

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GIOVANA BONAT CELLI

COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE FRUTOS DA  
PITANGUEIRA (*Eugenia uniflora* L.): CARACTERÍSTICAS DE  
INTERESSE PARA O CONSUMO HUMANO

CURITIBA  
2011

GIOVANA BONAT CELLI

COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE FRUTOS DA  
PITANGUEIRA (*Eugenia uniflora* L.): CARACTERÍSTICAS DE  
INTERESSE PARA O CONSUMO HUMANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Aducto B. de Pereira Netto

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Trust Beta


CURITIBA  
2011

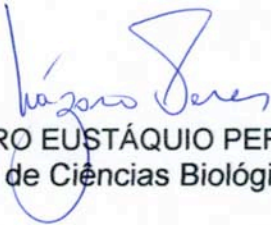
**GIOVANA BONAT CELLI**

**COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO E BIOQUÍMICO DA  
PITANGUEIRA (*Eugenia uniflora* L.): CARACTERÍSTICAS DE  
INTERESSE PARA O CONSUMO HUMANO**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador:

  
Prof. Dr. ADAUCTO BELLARMINO DE PEREIRA NETTO  
Setor de Ciências Biológicas, UFPR

  
Prof. Dr. LÁZARO EUSTÁQUIO PEREIRA PERES  
Departamento de Ciências Biológicas, USP

  
Prof. Dr. BEATRIZ HELENA LAMEIRO DE NORONHA SALES MAIA  
Setor de Ciências Exatas, UFPR

Curitiba, 18 de março de 2011.

Dedico este trabalho aos meus pais, Ivo e Jussara.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à CAPES e ao CBIE (*Canadian Bureau for International Education*), pelo suporte financeiro e ao segundo por possibilitar a minha ida ao Canadá.

Ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, ao Food Science Department e ao Richardson Centre for Functional Foods and Nutraceuticals pelo apoio e oportunidade.

Ao professor Aducto B. de Pereira Netto e à professora Trust Beta pela orientação e o tempo dispensado.

Aos amigos da bioquímica, pelas dicas valiosas e os momentos de descontração.

Aos amigos que deixei no Canadá. Sem vocês, teria sido muito mais difícil.

Aos técnicos que me ajudaram na realização deste trabalho – Michael e Alison, do Food Science Department; Rakesh, do Richardson Centre, e Silvana, da UFPR. A paciência de vocês foi fundamental.

Aos professores que fizeram parte desta trajetória e que de alguma forma contribuíram para este trabalho. Em especial ao professor Álvaro Mathias, pela amizade e conselhos.

À todos que abriram suas casas e me cederam gentilmente suas estimadas pitangas – Tio João, Tina e Juliana.

Às amigas Adélia e Marcela, que ajudaram na correção deste trabalho. Às amigas de longa data, por entenderem meus momentos de ausência.

Aos amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos.

Agradeço especialmente meus pais, Ivo e Jussara, por estarem ao meu lado em mais uma etapa da minha vida, me apoiarem incondicionalmente e ser o ombro para que eu pudesse “chorar as pitangas”. Ao Luiz, por toda a ajuda dispensada durante este trabalho e pelo suporte. Você e meus pais são os maiores *experts* em pitangas.

Agradeço à todas as outras pessoas que estiveram comigo nestes dois anos.

Success is the ability to go from one failure  
to another with no loss of enthusiasm.

Sir Winston Churchill

## RESUMO

A melhor caracterização dos atributos fisiológicos e bioquímicos de frutos da pitangueira deverá aumentar significativamente o apelo comercial destes frutos. A determinação do perfil de flavonóides durante o desenvolvimento de frutos da pitangueira é extremamente importante para a indústria de alimentos já que permite prever o melhor estágio de colheita e o processamento dos frutos para garantir que o produto comercial contenha quantidades consideráveis destes compostos funcionais. Os objetivos deste estudo foram caracterizar o perfil de flavonóides durante os estádios de desenvolvimento de frutos de duas variedades de pitangueira (vermelha e roxa) e o comportamento fisiológico de frutos tratados com etileno e seus inibidores. Frutos no estágio verde apresentaram a maior atividade antioxidante, medida como atividade sequestradora de DPPH• (17,18 e 18,13 mmol equivalentes de Trolox/100 g de fruto seco para as variedades vermelha e roxa, respectivamente), e também o maior conteúdo de fenólicos totais (4,14 e 5,18 g de equivalentes de ácido ferúlico/100 g de fruto seco para as variedades vermelha e roxa, respectivamente). O uso de espectrometria de massas permitiu a identificação de cianidina 3-O-glucosídeo, miricetina 3-O-hexosídeo, miricetina 3-O-pentosídeo, miricetina 3-O-ramnosídeo, quercetina 3-O-hexosídeo, quercetina 3-O-pentosídeo, quercetina 3-O-ramnosídeo e miricetina deoxihexosídeo-galato em ambas as variedades de pitangueira. O etileno acelerou o amaciamento e a coloração de frutos comparados ao controle, enquanto frutos tratados com aminoetoxivinilglicina (inibidor da biossíntese) e tiosulfato de prata (inibidor da ação do etileno) apresentaram atraso no desenvolvimento de cor e amadurecimento. Os dados deste estudo indicam que frutos da pitangueira são ricos em antioxidantes naturais e sugerem a possibilidade de manipular o amadurecimento destes frutos. Espera-se estimular uma maior utilização destes frutos, pela população em geral e pela indústria de alimentos, como fonte de fitoquímicos bioativos promotores da saúde humana.

Palavras chave: Frutos da pitangueira. Estádios de desenvolvimento. Flavonóides. Atividade Antioxidante. Etileno.

## ABSTRACT

A better characterization of the physiological and biochemical features of Brazilian cherry fruits is expected to significantly increase their marketing appeal. The determination of the flavonoids profile during the development of Brazilian cherry fruits is extremely important to the food industry since they can predict the best harvest stage and how to process the fruits to ensure that the commercial product contains considerable amounts of these functional compounds. The objectives of this study were to characterize the flavonoids profile during the developmental stages of Brazilian cherry fruits from two varieties, red and purple, and the physiological behavior of fruits treated with ethylene and its inhibitors. Fruits at the green stage presented the highest antioxidant activity, measured as DPPH• scavenging activity (17.18 and 18.13 mmol Trolox equivalents/ 100 g dried fruits for the red and purple varieties, respectively), and total phenolic content (4.14 and 5.81 g of ferulic acid equivalents/100 g dried fruit for the red and purple varieties, respectively), as well. Use of tandem mass spectrometry allowed the identification of cyanidin 3-*O*-glucoside, myricetin 3-*O*-hexoside, myricetin 3-*O*-pentoside, myricetin 3-*O*-rhamnoside, quercetin 3-*O*-hexoside, quercetin 3-*O*-pentoside, quercetin 3-*O*-rhamnoside, and myricetin deoxyhexoside-gallate in both varieties of Brazilian cherry. Ethylene enhanced fruit softening and color compared to the control, while fruits treated with aminoethoxyvinylglycine (biosynthesis inhibitor) and silver tiosulphate (ethylene action inhibitor) had delayed colour development and ripening. Our data indicate that Brazilian cherry fruits are rich in natural antioxidants and suggest the possibility to manipulate the ripening of these fruits. It is expected to stimulate a wider use of these fruits by the general population and the food industry as a source of bioactive human health promoter phytochemicals.

Key words: Brazilian cherry fruits. Developmental stages. Flavonoids. Antioxidant activity. Ethylene.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - SETORES DO MERCADO GLOBAL DE ALIMENTOS FUNCIONAIS/FORTIFICADOS EMBALADOS E BEBIDAS, EM 2006.....	18
FIGURA 2 - EXEMPLOS DE FLAVONÓIDES CUJA PRODUÇÃO É ALTERADA POR FATORES AMBIENTAIS.....	29
FIGURA 3 - ESQUEMA PROPOSTO PARA A COMPARTIMENTARIZAÇÃO DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NA BIOSÍNTESE DE ANTOCIANINAS.....	30
FIGURA 4 - ESQUEMA DAS VIAS PRINCIPAIS DA BIOSÍNTESE DOS FLAVONÓIDES .....	34
FIGURA 5 - AS TRÊS PRINCIPAIS CLASSES DE FLAVONÓIDE.....	36
FIGURA 6 - SUBGRUPOS DOS FLAVONÓIDES .....	36
FIGURA 7 - SUBGRUPOS DE ISOFLAVONÓIDES.....	37
FIGURA 8 - SUBGRUPOS DE NEOFLAVONÓIDES .....	38
FIGURA 9 - FLAVONÓIDES MENORES.....	38
FIGURA 10 - POSSÍVEIS ALTERAÇÕES DAS ANTOCIANINAS EM MEIO AQUOSO EM FUNÇÃO DO PH .....	40
FIGURA 11 - REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO DAS ANTOCIANINAS .....	41
FIGURA 12 - HIDRÓLISE DA RUTINA E QUERCITRINA POR ENZIMAS BACTERIANAS .....	44
FIGURA 13 - CLIVAGEM DO ANEL C DA QUERCETINA.....	45
FIGURA 14 - ESTRUTURA QUÍMICA DA QUERCETINA, COM INDICAÇÃO DOS GRUPOS QUE CONFEREM A PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE.....	46
FIGURA 15 – EXTRATOS BRUTOS DAS VARIEDADES VERMELHA (ESQUERDA) E ROXA (DIREITA) .....	49
FIGURA 16 - CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL (CFT) DE EXTRATOS BRUTOS DE POLPA DE FRUTOS DAS VARIEDADES VERMELHA (ESQUERDA) E ROXA (DIREITA) DE PITANGUEIRA .....	55
FIGURA 17 - CONTEÚDO DE FLAVONÓIDES TOTAIS DE EXTRATOS BRUTOS DE POLPA DE FRUTOS DAS VARIEDADES VERMELHA (ESQUERDA) E ROXA (DIREITA) DE PITANGUEIRA .....	56
FIGURA 18 - ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAL LIVRE DE EXTRATOS BRUTOS DE POLPA DE FRUTOS DAS VARIEDADES VERMELHA (ESQUERDA) E ROXA (DIREITA) DE PITANGUEIRA (APÓS 30 MINUTOS).....	58
FIGURA 19 - CROMATOGRAMA LC COMPLETO (0 - 35 MINUTOS) REGISTRADO EM 350 nm PARA FRUTOS NO ESTÁDIO ROXO DE PITANGUEIRA (VARIEDADE ROXA).....	61
FIGURA 20 - FORMAÇÃO DO ÍON RADICAL AGLICONA POR GLICOSÍDEO DE MIRICETINA (PICO 4) (ESQUERDA) E DE QUERCETINA (PICO 5) (DIREITA).....	68
FIGURA 21 - ESTRUTURAS MOLECULARES DE CIANIDINA 3-O-GLUCOSÍDEO (ESQUERDA), MIRICETINA 3-O-RAMNOSÍDEO (CENTRO) E QUERCETINA 3-O-RAMNOSÍDEO (DIREITA) .....	69
FIGURA 22 - VIA DE FRAGMENTAÇÃO PROPOSTA PARA QUERCETINA 3-O-RAMNOSÍDEO (ESQUERDA) E MIRICETINA 3-O-RAMNOSÍDEO (DIREITA) .....	69
FIGURA 23 - VIA DE BIOSÍNTESE DO ETILENO .....	77
FIGURA 24 - MODELO ATUAL PROPOSTO PARA A VIA DE SINALIZAÇÃO DO ETILENO.....	78
FIGURA 25 - MODELO PROPOSTO PARA A SINALIZAÇÃO DO ETILENO PELOS RECEPTORES E CTR1 .....	83
FIGURA 26 - MUDANÇAS NA CONCENTRAÇÃO INTERNA DE ETILENO (IEC) (EM AZUL ESCURO) E PRODUÇÃO DE CO <sub>2</sub> (EM AZUL CLARO) DURANTE AMADURECIMENTO NORMAL DE BANANAS ANÃS CAVENDISH APÓS A COLHEITA .....	85
FIGURA 27 - PADRÃO DE RESPIRAÇÃO APÓS A COLHEITA DE ASPARGO (HASTE) (EM MARROM), FRUTOS CLIMATÉRICOS (TOMATE, EM VERMELHO, E ABACATE, EM VERDE), E FRUTO NÃO CLIMATÉRICO (UVA, EM ROXO) .....	86
FIGURA 28 - PADRÃO CLIMATÉRICO (EM VERDE CLARO) E NÃO CLIMATÉRICO (EM VERDE ESCURO) DA RESPIRAÇÃO EM FRUTOS EM AMADURECIMENTO.....	86
FIGURA 29 - DIAGRAMA DO SISTEMA CIELAB MOSTRANDO APENAS OS PLANOS a* E b* .....	96
FIGURA 30 - DIFERENÇAS TOTAIS DE COR MÉDIAS (ΔE) DOS FRUTOS TRATADOS COM ETILENO .....	99
FIGURA 31 - VALORES MÉDIOS DE FIRMEZA DE FRUTOS DA PITANGUEIRA TRATADOS COM ETILENO .....	100

FIGURA 32 - DIFERENÇAS TOTAIS DE COR MÉDIAS ( $\Delta E$ ) DOS FRUTOS TRATADOS COM AVG	103
FIGURA 33 - VALORES MÉDIOS DE FIRMEZA DE FRUTOS DA PITANGUEIRA TRATADOS COM AVG	104
FIGURA 34 - DIFERENÇAS TOTAIS DE COR MÉDIAS ( $\Delta E$ ) DOS FRUTOS TRATADOS COM STS	107
FIGURA 35 - VALORES MÉDIOS DE FIRMEZA DE FRUTOS DA PITANGUEIRA TRATADOS COM STS	108

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESTIMATIVA DO TAMANHO DO MERCADO PARA PRODUTOS FUNCIONAIS EM REGIÕES ESPECÍFICAS (US\$ BILHÕES) .....	18
TABELA 2 - CAROTENÓIDES (EM $\mu\text{g/g}$ ) EM FRUTOS FRESCOS DA PITANGUEIRA COLHIDOS EM PERNAMBUCO, SÃO PAULO E PARANÁ.....	20
TABELA 3 - ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE DPPH• DE EXTRATOS DE POLPA DE FRUTOS DAS VARIEDADES VERMELHA E ROXA DE PITANGUEIRA, EM PORCENTAGEM .....	59
TABELA 4 - TEMPO DE RETENÇÃO, ABSORÇÃO UV MÁXIMA, MASSA MOLECULAR DESPROTONADA E INTENSIDADE RELATIVA DOS ÍONS DOS PICOS 1 - 8.....	62
TABELA 5 - IDENTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINA E GLICOSÍDEOS DE FLAVONÓIS EM FRUTOS DA PITANGUEIRA POR HPLC-MS/MS, EM MODO NEGATIVO .....	67
TABELA 6 - CONTEÚDO DE FLAVONÓIDES GLICOSILADOS ( $\mu\text{g}$ AGLICONA EQUIVALENTES/g FRUTO SECO) EM POLPA DE FRUTOS DAS VARIEDADES VERMELHA E ROXA DE PITANGUEIRA, EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO .....	70
TABELA 7 - LISTA DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA MYRTACEAE NAS QUAIS OS FLAVONÓIDES IDENTIFICADOS NESTE ESTUDO FORAM PREVIAMENTE REPORTADOS .....	72
TABELA 8 - PROPRIEDADES DE COR DOS FRUTOS DA PITANGUEIRA ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM ETILENO.....	98
TABELA 9 - PROPRIEDADES DE COR DOS FRUTOS DA PITANGUEIRA ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM AVG .....	103
TABELA 10 - PROPRIEDADES DE COR DOS FRUTOS DA PITANGUEIRA ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM STS .....	107

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	16
2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS	16
2.2 PITANGUEIRA	19
2.2.1 Características botânicas da pitangueira	19
2.2.2 Características do fruto da pitangueira	20
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	22
<b>4 OBJETIVOS</b>	23
4.1 OBJETIVO GERAL	23
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
<b>CAPÍTULO 1 – PERFIL DE FLAVONÓIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE</b>	24
<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	25
1.1 FLAVONÓIDES	25
1.1.1 Biossíntese de flavonóides	26
1.1.2 Classificação dos flavonóides	35
1.1.3 Antocianinas	39
1.1.4 Efeitos dos flavonóides sobre a fisiologia de plantas	41
1.1.5 Efeitos dos flavonóides sobre sistemas biológicos distintos das plantas	43
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	48
2.1 MATERIAIS	48
2.1.1 Material vegetal	48
2.1.2 Padrões e solventes	48
2.2 MÉTODOS	49
2.2.1 Preparo do extrato bruto	49
2.2.2 Determinação do conteúdo fenólico total (CFT)	50
2.2.3 Determinação do conteúdo de flavonóides totais	50
2.2.4 Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH	51
2.2.5 Análise por HPLC-MS/MS	51
2.2.6 Análise estatística	52
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	54
3.1 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL (CFT)	54
3.2 CONTEÚDO DE FLAVONÓIDES TOTAIS	56
3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH	57
3.4 CORRELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CFT DE EXTRATOS BRUTOS DE FRUTOS DA PITANGUEIRA	59
3.5 IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES GLICOSILADOS	60
3.5.1 Identificação de glicosídeo de cianidina	63
3.5.2 Identificação de glicosídeos de miricetina	64
3.5.3 Identificação de glicosídeos de quercetina	66
3.6 QUANTIFICAÇÃO DOS FLAVONÓIDES GLICOSILADOS	69
<b>CAPÍTULO 2 – EFEITOS DO ETILENO E SEUS INIBIDORES SOBRE COLORAÇÃO E TEXTURA</b>	75
<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	76
1.1 BIODISSÍNTese E MECANISMO DE SINALIZAÇÃO DO ETILENO	76
1.1.1 Frutos Climatericos x Não Climatericos	83
1.1.2 Efeitos adicionais do etileno	89
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	92
2.1 MATERIAIS	92
2.1.1 Material vegetal	92
2.1.2 Reagentes	92
2.2 MÉTODOS	93
2.2.1 Tratamento com etileno	93
2.2.2 Tratamento com aminoetoxivinilglicina (AVG)	93
2.2.3 Tratamento com tiosulfato de prata (STS)	93
2.2.4 Condições de armazenamento dos frascos	94

2.2.5 Medida objetiva de cor .....	94
2.2.6 Avaliação da firmeza .....	96
2.2.7 Análise estatística .....	97
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>98</b>
3.1 Frutos tratados com etileno.....	98
3.2 Frutos tratados com AVG .....	102
3.3 Frutos tratados com STS .....	105
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>113</b>
<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>114</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>115</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Eugenia uniflora* L. (família Myrtaceae), popularmente conhecida como pitangueira, é uma árvore nativa das regiões sul e sudeste do Brasil (LIMA; MÉLO; LIMA, 2005). Suas folhas são popularmente usadas por seus efeitos antihipertensivos, diuréticos, adstringentes, antipiréticos e para o tratamento de desordens digestivas (FIUZA *et al.*, 2008). Seu fruto apresenta sabor doce e ácido característicos, com aroma peculiar intenso. Com a maturação, o epicarpo evolui de verde a vermelho e, em alguns casos, chega a uma coloração quase negra (BEZERRA; SILVA; LEDERMAN, 2000).

No país, o maior plantio de pitangueira em escala comercial, pertencente à empresa Bonito Agrícola Ltda., encontra-se no município de Bonito (PE). Estima-se que a produção comercial anual de frutos da pitangueira no estado de Pernambuco seja de 1.300 a 1.700 toneladas (SILVA, 2006). A colheita do fruto é normalmente feita a partir do terceiro ano de plantio e 50 dias após a floração (BEZERRA; SILVA; LEDERMAN, 2000).

Assim como outras plantas superiores, *Eugenia uniflora* L. produz tanto metabólitos classificados como primários quanto secundários. Nos últimos duzentos anos de biologia e química modernas foram descritos os papéis de metabólitos primários em funções vitais básicas como divisão celular e crescimento, respiração, armazenamento e reprodução. Graças ao aperfeiçoamento de técnicas bioquímicas e a ascensão da biologia molecular, demonstrou-se claramente que metabólitos secundários têm um importante papel na adaptação de plantas ao seu ambiente. Estes compostos foram assim nomeados por não apresentarem nenhuma função metabólica clara. Acreditava-se que, por sua grande diversidade estrutural e distribuição, metabólitos secundários eram “lixo celular” (SWAIN, 1977). Tais metabólitos estão presentes em todas as plantas superiores na forma ativa ou como “pró-droga”, e contribuem grandemente para a saúde da planta por interagir com os ecossistemas, agindo como antibióticos, antifúngicos e antivirais (BOURGAUD *et al.*, 2001; WINK, 2003), mantendo a integridade geral da planta contra competidores, predadores e patógenos (SWAIN, 1977).

Os estudos sobre flavonóides, um exemplo de metabólito secundário, foram impulsionados pelo chamado “paradoxo francês”, considerado uma “anomalia

dietética”: baixa incidência de mortalidade cardiovascular observada em populações mediterrâneas associada a dieta rica em gordura saturada e ao consumo moderado de vinho tinto (RENAUD; LORGERIL, 1992; NIJVELDT *et al.*, 2001). O estudo dos compostos encontrados no vinho tinto sugeriu que os flavonóides são benéficos na longevidade e na proteção do sistema cardiovascular (FORMICA; REGELSON, 1995).

Além da pigmentação, os flavonóides atuam como compostos sinalizadores ou na defesa entre plantas e microrganismos, na fertilidade de algumas espécies e na proteção contra radiação ultravioleta (WINKEL-SHIRLEY, 2001). Em relação à saúde humana, estudos epidemiológicos e *in vitro* indicaram que flavonóides seriam capazes de induzir sistemas enzimáticos protetores, sugerindo efeitos benéficos contra doenças cardiovasculares, câncer e outras doenças crônicas não transmissíveis (COOK; SAMMAN, 1996).

O etileno é um hormônio vegetal que afeta muitos eventos durante o crescimento e desenvolvimento da planta (STEPANOVA; ECKER, 2000), além de regular a resposta ao estresse biótico e abiótico (SOLANO; ECKER, 1998). O precursor da biossíntese do etileno é a metionina (YANG; HOFFMAN, 1984), aminoácido também requerido para a síntese protéica. A metionina é convertida em S-adenosil L-metionina (GIOVANELLI; MUDD; DATKO, 1985; RAVANEL *et al.*, 1998) que, por sua vez, é transformada em ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) (ADAMS, YANG, 1979). Posteriormente, ACC é oxidado liberando etileno, CO<sub>2</sub> e cianeto (YANG; HOFFMAN, 1984).

Animais dispersores de sementes são atraídos pelo amadurecimento de frutos carnosos (GIOVANNONI, 2001). A classificação de frutos em climatéricos e não climatéricos é essencial para qualquer discussão da importância do etileno em sistemas pós colheita. Esta categorização baseia-se na presença ou na ausência do aumento da respiração durante o amadurecimento (WATKINS, 2002). Tal pico de respiração é associado a produção autocatalítica de etileno (SUDHEER; INDIRA, 2007).

A aplicação de etileno exógeno é rotineiramente usada para iniciar o amadurecimento uniforme de alguns frutos. Por outro lado, as estratégias comerciais mais frequentes baseiam-se na minimização da produção e ação do etileno e/ou que evitem a exposição ao hormônio durante o amadurecimento, colheita, armazenamento e transporte do fruto (WATKINS, 2002).

Nesta dissertação, propõe-se caracterizar o perfil de flavonóides ao longo do período de desenvolvimento dos frutos da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) e os efeitos da aplicação de etileno e seus inibidores sobre a coloração e textura dos frutos. Estas análises, além de contribuírem significativamente para a elucidação dos mecanismos fisiológicos envolvidos no processo de amadurecimento de frutos da pitangueira, também auxiliarão na determinação do ponto ótimo de colheita e na escolha das tecnologias mais apropriadas para a colheita e o processamento dos frutos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Nos últimos anos, a alimentação deixou de ser vista apenas como uma maneira de sobreviver e passou a ser encarada como agente ativo na qualidade de vida da população (NOGUEIRA, 2008). Sem dúvida, uma nutrição ótima é fator chave que influencia tanto funções fisiológicas como psicológicas de um indivíduo. Foram as mudanças na compreensão sobre a relação entre nutrição e saúde que impulsionaram a oferta de alimentos ditos funcionais (MOLLET; ROWLAND, 2002).

A oferta de alimentos com benefícios a saúde foi feita pela primeira vez na década de 60, quando a mídia relacionou a incidência de algumas enfermidades com a ingestão excessiva de certos ingredientes associada ao estilo de vida desequilibrado, situação observada até hoje (NOGUEIRA, 2008). Neste contexto, ganharam cada vez mais espaço os alimentos funcionais, capazes de fornecer nutrientes da nutrição básica além de elementos com desempenhos terapêuticos específicos à saúde.

O termo funcional foi promovido pela primeira vez no Japão, na década de 80, por cientistas que estudaram a relação entre nutrição, satisfação sensorial, fortificação e modulação de sistemas fisiológicos (SIRÓ *et al.*, 2008). A denominação FOSHU (*Foods for Specified Health Uses*) foi empregada referindo-se a alimentos processados que auxiliam funções específicas do corpo (NOGUEIRA, 2008). Semelhante à essa definição é a apresentada pelo *Institute of Medicine's Food and Nutrition Board* (IOM/FNB), dos E.U.A.: “qualquer alimento ou ingrediente que possa proporcionar um benefício à saúde, além dos nutrientes tradicionais que eles contém”, ajudando a prevenir ou tratar certas doenças (HASLER, 1998; TERATANAVAT; HOOKER, 2006). Na Ásia, onde os alimentos funcionais são considerados como parte da cultura há muitos anos, existe uma forte convicção de que os alimentos e medicamentos têm a mesma origem e servem para o mesmo propósito (VERSCHUREN, 2002).

A caracterização de alimentos que podem apresentar alegações de propriedades funcionais, no Brasil, está apresentada na Resolução RDC nº18, de 30

de abril de 1999, que dispõe: “são permitidas alegações de função e ou conteúdo para nutrientes e não nutrientes, podendo ser aceitas aquelas que descrevem o papel fisiológico do nutriente ou não nutriente no crescimento, desenvolvimento e funções normais do organismo, mediante demonstração de eficácia” (BRASIL, 1999).

Como características, alimentos funcionais devem:

- ser alimentos convencionais e consumidos na dieta usual. Hábitos alimentares são difíceis de serem mudados. Por serem produtos normalmente consumidos, os alimentos funcionais não requerem alterações comportamentais drásticas por parte dos consumidores (KOTILAINEN *et al.*, 2006);
- ser constituídos por componentes naturais, algumas vezes, em altas concentrações ou presentes em alimentos que normalmente não os conteriam;
- possuir efeitos positivos sobre o organismo;
- a propriedade funcional alegada deve ter embasamento científico;
- pode ser o alimento cuja natureza e/ou biodisponibilidade de um ou mais componentes possa ter sido modificada;
- deve ser funcional para todos os membros da população ou apenas para grupos particulares definidos (DIPLOCK *et al.*, 1999).

Uma grande variedade de produtos alimentícios são, ou serão, caracterizados como alimentos funcionais, com uma gama de componentes – tanto classificados ou não como nutrientes – afetando diversas funções do corpo relevantes tanto para o bem estar e saúde e/ou na redução do risco de doenças (ROBERFROID, 2002).

Devido às diferentes definições para alimentos funcionais, existem dificuldades específicas para analisar o desenvolvimento deste ramo do mercado, resultando em grandes variações das estimativas (MENRAD, 2003; VERBEKE, 2005). Além disso, o mercado mundial de alimentos e bebidas funcionais é altamente dinâmico e, de certo modo, pode ser caracterizado como um ambiente experimental (BECH-LARSEN; SCHOLDERER, 2007). A TABELA 1 baseia-se em dados do NBJ (*Nutrition Business Journal*) e apresenta as estimativas para o mercado de alimentos funcionais em 1997, 2000 e 2005.

TABELA 1 - ESTIMATIVA DO TAMANHO DO MERCADO PARA PRODUTOS FUNCIONAIS EM REGIÕES ESPECÍFICAS (US\$ BILHÕES)

REGIÃO	1997	2000	2005
EUA	13,6	17,4	25,7
Europa	12,3	16,4	34,4
Japão	9,6	12,8	22,6
Canadá	0,4	0,6	1,0
Restante do mundo	3,0	4,1	5,9
<b>Total</b>	<b>38,9</b>	<b>51,3</b>	<b>89,6</b>

Fonte: CULHANE, 2002

Um aspecto em que todos os analistas parecem concordar é que o mercado para produtos funcionais vem crescendo rapidamente a cada ano (CULHANE, 2002). O mercado mundial destes produtos apresenta um crescimento anual nos valores das vendas próximo de 10% (KOTILAINEN *et al.*, 2006). Embora as estimativas para crescimento diminuam ao longo do tempo, os números impressionam quando comparados com a taxa de crescimento de 2 - 3% ao ano para a indústria de alimentos como um todo (VERBEKE, 2005). Considerando alimentos e bebidas funcionais juntamente com fortificados, houve um aumento de 9,6% (totalizando US\$95,9 bilhões) e 12,2% (totalizando US\$56,4 bilhões), respectivamente, do mercado mundial, em 2007. A previsão é que em 2012, a soma destes mercados totalize mais de US\$192,7 bilhões (BERRY, 2009). A FIGURA 1 apresenta os setores do mercado global de alimentos funcionais/fortificados, em 2006.

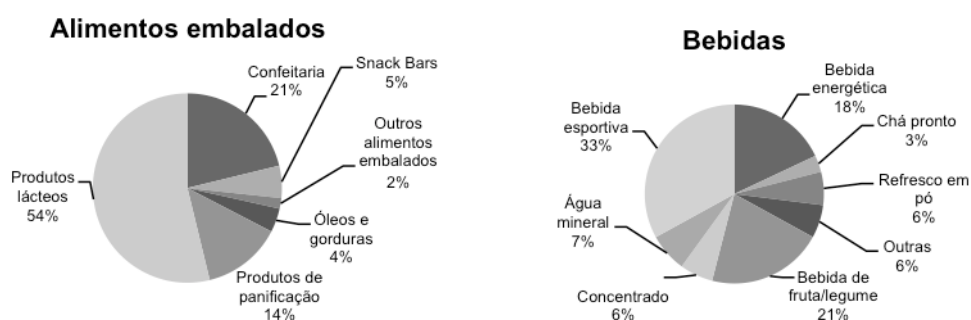


FIGURA 1 - SETORES DO MERCADO GLOBAL DE ALIMENTOS FUNCIONAIS/FORTIFICADOS EMBALADOS E BEBIDAS, EM 2006

Fonte: Adaptado de BERRY, 2009

O ponto chave para as indústrias de alimentos é desenvolver produtos aceitáveis pelos consumidores e consistentes com a compreensão e apreciação que tais consumidores têm em relação a alimentos funcionais dentro de uma dada cultura. Alimentos funcionais têm um importante papel na manutenção da saúde e na redução do risco de doenças (VERSCHUREN, 2002).

## 2.2 PITANGUEIRA

### 2.2.1 Características botânicas da pitangueira

O gênero *Eugenia* é um dos gêneros com maior número de espécies na família Myrtaceae, contando com mais de 500 espécies sendo que 400 das quais são encontradas no Brasil (FIUZA *et al.*, 2008). *Eugenia uniflora* L., popularmente conhecida como pitangueira, é originária da região que compreende o Brasil central até o norte da Argentina (BEZERRA; SILVA; LEDERMAN, 2000). Esta árvore é encontrada principalmente nas regiões sul e sudeste do Brasil (LIMA; MÉLO; LIMA, 2005), mas sua distribuição se fez ao longo de quase todo o território nacional e está presente em muitos centros de diversidade e domesticação brasileiros, que englobam diferentes ecossistemas tropicais, subtropicais e temperados (BEZERRA; SILVA; LEDERMAN, 2000). A pitangueira é cultivada, ainda, na América Central, nas Antilhas, na Flórida, na Califórnia, no Havaí, na China meridional, no Sri Lanka, na Argélia, na Tunísia e no sul da França (GOMES, 2007).

A pitangueira é uma árvore semidecídua de quatro a dez metros de altura, com copa estreita e tronco liso de cor pardo clara. As folhas são simples, de três a sete centímetros de comprimento e com aroma característico. As flores brancas são solitárias ou encontradas em grupos de duas ou três nas axilas e extremidades dos ramos (GOMES, 2007).

A propagação normalmente é feita pela semente, que origina plantas desuniformes e de baixa produtividade, com frutos de má qualidade. Outra opção é a enxertia por garfagem no topo em fenda cheia ou à inglesa simples. Nestes casos, pitangueiras com idade entre nove e doze meses podem ser usadas como porta-

enxerto. A enxertia permite a união de mais de um genótipo para gerar plantas com maior homogeneidade (BEZERRA *et al.*, 2002).

### 2.2.2 Características do fruto da pitangueira

A pitanga possui sabor doce e ácido agradáveis, com aroma peculiar intenso. O fruto é uma baga de aproximadamente 30 mm de diâmetro, achatada nas extremidades e com oito a dez sulcos longitudinais (GOMES, 2007). Com a maturação, o epicarpo evolui de verde a vermelho ou quase negro (BEZERRA; SILVA; LEDERMAN, 2000). Esta característica originou seu nome, que significa vermelho-rubro em tupi (LOPES, 2005).

A colheita do fruto é feita geralmente a partir do terceiro ano de plantio e 50 dias após a floração (BEZERRA; SILVA; LEDERMAN, 2000). Uma única árvore pode produzir de 2,5 a 3,0 kg de frutos/ano, sem irrigação. A maior parte da produção ainda deve-se a pequenos produtores.

A pitanga possui aproximadamente 66,2%(p/p) de polpa e o restante em sementes (VILLACHICA, 1996). Os carotenóides são uma importante classe de compostos de vias biossintéticas distintas do metabolismo primário encontrados em frutos da pitangueira (RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, 2008). Frutos frescos colhidos em Pernambuco, São Paulo e Paraná apresentaram diferentes concentrações de carotenóides (TABELA 2), por efeito da localização geográfica (CAVALCANTE, 1991; PORCU; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008). Além destes compostos, outra classe de grande importância em frutos da pitangueira é a dos flavonóides (LOPES, 2005).

TABELA 2 - CAROTENÓIDES (EM µg/g) EM FRUTOS FRESCOS DA PITANGUEIRA COLHIDOS EM PERNAMBUCO, SÃO PAULO E PARANÁ

Composto	Pernambuco <sup>1</sup>	São Paulo <sup>2</sup>	Paraná <sup>2</sup>
licopeno	73,0	71,1	14,0
γ-caroteno	52,7	3,8	1,6
β-criptoxantina	47,0	11,8	12,8
rubixantina	23,0	9,4	11,5
fitoflueno	13,1	nq	Nq
β-caroteno	9,5	3,2	2,6
ζ-caroteno	4,7	nq	nq

Fonte: <sup>1</sup>CAVALCANTE, 1991; <sup>2</sup>PORCU; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008

Nota: nq - não quantificado

Os frutos da pitanga são extremamente perecíveis e não duram mais que alguns dias após a colheita. A temperatura de armazenamento exerce forte influência sobre a qualidade destes frutos. A desvalorização comercial dos frutos ocorre quando as perdas em peso variam de 3 a 6%. O congelamento promove a perda da rigidez pela formação de cristais de gelo no interior das células (MÉLO; LIMA; NASCIMENTO, 2000).

A pitanga foi introduzida na medicina empírica pelos índios guaranis no século XV (FIUZA *et al.*, 2008). Popularmente, a infusão preparada com as folhas é utilizada como antihipertensivo, diurético (CONSOLINI; SARUBBIO, 2002), adstringente, antipirético e para redução dos níveis de colesterol e ácido úrico (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 1987). Na Ilha da Madeira, a oeste da costa africana, o chá preparado com as folhas é utilizado no tratamento de bronquite, gripe, para alívio da tosse, e o fruto para problemas intestinais (RIVERA; OBÓN, 1995). Há evidências que o extrato etanólico de folhas secas – por ação dos flavonóides – possui atividade inibitória da enzima xantina-oxidase, envolvida na conversão de xantina a ácido úrico (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 1987; THEODULOZ *et al.*, 1988), além de promover a diminuição da hiperglicemia e hipertrigliceridemia em animais por inibição da degradação de carboidratos e gorduras e da absorção intestinal de glucose (ARAI *et al.*, 1999). O extrato etanólico das folhas secas apresentou, ainda, atividade antifúngica contra dermatófitos (SOUZA *et al.*, 2002), e antibacteriana moderada contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (HOLETZ *et al.*, 2002). O extrato aquoso de folhas secas, por sua vez, mostrou fraca ação diurética, possivelmente relacionada ao aumento do fluxo sanguíneo renal, com diminuição da pressão sanguínea por vasodilatação direta (CONSOLINI; BALDINI; AMAT, 1999). Efeito antiinflamatório e aumento do tempo de sono induzido por pentobarbital foi relatado com o uso de infusão de folhas frescas (SCHAPOVAL *et al.*, 1994).

### 3 JUSTIFICATIVA

A revisão da literatura mostra que ainda há pouca informação a respeito de mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos no processo de amadurecimento de frutos da pitangueira. Tais informações são fundamentais para o processamento e armazenamento destes frutos pela indústria de alimentos.

Além de ser altamente desejável para o consumo *in natura*, os frutos da pitangueira também são usados para a produção de suco, polpa congelada e sorvete. A melhor caracterização das propriedades antioxidantes dos frutos da pitangueira deverá aumentar o apelo comercial destes frutos e, conseqüentemente, o interesse da indústria alimentícia em sua utilização. Além disso, espera-se aumentar a rentabilidade de pequenos produtores, que são responsáveis pela maior parte da produção destes frutos.

A alta perecibilidade dos frutos da pitangueira é o principal fator limitante da vida de prateleira destes frutos. Caracterizando-se o comportamento fisiológico dos frutos da pitangueira frente ao tratamento com o etileno e seus inibidores, espera-se sugerir técnicas que viabilizem sua conservação.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as características fisiológicas e bioquímicas dos frutos da pitangueira de interesse para a indústria de alimentos.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil de variação de flavonóides ao longo do seu período de amadurecimento;
- Avaliar a atividade antioxidante total dos frutos da pitangueira visando sua posterior utilização em produtos comerciais considerados como funcionais;
- Avaliar alterações induzidas pelo etileno exógeno e inibidores da biossíntese e do mecanismo de ação do etileno sobre a coloração e a textura de frutos da pitangueira que possibilitem a sua conservação.

**CAPÍTULO 1 – PERFIL DE FLAVONÓIDES E ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE**

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 FLAVONÓIDES

Os compostos sintetizados pelas plantas podem ser tradicionalmente classificados como metabólitos primários e secundários. Metabólitos primários são produzidos por todas as plantas e, geralmente, essenciais à sobrevivência. Esta classe está envolvida na fotossíntese, respiração, crescimento e desenvolvimento, e inclui fitoesteróis, nucleotídeos, aminoácidos, ácidos orgânicos, entre outros. Os metabólitos secundários (ou especializados), por sua vez, são estruturalmente diversos e muitos são distribuídos em um número limitado de espécies no reino vegetal (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2006). Estes compostos tem papel chave na manutenção da planta contra infecções, ataque de herbívoros, radiação ultravioleta, na atração de polinizadores e na sinalização (AHARONI; GALILI, 2010).

Metabólitos secundários podem ser divididos em três grupos principais: a) flavonóides, compostos fenólicos e polifenólicos; b) terpenóides/isoprenóides, e c) compostos contendo nitrogênio e enxofre, como alcalóides e glucosinolatos, respectivamente (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2006). Os compostos destas classes são produzidos por vias biossintéticas diferentes daquelas dos metabólitos primários (AHARONI; GALILI, 2010).

Há alguns anos, existiam poucos estudos sobre os mecanismos de ação dos flavonóides, mas sabia-se que estes compostos possuíam um amplo espectro de atividade biológica (ROBAK; GRYGLEWSKI, 1996). Na década de 30, Szent-György e colaboradores sugeriram que certos flavonóides agiam como vitamina, nomeando de vitamina P (ou citrina) uma mistura de flavonóides isolados de laranjas (KÜHNAU, 1976; NIJVELDT *et al.*, 2001). Tais flavonóides aumentaram ou estabilizaram a atividade biológica do ácido ascórbico levando a conclusão que o escorbuto seria uma avitaminose combinada de vitamina C e P (KÜHNAU, 1976). Depois desta descoberta, aproximadamente 9.000 flavonóides foram identificados em plantas (WOO; JEONG; HAWES, 2005).

Além da pigmentação, os flavonóides atuam na sinalização entre plantas e micróbios, no aroma, na fertilidade de algumas espécies, na defesa como agentes

antimicrobianos e na proteção a radiação ultravioleta (WINKEL-SHIRLEY, 2001); atuam, ainda, no controle do efluxo de auxinas (BROWN *et al.*, 2001), hormônio vegetal essencial para o crescimento e desenvolvimento da planta (LOMAX; MUDAY; RUBERY, 1995; FRIML, 2003). Em relação à saúde humana, estudos indicam que os flavonóides seriam capazes de induzir sistemas enzimáticos protetores; e inúmeros trabalhos epidemiológicos sugerem efeitos benéficos contra doenças cardiovasculares, câncer e outras doenças crônicas não transmissíveis (COOK; SAMMAN, 1996).

### 1.1.1 Biossíntese de flavonóides

Plantas são organismos dinâmicos e, por isso, não é de surpreender que os metabólitos secundários variam dentro da própria planta, geneticamente entre indivíduos e temporalmente ao longo de uma estação ou em anos sucessivos (BROOKS; FEENY, 2004).

Os genes para síntese dos flavonóides são regulados de maneira específica nas diferentes partes da planta durante seu desenvolvimento e por uma variedade de fatores ambientais, como:

- a) sazonalidade, ritmo circadiano (ciclo dia/noite) e desenvolvimento da planta: a concentração dos metabólitos secundários, incluindo flavonóides, não é constante durante o ano (CLARK; CLARK, 1990; BROOKS; FEENY, 2004). Outros fatores que afetam apreciavelmente esta concentração são o ciclo dia/noite, a idade e o desenvolvimento da planta, sendo que tecidos mais novos normalmente possuem uma taxa biossintética de flavonóides mais elevada (BOWERS; STAMP, 1993; GOBBO-NETO; LOPES, 2007);
- b) temperatura: estudos relacionando a influência da temperatura isoladamente na produção de metabólitos secundários são escassos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Segundo o trabalho desenvolvido por Christie, Alfenito e Walbot (1994), as baixas temperaturas e o tempo ao qual mudas de milho (*Zea mays* L.) foram expostas exerceram forte influência sobre os níveis de antocianinas e RNAm para enzimas chave da via dos fenilpropanóides, como PAL (fenilalanina amônia-liase) e chalcona sintase;

c) disponibilidade hídrica: muitas espécies de plantas superiores têm necessidades de recursos qualitativamente similares para crescimento e reprodução, mas diferem na forma que utilizam tais recursos (BAZZAZ *et al.*, 1987). Gray e colaboradores (2003) relataram um aumento significativo na concentração de flavonóides em *Echinacea purpurea* (L.) Moench submetida à estresse hídrico. O mesmo efeito foi observado sobre a concentração de antocianinas em folhas jovens de *Arabidopsis*, possivelmente pelo papel destes compostos na captura de espécies reativas de oxigênio em plantas sob estresse (JUNG, 2004);

d) intensidade de radiação ultravioleta: flavonóides absorvem comprimentos de onda seletivamente, permitindo que radiação visível (400-700 nm) chegue aos cloroplastos, removendo grande parte da radiação UV-B (280-320 nm) prejudicial (CALDWELL; ROBBERECHT; FLINT, 1983). Esta radiação danosa tem a capacidade de induzir a síntese de enzimas da via biossintética de fenilpropanóides (ZUCKER, 1972; BHARTI; KHURANA, 1997), além de contribuir para a redução da biomassa, a diminuição na porcentagem de germinação do pólen, a redução ou estímulo do crescimento de algumas partes da planta (internodos e brotos axilares, respectivamente), a diminuição da área das folhas, das quantidades de clorofilas, carotenóides e galactolipídeos dos cloroplastos e a deformação de estruturas epidermais (TEVINI; IWANZIK; THOMA, 1981; FLINT; CALDWELL, 1984; SULLIVAN; TERAMURA, 1988; BARNES; FLINT; CALDWELL, 1990). Estudos mostraram uma correlação positiva entre a intensidade de radiação solar e a produção de flavonóides (TEVINI; IWANZIK; THOMA, 1981; TEVINI; BRAUN; FIESER, 1991; BEGGS; WELLMAN, 1985; ALENIUS; VOGELMANN; BORNMAN, 1995; CUADRA; HARBORNE; WATERMAN, 1997; TATTINI *et al.*, 2004). Este aumento, principalmente em tecidos superficiais, pode ser explicado pelo efeito dos compostos em condições de estresse luminoso excessivo, que acarretam mudanças na expressão de genes responsáveis pela resistência à UV-B (CUADRA; HARBORNE; WATERMAN, 1997; BIEZA; LOIS, 2001; TATTINI *et al.*, 2004). A indução de genes dos flavonóides também pode ocorrer pelo receptor específico para a luz azul (criptocromo 1, CRY1), apesar de não ser tão eficiente quanto a radiação UV-B (KUBASEK *et al.*, 1992);

- e) disponibilidade de nutrientes: o balanço carbono/nitrogênio vem sendo implicado como um importante fator na defesa química e palatabilidade das plantas à herbívoros. No estudo desenvolvido por Dustin e Cooper-Driver (1992), a adição de fertilizantes nitrogenados antes do florescimento de *Dennstaedtia punctilobula* (Michx.) T. Moore diminuiu os níveis de fenólicos totais e taninos condensados enquanto a aplicação após o florescimento tendeu a aumentar os teores destes compostos (IASON; HARTLEY; DUNCAN, 1993). A adição de fertilizantes também levou à diminuição de proantocianidinas, catequina e flavonóides nas folhas em *Befula pendula* Roth. e o efeito inverso foi observado com o aumento do fornecimento de CO<sub>2</sub> (LAVOLA; JULKUNEN-TIITTO, 1994);
- f) altitude: além de afetar o desenvolvimento da planta, acredita-se que a altitude tenha uma correlação positiva com o conteúdo total de flavonóides, possivelmente pela maior susceptibilidade à radiação UV em maiores altitudes (GOBBO-NETO; LOPES, 2007);
- g) poluição atmosférica: existem poucos trabalhos enfocando este fator na alteração do metabolismo secundário. Os estudos analisam principalmente os efeitos de níveis elevados de O<sub>2</sub> ou de CO<sub>2</sub> no metabolismo de derivados fenólicos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007);
- h) indução por estímulos mecânicos (ferimentos) ou ataque de patógenos: ferimentos ou estímulos causados pelos mais diversos fatores – chuva, granizo, vento, areia, ataques de herbívoros etc. – podem afetar a produção de metabólitos secundários, levando a uma resposta bioquímica que torna o órgão ou todo o organismo inaceitável para ataques futuros (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A FIGURA 2 apresenta alguns exemplos de fatores ambientais que podem alterar a concentração de determinados metabólitos.

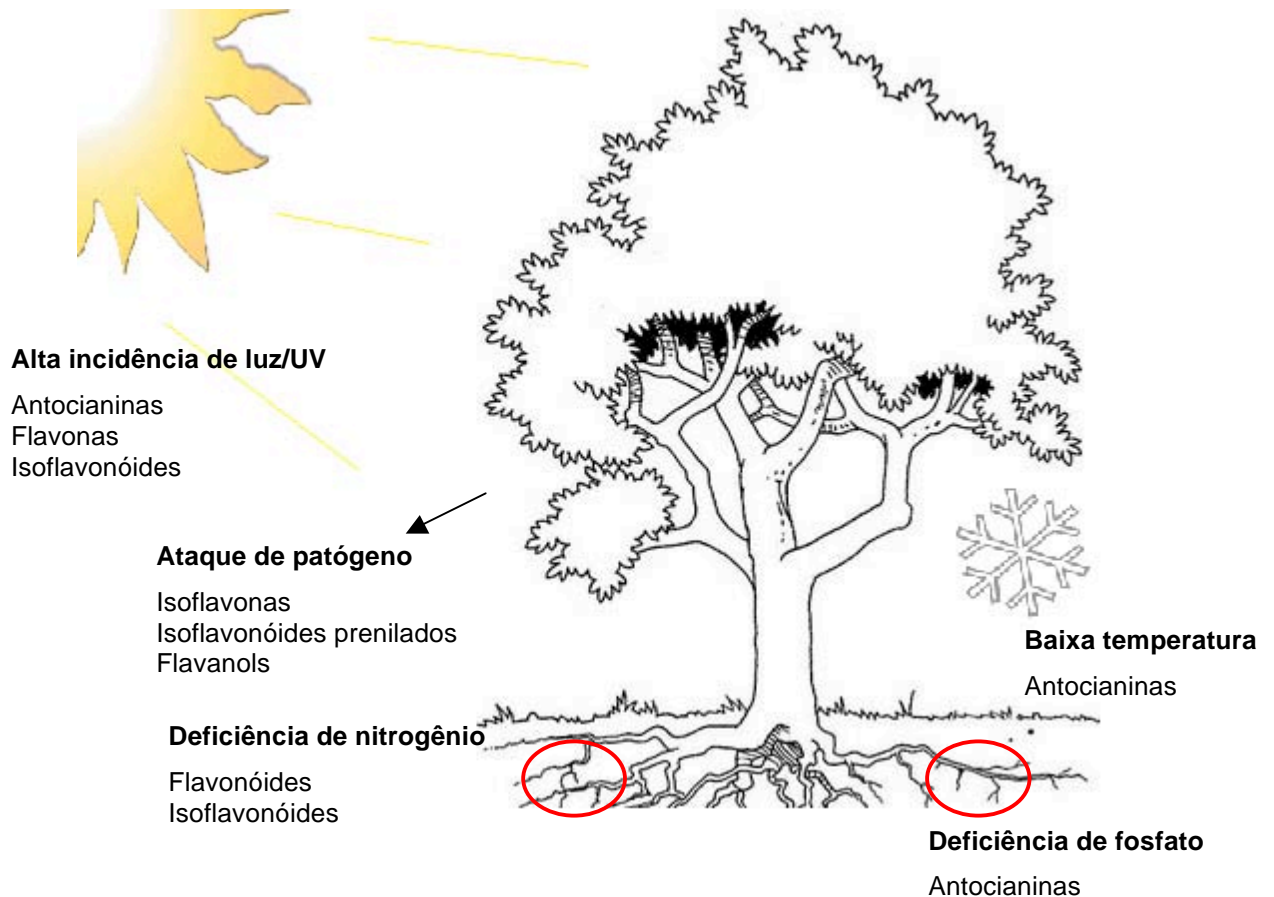


FIGURA 2 - EXEMPLOS DE FLAVONÓIDES CUJA PRODUÇÃO É ALTERADA POR FATORES AMBIENTAIS

Fonte: Adaptado de DIXON; PAIVA, 1995

A localização sub-celular da biossíntese de fenilpropanóides ainda é um tema de discussão. Muitos compostos se acumulam em vacúolos, comumente na forma de glicosídeos ou outros conjugados. Estudos mostraram que flavonóides e antocianinas induzidos por luz UV se acumulam especificamente nas células epidérmicas superiores, mas não se pode determinar se foram sintetizados por estas células ou foram transportados por células adjacentes. Outros estudos indicaram que fenilpropanóides, cuja produção é induzida por estresse, usualmente acumulam-se nas células em que foram sintetizados (DIXON; PAIVA, 1995).

Pesquisas que investigaram o transporte de antocianinas e flavonóides para dentro dos vacúolos indicaram a ocorrência de transporte ativo via proteína carreadora específica. Hopp e Sietz (1987), estudando vacúolos isolados de cenoura (*Daucus carota* L.), concluíram que o transporte de antocianina é dependente da estrutura molecular. A acilação dos compostos secundários tem um papel fundamental no transporte e armazenamento nos vacúolos. Os autores ainda

sugerem uma alteração conformacional da molécula de antocianina como uma consequência das condições ácidas no interior do vacúolo. A acilação é importante para esta classe de compostos para a proteção contra a adição de água na molécula e consequente perda de cor dentro do vacúolo (HOPP; SIETZ, 1987).

Além do armazenamento, os vacúolos estão envolvidos na biossíntese de produtos secundários de plantas, como as antocianinas, como proposto por Fritsch e Grisebach (1975) (FIGURA 3). Hopp e Sietz (1987) detectaram uma porção considerável (59%) de chalcona sintase associada com os vacúolos isolados. Em contrapartida, alguns estudos indicam o retículo endoplasmático como sítio do metabolismo de fenilpropanóides e flavonóides. Todas as funções citadas anteriormente argumentam contra a opinião que o vacúolo é apenas um depósito “passivo” de lixo, onde os metabólitos se acumulam unicamente devido a gradientes de pH e o grau de ionização (DIXON; PAIVA, 1995).

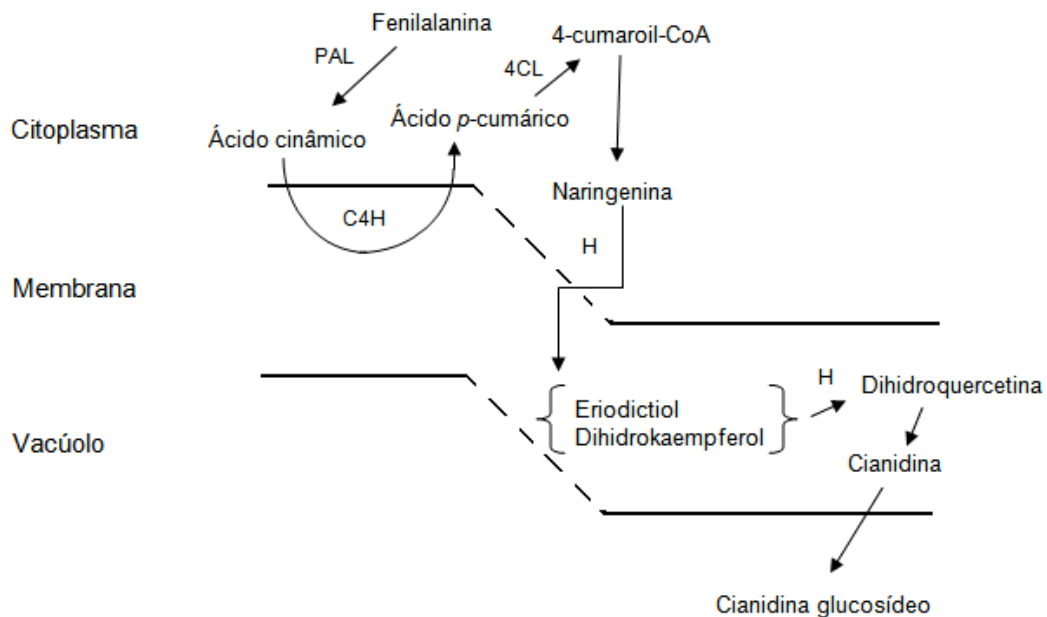


FIGURA 3 - ESQUEMA PROPOSTO PARA A COMPARTIMENTARIZAÇÃO DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NA BIOSÍNTESE DE ANTOCIANINAS

Fonte: Adaptado de FRITSCH; GRISEBACH, 1975

Nota: fenilalanina amônia-liase (PAL), cinamato-4-hidroxilase (C4H), 4-cumaroil:CoA ligase (4CL), hidroxilase (H) e glucosiltransferase (GT)

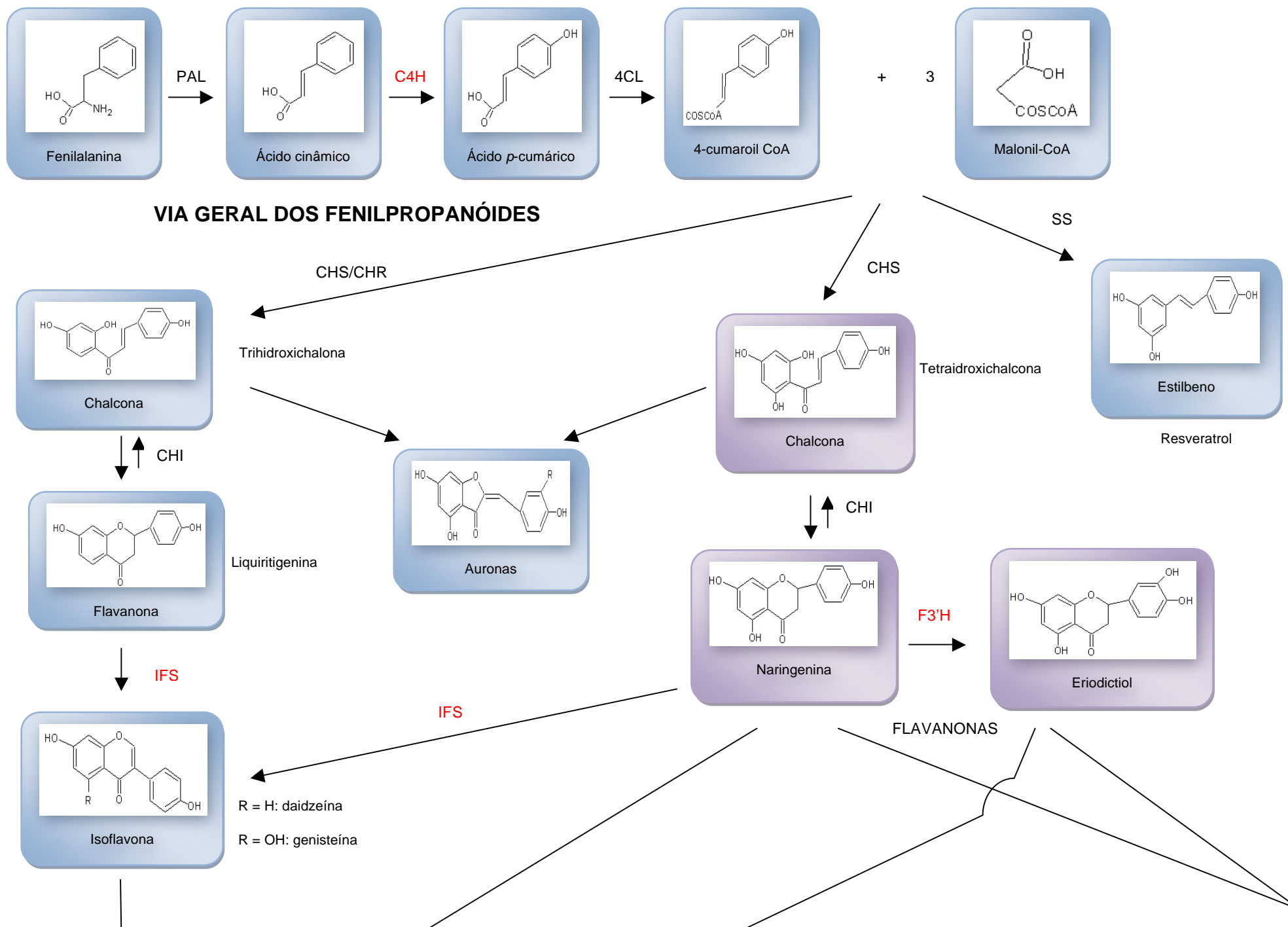
Em algumas espécies, as antocianinas se acumulam em vesículas formadas a partir do vacúolo e eventualmente coalescem em uma estrutura maior,

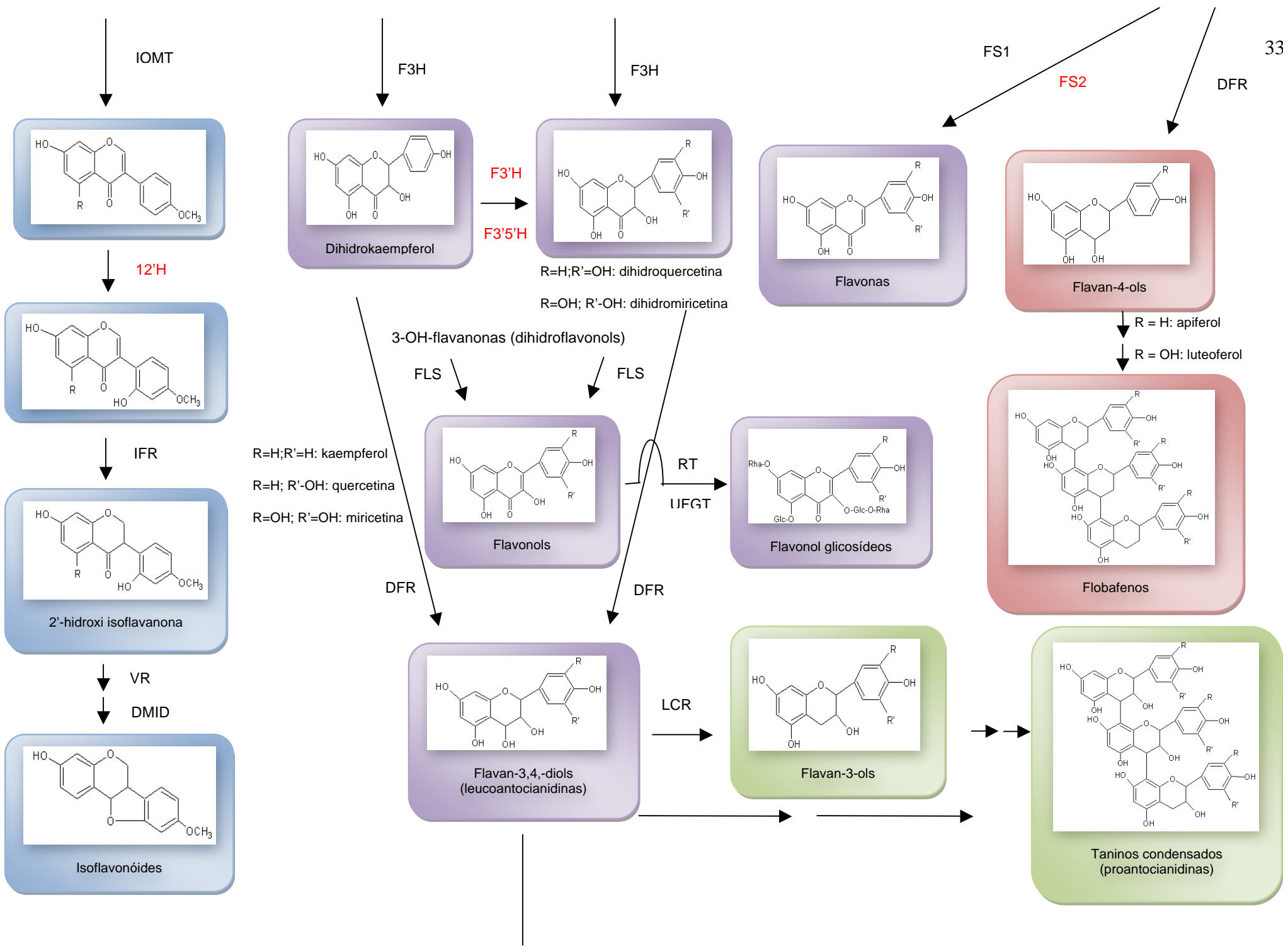
denominada antocianoplasto, que pode ser gradualmente degradada, deixando um vacúolo colorido em tecidos mais velhos. A exposição à luz leva a um aumento tanto na produção de antocianina como no tamanho dos antocianoplastos (PECKET; SMALL, 1980).

Os primeiros modelos experimentais utilizados no estudo da biossíntese dos flavonóides foram o milho (*Zea mays* L.), boca de leão (*Antirrhinum majus* L.) e sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Evidências sugerem que enzimas envolvidas no metabolismo de flavonóides e fenilpropanóides pertencem a um ou mais complexos multienzimáticos associados à membrana. Este tipo de organização tem importantes implicações na eficiência, especificidade e regulação das vias de formação destes produtos (WINKEL-SHIRLEY, 1999; 2001). A organização de enzimas em uma sequência ordenada, como um agregado ou um complexo multienzimático linear durante a biossíntese, pode provocar o predomínio de uma única rota, por ser mais eficiente na competição pelo substrato (STAFFORD, 1991).

Flavonóides são formados pela combinação de derivados sintetizados a partir da fenilalanina – pela via metabólica do ácido chiquímico – e ácido acético, apresentando o esqueleto  $C_6C_3C_6$  característico (PETERSON; DWYER, 1998), normalmente organizado em três anéis denominados A, B e C (heterocíclico) (WINKEL-SHIRLEY, 2001) e diferem entre si pela orientação dos substituintes, grau de insaturação, tipo de açúcar ligado e posição da substituição benzenóide (AJAY; GILANI; MUSTAFA, 2003). A representação esquemática da via biossintética (FIGURA 4) inicia com o metabolismo geral dos fenilpropanóides, levando à formação de nove subgrupos principais: chalconas, auronas, isoflavonóides, flavonas, flavonóis e flavandiols, antocianinas, taninos condensados e pigmentos flobafenos. A primeira etapa chave na biossíntese é catalisada pela chalcona sintase (CHS), que utiliza malonil-CoA e 4-cumaroil-CoA como substratos. Alguns exemplos são apresentados, mas uma enorme variedade de produtos finais pode ser formada. Hidroxilases P450, que podem funcionar como âncoras na membrana para complexos multienzimáticos, estão indicadas em vermelho (WINKEL-SHIRLEY, 2001).

Os flavonóides possuem duas bandas de absorção no UV características: banda II, com absorção entre 240-295 nm (anel A), e banda I, com absorção entre 310-560 nm (anel B) (ROBARDS; ANTOLOVICH, 1997). Grupos funcionais ligados ao esqueleto principal podem deslocar a sua absorção (YAO *et al.*, 2004).





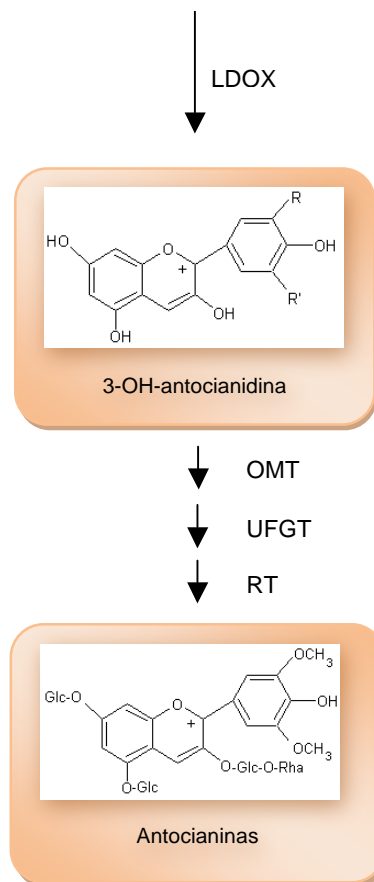


FIGURA 4 - ESQUEMA DAS VIAS PRINCIPAIS DA BIOSÍNTESE DOS FLAVONÓIDES

Fonte: Adaptado de WINKEL-SHIRLEY, 2001

Nota: cinamato-4-hidroxilase (C4H); chalcona isomerase (CHI); chalcona redutase (CHR); chalcona sintase (CHS); 4-cumaroil:CoA ligase (4CL); dihidroflavonol 4-redutase (DFR); 7,2'-dihidroxi, 4'-metoxiisoflavanol desidratase (DMID); flavanona 3-hidroxilase (F3H), flavona sintase (FSI e FSII); flavonóide 3' hidroxilase (F3'H) ou flavonóide 3' 5' hidroxilase (F3'5'H); isoflavona O-metiltransferase (IOMT); isoflavona redutase (IFR); isoflavona 2'-hidroxilase (I2'H); isoflavona sintase (IFS); leucoantocianidina dioxigenase (LDOX); leucocianidina redutase (LCR); O-metiltransferase (OMT); fenilalanina amônia-liase (PAL); ramnosil transferase (RT); estilbeno sintase (SS); UDPG-flavonóide glucosil transferase (UFGT) e vestitona redutase (VR)

As antocianinas, os flavonóis e as chalconas se acumulam principalmente nas anteras. O acúmulo de antocianidinas e seus glicosídeos na epiderme interior das pétalas pouco antes da abertura do botão da flor é importante para a atração de insetos e outros agentes polinizadores (WEISS, 1991). Flavonóides também podem se acumular nas células tapetais das paredes das anteras e no pistilo e existem relatos de que agliconas de flavonóis são capazes de reestabelecer a germinação e o crescimento do tubo polínico em plantas deficientes na produção de pólen (MO; NAGEL; TAYLOR, 1992). Apesar disso, os flavonóides não são universalmente requeridos para a fertilidade. Dois exemplos disso são petúnia e *Arabidopsis thaliana*. Mutantes de petúnia deficientes na produção de flavonóides apresentaram anteras brancas e esterilidade masculina devido a uma parada no desenvolvimento de gametófitos masculinos (van der MEER *et al.*, 1992). Contudo, isso não se aplica a *Arabidopsis*, onde a falta de flavonóides nas flores e estames não afetou a fertilidade masculina (BURBULIS; IACOBUCCI; SHIRLEY, 1996).

### 1.1.2 Classificação dos flavonóides

Os flavonóides estão distribuídos em várias classes dependendo da posição da ligação do anel aromático B à porção benzopirana C (cromona) (BEECHER, 1999; MARAIS *et al.*, 2006). De acordo com este critério, os flavonóides podem ser divididos em três classes principais: 1) flavonóides (2-fenilbenzopiranos); 2) isoflavonóides (3-fenilbenzopiranos), e 3) neoflavonóides (4-fenilbenzopiranos) (FIGURA 5) (MARAIS *et al.*, 2006).

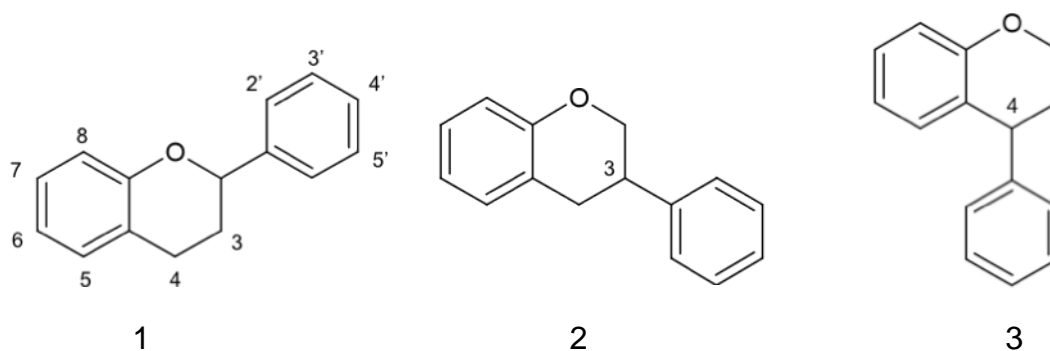


FIGURA 5 - AS TRÊS PRINCIPAIS CLASSES DE FLAVONÓIDE

Fonte: Adaptado de MARAIS *et al.*, 2006

Nota: 1) Flavonóides (2-fenilbenzopiranos); 2) isoflavonóides (3-fenilbenzopiranos), e 3) neoflavonóides (4-fenilbenzopiranos)

A primeira classe de compostos, os 2-fenilbenzopiranos (flavonóides), pode ser dividida em subgrupos dependendo do grau de oxidação e saturação presente no anel heterocíclico C (FIGURA 6) (MAR AIS *et al.*, 2006).

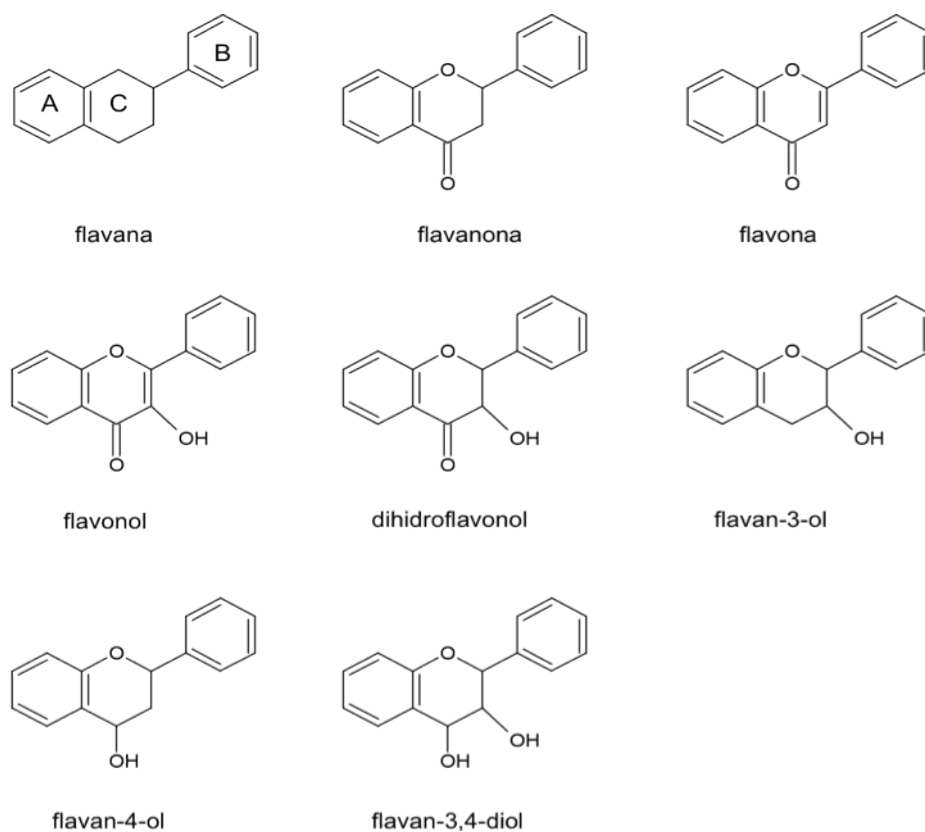


FIGURA 6 - SUBGRUPOS DOS FLAVONÓIDES

Fonte: Adaptado de MARAIS *et al.*, 2006

Os isoflavonóides (FIGURA 7) são um grupo distinto e diverso de flavonóides por possuírem um esqueleto 3-fenilcromona. Estes flavonóides variam quanto ao número e complexidade dos substituintes, diferentes níveis de oxidação e presença de anéis heterocíclicos adicionais (MARAIS *et al.*, 2006).

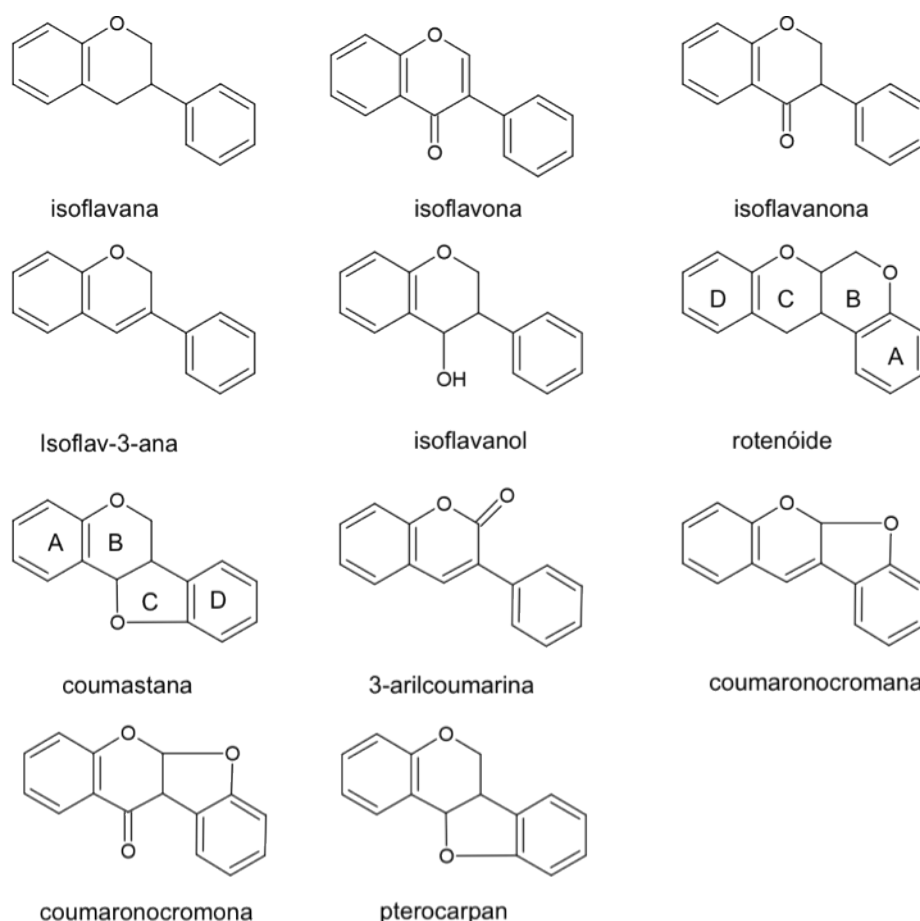


FIGURA 7 - SUBGRUPOS DE ISOFLAVONÓIDES

Fonte: Adaptado de MARAIS *et al.*, 2006

Os neoflavonóides compreendem as 4-arilcumarinas, as 3,4-dihidro-4-arilcumarinas e as neoflavanas, que diferem quanto aos substituintes do carbono na posição 2 e a presença (ou ausência) de dupla ligação nas posições 3 e 4 (FIGURA 8) (MARAIS *et al.*, 2006).

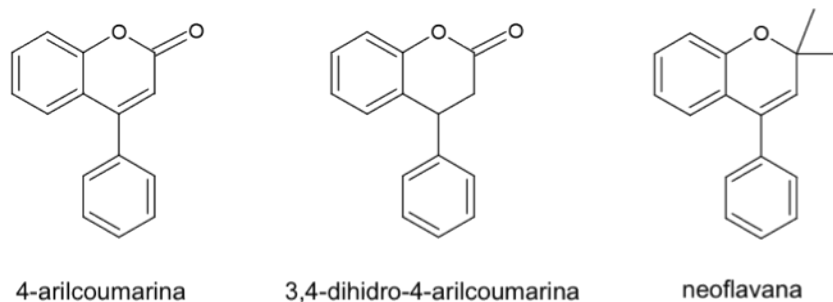


FIGURA 8 - SUBGRUPOS DE NEOFLAVONÓIDES

Fonte: Adaptado de MARAIS *et al.*, 2006

Outros produtos naturais também possuem um esqueleto carbônico  $C_6C_3C_6$ , como as chalconas e auronas, e são considerados flavonóides menores. Este grupo inclui os compostos apresentados na FIGURA 9 (MAR AIS *et al.*, 2006).

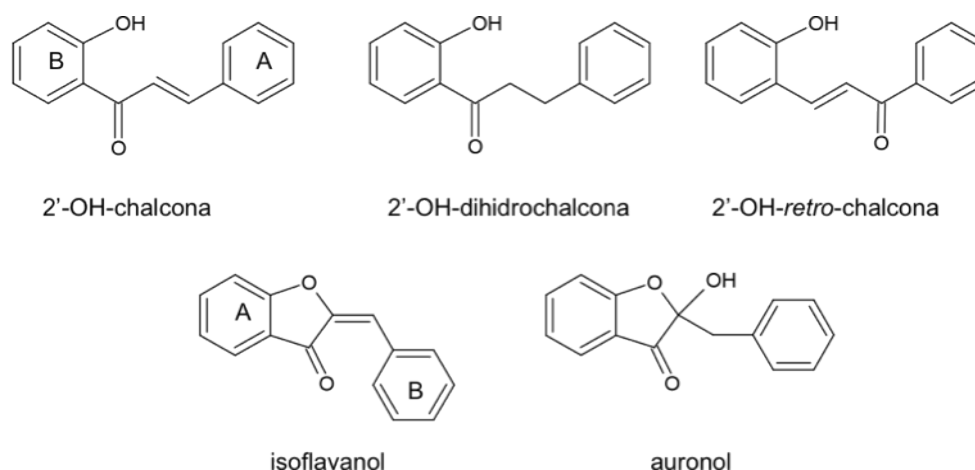


FIGURA 9 - FLAVONÓIDES MENORES

Fonte: Adaptado de MARAIS *et al.*, 2006

Outra forma possível de divisão é em relação aos substituintes que podem estar presentes na estrutura dos flavonóides. Desta maneira, os compostos são subdivididos em: a) flavanol, b) antocianidina, e c) flavona, flavanona e chalcona. Esta divisão é baseada, principalmente, na presença (ou ausência) do grupo carbonila na posição 4, presença (ou ausência) de dupla ligação nos carbonos 2 e 3 do anel C, e a presença de grupos hidroxila no anel B (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000). A divisão pode ser feita, ainda,

considerando o estado de oxidação e os grupos funcionais ligados ao anel C (BEECHER, 1999).

### 1.1.3 Antocianinas

Na maioria dos alimentos que utilizam matérias primas naturais, a coloração é conferida, em grande parte, por substâncias da classe dos flavonóides (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008). As antocianinas (do grego, *anthos* = flor e *kianos* = azul) são os pigmentos mais importantes de plantas vasculares e conferem coloração laranja, rosa, vermelha, violeta e azul a flores e frutos (CASTAÑEDA-OVANDO *et al.*, 2009).

As cores exibidas por estas moléculas foram pela primeira vez explicadas por Pauling, em 1939, que propôs uma estrutura ressonante do íon flavílium (WROLSTAD; DURST; LEE, 2005). As principais diferenças entre elas são o número de grupos hidroxila, a natureza e número de açúcares ligados à molécula, a posição desta ligação, a natureza e o número de ácidos alifáticos ou aromáticos ligados a moléculas de açúcar (KONG *et al.*, 2003). Embora a conjugação possa ser feita nos carbonos 3, 5, 7, 3' e 5', ela ocorre mais frequentemente no C3 (CASTAÑEDA-OVANDO *et al.*, 2009).

A deficiência eletrônica torna as antocianidinas isoladas altamente instáveis/reativas e muito susceptíveis a degradação (GIUSTI; WROLSTAD, 2003; SATUÉ-GRACIA; HEINONEN; FRANKEL, 1997). A estabilidade das antocianinas é afetada por fatores como pH, temperatura de armazenagem, presença de enzimas, luz, oxigênio, estrutura e concentração das antocianinas, e presença de outros compostos como flavonóides, proteínas e minerais (REIN, 2005). A estabilidade das antocianidinas também é influenciada pelos substituintes do anel B, sendo que a presença de grupo hidroxila ou metoxila adicional diminui a estabilidade da aglicona em meio neutro. Em contraste com agliconas, monoglicosídeos e diglicosídeos são mais estáveis em pH neutro. Isso ocorre porque as moléculas de açúcar ligadas a antocianinas evitam a degradação de intermediários instáveis em ácido fenólico e aldeídos (FLESCHHUT *et al.*, 2006).

A coloração das antocianinas é influenciada pelo pH (FIGURA 10). Em pH 1, o cátion flavílium, que contribui para colorações roxa e vermelha, é a espécie predominante. Entre pH 2 e 4, as espécies quinoidais azuis são predominante; entre pH 5 e 6 apenas duas espécies incolores podem ser observadas, uma pseudobase carbinol e uma chalcona. Acima de pH 7, as antocianinas são degradadas dependendo dos seus grupos substituintes (FIGURA 11) (CASTAÑEDA-OVANDO *et al.*, 2009).

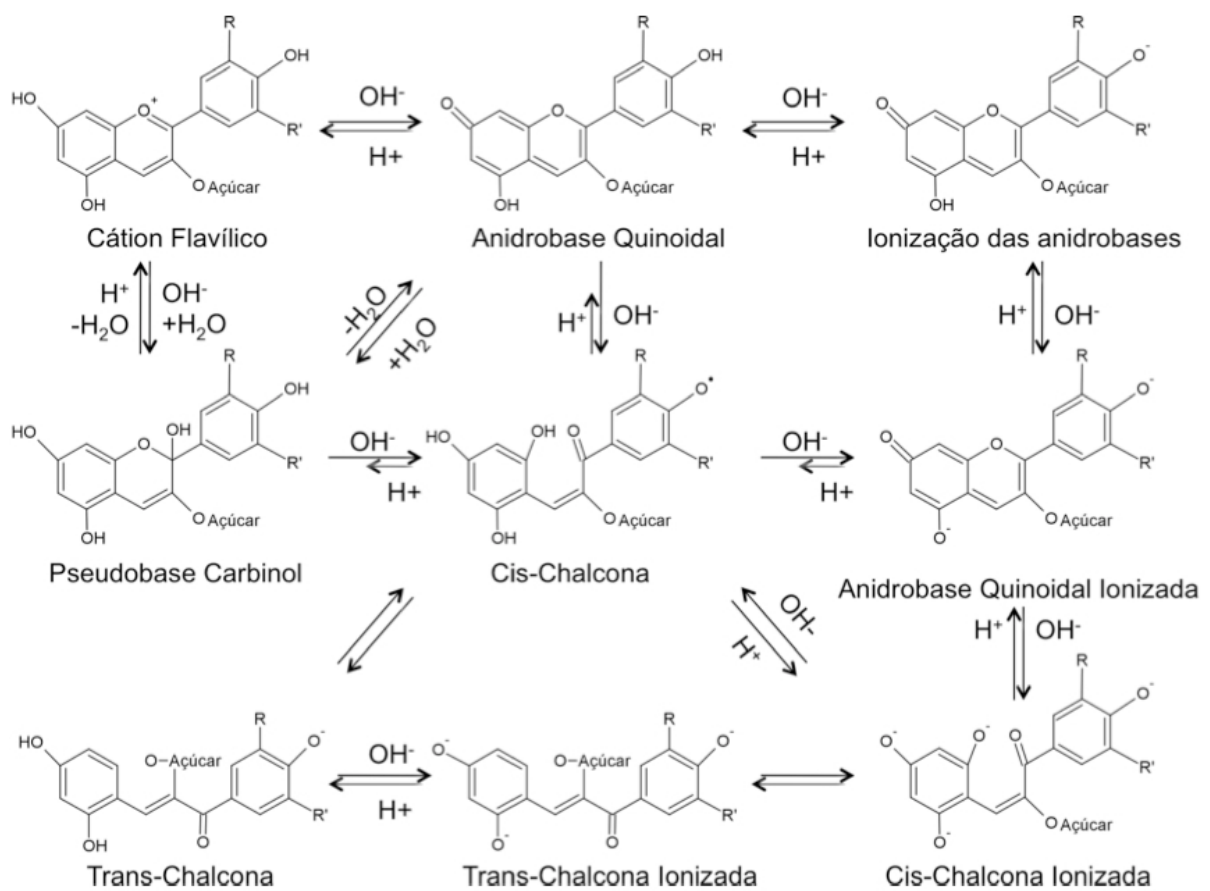


FIGURA 10 - POSSÍVEIS ALTERAÇÕES DAS ANTOCIANINAS EM MEIO AQUOSO EM FUNÇÃO DO pH

Fonte: Adaptado de MARÇÓ; POPPI; SCARMINIO, 2008

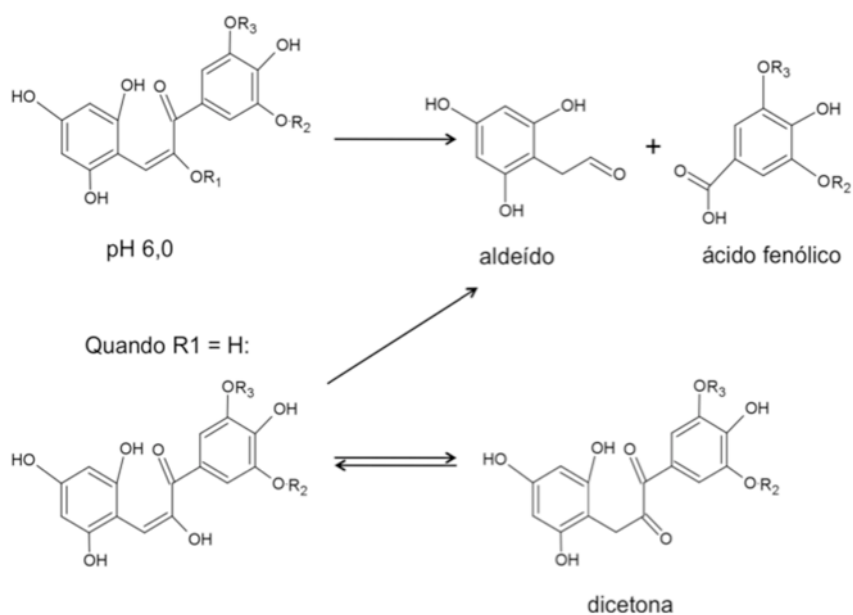


FIGURA 11 - REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO DAS ANTOCIANINAS

Fonte: Adaptado de CASTAÑEDA-OVANDO *et al.*, 2009

Nota: R1 = H ou sacarídeo, R2 e R3 = H ou metil

Pouco se sabe sobre os efeitos biológicos das antocianinas. Kamei e colaboradores (1995) demonstraram que a supressão direta não-específica do crescimento de células tumorais foi aparentemente mais efetiva para antocianinas que outros flavonóides, por ação citostática, sugerindo um efeito na proliferação e diferenciação celular.

#### 1.1.4 Efeitos dos flavonóides sobre a fisiologia de plantas

Acredita-se que os flavonóides atuam no controle do efluxo de auxinas (BROWN *et al.*, 2001). A regulação adequada do transporte deste hormônio vegetal é essencial para o crescimento e desenvolvimento da planta (LOMAX; MUDAY; RUBERY, 1995; FRIML, 2003), uma vez que ele está implicado na regulação da taxa de alongação de órgãos, no foto e gravitropismo e na morfologia do vegetal. A auxina é preferencialmente sintetizada por tecidos apicais jovens e, em seguida, move-se de célula para célula na forma polar para tecidos basais alvo. Seu transporte é controlado por diversos tipos de proteínas, incluindo transportadores de

influxo e efluxo de auxinas, e é claramente necessário para estágios iniciais do desenvolvimento radicular lateral e reprodutivo (BENNETT *et al.*, 1998). Os mecanismos pelos quais os transportadores de efluxo e influxo de auxina são modulados durante o crescimento e o desenvolvimento da planta em grande parte não são conhecidos (BROWN *et al.*, 2001).

A teoria de que flavonóides seriam capazes de inibir o transporte de auxinas foi proposta inicialmente na década de 70 (BROWN *et al.*, 2001). Plantas cultivadas na presença de ácido quínico acumularam compostos fenólicos, incluindo flavonóides, e apresentaram diminuição no transporte polar do hormônio (MARIGO; BOUDET, 1977). Estudos mostraram que a quercetina, além de promover o acúmulo localizado de auxina na planta, é o inibidor mais ativo do efluxo deste hormônio, seguida de outras agliconas de flavonóis (JACOBS; RUBERY, 1988; PEER; MURPHY, 2007). Os flavonóides modulam o transporte de auxina direta e indiretamente, afetando a atividade de transportadores de auxina e de proteínas que regulam tais transportadores (PEER; MURPHY, 2007).

Para ser considerado um regulador endógeno, o composto deve ser amplamente distribuído no reino vegetal, apresentar forte relação entre estrutura e função que permita subconjuntos de modificações químicas que levem a atividade inibitória (STAFFORD, 1990), além de síntese endógena ligada a mudanças ambientais e/ou desenvolvimento que altera o transporte de auxinas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). As agliconas de flavonóides, principalmente de flavonóis, se enquadram em todas as características citadas e seria razoável considerá-las inibidores naturais do transporte de auxinas (BROWN *et al.*, 2001).

A identificação de diferentes sítios subcelulares – como o núcleo – onde ocorre acúmulo de flavonóides e enzimas da sua via biossintética é consistente com a ideia que alguns compostos desta classe poderiam exercer controle direto sobre a transcrição de genes envolvidos no crescimento e desenvolvimento da planta (BESSEAU *et al.*, 2007). Os flavonóides claramente tem potencial para afetar diretamente a sinalização e transcrição de genes por interações com proteínas plasmáticas e nucleares (SASLOWSKY; WAREK; WINKEL, 2005).

Muitas plantas vivem em estreita relação com microrganismos ou simbiontes, que fornecem nutrientes e auxiliam no desenvolvimento do organismo hospedeiro em solos pobres. As raízes de leguminosas são colonizadas por bactérias fixadoras de nitrogênio – com a formação do nódulo, benéficas para o

crescimento da planta. Os flavonóides podem agir como sinalizadores nas raízes, induzindo a transcrição de genes bacterianos, cujos produtos protéicos são necessários para o processo de infecção (HUNGRIA; STACEY, 1997). Existem muitos genes para nodulação: alguns servem como reguladores de transcrição enquanto muitos codificam enzimas envolvidas na síntese de uma família de lipochito-oligossacarídeos (LCOs) denominados *Nod-factors*. Estes oligossacarídeos possuem propriedades semelhantes aos hormônios e são determinantes chave na nodulação, permitindo que o microrganismo entre na planta. Além disso, estes compostos são capazes de estimular a síntese e liberação de flavonóides das raízes dos legumes, amplificando a resposta à inoculação (BROUGHTON *et al.*, 2003). Este tipo de associação também foi observada em algumas plantas não-leguminosas e, da mesma maneira, flavonóides são importantes sinalizadores (TREUTTER, 2006). Ironicamente, flavonóides também atraem microrganismos patogênicos como *Agrobacterium tumefaciens* ou *Pseudomonas syringae* e podem induzir seus genes de virulência, promovendo a síntese de fitotoxinas (MO; NAGEL; TAYLOR, 1992). Foi observado que flavonóides também são capazes de estimular a oviposição de borboletas monarcas *Danaus plexippus* (BAUR *et al.*, 1998).

Em gramíneas, a flavanona naringenina foi relacionada à redução no crescimento do vegetal por inibir a enzima 4-cumarato CoA ligase, envolvida na síntese de monolignol e, conseqüentemente, lignificação da planta (DENG; AOKI; YOGO, 2004).

Flavonóides podem, ainda, se comportar impedindo a alimentação da planta por insetos, reduzindo a digestibilidade e como toxinas. Vários insetos são sensíveis a flavonóides ou são dissuadidos por eles em testes de alimentação (BRIGNOLAS *et al.*, 1998). Experimentos utilizando híbridos interespecíficos de amendoim revelaram uma correlação positiva entre o conteúdo de flavonol de plantas e a mortalidade larval de *Spodoptera litura* F. (MALLIKARJUNA *et al.*, 2004).

#### 1.1.5 Efeitos dos flavonóides sobre sistemas biológicos distintos das plantas

Após a absorção, o metabolismo subsequente dos flavonóides é em partes conhecido por dados obtidos de experimentos com animais, já que praticamente não

existem informações disponíveis em humanos (HOLLMAN; KATAN, 1997). A biodisponibilidade dos flavonóides é apenas parcial, com uma proporção de quantidade ingerida que é absorvida variando, por exemplo, de 0,2 a 0,9% para catequinas presentes no chá a 20% para quercetina e isoflavonas. Desta maneira, uma grande fração dos flavonóides ingeridos permanece não-absorvível e a mucosa gastrointestinal é exposta a concentrações particularmente altas destes compostos (YAO *et al.*, 2004). Apenas flavonóides livres são capazes de passar pela parede intestinal. Nenhuma enzima capaz de romper a ligação  $\beta$ -glicosídica é secretada no intestino ou está presente na parede intestinal. Em contrapartida, as bactérias intestinais possuem glicosidases capazes que clivar os resíduos de açúcares dos glicoconjugados (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000). Bokkenheuser, Shackleton e Winter (1987) reportaram a síntese de  $\beta$ -glucosidase por *Bacteroides ovatus*, *B. uniformis* e uma cepa de *B. distasonis*, e de  $\alpha$ -ramnosidade e  $\beta$ -galactosidade por outras cepas de *B. distasonis*. Aparentemente, as enzimas são produzidas de forma constitutiva, independentemente da presença do substrato. É bem possível que, em humanos, os glicosídeos de flavonóides possam ser hidrolisados por outras espécies de bactérias intestinais menos prevalentes, não identificadas no estudo desenvolvido por estes autores. A hidrólise de dois glicosídeos de quercetina é mostrada na FIGURA 12.

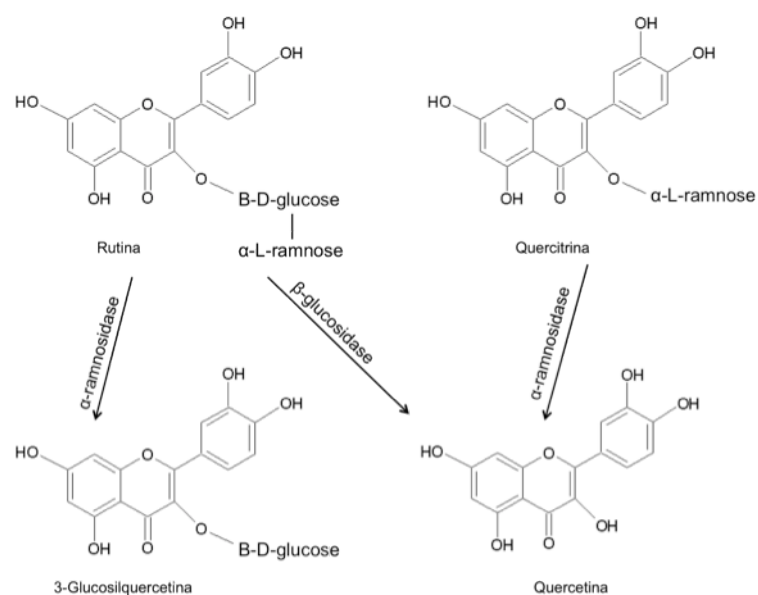


FIGURA 12 - HIDRÓLISE DA RUTINA E QUERCITRINA POR ENZIMAS BACTERIANAS  
Fonte: Adaptado de BOKKENHEUSER; SHACKLETON; WINTER, 1987

A hidrólise de glicosídeos e polímeros de flavonóides ocorre apenas no cólon, através de microrganismos que, além disso, degradam os flavonóides monoméricos extensivamente, quebrando o anel heterocíclico, e promovem a metilação e desidroxilação dos ácidos fenólicos resultantes (KIM *et al.*, 1998; HOLLMAN; KATAN, 1997; MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000). O metabolismo da quercetina por *Clostridium orbiscindens* sp. *Nov.*, por exemplo, produz ácido 3,4-diidroxifenilacético e floroglucinol pela clivagem da ligação entre C3 e C4 do anel heterocíclico (FIGURA 13) (WINTER *et al.*, 1991).

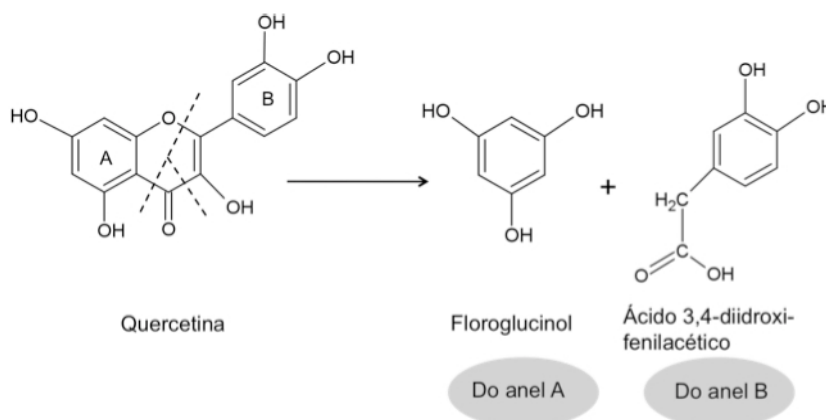


FIGURA 13 - CLIVAGEM DO ANEL C DA QUERCETINA  
Fonte: Adaptado de WINTER *et al.*, 1991

As formas não-glicosiladas de flavonóides têm sua absorção facilitada no intestino grosso em função da sua lipossolubilidade. Após a absorção, estes flavonóides sofrem *O*-metilação, glucoronidação e/ou sulfatação no fígado. Todavia, uma parte considerável dos flavonóides ingeridos é excretada pela bile e retorna ao lúmen intestinal, sofrendo novamente hidrólise e reabsorção, com eliminação nas fezes (BEHLING *et al.*, 2004).

Por serem extensivamente metabolizados *in vivo*, há uma significativa alteração no potencial redox dos flavonóides. Supõe-se que as formas bioativas dos flavonóides *in vivo* não são as mesmas encontradas nas plantas, como, por exemplo, os glicosídeos e, em alguns casos, a forma aglicona, mas sim conjugados e metabólitos decorrentes da absorção intestinal. A natureza antioxidante “clássica” dos flavonóides é definida principalmente pela presença de grupo catecol (anel B

diidroxilado), grupo este capaz de doar elétron (hidrogênio) para estabilizar espécies radicalares (WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004). Outras características estruturais que contribuem para a atividade antioxidante incluem a presença de insaturação 2,3 em conjugação com a função carbonila no anel C, responsável pelo deslocamento do elétron do anel B, e a presença de grupos funcionais hidroxilas nas posições 3 e 5 com a função carbonila nos anéis A e C, que maximiza o potencial para captura de radicais (FIGURA 14) (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

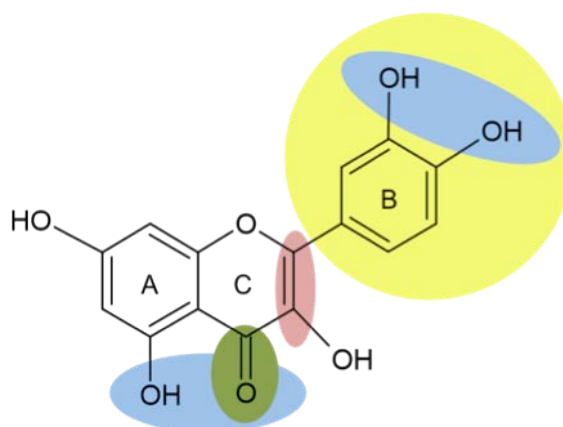


FIGURA 14 - ESTRUTURA QUÍMICA DA QUERCETINA, COM INDICAÇÃO DOS GRUPOS QUE CONFEREM A PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE

Fonte: Adaptado de WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004

Independente da propriedade antioxidante, flavonóides podem exercer efeitos modulatórios em diversos tipos celulares, através de ações seletivas em diferentes componentes de cascatas sinalizadoras de proteína e lipídio quinases como fosfoinositol 3-quinase (PI 3-quinase) (MATTER; BROWN; VLAHOS, 1992), Akt/PKB (SPENCER; RICE-EVANS; WILLIAMS, 2003), tirosina quinases, proteína quinase C (PKC) (GAMET-PAYRASTRE *et al.*, 1999) e MAP (*mitogen-activated protein*) quinases (SCHROETER *et al.*, 2001). Ações inibitórias ou estimulatórias nestas vias podem afetar a função celular por alterar o estado de fosforilação de moléculas alvo e/ou por expressão de genes modulatórios. Embora ações inibitórias seletivas nestas cascatas possam ser benéficas contra o câncer, doenças proliferativas, inflamação e neurodegeneração, estas ações podem ser prejudiciais durante o desenvolvimento, particularmente, do sistema nervoso imaturo. Em cérebro maduro pós-mitótico, neurônios utilizam cascatas MAP quinase e PI 3-

quinase na regulação de funções chave como plasticidade sináptica e formação da memória; assim, os efeitos dos flavonóides sobre estas vias poderiam ter resultados imprevisíveis e dependeriam do tipo de célula e da doença estudada (WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004).

Flavonóides também podem se ligar a sítios de ligação de ATP em um grande número de proteínas – incluindo ATPase mitocondrial (DIPIETRO *et al.*, 1975), proteína quinase C (GAMET-PAYRASTRE *et al.*, 1999), topoisomerase, cálcio ATPase da membrana plasmática, e proteína quinase A (BOEGE *et al.*, 1996), além dos receptores benzodiazepínicos GABA-A (MEDINA *et al.*, 1997; DEKERMENDJIAN *et al.*, 1999). Os flavonóides podem, ainda, interagir com mitocôndrias, interferindo nas vias de metabolismo intermediário e/ou na regulação negativa da expressão de moléculas de adesão (WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004; DORTA *et al.*, 2005).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAIS

#### 2.1.1 Material vegetal

Frutos de duas variedades (vermelha e roxa) de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) utilizados neste estudo foram colhidos na região metropolitana de Curitiba/PR (25°22'54''S, 49°10'50''O; 25°22'33''S, 49°34'20''O). Os frutos das duas variedades foram classificados em quatro estádios de desenvolvimento, como segue: verde (imaturo), amarelo, laranja e vermelho (maduro), para a variedade vermelha; e verde (imaturo), amarelo, vermelho e roxo (maduro), para a variedade roxa. As polpas foram mecanicamente removidas e liofilizadas.

#### 2.1.2 Padrões e solventes

Reagente fenólico de Folin-Ciocalteu; 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH); ácido ferúlico; acetona, acetonitrila e ácido acético grau HPLC, e padrões de flavonóides (quercetina, miricetina e cloreto de cianidina) foram adquiridos de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, E.U.A).

## 2.2 MÉTODOS

### 2.2.1 Preparo do extrato bruto

Para a extração, as amostras de polpas liofilizadas foram moídas em um pó fino (<0,5 mm). A extração foi realizada de acordo com modificações no procedimento de Prior e colaboradores (2001) como descrito por Qiu, Liu e Beta (2009). Brevemente, 40 mL de uma mistura contendo acetona/água/ácido acético (70:29:1, v/v/v) foram adicionados a 2,0 g de polpa moída. A extração foi realizada em sonicador Branson 5510 (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, E.U.A.) com frequência de 40 kHz por uma hora a temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 16.900 x g em rotor SS-34 (RC5C Sorvall Instruments, Newtown, CT, E.U.A.) por 25 minutos a 20°C. O sobrenadante foi removido e usado como extrato bruto (FIGURA 15) para determinação do conteúdo fenólico total, conteúdo de flavonóides totais e atividade antioxidante, e também para a análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em *tandem* (HPLC-MS/MS).



FIGURA 15 - EXTRATOS BRUTOS DAS VARIEDADES VERMELHA (ESQUERDA) E ROXA (DIREITA)

### 2.2.2 Determinação do conteúdo fenólico total (CFT)

Os CFT dos extratos brutos foram determinados por modificações descritas por Li e colaboradores (2009) para o método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965). Brevemente, 200  $\mu\text{L}$  da diluição apropriada de extrato bruto foram adicionados a 1,9 mL de reagente Folin-Ciocalteu diluído dez vezes em água destilada (recém preparado). O mesmo volume (1,9 mL) de solução aquosa de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ( $60 \text{ g.L}^{-1}$ ) foi usado para neutralizar a mistura. Após 120 minutos de reação na ausência de luz e a temperatura ambiente, a absorbância foi medida em 725 nm. Ácido ferúlico foi usado como padrão, e os resultados expressos como g de equivalentes de ácido ferúlico (EAF) por 100 g de fruto (em peso seco).

### 2.2.3 Determinação do conteúdo de flavonóides totais

O conteúdo de flavonóides totais dos extratos brutos foi determinado por adaptação do método colorimétrico descrito anteriormente por Subhasree e colaboradores (2009). Brevemente, 0,25 mL de extrato bruto foram diluídos com 1,5 mL de água destilada, seguido da adição de 150  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) 5%. A solução foi misturada bem e após cinco minutos à temperatura ambiente, 300  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 10% foram adicionados. A solução foi misturada bem e mantida em repouso por outros seis minutos à temperatura ambiente antes da adição de 1,0 mL de NaOH 1 M. O volume final foi acertado em 5,0 mL com água destilada e misturado bem. Um espectrofotômetro Ultrospec 1100 *pro* UV-Vis (Biochrom Ltd., Cambridge, UK) em 510 nm foi usado para medir a absorbância contra o branco. Os resultados foram calculados e expressos como g de equivalentes de quercetina (EQ) por 100 g de fruto (em peso seco).

#### 2.2.4 Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH

O teste usado para avaliação da atividade antioxidante baseou-se no método modificado de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) descrito por Anton e colaboradores (2008). Brevemente, 100 µL de extrato bruto foram adicionados a 3,9 mL de solução metanólica de radical DPPH 60 µM. Após 30 minutos de incubação no escuro e a temperatura ambiente, a absorbância foi medida em 515 nm. Os resultados foram expressos como mmol de equivalentes de Trolox (ET) por 100 g de fruto (em peso seco) e como porcentagem de descoloração, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ descoloração} = \left[ 1 - \left( \frac{\text{absorbância amostra}_{t=30}}{\text{absorbância controle}_{t=0}} \right) \right] \times 100 \quad (1)$$

#### 2.2.5 Análise por HPLC-MS/MS

Hexano (3 x 20 mL) foi adicionado a 5,0 mL de extrato bruto recém preparado para remoção de lipídios. As amostras foram secadas em rotaevaporador modelo RE-51 (Yamato Scientific America Inc., Santa Clara, CA, E.U.A.) a 35°C. O resíduo foi redissolvido em 0,5 mL de metanol 100%. A separação cromatográfica e análise espectrométrica das massas (HPLC-MS/MS) foram realizadas em HPLC Waters 2695 (Waters Corp., Milford, MA) equipado com detector *photodiode array* (PDA) Water 996 (Waters Corp.) e um amostrador automático Waters 717 plus (Waters Corp.) acoplado a espectrômetro de massa quadrupolo tempo de voo (Q-TOF-MS) (Micromass, Waters Corp.). A coluna usada foi uma Gemini RP 18 (150 mm x 4.6 mm d.i., 5 µm) (Phenomenex, Torrance, CA, E.U.A.). Durante as análises de HPLC-MS/MS, 10 µL de amostra foram injetados pelo amostrador automático. O procedimento de HPLC-MS/MS usado neste estudo foi uma modificação do método descrito por Qiu, Liu e Beta (2009). As amostras foram eluídas pela coluna com um

gradiente de fase móvel constituído de A (ácido acético 0,1%(v/v) em água) e B (ácido acético 0,1%(v/v) em acetonitrila) com fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>, antes da injeção no Q-TOF-MS. Um gradiente linear de 35 minutos foi programado como segue: 0 – 2 minutos, 5 – 10% B; 2 – 5 minutos, 10 – 15% B; 5 – 7 minutos, 15 – 20% B; 7 – 10 minutos, 20 – 23% B; 10 – 12 minutos, 23% B; 12 – 17 minutos, 23 – 25% B; 17 – 21 minutos, 25 – 32% B; 21 – 24 minutos, 32% B; 24 – 29 minutos, 32 – 40% B; 29 – 31 minutos, 40 – 5% B; 31 – 35 minutos, 5% B. As temperaturas da coluna e da amostra foram mantidas em 20°C. O Q-TOF-MS foi usado em modo negativo e calibrado com iodeto de sódio (2 µg.µL<sup>-1</sup>, 50:50 2-propanol:água), de acordo com as instruções do fabricante. Os espectros de massa totais foram registrados usando uma voltagem capilar de 1,2 kV e uma voltagem do cone de 45 V. Os fluxos dos gases de dessolvatação (N<sub>2</sub>) e de colisão (He) foram 900 e 50 L.h<sup>-1</sup>, respectivamente. A temperatura do gás de dessolvatação e da fonte de íon foram programadas para 350 e 150°C, respectivamente. O espectro MS/MS foi adquirido usando uma energia de colisão de 10 V. Os flavonóides foram determinados pela comparação do padrão de fragmentação com bibliotecas de espectros de massa e a quantificação baseou-se na área do pico, em um comprimento de onda de 350 nm (518 nm para derivado de cianidina), usando as respectivas agliconas como padrões externos. As concentrações de flavonóides foram expressas como µg de equivalentes de aglicona por g de fruto (em peso seco).

Todos os testes foram realizados em triplicata.

#### 2.2.6 Análise estatística

Os resultados foram reportados como média ± desvio padrão da média, sendo que este desvio foi calculado dividindo-se o desvio padrão das medidas pela raiz quadrada do número de experimentos. Os dados foram analisados pelo teste de análise de variância (*one-way* ANOVA), usando o software JMP<sup>®</sup> versão 8 (SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.A.). O teste de Tukey ( $p=0,05$ ) foi usado para acessar diferenças significativas entre médias para as várias amostras. As duas variedades de frutos da pitangueira foram analisadas separadamente. Os coeficientes de correlação de Pearson foram calculados para avaliar a associação linear entre CFT

e atividade antioxidante (Equação 2), para as duas variedades de pitangueira. Os coeficientes encontrados foram testados quanto às suas significâncias pelo teste t, conforme Equação 3.

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{(n-1)s_x s_y} \quad (2)$$

$$t = \frac{r}{\sqrt{\frac{1-r^2}{n-2}}} \quad (3)$$

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado que após a liofilização da polpa de pitanga houve perda na coloração do produto final. A liofilização é um processo comumente usado em laboratório, e em alguns casos em indústrias, para prolongar o armazenamento de produtos biológicos/botânicos já que reações enzimáticas dificilmente ocorrem no produto seco. Embora se aceite que a liofilização não afeta a composição dos materiais vegetais, existem poucos dados analíticos para confirmar esta hipótese (GEORGÉ *et al.*, 2011). Chang e colaboradores (2006) relataram que o processo de liofilização reduziu o conteúdo de licopeno em tomates em 33% e 48% nas duas variedades testadas. Isso poderia ser explicado pelo aumento da porosidade da amostra com conseqüente aumento da exposição dos carotenóides a oxigênio, que poderia afetar significativamente a estabilidade destes compostos (GEORGÉ *et al.*, 2011). Como a pitanga é rica em carotenóides, este evento poderia ser observado também neste fruto. Estudos complementares são necessários para confirmar esta hipótese.

#### 3.1 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL (CFT)

A FIGURA 16 apresenta o CFT para extratos brutos das variedades vermelha e roxa de frutos da pitangueira.

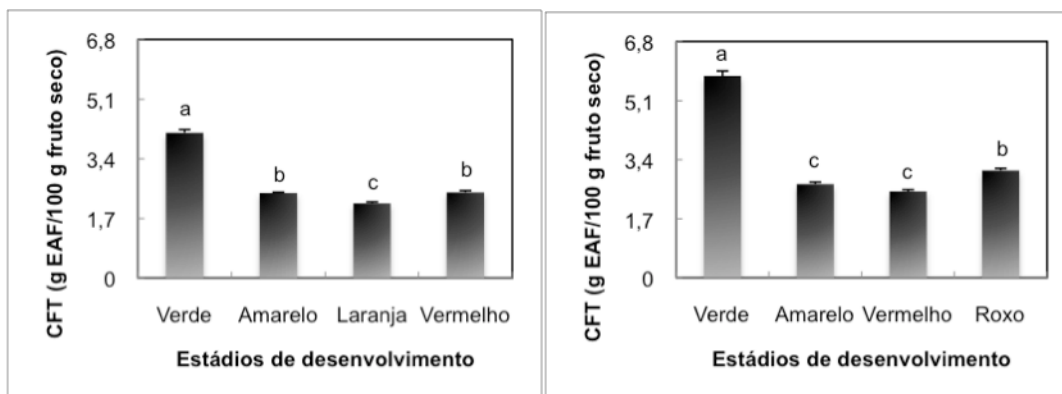


FIGURA 16 - CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL (CFT) DE EXTRATOS BRUTOS DE POLPA DE FRUTOS DAS VARIEDADES VERMELHA (ESQUERDA) E ROXA (DIREITA) DE PITANGUEIRA  
Nota: Colunas identificadas com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p=0,05$ )

O CFT variou de 2,13 a 4,14 g de equivalentes de ácido ferúlico (EAF)/100 g fruto (em peso seco) para a variedade vermelha, e de 2,49 a 5,81 g EAF/100 g fruto (em peso seco) para a variedade roxa, dependendo do estágio de desenvolvimento do fruto. Notavelmente, frutos verdes das duas variedades apresentaram CFT aproximadamente duas vezes superior comparado ao CFT encontrado para frutos em estádios mais avançados de desenvolvimento. Estes resultados claramente demonstram que o amadurecimento reduz o CFT de frutos da pitangueira, como reportado previamente para frutos de outras espécies no qual o CFT foi expresso em equivalentes de ácido gálico (EAG), como framboesa vermelha (*Rubus ideaus* L.) (WANG; CHEN; WANG, 2009), amora (*Rubus* sp. L.), morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) (WANG; LIN, 2000) e acerola (*Malpighia emarginata* D. C.) (LIMA *et al.*, 2005). Reynertson e colaboradores (2008) avaliaram o CFT, atividade antioxidante e perfil de flavonóides de 14 frutos comestíveis da família Myrtaceae, mas quantificaram em termos de miligramas de EAG por grama de fruto. Considerando esta unidade, entre as espécies estudadas, os valores de CFT variaram de 3,57 a 44,1 mg EAG/g de fruto. Exceto para o estágio laranja (variedade vermelha), o CFT encontrado para frutos da pitangueira neste estudo, para todos os estádios de desenvolvimento diferentes do verde, foram maiores quando comparados ao CFT encontrado para *seabuckthorn* maduro (sem a semente) (*Hippophae rhamnoides* L.) (2,283 g EAF/200g) (LI *et al.*, 2009). Frutos em estádios de desenvolvimento mais avançados em ambas as variedades apresentaram CFT superiores quando comparados a três variedades de tâmara (*Phoenix dactylifera* L.) (0,134 a 0,280 g

EAF/100 g) (AL-FARSI *et al.*, 2005), semente de girassol (*Helianthus annuus* L.) (1,601 g EAF/100 g) e cereja doce (*Prunus avium* L.) (2,098 g EAF/100 g), mas inferiores ao mirtilo (*Vaccinium angustifolium* Ait.) (4,18 g EAF/100 g) (VELIOGLU *et al.*, 1998). Frutos da variedade roxa apresentaram valores maiores de CFT quando comparados a frutos da variedade vermelha, em todos os estádios de desenvolvimento.

Os compostos fenólicos são considerados como determinantes principais na capacidade antioxidante de plantas (VELIOGLU *et al.*, 1998). Devido ao seu considerável conteúdo de carotenóides e fenólicos, frutos da pitangueira são uma fonte promissora de compostos antioxidantes naturais (LIMA; MÉLO; LIMA, 2002). Espera-se que a caracterização das mudanças no CFT durante o desenvolvimento do fruto contribua para a otimização do uso destes frutos como fonte de antioxidantes naturais pela indústria de alimentos assim como pela população em geral.

### 3.2 CONTEÚDO DE FLAVONÓIDES TOTAIS

O conteúdo de flavonóides totais quantificado nos extratos brutos das variedades vermelha e roxa de frutos da pitangueira são apresentados na FIGURA 17.

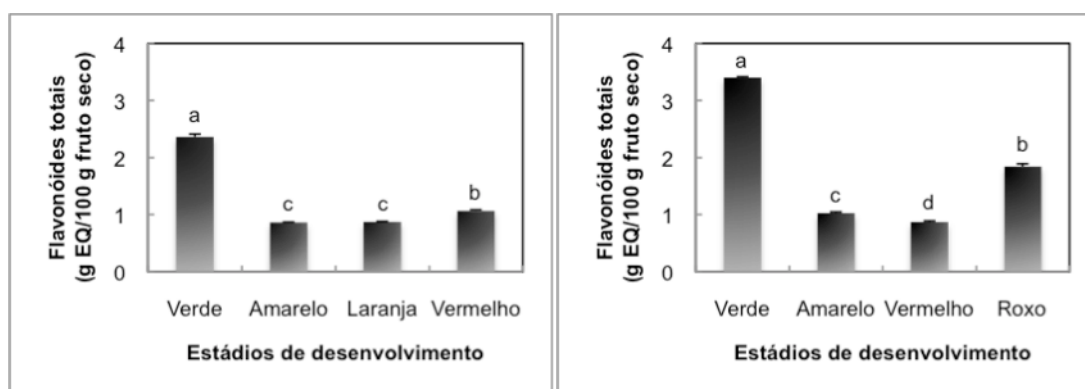


FIGURA 17 - CONTEÚDO DE FLAVONÓIDES TOTAIS DE EXTRATOS BRUTOS DE POLPA DE FRUTOS DAS VARIEDADES VERMELHA (ESQUERDA) E ROXA (DIREITA) DE PITANGUEIRA  
Nota: Colunas identificadas com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p=0,05$ )

O conteúdo de flavonóides totais variou de 0,86 a 2,36 g de equivalentes de quercetina (EQ)/100 g de fruto (em peso seco) para a variedade vermelha, e de 1,03 a 3,40 g EQ/100 g de fruto (em peso seco) para a variedade roxa, dependendo do estágio de desenvolvimento do fruto. Como observado previamente para CFT, o conteúdo de flavonóides foi superior em frutos verdes, das duas variedades, que nos demais estádios de desenvolvimento. Este dado mostra que o conteúdo de flavonóides totais é influenciado pelo estágio de desenvolvimento em que o fruto se encontra e, assim como o CFT, o conteúdo de flavonóides totais diminuiu com o amadurecimento dos frutos da pitangueira, em ambas as variedades. Estudando o mesocarpo de abacate (*Persea americana* Mill.) variedade “Hass” em quatro estádios de desenvolvimento, Villa-Rodríguez e colaboradores (2010) relataram um aumento na concentração de flavonóides totais (expresso em mg de EQ/100g de peso seco) entre os estádios 1 e 2 seguido de decréscimo até o estágio 4, mais avançado. Da mesma maneira, morangos (*F. ananassa* Duch.) colhidos na fase de “ponta branca” (*white tip*) apresentaram concentrações mais elevadas de flavonóides (expresso em equivalentes de catequina por kg de peso fresco) e compostos fenólicos que aqueles no estágio vermelho maduro (SHIN *et al.*, 2008).

### 3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH

DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um radical livre estável devido a um elétron desemparelhado que também previne sua dimerização, fenômeno observado com outros radicais livres (MOLYNEUX, 2004). O teste fotométrico de atividade antioxidante baseia-se na captura do radical DPPH. As atividades sequestradoras do DPPH• de extratos brutos de frutos da pitangueira são mostradas na FIGURA 18.

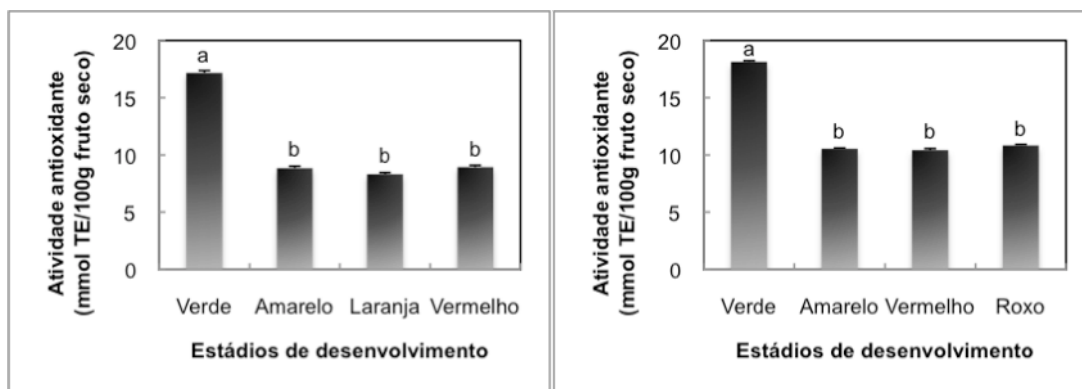


FIGURA 18 - ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAL LIVRE DE EXTRATOS BRUTOS DE POLPA DE FRUTOS DAS VARIEDADES VERMELHA (ESQUERDA) E ROXA (DIREITA) DE PITANGUEIRA (APÓS 30 MINUTOS)

Nota: Colunas identificadas com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p=0,05$ )

Houve um decréscimo na atividade sequestradora de DPPH• de 17,18 a 8,33 mmol de equivalentes de Trolox (ET)/100 g de fruto (em peso seco) durante o desenvolvimento dos frutos da variedade vermelha. Para frutos da variedade roxa, o decréscimo foi de 18,13 a 10,43 mmol ET/100 g de fruto (em peso seco) durante o desenvolvimento. A atividade antioxidante de frutos verdes, para as variedades vermelha e roxa, 17,18 e 18,13 mmol of ET/100 g de fruto (em peso seco), respectivamente, foram significativamente superiores ( $p=0,05$ ) quando comparadas a atividade antioxidante encontrada para frutos nos demais estádios de desenvolvimento. Estes resultados são consistentes com aqueles relatados para CFT. Para ambas as variedades usadas neste trabalho, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada para atividade sequestradora de radical DPPH para frutos em estádios de desenvolvimento além do verde. Em trabalho prévio, Bagetti e colaboradores (2009) avaliaram a capacidade antioxidante de sementes de pitanga obtidas de frutos maduros das variedades vermelha e roxa. A análise foi feita usando uma modificação do método de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), medindo a diminuição da absorbância após 24 horas de reação. Os valores encontrados por estes autores, 14,6 e 16,7 mmol ET/100 g de sementes, respectivamente para sementes das variedades vermelha e roxa, foram relativamente próximos àqueles encontrados neste estudo com polpa de frutos verdes. Se o padrão de alteração da atividade sequestradora de DPPH• é similar ao da polpa, dados deste estudo e aqueles de Bagetti e colaboradores (2009) indicam

que sementes de pitangueira podem apresentar atividade antioxidante superiores a da polpa.

A atividade antioxidante, medida como porcentagem de atividade de sequestro de DPPH• (ou descoloração), encontrada para frutos verdes de ambas as variedades de pitangueira (TABELA 3) foram similares a atividade antioxidante encontrada para *chokecherry* maduro (sem semente) (*Prunus virginiana* L.) (78,86%) após 60 minutos de reação. Para frutos de pitangueira da variedade vermelha nos estádios amarelo, laranja e vermelho, a atividade antioxidante foi muito próxima daquela encontrada para mirtilo selvagem maduro (*Vaccinium* sp. L.) (34,13%) após 60 minutos. Para frutos da variedade roxa nos estádios amarelo, vermelho e roxo, a atividade antioxidante foi muito próxima à reportada para morango maduro (*F. ananassa* Duch.) (40,33%) após 60 minutos (LI *et al.*, 2009). Estes dados indicam que frutos da pitangueira apresentam níveis semelhantes de atividade antioxidante, avaliada após 30 minutos, quando comparados a frutas comumente consumidas, após 60 minutos de reação.

TABELA 3 - ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE DPPH• DE EXTRATOS DE POLPA DE FRUTOS DAS VARIEDADES VERMELHA E ROXA DE PITANGUEIRA, EM PORCENTAGEM

Variedade	Estádio de maturação	Captura de DPPH• (%)
Vermelha	Verde	72,5±0,9 <sup>a</sup>
	Amarelo	35,1±0,7 <sup>b</sup>
	Laranja	32,9±0,6 <sup>b</sup>
	Vermelho	35,5±0,7 <sup>b</sup>
Roxa	Verde	74,9±0,4 <sup>a</sup>
	Amarelo	42,3±0,3 <sup>b</sup>
	Vermelho	41,9±0,6 <sup>b</sup>
	Roxo	43,5±0,4 <sup>b</sup>

Nota: Médias nas linhas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p=0,05$ )

### 3.4 CORRELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CFT DE EXTRATOS BRUTOS DE FRUTOS DA PITANGUEIRA

A correlação positiva entre CFT e atividade antioxidante foi previamente relatada para diferentes alimentos (GIL *et al.*, 2002; KISELOVA *et al.*, 2006; KEDAGE *et al.*, 2007; JAYAPRAKASHA; GIRENNABAR; PATIL, 2008; QIU; LIU;

BETA, 2009). O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado para avaliar a contribuição do CFT para a atividade antioxidante total de frutos da pitangueira das variedades vermelha e roxa. Uma alta correlação positiva,  $r = 0,9954$  e  $r = 0,9931$  ( $p=0,01$ ), foi encontrada entre atividade sequestradora de DPPH• e CFT, para as variedades vermelha e roxa, respectivamente. O teste t confirmou a significância dos coeficientes encontrados, rejeitando a hipótese nula de que a correlação seria igual a zero. Estas relações estreitas indicam que a atividade antioxidante de frutos da pitangueira de ambas as variedades podem ser atribuídas, pelo menos parcialmente, ao conteúdo fenólico.

### 3.5 IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES GLICOSILADOS

Cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massa foram utilizadas para caracterizar os flavonóides e determinar o perfil destes compostos em polpas de frutos da pitangueira de duas variedades diferentes durante seu desenvolvimento. A FIGURA 19 mostra o cromatograma completo (em 350 nm) para o extrato de polpa de frutos no estágio roxo da variedade roxa de pitangueira. Os picos foram numerados de acordo com seus tempos de retenção (Rt). Oito picos principais foram identificados em extratos de frutos em todos os quatro estádios de desenvolvimento. Resultados similares foram encontrados para a variedade vermelha (dados não apresentados), embora o pico 1 (Rt = 10,15 minutos) não tenha sido detectado em frutos verdes da variedade vermelha. Exceto pelo pico 1, os espectros UV para os picos numerados foram caracterizados por duas bandas principais de absorção: em torno de  $\lambda_{\text{máx}}$  260 nm e 350 nm. O pico 1 apresentou bandas de absorção em torno de  $\lambda_{\text{máx}}$  280 nm e 518 nm.

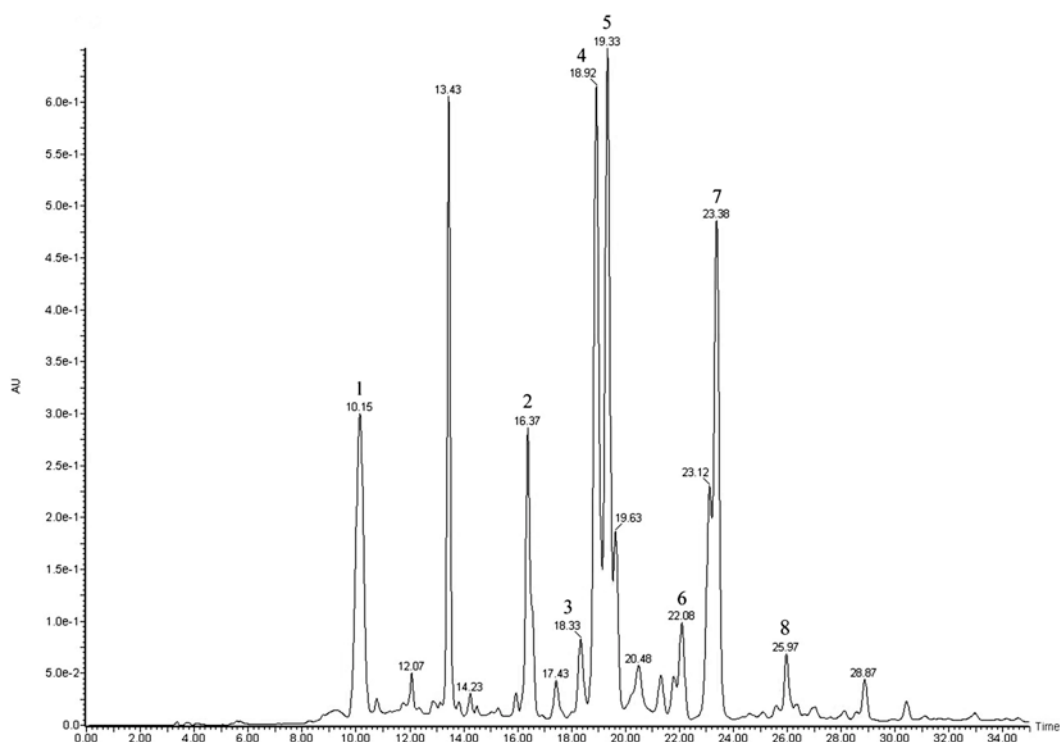


FIGURA 19 - CROMATOGRAMA LC COMPLETO (0 - 35 MINUTOS) REGISTRADO EM 350 nm PARA FRUTOS NO ESTÁDIO ROXO DE PITANGUEIRA (VARIEDADE ROXA)

Nota: Compostos foram identificados como segue: pico 1. cianidina 3-O-glucosídeo; 2. miricetina 3-O-hexosídeo; 3. miricetina 3-O-pentosídeo; 4. miricetina 3-O-ramosídeo; 5. quercetina 3-O-hexosídeo; 6. quercetina 3-O-pentosídeo; 7. quercetina 3-O-ramosídeo; 8. miricetina deoxihexosídeo-galato

O modo negativo foi escolhido para a espectrometria de massas por ser mais sensível na análise de flavonóides e o comportamento da fragmentação fornece informações adicionais e complementares para a identificação dos compostos (CUYCKENS; CLAEYS, 2004). Os resultados das análises de massa são mostrados na TABELA 4. Baseado no padrão de fragmentação, as agliconas foram identificadas como cianidina, miricetina e quercetina. Reynertson e colaboradores (2008) avaliaram o perfil de flavonóides de 14 frutos comestíveis da família Myrtaceae, exceto *Eugenia uniflora*. Cianidina 3-glucosídeo, delphinidina 3-glucosídeo, miricetina, quercetina, quercitrina e rutina foram identificados em quase todas as espécies.

TABELA 4 - TEMPO DE RETENÇÃO, ABSORÇÃO UV MÁXIMA, MASSA MOLECULAR DESPROTONADA E INTENSIDADE RELATIVA DOS ÍONS DOS PICOS 1 - 8

Pico	Rt (minutos)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$[M - H]^-$ (m/z)	Intensidade relativa (%) dos íons (m/z)						
				- gli	[A-H] <sup>-</sup>	[A-28] <sup>-</sup>	[A-45] <sup>-</sup>	[A-30] <sup>-</sup>	[A-46] <sup>-</sup>	[A-138] <sup>-</sup>
1	10,15	280, 518	447	285 (50)	284 (100)	257 (5)	240 (10)			
2	16,37	265, 357	479	317 (25)	316 (100)	287 (15)	271 (20)	179 (3)	151 (5)	
3	18,33	265, 350	449	317 (45)	316 (100)	287 (15)	271 (15)	179 (15)	151 (8)	
4	18,92	261, 350	463	317 (35)	316 (100)	287 (10)	271 (15)	179 (5)	151 (5)	
5	19,33	255, 353	463	301 (45)	300 (100)	271 (30)	255 (15)	179 (3)	151 (5)	
6	22,08	255, 354	433	301 (35)	300 (100)	271 (30)	255 (15)	179 (3)	151 (8)	
7	23,38	255, 348	447	301 (85)	300 (100)	271 (30)	255 (15)	179 (5)	151 (8)	
8	25,97	266, 350	615	- galato 463 (5)	- gli 317 (100)	[A-H] <sup>-</sup> 316 (25)	[A-138] <sup>-</sup> 179 (15)	[A-166] <sup>-</sup> 151 (10)		

Nota: Gli: fração glicosídica; A: aglicona

Os potenciais benefícios dos flavonóides, assim como de outros compostos fenólicos, na saúde humana são suportados por evidências epidemiológicas e *in vitro* de atividades antioxidante, cardioprotetora, anticarcinogênica e contra outras doenças crônicas não transmissíveis (COOK; SAMMAN, 1996). Muitos flavonóides são encontrados na natureza na forma glicosilada, como O- ou C- glicosídeos. A glicosilação é importante para reduzir a reatividade e aumentar a hidrossolubilidade dos flavonóides, e, em contrapartida, previne o dano citoplasmático e garante o armazenamento no vacúolo celular (CUYCKENS; CLAYES, 2005). Os monossacarídeos encontrados ligados a flavonóides são geralmente glucose (o mais comum, identificado em aproximadamente 90% das antocianinas estudadas, por exemplo), galactose, ramnose, xilose e arabinose (CUYCKENS; CLAYES, 2004; ANDERSEN; JORDHEIM, 2006).

### 3.5.1 Identificação de glicosídeo de cianidina

As bandas de absorção características ( $\lambda_{\text{máx}}$  280 e 518 nm) e a presença do íon 285 indicaram que o pico 1 é uma antocianina e a aglicona respectiva é cianidina (2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-triidroxicromenium). O íon  $m/z$  284 é o íon radical aglicona ( $[Y - H]^{\bullet}$ ) formado pela quebra homolítica da ligação glicosídica entre a aglicona e o grupamento açúcar. A razão entre o íon radical aglicona e o fragmento aglicona ( $Y^{\bullet}$ ) sugere o sítio de glicosilação: em flavonol 3-glicosídeos a razão é muito alta, como descrito por Cuyckens e Claves (2005). A O- glicosilação também foi confirmada pela ausência de perda de água (perda de 18 unidades de massa) e clivagem *cross-ring* do grupamento açúcar, o principal padrão de fragmentação de flavonóides C- glicosilados (CUYCKENS; CLAYES, 2004). O pico 1 foi designado como cianidina hexosídeo (MW = 449), compreendendo cianidina (287) e hexose (162). O uso de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI) permitiu a identificação prévia de cianidina 3-O-glucosídeo em extratos de frutos de pitangueira em estádios de desenvolvimento indefinidos (EINBOND *et al.*, 2004). Cianidina 3-O-glucosídeo é amplamente distribuído e encontrado em diversos frutos, incluindo groselha-preta (*Ribes nigrum* L.) (SLIMESTAD; SOLHEIM, 2002; SÓJKA *et al.*, 2009), rosa mosqueta (*Rosa*

*canina* L.) (HVATTUM, 2002), morango (*F. ananassa* Duch.) (AABY; EKEBERG; SKREDE, 2007; PALLAUF *et al.*, 2008; SIMIRGIOTIS *et al.*, 2009), amora Andina (*Rubus glaucus* Berth.), *capuli cherry* (*Prunus serotina* Ehrh.) e ameixa (*Prunus salicina* Lindl.) (VASCO *et al.*, 2009a).

Antocianinas representam um importante subgrupo de flavonóides tipicamente encontradas nas plantas como O- glicosídeos com o grupamento OH do C3 geralmente envolvido na ligação glicosídica (CLIFFORD; BROWN, 2006; ANDERSEN; JORDHEIM, 2006). Até o momento, apenas um C- glicosídeo (8-C-glucosilcianidina 3-[6-malonil]glucosídeo) foi reportado na literatura (SAITO *et al.*, 2003). A presença de antocianinas em plantas resulta em uma variedade de cores na maioria das flores, frutos e folhas, variando de rosa, vermelho, violeta até azul escuro (ANDERSEN; JORDHEIM, 2006), e quase todas as plantas da família Myrtaceae produzem antocianinas (LEE, 2002). Como em uvas (*Vitis vinifera* L.) (GONZÁLEZ-SAN JOSÉ *et al.*, 1991), antocianinas da pitangueira acumulam-se principalmente na parte externa do fruto, embora também possam ser encontradas na polpa de frutos maduros de ambas as variedades (LIMA; MÉLO; LIMA, 2002).

Acredita-se que o consumo de frutos da pitangueira, especialmente frutos roxos da variedade roxa, são benéficos para a saúde humana, já que cianidina 3-O-glucosídeo é uma antocianina. Apesar de alguns estudos sugerirem que apenas 2%, aproximadamente, da dose consumida de antocianinas é absorvida (CLIFFORD; BROWN, 2006), o consumo regular destes compostos tem sido associado com a redução do risco de doenças crônicas, especialmente aquelas relacionadas ao estresse oxidativo, devido às suas propriedades antioxidantes. Além dos efeitos benéficos na saúde humana, o interesse nas antocianinas reside na possibilidade de utilizar frutos como fontes naturais de corante alimentares (ANDERSEN; JORDHEIM, 2006).

### 3.5.2 Identificação de glicosídeos de miricetina

A presença do íon  $m/z$  317 em todos os fragmentos dos picos 2, 3, 4 e 8 indicou que a aglicona é miricetina (3,5,7-triidroxi-2-(3',4',5'-triidroxifenil)-4H-croman-4-ona). O íon  $m/z$  316 é o íon radical aglicona ( $[Y - H]^{\bullet}$ ). O perfil de fragmentação

apresentado pelos picos 2, 3 e 4 sugeriu uma O- glicosilação na posição 3. O pico 2 foi designado como miricetina hexosídeo (MW = 480), compreendendo miricetina (318) e hexose (162). Miricetina 3-O-hexosídeo foi também identificado em groselha preta (*R. nigrum* L.) (SÓJKA *et al.*, 2009), folhas de *Quercus ilex* L. (BROSSA *et al.*, 2009), polpa e casca de caju (*Anacardium occidentale* L.) (BRITO *et al.*, 2007; MICHODJEHOUN-MESTRES *et al.*, 2009), fruto de mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.) (KOPONEN *et al.*, 2008), casca de uva (*V. rotundifolia* Michx.) (SANDHU; GU, 2010), em algumas espécies de *Epilobium* (TÓTH; BLAZICS; KÉRY, 2009) e fruto de bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) (FANG, ZHANG; WANG, 2007). O pico 3 foi designado como miricetina pentosídeo (MW = 450), compreendendo miricetina (318) e pentose (132). Miricetina 3-O-pentosídeo foi também identificado em algumas espécies de *Epilobium* (TÓTH; BLAZICS; KÉRY, 2009), casca e polpa de caju (*A. occidentale* L.) (MICHODJEHOUN-MESTRES *et al.*, 2009) e fruto de mortiño (*V. floribundum* Kunth) (VASCO *et al.*, 2009b). O pico 4 foi designado como miricetina desoxihexosídeo (MW = 464), compreendendo miricetina (318) e desoxihexose (146), e o mais provável glicosídeo de flavonóide correspondente ao pico 4 é miricetina 3-O-ramnosídeo (ou miricetrina), como reportado anteriormente por Schmeda-Hirschmann e colaboradores (1987) para folhas de pitangueira. Miricetina 3-O-ramnosídeo também foi identificado em sub-produtos da fabricação de vinho (SILVA *et al.*, 2005), fruto de cranberry (*V. macrocarpon* Aiton) (LIN; HARNLY, 2007), fruto de mirtilo (*V. myrtillus* L.) (KOPONEN *et al.*, 2008), polpa e casca de uva (*V. rotundifolia* Michx.) (LEE; JOHNSON; TALCOTT, 2005; SANDHU; GU, 2010), em algumas espécies de *Epilobium* (TÓTH; BLAZICS; KÉRY, 2009), casca e polpa de caju (*A. occidentale* L.) (BRITO *et al.*, 2007; MICHODJEHOUN-MESTRES *et al.*, 2009). Pico 8 foi designado miricetina desoxihexosídeo galato (MW = 616), compreendendo miricetina (318), desoxihexose (146) e galato (152). Entretanto, as posições exatas dos grupamentos açúcar e galato não puderam ser determinadas pelos métodos usados neste estudo. O padrão de fragmentação poderia sugerir uma 7-O glicosilação, e o grupamento galato poderia estar ligado diretamente a desoxihexose, embora testes adicionais sejam requeridos para confirmar esta hipótese. Miricetina deoxihexosídeo-galato foi também identificada em frutos de bayberry (*M. rubra* Sieb. et Zucc.) (FANG *et al.*, 2006; FANG, ZHANG; WANG, 2007).

### 3.5.3 Identificação de glicosídeos de quercetina

A presença do íon 301 em todos os fragmentos dos picos 5, 6 e 7 indicou que a aglicona é quercetina (2-(3',4'-diidroxifenil)-3,5,7-triidroxi-4H-croman-4-ona). O íon  $m/z$  300 é o íon radical aglicona ( $[Y - H]^{\bullet}$ ). O padrão de fragmentação apresentado pelos picos 5 e 6 sugeriu uma *O*- glicosilação na posição 3. Picos 5 e 6 foram designados respectivamente como quercetina hexosídeo (MW = 464), compreendendo quercetina (302) e hexose (162), e quercetina pentosídeo (MW = 434), compreendendo quercetina (302) e pentose (132). Ambos os glicosídeos de quercetina foram identificados em uma grande variedade de plantas, incluindo groselha-preta (*R. nigrum* L.) (SÓJKA *et al.*, 2009), casca de manga (*Mangifera indica* L.) (SCHIEBER; BERARDINI; CARLE, 2003), folhas de *Agauria salicifolia* (LHULLIER *et al.*, 2007), polpa de rosa mosqueta (*R. canina* L.) (HVATTUM, 2002), folha de *Quercus ilex* L. (BROSSA *et al.*, 2009), fruto de *cranberry* (*V. macrocarpon* Aiton) (LIN; HARNLY, 2007), casca de pêra (*Pyrus* spp. L.) (LIN; HARNLY, 2008), casca e polpa de caju (*A. occidentale* L.) (BRITO *et al.*, 2007; MICHODJEHOUN-MESTRES *et al.*, 2009) e morango (*F. ananassa* Duch.) (SIMIRGIOTIS *et al.*, 2009). O pico 7 foi designado como quercetina desoxihexosídeo (MW = 448), compreendendo quercetina (302) e desoxihexose (146), e o mais provável flavonóide glicosilado correspondente ao pico 7 é quercetina 3-*O*-ramnosídeo (ou quercitrina), como reportado previamente por Schmeda-Hirschmann e colaboradores (1987) para folhas de pitangueira. Quercetina 3-*O*-ramnosídeo também foi identificada em casca de manga (*M. indica* L.) (SCHIEBER; BERARDINI; CARLE, 2003), frutos de mirtilo (*V. myrtillus* L.) (KOPONEN *et al.*, 2008), casca e polpa caju (*A. occidentale* L.) (MICHODJEHOUN-MESTRES *et al.*, 2009) e morango (*F. ananassa* Duch.) (PALLAUF *et al.*, 2008).

Quercetina é o flavonol mais comum em frutos (KYLE, DUTHIE, 2006) e o principal flavonol consumido na dieta humana. Como visto neste estudo, quercetina, assim como miricetina (flavonol) e cianidina (antocianidina), é geralmente encontrada conjugada com carboidratos em plantas (CUYCKENS; CLAYES, 2005).

Um resumo dos compostos identificados é mostrado na TABELA 5. Os termos gerais hexose, pentose e deoxihexose foram usados para grupamentos açúcares, uma vez que as técnicas usadas neste estudo não permitiram a detecção

de estruturas estereoquímicas de resíduos de carboidratos conjugados a flavonóides. A posição da glicosilação dos flavonóides também não pode ser confirmada devido as limitações da técnica. As tentativas de descrever a posição de glicosilação dos compostos encontrados neste estudo necessitam de confirmação posterior.

TABELA 5 - IDENTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINA E GLICOSÍDEOS DE FLAVONÓIS EM FRUTOS DA PITANGUEIRA POR HPLC-MS/MS, EM MODO NEGATIVO

Pico	Composto	Rt (min)	[M - H] <sup>-</sup> (m/z)	Íons gerados (m/z)
1	Cianidina 3-O-glucosídeo	10,15	447	285, 284, 257, 240
2	Miricetina 3-O-hexosídeo	16,37	479	317, 316, 287, 271, 179, 151
3	Miricetina 3-O-pentosídeo	18,33	449	317, 316, 287, 271, 179, 151
4	Miricetina 3-O-ramnosídeo	18,92	463	317, 316, 287, 271, 179, 151
5	Quercetina 3-O-hexosídeo	18,33	463	301, 300, 271, 255, 179, 151
6	Quercetina 3-O-pentosídeo	22,08	433	301, 300, 271, 255, 179, 151
7	Quercetina 3-O-ramnosídeo	23,38	447	301, 300, 271, 255, 179, 151
8	Miricetina deoxihexosídeo-galato	25,97	615	463, 317, 316, 179, 151

Como relatado anteriormente para flavonóides glicosilados disponíveis comercialmente (HVATTUM; EKEBERG, 2003), a abundância relativa do íon radical aglicona de flavonol 3-O-glicosídeos identificados neste estudo aumentaram com o número de substituições OH no anel B. Por exemplo, usando a mesma energia de colisão para os picos 4 e 5, que apresentam a mesma massa molecular, mas diferem quanto a aglicona (miricetina e quercetina, respectivamente) e o grupamento açúcar, a abundância do íon radical aglicona foi maior para o pico 4 (FIGURA 20), isto é, a razão radical aglicona: fragmento aglicona foi maior quando comparada à do pico 5. Quercetina e miricetina são orto substituídas por grupos OH no anel B, mas apenas a miricetina apresenta um grupo OH adicional na posição 5'. Segundo Hvattum e Ekeberg (2003), a presença do grupo OH extra faz com que a ligação 3-O-glicosídica seja mais susceptível a clivagem homolítica induzida por colisão por um possível efeito doador de elétron.

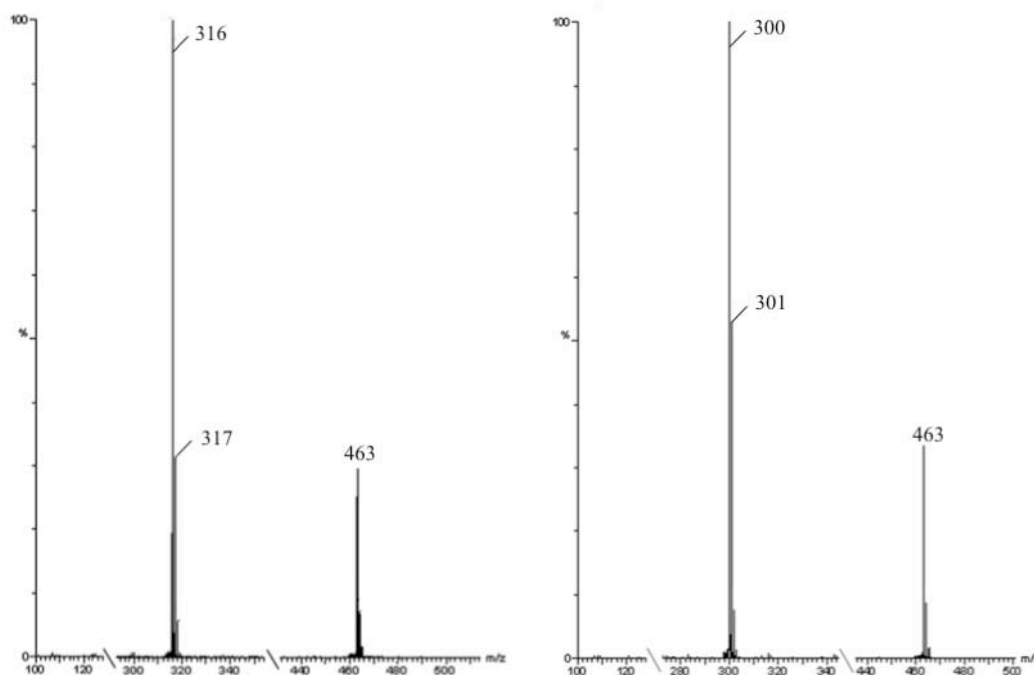


FIGURA 20 - FORMAÇÃO DO ÍON RADICAL AGLICONA POR GLICOSÍDEO DE MIRICETINA (PICO 4) (ESQUERDA) E DE QUERCETINA (PICO 5) (DIREITA)

A capacidade de formar o radical aglicona foi correlacionada com a atividade antioxidante de flavonóides (CUYCKENS; CLAYES, 2004). Esta habilidade é aparentemente similar à atividade antioxidante apresentada por alguns compostos desta classe, por doação de elétron ou hidrogênio (HVATTUM; EKEBERG, 2003). A doação de elétron ocorre devido a presença do grupo catecol (anel B diidroxilado), que é a principal estrutura requerida para a atividade antioxidante (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). Este grupamento também possui alta afinidade por íons metálicos, como ferro e cobre, que podem catalizar reações de formação de radicais livres (GALLEANO *et al.*, 2010).

Exemplos de um glicosídeo de cada aglicona identificada são mostrados na FIGURA 21. Os compostos apresentados foram previamente descritos para pitangueira. A via de fragmentação proposta para quercetina 3-O-ramnosídeo e miricetina 3-O-ramnosídeo é mostrada na FIGURA 22.

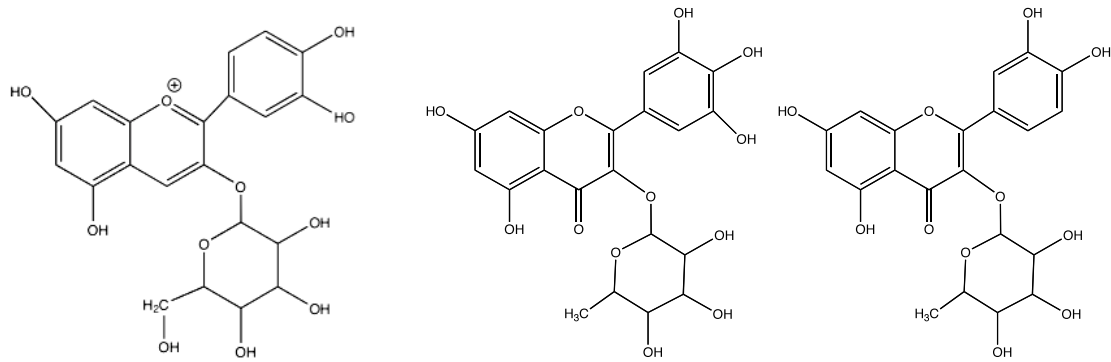


FIGURA 21 - ESTRUTURAS MOLECULARES DE CIANIDINA 3-O-GLUCOSÍDEO (ESQUERDA), MIRICETINA 3-O-RAMOSÍDEO (CENTRO) E QUERCETINA 3-O-RAMOSÍDEO (DIREITA)

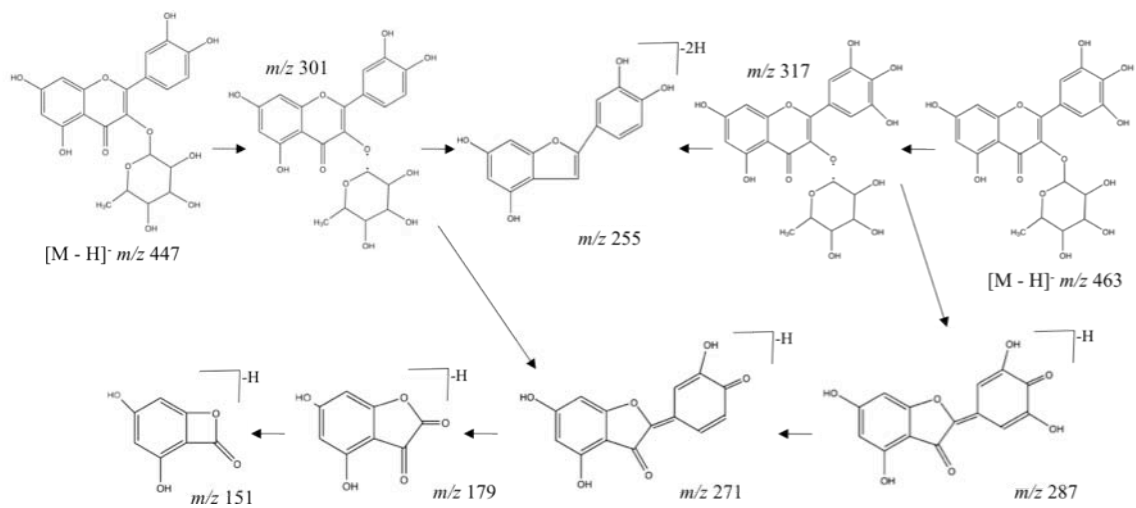


FIGURA 22 - VIA DE FRAGMENTAÇÃO PROPOSTA PARA QUERCETINA 3-O-RAMOSÍDEO (ESQUERDA) E MIRICETINA 3-O-RAMOSÍDEO (DIREITA)

### 3.6 QUANTIFICAÇÃO DOS FLAVONÓIDES GLICOSILADOS

Para quantificar flavonol glicosilados e antocianina em frutos de pitangueira, cloreto de cianidina, quercetina e miricetina foram usados como padrões para seus respectivos glicosídeos. O conteúdo de flavonóides nos frutos durante a maturação é mostrado na TABELA 6.

TABELA 6 - CONTEÚDO DE FLAVONÓIDES GLICOSILADOS ( $\mu\text{g}$  AGLICONA EQUIVALENTES/g FRUTO SECO) EM POLPA DE FRUTOS DAS VARIEDADES VERMELHA E ROXA DE PITANGUEIRA, EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO

Estádio de maturação	Pico							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Variedade vermelha								
Verde	nd	227,05 $\pm$ 1,51	49,77 $\pm$ 1,35	414,66 $\pm$ 0,44	202,23 $\pm$ 3,30	55,27 $\pm$ 0,28	235,81 $\pm$ 5,78	31,82 $\pm$ 0,05
Amarelo	11,81 $\pm$ 0,07	101,49 $\pm$ 1,18	10,03 $\pm$ 0,10	179,93 $\pm$ 0,41	85,73 $\pm$ 0,77	14,37 $\pm$ 0,30	91,76 $\pm$ 0,28	2,89 $\pm$ 0,07
Laranja	18,83 $\pm$ 0,06	122,27 $\pm$ 1,38	15,27 $\pm$ 0,03	213,77 $\pm$ 0,56	121,64 $\pm$ 1,05	22,50 $\pm$ 0,12	128,13 $\pm$ 0,17	5,49 $\pm$ 0,08
Vermelho	31,04 $\pm$ 0,74	130,25 $\pm$ 0,43	22,41 $\pm$ 0,06	226,19 $\pm$ 2,33	115,80 $\pm$ 3,09	27,97 $\pm$ 0,17	135,34 $\pm$ 3,87	9,91 $\pm$ 0,05
Variedade roxa								
Verde	7,45 $\pm$ 0,01	114,88 $\pm$ 1,78	25,70 $\pm$ 0,59	319,85 $\pm$ 1,06	245,84 $\pm$ 0,95	61,44 $\pm$ 0,03	348,07 $\pm$ 0,57	18,72 $\pm$ 0,20
Amarelo	59,14 $\pm$ 0,49	116,86 $\pm$ 1,22	41,47 $\pm$ 0,57	354,61 $\pm$ 1,67	159,71 $\pm$ 0,54	32,40 $\pm$ 0,21	200,34 $\pm$ 0,54	11,34 $\pm$ 0,07
Vermelho	345,00 $\pm$ 1,37	87,18 $\pm$ 2,00	19,18 $\pm$ 0,07	282,13 $\pm$ 0,89	134,63 $\pm$ 0,68	24,23 $\pm$ 0,27	194,19 $\pm$ 0,61	6,06 $\pm$ 0,06
Roxo	1689,67 $\pm$ 21,14	132,53 $\pm$ 1,20	25,21 $\pm$ 0,59	279,61 $\pm$ 0,79	375,32 $\pm$ 1,79	61,68 $\pm$ 0,02	285,04 $\pm$ 0,99	7,85 $\pm$ 0,06

Nota: Compostos foram identificados como segue: pico 1. cianidina 3-O-glucosídeo; 2. miricetina 3-O-hexosídeo; 3. miricetina 3-O-pentosídeo; 4. miricetina 3-O-ramnosídeo; 5. quercetina 3-O-hexosídeo; 6. quercetina 3-O-pentosídeo; 7. quercetina 3-O-ramnosídeo; 8. miricetina deoxihexosídeo-galato; nd – não detectado

Um pico significativo de antocianina foi encontrado apenas em frutos no estágio roxo da variedade roxa, enquanto um pico significativo de miricetina glicosilada estava presente apenas em frutos no estágio verde da variedade vermelha. Miricetina 3-O-ramnosídeo (pico 4) foi o principal flavonóide glicosilado encontrado em frutos da variedade vermelha em todos os estádios de desenvolvimento. Miricetina 3-O-ramnosídeo também foi o principal flavonóide glicosilado encontrado para frutos verdes e amarelos da variedade roxa. Nos últimos dois estádios de maturação dos frutos, um acúmulo significativo de cianidina glicosilada foi notado, especialmente para frutos da variedade roxa. A concentração de glicosídeo de cianidina em frutos no estágio roxo desta variedade representou 59% dos flavonóides glicosilados totais quantificados neste estudo, enquanto que o mesmo composto em frutos no estágio vermelho, da variedade vermelha, representou apenas 4% dos flavonóides glicosilados totais. Cianidina 3-O-glucosídeo, a antocianina mais distribuída na natureza (KONG *et al.*, 2003), é também amplamente encontrada na família Myrtaceae. Entre 19 gêneros e 50 espécies (TABELA 7), cianidina 3-O-glucosídeo foi reportada para 12 gêneros e 32 espécies, respectivamente, em Myrtaceae. Desta maneira, não surpreende o fato de que cianidina 3-O-glucosídeo foi o principal flavonóide encontrado para frutos maduros da variedade roxa de pitangueira. Pela sua cor característica vermelho-arroxeadado, cianidina 3-O-glucosídeo é provavelmente o principal pigmento que contribui para esta coloração em frutos maduros da variedade roxa de pitangueira. A alta concentração de antocianina encontrada em frutos de pitangueira, especialmente para a variedade roxa, pode justificar a utilização mais abrangente destes frutos pela indústria de alimentos no desenvolvimento de novos produtos direcionados a saúde humana, coloridos naturalmente e enriquecidos de antioxidantes.

Quercetina 3-O-ramnosídeo, juntamente com cianidina 3-O-glucosídeo, é o flavonóide mais comumente reportado para espécies da família Myrtaceae (TABELA 7). Quercetina 3-O-ramnosídeo foi relatada para 8 gêneros e 20 espécies. Desta maneira, encontrar quercetina 3-O-ramnosídeo como o principal flavonol em frutos da pitangueira de ambas as variedades usadas neste estudo não é uma surpresa. Em conjunto, todos os outros seis flavonóides identificados foram relatados previamente para 53% dos gêneros e menos de 30% das espécies listadas na TABELA 7.



TABELA 7 - LISTA DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA MYRTACEAE NAS QUAIS OS FLAVONÓIDES IDENTIFICADOS NESTE ESTUDO FORAM PREVIAMENTE REPORTADOS (conclusão)

<i>M. robusta</i>	X						ANDERSEN, 1988
<i>M. umbellata</i>	X						ANDERSEN, 1988
<i>Myrciaria cauliflora</i>	X					X	REYNERTSON <i>et al.</i> , 2008
<i>M. dubia</i>	X					X	REYNERTSON <i>et al.</i> , 2008
<i>M. vexator</i>	X					X	REYNERTSON <i>et al.</i> , 2008
<i>Myrsine seguinii</i>				X		X	ZHONG <i>et al.</i> , 1997
<i>Myrtus communi</i>		X	X	X	X	X	BARBONI <i>et al.</i> , 2010
<i>Neomyrtus pedunculata</i>	X						LOWRY, 1976
<i>Plinia pinnata</i>				X			MENDEZ <i>et al.</i> , 1994
<i>Psidium guajava</i>				X	X		ARIMA; DANNO, 2002; LIANG; QIAN; YAO, 2005
<i>Syzygium anisatum</i>					X	X	KONCZAK <i>et al.</i> , 2010
<i>S. cumini</i>	X					X	REYNERTSON <i>et al.</i> , 2008
<i>S. curranii</i>	X					X	REYNERTSON <i>et al.</i> , 2008
<i>S. jambos</i>						X	REYNERTSON <i>et al.</i> , 2008
<i>S. javanicum</i>						X	REYNERTSON <i>et al.</i> , 2008
<i>S. luehmannii</i>	X						NETZEL <i>et al.</i> , 2007
<i>S. malaccense</i>	X					X	REYNERTSON <i>et al.</i> , 2008
<i>S. samarangense</i>	X			X		X	REYNERTSON <i>et al.</i> , 2008; SIMIRGIOTIS <i>et al.</i> , 2008

Nota: Flavonóides identificados como segue: 1. cianidina 3-O-glucosídeo; 2. miricetina 3-O-hexosídeo; 3. miricetina 3-O-pentosídeo; 4. miricetina 3-O-ramnosídeo; 5. quercetina 3-O-hexosídeo; 6. quercetina 3-O-pentosídeo; 7. quercetina 3-O-ramnosídeo; 8. miricetina deoxihexosídeo-galato.

Frutos verdes da variedade vermelha apresentaram conteúdo superior de glicosídeos de miricetina (compostos 2, 3, 4 e 8) quando comparados aos frutos da variedade roxa. Conteúdos de miricetina 3-O-hexosídeo (2) e miricetina 3-O-pentosídeo (3) foram aproximadamente duas vezes superiores em frutos verdes da variedade vermelha, quando comparados aos frutos verdes da variedade roxa no mesmo estágio de desenvolvimento. Frutos amarelos da variedade roxa apresentaram conteúdo superior de todos os flavonóides glicosilados identificados (pelo menos duas vezes maior, exceto para miricetina 3-O-hexosídeo), quando

comparados aos frutos da variedade vermelha no mesmo estágio. De maneira similar ao observado para frutos amarelos, frutos no estágio vermelho (variedade roxa) apresentaram todos os flavonóides glicosilados identificados em maior quantidade quando comparados aos frutos no estágio laranja (variedade vermelha), exceto para miricetina 3-O-hexosídeo. É também notável que neste estágio o conteúdo de cianidina 3-O-glucosídeo foi mais de 18 vezes superior em frutos da variedade roxa (estádio vermelho) quando comparados aos frutos da variedade vermelha (estádio laranja). Exceto pelo pico 8 (miricetina deoxihexosídeo-galato), todos os flavonóides glicosilados identificados foram encontrados em quantidades superiores em frutos roxos, para a variedade roxa, quando comparados aos frutos vermelhos, da variedade vermelha. Para frutos neste estágio de desenvolvimento, a maior diferença (pelo menos duas vezes) no conteúdo de flavonóides glicosilados foi encontrada para compostos 1, 5, 6 e 7, todos flavonóides glicosilados diferentes de conjugados de miricetina. Além disso, frutos no estágio roxo apresentaram um conteúdo de cianidina 3-O-glucosídeo aproximadamente cinco vezes superior quando comparado aos frutos no estágio vermelho.

Uma vez que flavonóides são metabólitos secundários estruturalmente diversos comumente encontrados no reino vegetal (WINKEL-SHIRLEY, 2002), eles foram usados por muitos anos como marcadores filogenéticos úteis e confiáveis. Baseado na evolução das angiospermas, famílias mais derivadas de dicotiledôneas tendem a acumular O- glicosídeos de flavonas (apigenina e luteolina) e agliconas metiladas ou com hidroxilas adicionais. Em contrapartida, famílias supostamente menos derivadas produzem predominantemente flavonol O- glicosídeos (kaempferol, quercetina e miricetina), principalmente derivados de miricetina e proantocianinas (HARBORNE, 1977; SOARES; KAPLAN, 2001; WILLIAMS, 2006). Assim, dados deste trabalho fornecem suporte adicional para a assunção de que Myrtaceae não é uma família avançada entre as dicotiledôneas.

**CAPÍTULO 2 – EFEITOS DO ETILENO E SEUS INIBIDORES SOBRE  
COLORAÇÃO E TEXTURA**

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 BIOSÍNTESE E MECANISMO DE SINALIZAÇÃO DO ETILENO

O etileno é um hormônio vegetal que afeta muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento da planta, como germinação, floração, senescência, amadurecimento de frutos, abscisão foliar, nodulação das raízes, determinação do sexo, morte celular programada, dentre outros (STEPANOVA; ECKER, 2000). O etileno também é um regulador chave na resposta a estresse biótico e abiótico. O efeito do etileno depende da habilidade da célula vegetal em “perceber” o hormônio, transduzir o sinal da membrana ao núcleo e modular a expressão de genes específicos envolvidos nestes efeitos (SOLANO; ECKER, 1998). A existência de uma hierarquia de fatores transcricionais na via de sinalização do etileno serviria para a amplificação do sinal percebido e/ou fornecer meios de regulação das respostas ao etileno (SOLANO *et al.*, 1998).

A “resposta tripla” é um efeito bem conhecido do etileno no crescimento de mudas estioladas de dicotiledôneas. Tal resposta ocorre nos estádios iniciais do desenvolvimento (três dias após a germinação) e caracteriza-se pela inibição da alongação celular do hipocótilo e raízes, inchaço radial do hipocótilo e curvatura exagerada do gancho apical (GUO; ECKER, 2004).

Além de estar envolvido no metabolismo de poliaminas, o composto S-adenosil L-metionina (SAM) é o precursor da biossíntese do etileno (YANG; HOFFMAN, 1984; KENDE, 1993) (FIGURA 23). A metionina é um aminoácido essencial na síntese de proteínas e aproximadamente 80% do conteúdo celular é convertido a SAM pela ação da SAM sintetase, com gasto de ATP (GIOVANELLI; MUDD; DATKO, 1985; RAVANEL *et al.*, 1998). SAM é o principal doador de grupos metila em reações de transmetilação, sendo que mais de 90% do conteúdo sintetizado pelas células é utilizado para este fim (GIOVANELLI; MUDD; DATKO, 1985).

A etapa limitante da biossíntese de etileno é a conversão de SAM em ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) (ADAMS; YANG, 1979) pela ACC sintase (ACS), que também produz 5-metiltoadenosina (MTA) pela eliminação do grupo

metila e do enxofre, posteriormente convertida a metionina (YANG; HOFFMAN, 1984; MIYAZAKI; YANG, 1987; KENDE, 1993). Esta via permite que novas moléculas de metionina sejam formadas sem elaboração de novos grupos metilíio, além de manter a produção de etileno e poliaminas (MIYAZAKI; YANG, 1987). ACC sintase necessita de um cofator piridoxal fosfato para agir (YU; ADAMS; YANG, 1979).

A formação de etileno ocorre com a oxidação do ACC pela ACC oxidase, com liberação de CO<sub>2</sub> e cianeto (YANG; HOFFMAN, 1984), que é convertido a β-cianoalanina para prevenir seus efeitos tóxicos (WANG; LI; ECKER, 2002).

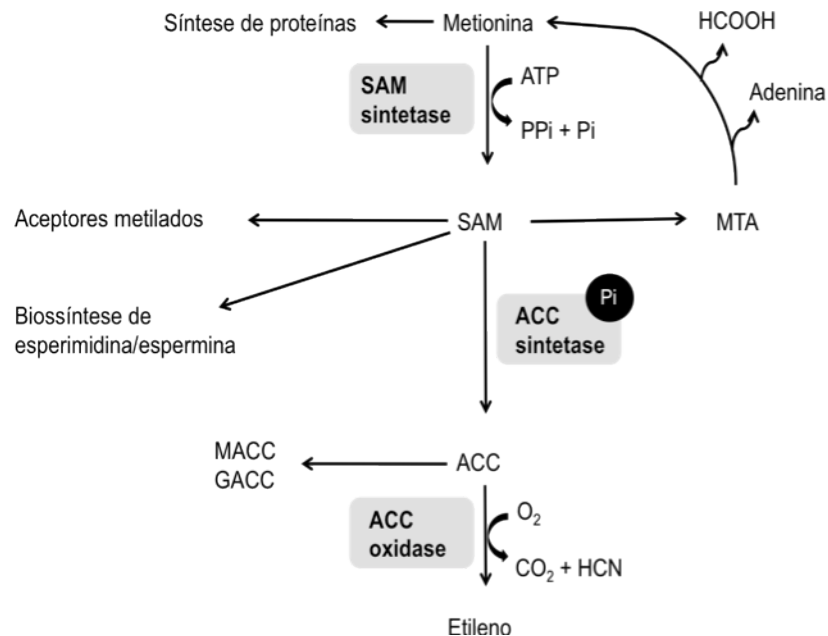


FIGURA 23 - VIA DE BIOSÍNTESE DO ETILENO

Fonte: Adaptado de WANG; LI; ECKER, 2002

Nota: MACC - N-malonil-ACC; GACC - 1-(γ-L-glutamil-amino)-ACC

O modelo de sinalização do etileno, em *Arabidopsis*, está representado na FIGURA 24.

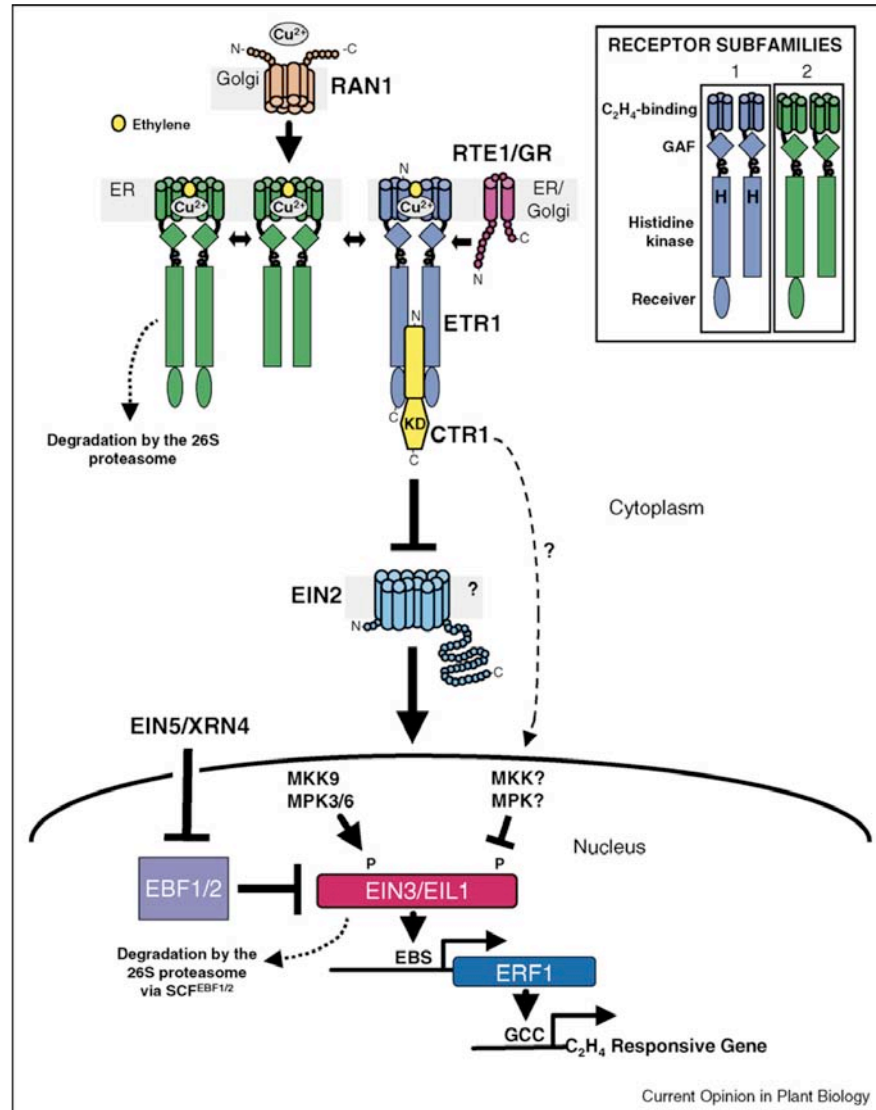


FIGURA 24 - MODELO ATUAL PROPOSTO PARA A VIA DE SINALIZAÇÃO DO ETILENO  
 Fonte: KENDRICK; CHANG, 2008

O início do mecanismo de transdução de sinal do etileno ocorre com a ligação do hormônio a receptores específicos ou um complexo de receptores (homo e heteroméricos) associados a membrana (GREFEN *et al.*, 2008), uma família de proteínas do tipo histidina quinases que inclui cinco membros (HUA; MEYEROWITZ, 1998; SOLANO; ECKER, 1998), identificados em *Arabidopsis* como ETHYLENE RESPONSE1 (ETR1) (CHANG *et al.*, 1993), ETR2 (SAKAI *et al.*, 1998), ETHYLENE RESPONSE SENSOR1 (ERS1) (HUA *et al.*, 1995), ERS2 e ETHYLENE INSENSITIVE4 (EIN4) (HUA *et al.*, 1998). Tais receptores possuem similaridade com os sistemas bacterianos de regulação por dois componentes, o que se acreditava ser exclusividade deste tipo de microrganismo (CHANG; STADLER,

2001). Estes sistemas de regulação servem como um mecanismo básico de acoplamento estímulo-resposta que permite aos organismos perceber e responder a alterações em diversas condições ambientais. Um sistema básico consiste de uma histidina quinase (HK) com *core* quinase conservado e uma proteína reguladora de resposta (RR) com domínio regulatório conservado. Os estímulos extracelulares são percebidos por, e modulam as atividades de, HK. A HK transfere um grupamento fosforil a RR, em uma reação catalisada por RR. A transferência do fosfato para RR resulta na ativação do domínio efetor *downstream* que gera uma resposta específica (STOCK; ROBINSON; GOUDREAU, 2000).

Com base na suas similaridades estruturais, a família de receptores pode ser dividida em duas subfamílias (FIGURA 24) (HUA *et al.*, 1998; GUO; ECKER; 2004; HALL; SHAKEEL; SCHALLER, 2007). Além da sequência de aminoácidos, genes de uma mesma subfamília possuem posições dos íntrons conservadas que não são compartilhadas entre as duas subfamílias, como por exemplo a presença de um íntron nos genes *ETR2*, *EIN4* e *ERS2* em uma localização onde nenhum íntron é encontrado tanto em *ETR1* como *ERS1* (HUA *et al.*, 1998). Cada receptor possui uma região de ligação ao etileno próximo ao domínio amino-terminal transmembrana seguido do domínio GAF (com função não totalmente elucidada) e domínio sinal no terminal carboxi. Além da ligação com o etileno, os domínios transmembranas são responsáveis pela localização na membrana e estão entre as regiões mais conservadas dos receptores de etileno. O domínio GAF poderia mediar a associação não covalente e reversível entre receptores (GREFEN *et al.*, 2008). Os membros da subfamília tipo I (*ETR1* e *ERS1*) possuem três domínios transmembrana e atividade histidina quinase (HK), enquanto os receptores da subfamília tipo II (*ETR2*, *ERS2* e *EIN4*) possuem um quarto domínio, que pode servir como uma sequência de sinal, atividade serina/treonina quinase e domínio HK degenerado. O receptor *ERS1* de *Arabidopsis* possui ambas as atividades (HALL; SHAKEEL; SCHALLER, 2007).

Os genes dos receptores são regulados diferentemente pelo etileno. Enquanto os níveis de RNA de *ERS1*, *ETR2* e *ERS2* são regulados positivamente pelo hormônio, a expressão de *ETR1* e *EIN4* não é afetada quando as plantas são tratadas com etileno (HUA *et al.*, 1998). Esta regulação positiva poderia ser um mecanismo de adaptação nas respostas ao etileno. O etileno também induz a expressão de muitos membros desta família, que levaria a uma produção de mais proteínas que podem reprimir a resposta do etileno. Pela regulação positiva poderia-

se desensibilizar progressivamente o sistema, já que concentrações cada vez maiores de etileno seriam necessárias para manter o mesmo nível de resposta (HUA; MEYEROWITZ, 1998).

Acredita-se que a ligação do etileno aos receptores inativa suas funções como um regulador negativo, permitindo que a resposta do etileno ocorra (HUA; MEYEROWITZ, 1998; BLEECKER; KENDE, 2000; CIARDI *et al.*, 2000). Esta inativação ocorre de maneira oposta ao observado em receptores de hormônio e fatores de crescimento animais mais conhecidos, na qual a ligação normalmente induz uma resposta por ativação de tais receptores (HUA; MEYEROWITZ, 1998). Na ausência de etileno, acredita-se que os receptores estejam em formas funcionalmente ativas que ativam constitutivamente uma proteína serina/treonina quinase (HUANG *et al.*, 2003) semelhante à família Raf (em animais, Raf fosforila MEKs, *mitogen-activated protein kinase kinase* - MAPKK, por sua vez fosforila MAPKs), *CONSTITUTIVE RESPONSE1* (CTR1), que também age como regulador negativo da via de transdução do sinal (KIEBER *et al.*, 1993; SOLANO; ECKER, 1998). A ativação de CTR1 poderia se dar por fosforilação direta ou defosforilação pelas proteínas relacionadas ao receptor ou ainda pela localização de CTR1 por ligação física às proteínas (HUA; MEYEROWITZ, 1998).

Estudos mostram que ETR1 poderia interagir com algumas proteínas associadas a membrana como *RESPONSE TO ANTAGONIST1* (RAN1), presente no complexo de Golgi e responsável pelo transporte de cobre (co-fator de ligação do etileno aos receptores) (HIMELBLAU; AMASINO, 2000). RAN1 possui similaridade com ATPases tipo P transportadoras de cobre, como as proteínas Menkes/Wilson, em humanos, e Ccc2, em leveduras (HIRAYAMA *et al.*, 1999). Woeste e Kieber (2000) sugerem que o cobre seja enviado pela RAN1 aos receptores, tornando-os funcionais, e para enzimas que necessitam de tais íons. Apesar de ser necessário, o cobre é muito reativo em sistemas biológicos e um desequilíbrio na sua homeostasia pode resultar na geração rápida de espécies reativas de oxigênio, sugerindo uma outra função de RAN1 (WOESTE; KIEBER, 2000).

Na sequência da suposta cascata MAPK, alguns genes são necessários para a sinalização do etileno, que incluem *EIN2*, *EIN5* e *EIN6* (SOLANO; ECKER, 1998), reguladores positivos das respostas ao etileno (GUO; ECKER, 2004). *EIN2* é uma proteína integral cuja função não é completamente entendida. Sua porção amino terminal possui similaridade com a família Nrap (*natural resistance-*

*associated macrophage protein*) de transportadores de íons metálicos, sugerindo que EIN2 possa perceber cátions divalentes (inferindo a existência de mensageiros secundários na via de transdução do sinal do etileno) ou que apenas sirva para ancorar a proteína à membrana, mantendo o terminal COOH em posição para que interaja com outros componentes da via de transdução de sinal (ALONSO *et al.*, 1999). As proteínas nucleares EIN3 e ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE (EILs) são fatores transcricionais que regulam a expressão de genes alvo imediatos como ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 (ERF1), por se ligarem diretamente como dímeros na porção PERE (*primary ethylene response element*) presente nos promotores (SOLANO *et al.*, 1998). Sugere-se que a superexpressão (e aumento da atividade) de EIN3 ou EIL1 poderia gerar respostas esperadas para o etileno (CHAO *et al.*, 1997).

Na ausência do etileno, EIN3 é uma proteína instável (com meia vida inferior a 30 minutos), degradada por uma via ubiquitina/proteasoma pelo complexo SCF (*SKP1, Cullin 1, F-box*) E3 (ubiquitina ligase) que contém duas proteínas, EIN3 BINDING F-BOX (EBF) 1 e 2. A superexpressão destas proteínas resulta em insensibilidade ao etileno e desestabilização de EIN3 (GUO; ECKER, 2003; POTUSCHAK *et al.*, 2003; GAGNE *et al.*, 2004). Estudo *in vitro* com mudas de *Arabidopsis* mostrou que a luz pode agir como um regulador negativo na desestabilização de EIN3 e EIL1 (LEE; DENG; KIM, 2006). Segundo Binder e colaboradores (2007), EBF1 agiria nos estágios iniciais de sinalização, degradando constitutivamente EIN3 e EIL1 na ausência ou em baixas concentrações de etileno. Por outro lado, EBF2 exerceria seu papel durante os estágios mais tardios da resposta, quando EIN3 e EIL1 estão em excesso (BINDER *et al.*, 2007). A fosforilação de EIN3 no sítio T714 pela cascata MKK9-MPK3/6 promove sua estabilidade; a do sítio T592, sua degradação (YOO *et al.*, 2008).

Estudos mostraram que *EIN5* codifica a EXORIBONUCLEASE4 (XRN4) (OLMEDO *et al.*, 2006; POTUSCHAK *et al.*, 2006). O papel de EIN5 no mecanismo de percepção do etileno seria antagonizar o *feedback* negativo na regulação de EIN3, promovendo a redução de RNAm de EBF1 e EBF2, com consequente acúmulo de EIN3 (OLMEDO *et al.*, 2006).

Uma cascata transcricional mediada pelas proteínas EIN3/EIL e ERF1 regula a expressão de genes controlados pelo etileno (GUO; ECKER, 2004). ERF1 pertence a família de fatores transcricionais contendo domínio APETALA2 que se

liga ao SERE (*secondary ethylene response element*) GCC-box (motivos AGCCGCC) presentes nos promotores de genes induzidos pelo etileno e relacionados a defesa (HAO; OHME-TAKAGI; SARAI, 1998; SOLANO *et al.*, 1998). A expressão constitutiva de ERF1 ativa a transcrição de genes efetores localizados abaixo da via de transdução de sinal, como quitinase básica e PDF1.2. Plantas superexpressando ERF1 apresentaram inibição da elongação celular do hipocótilo e raízes e plântulas com falta do gancho apical exagerado (SOLANO *et al.*, 1998).

O entendimento do mecanismo de sinalização do etileno foi surpreendido com a descoberta de que o retículo endoplasmático (RE) está envolvido neste processo (GUO; ECKER, 2004). Segundo Chen e colaboradores (2002), o receptor ETR1 é predominantemente localizado e retido no RE de *Arabidopsis*. Tal localização apresenta algumas vantagens para a transdução do sinal: é energeticamente eficiente, já que o receptor não é exportado do sistema secretório para a membrana plasmática; os receptores são direcionados rapidamente para o seus sítios de ação, e permite a regulação local dos processos relacionados ao ER, como a liberação de cálcio e proteínas (CHEN *et al.*, 2002). O cálcio foi relacionado previamente com as respostas das plantas ao etileno (RAZ; FLUHR, 1992; KWAK; LEE, 1997; YANG; POOVAIAH, 2000). Estudos mais recentes mostraram que ETR1 é encontrado principalmente no complexo de Golgi e parcialmente no RE de células de raiz de *Arabidopsis*. Sugere-se que esta localização diferenciada dependa do estágio e tipo de célula, resultando em diferentes respostas. Outra proteína recentemente identificada no complexo de Golgi é REVERSION-TO-ETHYLENE SENSITIVITY1 (RTE1), que regula positivamente o receptor ETR1 (DONG *et al.*, 2008). Tratamento com etileno induz a expressão de RTE1 e sua superexpressão confere sensibilidade reduzida ao hormônio, que parcialmente depende de ETR1 (ZHOU *et al.*, 2007; RESNICK *et al.*, 2006).

Além de ETR1, CTR1 é predominantemente localizado na membrana do RE em *Arabidopsis*, resultado de sua interação com receptores do etileno (GAO *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2003). Estudo conduzido por Gao e colaboradores (2003) mostrou a associação de CTR1 e ETR1, assim como outros receptores das subfamílias I (com maior afinidade) e II, formando complexos estáveis (FIGURA 25). CTR1 solúvel pode não ser capaz de reprimir as respostas ao etileno já que pode ocorrer uma autoinibição da sua atividade quinase pelo seu terminal amino e por estar longe do substrato localizado no RE (GAO *et al.*, 2003).

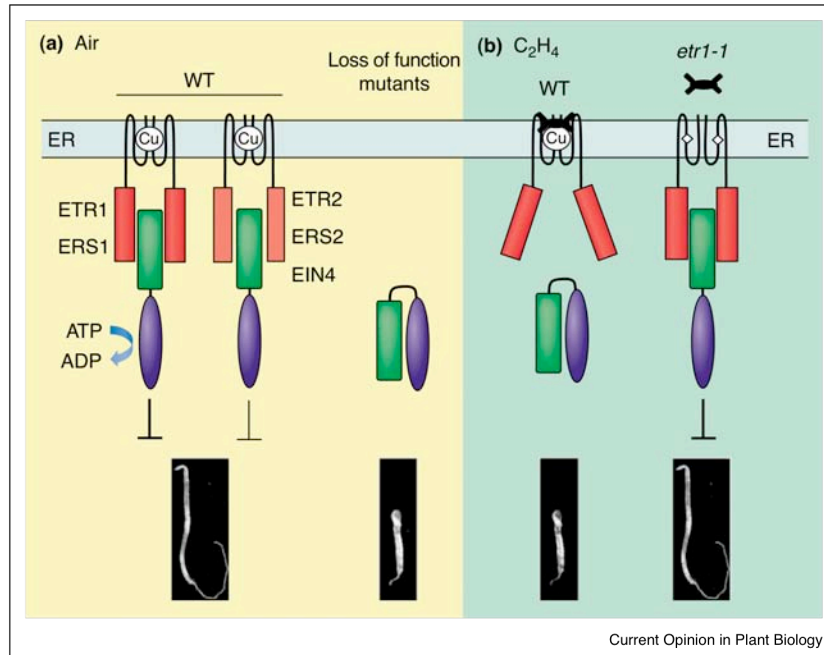


FIGURA 25 - MODELO PROPOSTO PARA A SINALIZAÇÃO DO ETILENO PELOS RECEPTORES E CTR1

Fonte: GUO; ECKER, 2004

### 1.1.1 Frutos Climatéricos x Não Climatéricos

Para a manutenção de gerações subseqüentes viáveis e progenia competitiva, diversos mecanismos envolvidos na dispersão das sementes evoluíram nas plantas, tendo os frutos um papel fundamental neste processo. Frutos são basicamente carpelos maduros e, em uma definição mais acurada, engloba tecidos extra-carpelares que são incluídos no estágio de frutificação mais avançado. Estes tecidos adicionais podem ser exemplificados como os receptáculos de morango e as brácteas do abacaxi. Os frutos podem ser classificados como deiscentes (ou secos, como as vagens de legumes) e indeiscentes (ou carnosos) (GIOVANNONI, 2001).

O amadurecimento de frutos, típico de frutos carnosos, confere atratividade e palatabilidade a animais dispersores de sementes, resultado de uma soma de alterações bioquímicas e fisiológicas que ocorrem na fase final do desenvolvimento do fruto (GIOVANNONI, 2001; ALEXANDER; GRIERSON, 2002), um prelúdio para a senescência (OELLER *et al.*, 1991). Frutos partenocárpicos (sem semente) ocorrem como resultado de alterações genéticas (como mutações gênicas e alterações na ploidia genômica) ou ambientais e/ou alterações hormonais, que mimetizam e dão

início a cascata de desenvolvimento do fruto ou aborto do embrião prematuro. Comercialmente, o amadurecimento agrega valor ao fruto como *commodity* agrícola. De maneira geral, ocorre a modificação da ultraestrutura e textura da parede celular, conversão de amido em açúcares, aumento da susceptibilidade pós-colheita à patógenos, alterações na biossíntese e acúmulo de pigmento e intensificação de sabor e compostos aromáticos voláteis. Como consequência do amadurecimento, há a diminuição da vida de prateleira e aumento dos cuidados exigidos na colheita, transporte e armazenamento, além de gastos consideráveis e perdas da colheita, como resultado da alteração da firmeza e diminuição da resistência a infecções microbianas nos frutos maduros (GIOVANNONI, 2001).

O conceito de fruto climatérico e não climatérico é fundamental para qualquer discussão da importância do etileno em sistemas pós-colheita. Kidd e West (1925) introduziram o termo climatérico para descrever o aumento ocorrido na taxa respiratória observada juntamente com a fase de maturação em maçãs. Categorias climatérica e não climatérica foram desenvolvidas baseando-se na presença ou na ausência do aumento da respiração durante o amadurecimento (WATKINS, 2002).

O climatérico pode ser definido como o período na ontogenia de certos frutos no qual uma série de alterações bioquímicas iniciadas pela produção autocatalítica de etileno, associada a respiração aumentada, leva a mudanças do crescimento e, conseqüentemente, ao amadurecimento (SUDHEER; INDIRA, 2007).

A produção autocatalítica do etileno pode preceder, coincidir ou proceder o aumento da taxa respiratória, dependendo do fruto sob investigação. A manutenção da taxa respiratória e, conseqüentemente, a utilização de carboidratos a níveis mínimos é desejável para manutenção da qualidade do fruto (WATKINS, 2002).

A relação entre o período climatérico e índices de amadurecimento não é sempre perfeita. Embora o climatérico e amadurecimento ocorram simultaneamente em muitas frutas sob uma ampla variedade de condições, evidências mostram que estes eventos podem ser separados (HAARD; CHISM, 1996). Tomando como exemplo a banana (FIGURA 26), conhecido fruto climatérico, o conteúdo de etileno é constante durante o seu crescimento e desenvolvimento até o início do amadurecimento, quando um abrupto aumento na síntese de etileno precede o aumento climatérico na respiração. Esta taxa de produção acelerada pode ser requerida para elevar o conteúdo interno de etileno para um nível estimulatório ou pode ser uma resposta autocatalítica iniciada quando o tecido torna-se sensível a

um nível baixo de etileno presente durante o período de desenvolvimento. Após a colheita, o tempo requerido para responder a baixas concentrações de etileno aplicado diminui progressivamente com a idade do fruto até que, pouco antes do início do amadurecimento natural, o fruto torna-se capaz de reagir rapidamente a quantidade de gás semelhante ao que ele continha durante o período pré climatérico (BURG; BURG, 1965).

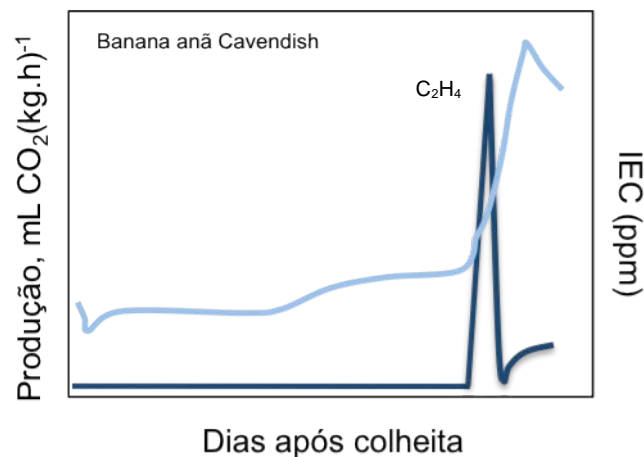


FIGURA 26 - MUDANÇAS NA CONCENTRAÇÃO INTERNA DE ETILENO (IEC) (EM AZUL ESCURO) E PRODUÇÃO DE  $CO_2$  (EM AZUL CLARO) DURANTE AMADURECIMENTO NORMAL DE BANANAS ANÃS CAVENDISH APÓS A COLHEITA

Fonte: Adaptado de BURG, 2004

Após a colheita, a taxa respiratória tipicamente decai. O decaimento ocorre lentamente em frutos não climatéricos e órgãos armazenados, e rapidamente em tecidos vegetais e frutos imaturos. O rápido declínio presumidamente reflete a diminuição da concentração de substratos respiráveis que são tipicamente baixos em tais tecidos (SALTVEIT, 2004). Uma importante característica pós-colheita é o rápido e algumas vezes drástico aumento da respiração durante o amadurecimento de frutos climatéricos (FIGURA 27). Este aumento normalmente consiste de quatro fases distintas: a) mínimo pré-climatérico (atividade respiratória neste estágio é mínima); b) aumento climatérico; c) pico climatérico; d) declínio pós-climatérico (ou senescência) (FIGURA 28) (SALTVEIT, 2004).

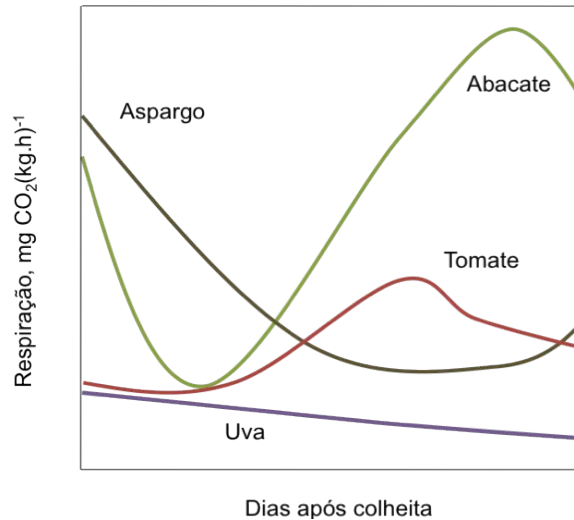


FIGURA 27 - PADRÃO DE RESPIRAÇÃO APÓS A COLHEITA DE ASPARGO (HASTE) (EM MARROM), FRUTOS CLIMATÉRICOS (TOMATE, EM VERMELHO, E ABACATE, EM VERDE), E FRUTO NÃO CLIMATÉRICO (UVA, EM ROXO)  
 Fonte: Adaptado de HAARD; CHISM, 1996

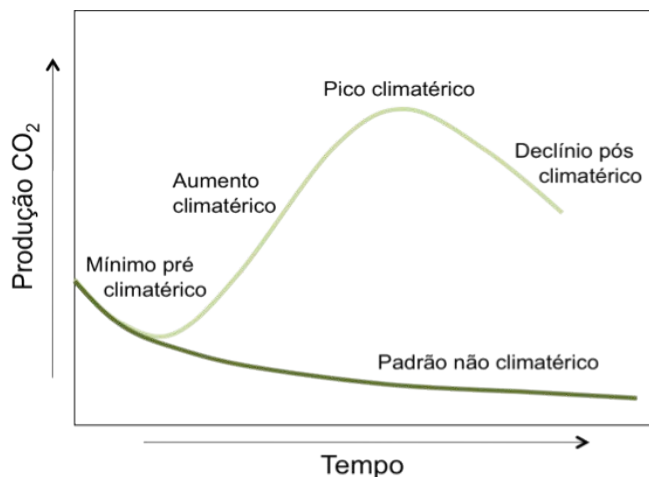


FIGURA 28 - PADRÃO CLIMATÉRICO (EM VERDE CLARO) E NÃO CLIMATÉRICO (EM VERDE ESCURO) DA RESPIRAÇÃO EM FRUTOS EM AMADURECIMENTO  
 Fonte: Adaptado de SALTVEIT, 2004

Quanto maior a taxa respiratória, mais perecível é o produto, isto é, menor é a vida pós-colheita. A respiração tem um importante papel na vida pós-colheita de produtos frescos porque reflete a atividade metabólica do tecido, que também inclui a perda do substrato, a síntese de novos compostos e a liberação de calor (SALTVEIT, 2004).

Frutos climatéricos frequentemente, embora não sempre, possuem reservas de amido armazenado e, durante o climatérico, estas reservas são hidrolisadas

(BEATTIE; WADE, 1996). O uso de vários substratos na respiração pode resultar na perda de reservas do alimento nos tecidos, da qualidade sensorial (principalmente doce) e o valor do produto pelo consumidor (SALTVEIT, 2004).

Utilizando-se da técnica de expressão gênica *antisense*, pesquisadores inibiram com sucesso a função de determinados genes, o que permitiu o estudo de seus papéis no processo de amadurecimento e desenvolvimento de frutos de tomate (GRAY *et al.*, 1994; GIOVANNONI, 2001). Esta técnica baseia-se na inserção de uma sequência de DNA (cDNA ou um fragmento genômico) na orientação oposta, *antisense*, entre o promotor e o terminador do gene. O gene construído é então transferido para explantes e as plantas são regeneradas. A presença de transcritos do gene *antisense* diminui o número de transcritos endógenos homólogos por um mecanismo não completamente explicado, mas que provavelmente envolve a hibridização dos transcritos *sense* e *antisense* (GRAY *et al.*, 1994). Isso pode ser demonstrado com alguns exemplos como poligalacturonase (PG) e pectinesterase (PE). Por muitos anos, acreditou-se que PG era a enzima primária responsável pelo amaciamento do tomate (GIOVANNONI, 2001). A PG não é detectada nos estádios iniciais do amadurecimento de frutos do tomate, mas passa a ser observada a medida que o fruto inicia a alteração de cor e a concentração aumenta durante o período de amadurecimento (TUCKER, ROBERTSON, GRIERSON, 1980). Estudos mostraram que durante este período os níveis estacionários de RNAm de PG aumentam mais de 2.000 vezes, somando mais de 2% da massa total de RNAm do fruto maduro (DELLAPENNA *et al.*, 1989). A dissolução extensiva da parede celular é fortemente correlacionada com o aumento da atividade de PG, que catalisa a clivagem hidrolítica das ligações  $\alpha(1-4)$  da galacturona (SITRIT; BENNETT, 1998). Durante o amadurecimento, a primeira dissolução detectável ocorre na lamela média, quando o fruto contém basicamente PG1, sugerindo que esta isoenzima seja responsável por iniciar a desestruturação da parede, sendo requerida para a dissolução da pectina (CROOKES, GRIERSON, 1983; SMITH *et al.*, 1990). O ataque a parede primária, que ocorre em estádios mais avançados, pode ser em decorrência da isoforma PG2, que pode ser responsável pela despolimerização da pectina (CROOKES, GRIERSON, 1983; SMITH *et al.*, 1990). Autores observaram que PG usualmente acumula-se em paralelo com o licopeno durante o amadurecimento (SMITH *et al.*, 1988). Utilizando frutos de tomate expressando RNA de PG *antisense*, Smith e colaboradores (1988) relataram que frutos transgênicos

sintetizaram quantidades similares de licopeno em relação aos frutos controle. Além disso, tais frutos apresentaram redução na atividade de PG a medida que amadureciam. A PE é encontrada em vários tecidos vegetais e é responsável pela desmetilação (desesterificação) de resíduos de ácido galacturônico em pectinas de alto peso molecular da parede celular, convertendo cada grupo metila a metanol (HALL *et al.*, 1993). Sugere-se que durante o amadurecimento do fruto, a enzima prepara a parede celular para hidrólise pela PG (GRAY *et al.*, 1994). Utilizando tomates transgênicos, Hall e colaboradores (1993) relataram maior esterificação da pectina e redução na atividade de PE em até 93% em alguns frutos, sem alteração em outros órgãos.

Diagnosticamente, frutos climatéricos podem ser separados de não climatéricos pelas respostas de respiração e/ou produção de etileno a etileno exógeno ou a análogos, como propileno. Em frutos climatéricos, etileno exógeno acelera o climatérico e a produção autocatalítica continua após a remoção do etileno (WATKINS, 2002). A concentração de etileno aplicado requerida para induzir o amadurecimento diminuiu a medida que os frutos se desenvolvem na árvore. A mudança na sensibilidade a etileno em relação a colheita pode ser ilustrada pela resposta de bananas colhidas e tratadas com etileno. Frutos responderam lentamente a  $0,5 \mu\text{L.L}^{-1}$  de etileno aplicado imediatamente após a colheita, e mais rapidamente a medida que o climatérico natural se aproximava. A aplicação de  $2 \mu\text{L.L}^{-1}$  de etileno induziu a respiração climatérica dentro de três a cinco horas independentemente do tempo que decorreu entre colheita e tratamento. Na árvore, as bananas não amadureceram por 40 - 50 dias (BURG, 2004). Em contraste, frutos não climatéricos apresentam taxas respiratórias dependentes da concentração de etileno, isto é, a taxa aumenta em função da concentração de etileno e declina quando etileno é removido (HAARD; CHISM, 1996). A produção de etileno nestes frutos é muito baixa. A aplicação de etileno tem pouco efeito além de acelerar o desenvolvimento de características relacionadas a senescência, como mudanças de cor, abscisão do pedicelo, aumento da susceptibilidade a doenças e desenvolvimento de *off-flavours* (BEATTIE; WADE, 1996).

Frutos não climatéricos amadurecem mais devagar quando ligados a árvore “mãe,” e sua qualidade sensorial não melhora após a colheita. Estes frutos são melhores quando amadurecidos antes de colhidos, por não serem capazes de

continuar seu processo de amadurecimento uma vez removidos da planta (BURG, 2004; SUDHEER; INDIRA, 2007).

Etileno exógeno e ferimentos podem estimular o pico respiratório em muitos órgãos vegetais removidos da planta “mãe” (climatéricos não verdadeiros). Injúrias mecânicas de tomates verdes maduros dobram a taxa respiratória. Embora estresse (imposto por injúrias mecânicas, temperaturas extremas, agente químicos ou biológicos) possa resultar no pico de atividade respiratória, climatérico associado com amadurecimento não é sempre aparente (HAARD; CHISM, 1996).

A importância científica de frutos climatéricos reside na premissa de que muitos aspectos do amadurecimento do fruto possam ser manipulados para controlar a produção ou percepção do etileno (WATKINS, 2002). Além disso, a classificação em climatéricos fornece um guia simples do comportamento geral de um fruto. Exposição acidental à etileno pode causar tal evento indesejável. Laranjas, sendo não climatéricas, não amadurecem quando expostas a etileno, que tem normalmente efeitos poucos notáveis na qualidade a menos que os frutos sejam armazenados por tempo considerável (BEATTIE; WADE, 1996).

### 1.1.2 Efeitos adicionais do etileno

Apesar do etileno ser o gatilho para o amadurecimento de frutos climatéricos, controlando o início de alterações de cor, aromas, textura, sabor e outros atributos bioquímicos e fisiológicos, Lelièvre e colaboradores (1997) sugeriram a coexistência de vias reguladas por genes dependentes e independentes de etileno. Dois sistemas de regulação do etileno foram propostos para plantas superiores: sistema I, funcional em frutos climatéricos, não climatéricos e tecidos vegetativos, é responsável pela produção dos níveis basais de etileno e induzido por ferimento; e sistema II, operante durante o amadurecimento dos frutos climatéricos e senescência de algumas pétalas, com produção autocatalítica de etileno. Em fruto climatérico fisiologicamente imaturo, a aplicação de etileno exerce *feedback* negativo na produção de etileno (sistema I), como demonstrado em sicomoro (*Ficus sycomorus* L.) (ZERONI; GALIL; BEN-YEHOSHUA, 1976). Da mesma maneira, frutos imaturos de tomate tratados com tiosulfato de prata (antagonista da ação do

etileno) apresentaram concentrações maiores de etileno quando comparados aos frutos controle (ATTA-ALY; SALTVEIT; HOBSON, 1987). Em frutos não climatéricos, a aplicação exógena de etileno também provocou a auto-inibição da produção endógena de etileno em resposta ao fatiamento, como relatado para flavedo de *Citrus paradisi* MacFad. Cv. Ruby Red, devido a supressão da formação de ACC pela repressão da síntese de ACC sintase e inibição da sua atividade (RIOV; YANG, 1982). Em contraste ao citado anteriormente, etileno exógeno é auto-estimulatório em frutos climatéricos fisiologicamente maduros (sistema II), como em tomate verde maduro, tratamento que acelera o início do amadurecimento (DELLAPENNA *et al.*, 1989; LELIÈVRE *et al.*, 1997). Contrariamente, o uso de inibidores do mecanismo de ação bloqueia completamente a produção de etileno e o amadurecimento (LELIÈVRE *et al.*, 1997).

Além do amadurecimento, sugere-se que o etileno também esteja envolvido em outros processos fisiológicos, como a resposta a patógenos e ferimento, senescência de folhas, resposta a estresse abiótico e biótico (ALEXANDER; GRIERSON, 2002) e afetando o crescimento de tecidos vegetais, incluindo caules, raízes e pecíolo (DEIKMAN, 1997). A resposta da planta à uma infecção patogênica irá determinar a extensão do crescimento do microrganismo assim como o dano causado por ele. Podem ser classificados dois tipos de interação planta-patógeno: a) compatível, no qual o microrganismo espalha-se de um ponto de entrada, causando danos celulares distantes do sítio de infecção; b) incompatível, com morte celular limitada ao sítio de infecção, resposta hipersensitiva da planta e produção de diferentes hormônios vegetais, como o etileno (CIARDI *et al.*, 2000). O etileno regula diversos genes envolvidos nas respostas de defesa, como aqueles codificando quitinases (BROGLIE; GAYNOR; BROGLIE, 1986; BROGLIE *et al.*, 1989),  $\beta$ -1,3-glucanases (FELIX; MEINS, 1987), proteína PATHOGENESIS-RELATED1 (PR1) (EYAL *et al.*, 1993), defensina (PENNINCKX *et al.*, 1996), HRGP (*hydroxyproline-rich glycoprotein*) (TOPPAN; ROBY; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, 1982; ECKER; DAVIS, 1987), enzimas da via biossintética de fenilpropanóides e flavonóides (PAL, 4CL e CHS) (ECKER; DAVIS, 1987). Desta maneira, é de se esperar que durante uma infecção incompatível o aumento na síntese de etileno seja uma forma de iniciar uma resposta de defesa mais rápida (CIARDI *et al.*, 2000).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAIS

#### 2.1.1 Material vegetal

Frutos maduros íntegros no estágio verde da variedade vermelha de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) foram colhidos em Curitiba/PR (25°27'13"S, 49°17'12"O) e transportados imediatamente para o laboratório. Os frutos foram inspecionados para a ausência de danos na parte externa e selecionados quanto à uniformidade de tamanho (ausência de diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tukey,  $p=0,05$ ) e coloração da epiderme. Foram avaliados os efeitos do etileno exógeno, AVG (inibidor de biossíntese) e STS (inibidor do mecanismo de ação) na coloração e firmeza destes frutos.

#### 3.1.2 Reagentes

AVG (aminoetoxivinilglicina) comercial (15% de pureza), nitrato de prata e tiosulfato de sódio foram adquiridos de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, E.U.A). Soluções estoque de nitrato de prata e tiosulfato de sódio foram utilizadas para preparar a solução de tiosulfato de prata (STS), em uma razão molar de 1:4 (REID *et al.*, 1980). Todas as soluções de compostos usados neste trabalho foram preparadas imediatamente antes do uso.

## 2.2 MÉTODOS

### 2.2.1 Tratamento com etileno

Frutos tratados com etileno foram mantidos em frascos de vidro de 600 mL hermeticamente fechados, sobre dupla camada de papel filtro umedecido. Etileno foi injetado nos frascos através do septo de borracha localizado na tampa até alcançar as concentrações desejadas (0; 0,15; 0,45; 1,35 e 4,05  $\mu\text{L.L}^{-1}$ ). Após 48 horas, os frascos foram abertos, ventilados e uma nova injeção de etileno foi realizada. Os frutos foram avaliados quanto a coloração e firmeza após 24 horas da reinjeção de etileno.

### 2.2.2 Tratamento com aminoetoxivinilglicina (AVG)

Para avaliar o efeito de inibidor da biossíntese de etileno sobre a coloração e firmeza de frutos da pitangueira foram preparadas soluções de AVG nas concentrações desejadas (0, 150, 300, 450 e 600  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Os frutos foram imersos nas soluções por cinco minutos, retirados e mantidos em frascos de vidro de 200 mL sobre camada dupla de papel filtro umedecido, fechados com tampas de polipropileno semitransparentes. Após 72 horas, os frascos foram abertos, ventilados e novamente fechados. Os frutos foram mantidos por mais 72 horas nos frascos até a avaliação da coloração e firmeza.

### 2.2.3 Tratamento com tiosulfato de prata (STS)

Para testar o efeito de sais de prata (inibidor do mecanismo de ação do etileno) sobre o amadurecimento de frutos da pitangueira, uma solução de tiosulfato de prata foi preparada a partir de nitrato de prata e tiosulfato de sódio

(1:4) e diluída nas concentrações desejadas (0, 33, 100, 300 e 900  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Os frutos foram imersos nas soluções por cinco minutos, retirados e mantidos em frascos de vidro de 200 mL sobre camada dupla de papel filtro umedecido, fechados com tampas de polipropileno semitransparentes. Após 72 horas, os frascos foram abertos, ventilados e fechados. Os frutos foram mantidos nos frascos por mais 72 horas até a avaliação.

#### 2.2.4 Condições de armazenamento dos frascos

Os frascos com frutos utilizados em todos os testes foram mantidos em sala de cultivo com temperatura controlada ( $24,2\pm 0,2^\circ\text{C}$ ), fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) e densidade média de fluxo de radiação fotossinteticamente ativa (400-700 nm) de  $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , até o final dos experimentos.

#### 2.2.5 Medida objetiva de cor

Para avaliar os efeitos dos tratamentos na coloração dos frutos, foram realizadas leituras no início e final dos experimentos utilizando um espectrofotômetro de reflectância MiniScan XE Plus (Hunter Associates Laboratory, Inc., Naperville, IL, E.U.A.). O iluminante primário selecionado foi D65 (luz do dia correlacionada a temperatura de cor de 6.500 K) e ângulo do observador de  $10^\circ$ . Antes de realizar as medidas, o equipamento foi calibrado de acordo com as instruções do fabricante. Para as calibrações negativa e positiva, foram utilizadas as placas preta e branca, respectivamente. O sistema de cor testado foi CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*)  $L^*a^*b^*$  ( $L^*$ =luminosidade;  $a^*$ =tonalidade verde-vermelha;  $b^*$ =tonalidade azul-amarela). As leituras foram feitas em triplicata contra fundo preto. A diferença total de cor ( $\Delta E$ ) entre as medidas feitas no início e final dos tratamentos foi calculada pela seguinte equação:

$$\Delta E = [(L^*_f - L^*_i)^2 + (a^*_f - a^*_i)^2 + (b^*_f - b^*_i)^2]^{1/2} \quad (4)$$

onde:

f = medida ao final do tratamento;

i = medida no início do tratamento.

Os valores  $C^*$  (croma, pureza da cor em relação ao cinza) e  $h_{ab}$  (*hue angle* ou ângulo de tom, expresso em graus) foram calculados a partir das seguintes fórmulas:

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (5)$$

$$h_{ab} = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (6)$$

Para comparações estatísticas, os ângulos ( $h_{ab}$ ) foram transformados para representações em  $360^\circ$ . McLellan, Lind e Kime (1995) propuseram algumas alterações na fórmula original para o cálculo de  $h$ , pelo sistema de cor Hunter Lab (FIGURA 29). Resultados positivos para  $h_{ab}$  só são gerados quando  $a^*$  e  $b^*$  são positivos (quadrante I). Quando  $a^*$  for negativo e  $b^*$  positivo ou ambos os parâmetro forem negativos (quadrantes II e III, respectivamente), utilizar a Equação 7; quando  $a^*$  for positivo e  $b^*$  negativo (quadrante IV), proceder como na Equação 8.

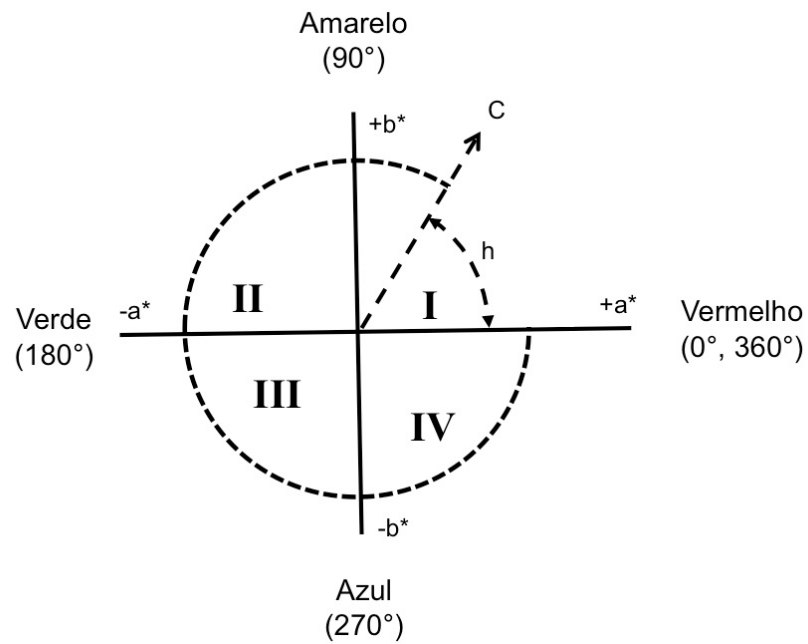


FIGURA 29 - DIAGRAMA DO SISTEMA CIELAB MOSTRANDO APENAS OS PLANOS  $a^*$  E  $b^*$   
 Fonte: Adaptado de McLELLAN; LIND; KIME, 1995

$$h^* = 180 + \tan^{-1}(b^* / a^*) \quad (7)$$

$$h^* = 360 + \tan^{-1}(b^* / a^*) \quad (8)$$

### 2.2.6 Avaliação da firmeza

A avaliação da firmeza dos frutos ao final dos tratamentos foi feita por compressão utilizando um texturômetro Brookfield CT3 Texture Analyzer (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, MA, E.U.A.), com probe de punção cilíndrico TA-39 (aço inoxidável, 20 mm comprimento x 2 mm diâmetro) e base retangular TA-BT-KIT. A velocidade do teste foi de  $0,5 \text{ mm.s}^{-1}$  e a distância de penetração de 1,5 mm, com força de contato de 10 g. As medidas foram realizadas

a temperatura ambiente e em triplicada por fruto, e os resultados expressos em gramas (g).

### 2.2.7 Análise estatística

Os resultados foram reportados como média  $\pm$  desvio padrão da média (indicado por linhas verticais nos gráficos), sendo que este desvio foi calculado dividindo-se o desvio padrão das medidas pela raiz quadrada do número de experimentos. Os dados foram analisados pelo teste de análise de variância (*one-way ANOVA*), usando a versão 8 do Software JMP<sup>®</sup> (SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.A.). O teste de Tukey ( $p=0,05$ ) foi usado para acessar diferenças significativas entre médias para as várias amostras.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Frutos tratados com etileno

Segundo Akamine e Goo (1979), o padrão de respiração de frutos verdes maduros de *Eugenia uniflora* L. indicou a natureza não climatérica destes frutos. Os mesmos autores relataram que frutos no estágio verde maduro tratados com etileno apresentaram alteração na coloração da epiderme, tornando-se vermelhos (AKAMINE; GOO, 1979). Etileno exógeno foi aplicado nos frutos da pitangueira para avaliar seus efeitos sobre a coloração e firmeza.

Os parâmetros de cor avaliados nos frutos da pitangueira antes e após o tratamento com etileno são apresentados na TABELA 8, e as diferenças totais de cor ( $\Delta E$ ) médias na FIGURA 30.

TABELA 8 - PROPRIEDADES DE COR DOS FRUTOS DA PITANGUEIRA ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM ETILENO

Concentração de etileno ( $\mu\text{L.L}^{-1}$ )		Controle	0,15	0,45	1,35	4,05
Antes do tratamento	L*	25,1251 $\pm$ 1,4428 <sup>a</sup>	22,9540 $\pm$ 1,6043 <sup>a</sup>	21,2201 $\pm$ 1,5250 <sup>a</sup>	23,6902 $\pm$ 1,9764 <sup>a</sup>	25,8133 $\pm$ 1,3423 <sup>a</sup>
	a*	-6,5715 $\pm$ 0,2547 <sup>a</sup>	-5,7584 $\pm$ 0,2913 <sup>a</sup>	-5,6934 $\pm$ 0,5095 <sup>a</sup>	-5,0994 $\pm$ 0,5761 <sup>a</sup>	-5,6311 $\pm$ 0,4063 <sup>a</sup>
	b*	25,4587 $\pm$ 1,0400 <sup>a</sup>	23,1625 $\pm$ 1,2023 <sup>a</sup>	23,4058 $\pm$ 1,3256 <sup>a</sup>	24,3842 $\pm$ 1,9186 <sup>a</sup>	25,1607 $\pm$ 0,9607 <sup>a</sup>
	h*	26,3044 $\pm$ 1,0415 <sup>a</sup>	23,8895 $\pm$ 1,1996 <sup>a</sup>	24,0604 $\pm$ 1,3309 <sup>a</sup>	24,9491 $\pm$ 1,9212 <sup>a</sup>	25,8314 $\pm$ 0,9402 <sup>a</sup>
Após o tratamento	L*	104,6843 $\pm$ 0,4390 <sup>a</sup>	104,3238 $\pm$ 0,6125 <sup>a</sup>	103,1643 $\pm$ 0,9446 <sup>a</sup>	102,3724 $\pm$ 0,9164 <sup>a</sup>	102,9113 $\pm$ 0,8427 <sup>a</sup>
	L*	26,2230 $\pm$ 0,4598 <sup>a</sup>	21,8279 $\pm$ 0,4945 <sup>b</sup>	20,9714 $\pm$ 1,0232 <sup>b</sup>	23,1766 $\pm$ 0,7479 <sup>ab</sup>	20,2485 $\pm$ 1,3075 <sup>b</sup>
	a*	16,4759 $\pm$ 1,0753 <sup>a</sup>	18,1625 $\pm$ 0,5522 <sup>a</sup>	17,6832 $\pm$ 1,0130 <sup>a</sup>	17,4463 $\pm$ 1,0295 <sup>a</sup>	17,7466 $\pm$ 1,0,8208 <sup>a</sup>
	b*	31,2954 $\pm$ 0,5764 <sup>a</sup>	24,7686 $\pm$ 0,7535 <sup>b</sup>	23,8078 $\pm$ 1,1404 <sup>b</sup>	27,2084 $\pm$ 1,0061 <sup>ab</sup>	23,6100 $\pm$ 1,5331 <sup>b</sup>
C*	35,6315 $\pm$ 0,5356 <sup>a</sup>	30,8586 $\pm$ 0,6037 <sup>b</sup>	30,8580 $\pm$ 0,9236 <sup>b</sup>	30,6770 $\pm$ 0,8022 <sup>b</sup>	30,9863 $\pm$ 1,3356 <sup>b</sup>	
h*	59,3201 $\pm$ 1,4620 <sup>a</sup>	52,7528 $\pm$ 1,3275 <sup>b</sup>	52,3513 $\pm$ 1,9040 <sup>b</sup>	53,8365 $\pm$ 1,9541 <sup>b</sup>	55,7364 $\pm$ 1,2507 <sup>ab</sup>	

Médias nas linhas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $p=0,05$ )

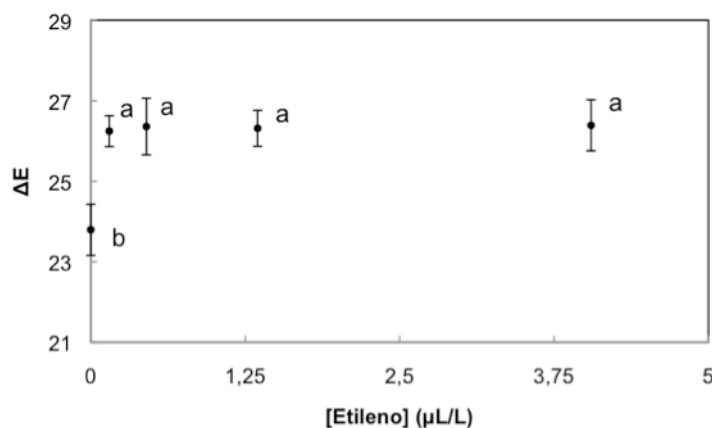


FIGURA 30 - DIFERENÇAS TOTAIS DE COR MÉDIAS ( $\Delta E$ ) DOS FRUTOS TRATADOS COM ETILENO

Nota: Pontos com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%

O teste de Tukey (FIGURA 30) não mostrou diferença estatisticamente significativa ( $p=0,05$ ) para as diferenças totais de cor ( $\Delta E$ ) nas concentrações de etileno testadas à exceção dos frutos controle. A alteração de cor reflete-se no aumento dos valores de  $a^*$  do início para o final dos tratamentos, passando de negativos (tonalidade verde) para positivos (tonalidade vermelha), em concordância com o observado em pêssegos por Ferrer e colaboradores (2005). O parâmetro  $b^*$ , por sua vez, apresentou valor médio maior para frutos controle que os demais, indicando uma coloração mais amarelada. O ângulo  $h_{ab}$  também foi maior para os frutos controle sugerindo uma orientação para a coloração verde. A rápida perda da coloração verde pelo tratamento de frutos com etileno foi previamente reportada para ponkan (ZHOU *et al.*, 2010) e laranja (RODRIGO; ZACARIAS, 2007). O tratamento com etileno também acelerou o início do amadurecimento de uvas Doradillo quando aplicado imediatamente antes do tempo normal esperado para que o processo se inicie (HALE; COOMBE; HAWKER, 1970; COOMBE; HALE, 1973). Estudo realizado por Chervin e colaboradores (2004) confirmou o acúmulo de transcritos e atividade *in vivo* da enzima ACO em uvas. Os autores observaram um aumento transitório da produção endógena de etileno pouco antes do início do amadurecimento (em concentração abaixo do limite fisiológico de muitos tecidos vegetais), sugerindo que a percepção do hormônio é requerida pelo menos para o aumento do diâmetro do fruto, diminuição da acidez e acúmulo de antocianinas (CHERVIN *et al.*, 2004).

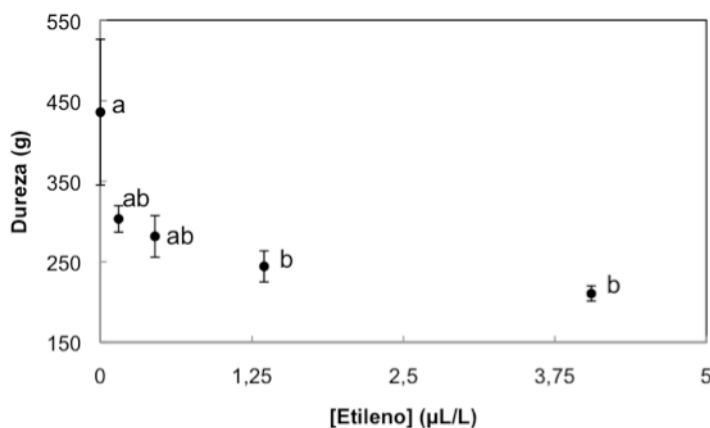


FIGURA 31 - VALORES MÉDIOS DE FIRMEZA DE FRUTOS DA PITANGUEIRA TRATADOS COM ETILENO

Nota: Pontos com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%

A firmeza (FIGURA 31) avaliada instrumentalmente apresentou diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A firmeza dos frutos diminuiu com o aumento da concentração de etileno aplicada, evidenciando que o uso deste composto influencia não só a cor, mas também a firmeza dos frutos. Outra característica percebida é que frutos tratados com etileno apresentaram aroma intensificado quando comparados com frutos de outros tratamentos.

Hayama e colaboradores (2006) relataram que a aplicação de etileno reduziu rapidamente a firmeza da polpa, possivelmente pelo aumento da atividade de endo e exo PG, de pêssegos *stony hard*, caracterizados pela produção insuficiente de etileno e por frutos maduros com a polpa firme. Da mesma maneira, pêras tratadas com etileno exógeno apresentaram-se até 6,5 vezes mais macias que os frutos controle (AGAR; BIASI; MITCHAM, 1999). O tratamento de mamão papaia com etileno também resultou em polpa mais macia e alteração uniforme da coloração da casca (AN; PAULL, 1990).

A aplicação de etileno em morangos acelerou alguns aspectos do amadurecimento, como o acúmulo de antocianinas, conteúdo de açúcares totais e incremento da atividade das enzimas PAL e  $\beta$ -galactosidase, enquanto outros foram reprimidos, como os níveis de clorofila e aumento das atividades de endo-1,4- $\beta$ -glucanase e  $\beta$ -xilosidase (VILLAREAL *et al.*, 2010).

Cerejas mantém níveis muito baixos de etileno durante o amadurecimento (BLANPIED, 1972), sendo classificadas como frutos não climatéricos. Frutos de cereja doce tratados com ethephon (ácido 2-cloroetilfosfônico), composto liberador

de etileno em solução alcalina (YANG, 1969), não apresentaram pico respiratório nem de produção de etileno próximo a maturidade. A respiração dos frutos não foi estimulada pela presença de etileno exógeno durante os estádios tardios do desenvolvimento de tais frutos, como observado em outros frutos não climatéricos. Da mesma maneira, o tratamento com ethephon não afetou a firmeza dos frutos (LI; ANDREWS; PATTERSON, 1994). Frutos de cereja azeda cujas árvores foram tratadas com ethephon apresentaram concentrações significativamente baixas de sólidos solúveis, conteúdo de antocianina, atividade antioxidante e firmeza do que aqueles provenientes das árvores controle (KHORSHIDI; DAVARYNEJAD, 2010).

Pimenta também apresenta um comportamento tipicamente não climatérico. Etileno na forma de ethephon, aplicado antes e após a colheita, induziu efetivamente o desenvolvimento de cor dos frutos de pimenta, acelerando a degradação de clorofila e a biossíntese de carotenóides (THANG, 2007). O amadurecimento de páprica também foi estimulado com aplicação foliar de ethephon (WORKU; HERNER; CAROLUS, 1975). Outros frutos também tiveram sua coloração alterada pela aplicação de ethephon, como tomate inglês (ou tomatilho) (PROHENS; RUIZ; NUEZ, 1996), além da firmeza, como mirtilo (BAN *et al.*, 2007), e da respiração e produção de etileno, como banana (VENDRELL, 1985).

O teste com o etileno sugere que este composto produz uma modificação na coloração dos frutos da pitangueira, como exemplificado anteriormente para outros frutos climatéricos e não climatéricos. Além disso, o aumento da concentração de etileno utilizada promoveu a diminuição da firmeza dos frutos, sugerindo que este hormônio esteja agindo de alguma forma, direta ou indiretamente, sobre enzimas responsáveis pela desestruturação da parede celular, resultando no amaciamento dos frutos, como PG.

Como apresentado anteriormente, etileno exógeno estimula a síntese de PG quando aplicado em frutos verdes maduros. A degradação da parede celular de tomates inicia-se quando PG1 é sintetizada e antes do aparecimento de PG2. Extratos de parede celular de tomates verdes maduros, com concentrações basais de etileno, não apresentaram níveis detectáveis de PG, tanto por testes enzimáticos como por radioimunoensaio (GRIERSON; TUCKER, 1983). Como o pericarpo de frutos de tomates maduros é rico em atividade PG, assumiu-se por muito tempo que esta era a principal enzima envolvida no amaciamento do fruto. Outras enzimas estão envolvidas, como pectato liases (PL), que catalisam a clivagem de pectina

esterificada gerando oligossacarídeos com resíduos galacturonosil insaturados nos terminais não redutores (MARÍN-RODRÍGUEZ; ORCHARD; SEYMOUR, 2002). Sequências para PL foram reportadas em banana (DOMINGUEZ-PUIGJANER *et al.*, 1997; MEDINA-SUÁREZ *et al.*, 1997), morango (MEDINA-ESCOBAR *et al.*, 1997) e uva (NUNAN *et al.*, 2001). Estudo desenvolvido por Jiménez-Bermúdez e colaboradores (2002) mostrou que morangos transgênicos com supressão de PL durante o amadurecimento resultou em frutos significativamente mais firmes que o controle.

### 3.2 Frutos tratados com AVG

A aplicação de etileno é rotineiramente usada para iniciar o amadurecimento uniforme de frutos como a banana. O mais comum, entretanto, é a utilização de estratégias comerciais que evitem a exposição ao etileno e/ou minimizem sua produção e ação (WATKINS, 2002). Neste contexto, destacam-se os inibidores de biossíntese e do mecanismo de ação do etileno. O AVG é uma fitotoxina produzida por *Rhizobium japonicum* (bactéria encontrada nos nódulos das raízes de soja) e análogo vinilglicina que inibe a conversão de S-adenosil-metionina em ACC, agindo sobre a enzima ACC sintase, e, conseqüentemente, inibindo a produção de etileno (ADAMS; YANG, 1979; MULLINS; McCOLLUM; McDONALD, 1999). A TABELA 9 apresenta os parâmetros de cor avaliados nos frutos tratados com AVG, sumarizados na FIGURA 32 pela  $\Delta E$ .

TABELA 9 - PROPRIEDADES DE COR DOS FRUTOS DA PITANGUEIRA ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM AVG

Concentração de AVG ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )		Controle	150	300	450	600
Antes do tratamento	L*	29,6421 $\pm$ 1,7281 <sup>a</sup>	30,7424 $\pm$ 1,0146 <sup>a</sup>	26,8263 $\pm$ 0,6432 <sup>a</sup>	29,0027 $\pm$ 1,3285 <sup>a</sup>	30,4028 $\pm$ 1,2169 <sup>a</sup>
	a*	-6,7448 $\pm$ 0,1307 <sup>a</sup>	-7,1277 $\pm$ 0,2603 <sup>a</sup>	-6,8481 $\pm$ 0,1846 <sup>a</sup>	-6,6396 $\pm$ 0,3241 <sup>a</sup>	-7,1736 $\pm$ 0,2645 <sup>a</sup>
	b*	33,3269 $\pm$ 1,1714 <sup>a</sup>	33,7970 $\pm$ 1,2940 <sup>a</sup>	31,5411 $\pm$ 0,4892 <sup>a</sup>	33,5034 $\pm$ 1,2387 <sup>a</sup>	35,6009 $\pm$ 1,1012 <sup>a</sup>
	c*	34,0123 $\pm$ 1,1490 <sup>a</sup>	34,5516 $\pm$ 1,3064 <sup>a</sup>	32,6025 $\pm$ 0,4315 <sup>a</sup>	34,1827 $\pm$ 1,2326 <sup>a</sup>	35,2968 $\pm$ 1,1438 <sup>a</sup>
Após o tratamento	L*	101,1314 $\pm$ 0,2454 <sup>a</sup>	101,5591 $\pm$ 0,2638 <sup>a</sup>	101,9799 $\pm$ 0,2164 <sup>a</sup>	101,3093 $\pm$ 0,5501 <sup>a</sup>	101,4189 $\pm$ 0,4009 <sup>a</sup>
	L*	31,1468 $\pm$ 1,1967 <sup>a</sup>	27,3789 $\pm$ 1,1925 <sup>a</sup>	30,6500 $\pm$ 1,0241 <sup>a</sup>	30,4688 $\pm$ 1,1568 <sup>a</sup>	29,2511 $\pm$ 0,8439 <sup>a</sup>
	a*	21,3877 $\pm$ 1,1781 <sup>a</sup>	0,3940 $\pm$ 1,6955 <sup>b</sup>	-2,8257 $\pm$ 1,2399 <sup>bc</sup>	-3,2718 $\pm$ 1,0505 <sup>bc</sup>	-6,1309 $\pm$ 0,4795 <sup>c</sup>
	b*	36,5945 $\pm$ 0,8791 <sup>a</sup>	35,0766 $\pm$ 0,7913 <sup>a</sup>	37,5470 $\pm$ 0,7903 <sup>a</sup>	35,6930 $\pm$ 1,0384 <sup>a</sup>	36,2354 $\pm$ 0,7379 <sup>a</sup>
Após o tratamento	c*	38,2644 $\pm$ 0,9359 <sup>a</sup>	36,1270 $\pm$ 0,7714 <sup>a</sup>	38,6815 $\pm$ 0,7871 <sup>a</sup>	36,8392 $\pm$ 0,8484 <sup>a</sup>	37,3381 $\pm$ 0,8157 <sup>a</sup>
	h*	59,8922 $\pm$ 2,3013 <sup>c</sup>	94,1859 $\pm$ 2,0039 <sup>b</sup>	98,4030 $\pm$ 1,4561 <sup>ab</sup>	99,6200 $\pm$ 1,2252 <sup>ab</sup>	100,2030 $\pm$ 0,6973 <sup>a</sup>

Médias nas linhas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $p=0,05$ )

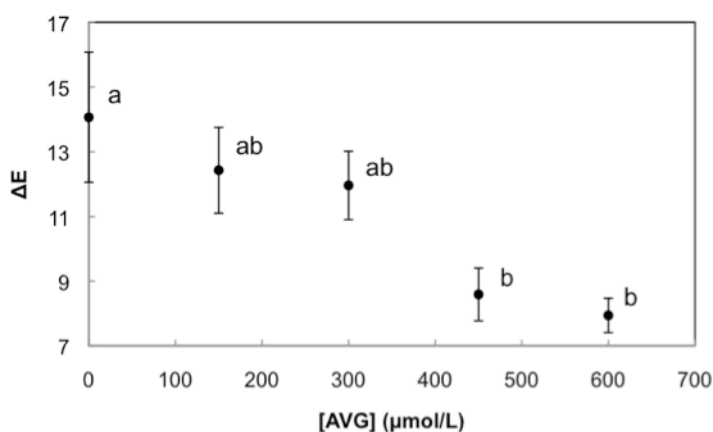


FIGURA 32 - DIFERENÇAS TOTAIS DE COR MÉDIAS ( $\Delta E$ ) DOS FRUTOS TRATADOS COM AVG  
Nota: Pontos com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%

A comparação de médias das diferenças totais de cor ( $\Delta E$ ) (FIGURA 32) mostrou diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,05$ ) nas concentrações de AVG testadas. Frutos controle apresentaram maior variação de coloração quando comparados às concentrações mais elevadas de AVG (450 e 600  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Além disso, frutos do controle e da concentração de 150  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de AVG apresentaram valores positivos de  $a^*$  ao final do experimento quando comparados às demais concentrações, indicando que estes frutos adquiriram tonalidade vermelha. O  $h_{ab}$  sugere a mesma conclusão: concentrações mais altas de AVG resultaram em ângulos maiores, indicando frutos mais verdes. Whale e colaboradores (2008) testaram o efeito do AVG sobre a maturação de maçãs “Cripp’s Pink”. Quando aplicado de quatro a cinco semanas antes da colheita, o AVG retardou a alteração de cor dos frutos da macieira, além de manter a firmeza (WHALE *et al.*, 2008),

também observado por Drake e colaboradores (2005) para a variedade “Delicious”. A incubação de discos de flavedo de *grapefruit* com AVG diminuiu significativamente tanto a conversão de SAM a ACC como a evolução de etileno no tecido tratado (MULLINS; McCOLLUM; McDONALD, 1999).

A firmeza de frutos da pitangueira tratados com AVG (FIGURA 33) também apresentou diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p=0,05$ ). Aumentando a concentração do composto, houve a manutenção da firmeza dos frutos. O mesmo efeito foi observado em pêras tratadas com AVG antes da colheita. De maneira geral, frutos tratados possuíam a aparência de menos maduros que o controle, sendo significativamente mais firmes (D'AQUINO *et al.*, 2010). A firmeza de frutos de caqui tratados com AVG após a colheita e mantidos sob refrigeração aumentou linearmente com a dose do produto aplicado (FAGUNDES; DABUL; AYUB, 2006). A manutenção da firmeza também foi observada em damasco (PALOU; CRISOSTO, 2003), pêssago (GARNER; CRISOSTO; OTIEZA, 2001; BREGOLI *et al.*, 2002) e nectarina (BYERS, 1997).

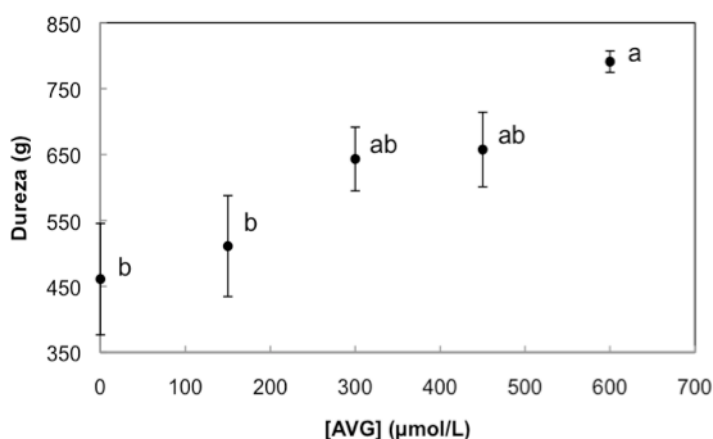


FIGURA 33 - VALORES MÉDIOS DE FIRMEZA DE FRUTOS DA PITANGUEIRA TRATADOS COM AVG

Nota: Pontos com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%

Em tratamentos complementares feitos com concentrações superiores a 600  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  foram observados efeitos no aspecto visual dos frutos indesejáveis para a indústria de alimentos. Por esse motivo, a concentração de 600  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de AVG poderia ser considerada o limite para utilização em frutos da pitangueira, com efeitos

positivos no controle do amadurecimento dos frutos, representado pela manutenção da firmeza e coloração da epiderme.

### 3.3 Frutos tratados com STS

Apesar da aplicação dos sais de prata ser proibida em produtos destinados ao consumo humano, o teste foi realizado em frutos da pitangueira para avaliar o efeito do uso de inibidor do mecanismo de ação do etileno. Observações da inibição de efeitos da aplicação de etileno exógeno pela prata levou a sua utilização na cultura de tecidos, sendo mais tarde explorada em vários sistemas vegetais (KUMAR; PARVATAM; RAVISHANKAR, 2009). A prata era comumente utilizada na forma de nitrato de prata (BEYER, 1976). Estudo conduzido em pepinos por Nijs e Visser (1980) mostrou que nitrato de prata gera efeitos fitotóxicos (KOONTZ; BERLE, 1980) não observados com a utilização de STS. Nitrato de prata mostrou-se tóxico também para protoplastos de maçã, apesar de promover a inibição da produção de etileno. Por outro lado, a aplicação na forma de STS foi inefetiva na inibição da produção de etileno e os efeitos tóxicos foram observados apenas em protoplastos após longos períodos de incubação (LIS; KWAKKENBOS; VEEN, 1984).

Parte do pericarpo de tomates verdes fisiologicamente maduros intactos permaneceu verde quando infiltrados com STS (HOBSON; ATTA-ALY, 1984). Frutos tratados com prata pelo pedicelo não apresentaram o aumento climatérico normal da respiração, mas mantiveram a habilidade de produzir etileno (ATTA-ALY; SALTVEIT; HOBSON, 1987). O aumento temporário da produção de etileno pode ser devido a um efeito danoso do metal pesado, por estimular a conversão de SAM a ACC, ou por efeito na percepção do etileno pelo tecido. A falta de síntese de licopeno nos tecidos tratados mostra que a prata preveniu a percepção do etileno pelos tecidos. A diminuição da percepção poderia estar exercendo um efeito estimulatório na síntese de etileno (ATTA-ALY; SALTVEIT; HOBSON, 1987).

O tratamento de morangos verdes excisados com STS isoladamente ou em combinação com ACC falhou em retardar o amadurecimento, já que tais frutos exibiram produção aumentada de etileno. Comparados aos frutos controle, a

produção de etileno em frutos mantidos em solução com STS e sem ACC aumentou 40% (PERKINS-VEAZIE; HUBER; BRECHT, 1996). O aumento na intensidade da respiração e na produção de etileno também foi relatado em pimentas tratadas com STS devido ao estresse causado pelo metal, que por sua vez levou ao aumento dos níveis de ACC após o tratamento (PRETEL et al., 1995). STS aplicado em frutos ainda na planta e partes dissecadas *ex situ* mostraram que a produção de etileno é regulada por *feedback* negativo até que o fruto tenha se expandido (a regulação em frutos maduros dá-se por *feedback* positivo) (IANNETTA et al., 2006). A vida de prateleira de goiaba também aumentou com a aplicação de prata (KRISHNA; BABU, 2002).

Miller e Roberts (1982) mostraram que a inibição de xilogênese em culturas de soja por nitrato de prata em explantes cultivados *in vitro* foi revertida por L-metionina exógena. Assumiu-se que tal reversão seja resultado de antagonismo competitivo pelo sítio de ligação com etileno entre prata e etileno produzido a partir da metionina exógena (MILLER; ROBERTS, 1982).

Os íons prata são capazes de gerar plantas insensíveis a etileno (ZHAO et al., 2002). Acredita-se que certas mutações que conferem insensibilidade ao etileno (HALL et al., 1999) e íons prata perturbam os sítios de ligação com etileno (RODRÍGUEZ et al., 1999). O receptor de etileno, ETR1, contém um sítio de ligação para etileno por homodímero e a ligação é mediada por um íon de cobre único presente neste sítio de ligação. A substituição do cofator por prata permite a ligação do etileno ao receptor, mas fecha-o em uma conformação que continuamente reprime a resposta ao etileno (HIRAYAMA et al., 1999; RODRÍGUEZ et al., 1999; ZHAO et al., 2002). Além disso, tratamento de mudas com prata resultou no aumento dos níveis de ETR1. A ligação da prata ao receptor pode mimetizar o efeito de mutações que levam a insensibilidade ao etileno, o que leva ao aumento dos níveis de tal receptor (ZHAO et al., 2002). Outros possíveis mecanismos de ação incluem a inibição do acúmulo de EIN3 (GUO; ECKER, 2003) e EIN2 (QIAO et al., 2009), e o possível envolvimento da prata na oxidação do etileno a dióxido de carbono (BEYER, 1976). Knee (1992) mostrou que ATPases mitocondriais parecem ser menos sensíveis ao nitrato de prata que enzimas da membrana plasmática, mas mais sensíveis quando STS foi usado. O autor sugeriu que a ação do etileno é inibida pela prata agindo fora da membrana plasmática (KNEE, 1992).

Os parâmetros de cor avaliados nos frutos da pitangueira antes e após o tratamento com STS são apresentados na TABELA 10, e as  $\Delta E$  médias na FIGURA 34.

TABELA 10 - PROPRIEDADES DE COR DOS FRUTOS DA PITANGUEIRA ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM STS

Concentração de STS ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )		Controle	33	100	300	900
Antes do tratamento	L*	27,7784 $\pm$ 1,1283 <sup>a</sup>	27,6459 $\pm$ 1,1376 <sup>a</sup>	27,7005 $\pm$ 1,2426 <sup>a</sup>	24,8623 $\pm$ 1,0337 <sup>a</sup>	24,7143 $\pm$ 1,3838 <sup>a</sup>
	a*	-6,4380 $\pm$ 0,1772 <sup>a</sup>	-6,6596 $\pm$ 0,2059 <sup>a</sup>	-6,1728 $\pm$ 0,1767 <sup>a</sup>	-6,4573 $\pm$ 0,3219 <sup>a</sup>	-6,6498 $\pm$ 0,3197 <sup>a</sup>
	b*	29,6238 $\pm$ 0,8984 <sup>a</sup>	29,8417 $\pm$ 0,7707 <sup>a</sup>	29,3368 $\pm$ 0,9005 <sup>a</sup>	27,3471 $\pm$ 0,9338 <sup>a</sup>	26,7368 $\pm$ 1,1298 <sup>a</sup>
	C*	30,3276 $\pm$ 0,8906 <sup>a</sup>	30,5885 $\pm$ 0,7678 <sup>a</sup>	30,6681 $\pm$ 0,8151 <sup>a</sup>	28,1230 $\pm$ 0,9482 <sup>a</sup>	28,4625 $\pm$ 0,9962 <sup>a</sup>
Após o tratamento	L*	16,6314 $\pm$ 1,1502 <sup>b</sup>	18,4744 $\pm$ 0,9136 <sup>b</sup>	23,4527 $\pm$ 1,2477 <sup>a</sup>	23,5784 $\pm$ 1,2838 <sup>a</sup>	24,6397 $\pm$ 0,9660 <sup>a</sup>
	a*	20,6577 $\pm$ 0,7853 <sup>a</sup>	19,6648 $\pm$ 0,9939 <sup>a</sup>	11,3182 $\pm$ 1,2433 <sup>b</sup>	1,3398 $\pm$ 1,2603 <sup>c</sup>	-0,6056 $\pm$ 0,9194 <sup>c</sup>
	b*	22,5893 $\pm$ 0,8977 <sup>c</sup>	23,9560 $\pm$ 0,6780 <sup>bc</sup>	27,6291 $\pm$ 1,2043 <sup>ab</sup>	28,2899 $\pm$ 1,3402 <sup>a</sup>	28,9759 $\pm$ 0,7744 <sup>a</sup>
	C*	30,7657 $\pm$ 0,5738 <sup>a</sup>	30,5593 $\pm$ 0,9209 <sup>a</sup>	31,5346 $\pm$ 0,8753 <sup>a</sup>	29,5304 $\pm$ 1,1128 <sup>a</sup>	29,3655 $\pm$ 0,7293 <sup>a</sup>
	h*	45,3287 $\pm$ 1,3643 <sup>c</sup>	48,3220 $\pm$ 1,1181 <sup>c</sup>	76,4036 $\pm$ 1,0901 <sup>b</sup>	91,1214 $\pm$ 1,5648 <sup>a</sup>	95,2237 $\pm$ 1,0696 <sup>a</sup>

Médias nas linhas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $p=0,05$ )

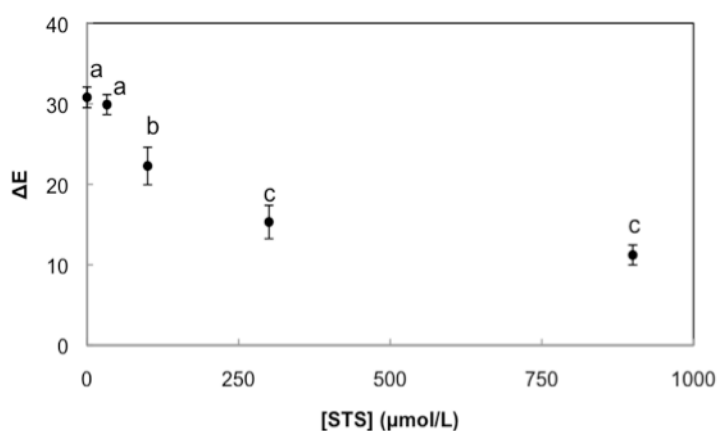


FIGURA 34 - DIFERENÇAS TOTAIS DE COR MÉDIAS ( $\Delta E$ ) DOS FRUTOS TRATADOS COM STS

Nota: Pontos com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%

Frutos da pitangueira tratados com STS apresentaram diferenças significativas ( $p=0,05$ ) na  $\Delta E$ . As variações de cor média da epiderme de frutos nas concentrações elevadas de STS (300 e 900  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) foram menores quando comparados aos frutos do controle e aqueles tratados com 33  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de STS. Avaliando apenas o parâmetro  $a^*$ , inicialmente todos os tratamentos apresentaram frutos com valores negativos de coloração (verde) e, posteriormente, valores positivos (vermelho), à exceção de 900  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de STS. Os menores valores de  $a^*$

também foram observados nas concentrações de 300 e 900  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de STS. O ângulo  $h_{ab}$  também aumentou juntamente com a concentração, sugerindo frutos mais verdes nas concentrações mais elevadas. Assim como nos testes anteriores, as medidas dos parâmetros de cor antes dos tratamentos não apresentaram diferenças significativas no teste de Tukey à 5% de significância, reflexo da homogeneidade das amostras.

Uma característica marcante do teste realizado com STS foi o amadurecimento assimétrico dos frutos da pitangueira, previamente relatado em estudos realizados com tomate (HOBSON *et al.*, 1984; DAVIES; HOBSON; GRIERSON, 1990). Davies, Hobson e Grierson (1988) também mostraram que íons prata inibiram efetivamente tanto a iniciação como a continuação do amadurecimento de tomate, retardando alterações na cor dos frutos. Após incubação prolongada, os pericarpos tratados recuperaram-se da inibição e iniciaram o amadurecimento (DAVIES; HOBSON; GRIERSON, 1988).

Em contrapartida, o uso de STS nas árvores e em frutos individuais de cereja não retardou a maturação, sugerindo que o etileno não esteja envolvido diretamente no processo de maturação destes frutos (REID; PECH; LATSHE, 1985).

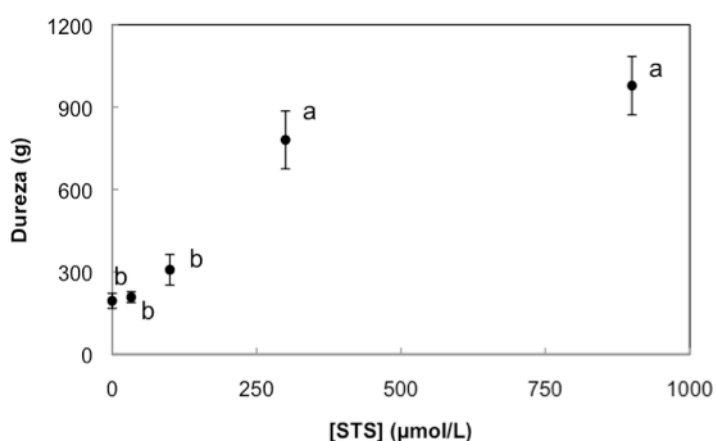


FIGURA 35 - VALORES MÉDIOS DE FIRMEZA DE FRUTOS DA PITANGUEIRA TRATADOS COM STS

Nota: Pontos com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%

Como no tratamento com AVG, a firmeza de frutos da pitangueira tratados com STS apresentou diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p=0,05$ ) (FIGURA

35). O aumento da concentração do composto levou à manutenção da firmeza dos frutos, particularmente nas concentrações de 300 e 900  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  que apresentaram valores estatisticamente semelhantes. Os trabalhos realizados com STS não fizeram referência quanto a firmeza dos frutos.

Para identificar diferenças genéticas entre frutos climatéricos e não climatéricos, Lee e colaboradores (2010) avaliaram a expressão de genes relacionados ao amadurecimento de tomate (climatérico) e pimenta (não climatérico). Utilizando folhas como referência no teste de hibridização, foram considerados genes específicos de frutos aqueles cuja expressão foi no mínimo três vezes superior em frutos e não em folhas. Os autores identificaram 306 genes específicos de frutos de um total de 3.883 genes (7,8%) em pimenta contra 182 de 2.337 genes (7,8%), em tomate. Mais de 60% dos genes analisados mostraram padrões de expressão similar durante o amadurecimento de ambos os frutos, sugerindo que a maturação e o amadurecimento de frutos climatéricos e não climatéricos pode envolver regulação transcricional conservada de um conjunto comum de genes. Genes envolvidos na biossíntese e resposta ao etileno foram expressos em pimenta. Gene semelhante a cistationina  $\gamma$ -sintase (CGS), que converte a O-fosfo-L-homoserina a homocisteína e posteriormente a metionina, foram identificados na pimenta e no pericarpo de tomate, assim como metionina sulfóxido redutase (MSR), envolvida na reciclagem de metionina. Não foi observado acúmulo de transcritos de genes semelhantes a ACS e ACO em pimenta, sugerindo que a acumulação de metionina não é alterada em pimenta, mas sua conversão a etileno por ACS e ACO não ocorre durante o amadurecimento deste fruto (LEE *et al.*, 2010).

Yamane e colaboradores (2007) sugerem que o controle da expressão gênica de ACO é um importante fator para diferenciar pêras climatéricas e não climatéricas. Após ferimento, ambos os frutos produziram etileno, com indução da expressão de genes para dois tipos de ACS e um de ACO. A expressão de gene para outra forma de ACO pode estar sob um mecanismo regulatório de *feedback* positivo mesmo em frutos não climatéricos. Tais frutos possuem genes para ACS requeridos para a produção de etileno, mas não conseguem expressá-los (YAMANE *et al.*, 2007).

Outro estudo realizado sugere que um mecanismo de *feedback* negativo (autoinibição) na síntese de etileno possa ser responsável pelo comportamento não

climatérico observado em morangos e tomates imaturos, enquanto *feedback* positivo (autocatálise) justificaria o comportamento climatérico do tomate durante o amadurecimento. O tratamento com etileno exógeno aumentou significativamente a atividade de ACO em morango e tomate, mas ACC aumentou apenas em tomate. O uso de STS inibiu as duas formas de mecanismo regulatório (ATTA-ALY; BRECHT; HUBER, 2000). A expressão de dois genes para receptores da sub-família I (ETR1 e ERS1) em morango mostrou um contínuo incremento durante o amadurecimento. A expressão máxima de receptor do tipo II (ETR2) foi observada quando o amadurecimento começa a se tornar visível e se mantém alto durante todo o amadurecimento. A presença destes receptores, juntamente com o etileno que age através deles, pode sugerir algum papel fisiológico no amadurecimento de frutos não climatéricos. A prevalência dos receptores tipo II, que supostamente possuem uma fraca afinidade pelo domínio amino terminal de CTR1, poderia sugerir que baixas concentrações de etileno liberariam CTR1 e seriam suficientes para gerar algumas respostas fisiológicas (TRAINOTTI; PAVANELLO; CASADORO, 2005).

Da mesma forma que a pitanga, frutos cítricos respondem a etileno exógeno, com aumento da respiração e alteração de pigmentos relacionados ao amadurecimento, com acúmulo de carotenóides (STEWART; WHEATON, 1972) e degradação da clorofila (PURVIS; BARMORE, 1981; GOLDSCHMIDT; HUBERMAN; GOREN, 1993). Eaks (1970) propôs chamar este fenômeno de “pseudoclimatérico”. Frutos imaturos ligados a árvore mãe produzem altos níveis de etileno, que diminui drasticamente durante a maturação. Com a colheita, os frutos imaturos exibem um aumento semelhante ao climatérico na produção de etileno, precedido pela indução de genes de ACS e ACO e receptor de etileno ERS1. Esta indução foi avançada e aumentada com etileno exógeno, indicando uma biossíntese de etileno semelhante ao sistema II (autocatalítico). Frutos maduros retirados da árvore apresentaram níveis muito baixos de produção de etileno, associados com a expressão constitutiva de outros genes para ACS e ETR1 (sistema I). A expressão do gene para ACS citado anteriormente foi indetectável neste estágio, mesmo após tratamento com etileno, e a expressão de ERS1 permaneceu constante, indicando que não houve resposta autocatalítica (KATZ et al., 2004).

Até pouco tempo atrás, acreditava-se que os fatores transcricionais da família MADS-box estavam envolvidos apenas na regulação do desenvolvimento floral. A identificação de dois genes MADS-box em tomate mutante *rin* (com inibição

de todos os fenômenos mensuráveis do amadurecimento, como o amaciamento) mostrou que estes fatores também estão envolvidos na regulação do amadurecimento de frutos. Tais genes codificam para proteínas caracterizadas por domínio de ligação MADS-box com DNA conservado. Os genes identificados foram LeMADS-MC (expresso em sépalas, pétalas e carpelos), correlacionado com a determinação de inflorescências do tomate e desenvolvimento de sépalas, e LeMADS-RIN (expresso predominantemente em frutos), relacionado à complementação da deficiência do amadurecimento exibida por estes mutantes. A expressão deste último gene não é influenciada significativamente pelo etileno, mas sua indução coincide com o amadurecimento. Tal gene é requerido para iniciar a respiração climatérica e biossíntese de etileno em adição a fatores de amadurecimento que não podem ser complementados com suplemento de etileno. Desta maneira, sugere-se que LeMADS-RIN aja acima do etileno na cascata regulatória, podendo representar um regulador gloral compartilhado entre espécies climatéricas e não climatéricas (VREBALOV *et al.*, 2002).

Outra forma de controlar o amadurecimento de frutos não climatéricos é com o uso de auxinas (TRAINOTTI; PAVANELLO; CASADORO, 2005). O declínio da concentração de auxina em aquênios (fonte rica em ácido indol-3-acético, AIA), como o morango, poderia modular a taxa de amadurecimento do fruto. O uso de AVG e inibidores do mecanismo de ação do etileno (como a prata) não afetaram significativamente o acúmulo de antocianinas ou a indução da atividade de PAL a medida que o fruto amadurece. Frutos verdes não maduros que tiveram aquênios removidos acumularam antocianinas (associado com redução acelerada de clorofila e firmeza) e apresentaram indução de PAL. Isto porque a auxina produzida pelos aquênios pode inibir o amadurecimento do fruto. Este efeito de remoção do aquênios poderia ser prevenido pela aplicação de auxinas sintéticas. A introdução de auxina sintética (NAA) em morango intacto não maduro, através do pedúnculo, retardou o subsequente amadurecimento, medido pelo acúmulo de antocianina, perda de clorofila e diminuição da firmeza (GIVEN; VENIS; GRIERSON, 1988). Em cereja, ácido abscísico (ABA) estimulou significativamente a síntese de antocianina, em contraste com o etileno, sugerindo que ABA possa controlar a síntese destes compostos. Ao contrário do morango, a alteração de cor da cereja (na árvore ou colhido) para vermelho não foi acompanhada de aumento na atividade de PAL (HARTMANN, 1992).

O tratamento de uva com auxina sintética antes da alteração de cor retardou o amadurecimento (medido pelo tempo de acúmulo de antocianina e hexose, amaciamento do fruto e aumento do peso) e alterou a expressão de genes regulados durante o desenvolvimento, demonstrando que o atraso no amadurecimento era, pelo menos em parte, devido a alterações induzidas por hormônio no padrão de expressão gênica normal. É possível que o tratamento com auxina exógena atrase o declínio dos níveis de AIA, normalmente observado no momento de alteração de cor. O controle dos níveis de auxina e ABA é de alguma forma correlacionado. Assim, o amadurecimento de uva poderia ser iniciado pela combinação do declínio dos níveis de auxina com aumento dos níveis de ABA (DAVIES; BOOS; ROBINSON, 1997).

Estudos mais detalhados à nível de biologia molecular são necessários para determinar se frutos da pitangueira apresentam o mesmo padrão de expressão gênica exemplificado anteriormente. Da mesma maneira, faz-se necessário avaliar a resposta de outros fatores relacionados ao amadurecimento nos frutos tratados não avaliados neste estudo, como a atividade de enzimas envolvidas no amaciamento dos frutos.

## CONCLUSÕES GERAIS

Os dados deste estudo demonstram que o conteúdo fenólico total, conteúdo de flavonóides totais e a atividade antioxidante dos extratos de frutos da pitangueira diminuem durante o desenvolvimento destes frutos em ambas as variedades testadas. A intensidade e extensão da coloração em frutos vermelhos ou roxos é um fator importante na determinação do ponto ótimo de colheita e na escolha dos padrões de embalagem a serem utilizadas. Assim, a caracterização de alterações no conteúdo de flavonóides durante o desenvolvimento dos frutos da pitangueira pode contribuir com iniciativas de estimular a biossíntese destes compostos, por manipulação das vias biossintéticas, visando a melhoria das propriedades funcionais ou da aceitabilidade dos frutos. A alta atividade antioxidante dos frutos de pitangueira poderá estimular sua utilização pela indústria de alimentos na elaboração de alimentos funcionais e nutracêuticos destinados a manutenção da saúde, na redução e/ou tratamento de enfermidades. Frutos roxos da variedade roxa poderiam ser utilizados como corantes naturais pelo alto teor de antocianina.

A utilização de inibidores de biossíntese e de mecanismo de ação do etileno são ferramentas que poderiam contribuir para controlar o amadurecimento dos frutos da pitangueira. Os dados deste estudo demonstram que a cor e a firmeza dos frutos são afetadas com a utilização destes compostos e que tais tratamentos poderiam aumentar a vida de prateleira destes frutos e, conseqüentemente, a exploração comercial da pitangueira.

Acredita-se que a demonstração que os frutos da pitangueira apresentam alta atividade antioxidante e a possibilidade de manipular o seu amadurecimento estimulará uma utilização mais ampla destes frutos pela indústria de alimentos e pela população em geral como fonte de fitoquímicos bioativos promotores da saúde humana.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Identificação dos grupamentos açúcares dos glicosídeos de flavonóides descritos neste estudo por ressonância magnética nuclear (RMN);
- ✓ Avaliação da atividade antioxidante dos extratos *on-line*, no HPLC;
- ✓ Identificação dos compostos fenólicos nos frutos da pitangueira das duas variedades estudadas;
- ✓ Avaliação da atividade antioxidante e da concentração dos flavonóides identificados em frutos da pitangueira *in natura*;
- ✓ Aplicação de 1-MCP (inibidor do mecanismo de ação) e avaliação dos seus efeitos sobre coloração e textura;
- ✓ Avaliação de outros fatores relacionados ao amadurecimento, como o aumento dos açúcares redutores, a diminuição da acidez, o acúmulo de antocianinas, licopeno e a concentração de sólidos solúveis, além da atividade antioxidante;
- ✓ Avaliação sensorial dos frutos tratados;
- ✓ Medição do etileno liberado e taxa respiratória de frutos da pitangueira.

## REFERÊNCIAS

- AABY, K.; EKEBERG, D.; SKREDE, G. Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 4395-4406, 2007.
- ABD-ALLA, M.F. *et al.* Flavonoid glycosides and the chemosystematics of *Eucalyptus camaldulensis*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 12, p. 2629-2632, 1980.
- ADAMS, D. O.; YANG, S. F. Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 76, n. 1, p. 170-174, 1979.
- AGAR, I. T.; BIASI, W. V.; MITCHAM, E. J. Exogenous ethylene accelerates ripening responses in Bartlett pears regardless of maturity or growing region. **Postharvest Biology and Technology**, v. 17, n. 2, p. 67-78, 1999.
- AHARONI, A.; GALILI, G. Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. **Current Opinion in Biotechnology**, *Article in Press*, 2010.
- AJAY, M.; GILANI, A. H.; MUSTAFA, M. R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. **Life Sciences**, v. 74, n. 5, p. 603-612, 2003.
- AKAMINE, E. K.; GOO, T. Respiration and ethylene production in fruits of species and cultivars of *Psidium* and species of *Eugenia*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 104, n. 5, p. 632-635, 1979.
- AL-FARSI, M. *et al.* Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 19, p. 7592-7599, 2005.
- ALENIUS, C. M.; VOGELMANN, T. C.; BORNMAN, J. F. A three-dimensional representation of the relationship between penetration of UV-B radiation and UV-screening pigments in leaves of *Brassica napus*. **New Phytologist**, v. 131, n. 3, p. 297-302, 1995.

- ALEXANDER, L.; GRIERSON, D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 377, p. 2039-2055, 2002.
- ALONSO, J. M. *et al.* EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. **Science**, v. 284, n. 5423, p. 2148-2152, 1999.
- AMARAL, A. C. *et al.* Flavonoids and other phenolics from leaves of two *Marlierea* species (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 6, p. 653-654, 2001.
- AN, J. F.; PAULL, R. E. Storage temperature and ethylene influence on ripening of papaya fruit. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v. 115, n. 6, p. 949-953, 1990.
- ANDERSEN, O. M. Proportions of individual anthocyanins in the genus *Metrosideros*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 16, n. 6, p. 535-539, 1988.
- ANDERSEN, O. M.; JORDHEIM, M. The anthocyanins. In: ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 471-551.
- ANTON, A. A. *et al.* Effect of pre-dehulling treatments on some nutritional and physical properties of navy and pinto beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 5, p. 771-778, 2008.
- ARAI, I. *et al.* Improving effects of the extract from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, n. 1-3, p. 307-314, 1999.
- ARIMA, H.; DANNO, G. Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, n. 8, p. 1727-1730, 2002.
- ATTA-ALY, M. A.; BRECHT, J. K.; HUBER, D. J. Ethylene feedback mechanisms in tomato and strawberry fruit tissues in relation to fruit ripening and climacteric patterns. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, n. 2, p. 151-162, 2000.
- ATTA-ALY, M. A.; SALTVEIT, M. E.; HOBSON, G. E. Effect of silver ions on ethylene biosynthesis by tomato fruit tissue. **Plant Physiology**, v. 83, n. 1, p. 44-48, 1987.

BAGETTI, M. *et al.* Antioxidant capacity and composition of pitanga seeds. **Ciência Rural**, v. 39, n. 8, p. 2504-2510, 2009.

BAN T. *et al.* Effect of ethephon (2-chloroethylphosphonic acid) on the fruit ripening characters of rabbiteye blueberry. **Scientia Horticulturae**, v. 112, n. 3, p. 278-281, 2007.

BARBONI, T. *et al.* Characterisation of volatiles and polyphenols for quality assessment of alcoholic beverages prepared from Corsican *Myrtus communis* berries. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1304-1312, 2010.

BARNES, P. W.; FLINT, S. D.; CALDWELL, M. M. Morphological responses of crop and weed species of different growth forms to ultraviolet-B radiation. **American Journal of Botany**, v. 77, n. 10, p. 1354-1360, 1990.

BAUR, R. *et al.* Contact chemoreception related to host selection and oviposition behaviour in the monarch butterfly, *Danaus plexippus*. **Physiological Entomology**, v. 23, n. 1, p. 7-19, 1998.

BAZZAZ, F. A. *et al.* Allocating resources to reproduction and defense. **Bioscience**, v. 37, n. 1, p. 58-67, 1987.

BEATTIE, B.; WADE, N. Storage, ripening, and handling of fruit. In: ARTHEY, D.; ASHURST, P. R. **Fruit processing**. London: Chapman & Hall, 1996. p. 40-69.

BECH-LARSEN, T.; SCHOLDERER, J. Functional foods in Europe: consumer research, market experiences and regulatory aspects. **Trends in Food Science & Tech.**, v. 18, n. 4, p. 231-234, 2007.

BEECHER, G. R. Flavonoids in Foods. In: PACKER, L.; HIRAMATSU, M.; YOSHIKAWA, T. **Antioxidant food supplements in human health**. New York: Academic Press, 1999. p. 269-281.

BEGGS, C. J.; WELLMAN, E. Analysis of light-controlled anthocyanin formation in coleoptiles of *Zea mays* L.: The role of UV-B, blue, red and far-red light. **Photochemistry and Photobiology**, v. 41, n. 4, p. 481-486, 1985.

BEHLING, E. B. *et al.* Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BENNETT, M. J. *et al.* Going the distance with auxin: unravelling the molecular basis of auxin transport. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B**, v. 353, n. 1374, p. 1511-1515, 1998.

BERRY, B. Health and wellness trends for Canada and the world. Ontario: **AAFC**, 2009. Disponível em: <http://www.ats.agr.gc.ca/info/4367-eng.htm>.

BESSEAU, S. *et al.* Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. **Plant Cell**, v. 19, n. 1, p. 148-162, 2007.

BEYER, E. M. A potent inhibitor of ethylene action in plants. **Plant Physiology**, v. 58, n. 3, p. 268-271, 1976.

BEZERRA, J. E. F. *et al.* Propagação de genótipos de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) pelo método de enxertia de garfagem no topo em fenda cheia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 1, p. 160-162, 2002.

BEZERRA, J. E. F.; SILVA, J. F.; LEDERMAN, I. E. **Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. Jaboticabal: Funep (Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia), 2000. 30p.

BHARTI, A. K.; KHURANA, J. P. Mutants of *Arabidopsis* as tools to understand the regulation of phenylpropanoid pathway and UVB protection mechanisms. **Photochemistry and Photobiology**, v. 65, n. 5, p. 765-776, 1997.

BIEZA, K.; LOIS, R. An *Arabidopsis* mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. **Plant Physiology**, v. 126, n. 3, p. 1105-1115, 2001.

BINDER, B. M. *et al.* The *Arabidopsis* EIN3 binding F-box proteins EBF1 and EBF2 have distinct but overlapping roles in ethylene signaling. **Plant Cell**, v. 19, n. 2, p. 509-523, 2007.

BLANPIED, G. D. A study of ethylene in apple, red raspberry, and cherry. **Plant Physiology**, v. 49, n. 4, p. 627-630, 1972.

BLEECKER, A. B.; KENDE, H. Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 16, n. 1, p. 1-18, 2000.

BOEGE, F. *et al.* Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase I. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 4, p. 2262-2270, 1996.

BOKKENHEUSER, V. D.; SHACKLETON, C. H.; WINTER, J. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal *Bacteroides* from humans. **Biochemical Journal**, v. 248, n. 3, p. 953-956, 1987.

BOURGAUD, F. *et al.* Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, n. 5, p. 839-851, 2001.

BOWERS, M. D.; STAMP, N. E. Effects of plant age, genotype and herbivory on *Plantago* performance and chemistry. **Ecology**, v. 74, n. 6, p. 1778-1791, 1993.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science & Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Resolução ANVS/MS n. 16, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03/05/1999. Seção 1.

BREGOLI, A. M. *et al.* Peach (*Prunus persica*) fruit ripening: aminoethoxyvinylglycine (AVG) and exogenous polyamines affect ethylene emission and flesh firmness. **Physiologia Plantarum**, v. 114, n. 3, p. 472-481, 2002.

BRIGNOLAS, F. *et al.* Phenolic predictors for Norway spruce resistance to the bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae) and an associated fungus, *Ceratocystis polonica*. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 28, n. 5, p. 720-728, 1998.

BRITO, E. S. *et al.* Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD-ESI/MS. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 1112-1118, 2007.

BROGLIE, K. E. *et al.* Functional analysis of DNA sequences responsible for ethylene regulation of a bean chitinase gene in transgenic tobacco. **The Plant Cell**, vol. 1, n. 6, p. 599-607, 1989.

BROGLIE, K. E.; GAYNOR, J. J.; BROGLIE, R. M. Ethylene-regulated gene expression: Molecular cloning of the genes encoding an endochitinase from *Phaseolus vulgaris*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 83, n. 18, p. 6820-6824, 1986.

BROOKS, J. S.; FEENY, P. Seasonal variation in *Daucus carota* leaf-surface and leaf-tissue chemical profiles. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 9, p. 769-782, 2004.

BROSSA, R. *et al.* Leaf flavonoid content in *Quercus ilex* L. resprouts and its seasonal variation. **Trees – Structure and Function**, v. 23, n. 2, 401-408, 2009.

BROUGHTON, W. J. *et al.* Signals exchanged between legumes and *Rhizobium*: agricultural uses and perspectives. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 129-137, 2003.

BROWN, D. E. *et al.* Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 126, n. 2, p. 524-535, 2001.

BURBULIS, I. E.; IACOBUCCI, M.; SHIRLEY, B. W. A null mutation in the first enzyme of flavonoid biosynthesis does not affect male fertility in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 8, n. 6, p. 1013-1025, 1996.

BURG, S. P. Ethylene. In: \_\_\_\_\_. **Postharvest physiology and hypobaric storage of fresh produce**. Cambridge: CABI Publishing, 2004. p. 132-239.

BURG, S. P.; BURG, E. A. Relationship between ethylene production and ripening in bananas. **Botanical Gazette**, v. 126, n. 3, p. 200-204, 1965.

BYERS, R. E. Peach and nectarine fruit softening following aminoethoxyvinylglycine sprays and dips. **HortScience**, v. 32, n. 1, p. 86-88, 1997.

CALDWELL, M. M.; ROBBERECHT, R.; FLINT, S. D. Internal filters: prospects for UV-acclimation in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v. 58, n. 3, p. 445-450, 1983.

CASTAÑEDA-OVANDO, A. *et al.* Chemical studies of anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 859-871, 2009.

CAVALCANTE, M. L. **Composição de carotenóides e valor de vitamina A em pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e acerola (*Malpighia glabra* L.)**. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Nutrição, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1991.

CHANG, C.H. *et al.* Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 3, p. 478-485, 2006.

CHANG, C. *et al.* *Arabidopsis* ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. **Science**, v. 262, n. 5133, p. 539-544, 1993.

CHANG, C.; STADLER, R. Ethylene hormone receptor action in *Arabidopsis*. **Bioessays**, v. 23, n. 7, p. 619-627, 2001.

CHAO, Q. *et al.* Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. **Cell**, v. 89, n. 7, p. 1133-1144, 1997.

CHEN, Y. F. *et al.* Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 22, p. 19861-19866, 2002.

CHERVIN, C. *et al.* Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. **Plant Science**, v. 167, n. 6, p. 1301-1305, 2004.

CHRISTIE, P. J.; ALFENITO, M. R.; WALBOT, V. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. **Planta**, v. 194, n. 4, p. 541-549, 1994.

CIARDI, J. A. *et al.* Response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato involves regulation of ethylene receptor gene expression. **Plant Physiology**, v. 123, n. 1, p. 81-92, 2000.

CLARK, L. E.; CLARK, W. D. Seasonal variation in leaf exudate flavonoids of *Isocoma acradenia* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 18, n. 2-3, p. 145-148, 1990.

CLIFFORD, M. N.; BROWN, J. E. Dietary flavonoids and health – Broadening the perspective. In: ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 319-370.

CONSOLINI, A. E.; BALDINI, O. A. N.; AMAT, A. G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 33-39, 1999.

CONSOLINI, A. E.; SARUBBIO, M. G. Pharmacological effect of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 57-63, 2002.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996.

COOMBE, B. G.; HALE, C. R. The hormone content of ripening grape berries and the effects of growth substance treatments. **Plant Physiology**, v. 51, n. 4, p. 629-634, 1973.

CROOKES, P. R.; GRIERSON, D. Ultrastructure of tomato fruit ripening and the role of polygalacturonase isoenzymes in cell wall degradation. **Plant Physiology**, v. 72, n. 4, p. 1088-1093, 1983.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Phenols, polyphenols and tannins: an overview. In: CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. **Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2006. p. 1-24.

CUADRA, P.; HARBORNE, J. B.; WATERMAN, P. G. Increases in surface flavonols and photosynthetic pigments in *Gnaphalium luteo-album* in response to UV-B radiation. **Phytochemistry**, v. 45, n. 7, p. 1377-1383, 1997.

CULHANE, C. Potential benefits of functional foods and nutraceuticals to the agri-food Industry in Canada, Final report. Ontario: **AAFC**, 2002.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 1, p. 1-15, 2004.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Determination of the glycosylation site in flavonoid mono-*O*-glycosides by collision-induced dissociation of electrospray-generated deprotonated and sodiated molecules. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, n. 3, p. 364-372, 2005.

D'AQUINO, S. *et al.* Preharvest aminoethoxyvinylglycine treatments reduce internal browning and prolong the shelf-life of early ripening pears. **Scientia Horticulturae**, v. 125, n. 3, p. 353-360, 2010.

DAVIES, C.; BOSS, P. K.; ROBINSON, S. P. Treatment of grape berries, a nonclimacteric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. **Plant Physiology**, v. 115, n. 3, p. 1155-1161, 1997.

DAVIES, K. M.; HOBSON, G. E.; GRIERSON, D. Silver ions inhibit the ethylene-stimulated production of ripening-related mRNAs in tomato. **Plant, Cell & Environment**, v. 11, n. 8, p. 729-738, 1988.

DAVIES, K. M.; HOBSON, G. E.; GRIERSON, D. Differential effect of silver ions on the accumulation of ripening-related mRNAs in tomato fruit. **Journal of Plant Physiology**, v. 135, n. 6, p. 708-713, 1990.

DEIKMAN, J. Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription. **Physiologia Plantarum**, v. 100, n. 3, p. 561-566, 1997.

DEKERMENDJIAN, K. *et al.* Structure-activity relationships and molecular modeling analysis of flavonoids binding to the benzodiazepine site of the rat brain GABA (A) receptor complex. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 21, p. 4343-4350, 1999.

DELLAPENNA, D. *et al.* Transcriptional analysis of polygalacturonase and other ripening associated genes in Rutgers, rin, nor, and Nr tomato fruit. **Plant Physiology**, v. 90, n. 4, p. 1372-1377, 1989.

DENG, F.; AOKI, M.; YOGO, Y. Effect of naringenin on the growth and lignin biosynthesis of gramoineous plants. **Weed Biology and Management**, v. 4, n. 1, p. 49-55, 2004.

DiPIETRO, A. *et al.* Pig heart mitochondrial ATPase: properties of purified and membrane-bound enzyme. Effects of flavonoids. **Biochimie**, v. 57, n. 8, p. 959-967, 1975.

DIPLOCK, A. T. *et al.* Scientific concepts of functional foods in Europe - Consensus document. **British Journal of Nutrition**, v. 81, Suppl. 1, p. S1-S27, 1999.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 1085-1097, 1995.

DOMINGUEZ-PUIGJANER, E. *et al.* A cDNA clone highly expressed in ripe banana fruit shows homology to pectate lyases. **Plant Physiology**, v. 114, n. 3, p. 1071-1076, 1997.

DONG, C. H. *et al.* Subcellular co-localization of *Arabidopsis* RTE1 and ETR1 supports a regulatory role for RTE1 in ETR1 ethylene signalling. **Plant Journal**, v. 53, n. 2, p. 275-286, 2008.

DORTA, D. J. *et al.* The interaction of flavonoids with mitochondria: Effects on energetic processes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 152, n. 2-3, p. 67-78, 2005.

DRAKE, S. R. *et al.* The influence of aminoethoxyvinylglycine and ethephon on objective and sensory quality of "Delicious" apples and apple juice at harvest and after storage. **HortScience**, v. 40, n. 7, p. 2102-2108, 2005.

DUSTIN, C. D.; COOPER-DRIVER, G. A. Changes in phenolic production in the hay-scented fern (*Dennstaedtia punctilobula*) in relation to resource availability. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 20, n. 2, p. 99-106, 1992.

EAKS, I. L. Respiratory response, ethylene production, and response to ethylene of citrus fruit during ontogeny. **Plant Physiology**, v. 45, n. 3, p. 334-338, 1970.

ECKER, J. R.; DAVIS, R. W. Plant defense genes are regulated by ethylene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 84, n. 15, p. 5202-5206, 1987.

EINBOND, L. S. *et al.* Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 23-28, 2004.

EYAL, Y. *et al.* A basic-type PR-1 promoter directs ethylene responsiveness, vascular and abscission zone-specific expression. **The Plant Journal**, v. 4, n. 2, p. 225-234, 1993.

FAGUNDES, A. F.; DABUL, A. N. G.; AYUB, R. A. Aminoethoxivinilglicina no controle do amadurecimento de frutos de caqui cv. Fuyu. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 73-75, Apr. 2006.

FANG, Z. *et al.* How to improve bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) juice color quality: effect of juice processing on bayberry anthocyanins and polyphenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 99-106, 2006.

FANG, Z.; ZHANG, M.; WANG, L. HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in bayberries (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.). **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 845-852, 2007.

FELIX, G.; MEINS, F. Ethylene regulation of  $\beta$ -1,3-glucanase in tobacco. **Planta**, v. 172, n. 3, p. 386-392, 1987.

FERRER, A. *et al.* Changes during the ripening of the very late season Spanish peach cultivar Calanda: Feasibility of using CIELAB coordinates as maturity indices. **Scientia Horticulturae**, v. 105, n. 4, p. 435-446, 2005.

FIUZA, T. S. *et al.* Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 2, p. 21-31, 2008.

FLESCHHUT, J. *et al.* Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins *in vitro*. **European Journal of Nutrition**, v. 45, n. 1, p. 7-18, 2006.

FLINT, S. D.; CALDWELL, M. M. Partial inhibition of *in vitro* pollen germination by simulated solar ultraviolet-B radiation. **Ecology**, v. 65, n. 3, p. 792-795, 1984.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 12, p. 1061-1080, 1995.

FRIML, J. Auxin transport - Shaping the plant. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 1, p. 7-12, 2003.

FRITSCH, H.; GRISEBACH, H. Biosynthesis of cyanidin in cell cultures of *Haplopappus gracilis*. **Phytochemistry**, v. 14, n. 11, p. 2437-2442, 1975.

GAGNE, J. M. *et al.* *Arabidopsis* EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3

degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 101, n. 17, p. 6803-6808, 2004.

GALLEANO, M. *et al.* Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, n. 1, p. 23-30, 2010.

GAMET-PAYRASTRE, L. *et al.* Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. **General Pharmacology**, v. 32, n. 3, p. 279-286, 1999.

GAO, Z. *et al.* Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 36, p. 34725-34732, 2003.

GARNER, D.; CRISOSTO, C. H.; OTIEZA, E. Controlled atmosphere storage and aminoethoxyvinylglycine postharvest dip delay post cold storage softening of "Snow King" peach. **HortTechnology**, v. 11, n. 4, 598-601, 2001.

GEORGÉ, S. *et al.* Changes in the contents of carotenoids, phenolic compounds and vitamin C during technical processing and lyophilisation of red and yellow tomatoes. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1603-1611, 2011.

GIL, M. I. *et al.* Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 17, p. 4976-4982, 2002.

GIOVANELLI, J.; MUDD, S. H.; DATKO, A. H. Quantitative analysis of pathways of methionine metabolism and their regulation in *Lemna*. **Plant Physiology**, v. 78, n. 3, p. 555-560, 1985.

GIOVANNONI, J. Molecular biology of fruit maturation and ripening. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, n. 1, p. 725-749, 2001.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, n. 3, p. 217-225, 2003.

GIVEN, N. K.; VENIS, M. A.; GRIERSON, D. Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. **Plant**, v. 174, n. 3, p. 402-406, 1988.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOLDSCHMIDT, E. E.; HUBERMAN, M.; GOREN, R. Probing the role of endogenous ethylene in the degreening of citrus fruit with ethylene antagonists. **Plant Growth Regulation**, v. 12, n. 3, p. 325-329, 1993.

GOMES, R. P. A pitangueira. In: \_\_\_\_\_. **Fruticultura brasileira**. 13<sup>a</sup> Ed. São Paulo: Nobel, 2007. p. 384-388.

GONZÁLEZ-SAN JOSÉ, M. L. *et al.* Application of principal component analysis to ripening indices for wine grapes. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 4, n. 3, p. 245-255, 1991.

GRAY, J. E. *et al.* The use of transgenic and naturally-occurring mutants to understand and manipulate tomato fruit ripening. **Plant, Cell and Environment**, v. 17, n. 5, p. 557-571, 1994.

GRAY, D. E. *et al.* Acute drought stress and plant age effects on alkalamide and phenolic acid content in purple coneflower roots. **Planta Medica**, v. 69, n. 1, p. 50-55, 2003.

GREFFEN, C. *et al.* Subcellular localization and *in vivo* interactions of the *Arabidopsis thaliana* ethylene receptor family members. **Molecular Plant**, v. 1, n. 2, p. 308-320, 2008.

GRIERSON, D.; TUCKER, G. A. Timing of ethylene and polygalacturonase synthesis in relation to the control of tomato fruit ripening. **Planta**, v. 157, n. 2, p. 174-179, 1983.

GUO, H.; ECKER, J. R. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF<sup>EBF1/EBF2</sup>-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. **Cell**, v. 115, n. 6, p. 667-677, 2003.

GUO, H.; ECKER, J. R. The ethylene signaling pathway: New insights. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 1, p. 40-49, 2004.

HAARD, N. E.; CHISM, G. W. Characteristics of edible plant tissues. In: FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 3<sup>a</sup> ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996. p. 943-1012.

HALE, C. R.; COOMBE, B. G.; HAWKER, J. S. Effects of ethylene and 2-chloroethylphosphonic acid on the ripening of grapes. **Plant Physiology**, v. 45, n. 5, p. 620-623, 1970.

HALL, L.N. *et al.* Antisense inhibition of pectin esterase gene expression in transgenic tomatoes. **The Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 121-129, 1993.

HALL, A. E. *et al.* The relationship between ethylene binding and dominant insensitivity conferred by mutant forms of the ETR1 ethylene receptor. **Plant Physiology**, v. 121, n. 1, p. 291-299, 1999.

HALL, B. P.; SHAKEEL, S. N.; SCHALLER, G. E. Ethylene receptors: ethylene perception and signal transduction. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 26, n. 2, p. 118-130, 2007.

HAO, D.; OHME-TAKAGI, M.; SARAI, A. Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 41, p. 26857-26861, 1998.

HARBORNE, J. B. Flavonoids and the evolution of the angiosperms. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 5, n. 1, p. 7-22, 1977.

HARTMANN, C. Biochemical changes in harvested cherries. **Postharvest Biology and Technology**, v. 1, n. 3, p. 231-240, 1992.

HASLER, C. M. Functional foods: Their role in disease prevention and health promotion. **Food Technology**, v. 52, n. 11, p. 63-70, 1998.

HAYAMA, H. *et al.* Ethylene and fruit softening in the *stony hard* mutation in peach. **Postharvest Biology and Technology**, v. 41, n. 1, p. 16-21, 2006.

HEGNAUER, R. Myrtaceae. In: \_\_\_\_\_. **Chemotaxonomie der Pflanzen IX: eine Übersicht über die Verbreitung und die Systematische Bedeutung der Pflanzenstoffe**. Basel: Birkhäuser Verlag, 1990. p. 116-132.

HILLIS, W. E.; ISOI, K. Variation in the chemical composition of *Eucalyptus sideroxylon*. **Phytochemistry**, v. 4, n. 4, p. 541-550, 1965.

HIMELBLAU, E.; AMASINO, R. M. Delivering copper within plant cells. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, n. 3, p. 205-210, 2000.

HIRAYAMA, T. *et al.* RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. **Cell**, v. 97, n. 3, p. 383-393, 1999.

HOBSON, G. E.; ATTA-ALY, M. A. Effect of silver ion on tomato fruit ripening, and a new method for treatment (*in vivo* & *vitro*). **Acta Horticulturae**, v. 190, n. 1, p. 225-233, 1984.

HOBSON, G. E. *et al.* The inhibition of tomato fruit ripening by silver. **Journal of Plant Physiology**, v. 116, n. 1, p. 21-29, 1984.

HOLETZ, F. B. *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 51, n. 8, p. 305-310, 1997.

HOPP, W.; SIETZ, H. U. The uptake of acylated anthocyanin into isolated vacuoles from a cell suspension culture of *Daucus carota*. **Planta**, v. 170, n. 1, p. 74-85, 1987.

HUA, J. *et al.* Ethylene insensitivity conferred by *Arabidopsis* ERS gene. **Science**, v. 269, n. 5231, p. 1712-1714, 1995.

HUA, J. *et al.* *EIN4* and *ERS2* are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 10, n. 8, p. 1321-1332, 1998.

HUA, J.; MEYEROWITZ, E. M. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Cell**, v. 94, n. 2, p. 261-271, 1998.

HUANG, Y. *et al.* Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, v. 33, n. 2, p. 221-233, 2003.

HUNGRIA, M.; STACEY, G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 29, n. 5-6, p. 819-830, 1997.

HUSSEIN, S. A. *et al.* Polyoxygenated flavonoids from *Eugenia edulis*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 4, p. 883-889, 2003.

HVATTUM, E. Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry and diode-array detection. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 16, n. 7, p. 655-662, 2002.

HVATTUM, E.; EKEBERG, D. Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, n. 1, p. 43-49, 2003.

IANNETTA; P. P. M. *et al.* Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit. **Physiologia Plantarum**, v. 127, n. 2, p. 247-259, 2006.

IASON, G. R.; HARTLEY, S. E.; DUNCAN, A. J. Chemical composition of *Calluna vulgaris* (Ericaceae): Do responses to fertilizer vary with phenological stage? **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 21, n. 3, p. 315-321, 1993.

JACOBS, M.; RUBERY, P. H. Naturally occurring auxin transport regulators. **Science**, v. 241, n. 4863, p. 346-349, 1988.

JAYAPRAKASHA, G. K.; GIRENNAVAR, B.; PATIL, B. S. Radical scavenging activities of Rio Red grapefruits and sour orange fruit extracts in different *in vitro* model systems. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4484-4494, 2008.

JIMENÉZ-BERMÚDEZ, S. *et al.* Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. **Plant Physiology**, v. 128, n. 2, p. 751-759, 2002.

JUNG, S. Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. **Plant Science**, v. 166, n. 2, p. 459-466, 2004.

KAMEI, H. *et al.* Suppression of tumor cell growth by anthocyanins *in vitro*. **Cancer Investigation**, v. 13, n. 6, p. 590-594, 1995.

KAMIYA, K.; SATAKE, T. Chemical constituents of *Baeckea frutescens* leaves inhibit copper-induced low-density lipoprotein oxidation. **Fitoterapia**, v. 81, n. 3, p. 185-189, 2010.

KATZ, E. *et al.* Molecular and physiological evidence suggests the existence of a system II-like pathway of ethylene production in non-climacteric *Citrus* fruit. **Planta**, v. 219, n. 2, p. 243-252, 2004.

KEDAGE, V. V. *et al.* Study of antioxidant properties of some varieties of grapes (*Vitis vinifera* L.). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.47, n. 2., p. 175-185, 2007.

KENDE, H. Ethylene biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 44, n. 1, p. 283-307, 1993.

KENDRICK, M. D.; CHANG, C. Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 5., p. 479-485, 2008.

KHORSHIDI, S.; DAVARYNEJAD, G. Influence of preharvest ethephon spray on fruit quality and chemical attributes of "Cigany" sour cherry cultivar. **Journal Of Biological and Environmental Sciences**, v. 4, n. 12, p. 133-141, 2010.

KIDD, F.; WEST, C. The course of respiratory activity throughout the life of an apple. **Rep. Food Invest. Board for the Year 1924**, DSIR, London, p. 27-33, 1925.

KIEBER, J. J. *et al.* *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. **Cell**, v. 72, n. 3, p. 427-441, 1993.

KIM, D. H. *et al.* Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. **Archives of Pharmacal Research**, v. 21, n. 1, p. 17-23, 1998.

KISELOVA, Y. *et al.* Correlation between the *in vitro* antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 11, p. 961-965, 2006.

KNEE, M. Sensitivity of ATPase to silver ions suggests that silver acts outside the plasma membrane to block ethylene action. **Phytochemistry**, v. 31, n. 4, p. 1093-1096, 1992.

KONCZAK, I. *et al.* Antioxidant capacity and phenolic compounds in commercially grown native Australian herbs and spices. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 260-266, 2010.

KONG, J. M. *et al.* Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, n. 5, p. 923-933, 2003.

KOONTZ, H. V.; BERLE, K. L. Silver uptake, distribution, and effect on calcium, phosphorus, and sulfur uptake. **Plant Physiology**, v. 65, n. 2, p. 336-339, 1980.

KOPONEN, J. M. *et al.* Characterization and fate of black currant and bilberry flavonols in enzyme-aided processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 3136-3144, 2008.

KOTILAINEN, L. *et al.* Health enhancing foods: Opportunities for strengthening the sector in developing countries. Washington: **Agriculture and Rural Development Department**. Discussion Paper 30, 2006.

KRISHNA, A. G.; BABU, K. H. Effect of post harvest application of calcium and virosil on ripening and shelf life of guava var. Allahabad Safeda. **Madras Agricultural Journal**, v. 89, n. 4-6, p. 221-224, 2002.

KUBASEK, W. L. *et al.* Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating *Arabidopsis* seedling. **Plant Cell**, v. 4, n. 10, p. 1229-1236, 1992.

KÜHNAU, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 24, n. 1, p. 117-191, 1976.

KUMAR, V.; PARVATAM, G.; RAVISHANKAR, G. A. AgNO<sub>3</sub> - A potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 1-15, 2009.

KWAK, S. H.; LEE, S. H. The requirements for Ca<sup>2+</sup>, protein phosphorylation, and dephosphorylation for ethylene signal transduction in *Pisum sativum* L. **Plant Cell Physiology**, v. 38, n. 10, p. 1142-1149, 1997.

KYLE, J. A. M.; DUTHIE, G. G. Flavonoids in Foods. In: ANDERSEN, O. M.; MARKAHM, K. R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 219-262.

LAVOLA, A.; JULKUNEN-TIITTO, R. The effect of elevated carbon dioxide and fertilization on primary and secondary metabolites in birch, *Betula pendula* (Roth). **Oecologia**, v. 99, n. 3-4, p. 315-321, 1994.

LEE, D. W. Anthocyanins in leaves: distributions, phylogeny and development. **Advances in Botanical Research**, v. 37, n. 1, p. 37-53, 2002.

LEE, J. H.; DENG, X. W.; KIM, W.T. Possible role of light in the maintenance of EIN3/EIL1 stability in *Arabidopsis* seedlings. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, n. 2, p. 484-491, 2006.

LEE, J. H.; JOHNSON, J. V.; TALCOTT, S. T. Identification of ellagic acid conjugates and other polyphenolics in muscadine grapes by HPLC-ESI-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 15, p. 6003-6010, 2005.

LEE, S. *et al.* Non-climacteric fruit ripening in pepper: increased transcription of EIL-like genes normally regulated by ethylene. **Functional & Integrative Genomics**, v. 10, n. 1, p. 135-146, 2010.

LELIÈVRE, J. M. *et al.* Ethylene and fruit ripening. **Physiologia Plantarum**, v. 101, n. 4, p. 727-739, 1997.

LHULLIER, A. *et al.* Comparison of flavonoid profiles of *Agauria salicifolia* (Ericaceae) by liquid chromatography-UV diode array detection-electrospray ionisation mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1160, n. 1-2, p. 13-20, 2007.

LI, S.; ANDREWS, P. K.; PATTERSON, M. E. Effects of ethephon on the respiration and ethylene evolution of sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit at different development stages. **Postharvest Biology and Technology**, v. 4, n. 3, p. 235-243, 1994.

LI, W. *et al.* Comparison of antioxidant capacity and phenolic compounds of berries, chokecherry and seabuckthorn. **Central European Journal of Biology**, v. 4, n. 4, p. 499-506, 2009.

LIANG, Q.; QIAN, H.; YAO, W. Identification of flavonoids and their glycosides by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and with diode array ultraviolet detection. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 11, n. 1, p. 93-101, 2005.

LIMA, V. L. A. G. *et al.* Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 565-568, 2005.

LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; LIMA, D. E. S. Fenólicos e carotenóides totais em pitanga. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 447-450, 2002.

LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; LIMA, D. E. S. Efeito da luz e da temperatura de congelamento sobre a estabilidade das antocianinas da pitanga roxa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 92-94, 2005.

LIN, L. Z.; HARNLY, J. M. A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 1084-1096, 2007.

LIN, L. Z.; HARNLY, J. M. Phenolic compounds and chromatographic profiles of pear skins (*Pyrus* spp.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 19, p. 9094-9101, 2008.

LIS, E. K.; KWAKKENBOS, A. A. M.; VEEN, H. Differential effects of silver salt in apple tissue. **Plant Science Letters**, v. 33, n. 1, p. 1-6, 1984.

LOMAX, T. L.; MUDAY, G. K.; RUBERY, P. H. Auxin transport. In: DAVIES, P. J. **Plant hormones: physiology, biochemistry, and molecular biology**. London: Dordrecht Kluwer Academic Publishers. 2<sup>a</sup> ed. 1995. p. 509-530.

LOPES, A. S. **Pitanga e acerola: Estudo de processamento, estabilidade e formulação de néctar misto**. 193 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2005.

LOWRY, J. B. Anthocyanins of the Melastomataceae, Myrtaceae and some allied families. **Phytochemistry**, v. 15, n. 4, p. 513-516, 1976.

MAHMOUD, I. I. *et al.* Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. **Phytochemistry**, v. 58, n. 8, p. 1239-1244, 2001.

MALLIKARJUNA, N. *et al.* Influence of foliar chemical compounds on the development of *Spodoptera litura* (Fab.) in interspecific derivatives of groundnut. **Journal of Applied Entomology**, v. 128, n. 5, p. 321-328, 2004.

MARAIS, J. P. J. *et al.* The stereochemistry of flavonoids. In: GROTEWOLD, E. **The Science of Flavonoids**. New York: Springer Science + Business Media, Inc., 2006. p. 1-46.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, 1218-1223, 2008.

MARIGO, G.; BOUDET, A. M. Relations polyphénols - croissance: Mise en évidence d'un effet inhibiteur des composés phénoliques sur le transport polarisé de l'auxine. **Physiologia Plantarum**, v. 41, n. 3, p. 197-202, 1977.

MARÍN-RODRÍGUEZ, M. C.; ORCHARD, J.; SEYMOUR, G. B. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 377, p. 2115-2119, 2002.

MATTER, W. F.; BROWN, R. F.; VLAHOS, C. J. The inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase by quercetin and analogs. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 186, n. 2, p. 624-631, 1992.

McLELLAN, M. R.; LIND, L. R.; KIME R. W. Hue angle determinations and statistical analysis for multi-quadrant Hunter L, a, b data. **Journal of Food Quality**, v. 18, n. 3, p. 235-240, 1995.

MEDINA, J. H. *et al.* Overview - Flavonoids: A new family of benzodiazepine receptor ligands. **Neurochemical Research**, v. 22, n. 4, p. 419-425, 1997.

MEDINA-ESCOBAR, N. *et al.* Cloning, molecular characterization and expression pattern of a strawberry ripening-specific cDNA with sequence homology to pectate lyase from higher plants. **Plant Molecular Biology**, v. 34, n. 6, p. 867-877, 1997.

MEDINA-SUÁREZ, R. *et al.* Gene expression in the pulp of ripening bananas. Two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of *in vitro*

translation products and cDNA cloning of 25 different ripening-related mRNAs. **Plant Physiology**, v. 115, n. 2, p. 453-461, 1997.

MÉLO, E. A.; LIMA, V. L. A. G.; NASCIMENTO, P. P. Temperatura no armazenamento de pitanga. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 4, p. 629-634, 2000.

MENDEZ, J. *et al.* 5,7,2',5'-Tetrahydroxy-dihydroflavonol 3-rhamnoside from *Plinia pinnata*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 4, p. 1087-1088, 1994.

MENRAD, K. Market and marketing of functional food in Europe. **Journal Food Engineering**, v. 56, n. 2-3, p. 181-188, 2003.

MICHODJEHOUN-MESTRES, L. *et al.* Monomeric phenols of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 851-857, 2009.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MILLER, A. R.; ROBERTS, L. W. Regulation of tracheary element differentiation by exogenous L-methionine in callus of soya bean cultivars. **Annals of Botany**, v. 50, n. 1, p. 111-116, 1982.

MIYAZAKI, J. H.; YANG, S. F. The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. **Physiologia Plantarum**, v. 69, n. 2, p. 366-370, 1987.

MO, Y.; NAGEL, C.; TAYLOR, L. P. Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 89, n. 15, p. 7213-7217, 1992.

MOLLET, B.; ROWLAND, I. Functional foods: at the frontier between food and pharma. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 483-485, 2002.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MULLINS, E. D.; McCOLLUM, T. G.; McDONALD, R. E. Ethylene: A regulator of stress-induced ACC synthase activity in nonclimacteric fruit. **Physiologia Plantarum**, v. 107, n. 1, p. 1-7, 1999.

NETZEL, M. *et al.* Native Australian fruits - A novel source of antioxidants for food. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, n. 3, p. 339-346, 2007.

NIJS, A. P. M.; VISSER, D. L. Induction of male flowering in gynoecious cucumbers (*Cucumis sativus* L.) by silver ions. **Euphytica**, v. 29, n. 2, p. 273-280, 1980.

NIJVELDT, R. J. *et al.* Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 4, p. 418-25, 2001.

NOGUEIRA, C. Funcionais e Nutracêuticos: uma breve introdução. **Funcionais & Nutracêuticos**, n. 1, p. 18-25, 2008.

NUNAN, K. J. *et al.* Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grape berry development. **Planta**, v. 214, n. 2, p. 257-264, 2001.

OELLER, P. W. *et al.* Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. **Science**, v. 254, n. 5030, p. 437-439, 1991.

OKAMURA, H. *et al.* Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 3, p. 557-561, 1993.

OLMEDO, G. *et al.* *ETHYLENE-INSENSITIVE5* encodes a 5'→3' exoribonuclease required for regulation of the EIN3-targeting F-box proteins EBF1/2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 103, n. 36, p. 13286-13293, 2006.

PALLAUF, K. *et al.* Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 4, p. 273-281, 2008.

PALOU, L.; CRISOSTO, C.H. Postharvest treatments to reduce the harmful effects of ethylene on apricots. **Acta Horticulturae**, v. 599, n. 1, p. 31-38, 2003.

PECKET, R. C.; SMALL, C. J. Occurrence, location, and development of anthocyanoplasts. **Phytochemistry**, v. 19, n. 12, p. 2571-2576, 1980.

PEER, W. A.; MURPHY, A. S. Flavonoids and auxin transport: Modulators or regulators? **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 12, p. 556-563, 2007.

PENNINCKX, I. A. *et al.* Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. **The Plant Cell**, v. 8, n. 12, p. 2309-2323, 1996.

PERKINS-VEAZIE, P. M.; HUBER, D. J.; BRECHT, J. K. *In vitro* growth and ripening of strawberry fruit in the presence of ACC, STS or propylene. **Annals of Applied Biology**, v. 128, n. 1, p. 105-116, 1996.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998.

PORCU, O. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Variation in the carotenoid composition of the lycopene-rich Brazilian fruit *Eugenia uniflora* L. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 63, n. 4, p. 195-199, 2008.

POTUSCHAK, T. *et al.* EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two *Arabidopsis* F Box proteins: EBF1 and EBF2. **Cell**, v. 115, n. 6, p. 679-689, 2003.

POTUSCHAK, T. *et al.* The exoribonuclease XRN4 is a component of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 18, n. 11, p. 3047-3057, 2006.

PRETEL, M. T. *et al.* Non-involvement of ACC and ACC oxidase activity in pepper fruit ripening. **Postharvest Biology and Technology**, v. 5, n. 4, p. 295-302, 1995.

PRIOR, R. L. *et al.* Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1270-1276, 2001.

PROHENS, J.; RUIZ, J. J.; NUEZ, F. Advancing the tamarillo harvest by induced postharvest ripening. **HortScience**, v. 31, n. 1, p. 109-111, 1996.

PURVIS, A.C.; BARMORE, C. R. Involvement of ethylene in chlorophyll degradation in peel of *Citrus* fruits. **Plant Physiology**, v 68, n. 4, p. 854-856, 1981.

QIAO, H. *et al.* Interplay between ethylene, ETP1/ETP2 F-box proteins, and degradation of EIN2 triggers ethylene responses in *Arabidopsis*. **Genes & Development**, v. 23, n. 4, p. 512-521, 2009.

QIU, Y.; LIU, Q.; BETA, T. Antioxidant activity of commercial wild rice and identification of flavonoid compounds in active fractions. **Journal Of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 16, p. 7543-7551, 2009.

RAVANEL, S. *et al.* The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 95, n. 13, p. 7805-7812, 1998.

RAZ, V; FLUHR, R. Calcium requirements for ethylene-dependent responses. **Plant Cell**, v. 4, n. 9, p. 1123-1130, 1992.

REID, M. S. *et al.* Pulse treatments with the silver thiosulfate complex extend the vase life of cut carnations. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 105, n. 1, p. 25-27, 1980.

REID, M. S.; PECH, J. C.; LATCHE, A. Non-intervention de l'éthylène dans la maturation de la cerise, fruit non-climactérique. **Fruits**, v. 40, n. 3, p. 197-203, 1985.

REIN, M. **Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins**. Dissertação acadêmica – Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, 2005. p. 10-14.

RENAUD, S.; LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **Lancet**, v. 339, n. 8808, p. 1523-1526, 1992.

RESNICK, J. S. *et al.* **REVERSION-TO-ETHYLENE SENSITIVITY1**, a conserved gene that regulates ethylene receptor function in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 103, n. 20, p. 7917-7922, 2006.

REYNERTSON, K. A. *et al.* Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v. 109, n. 4, p. 883-890, 2008.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RIOV, J.; YANG, S. F. Autoinhibition of ethylene production in *Citrus* peel discs: suppression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthesis. **Plant Physiology**, v. 69, n. 3, p. 687-690, 1982.

RIVERA, D.; OBÓN, C. The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo Islands, A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, n. 2, p. 73-93, 1995.

ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. J. Bioactivity of flavonoids. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 48, n. 6, p. 555-564, 1996.

ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Analytical Chemistry of fruit bioflavonoids - A Review. **Analyst**, v. 122, n. 2, p. 11R-34R, 1997.

ROBERFROID, M. B. Global view on functional foods: European perspectives. **British Journal of Nutrition**, v. 88, Suppl. 2, p. S133-S138, 2002.

RODRIGO, M. J.; ZACARIAS, L. Effect of postharvest ethylene treatment on carotenoid accumulation and the expression of carotenoid biosynthetic genes in the flavedo of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 43, n. 1, p. 14-22, 2007.

RODRÍGUEZ, F. I. *et al.* A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. **Science**, v. 283, n. 5404, p. 996-998, 1999.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. *et al.* Updated Brazilian database on food carotenoids: factors affecting carotenoid composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 6, p. 445-463, 2008.

SAITO, N. *et al.* The first isolation of C-glycosylanthocyanin from the flowers of *Tricyrtis formosana*. **Tetrahedron Letters**, v. 44, n. 36, p. 6821-6923, 2003.

SAKAI, H. *et al.* ETR2 is and ETR1-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 95, n. 10, p. 5812-5817, 1998.

SALTVEIT, M. Respiratory metabolism. In: GROSS, K. C.; WANG, C. Y.; SALTVEIT, M. **The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks.** USDA, ARS. Agriculture Handbook n. 66, 2004.

SANDHU, A. K.; GU, L. Antioxidant capacity, phenolic content, and profiling of phenolic compounds in the seeds, skin, and pulp of *Vitis rotundifolia* (Muscadine grapes) as determined by HPLC-DAD-ESI-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4681-4692, 2010.

SANTOS, S. C.; WATERMAN, P. G. Polyphenols from *Eucalyptus consideniana* and *Eucalyptus viminalis*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 1, p. 95-97, 2001.

SANTOS, S. C.; WATERMAN, P. G. Polyphenols from *Eucalyptus ovata*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 3, p. 316-318, 2001.

SASLOWSKY, D. E.; WAREK, U.; WINKEL, B. S. Nuclear localization of flavonoid enzymes in *Arabidopsis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 23735-23740, 2005.

SATUÉ-GRACIA, M. T.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E. N. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 3362-3367, 1997.

SCHAPOVAL, E. E. S. *et al.* Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 44, n. 3, p. 137-142, 1994.

SCHIEBER, A.; BERARDINI, N.; CARLE, R. Identification of flavonol and xanthone glycosides from mango (*Mangifera indica* L. Cv. "Tommy Atkins") peels by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 17, p. 5006-5011, 2003.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia*, and *Hexachlamys* species. **Fitoterapia**, v. 66, n. 4, p. 373-374, 1995.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. *et al.* Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 183-186, 1987.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. *et al.* Xanthine oxidase inhibitory activity of flavonoids and tannins from *Hexachlamys edulis* (Myrtaceae). **Phytotherapy Research**, v. 10, n. 3, p. 260-262, 1996.

SCHROETER, H. *et al.* Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. **Biochemical Journal**, v. 358, n. Pt 3, p. 547-557, 2001.

SHIN, Y. *et al.* Harvest maturity, storage temperature and relative humidity affect fruit quality, antioxidant contents and activity, and inhibition of cell proliferation of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, n. 2, p. 201-209, 2008.

SILVA, S. *et al.* Identification of flavonol glycosides in wine making by-products by HPLC with different detectors and hyphenated with mass spectrometry. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v. 20, n. 1, p. 17-33, 2005.

SILVA, S. M. Pitanga. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 159, 2006.

SIMIRGIOTIS, M. J. *et al.* Cytotoxic chalcones and antioxidants from the fruits of *Syzygium samarangense* (Wax Jambu). **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 813-819, 2008.

SIMIRGIOTIS, M. J. *et al.* Comparison of phenolic composition and antioxidant properties of two native Chilean and one domestic strawberry genotypes. **Food Chemistry**, v. 113, n. 2, p. 377-385, 2009.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SIRÓ, I. *et al.* Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - A review. **Appetite**, v. 51, n. 3, p. 456-467, 2008.

SITRIT, Y.; BENNETT, A. B. Regulation of tomato fruit polygalacturonase mRNA accumulation by ethylene: a re-examination. **Plant Physiology**, v. 116, n. 3, p. 1145-1150, 1998.

SLIMESTAD, R.; SOLHEIM, H. Anthocyanins from black currants (*Ribes nigrum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 3228-3231, 2002.

SMITH, C. J. S. *et al.* Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. **Nature**, v. 334, n. 8, p. 724-726, 1988.

SMITH, C. J. S. *et al.* Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. **Plant Molecular Biology**, v. 14, n. 3, p. 369-379, 1990.

SOARES, G. L. G.; KAPLAN, M. A. C. Analysis of flavone-flavonol ratio in Dicotyledoneae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 135, n. 1, p. 61-66, 2001.

SÓJKA, M. *et al.* Composition and properties of purified phenolics preparations obtained from an extract of industrial blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) pomace. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 84, n. 6, p. 100-106, 2009.

SOLANO, R. *et al.* Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. **Gene & Development**, v. 12, n. 23, p. 3703-3714, 1998.

SOLANO, R.; ECKER, J. R. Ethylene gas: perception, signaling and response. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 1, n. 5, p. 393-398, 1998.

SOUZA, L. K. H. *et al.* Antifungal properties of Brazilian cerrado plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 247-249, 2002.

SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C.; WILLIAMS, R. J. Modulation of pro-survival Akt/protein kinase B and ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its *in vivo* metabolites underlie their action on neuronal viability. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 37, p. 34783-34793, 2003.

STAFFORD, H. A. **Flavonoid Metabolism**. Boca Raton: CRC Press, 1990. 286 p.

STAFFORD, H. A. Flavonoid evolution: an enzymic approach. **Plant Physiology**, v. 96, n. 3, p. 680-685, 1991.

STEPANOVA, A. N.; ECKER, J. R. Ethylene signaling: from mutants to molecules. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, n. 5, p. 353-360, 2000.

STEWART, I.; WHEATON, T. A. Carotenoids in citrus. Their accumulation induced by ethylene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 448-449, 1972.

STOCK, A. M.; ROBINSON, V. L.; GOUDREAU, P. N. Two-component signal transduction. **Annual Review in Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 183-215, 2000.

SUBHASREE, B. *et al.* Evaluation of antioxidant potential in selected green leafy vegetables. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1213-1220, 2009.

SUDHEER, K. P.; INDIRA, V. Maturity and harvesting of fruits and vegetables. In: PETER, K. V. **Post harvest technology of horticultural crops**. New Delhi: New India Publishing Agency, 2007. p. 31-46.

SULLIVAN, J. H.; TERAMURA, A. H. Effects of ultraviolet-B irradiation on seedling growth in the Pinaceae. **American Journal of Botany**, v. 75, n. 2, p. 225-230, 1988.

SWAIN, T. Secondary compounds as protective agents. **Annual Review in Plant Physiology**, v. 28, n. 1, p. 479-501, 1977.

TATTINI, M. *et al.* Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. **New Phytologist**, v. 163, n. 3, p. 547-561, 2004.

TERATANAVAT, R.; HOOKER, N. H. Consumer valuations and preference heterogeneity for a novel functional food. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 7, p. S533-S541, 2006.

TEVINI, M.; BRAUN, J.; FIESER, G. The protective function of the epidermal layer of rye seedlings against ultraviolet-B radiation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 53, n. 3, p. 329-333, 1991.

TEVINI, M.; IWANZIK, W.; THOMA, U. Some effects of enhanced UV-B irradiation on the growth and composition of plants. **Planta**, v. 153, n. 4, p. 388-394, 1981.

THANG, P. T. N. **Ripening behaviour of capsicum (*Capsicum annuum* L.) fruit**. 149 f. Tese (Doutorado) – School of Agriculture, Food and Wine, University of Adelaide, Australia, 2007.

THEODULOZ, C. *et al.* Xanthine oxidase inhibitory activity of Paraguayan Myrtaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 24, n. 2-3, p. 179-183, 1988.

TOPPAN, A.; ROBY, D.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. T. Cell surfaces in plant-microorganism interactions: III. *In vivo* effect of ethylene on hydroxyproline-rich glycoprotein accumulation in the cell wall of diseased plants. **Plant Physiology**, v. 70, n. 1, p. 82-86, 1982.

TÓTH, B. H.; BLAZICS, B.; KÉRY, Á. Polyphenol composition and antioxidant capacity of *Epilobium* species. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 1, p. 26-31, 2009.

TRAINOTTI, L.; PAVANELLO, A.; CASADORO, G. Different ethylene receptors show an increased expression during the ripening of strawberries: does such an increment imply a role for ethylene in the ripening of these non-climacteric fruits? **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 418, p. 2037-2046, 2005.

TREUTTER, D. Significance of flavonoids in plant resistance: A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 4, n. 3, p. 147-157, 2006.

TUCKER, G. A.; ROBERTSON, N. G.; GRIERSON, D. Changes in polygalacturonase isoenzymes during the "ripening" of normal and mutant tomato fruit. **European Journal of Biochemistry**, v. 112, n. 1, p. 119-124, 1980.

van der MEER, I. M. *et al.* Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility. **Plant Cell**, v. 4, n. 3, p. 253-262, 1992.

VASCO, C. *et al.* Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8274-8281, 2009.

VASCO, C. *et al.* Phenolic compounds in *Rosaceae* fruits from Ecuador. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1204-1212, 2009.

VELIOGLU, Y. S. *et al.* Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4113-4117, 1998.

VENDRELL, M. Effect of abscisic acid and ethephon on several parameters of ripening in banana fruit tissue. **Plant Science**, v. 40, n. 1, p. 19-24, 1985.

VERBEKE, W. Consumer acceptance of functional foods: Socio-demographic, cognitive and attitudinal determinants. **Food Quality and Preference**, v. 16, n. 1, p. 45-57, 2005.

VERSCHUREN, P. M. Functional foods: scientific and global perspectives. **British Journal of Nutrition**, v. 88, Suppl. 2, p. S125-S130, 2002.

VILLA-RODRÍGUEZ, J.A. *et al.* Effect of maturity stage on the content of fatty acids and antioxidant activity of 'Hass' avocado. **Food Research International**, *Article in Press*, 2010.

VILLACHICA, H. Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia. **Tratado de Cooperación Amazónica**, 1996. p. 228-233.

VILLARREAL, N. M. *et al.* Effect of ethylene and 1-MCP treatments on strawberry fruit ripening. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 4, p. 683-689, 2010.

VREBALOV, J. *et al.* A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato *Ripening-inhibitor (Rin)* Locus. **Science**, v. 296, n. 5566, p. 343-346, 2002.

WANG, K. L. C.; LI, H.; ECKER, J. R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **The Plant Cell**, v. 14, Suppl., S131-S151, 2002.

WANG, S. Y.; CHEN, C. T.; WANG, C. Y. The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of red raspberries. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 676-684, 2009.

WANG, S. Y.; LIN, H. S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 2, p. 140-146, 2000.

WATKINS, C. B. Ethylene synthesis, mode of action, consequences and control. In: KNEE, M. **Fruit quality and its biological basis**. Boca Raton: CRC Press, 2002. p. 180-224.

WEISS, M. R. Flora color changes as cues for pollinators. **Nature**, v. 354, n. 6350, p. 227-229, 1991.

WHALE, S. K. *et al.* Fruit quality in "Cripp's Pink" apple, especially colour, as affected by preharvest sprays of aminoethoxyvinylglycine and ethephon. **Scientia Horticulturae**, v. 115, n. 4, p. 342-351, 2008.

WILLIAMS, C. A. Flavone and flavonol O-glycosides. In: ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 749-856.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 7, p. 838-849, 2004.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 3-19, 2003.

WINKEL-SHIRLEY, B. Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. **Physiologia Plantarum**, v. 107, n. 1, p. 142-149, 1999.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiology**, v. 126, n. 2, p. 485-493, 2001.

WINKEL-SHIRLEY, B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 3, p. 218-223, 2002.

WINTER, J. *et al.* *Clostridium orbiscindens* sp. nov., a human intestinal bacterium capable of cleaving the flavonoid C-ring. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, n. 3, p. 355-357, 1991.

WOESTE, K. E.; KIEBER, J. J. A strong loss-of-function mutation in *RAN1* results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. **Plant Cell**, v. 12, n. 3, p. 443-455, 2000.

WOO, H. H.; JEONG, B. R.; HAWES, M. C. Flavonoids: from cell cycle regulation to biotechnology. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 6, p. 365-374, 2005.

WORKU, Z.; HERNER, R. C.; CAROLUS, R. L. Effect of stage of ripening and ethephon treatment on color content of paprika pepper. **Scientia Horticulturae**, v. 3, n. 3, p. 239-245, 1975.

WROLSTAD, R. E.; DURST, R. W.; LEE, J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. **Trends Food Science and Technology**, v. 16, n. 9., p. 423-428, 2005.

YAMANE, M. *et al.* Differential expression of ethylene biosynthetic genes in climacteric and non-climacteric Chinese pear fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, n. 3, p. 200-277, 2007.

YANG, S. F. Ethylene evolution from 2-chloroethylphosphonic acid. **Plant Physiology**, v. 44, n. 8, p. 1203-1204, 1969.

YANG, S. F.; HOFFMAN, N. E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 35, n. 1, p. 155-189, 1984.

YANG, T.; POOVAIAH, B. W. An early ethylene up-regulated gene encoding a calmodulin-binding protein involved in plant senescence and death. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 49, p. 38467-38473, 2000.

YAO, L. H. *et al.* Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 59, n. 3, p. 113-122, 2004.

YOO, S. *et al.* Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> signaling. **Nature**, v. 451, n. 7180, p. 789-795, 2008.

YU, Y. B; ADAMS, D. O.; YANG, S. F. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 198, n. 1, p. 280-286, 1979.

ZERONI, M.; GALIL, J.; BEN-YEHOSHUA, S. Autoinhibition of ethylene formation in nonripening stages of the fruit of sycomore fig (*Ficus sycomorus* L.). **Plant Physiology**, v. 57, n. 4, p. 647-650, 1976.

ZHAO, X. C. *et al.* Effect of ethylene-pathway mutations upon expression of the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 130, n. 4, p. 1983-1991, 2002.

ZHONG, X. N. *et al.* Three flavonols glycosides from leaves of *Myrsine seguinii*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 5, p. 943-946, 1997.

ZHOU, J. Y. *et al.* Preferential accumulation of orange-colored carotenoids in ponkan (*Citrus reticulata*) fruit peel following postharvest application of ethylene or ethephon. **Scientia Horticulturae**, v. 126, n. 2, p. 229-235, 2010.

ZHOU, X. *et al.* RTE1 is a Golgi-associated and ETR1-dependent negative regulator of ethylene responses. **Plant Physiology**, v. 145, n. 1, p. 75-86, 2007.

ZUCKER, M. Light and enzymes. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 23, n. 1, p. 133-156, 1972.