



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

LUCIANA DE SIQUEIRA OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DO METABOLISMO ANTIOXIDANTE DURANTE O
DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS DE CLONES DE ACEROLEIRA E SAPOTIZEIRO

FORTALEZA-CE

2012

LUCIANA DE SIQUEIRA OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO METABOLISMO ANTIOXIDANTE DURANTE O
DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS DE CLONES DE ACEROLEIRA E
SAPOTIZEIRO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof^ª. Dra. Maria Raquel Alcântara de Miranda.

Co-orientador: Dr. Carlos Farley Herbster Moura.

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- O48a Oliveira, Luciana de Siqueira.
Avaliação do metabolismo antioxidante durante o desenvolvimento de frutos de clones de aceroleira e sapotizeiro / Luciana de Siqueira Oliveira. – 2012.
107 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2012.
Orientação: Profa. Dra. Maria Raquel Alcântara de Miranda.
1. Sapotizeiro. 2. Aceroleira. 3. Antioxidantes. 4. Metabolismo . I. Título.

CDD 572

LUCIANA DE SIQUEIRA OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DO METABOLISMO ANTIOXIDANTE DURANTE O
DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS DE CLONES DE ACEROLEIRA E SAPOTIZEIRO

Tese apresentada ao Doutorado em
Bioquímica do Departamento de Bioquímica e
Biologia Molecular da Universidade Federal
do Ceará, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Bioquímica.
Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovado em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Maria Raquel Alcântara de Miranda (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Isabella Montenegro Brasil
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Carlos Farley Herbster Moura (Co-orientador)
Embrapa Agroindústria Tropical

Dr. Edy Sousa de Brito
Embrapa Agroindústria Tropical

Prof^a. Dra. Patrícia Lígia Dantas de Moraes
Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)

A Deus.

Aos meus pais, José Cauby e Aldenir.

Aos meus irmãos, Mariana e Tiago.

Ao meu esposo, Glendo.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À EMBRAPA, pelo financiamento do projeto de tese.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Frutos Tropicais (INCT-Frutos Tropicais).

À Universidade Federal do Ceará.

Ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

À Prof^a. Dra. Maria Raquel Alcântara de Miranda, pela excelente orientação e ensinamentos, contribuindo para o meu crescimento profissional.

Ao Dr. Carlos Farley Herbster Moura, pela orientação e confiança.

Ao Dr. Edy Sousa de Brito e a Dra. Rosa Virgínia Soares Mamede da Embrapa Agroindústria Tropical, pelos ensinamentos experimentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos participantes da Banca Examinadora, pelas valiosas colaborações e sugestões.

À Empresa Frutacor e a EMBRAPA Agroindústria Tropical por terem cedido os frutos para a realização do experimento.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelos ensinamentos passados e em especial aos professores Joaquim Enéas Filho, Enéas Gomes Filho e Dirce Fernandes Melo que ainda me acolheram em seus laboratórios.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela ajuda e boa vontade.

Às colegas do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Frutos da UFC, Ana Livia, Aurelice, Frederico, Jéssica, Kellina, Marcela, Marília, Mônica, Roberta, Sérgio, Taís e Winne, pela convivência.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia e Tecnologia Pós-Colheita da Embrapa Agroindústria Tropical e em especial à Delane da Costa Rodrigues e à Samira Pereira Moreira, pelo companheirismo durante o desenvolvimento experimental desse trabalho.

À minha família, pelo carinho, incentivo e apoio para que tudo isso fosse possível.

Ao meu esposo Glendo, pela cumplicidade e incentivo em todos os momentos; por ser um exemplo de determinação e por sua presença fundamental em minha vida.

RESUMO

O amadurecimento de frutos é um processo complexo do desenvolvimento, envolvendo inúmeras mudanças nas características bioquímicas, fisiológicas e sensoriais, bem como no metabolismo oxidativo determinando seus atributos de qualidade e propriedade antioxidante. Desta forma, esse trabalho objetivou analisar as principais mudanças no sistema antioxidante durante o desenvolvimento de frutos de duas espécies tropicais. Os frutos de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C), clones II 47/1, BRS 235, BRS 236, BRS 237 e BRS 238, e de sapotizeiro (*Manilkara zapota* L.), clones BRS 227 e BRS 228, foram analisados em diferentes estádios do desenvolvimento quanto às variáveis de qualidade pós-colheita, compostos antioxidantes, atividade antioxidante total (AAT), atividade das enzimas antioxidante e grau de peroxidação de lipídeos. Durante o processo de desenvolvimento das acerolas o conteúdo de vitamina C e de polifenóis solúveis totais (PST) diminuiu resultando em um declínio da atividade antioxidante dos frutos. Apesar da redução dos PST, o conteúdo de flavonóides amarelos e antocianinas totais mostraram um aumento evidente com o amadurecimento, o que pode estar associado à mudança de cor e propriedades antioxidantes nutricionais da acerola. Enquanto no sapoti, o conteúdo dos compostos antioxidantes diminuiu significativamente ao longo do desenvolvimento contribuindo para uma redução da AAT, resultante principalmente do declínio do conteúdo dos fenólicos, flavonóides amarelos e polifenóis totais, pois o sapoti não é considerado uma boa fonte de vitamina C. A atividade das enzimas antioxidantes dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) diminuiu ao longo do amadurecimento dos frutos tropicais estudados, o que contribuiu para um aumento do estresse oxidativo evidenciado pelo aumento da peroxidação de lipídeos, sendo, portanto necessário para facilitar muitas das mudanças relacionadas com a maturação. O amadurecimento das espécies tropicais estudadas foi acompanhado por um aumento do estresse oxidativo e peroxidativo, o qual pode contribuir para as alterações observadas na qualidade pós-colheita dos frutos e para um declínio em seu potencial antioxidante.

Palavras-chaves: *Malpighia emarginata* D.C; *Manilkara zapota* L.; atividade antioxidante; enzimas antioxidantes; compostos bioativos; amadurecimento.

ABSTRACT

Fruit ripening is a complex developmental process involving changes in biochemical, physiological and sensorial characteristics, as well as in the oxidative metabolism which result in their quality attributes and antioxidant properties. This research described the major changes in the antioxidant systems during development of two tropical fruit species. Acerola (*Malpighia emarginata* D.C) and sapodilla (*Manilkara zapota* L.) fruits were analyzed at different maturity stages for quality parameters post-harvest, antioxidant compounds, total antioxidant activity (TAA), antioxidant enzymes activity and cell membrane integrity. Ripening process promoted improvements in post-harvest quality of tropical fruits studied. In acerola, the total vitamin C and total soluble phenols (TSP) content reduced during development, which resulted in decline of total antioxidant activity (TAA). In spite of the decline in TSP, the yellow flavonoid and total anthocyanins content showed an evident increase at ripening, which may be associated to fruit coloring and antioxidant nutrition properties. While in sapodilla, antioxidant compounds contents reduced significantly during the fruit development which contributed to decreased of TAA, that resulting mainly from the decline of phenolics contents, such as TSP and yellow flavonoids, because sapodilla is not a good vitamin C source. The activities of oxygen-scavenging enzymes, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) decreased with tropical fruits ripening, which contributed to an increased oxidative stress as evidenced by lipid peroxidation, therefore necessary to make easy many changes related to aging. The development of tropical fruits studied was accompanied by progressive increase in oxidative and peroxidative stress, which can contributed to the fruit postharvest quality and nutritional antioxidant potential.

Keywords: *Malpighia emarginata* D.C; *Manilkara zapota* L.; antioxidant activity; antioxidant enzymes; bioactives compounds; ripening.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Principais mudanças durante o desenvolvimento e amadurecimento de frutos climatéricos.	15
Figura 2 – Via de biossíntese e metabolismo do etileno.	17
Figura 3 – Rotas metabólicas de formação das EROS nas células vegetais.	19
Figura 4 – Estrutura química básica dos flavonóides.	23
Figura 5 – Estrutura química geral das antocianinas.	24
Figura 6 – Frutos e plantas dos quatro clones de aceroleira: BRS 235 (1), BRS 236 (2), BRS 237 (3) e BRS 238 (4).	28
Figura 7 – Frutos de saptizeiro com formatos globoso, ‘Sapota Tropical’ (A), e oblongo, ‘Sapotí Ipa-Curu’ (B).	31
Figura 8 – Estádios de maturação dos frutos dos clones de aceroleira com base na cor da casca.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais municípios produtores de acerola no Estado do Ceará.	29
Tabela 2 – Mudanças na qualidade pós-colheita durante o desenvolvimento de frutos de cinco clones de aceroleira cultivados na Chapada do Apodi, Limoeiro do Norte, CE.	58
Tabela 3 – Determinação da cor (L^* , a^* e b^*) durante o desenvolvimento de frutos de cinco clones de aceroleira cultivados na Chapada do Apodi, Limoeiro do Norte, CE. ..	59
Tabela 4 - Mudanças nos compostos fenólicos antioxidantes durante o desenvolvimento de frutos de cinco clones de aceroleira cultivados na Chapada do Apodi, Limoeiro do Norte, CE.	63
Tabela 5 – Mudanças na atividade de enzimas antioxidantes, na peroxidação lipídica e na atividade antioxidante total durante o desenvolvimento de frutos de cinco clones de aceroleira cultivados na Chapada do Apodi, Limoeiro do Norte, CE.	65
Tabela 6 – Correlação entre as variáveis antioxidantes e o grau de peroxidação lipídica através do coeficiente de Pearson durante o desenvolvimento de frutos de cinco clones de aceroleira cultivados na Chapada do Apodi, Limoeiro do Norte, CE. ..	68
Tabela 7 – Mudanças na qualidade pós-colheita durante o desenvolvimento de frutos de duas cultivares de saptizeiro cultivadas em Paraipaba, CE.	89
Tabela 8 – Mudanças nos compostos antioxidantes durante o desenvolvimento de frutos de duas cultivares de saptizeiro cultivadas em Paraipaba, CE.	92
Tabela 9 – Mudanças na atividade de enzimas antioxidantes, na peroxidação lipídica e na atividade antioxidante total durante o desenvolvimento de frutos de duas cultivares de saptizeiro cultivadas em Paraipaba, CE.	96
Tabela 10 – Correlação entre as variáveis antioxidantes e o grau de peroxidação lipídica através do coeficiente de Pearson durante o desenvolvimento de frutos de duas cultivares de saptizeiro cultivadas em Paraipaba, CE.	99

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	10
1.	INTRODUÇÃO GERAL	11
2.	OBJETIVO GERAL	13
3.	REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1.	Amadurecimento de frutos	14
3.2.	Metabolismo oxidativo do amadurecimento	18
3.3.	Mecanismos antioxidantes	20
3.4.	Espécies tropicais estudadas	26
3.4.1.	<i>Acerola (Malpighia emarginata D.C)</i>	26
3.4.2.	<i>Sapoti (Manilkara zapota L.)</i>	31
	REFERÊNCIAS	34
	CAPÍTULO 2: METABOLISMO ANTIOXIDANTE DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS DE CLONES DE ACEROLEIRA (Malpighia emarginata D.C)	42
	RESUMO	43
1.	INTRODUÇÃO	44
2.	OBJETIVO	46
3.	MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1.	Obtenção e manuseio dos frutos	47
3.2.	Condução do experimento	48
3.3.	Análise física	48
3.3.1.	<i>Cor</i>	48
3.4.	Análises físico-químicas e químicas	48
3.4.1.	<i>Acidez titulável (AT)</i>	48
3.4.2.	<i>Sólidos solúveis (SS)</i>	49
3.4.3.	<i>Relação sólidos solúveis e acidez titulável (SS/AT)</i>	49
3.4.4.	<i>pH</i>	49
3.5.	Atividade das enzimas antioxidantes	49
3.5.1.	<i>Obtenção do extrato enzimático</i>	49
3.5.2.	<i>Proteínas solúveis totais</i>	49

3.5.3.	<i>Atividade da Dismutase do superóxido</i>	50
3.5.4.	<i>Atividade da Catalase</i>	50
3.5.5.	<i>Atividade da Peroxidase do ascorbato</i>	50
3.6.	Peroxidação de lipídeos	51
3.7.	Compostos antioxidantes e atividade antioxidante total	51
3.7.1.	<i>Flavonóides amarelos e antocianinas totais</i>	51
3.7.2.	<i>Vitamina C</i>	52
3.7.3.	<i>Polifenóis solúveis totais</i>	52
3.7.4.	<i>Atividade antioxidante total</i>	53
3.8.	Identificação e quantificação de compostos fenólicos	53
3.8.1.	<i>Extração dos compostos fenólicos</i>	53
3.8.2.	<i>Condições LC-DAD-ESI/MS</i>	54
3.9.	Delineamento experimental e análise estatística	54
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1.	Qualidade pós-colheita e compostos antioxidantes não enzimáticos	56
4.2.	Compostos fenólicos antioxidantes	60
4.3.	Atividades de enzimas antioxidantes	64
4.4.	Atividade antioxidante total e peroxidação de lipídeos	67
5.	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71
	CAPÍTULO 3: METABOLISMO ANTIOXIDANTE DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS DE CLONES DE SAPOTIZEIRO (<i>Manilkara zapota</i> L.)	77
	RESUMO	78
1.	INTRODUÇÃO	79
2.	OBJETIVO	80
3.	MATERIAL E MÉTODOS	81
3.1.	Obtenção e manuseio dos frutos	81
3.2.	Condução do experimento	81
3.3.	Análises físicas	82
3.3.1.	<i>Peso</i>	82
3.3.2.	<i>Tamanho</i>	82

3.4.	Análises físico-químicas e químicas	82
3.4.1.	<i>Acidez titulável (AT)</i>	82
3.4.2.	<i>Sólidos solúveis (SS)</i>	82
3.4.3.	<i>Relação sólidos solúveis e acidez titulável (SS/AT)</i>	82
3.4.4.	<i>pH</i>	83
3.5.	Atividades das enzimas antioxidantes	83
3.5.1.	<i>Obtenção do extrato enzimático</i>	83
3.5.2.	<i>Proteínas solúveis totais</i>	83
3.5.3.	<i>Atividade da Dismutase do superóxido</i>	83
3.5.4.	<i>Atividade da Catalase</i>	84
3.5.5.	<i>Atividade da Peroxidase do ascorbato</i>	84
3.6.	Peroxidação de lipídeos	84
3.7.	Compostos antioxidantes e atividade antioxidante total	85
3.7.1.	<i>Flavonóides amarelos</i>	85
3.7.2.	<i>Vitamina C</i>	85
3.7.3.	<i>Polifenóis solúveis totais</i>	86
3.7.4.	<i>Atividade antioxidante total</i>	86
3.8.	Delineamento experimental e análise estatística	87
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
4.1.	Qualidade pós-colheita	88
4.2.	Compostos antioxidantes não enzimáticos	91
4.3.	Atividade antioxidante total e peroxidação de lipídeos	94
4.4.	Atividades de enzimas antioxidantes	97
5.	CONCLUSÃO	100
	REFERÊNCIAS	101

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os frutos de origem tropical apresentam alguns obstáculos em relação à extensão de sua vida útil pós-colheita por serem mais perecíveis devido uma maior taxa respiratória. A velocidade com que se processa a respiração é um bom indicador do potencial de conservação do fruto após a colheita, uma vez que altas taxas respiratórias estão geralmente associadas à vida útil curta no armazenamento (ANTONIALI *et al.*, 2006). Quanto maior é a taxa respiratória de um fruto mais rápido é seu metabolismo e, portanto mais rápido é seu amadurecimento e senescência.

As espécies reativas do oxigênio (EROS), como radical superóxido (O_2^{\bullet}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxí (OH^{\bullet}), radical peroxi (ROO^{\bullet}), radical alcoxi (RO^{\bullet}) e oxigênio *singlet* (1O_2), são constantemente geradas nos organismos vivos durante os processos fisiológicos, como a respiração, e especialmente sob condições patológicas resultando em danos oxidativos nas plantas (HUANG *et al.*, 2007).

O amadurecimento de frutos é um complexo processo do desenvolvimento, geneticamente programado e um fenômeno irreversível que envolve a regulação de inúmeras características bioquímicas, fisiológicas e sensoriais, bem como mudanças no metabolismo oxidativo (PRASANNA *et al.*, 2007; ZHU *et al.*, 2008). Assim, o estresse oxidativo induzido pelas EROS exerce importante função na maturação, amadurecimento e senescência de frutos promovendo, principalmente, a deterioração da estrutura lipídica das membranas com consequente perda de sua integridade (JIMÉNEZ *et al.*, 2002). Desta forma, as EROS parecem ser uma característica intrínseca do amadurecimento de frutos, promovendo os processos de degradação oxidativa que contribuem para uma deterioração geral do metabolismo celular.

Nos organismos vivos, as EROS são reduzidas e neutralizadas pelos antioxidantes, os quais podem prevenir, retardar ou inibir danos oxidativos a lipídeos, proteínas e outras biomoléculas pela inibição da iniciação ou propagação das reações de oxidação em cadeia (WANG; BALLINGTON, 2007). Os antioxidantes têm papel essencial não só para manter em equilíbrio a produção e a eliminação das EROS durante condições não estressantes, mas também para determinar o nível de estresse oxidativo celular (TORRES; ANDREWS, 2006). Desta forma, o aumento do nível das EROS durante a senescência e o amadurecimento de frutos pode ser devido à alterações nos seus componentes antioxidantes.

Estudos têm evidenciado a função benéfica do consumo de frutas para a manutenção da saúde e prevenção de doenças, aumentando assim a expectativa de vida dos

seus consumidores (HUNG *et al.*, 2004; MARTINEZ-VALVERDE; PERIAGO; ROS, 2000; SUN *et al.*, 2002; TULIPANI *et al.*, 2011) e esta proteção tem sido atribuída aos vários antioxidantes que esses alimentos contém. Entre os mais abundantes presentes em frutos estão os compostos polifenólicos, as vitaminas C, A, B e E e os carotenóides (LIM; LIM; TEE, 2007). Contudo, o conteúdo desses compostos bioativos é influenciado por inúmeros fatores, como condições climáticas, tempo de amadurecimento, genótipo, técnicas de cultivo e, principalmente, estágio de maturação (MENICHINI *et al.*, 2009).

Ao longo do amadurecimento de frutos as inúmeras mudanças bioquímica, fisiológica e estrutural que ocorrem são responsáveis por determinar seus atributos de qualidade e propriedade antioxidante. Estudos mostram que há diferença significativa no conteúdo de compostos antioxidantes e na atividade antioxidante de frutos nos seus diferentes estádios de maturação (PARK *et al.*, 2006; ZHANG; KOO; EUN, 2006).

O consumo de frutas tropicais está aumentando nos mercados nacional e internacional devido ao crescente reconhecimento de seu valor nutricional e terapêutico (RUFINO *et al.*, 2010). Os frutos de clima tropical e subtropical se sobressaem quanto à qualidade e quantidade dos compostos antioxidantes devido a sua forte exposição à radiação solar (HANAMURA; HAGIWARA; KAWAGISHI, 2005). Portanto, frutos tropicais podem ser atraentes fontes de compostos antioxidantes funcionais benéficos à saúde.

Informações sobre a propriedade antioxidante de frutos em diferentes estádios do amadurecimento é muito útil para que possamos selecionar a correta variedade, cultivar e maturação, onde o conteúdo de antioxidantes seja maior, proporcionando não só melhores valores nutricionais ao fruto, como também conhecimento sobre sua proteção, uma vez que sofrerá processamento ou armazenamento pós-colheita.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar as mudanças no sistema de defesa antioxidante em frutos de duas espécies tropicais decorrentes do metabolismo oxidativo durante o seu desenvolvimento e amadurecimento com a finalidade de fundamentar uma base de dados para utilização na agroindústria.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Amadurecimento de frutos.

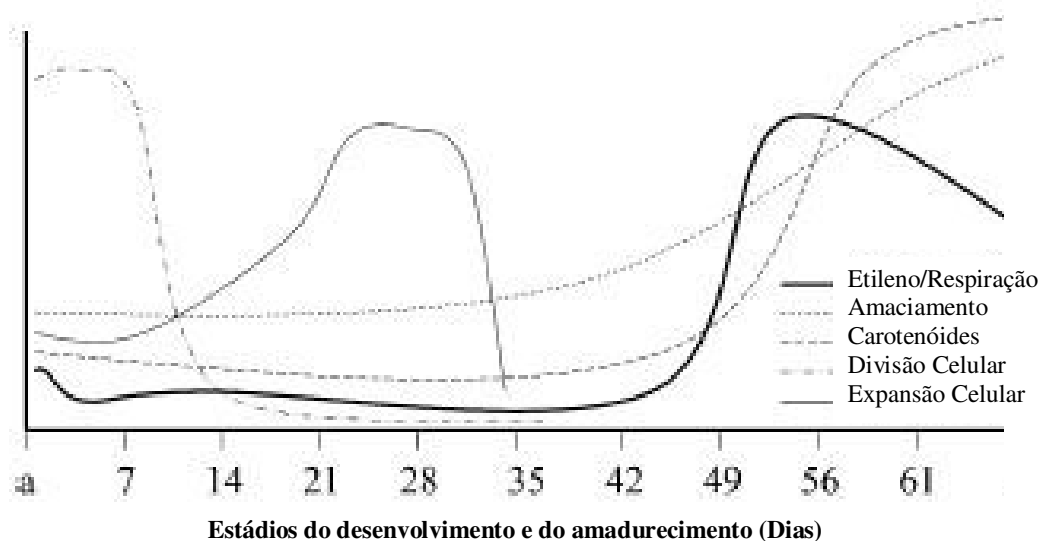
As frutas constituem de alimentos comercialmente importantes e nutricionalmente indispensáveis, sendo órgãos altamente especializados em plantas superiores, oferecendo uma grande variedade de características sensoriais como, aroma complexo/delicado, sabor agradável, cores exóticas, suculência, e textura. Exercendo uma função vital para a nutrição humana por fornecer fatores de crescimento essenciais e necessários para manutenção da saúde, como vitaminas (complexo B, C, entre outras), minerais, pró-vitamina A (β -caroteno) e compostos fenólicos (antioxidantes) (PRASANNA; PRABHA; THARANATHAN, 2007).

Os frutos são colhidos em sua completa maturidade, na qual são auto-suficientes, com sua própria maquinária catabólica, utilizando substratos acumulados enquanto estavam ligados à planta (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Desta forma, a respiração é o principal processo fisiológico envolvido na fisiologia pós-colheita de frutos, e a velocidade com que se processa a respiração é um bom indicador do potencial de conservação do fruto após a colheita, uma vez que altas taxas respiratórias estão geralmente associadas à curta vida útil no armazenamento (ANTONIALI *et al.*, 2006; CALBO; MORETTI; HENZ, 2007). Os frutos de origem tropical apresentam alguns obstáculos em relação à extensão de sua vida pós-colheita, por serem mais perecíveis devido a uma maior taxa respiratória. Assim, quanto maior a taxa respiratória do fruto mais rápido é seu metabolismo e, portanto mais rápido é seu amadurecimento e senescência.

Baseado no seu padrão respiratório e biossíntese do etileno durante o amadurecimento, os frutos podem ser classificados como climatéricos e não climatéricos. Os frutos climatéricos apresentam um aumento rápido e acentuado na atividade respiratória e na produção de etileno no início da maturação, denominado climatério, conduzindo ao amadurecimento imediato, podendo ocorrer ainda na planta ou desligado dela quando colhidos em sua completa maturidade, ou seja, fisiologicamente desenvolvidos. Os frutos não climatéricos apresentam atividade respiratória relativamente baixa e constante, com um gradual declínio do seu padrão respiratório e produção de etileno ao longo do amadurecimento, além de não serem capazes de continuar o seu processo de amadurecimento quando colhidos na maturidade fisiológica. Esses frutos produzem uma pequena quantidade de etileno endógeno (CHITARRA; CHITARRA, 2005; PRASANNA; PRABHA; THARANATHAN, 2007). Desta forma, podemos considerar que nos frutos climatéricos como, a acerola (CARRINGTON; KING, 2001), o sapoti (MIRANDA *et al.*, 2002) e o

tomate (GIOVANNONI, 2004), o processo de amadurecimento é conduzido pelo aumento da produção de etileno levando a altas taxas metabólicas e respiratórias, as quais conduzem à alterações bioquímica, fisiológica e estrutural que influenciam na aparência, na textura, no sabor e no aroma dos frutos, tornando-os atrativos para organismos dispersores de sementes (GIOVANNONI, 2004). As mudanças relativas ao crescimento (divisão e expansão celular), respiração e síntese de etileno com o amadurecimento, além de mudanças como o amaciamento e o acúmulo de carotenóides em frutos climáticos, podem ser observadas na Figura 1.

Figura 1 - Principais mudanças durante o desenvolvimento e amadurecimento de frutos climáticos.



FONTE: GIOVANNONI (2004).

O amadurecimento é uma etapa intermediária entre o final do desenvolvimento e o início da senescência, no qual os frutos são transformados em produtos atrativos e aptos para o consumo, do ponto de vista agrônomico (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Esse processo é altamente coordenado, geneticamente programado e irreversível que leva ao desenvolvimento de um fruto maduro com atributos de qualidade desejáveis (FONSECA *et al.*, 2004; PRASANNA; PRABHA; THARANATHAN, 2007). Embora os processos bioquímicos resultantes do amadurecimento de frutos sejam específicos e variem entre as

espécies, algumas mudanças são consideradas comuns, incluindo (1) modificação da cor através da alteração de pigmentos como, clorofila, carotenóides, e/ou acúmulo de flavonóides, como antocianinas, (2) modificação na textura através de alterações na turgescência e na estrutura e/ou no metabolismo da parede celular e (3) modificações no conteúdo de açúcares e de ácidos, e no perfil dos compostos voláteis, os quais afetam a qualidade nutricional, o sabor e o aroma (GIOVANNONI, 2004).

A mudança na cor durante o amadurecimento de frutos é devido a degradação da clorofila tornando visíveis pigmentos pré-existentes e/ou síntese de novos pigmentos responsáveis pela coloração característica de cada espécie ou cultivar, como diferentes tipos de antocianinas, que se acumulam nos vacúolos da célula, e de carotenóides, sendo o processo de degradação da clorofila promovido pelas enzimas clorofilase, lipoxigenase e peroxidase, as quais contribuem indiretamente para o processo (CHITARRA; CHITARRA, 2005; PRASANNA; PRABHA; THARANATHAN, 2007).

Já a qualidade do *flavor*, características de grande importância na aceitação das frutas, é atribuída a produção de uma complexa mistura de compostos voláteis, como ésteres, cetonas, terpenos, entre outros, além da degradação de flavonóides e taninos, os quais contribuem para a adstringência, acidez, ou para o sabor amargo dos frutos imaturos. Enquanto, o desenvolvimento do sabor é atribuído, principalmente, ao aumento da doçura resultante da hidrólise de polissacarídeos como o amido, bem como pela gluconeogênese e diminuição da acidez devido ao consumo dos ácidos orgânicos como substratos na respiração, levando a um aumento na relação açúcar/ácido.

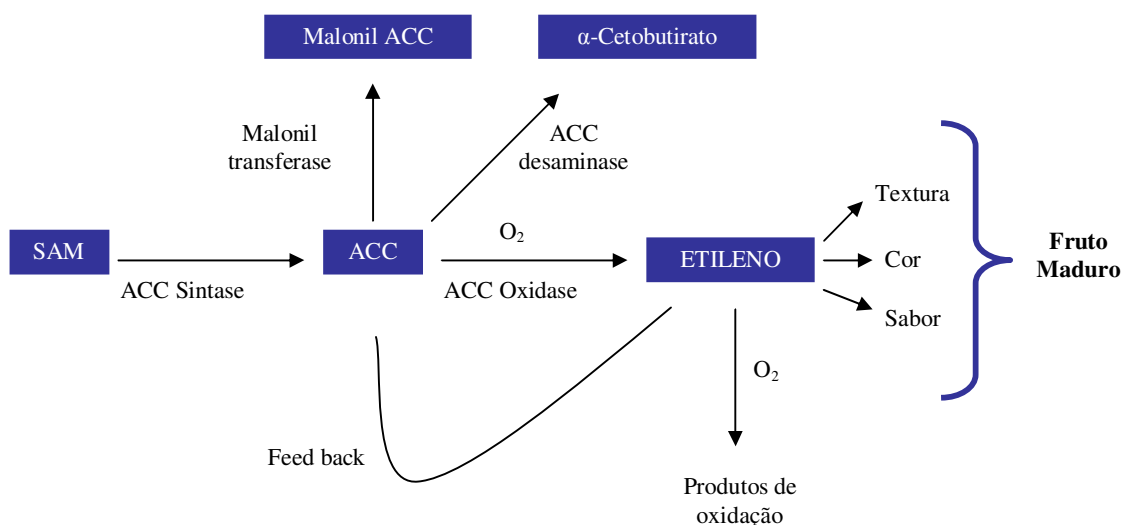
Outra importante mudança que ocorre em paralelo com o amadurecimento de frutos é o amaciamento, o qual tem uma relação direta com os constituintes da parede celular. Através de alterações na composição e na estrutura da parede celular mediada pela ação de enzimas, as quais promovem a solubilização completa ou parcial de polissacarídeos, como celulose e pectinas (CHITARRA; CHITARRA, 2005; PRASANNA; PRABHA; THARANATHAN, 2007).

Estudos têm relatado o controle genético de uma ampla variedade de processos celulares evidenciando o aumento dos níveis de expressão gênica durante o desenvolvimento ou processos do amadurecimento. Fonseca *et al.* (2004) relataram o envolvimento de genes no metabolismo dos açúcares e dos ácidos graxos, na biossíntese de pigmentos e de compostos do aroma, bem como na modificação da parede celular durante o amadurecimento de pêras. Ainda segundo esses autores, foi observado um acúmulo de transcritos que codificam enzimas que exercem função de defesa contra o estresse oxidativo. Tieman *et al.* (1992) observaram

que o gene que codifica a enzima hidrolítica da parede celular, pectinametilesterase (PME), é expressado antes do amadurecimento e é sub-regulado pelo etileno em tomates. Essa enzima é responsável pela remoção dos grupos metil-éster nas pectinas constituintes da parede celular para facilitar o acesso de uma outra classe de enzimas também envolvidas nesse metabolismo, as poligalacturonases (PG), ao seu substrato.

O etileno é o principal hormônio responsável pelo desencadeamento e coordenação dos eventos do amadurecimento em frutos climatéricos (MORAIS *et al.*, 2008). Estudos têm demonstrado que o amadurecimento climatérico envolve a expressão de genes específicos, muitos dos quais são dependentes do etileno (GIOVANNONI, 2001). Segundo Chitarra e Chitarra (2005), em 1980, Yang e Hoffman comprovaram a via biossintética do etileno a partir da L-metionina e na figura 2 podemos observar a elucidação dessa via conforme Prasanna, Prabha e Tharanathan (2007).

Figura 2 - Via de biossíntese e metabolismo do etileno.



FONTE: PRASANNA; PRABHA; THARANATHAN (2007).

O primeiro passo da síntese desse fitôrmônio é a conversão da S-adenosilmetionina (SAM) a ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) pela ação da enzima ACC sintase. Por fim o ACC é oxidado a etileno pela enzima ACC oxidase. Segundo Taiz e Zeiger (2009), a medida que os frutos amadurecem, o ACC e o etileno aumentam em concentração assim como as atividades enzimáticas, tanto da ACC oxidase quanto da ACC sintase, bem como os níveis de mRNA de subgrupos de genes que codificam cada enzima.

Desta forma, podemos considerar que o etileno exerce uma importante função sobre a modulação da expressão programada de genes específicos do amadurecimento de frutos, os quais induzem alterações nos seus atributos bioquímicos e fisiológicos (BARRY; GIOVANNONI, 2007; JIANG; FU, 2000) determinantes de sua qualidade comestível.

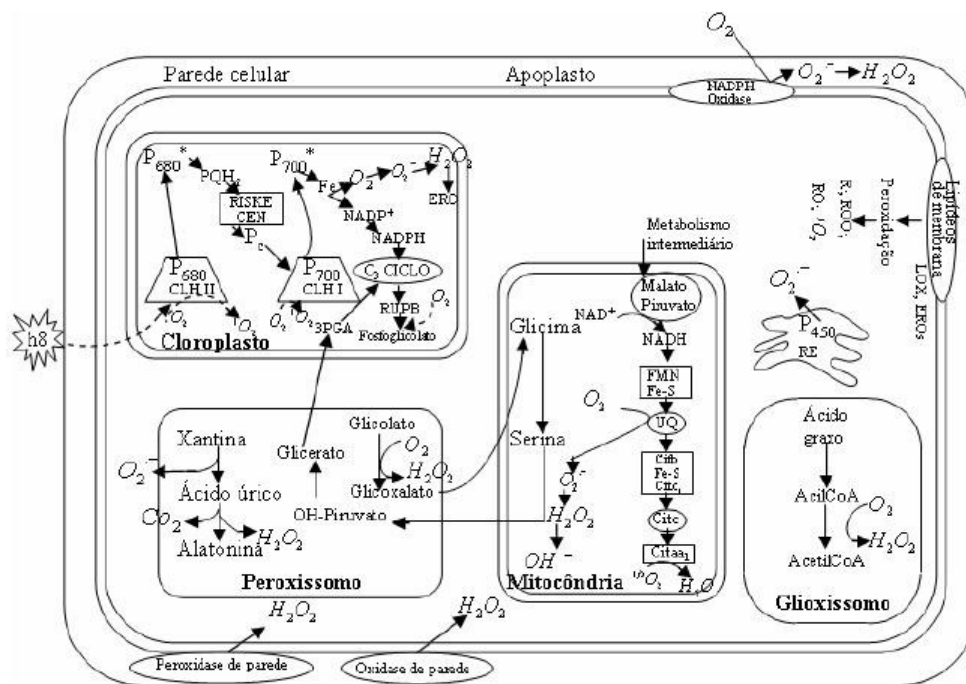
3.2. Metabolismo oxidativo do amadurecimento.

Os radicais livres como as espécies reativas do oxigênio (EROs) são inevitavelmente produzidas nas células vegetais como resultado de processos fisiológicos do metabolismo normal como a respiração e a fotossíntese e, especialmente, sob condições patológicas (HUANG *et al.*, 2007; LÓPEZ *et al.*, 2010; MONDAL *et al.*, 2004). As EROS como o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot) são compostos tóxicos gerados pela redução incompleta do oxigênio molecular ou pela oxidação incompleta da água através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria ou no cloroplasto (TORRES; ANDREWS, 2006). Essas espécies químicas reagem indiscriminadamente causando danos oxidativos aos lipídeos de membranas, as proteínas e ao DNA, gerando disfunção celular e, ao final, induzindo a morte da célula (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Nas células vegetais, as EROS podem ser produzidas através de rotas metabólicas em vários compartimentos celulares (Figura 3).

O amadurecimento dos frutos é um processo complexo do desenvolvimento envolvendo a regulação de uma série de características bioquímicas e fisiológicas, assim como alterações no metabolismo oxidativo através do importante aumento da taxa respiratória e, conseqüentemente, um aumento no acúmulo das EROS. Pesquisas evidenciaram que reações envolvendo as EROS são intrínsecas à maturação dos frutos e à senescência, uma vez que promovem processos oxidativos como a deterioração da estrutura lipídica das membranas com conseqüente perda de sua integridade, contribuindo para uma deterioração geral do metabolismo celular (JIMÉNEZ *et al.*, 2002b). Lacan e Baccou (1998) observaram em melão variedade Jerac que a peroxidação de lipídeos da membrana plasmática por radicais livres resultou em aumento do vazamento do material intracelular devido a uma maior atividade das enzimas lipolíticas. Jiménez *et al.* (2002a) mostraram que a formação de O_2^- e de H_2O_2 aumentavam durante o amadurecimento de tomate, sendo evidenciado pelo aumento nos produtos da peroxidação de lipídeos e da oxidação de proteínas. Mondal *et al.* (2004) relataram que o aumento no conteúdo de malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica, durante o amadurecimento de tomates não necessitaria estar diretamente relacionado

a atividade da enzima lipoxigenase (LOX), contudo seria melhor explicado pelas reações de oxidação não enzimáticas realizadas pelas EROS.

Figura 3 – Rotas metabólicas de formação das EROS nas células vegetais.



FONTE: BHATTACHARJEE (2005)

O estresse oxidativo tem sido definido como uma perturbação no equilíbrio dos sistemas pro-oxidante/antioxidante nas células íntegras (HASSIMOTTO; GENOVESE; LAJOLO, 2005). Desta forma, uma condição biótica ou abiótica que interrompe, restringe ou acelera o processo metabólico normal do organismo induz a uma condição de estresse (HODGES, 2003). Então, sob condições metabólicas normais, a concentração das EROS é mantida em níveis baixos devido à ação eficiente de um sistema de eliminação que incluem enzimas antioxidantes e compostos antioxidantes não enzimáticos. No entanto, em condições patológicas, as EROS acumulam-se em elevadas concentrações e induzem ao estresse oxidativo que acarreta em uma série de danos, resultando no impedimento metabólico da célula. Desta forma, os antioxidantes exercem um papel essencial não só para manter a produção e a eliminação das EROS em equilíbrio durante uma condição de não-estresse, mas também determinam o nível do estresse oxidativo (TORRES; ANDREWS, 2006). Segundo

Carmejo *et al.* (2010) em um estudo com pêssego, há um aumento em proteínas, em antioxidantes e na atividade de enzimas antioxidantes com a manutenção ou diminuição dos radicais livres reforçando a ideia de que a síntese de antioxidantes ou moduladores redox é eliciada durante o amadurecimento favorecendo a proteção contra os danos oxidativos. Assim, o aumento nos níveis das EROS durante o amadurecimento pode ser devido as alterações nos componentes antioxidantes dos frutos.

Os antioxidantes podem ser definidos como constituintes das células que as protegem contra o ataque de espécies químicas como as espécies reativas do oxigênio, retardando ou inibindo a oxidação de biomoléculas pela inibição da iniciação ou propagação das reações de oxidação em cadeia (FERREYRA, *et al.*, 2007; WANG; BALLINGTON, 2007). Ao longo do amadurecimento de frutos, as inúmeras mudanças que ocorrem são responsáveis por determinar seus atributos de qualidade e sua propriedade antioxidante. Contudo, vários fatores podem influenciar o conteúdo de compostos bioativos, como condições climáticas, genótipo, técnicas de cultivo e estágio de maturação (MENICHINI *et al.*, 2009). Estudos têm evidenciado diferenças significativas nos componentes antioxidantes e na atividade antioxidante de frutos nos seus diferentes estádios de maturação (PARK *et al.*, 2006; ZHANG; KOO; EUN, 2006) como observado em morango (LÓPEZ; GOCHICOA; FRANCO, 2010), romã (SHWARTZ *et al.*, 2009), em polpa de laranja (HUANG *et al.*, 2007) e em pimenta chili (JIMÉNEZ *et al.*, 2002b). Devido à relevância dos antioxidantes para a fisiologia dos frutos e para a nutrição humana, é importante entender a evolução de sua produção e degradação durante o desenvolvimento desses órgãos.

3.3. Mecanismos antioxidantes.

Os antioxidantes nas células podem atuar isoladamente ou combinados em diferentes mecanismos de proteção contra as EROS impedindo sua formação através da inibição de enzimas ou pela quelatação de metais, interceptando-as e reparando as lesões causadas por essas espécies químicas (BIANCHI; ANTUNES, 1999; HASSIMOTTO *et al.*, 2005).

O sistema antioxidante é constituído por componentes enzimático e não enzimático. Entre as enzimas antioxidantes incluem a dismutase do superóxido (SOD), a catalase (CAT), a peroxidase do guaiacol (G-POD) e as enzimas do ciclo ascorbato-glutationa: peroxidase do ascorbato (APX), redutases do mono e dehidroascorbato (MDHAR e DHAR) e redutase da glutatona (GR) (HUANG *et al.*, 2007) e, entre os antioxidantes não

enzimáticos podemos destacar os carotenóides, os compostos fenólicos, o α -tocoferol e o ácido ascórbico.

A enzima dismutase do superóxido (SOD), considerada a primeira linha de defesa contra injúrias mediadas por oxirradicais (ALSCHER *et al.*, 1997), é uma proteína multimérica (SCANDALIOS, 1993) pertencente ao grupo das metaloenzimas que protegem as células dos radicais superóxidos (O_2^-) catalisando a sua dismutação à oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), conseqüentemente diminuindo o risco de formação do radical hidroxila (OH \cdot), considerado o radical mais deletério agindo sobre lipídeos, proteínas e DNA através da reação de Haber-Weiss (ARORA *et al.*, 2002). A catalase (CAT), proteína tetramérica ferro-porfirínica, catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a água e oxigênio (HODGES, 2003), sendo encontrada em grandes concentrações nos peroxissomos, onde o peróxido de hidrogênio é principalmente gerado durante a fotorrespiração e a β -oxidação dos ácidos graxos (ZIMMERMANN; ZENTGRAF, 2005). A enzima peroxidase do ascorbato (APX), uma peroxidase que contém ferro como cofator (HODGES, 2003), é a mais importante enzima removedora de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido nos cloroplastos, possuindo uma alta afinidade por esta espécie química, sendo capaz de promover sua desintoxicação em baixas concentrações, enquanto que a CAT, apesar de apresentar alta taxa de reação, possui baixa afinidade pelo H_2O_2 (ZIMMERMANN; ZENTGRAF, 2005). A enzima APX catalisa a dismutação do H_2O_2 à água utilizando o ácido ascórbico (AA) como doador de hidrogênio e produzindo o ácido desidroascorbato (DHA). Para a manutenção da forma reduzida do AA, é necessário uma série de reações redox acopladas, denominado ciclo ascorbato-glutationa, que envolve além da APX, as enzimas redutase do monodesidroascorbato (MDHAR), redutase do desidroascorbato (DHAR) e a redutase da glutationa (GR), e sua presença foi descrita em diferentes compartimentos da célula, incluindo cloroplastos, mitocôndrias, citoplasma e peroxissomos (CAMEJO *et al.*, 2010).

Mudanças na atividade das enzimas antioxidantes têm sido descritas durante o amadurecimento de frutos, sendo observadas evidências contrastantes na atividade das enzimas dentro e entre espécies. Estudos com duas variedades de melão, 'Clipper' e 'Jerac', frutos com vida útil pós-colheita longa e curta, respectivamente, mostraram que os melões 'Clipper' apresentavam níveis até dez vezes mais altos de SOD e CAT do que melões 'Jerac', no pós-climatério (LACAN; BACCOU, 1998). Além disso, os autores observaram que as atividades da SOD e da CAT estavam associadas e contribuíam para o retardo da senescência na cultivar Clipper. Em experimentos com maçãs 'Fuji' e 'Golden Delicious', Masia (1998) mostrou que a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT aumentava concomitante ao

pico de etileno no climatério e decrescia no pós-climatério. O autor explicou que esse aumento era devido aos elevados níveis de radicais livres produzidos com o climatério, sendo as enzimas antioxidantes necessárias para proteger as células dos danos oxidativos e, quando os frutos da cultivar Fuji foram armazenados sob refrigeração, observou-se uma maior produção de H_2O_2 indicando um estresse oxidativo que provavelmente ativa os sistemas de defesa do fruto. Além disso, os frutos da cultivar Fuji apresentaram níveis mais baixos de SOD e CAT, o que refletiu em uma menor vida útil pós-colheita do que os da cultivar Golden Delicious. Em tomates cultivar Ailsa Craig, as atividades da SOD e CAT decresceram com o amadurecimento, assim como os níveis de seus mRNAs (JIMENEZ *et al.*, 2002a). Em estudos realizados por Wang e Jiao (2001) com amoras pretas (*Rubus* sp), foi observado um decréscimo nas atividades de SOD, CAT e peroxidases, assim como um aumento na peroxidação dos lipídeos concomitante ao amadurecimento. Torres e Andrews (2006) analisando mudanças do desenvolvimento em quatro genótipos de tomate observaram que embora as atividades das enzimas antioxidantes variassem entre os genótipos, houve um aumento com o desenvolvimento seguido por uma diminuição com o amadurecimento. Em pêssegos, Camejo *et al.* (2010) relataram aumento na atividade das enzimas envolvidas no metabolismo antioxidante junto com a manutenção ou diminuição de oxidantes como, $\cdot O_2^-$ e H_2O_2 evidenciando a proteção contra danos oxidativos durante o amadurecimento.

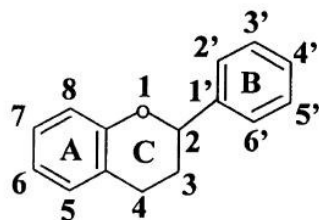
Desta forma, a perda na habilidade de remover os radicais livres durante o amadurecimento e senescência é resultado principalmente do decréscimo na atividade de enzimas antioxidantes como SOD, APX e CAT (LURIE, 2003).

As frutas possuem diferentes componentes biologicamente ativos com potencial antioxidante e estudos mostram convincentes evidências das suas propriedades benéficas para a manutenção da saúde humana e prevenção de doenças, aumentando a expectativa de vida de seus consumidores (AMES *et al.*, 1993; HUNG *et al.*, 2004; MARTINEZ-VALVERDE; PERIAGO; ROS, 2000; RICE-EVANS; MILLER, 1995; SUN *et al.*, 2002; TULIPANI *et al.*, 2011) e, de acordo com Hanamura, Hagiwara e Kawagishi (2005), os frutos tropicais são considerados de destaque na qualidade e quantidade dos compostos bioativos como antioxidantes devido à forte exposição à luz solar. Assim, quando consideramos a função dos antioxidantes na saúde humana suas características químicas incluindo, solubilidade, habilidade regenerativa, relação estrutura/atividade e biodisponibilidade, são fatores importantes (KAUR; KAPOOR, 2001). Segundo Lim, Tim e Tee (2007), os mais abundantes antioxidantes em frutas são os polifenóis e a vitamina C.

Os compostos fenólicos são largamente encontrados nos vegetais e constituem um grupo de fitoquímicos muito diversificado derivado da fenilalanina e da tirosina (ANGELO; JORGE, 2007), considerados de importância fisiológica e morfológica participando no crescimento e na reprodução, promovendo proteção contra patógenos e predadores, além de contribuírem para a qualidade sensorial de frutos e hortaliças (cor, adstringência e aroma), bem como seu equilíbrio oxidativo (ANGELO; JORGE, 2007; BALASUNDRAM *et al.*, 2006; BRAVO, 1998). Quimicamente, os compostos fenólicos possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais e, devido à diversidade estrutural, o grupo dos compostos fenólicos é frequentemente referido como polifenóis (ANGELO; JORGE, 2007; BALASUNDRAM *et al.*, 2006; ROBARDS *et al.*, 1999). A atividade antioxidante dos polifenóis é principalmente atribuída a sua propriedade redox, a qual permite uma importante função na adsorção e neutralização de radicais livres, na eliminação do oxigênio *singlet* e *triplet* e na decomposição de peróxidos (WANG; BALLINGTON, 2007) e o seu potencial antioxidante depende do número e arranjo dos grupos hidroxilas e do grau de conjugação estrutural, assim como da presença de substituintes oxidantes e redutores na estrutura do anel e do nível de glicosilação (BORS *et al.*, 1990; KAUR; KAPOOR, 2001; RICE-EVANS *et al.*, 1995). Entre os polifenóis, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis, como os mais comuns antioxidantes fenólicos encontrados em frutas e hortaliças (KING; YOUNG, 1999).

Os flavonóides, principalmente antocianinas e flavonóis, atuam nas plantas atraindo polinizadores e disseminadores de sementes e sua estrutura é baseada no núcleo que consiste de dois anéis fenólicos A e B e um anel C (Figura 3), que pode ser um pirano heterocíclico, como no caso de flavanóis (catequinas) e antocianidinas, ou pirona, como nos flavonóis, flavonas, isoflavonas e flavanonas, que possuem um grupo carbonila na posição C4 do anel C, compreendendo as principais classes dos flavonóides (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

Figura 4 - Estrutura química básica dos flavonóides.

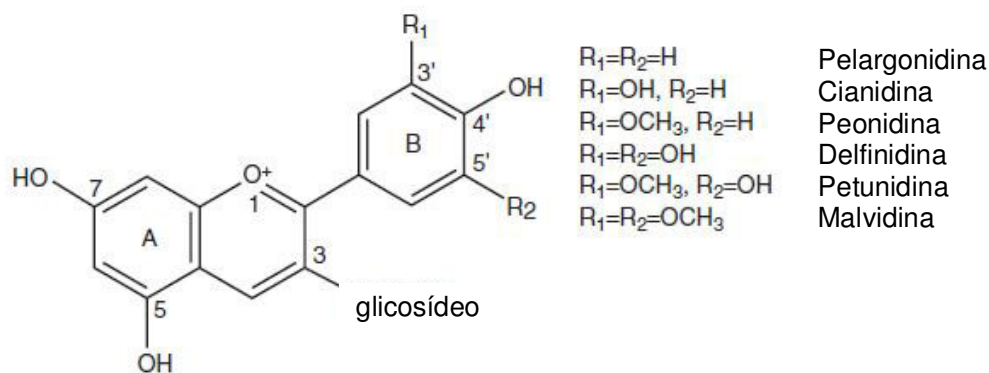


FONTE: HEIM *et al.* (2002).

Os flavonóides exibem muitas atividades biológicas, incluindo antialérgica, antiviral, antitumoral, antiinflamatória e antioxidante, as quais dependem da sua estrutura química e dos vários substituintes da molécula, uma vez que a estrutura básica pode sofrer uma série de modificações, tais como, glicosilação, esterificação, amidação, hidroxilação, entre outras alterações, que irão modular a polaridade, toxicidade e direcionamento intracelular destes compostos (HASSIMOTTO; GENOVESE; LAJOLO, 2005; HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008). Assim, os flavonóides vêm despertando um grande interesse devido estudos demonstrarem que uma dieta rica nestes compostos está associada ao baixo risco de doenças cardiovasculares e câncer (HERTOG; FESKENS; KROMHOUT, 1997; NEUHOUSER, 2004).

As antocianinas são pigmentos responsáveis por grande parte da atrativa coloração vermelha, azul e roxa das frutas, flores e hortaliças e consistem em glicosídeos de polihidroxi e polimetoxi derivados do 2-fenilbenzopirílium ou sais flavílium encontradas nos alimentos, principalmente como glicosídeos e acilglicosídeos de seis comuns agliconas de antocianidinas: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina (BRITO *et al.*, 2007; KONG *et al.*, 2003) (Figura 4).

Figura 5 – Estrutura química geral das antocianinas.



FONTE: DURST; WROLSTAD (1994).

Nos últimos anos, o interesse por esse pigmento se intensificou uma vez que pesquisas demonstraram que as antocianinas e suas respectivas agliconas são compostos bioativos que possuem atividade antioxidante, pois sua estrutura química possibilita a doação

de elétrons ou de átomos de hidrogênio dos grupos hidroxilas para os radicais livres (KÄHKÖNEN; HEINONEM, 2003; PRIOR, 2003), sendo a sua atividade antioxidante dependente dos grupos hidroxilas nas posições 3' e 4' do anel B (Figura 3), os quais conferem elevada estabilidade ao radical formado (HARBORNE; WILLIAMS, 2000; SÁNCHEZ-MORENO, 2002). Assim, estudos evidenciam a importância desses compostos para a saúde humana, o que pode estar relacionado ao seu forte potencial antioxidante e, entre os benefícios associados com a ingestão de antocianinas incluem a redução do risco de doenças cardiovasculares (SUMNER *et al.*, 2005) e proteção contra obesidade e hipoglicemia (JAYAPRAKASAM *et al.*, 2006). Contudo, as antocianinas são altamente instáveis e muito suscetíveis à degradação, sendo sua estabilidade afetada por diversos fatores, como pH, temperatura, estrutura, concentração, luz, oxigênio, enzimas, a presença de flavonóides, de proteínas e de íons metálicos (CHITARRA; CHITARRA, 2005; LIMA *et al.*, 2002).

A vitamina C é uma das vitaminas mais importantes para a nutrição humana, a qual é fornecida pelas frutas e hortaliças, e tem o ácido L-ascórbico como sua principal forma biologicamente ativa (HERNÁNDEZ; LOBO; GONZÁLEZ, 2006). O ácido ascórbico é largamente distribuído nas células vegetais onde exerce muitas funções cruciais no crescimento e metabolismo, estando envolvido no ciclo celular e em outros mecanismos do crescimento e divisão da célula, além de atuar como cofator para muitas enzimas. Enquanto no organismo humano essa vitamina participa na formação do tecido conjuntivo (produção e manutenção do colágeno), no transporte de íons, na cicatrização, na redução da suscetibilidade a infecções, na formação dos dentes e ossos, na absorção do ferro e prevenção do escorbuto (BARATA-SOARES *et al.*, 2004; GOMEZ; LAJOLO, 2008; MAIA *et al.*, 2007).

O ácido ascórbico é um potente antioxidante, apresentando elevada capacidade para eliminar diferentes espécies reativas do oxigênio, e a sua atividade antioxidante é devido a sua facilidade de doar elétrons, o que o torna um agente redutor muito eficaz nos sistemas biológicos (HERNÁNDEZ; LOBO; GONZÁLEZ, 2006; KAUR; KAPOOR, 2001).

O conteúdo de vitamina C varia muito dependendo de diversos fatores, tais como espécie, variedade e condições de cultivo e colheita, além do amadurecimento podendo aumentar ou diminuir como observado na goiaba e na manga, respectivamente (GOMEZ; LAJOLO, 2008). Contudo, dependendo do fruto, o conteúdo do ácido ascórbico tende a diminuir com a maturação e a sua degradação oxidativa pode ser resultante da ação direta da enzima oxidase do ascorbato (AO) ou pela ação da enzima peroxidase do ascorbato (APX) (BARATA-SOARES *et al.*, 2004; CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Em estudos realizados com pimenta cultivar Habanero, Menichini *et al.* (2009) observaram um maior conteúdo de polifenóis em frutos no estágio imaturo (782 mg de equivalente de ácido clorogênico) quando comparado maduro (759 mg de equivalente de ácido clorogênico), sendo responsáveis pela elevada atividade antioxidante notada nesse estágio de maturação. No entanto, as pimentas maduras apresentaram um maior potencial antioxidante do que as imaturas e os autores relacionaram isso com o elevado conteúdo de carotenóides e capsaicina nesse estágio de maturação. Righetto *et al.* (2005) estudaram a polpa processada de acerola imatura e madura e observaram que o extrato do fruto imaturo apresentou maior atividade antioxidante com 72% de inibição da formação de hidroperóxidos contra 68% dos frutos maduros. Em estudos sobre a capacidade antioxidante e acúmulo de fitoquímicos de cerejas em quatro estágios de maturação, Çelik *et al.* (2008) observaram que algumas propriedades químicas e a capacidade antioxidante desses frutos são afetados pelo estágio de maturação. Com o processo de maturação, as cerejas apresentaram uma diminuição do conteúdo de polifenóis e ácido ascórbico, porém um aumento do conteúdo de antocianinas, sendo os frutos verdes os que apresentaram maior capacidade antioxidante.

As alterações nos constituintes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos durante o amadurecimento vêm sendo estudadas em várias espécies, no entanto há ainda uma deficiência de informações sobre o comportamento desse sistema de defesa em frutos tropicais.

3.4. Espécies tropicais estudadas

3.4.1. Acerola (*Malpighia emarginata* D.C)

A acerola (*Malpighia emarginata* D.C) é um fruto proveniente da América Central e tem sido propagada na América do Sul, incluindo o Brasil devido a sua boa adaptação ao solo e clima (VENDRAMINI; TRUGO, 2000), e recentemente em áreas subtropicais incluindo o sudeste da Ásia e Índia (HANAMURA; UCHIDA; AOKI, 2008).

No Brasil, a acerola foi introduzida em 1950 na região Nordeste, através da Universidade Federal Rural de Pernambuco com sementes trazidas de Porto Rico (SOUZA *et al.*, 2006). O cultivo da aceroleira intensificou-se rapidamente no Brasil no período de 1988 a 1992 devido ao interesse pelo fruto por parte dos consumidores, industriais e exportadores (ARAÚJO *et al.*, 2007). Nesse momento surgiu um grande interesse no desenvolvimento de variedades adaptadas ao solo e as condições climáticas com elevada produção de frutos de excelente qualidade e, na década de 90 a Embrapa Agroindústria Tropical e outras instituições

brasileiras de pesquisa iniciaram programas de melhoramento genético da aceroleira para produzir clones de alta qualidade (ALVES *et al.*, 2008; SAMPAIO *et al.*, 2009). Através do programa de melhoramento genético da aceroleira realizado pela Embrapa Agroindústria Tropical, com base no desempenho das características morfológicas da planta, de produção e qualidade dos frutos foram selecionados e recomendados para o plantio comercial os clones: BRS 235 ou Apodi, maior rendimento e peso, BRS 236 ou Cereja, elevado conteúdo de vitamina C, BRS 237 ou Roxinha, polpa com coloração vermelha e BRS 238 ou Frutacor, elevado conteúdo de vitamina C e de sólidos solúveis (Figura 6) (PAIVA *et al.*, 2003).

Atualmente, o Brasil se destaca como o principal produtor, consumidor e exportador de acerola com algumas das maiores plantações de aceroleira localizadas, particularmente, na região Nordeste do país (DE ASSIS *et al.*, 2008; DE ROSSO, *et al.*, 2008). Nesta região, os estados que se detacam na produção de acerola são Bahia, Ceará, Pernambuco e Rio Grande do Norte, juntos processam aproximadamente 35 mil toneladas de acerola por ano, volume que rende algo em torno de 18 mil litros de suco e polpa destinados, principalmente para o Japão, a Europa e os Estados Unidos (FRANCO, 2008).

De acordo com o Instituto Agropolos do Ceará, a fruticultura se tornou um item importante na pauta das exportações, representando, em 2008, o terceiro maior índice de crescimento (67,7%) entre os principais produtos do agronegócio cearense, sendo a acerola uma das principais cadeias produtivas no Estado. Segundo o Grupo de Coordenação de Estatística Agropecuária do Ceará (GCEA) (IBGE, 2011), o Ceará produziu no mês de outubro de 2011 mais de treze mil toneladas de acerola com um rendimento médio de 7.175 kg/ha. A Tabela 1 apresenta os principais municípios produtores de acerola no Estado do Ceará.

O interesse dos consumidores e dos produtores de acerola e de seus derivados aumentou no Brasil e em todo o mundo (DE ASSIS; LIMA; DE FARIA OLIVEIRA, 2001). Seu agradável sabor e aroma, além de características tais como, fácil cultivo e grande capacidade de aproveitamento industrial, viabiliza a elaboração de vários produtos (FREITAS *et al.*, 2006). No Brasil, a acerola é principalmente comercializada como fruta *in natura*, polpa congelada e suco pasteurizado (MEZADRI *et al.*, 2008). No Japão, a acerola é utilizada na produção de suco, refrigerantes, gomas e licores. Na Europa, principalmente Alemanha, França, Bélgica e Hungria, extratos de acerola são utilizados para enriquecer sucos de pêra e maçã. Nos Estados Unidos, seu principal uso tem sido na indústria farmacêutica (DE ASSIS *et al.*, 2008). Devido à existência de um excelente mercado para derivados de frutas, a exportação da acerola é uma potencial fonte alternativa de renda para as empresas agrícolas.

Figura 6 – Frutos e plantas dos quatro clones de aceroleira: BRS 235 (1), BRS 236 (2), BRS 237 (3) e BRS 238 (4).



FONTE: PAIVA (2003).

Tabela 1 – Principais municípios produtores de frutos de aceroleira no Estado do Ceará.

Município	Produção (t)
Ubajara	2.325
Jaguaruana	1.034
Maranguape	720
Baturité	651
Boa Viagem	580

Fonte: GCEA – IBGE (2011)

Segundo Carrington e King (2002), a acerola é um fruto tropical com comportamento respiratório consistente ao de frutos climatéricos com a evolução do etileno seguindo padrão semelhante com o pico climatérico, o qual ocorre 2 a 4 dias após a colheita. Devido uma taxa respiratória extremamente elevada ($900 \text{ mL CO}_2 \text{ kg}^{-1}\text{h}$), esse fruto apresenta rápida atividade metabólica e maturação, conseqüentemente, a acerola é um produto de vida útil pós-colheita curta, 2 a 3 dias em temperatura ambiente (DE ASSIS *et al.*, 2008; VENDRAMINI; TRUGO, 2000), o que promove uma rápida diminuição da sua qualidade, caracterizada por mudanças significativas na cor, aroma, sabor e, principalmente, textura.

Na acerola, bem como em outras frutas tropicais, várias alterações ocorrem durante a maturação, o amadurecimento e a senescência. O processo de amadurecimento da acerola envolve uma sucessão de complexas reações bioquímicas incluindo, hidrólise do amido, degradação da clorofila, produção de carotenóides, antocianinas e fenólicos, formação de compostos voláteis, diminuição da acidez, aumento dos açúcares redutores e, principalmente, diminuição do conteúdo de ácido ascórbico (ASSIS *et al.*, 2008; RIGHETTO; NETTO; CARRARO, 2005). Todas essas reações são importantes para as características de qualidade da acerola madura, cuja polpa é muito suculenta e refrescante apresentando sabor doce (MEZADRI *et al.*, 2008).

A acerola contém tiamina, riboflavina, niacina, proteínas e sais minerais, principalmente, ferro, cálcio e fósforo (DE ASSIS; LIMA; DE FARIA OLIVEIRA, 2001; BADEJO *et al.*, 2007), e é bem conhecida por ser uma das melhores fontes naturais de vitamina C, $1137\text{-}1667 \text{ mg. } 100 \text{ g}^{-1}$ (OLIVEIRA *et al.*, 2011), e desta forma, tem se tornado extremamente popular na dieta de pessoas preocupadas com a saúde, como um notável alimento funcional, competindo no setor de mercado de consumidores que preferem os

produtos naturais, pois quando comparado ao ácido ascórbico sintético, a vitamina C produzida pela acerola é melhor absorvida pelo organismo humano (DE ASSIS *et al.*, 2008; HANAMURA; HAGIWARA; KAWAGISHI, 2005). Em adição, a vitamina C proveniente da acerola pode ser utilizada para a produção de concentrado dessa vitamina para fins farmacêuticos ou enriquecimento de alimentos industrializados.

Recentes estudos evidenciaram que além da vitamina C, a acerola possui elevado conteúdo de outros constituintes funcionais como carotenóides e polifenóis (HANAMURA; HAGIWARA; KAWAGISHI, 2005; LIMA *et al.*, 2005; MEZADRI *et al.*, 2008) conhecidos por suas propriedades antioxidantes na saúde humana, bem como seus efeitos no retardo e/ou prevenção da oxidação de alimentos (NEUHOUSER, 2004). Segundo Lima *et al.* (2005), o conteúdo de carotenóides em acerola está presente entre 3,2 e 406 mg. kg⁻¹ e, em relação aos flavonóides, as antocianinas (37,9-597,4 mg. kg⁻¹) e os flavonóis (70-185 mg. kg⁻¹) são os principais componentes (LIMA *et al.*, 2003). Vendramini e Trugo (2000) identificaram quercetina, kaempferol e ácidos fenólicos, como p-cumárico, ferúlico, caféico e clorogênico. Brito *et al.* (2007) identificaram cianidina 3-ramnosídeo e pelargonidina 3-ramnosídeo como principais antocianinas em acerola. Hanamura, Hagiwara e Kawagishi (2005) também identificaram cianidina e pelargonidina como antocianinas, além de um flavonol (quercetina 3-ramnosídeo). O elevado conteúdo de compostos antioxidantes tem contribuído para o uso da acerola como um remédio contra gripes e resfriados, distúrbios pulmonares, doenças do fígado, irregularidades da vesícula biliar e, em doses maiores, efeito benéfico sobre hepatite viral, varicela, bem como poliomielite (DE ASSIS; LIMA; DE FARIA OLIVEIRA, 2001), efeito hepatoprotetor (NAGAMINI *et al.*, 2004) e antihiperglicêmico (HANAMURA; HAGIWARA; KAWAGISHI, 2005). Além disso, extratos de acerola têm sido utilizados na prevenção de doenças relacionadas ao envelhecimento, como hipertensão e câncer (HWANG; HODIS; SEVANIAN, 2002).

A presença desses constituintes bioativos confere a acerola considerável capacidade antioxidante, tornando-a uma das mais importantes frutas para consumo humano (RUFINO *et al.*, 2010) e o seu apelo natural como produto vinculado à saúde tende a ampliar a sua importância tanto no mercado nacional quanto internacional, bem como sua utilização pelas indústrias alimentícia e farmacêutica vem aumentando progressivamente as áreas de plantios de aceroleiras para fins comerciais (CECÍLIO *et al.*, 2009).

3.4.2. Sapoti (*Manilkara zapota* L.)

O saptizeiro (*Manilkara zapota* L.) é nativo do sul do México e da América Central e, se disseminou por toda a América tropical, Caribe, América do Sul e nas regiões mais quentes do sul dos Estados Unidos (BANDEIRA *et al.*, 2003). É uma planta bem adaptada às condições edafoclimáticas de praticamente todo o Brasil, contudo adaptou-se melhor na região Nordeste, que apresenta altas temperaturas e umidade que favorecem o seu crescimento e produção (BANDEIRA *et al.*, 2003; MIRANDA *et al.*, 2002; MIRANDA *et al.*, 2008).

No Brasil, a primeira cultivar foi desenvolvida em 1983, a ‘Itapirema-31’, seguida pela ‘Chocolate’ em 1999, ambas estabelecidas por pesquisadores da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA. Após 10 anos de pesquisa, em 2003, através de estudos de melhoramento genético realizados pela EMBRAPA – Agroindústria Tropical, utilizando materiais obtidos junto ao IPA, foram lançadas as cultivares de sapoti Sapota Tropical (BRS 228) e Sapoti Ipa-Curu (BRS 227). Apesar de serem de uma mesma espécie (*Manilkara zapota* L.), apresentam diferenças em relação ao tamanho e formato, o sapoti é menor e possui forma ovalada, enquanto a sapota tem formato redondo e maior tamanho (Figura 8) (MIRANDA *et al.*, 2003; MORAIS *et al.*, 2006)

Figura 7 – Frutos do saptizeiro com formatos globoso, cultivar Sapota Tropical (A), e oblongo, cultivar Sapoti Ipa-Curu (B).



FONTE: OLIVEIRA (2012).

O cultivo do sapotizeiro vem ganhando atenção de produtores e consumidores em diversos países. A Índia é considerada o maior produtor mundial e sua produção continua crescendo, graças a um ativo programa de pesquisa no país para melhorar técnicas de armazenamento, transporte e estratégias de marketing. Embora não se disponham de dados estatísticos mundiais com relação à produção e comercialização de sapoti, os maiores produtores estão distribuídos pela faixa intertropical do globo, destacando-se a América Central, países asiáticos e o Brasil. Sendo variedades estritamente tropicais, os frutos são tolerantes à seca e se adaptam a uma grande variedade de solo. No Brasil, a região Nordeste é responsável pela maior parte da produção e no Estado do Ceará, a produção se concentra na região metropolitana de Fortaleza, sendo principalmente proveniente de plantios domésticos. Contudo, essa situação está sendo revertida com o incentivo à pesquisa visando à seleção de plantas, identificação das melhores condições de cultivo do sapotizeiro e esclarecimento de sua fisiologia (MIRANDA *et al.*, 2002; MORAIS *et al.*, 2006). Seu agradável aroma e sabor adocicado, além de características sensoriais de excelente aceitação, favorecem o aproveitamento industrial do sapoti, viabilizando a elaboração de vários produtos. Nos vários países onde o sapoti é produzido, essa fruta é consumida principalmente *in natura* ou na forma de polpa congelada, suco, sorvete, doces, compotas e geléias (ALVES; FILGUEIRAS; MOURA, 2000; MIRANDA *et al.*, 2002).

O sapoti apresenta padrão respiratório consistente ao de frutos climatéricos, sendo caracterizado por um aumento brusco na atividade respiratória concomitante a produção de etileno (MIRANDA, 2002; MORAIS, 2005). Sua taxa respiratória é de 27 mL CO₂. kg⁻¹h e, portanto, seu amadurecimento sob condição ambiente é rápido, levando a uma vida útil pós-colheita curta de 8 a 10 dias (MORAIS *et al.*, 2008), promovendo diminuição da sua qualidade, caracterizada por mudanças significativas no aroma, sabor e, principalmente, textura. Durante o processo de amadurecimento do sapoti ocorre uma sucessão de complexas reações bioquímicas incluindo degradação dos carboidratos constituintes da parede celular, do amido e do látex, diminuição do conteúdo de fenólicos e da acidez (MIRANDA, 2002; MORAIS, 2005), embora o amaciamento da polpa seja a mudança mais evidente, pois não há alteração visível na cor da casca (BAEZ *et al.*, 1997).

O sapoti contém cálcio, ferro, fósforo, niacina, vitaminas B1 e B2 e vitamina C, embora não seja considerado uma boa fonte nutricional dessa vitamina (BRITO; NARAIN, 2002). Contudo, estudos têm relatado o alto conteúdo de fenólicos antioxidantes em sapotis imaturos, conhecidos por suas propriedades antioxidantes na saúde humana, bem como seus efeitos no retardo e/ou prevenção da oxidação de alimentos (NEUHOUSER, 2004), os quais

contribuem para a extremamente elevada atividade antioxidante desses frutos. Estudos anteriores relataram a presença de catequina, epicatequina, leucocianidina, leucodelfinidina, leucopelargonidina, ácido clorogênico e ácido gálico em frutos de sapoti imaturo, enquanto nos frutos maduros foi relatada a presença do ácido 5-cafeoilquínico na casca ($94,6 \pm 9,50$ mg. kg^{-1} polpa) e na polpa ($32,1 \pm 18,7$ mg. kg^{-1} polpa) (MATHEW; LAKSHMINARAYANA, 1969; PONTES *et al.*, 2002).

Leong e Shui (2002) analisaram a capacidade antioxidante de frutas obtidas no mercado de Singapura, entre elas o sapoti, o qual apresentou a maior atividade antioxidante entre os frutos estudados. Em estudo realizado por Ma *et al.* (2003), dois fenólicos derivados do ácido clorogênico foram isolados em saptis maduros e em estudos posteriores relataram o elevado potencial antioxidante desses fenólicos, bem como o seus efeitos citotóxicos *in vitro* contra células cancerosas do cólon humano. Desta forma, a presença do elevado conteúdo de fenólicos antioxidantes conferem ao sapoti considerável atividade antioxidante, tornando-o um fruto importante na prevenção de doenças degenerativas associadas ao estresse oxidativo, como doenças cardiovasculares (SHUI; WONG; LEONG, 2004)

REFERÊNCIAS

- ALSCHER, R.G.; DONAHUE, J.L.; CRAMER, C.L. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. **Physiologia Plantarum**. v. 100, p. 224-233, 1997.
- ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; RUFINO, M.S.M.; SAMPAIO, C.G. Antioxidant activity measurement in tropical fruits: a case study with acerola. **Acta Horticulturae**. v. 773, p. 299-306, 2008.
- ALVES, R.E.; FILGUEIRAS, H.A.C.; MOURA, C.F.H. Sapoti. In: **Caracterização de frutas nativas da América Latina**. Jaboticabal FUNEP, 2000, p. 55-58. (Série Frutas Nativas).
- AMES, B.M.; SHIGENA, M.K.; HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy Sciences**. v. 90, p. 7915-7922. 1993.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Instituto Adolfo Lutz**. v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007
- ARAÚJO, P.G.L.; FIGUEREDO, R.W.; ALVES, R.E.; MAIA, G.A.; PAIVA, J.R. β -carotene, ascorbic acid and total anthocyanins in fruit pulp of the acerola tree conserved by the cold for 12 months. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**. v. 27, n. 1, p. 104-107, 2007.
- ARORA, A.; SAIRAM, R.K.; SRIVASTAVA, G.C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, v. 82, p. 1221-1235, 2002.
- BAEZ, M.A.; SILLER, J.H.; HEREDIA, J.B.; PORTILLO, T.; ARAIZA, E.; GARCIA, R.S.; MUY, M.D. Fisiologia poscosecha de frutos de chicozapote (*Achras zapota* L.) durante condiciones de mercadeo. **Proceedings of Interamerican Society for Tropical Horticulture**. v. 41, p. 209-214, 1997.
- BADEJO, A.A.; JEONG, S.T.; GOTO-YAMAMOTO, N.; ESAKA, M. Cloning and expression of GDP-D-mannose pyrophosphorylase gene and ascorbic acid content of acerola (*Malpighia glabra* L.) fruit at ripening stages. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 45, p. 665-672, 2007.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence and potencial uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.
- BANDEIRA, C.T.; MESQUITA, A.L.M.; CAVALCANTE JR, A.T.; SANTOS, F.J.S.; OLIVEIRA, F.N.S.; NETO, J.S.; BARROS, L.M.; SOBRINHO, R.B.; LIMA, R.N.; OLIVEIRA, V.H. **O cultivo do sapotizeiro**. Fortaleza: Embrapa-CNPAT, 2003. 20p. (Circular Técnica ,13).
- BARATA-SOARES, A.D.; GOMEZ, M.L.P.A.; MESQUITA, C.H.; LAJOLO, F.M. Ascorbic acid biosynthesis: a precursor study on plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, n. 3, p. 147-154, 2004.

- BARRY C.S.; GIOVANNONI J.J. Ethylene and fruit ripening. **Plant Growth Regulation**. v. 26, p. 143-159, 2007
- BHATTACHARJEE, S. Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plants. **Current Science**, v. 89, n. 7, p. 1113-1120, 2005.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidant: determination of radical scavenging efficiencies. **Methods in Enzymology**. v. 186, p. 343-355, 1990.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**. v. 56, p. 317-333, 1998.
- BRITO, E.S.; ARAÚJO, M.C.P.; ALVES, R.E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B.A.; NOVOTNY, J.A. Anthocyanins present in selected tropical fruits: Acerola, Jambolão, Jussara e Guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, p. 9389-9394, 2007.
- BRITO, E. S.; NARAIN, N. Physical and chemical characteristics of sapota fruit at different stages of maturation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 37, n. 4, p. 567-572, 2002.
- CAMEJO, D.; MARTÍ, M.C.; ROMÁN, P.; ORTIZ, A.; JIMÉNEZ, A. Antioxidant system and proteína pattern in peach fruits at two maturation stages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, p.11140-11147, 2010.
- CARRINGTON, C.M.S.; KING, R.A.G. Fruit development and ripening in Barbados cherry, *Malpighia emarginata* D.C. **Scientia Horticulturae**. v. 92, p. 1-7, 2002
- CECÍLIO, R.A.; MEDEIROS, S.S.; PEZZOPANE, J.E.M.; GARCIA, G.O. Elaboração de zoneamento agoclimático da região nordeste para a cultura de acerola. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 4, p. 26-32, 2009.
- CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2º. ed. Lavras: UFLA, 2005, 785p.
- ÇELIK, H.; ÖZGEN, M.; SERÇE, S.; KAYA, C. Phytochemical accumulation and antioxidante capacity at four maturity stages of cranberry fruit. **Scientia Horticulturae**. v. 117, p.345-348, 2008.
- DE ASSIS, S.A.; LIMA, D.C.; DE FARIA OLIVEIRA, O.M.M. Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development. **Food Chemistry**. v. 74, p. 133-137, 2001.
- DE ASSIS, S.A.; FERNANDES, F.P.; MARTINS, A.B.G.; FARIA OLIVEIRA, O.M.M. Acerola: importance, culture conditions, production and biochemical aspects. **Fruits**. v. 63, p. 93-101, 2008.
- DE ROSSO, V.V.; HILLEBRAND, S.; MONTILLA, E.C.; BOBBIO, F.O.; WINTERHALTER, P.; MERCADANTE, A.Z. Determination of anthocyanins from acerola

(*Malpighia emarginata* D.C) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 21, p. 291-299, 2008.

DURST, R.W.; WROLSTAD, R.E. **Separation and characterization of anthocyanins by HPLC**. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, Oregon State University Corvallis, Oregon, 1994, 13p.

FERREYRA, R.M.; VIÑA, S.Z.; MUGRIDGE, A. CHAVES, A.R. Growth and ripening season effects on antioxidant capacity of strawberry cultivar Selva. **Scientia Horticulturae**. v. 112, p. 27-32, 2007.

FONSECA, S.; Jr. HACKLER, L.; ZVARA, A.; FERREIRA, S.; BALDÉ, A.; DUDITS, D.; PAIS, M.S.; PUSKÁS, L.G.; Monitoring gene expression along pear fruit development, ripening and senescence using cDNA microarrays. **Plant Science**. v. 167, p.457-469, 2004.

FRANCO, L. Vermelho esperança. Revista Globo Rural. Edição:269 – Mar /2008. Editora Globo. Disponível em: <[http:// revistagloborural.com.br](http://revistagloborural.com.br)> Acesso em Fev/2010.

FREITAS, C.A.S.; MAIA, G.A.; COSTA, J.M.C.; FIGUEREDO, R..W.; SOUSA, P.H.M. Acerola: production, composition, nutritional aspects and products. **Revista Brasileira de Agrociência**. v. 12, n. 4, p. 395-400, 2006.

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

GIOVANNONI, J.J. Genetic regulation of fruit development and ripening. **The Plant Cell**. v. 16, p.170-180, 2004.

GOMEZ, M.L.P.A.; LAJOLO, F.M. Ascorbic acid metabolism in fruits: Activity of enzymes involved in synthesis and degradation during ripening in mango and guava. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 88, p. 756-762, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 2°. ed Oxford University Press. Oxford, 1989. p. 379-386.

HANAMURA, T.; HAGIWARA, T.; KAWAGISHI, H. Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* D.C) fruit. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**., v. 69, p. 280-286, 2005.

HANAMURA, T; USHIDA, E; AOKI, H. Changes of the composition in acerola (*Malpighia emarginata* D.C) fruit in relation to cultivar, growing region and maturity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 88, p. 1813–1820, 2008.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonóides research since 1992. **Phytochemistry**. v. 55, p. 481-504, 2000.

HASSIMOTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO,F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p. 2928-2935, 2005.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 53, p. 1984-1989, 2002.

HERNÁNDEZ, Y.; LOBO, M.G.; GONZÁLES, M. Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. **Food Chemistry**, v. 96, p. 654-664, 2006.

HERTOG, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; KROMHOUT, D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. **The Lancet**. v.349, p.699-699, 1997.

HODGES, D.M. **Postharvest oxidative stress in horticultural crops**. New York: Food Products Press, 2003. 266 p.

HUANG, R.; XIA, R.; R.H.; HU, L.; LU, Y.; WANG, M. Antioxidant activity and oxygenscavenging system in orange pulp during fruit ripening and maturation. **Scientia Horticulturae**, v. 113, p. 166 - 172, 2007.

HUBER, L.S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Flavonóis e flavonas: Fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of Food and Nutrition**. v. 19, n. 1, p. 97-108, 2008.

HUNG, H.C.; JOSHIPURA, K.J.; JIANG, R.; HU, F.B.; HUNTER, D.; SMITH-WARNER, S.A.; COLDITZ, G.A.; ROSNER, B.; SPIEGELMAN, D.; WILLETT, W.C. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 96, p. 1577–1584, 2004.

HWANG, J.; HODIS, H.N.; SEVANI, A. Soy and alfalfa extracts become potent low-density lipoprotein antioxidants in the presence of acerola cherry extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, p. 308-314, 2002.

JAYAPRAKASAM, B.; OLSON, L.K.; SCHUTZKI, R.E.; TAI, M.H.; NAIR, M.G. Amelioration of obesity and glucose intolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in cornelian cherry (*Cornus mas*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, n. 1, p. 243-248, 2006.

JIANG Y; FU J. Ethylene regulation of fruit ripening: molecular aspects. **Plant Growth Regulation**. v. 30, p. 193–200, 2000.

JIMÉNEZ, A.; CREISSEN, G.; KULAR, B.; FIRMIN, J.; ROBINSON, S.; VERHOEYEN, M.; MULLINEAUX, P. Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. **Planta**, v. 214, p. 751-758, 2002a.

JIMÉNEZ, A.; GÓMEZ, J.M.; NAVARRO, E.; SEVILLA, F. Changes in the antioxidative systems in mitochondria during ripening of pepper fruits. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 515-520, 2002b.

KÄHKÖNEN, M.P.; HEINONEM, M. Antioxidant activity of anthocyanins present in fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 628-633, 2003.

KAUR, C.; KAPOOR, H.C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium’s health. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 36, p. 703-725, 2001.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 50, p. 213-218, 1999.

KONG, J.M.; CHIA, L.S.; GOH, N.K.; CHIA, T.F.; BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**. v. 64, p.923-933, 2003.

LEONG, L.P.; SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in the Singapore markets. **Food Chemistry**. v. 76, p. 69-75, 2002.

LIM, Y.Y.; LIM, T.T.; TEE, J.J. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. **Food Chemistry**. v. 103, p. 1003-1008, 2007.

LIMA, V.L.A.G.; MELO, E.A.; LIMA, L.S.; LIMA, D.E.S. Polpa congelada de acerola: efeito da temperatura sobre os teores de antocianinas e flavonóis totais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, p. 669-670, 2002.

LIMA, V.L.A.G.; MÉLO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; PRAZERES, F.G.; MUSSER, R.S.; LIMA, D.E.S. Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. **Food Chemistry**. v. 90, p. 565-568, 2005.

LÓPEZ, A.P.; GOCHICOA, M.T.N.; FRANCO, A.R. Activities of antioxidant enzymes during strawberry fruit development and ripening. **Biologia Plantarum**. v. 54, n. 2, p.349-352, 2010.

LURIE, S. **Antioxidants**. In: Hodges, D.M. Postharvest oxidative stress in horticultural crops. New York: Food Products Press p. 131-150, 2003.

MA, J.; LUO, X.D.; PROTIVAS, P.; YANG, H.; MA, C.; BASILE, M.J.; WEINSTEIN, J.B.; KENNELLY, E.J. Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manilkara zapota* (sapodilla). **Journal of Natural Products**. v. 66, n. 7, p. 69-75, 2003.

MAIA, G.A.; SOUSA, P.H.M.; SANTOS, G.M.; SILVA, D.S.; FERNANDES, A.G.; PRADO, G.M. Efeito do processamento sobre componentes do suco de acerola. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 130-134, 2007.

MARTINEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M.J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Archivos Latinoamericanos de Nutrição, Caracas**. v. 50, n. 1, p. 5-18, 2000.

MATHEW, A.G.; LAKSHMINARAYANA, S. Polyphenols of immature sapota fruit **Phytochemistry**. v. 8, p. 507-509, 1969.

MENICHINI, F; TUNDIS, R; BONESI, M; LOIZZO, M.R; CONFORTI, F; STATTI, G; DE CINDIO, B; HOUGHTON, P.J; MENICHINI, F. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. **Food Chemistry**, v. 114, p. 553-560, 2009.

MEZADRI, T.; VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* D.C) fruits and derivatives. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 21, p. 282-290, 2008.

MIRANDA, M.R.A. **Alterações fisiológicas e histológicas durante o desenvolvimento, maturação e armazenamento refrigerado do sapoti**. 2002. 136p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MIRANDA, M.R.A., BENBADIS, A.K., FILGUEIRAS, H.A.C., ALVES, R.E. Alterações físicas e químicas durante o desenvolvimento e maturação do sapoti. **Proceedings of Interamerican Society for Tropical Horticulture**. v. 47, p. 259-261, 2003.

MIRANDA, M.R.A., FILGUEIRAS, H.A.C., ALVES, R.E., SOARES, A.A., BENBADIS, A.K. Physico-chemical and histological characterization of the development of sapodilla. **Revista Ciência Agronômica**. v. 39, n. 4, p. 575-582, 2008.

MIRANDA, M.R.A; SILVA, F.S; ALVES, R.E; FILGUEIRAS, H.A.C; ARAÚJO, N.C.C. Armazenamento de dois tipos de sapoti sob condição de ambiente. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 24, n. 3, p. 644-646, 2002.

MONDAL, K.; SHARMA, N.S.; MALHOTRA, S.P.; DHAWAN, K.; SINGH, R. Antioxidant systems in ripening tomato fruits. **Biologia Plantarum**. v. 48, n. 1, p. 49-53, 2004.

MORAIS, P.L.D. **Qualidade e bioquímica de parede celular de sapoti (*Manilkara zapota* L.) Von Royen submetido ao metilciclopropeno**. 2005, 144p. Tese (Doutorado Fisiologia vegetal), Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

MORAIS, P.L.D.; LIMA, L.C.O.; ALVES, R.E.; FILGUEIRAS, H.A.C.; ALMEIDA, S.A. Alterações físicas, fisiológicas e químicas durante o armazenamento de duas cultivares de sapoti. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 41, p. 549-554, 2006.

MORAIS, P.L.D; MIRANDA, M.R.A; LIMA, L.C.O; ALVES, J.D; ALVES, R.E; SILVA, J.D. Cell wall biochemistry of sapodilla (*Manilkara zapota*) submitted to 1-methylcyclopropene. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v. 20, n. 2, p. 85-94, 2008.

NAGAMINE, L.; FIUJITA, M.; HONGO, I.; NGUYEN, H.T.T.; MIYAHARA, M.; PARKANYIOVA, J.; POKORNY, J.; DOSTALOVA, J.; SAKURAI, H.; Hepatoprotective effects of acerola cherry extract power against D-galactosamine induced liver injury in rats and its bioactive compounds. **Czech Journal of Food Sciences**. v. 22, p. 159-162, 2004.

NEUHouser, M. L. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. **Nutrition and Cancer**. v. 50, p. 1-7, 2004.

OLIVEIRA, L.S.; RUFINO, M.S.M.; MOURA, C.F.H.; CAVALCANTI, F.R.; ALVES, R.E.; MIRANDA, M.R.A. The influence of processing and long-term storage on the antioxidant metabolism of acerola (*Malpighia emarginata* D.C) purée. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v. 23, n. 2, p. 151-160, 2011.

PAIVA, J.R.; ALVES, R.E.; BARROS, L.M.; CRISÓSTOMO, J.R.; MOURA, C.F.H.; ALMEIDA, A.S.; NORÕES, N.P. Clones de aceroleira: BRS 235 ou Apodi, BRS 236 ou Cereja, BRS 237 ou Roxinha e BRS 238 ou Frutacor. **Comunicado Técnico 87**, Brasília: EMBRAPA-CNPAT, 2003.

- PARK, Y.S.; JUNG, S.T.; KANG, S.G.; DRZEWIECKI, J.; NAMIESNIK, J.; HARUENKIT, R.; BARASCH, D.; TRAKHTENBERG, S.; GORINSTEIN, S. In vitro studies of polyphenols, antioxidants and other dietary indices in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. v. 57, p. 107-122, 2006.
- PONTES, P.V.; MOREIRA, R.F.A.; TRUGO, L.C.; DE MARIA, C.A.B. The content of chlorogenic acids in tropical fruits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 82, p. 1177-1181, 2002.
- PRASANNA, V.; PRABHA, T.N.; THARANATHAN, R.N. Fruit ripening phenomena – An overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 47, p.1-19, 2007.
- PRIOR, R.L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, p. 570-578, 2003.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J. Antioxidants – the case for fruit and vegetables in the diet. **British Food Journal**, v. 97, p. 35-40, 1995.
- RIGHETTO, A.M.; NETTO, F.M.; CARRARO, F. Chemical composition and antioxidant activity of juices from mature and immature acerola (*Malpighia emarginata*). **Food Science and Technology International**, v. 11, n. 4, p. 315-321, 2005.
- ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, v. 66, p. 401-436, 1999.
- RUFINO, M.S.M; ALVES, R.E; BRITO, E.S; JIMÉNEZ, J.P; CALIXTO, F.S; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits of Brazil. **Food Chemistry**. v. 121, p. 996-1002, 2010.
- SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. Actividad antioxidante. **Alimentaria**. p. 29-40, 2002.
- SAMPAIO, C.G.; MORAIS, S.M.; RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S. Quality, bioactives compounds and antioxidant activity of Brazilian acerola clones. **Acta Horticulturae**. v. 841, p. 463-466, 2009.
- SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v. 101, p. 7-12, 1993.
- SOUZA, M.J.H.; GUIMARÃES, M.C.A.; GUIMARÃES, C.D.L.; FREITAS, W.S.; OLIVEIRA, A.M.S. Potencial agroclimático para a cultura da acerola no Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 10, p. 390-396, 2006
- SHWARTZ, E.; GLAZER, I.; BAR-YA'AKOV, I.; MATITYAHU, I.; BAR-ILA, I.; HOLLAND, D.; AMIR, R. Changes in chemical constituents during the maturation and ripening of two commercially important pomegranate accessions. **Food Chemistry**. v. 115, p. 965-973, 2009.

SHUI, G.; WONG, S.P.; LEONG, L.P. Characterization of antioxidant and changes of antioxidant levels during storage of *Manilkara zapota* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 7834-7841, 2004.

SUMNER, M.D.; ELLIOT-ELLER, M.; WIEDNER, G.; DAUBENMEIER, J.J.; CHEW, M.H.; MARLIN, R.; RAISIN, C.J.; ORNISH, D. Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart disease. **American Journal of Cardiology**. v. 96, p. 810-814, 2005.

SUN, J.; CHU, Y.F.; WU, X.; LIU, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 7449-7454, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre, 4° Ed., Artmed, 2009, 848p.

TIEMAN, D.M.; HARRIMAN, R.W.; RAMAMOHA, G.; HANDA, A.K. An antisense pectin methylesterase gene alters pectin chemistry and soluble solids in tomato fruit. **Plant Cell**. v. 4, p. 667-679, 1992.

TORRES, C.A.; ANDREWS, P.K. Developmental changes in antioxidant metabolites, enzymes, and pigments in fruit exocarp of four tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) genotypes: beta-carotene, high pigment-1, ripening inhibitor, and 'Rutgers'. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 44, n. 11-12, p. 806-818, 2006.

TULIPANI, S.; ALVAREZ-SUAREZ, J.M.; BUSCO, F.; BOMPADRE, S.; QUILES, J.L.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. Strawberry consumption improves plasma antioxidant status and erythrocyte resistance to oxidative haemolysis in humans. **Food Chemistry**. v. 128, p. 180-186, 2011.

VENDRAMINI, A.L.; TRUGO, L.C. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia punicifolia* L.) at three stages of maturity. **Food Chemistry**. v. 71, p. 195-198, 2000.

ZHANG, X.; KOO, J.; EUN, J.B. Antioxidant activities of methanol extracts and phenolic compounds in Asian pear at different stages of maturity. **Food Science and Biotechnology**. v. 15, n. 1, p. 44-50, 2006.

ZIMMERMANN, P.; ZENTGRAF, U. The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 10, p. 515-534, 2005.

WANG, S.Y.; BALLINGTON, J.R. Free radical scavenging capacity and antioxidant enzymes activity in deerberry (*Vaccinium stamineum* L.). **LWT Food Science and Technology**. v. 40, p. 1352-1361, 2007.

CAPÍTULO 2

METABOLISMO ANTIOXIDANTE DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS DE CLONES DE ACEROLEIRA (*Malpighia emarginata* D.C)

RESUMO

O amadurecimento de frutos é um processo complexo do desenvolvimento envolvendo inúmeras mudanças nas características bioquímicas, fisiológicas e sensoriais, bem como no metabolismo oxidativo determinando seus atributos de qualidade e propriedade antioxidante. Desta forma, esse trabalho objetivou analisar as principais mudanças no sistema antioxidante e sua significância durante o desenvolvimento da acerola (*Malpighia emarginata* D.C). Frutos de cinco clones de aceroleira selecionados a partir de melhoramento genético realizados pela Embrapa Agroindústria Tropical: BRS 235 (Apodi), BRS 236 (Cereja), BRS 237 (Roxinha), BRS 238 (Frutacor) e II47/1, foram colhidos manualmente em diferentes estádios de maturação com base na cor da casca e analisados quanto aos parâmetros de qualidade pós-colheita, compostos antioxidantes, atividade antioxidante total, atividade das enzimas antioxidante e a integridade da membrana celular. Em acerola o amadurecimento promoveu mudanças sensoriais desejáveis na sua qualidade. O conteúdo de vitamina C e polifenóis solúveis totais (PST) diminuíram durante o desenvolvimento, o que possivelmente resultou em um declínio da atividade antioxidante dos frutos. Apesar da redução dos PST, o conteúdo de flavonóides amarelos e antocianinas totais mostraram um aumento evidente com o amadurecimento, o que pode estar associado à mudança de cor do fruto, sendo a antocianina cianidina 3-ramnosídeo e o flavonóide quercetina 3-ramnosídeo os principais fenólicos identificados na acerola madura, assim, apesar da diminuição da vitamina C outro eficiente antioxidante, a quercetina, é acumulado contribuindo para as propriedades antioxidantes nutricionais da acerola. A atividade das enzimas antioxidantes dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) diminuiu ao longo do amadurecimento, contribuindo para um aumento do estresse oxidativo evidenciado pelo aumento da peroxidação de lipídeos (PL). Contudo, a vitamina C mostrou ser uma proteção antioxidante contra danos oxidativos. O amadurecimento da acerola foi acompanhado por um progressivo estresse oxidativo, o qual contribui para a qualidade pós-colheita dos frutos e seu potencial antioxidante atribuído a vitamina C e polifenóis, especialmente cianidina e quercetina.

Palavras-chaves: *Malpighia emarginata* D.C; atividade antioxidante; enzimas antioxidantes; compostos bioativos; amadurecimento.

1. INTRODUÇÃO

A acerola (*Malpighia emarginata* D.C), também conhecida como Cereja das Antilhas, é um fruto que tem como centros de origem as regiões das Antilhas, o norte da América do Sul e a América Central, com algumas das maiores plantações localizadas no Brasil (ASSIS *et al.*, 2001; HANAMURA; UCHIDA; AOKI, 2008), sendo excepcionalmente rico em vitamina C, contém vitamina A e ainda constitui uma boa fonte de ferro e cálcio, além de conter tiamina, riboflavina e niacina (vitaminas constituintes do complexo B) (ARAÚJO; MINAMI, 2002).

O fruto da aceroleira é bem conhecido por ser uma das melhores fontes naturais de vitamina C, considerando que o consumo de três unidades de acerola por dia satisfaz a concentração de vitamina C recomendada para a dieta de um adulto (MEZADRI *et al.*, 2008), tornando-o extremamente popular na dieta de pessoas preocupadas com a saúde, pois as funções biológicas dessa vitamina são centradas sobre suas propriedades antioxidantes nos sistemas biológicos ajudando a prevenir os processos degenerativos comuns (HANAMURA; UCHIDA; AOKI, 2008). Contudo, além da vitamina C a acerola possui elevado conteúdo de outros compostos funcionais como os polifenóis, conhecidos por suas propriedades antioxidantes na saúde humana (HANAMURA *et al.*, 2006; HWANG; HODIS; SEVANIAN, 2002), bem como seus efeitos no retardo e/ou prevenção da oxidação de alimentos (NEUHOUSER, 2004).

Em estudo recente realizado em polpa de acerola, Oliveira *et al.*, 2011 observaram a presença das principais enzimas (Dismutase do superóxido-SOD, catalase-CAT e peroxidase do ascorbato-APX) constituintes do sistema de defesa antioxidante, as quais juntamente com os compostos antioxidantes não enzimáticos, através de interações sinérgica e/ou antagonística entre eles, contribuíram para o elevado potencial antioxidante apresentado por este fruto. Assim, a presença desses constituintes antioxidantes confere a acerola considerável capacidade antioxidante apresentando grande potencial para extensão da vida útil pós-colheita (LACAN; BACCOU, 1998) e para promover benefícios à saúde humana associados a sua capacidade de prevenir a degeneração biológica (ZEACHAN *et al.*, 2008).

O estágio de maturação é um importante fator que influencia a qualidade de frutas e hortaliças, pois durante o amadurecimento as inúmeras modificações bioquímicas, fisiológicas e estruturais que ocorrem são responsáveis por determinarem seus atributos sensoriais e propriedade antioxidante (MENICHINI *et al.*, 2009). Segundo Rogiers *et al.*

(1998), a perda gradual na habilidade de neutralizar as EROs, devido a mudanças nos componentes antioxidantes dos frutos, pode ser central para muitas das alterações metabólicas associadas com o amadurecimento. Desta forma, o estresse oxidativo ocasionado como consequência do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas do oxigênio e a atividade do sistema antioxidante podem ser requisitos para mediar muitas das mudanças estrutural e físico-química que caracterizam o amadurecimento dos frutos.

2. OBJETIVO

Investigar as mudanças nos componentes enzimáticos e não enzimáticos do sistema de defesa antioxidante e o papel dos mesmos na degradação de membranas biológicas durante desenvolvimento e amadurecimento de frutos de clones de aceroleira.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção e manuseio dos frutos

Frutos de cinco clones de aceroleiras, BRS 235 (Apodi), BRS 236 (Cereja), BRS 237 (Roxinha), BRS 238 (Frutacor) e II47/1, selecionados a partir de Programas de Melhoramento Genético realizados pela Embrapa Agroindústria Tropical, foram manualmente colhidos no início da manhã, em plantio da empresa Frutacor localizado em Limoeiro do Norte – CE em Agosto de 2009, com precipitação média de 35,8 mm. A agroempresa está localizada a 5° 6' S e 37° 52' W, com altitude de 151 m. O clima é do tipo BS w'h' (Köppen) com maior concentração de chuvas ocorrendo de março a maio. A média de precipitação anual é de 772 mm e de temperatura 28,5 °C, segundo DNOCS (Departamento Nacional de Obras Contra a Seca).

A colheita dos frutos foi feita em diferentes estádios de maturação com base na cor da casca: verde pequeno e imaturo (VPI), verde predominante (VP), vermelho predominante (VMP) e maduro e vermelho (MV), conforme ilustrado na figura 7. Os frutos foram acondicionados em caixas de colheita forradas com espuma de poliestireno e transportados para o Laboratório de Fisiologia e Tecnologia Pós-Colheita da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza – CE.

Figura 8 – Estádios de maturação dos frutos dos clones de aceroleira com base na cor da casca.



Verde pequeno e imaturo (VPI)



Verde predominante (VP)



Vermelho predominante (VMP)



Maduro e vermelho (MV)

3.2. Condução do experimento

No laboratório de Fisiologia e Tecnologia Pós-Colheita da Embrapa Agroindústria Tropical, os frutos nos diferentes estádios de maturação foram separados em três repetições com 400 g cada e inicialmente, analisados quanto à cor da casca.

A polpa dos frutos dos clones de aceroleira, em diferentes estádios do desenvolvimento, foi extraída e processada utilizando um liquidificador doméstico. O homogeneizado foi analisado quanto às variáveis físico-químicas e químicas, compostos antioxidantes e atividade antioxidante total, conduzidos no Laboratório de Fisiologia e Tecnologia Pós-Colheita (EMBRAPA-Agroindústria Tropical), quanto à atividade das enzimas antioxidantes e integridade da membrana celular, realizadas no Laboratório Fisiologia e Bioquímica de Frutos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, e caracterizado quanto aos polifenóis isolados, conduzido no Laboratório de Análises Instrumentais (EMBRAPA-Agroindústria Tropical).

3.3. Análise física

3.3.1. Cor

A cor da casca dos frutos dos clones de aceroleira foi determinada utilizando um colorímetro portátil (Minolta modelo CR 300), o qual nos forneceu os valores dos parâmetros L* (luminosidade), a* (mudança da cor verde para vermelha) e b* (mudança da cor azul para amarela), através de duas leituras efetuadas em pontos aproximadamente equidistantes. Foram selecionados vinte frutos de cada estágio de maturação (McGUIRE, 1992).

3.4. Análises físico-químicas e químicas

3.4.1. Acidez titulável (AT)

A acidez titulável foi determinada por titulação volumétrica com solução de NaOH 0,1 N até pH 8,2, conforme IAL (1985). Aproximadamente 1 g da polpa foi pesada e diluída em 50 mL de água destilada. Fenolftaleína 1% foi utilizada como indicador. A solução de NaOH 0,1 N foi adicionada lentamente até a mudança de cor para levemente róseo. Os resultados foram expressos em percentagem de ácido málico.

3.4.2. Sólidos solúveis (SS)

A polpa dos frutos foi filtrada em papel de filtro e, em seguida, o conteúdo de sólidos solúveis foi medido utilizando um refratômetro digital (Atago modelo PR-101 Pallette), variando de 0 a 45 °Brix, com compensação automática de temperatura, de acordo com metodologia recomendada por AOAC (2005). Os resultados foram expressos em °Brix.

3.4.3. Relação sólidos solúveis e acidez titulável (SS/AT)

A variável SS/AT foi obtida através da relação entre o conteúdo de sólidos solúveis e acidez titulável apresentada pela polpa dos frutos.

3.4.4. pH

O pH foi medido diretamente na polpa dos frutos utilizando um potenciômetro digital (Mettler DL 12) com membrana de vidro, conforme metodologia recomendada pela AOAC (2005).

3.5. Atividades das enzimas antioxidantes

3.5.1. Obtenção do extrato enzimático

Alíquota de 2 g da polpa homogeneizada foram diluídas em 10 mL de tampão fosfato de potássio 0.1M (pH 7,0), contendo ácido etilenodiamino tetra-ácetico (EDTA) 0,1 mM, e centrifugadas a 3248 g por 40 minutos a 4 °C, com base na metodologia adaptada de Yang, Zheng e Cao (2009). O sobrenadante (extrato enzimático) foi utilizado para determinar o conteúdo de proteínas totais e a atividade das enzimas antioxidante.

3.5.2. Proteínas solúveis totais

O conteúdo de proteínas solúveis totais foi determinado segundo Bradford (1976) utilizando como padrão albumina sérica bovina – BSA - (SIGMA). Alíquota de 0,1 mL do extrato enzimático foi adicionada a 1 mL do reagente de Bradford e homogeneizada utilizando agitador de tubos tipo Vortex. Após 15 minutos de reação, as leituras das

absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro (Pharmacia, modelo Biotech Ultrospec 2000) a 595 nm. Os resultados foram expressos em mg de proteína. g⁻¹ de polpa.

3.5.3. Atividade da Dismutase do superóxido

A atividade da dismutase do superóxido (SOD) foi determinada segundo Giannopolitis e Ries (1977) baseada na fotorredução do azul de nitrotetrazolio (NBT) pela luz na presença de riboflavina e metionina. Alíquota de 0,05 mL do extrato enzimático foi diluído em 1 mL do tampão fosfato de potássio a 50 mM, (pH 7,8) contendo EDTA 0,1 mM e metionina 19,5 mM. Na ausência de luz, foram adicionados 0,15 mL de NBT 750 mM e 0,3 mL de riboflavina 10 mM. A mistura de reação foi exposta à luz sob uma lâmpada fluorescente de 20 W por 15 minutos e a absorbância monitorada espectrofotometricamente a 560 nm. Os resultados foram expressos em UAE. mg⁻¹ de proteína, considerando que uma unidade de atividade enzimática da SOD (UAE) é definida como a quantidade da enzima requerida para promover 50% de inibição da taxa de fotorredução do NBT (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971).

3.5.4. Atividade da Catalase

A atividade da catalase (CAT) foi determinada conforme método descrito por Beers Júnior e Sizer (1952), com base na redução do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Em banho-maria a 30 °C, 1,42 mL do tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), contendo EDTA 0,1 mM, foi aquecido durante 5 minutos. Após aquecimento foram adicionados 0,06 mL de H₂O₂ 0,5 M e 0,02 mL do extrato enzimático, iniciando a reação. A atividade da CAT foi monitorada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm durante 10 minutos e quantificada utilizando o coeficiente de extinção molar do H₂O₂ (36 M⁻¹. cm⁻¹). Os resultados foram expressos em µmol H₂O₂. mg⁻¹ de proteína. min⁻¹.

3.5.5. Atividade da Peroxidase do ascorbato

A atividade da peroxidase do ascorbato (APX), baseada na oxidação do ascorbato pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂), foi determinada conforme metodologia descrita por Nakano e Asada (1981). Em banho-maria a 30 °C, 1,38 mL do tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0), contendo EDTA 0,05 mM, foi aquecido durante 5 minutos. Posteriormente,

foram adicionados 0,02 mL do extrato enzimático, 0,05 mL de H₂O₂ 0,03 M e 0,05 mL de ácido ascórbico 15 mM, iniciando a reação. A taxa de oxidação do ascorbato pelo H₂O₂ foi monitorada pelo decréscimo da absorbância a 290 nm durante 10 minutos, sendo quantificada como Índice de Oxidação do Ascorbato, utilizando o coeficiente de extinção do ascorbato (2,8 mM⁻¹. cm⁻¹). Os resultados foram expressos em μmol H₂O₂. mg⁻¹ de proteína. min⁻¹.

3.6. Peroxidação de lipídeos

A taxa de peroxidação de lipídeos (PL) foi determinada conforme Zhu *et al.* (2008) baseado na formação de malondialdeído (MDA), um produto secundário da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados.

Alíquota de 2 g da polpa foi adicionada a 10 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% e centrifugada a 3248 g durante 20 minutos a 4 °C. Em tubos de ensaio, 0,75 mL do sobrenadante foram adicionados a 3 mL da solução de TCA 20% contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% e incubados durante 30 minutos a 95 °C. Após a incubação, os tubos foram imediatamente resfriados em banho de gelo e centrifugados a 3000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. As absorbâncias do sobrenadante foram monitoradas espectrofotometricamente a 532 nm e corrigidas para turbidez inespecífica subtraindo a absorbância a 600 nm, obtendo a leitura específica da absorbância. O conteúdo de MDA foi calculado utilizando coeficiente de extinção molar de 155 nmol⁻¹. cm⁻¹ (HEATH; PACKER, 1968) e expressos em nmol MDA. g⁻¹ de polpa.

3.7. Compostos antioxidantes e atividade antioxidante total

3.7.1. Flavonóides amarelos e antocianinas totais

Flavonóides amarelos e antocianinas totais foram determinados conforme metodologia desenvolvida por Francis (1982). Pesou-se aproximadamente 1 g da polpa e adicionou-se 30 mL da solução extratora etanol-HCl 1,5 N na proporção 85:15. As amostras foram homogeneizadas utilizando um homogeneizador de tecidos tipo “Turrax” por 2 minutos e transferidas para um balão volumétrico âmbar de 50 mL, aferindo-se o volume com a solução extratora. O conteúdo do balão foi acondicionado em frasco âmbar e deixado descansar por 12 horas em refrigerador a 4 °C. Posteriormente, o material foi filtrado utilizando papel de filtro qualitativo 80 g/m² e o filtrado teve sua absorbância analisada espectrofotometricamente a 374 nm e a 532 nm para os flavonóides amarelos e antocianinas

totais, respectivamente. O conteúdo de flavonóides amarelos e de antocianinas totais foram calculados utilizando coeficiente de extinção molar 76,6 e 98,2 mol⁻¹. cm⁻¹, respectivamente, e os resultados foram expressos em mg. 100 g⁻¹ de polpa.

3.7.2. *Vitamina C*

O conteúdo de ácido ascórbico foi determinado por titulação direta com solução de Tillman (2,6-dicloro-fenol-indofenol, 0,02% - DFI) de acordo com Strohecker e Henning (1967). Amostra de 0,5 g da polpa foi diluída em 50 mL de ácido oxálico 0,5%. Alíquota de 5 mL do extrato preparado foi diluída em 50 mL de água destilada e titulada com solução de Tillman até mudança de cor permanente. Os resultados foram expressos em mg. 100 g⁻¹ de polpa.

3.7.3. *Polifenóis solúveis totais*

O extrato utilizado para determinar o conteúdo de polifenóis solúveis totais (PST) e a atividade antioxidante total foi obtido conforme metodologia de Larrauri, Ruperez e Saura-Calixto (1997). Amostra de 2 g da polpa foi adicionada a 40 mL da solução de metanol 50%, homogeneizada e deixada em repouso por 1 h à temperatura ambiente. Posteriormente, o material foi centrifugado a 16000 g, por 15 minutos a 20 °C, e o sobrenadante recolhido. O precipitado dessa extração foi ressuspensão em 40 mL da solução de acetona 70%, homogeneizado, deixado em repouso por 1 hora à temperatura ambiente e centrifugado a 16000 g por 15 min a 20 °C. O sobrenadante foi recolhido, colocado em balão volumétrico junto ao primeiro e o volume aferido para 50 mL com água destilada.

O conteúdo de polifenóis solúveis totais (PST) foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (OBANDA; OWUOR, 1997) adaptado por Rufino *et al.* (2006). Em ambiente escuro, 1 mL do extrato foi homogeneizado com 1 mL da solução de Folin-Ciocalteu (1 N), 2 mL da solução de carbonato de sódio anidro (Na₂CO₃) 20% e 2 mL de água destilada. Após 30 minutos de repouso, as leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro (Pharmacia, modelo Biotech Ultraspec 2000) a 700 nm. O conteúdo de PST foi calculado com base em uma curva padrão de doses crescentes de ácido gálico 98% (0 – 50 µg), utilizado como referência, e os resultados foram expressos em mg de equivalente à ácido gálico (EAG). 100 g⁻¹ de polpa.

3.7.4. Atividade antioxidante total

A atividade antioxidante total (AAT) foi determinada pelo método ABTS conforme metodologia desenvolvida por Re *et al.* (1999) adaptada por Rufino *et al.* (2006). A técnica envolve a produção direta do radical cromóforo ABTS^{•+} através da reação de oxidação entre a solução ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) 7 mM com a solução de persulfato de potássio 140 mM mantida no escuro à temperatura ambiente por 16 horas antes de ser utilizada. A solução ABTS^{•+} foi diluída em etanol absoluto para uma absorvância de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm.

A AAT foi avaliada com base em uma curva padrão linear utilizando como antioxidante de referência o composto 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico (Trolox, Sigma) a 2000 μM , preparado com etanol absoluto, utilizando concentrações entre 100 e 2000 μM . Em ambiente escuro, alíquota de 0,03 mL da solução do Trolox foi adicionada a 3 mL da solução ABTS^{•+}. As absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro (Pharmacia, modelo Biotech Ultrospec 2000) a 734 nm, 6 minutos após a adição da solução do radical. A partir dessa curva foi obtida a equação 1, da qual calculou-se a absorvância referente a 1000 μM de Trolox. Seguindo os mesmos procedimentos utilizados na determinação da curva padrão do Trolox, obtivemos a equação 2 utilizando alíquota de 0,03 mL do extrato, preparado conforme descrito no item 2.7.3, em três diferentes concentrações. A AAT da amostra foi calculada substituindo na equação 2 a absorvância equivalente a 1000 μM de Trolox. O valor obtido corresponde à concentração da amostra equivalente a 1000 μM de Trolox e os resultados foram expressos em capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) (μM Trolox. g^{-1} de polpa).

3.8. Identificação e quantificação de compostos fenólicos

3.8.1. Extração dos compostos fenólicos

Amostra de 0,3 g da polpa de acerola liofilizada foi adicionada a 5 mL da solução de metanol 40%, homogeneizada por 1 minuto utilizando agitador de tubos tipo Vortex, sonicada por 1 hora e centrifugada a 2500 g por 10 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi coletado em frascos tipo vial e então submetidos à análise cromatográfica.

3.8.2. Condições LC-DAD-ESI/MS

A análise dos compostos fenólicos foi realizada utilizando procedimento geral aplicado em análises de compostos fenólicos de materiais vegetais conforme Lin e Harnly (2007) com algumas modificações. O equipamento utilizado, LC-DAD-ESI-MS, um sistema Varian ProStar (Walnut Creek, CA), consistiu de uma cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Varian 250, Varian CA) com fonte de ionização por electrospray acoplada a detecção por arranjo de fotodiodo (DAD) e um espectrômetro de massa (500-MS IT, Varian). Uma coluna Symmetry® C18 (5,0 µm, 250 x 4,6 mm) foi utilizada a uma vazão de 0,4 mL por minuto. A temperatura do forno da coluna foi fixada em 30 °C. A fase móvel consistiu da combinação de A (0,1% ácido fórmico em água milli-Q) e B (0,1% ácido fórmico em acetonitrila). O gradiente aumentou linearmente de 10% para 26% de B (v/v) em 40 minutos, seguindo linear para 65% de B em 60 minutos e finalmente para 100% de B em 70 minutos mantendo-se em 100% de B até 75 minutos. O detector DAD foi fixado em 340, 270 e 520 nm em tempo real de leitura e espectros no ultravioleta (UV)/ visível (VIS), de 190 a 650 nm, foram continuamente coletados. Espectros de massa foram simultaneamente adquiridos utilizando ionização electrospray nos modos de ionização positivo e negativo (PI e NI) a uma voltagem de fragmentação de 80 V para faixa de massa de 2 a 100 (m/z). Foi utilizado pressão do gás de secagem de 35 psi, pressão do gás nebulizador de 40 psi, temperatura do gás de secagem de 370 °C e tensões capilares de 3.500 V para os modos de ionização positivo e negativo. O sistema de cromatografia líquida (LC) estava diretamente acoplado ao espectrômetro de massa (MS) sem divisão de fluxo. As concentrações dos produtos identificados foram calculadas a partir de curvas padrão obtidas com produtos comerciais cromatografados em condições idênticas utilizando-se as áreas dos picos a 340 e 532 nm para quercetina e cianidina 3-ramnosídeo, respectivamente e os resultados foram expressos como equivalentes de cianidina (mg) e como equivalentes de quercetina (mg) por 100 g de massa seca (MS).

3.9. Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi desenvolvido em um delineamento inteiramente casualizado em regime fatorial 5 x 4 (clones x estágio de desenvolvimento). As amostras foram divididas em 3 repetições, cada uma com 400 g de frutos e representando uma unidade experimental e todas as análises foram realizadas em triplicata.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) realizada com auxílio do programa computacional SISVAR versão 3.01 e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (GOMES, 1990).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Qualidade pós-colheita e compostos antioxidantes não enzimáticos

Mudanças importantes relacionadas com a melhoria da qualidade dos frutos ocorreram nas variáveis físico-químicas durante o desenvolvimento da acerola (Tabela 2), as quais caracterizam os processos de maturação, crescimento e amadurecimento.

Durante o amadurecimento, o conteúdo de sólidos solúveis (SS) aumentou significativamente, sendo no estágio maduro (MV) o maior valor (9,28 °Brix) apresentado pelo clone II 47/1 e o menor (7,20 °Brix) pelo clone BRS 236. De acordo com Shwartz *et al.* (2009), SS é uma das variáveis mais utilizadas para caracterizar a qualidade das frutas e aumento semelhante no conteúdo de SS em acerola também foram relatados por Nogueira *et al.* (2002) e por Righetto, Netto e Carraro (2005). Recentemente, em estudo com clones de aceroleira foi demonstrado que o conteúdo de SS estava positivamente correlacionado com o conteúdo de polifenóis e de antocianinas (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

O amadurecimento de frutos é caracterizado pelo desenvolvimento do sabor, para uma melhora na doçura, como resultado do acúmulo de SS e declínio da acidez. O aumento do conteúdo de SS pode ser explicado pela hidrólise de polissacarídeos como o amido, bem como pela gluconeogênese, enquanto a diminuição da acidez pode resultar do consumo de ácidos orgânicos como substrato na respiração, levando a uma excelente relação açúcar/ácido (PRASANNA; PRABHA; THARANATHAN, 2007). Assim, a acidez titulável (AT) também foi avaliada como uma medida da qualidade dos frutos (Tabela 2). Os clones de aceroleira exibiram diferentes padrões para a AT com o desenvolvimento. Os clones II 47/1, BRS 235 e BRS 237 apresentaram um aumento na sua acidez, de 1,59 para 1,81% ácido málico, de 1,37 para 1,61% ácido málico, de 1,11 para 1,42% ácido málico, respectivamente, enquanto os clones BRS 238 e 236 mostraram uma diminuição, de 1,50 para 1,24% ácido málico e de 1,54 para 1,40% ácido málico, respectivamente. O aumento incomum na AT, também foi relatado por Vendramini e Trugo (2000) em acerolas, e é atribuído à formação de ácidos orgânicos durante a maturação.

Conforme descrito anteriormente, a relação SS/AT define o sabor da fruta e, em acerolas, o seu sabor ligeiramente ácido é evidenciado pela baixa relação SS/AT observada, quando comparada com a banana, 8,26 (THAIPHANIT; ANPRUNG, 2010) e com o sapoti, entre 111,17 e 133,44 (MIRANDA *et al.*, 2002). Dentre os clones de aceroleira estudados, no estágio maduro, o BRS 238 apresentou o maior valor da relação SS/AT, 5,98.

Embora, os resultados tenham sido controversos em relação a AT, os valores do pH aumentaram ligeiramente durante a maturação da acerola. Estes resultados sugerem a existência de um saldo líquido devido as diferenças apresentadas no grau de dissociação do ácido ascórbico, o qual diminuiu ao longo do amadurecimento (Tabela 2), e dos outros ácidos orgânicos que podem ter aparecido durante a maturação. O valores do pH variaram pouco entre os clones de aceroleira e tendiam a estar diretamente relacionado com a acidez. Um aumento nos valores de pH durante o desenvolvimento da acerola foi também observado por Nogueira *et al.* (2002), no entanto, Vendramini e Trugo (2000) não relataram variação no pH durante a maturação de acerolas.

Os clones de aceroleira apresentaram um padrão similar de declínio do conteúdo de vitamina C, sendo observada uma diminuição mais abrupta durante o amadurecimento, de 2453,20 – 3756,47 mg. 100 g⁻¹ polpa no estágio verde pequeno e imaturo (VPI) para 1200,80 – 1819,55 mg. 100 g⁻¹ polpa no estágio maduro e vermelho (MV). Entre os clones estudados destacam-se o BRS 236 e o II 47/1 por apresentarem maior conteúdo de vitamina C nos estádios verde imaturo e maduro, respectivamente. Apesar do decréscimo registrado, os cinco clones de aceroleira ainda apresentaram elevado conteúdo de vitamina C. Vitamina C como ácido ascórbico e suas formas oxidadas estão abundantemente presentes nas células vegetais e exercem muitas funções biológicas nos frutos, que incluem o controle redox e a atividade antioxidante (KULKARNI; ARADHYA, 2005; SHWARTZ *et al.*, 2009). Perdas no conteúdo de ácido ascórbico têm sido frequentemente relatadas durante o desenvolvimento de frutos. Vendramini e Trugo (2000) também observaram uma redução em vitamina C durante a maturação de acerola, 2160-1070 mg. 100 g⁻¹ polpa. Esses autores relacionaram a redução da vitamina C com a sua oxidação bioquímica, pois um produto da degradação oxidativa do ácido ascórbico, 3-hidroxi-2-pirona, foi encontrado na acerola madura. Segundo Asenjo, Penalosa e Medina (1960), nos frutos de aceroleira maduros há uma maior atividade da enzima ascorbato oxidase (E.C.1.10.3.3), o que pode explicar as perdas observadas no decorrer do amadurecimento.

Com o amadurecimento da acerola houve mudanças significativas nos valores de L*, a* e b*, os quais determinam a relação entre a cor e o estágio de maturação do fruto (Tabela 3). O índice de luminosidade (L*) gradualmente diminuiu com o amadurecimento. Esses resultados estão conforme o esperado, pois com o amadurecimento os frutos acumulam mais ceras em sua casca (ÇELIK *et al.*, 2008). Vendramini e Trugo (2000), estudando a composição química da acerola em três estádios de maturação, observaram que a luminosidade dos frutos aumentou entre os estádios imaturo e maturação intermediária,

Tabela 2 - Mudanças na qualidade pós-colheita durante o desenvolvimento de frutos de cinco clones de aceroleira cultivados na Chapada do Apodi, Limoeiro do Norte, CE.

Clones	Estádio	Sólidos Solúveis (SS)	Acidez Titulável (AT)	SS/AT	pH	Vitamina C Total
		°Brix	% ácido málico			mg. 100g ⁻¹ polpa
II 47/1	VPI	7,83 ± 0,09 Ca	1,59 ± 0,03 Db	4,93 ± 0,06 ABa	3,38 ± 0,04 Cb	2864 ± 0,41 Cc
	VP	8,35 ± 0,08 Db	1,36 ± 0,05 Ba	6,14 ± 0,20 Db	3,13 ± 0,02 Ba	2355 ± 0,20 Cb
	VMP	8,55 ± 0,08 Db	1,74 ± 0,03 Cc	4,92 ± 0,09 BCa	3,16 ± 0,04 Ca	2340 ± 0,30 Bb
	MV	9,28 ± 0,06 Dc	1,81 ± 0,01 Dc	5,12 ± 0,03 Aa	3,38 ± 0,00 Ab	1820 ± 0,04 Da
BRS 235	VPI	7,12 ± 0,17 Ba	1,37 ± 0,02 Ba	5,19 ± 0,07 Ba	3,10 ± 0,01 Aa	3243 ± 0,43 Dd
	VP	7,50 ± 0,21 Cb	1,47 ± 0,02 Cb	5,09 ± 0,09 Ba	3,22 ± 0,05 Cb	2793 ± 0,53 Dc
	VMP	7,75 ± 0,08 Cb	1,39 ± 0,03 Aa	5,56 ± 0,08 Db	3,36 ± 0,05 Dc	2313 ± 0,20 Bb
	MV	8,22 ± 0,14 Cc	1,61 ± 0,05 Cc	5,11 ± 0,19 Aa	3,44 ± 0,02 ABd	1578 ± 0,16 Ca
BRS 236	VPI	7,20 ± 0,16 Bb	1,54 ± 0,02 CDb	4,67 ± 0,06 Aa	3,12 ± 0,02 Ab	3756 ± 0,14 Ed
	VP	6,67 ± 0,10 Aa	1,52 ± 0,01 CDb	4,39 ± 0,07 Aa	2,91 ± 0,01 Aa	2719 ± 0,29 Dc
	VMP	6,75 ± 0,19 Aa	1,50 ± 0,01 Bb	4,50 ± 0,12 Aa	2,92 ± 0,01 Aa	2495 ± 0,44 Cb
	MV	7,20 ± 0,04 Ab	1,40 ± 0,03 Ba	5,15 ± 0,13 ABb	3,44 ± 0,01 ABc	1642 ± 0,08 Ca
BRS 237	VPI	6,42 ± 0,12 Aa	1,11 ± 0,05 Aa	5,79 ± 0,31 Cb	3,28 ± 0,03 Bc	2453 ± 0,50 Ad
	VP	7,15 ± 0,11 Bb	1,26 ± 0,03 Ab	5,68 ± 0,08 Cb	3,16 ± 0,01 BCb	1921 ± 0,14 Ac
	VMP	7,25 ± 0,04 Bb	1,37 ± 0,01 Ac	5,28 ± 0,01 CDa	3,03 ± 0,01 Ba	1782 ± 0,34 Ab
	MV	7,78 ± 0,12 Bc	1,42 ± 0,01 Bc	5,49 ± 0,04 Bab	3,50 ± 0,01 Bd	1293 ± 0,14 Ba
BRS 238	VPI	7,20 ± 0,08 Ba	1,50 ± 0,02 Cb	4,82 ± 0,11 Aa	3,03 ± 0,03 Aa	2713 ± 0,51 Bd
	VP	7,15 ± 0,11 Ba	1,59 ± 0,03 Dc	4,91 ± 0,11 Ba	3,12 ± 0,01 BCb	2107 ± 0,18 Bc
	VMP	7,25 ± 0,04 Ba	1,45 ± 0,04 ABb	4,79 ± 0,12 ABa	3,03 ± 0,01 Bb	1770 ± 0,23 Ab
	MV	7,78 ± 0,12 Bb	1,24 ± 0,03 Aa	5,98 ± 0,19 Cb	3,50 ± 0,01 Bc	1201 ± 0,12 Aa

* Verde pequeno e imaturo (VPI); verde predominante (VP); vermelho predominante (VMP); maduro e vermelho (MV).

* Para cada variável, letra minúscula diferente indica diferença estatística em P<0.05 entre os estádios de acordo com teste de Tukey. Para cada variável, diferente letra maiúscula indica diferença estatística em P<0.05 entre as cultivares de acordo com teste de Tukey.

Tabela 3 - Determinação da cor (L*, a* e b*) durante o desenvolvimento de frutos de cinco clones de aceroleira cultivados na Chapada do Apodi, Limoeiro do Norte, CE.

Clones	Estádio	Características da Cor		
		L*	a*	b*
II 47/1	VPI	57,12 ± 5,03 Cc	-16,97 ± 2,72 Aa	33,39 ± 3,15 Dc
	VP	54,93 ± 4,41 Bc	-0,69 ± 9,03 ABb	30,66 ± 3,20 Cc
	VMP	46,79 ± 3,52 Ab	17,39 ± 5,90 Bc	22,84 ± 3,63 ABb
	MV	37,05 ± 4,52 Aa	23,26 ± 6,03 Ad	12,86 ± 6,10 Ba
BRS 235	VPI	48,72 ± 3,43 Ab	-10,12 ± 2,08 Ba	19,07 ± 3,99 Ab
	VP	52,77 ± 3,26 ABc	2,74 ± 7,94 BCb	23,49 ± 3,10 Ac
	VMP	48,48 ± 3,55 ABb	18,98 ± 5,12 BCc	20,38 ± 3,68 Ab
	MV	41,63 ± 3,55 Ba	27,21 ± 4,31 Bd	14,83 ± 4,59 Ba
BRS 236	VPI	58,02 ± 2,67 Cc	-10,47 ± 1,82 Ba	27,46 ± 2,54 Cc
	VP	58,08 ± 3,36 Cc	3,68 ± 7,05 Cb	29,59 ± 2,81 Cc
	VMP	51,49 ± 3,46 Cb	22,13 ± 4,19 Cc	24,82 ± 4,38 Bb
	MV	42,17 ± 4,00 Ba	26,22 ± 2,92 ABd	13,65 ± 3,62 Ba
BRS 237	VPI	52,15 ± 4,71 Bb	-13,60 ± 6,90 ABa	24,35 ± 2,78 Bb
	VP	54,96 ± 4,75 Bc	3,38 ± 9,57 Cb	26,82 ± 3,92 Bb
	VMP	51,53 ± 4,91 Cb	20,84 ± 7,25 BCc	24,40 ± 4,01 Bb
	MV	40,41 ± 2,67 Ba	25,71 ± 3,93 ABd	9,78 ± 3,90 Aa
BRS 238	VPI	48,28 ± 3,79 Aab	-14,41 ± 1,45 Aa	24,99 ± 3,63 BCa
	VP	50,20 ± 6,58 Ab	-3,84 ± 6,21 Ab	25,87 ± 6,26 ABab
	VMP	49,54 ± 5,37 BCb	12,76 ± 7,46 Ac	27,86 ± 7,14 Cbc
	MV	46,55 ± 6,87 Ca	27,62 ± 5,43 Bd	30,31 ± 7,42 Cc

* Verde pequeno e imaturo (VPI); verde predominante (VP); vermelho predominante (VMP); maduro e vermelho (MV).

* Índice de luminosidade (L); mudança da cor verde para vermelha (a); mudança da cor azul para amarela (b).

* Para cada variável, letra minúscula diferente indica diferença estatística em P<0.05 entre os estádios de acordo com teste de Tukey. Para cada variável, diferente letra maiúscula indica diferença estatística em P<0.05 entre as cultivares de acordo com teste de Tukey.

no entanto com o avanço do amadurecimento, a luminosidade diminuiu. Com relação ao índice a*, o qual representa mudança da cor verde para vermelha, os clones de aceroleira apresentaram um aumento significativo com o amadurecimento como resultado da degradação da clorofila e evidenciado pelo acúmulo do conteúdo de antocianinas totais (Tabela 4). O índice b*, que indica mudança da cor azul para amarela, decaiu significativamente com o amadurecimento e os frutos de acerola no estágio maduro apresentaram valores de b* menores do que os de a*, demonstrando menor intensidade da cor

amarela do que da cor vermelha, uma característica desejável já que o mercado busca frutos com coloração avermelhada, o que é mais atrativo aos consumidores. Resultado semelhante foi observado por Adriano, Leonel e Evangelista (2011). Contudo, para o clone BRS 238 os valores de b^* aumentaram significativamente com o amadurecimento e no estágio maduro apresentou maior intensidade da cor amarela evidenciada pela cor alaranjada da casca nos frutos desse clone.

4.2. Compostos fenólicos

As mudanças nos compostos antioxidantes fenólicos durante o desenvolvimento dos clones de aceroleira estão apresentadas na Tabela 4.

O conteúdo de polifenóis solúveis totais (PST) diminuiu significativamente durante o desenvolvimento dos frutos dos clones de aceroleira e o maior declínio foi observado durante o crescimento, entre os estádios verde pequeno e imaturo (VPI) e verde predominante (VP). No estágio verde pequeno e imaturo (VPI), os clones BRS 236 e II47/1 apresentaram maior conteúdo de polifenóis, 4370,81 mg EAG. 100 g⁻¹ polpa e 4202,08 mg EAG. 100 g⁻¹ polpa, respectivamente. Contudo, não foi observado diferença estatística entre eles. Enquanto no estágio maduro, o clone II47/1 apresentou o maior conteúdo, 1679,27 mg EAG. 100 g⁻¹ polpa. Segundo Kulkarni e Aradhya (2005), a diminuição no conteúdo de polifenóis durante o amadurecimento reduz a adstringência do fruto, o que consiste em uma qualidade sensorial desejável. Esse declínio evidenciado pode ser devido a sua polimerização ou oxidação pela atividade da enzima polifenoloxidase (SHWARTZ *et al.*, 2009). Lima *et al.* (2005) estudaram diferentes genótipos de acerola em três estádios de maturação e também relataram uma diminuição significativa no conteúdo de polifenóis durante o amadurecimento. Comportamento semelhante também foi relatado em outros frutos, como romã (SHWARTZ *et al.*, 2009), *Vaccinium macrocarpon* (CELIK *et al.*, 2008) e goiaba (BASHIR; ABU-GOUKH, 2003).

Flavonóides representam um grande grupo de compostos fenólicos com funções fisiológicas na reprodução de plantas e mecanismos de defesa contra microorganismos e fotooxidação, além de contribuir para as características de qualidade de produtos alimentares frescos e transformados, incluindo adstringência, sabor, textura e cor (HARUENKIT *et al.*, 2010; VVEDENSKAYA; VORSA, 2004). Antocianinas e flavonóides amarelos, dentre todos os flavonóides, são os principais responsáveis pela pigmentação de flores e frutas para atrair polinizadores e disseminadores de sementes (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008). Além

do seu papel na fisiologia das plantas, os flavonóides estão associados com a promoção da saúde em humanos. Estudos demonstram que o consumo de flavonóides previne problemas cardiovasculares e câncer em seres humanos (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2011; NAGAPRASHANTHA *et al.*, 2011; NEUHOUSER, 2004), o que está fortemente relacionado ao seu elevado potencial antioxidante (HUBER, RODRIGUEZ-AMAYA, 2008). Apesar da diminuição no conteúdo de PST durante o desenvolvimento da acerola, o conteúdo de flavonóides amarelos, bem como o de antocianinas totais, mostraram um aumento evidente ao longo do amadurecimento, o que pode estar associado a mudança de cor observada no fruto com o amadurecimento (Tabela 3). De acordo com Kalt *et al.* (2003) durante o amadurecimento ocorrem mudanças no conteúdo de fenólicos totais, como síntese de antocianinas e, em geral, diminuição do conteúdo de outros compostos fenólicos. Além disso, uma diminuição dos fenólicos totais podem contribuir para a biossíntese do anel flavilium constituinte das antocianinas. Castrejón *et al.* (2008) também relataram que a biossíntese de flavonóides está fortemente associada com os estádios do desenvolvimento.

Os frutos dos clones de aceroleira estudados apresentaram baixo conteúdo de flavonóides amarelos nos estádios iniciais do desenvolvimento, apresentando um aumento mais intenso com o amadurecimento, entre os estádios vermelho predominante (VMP) e maduro e vermelho (MV). Destacando-se no estádio maduro, os clones BRS 237 e BRS 235 com o maior (10,06 mg. 100 g⁻¹ polpa) e o menor (6,46 mg. 100 g⁻¹ polpa) conteúdo de flavonóides amarelos, respectivamente, o que caracteriza a cor laranja da polpa dos clones avaliados, com exceção do BRS 237, cuja polpa é vermelho escuro. Contudo, embora este clone tenha apresentado o maior conteúdo de flavonóides amarelos possivelmente outros pigmentos se destacam, como as antocianinas, determinando a sua cor vermelha resultante do amadurecimento.

A quercetina, um flavonol de coloração amarela, é conhecido como o flavonóide de maior potencial antioxidante (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008) com potente atividade anti-inflamatória (MEDINA *et al.*, 2002) e, mais especificamente a quercetina proveniente da acerola, excelente efeito antiglicêmico (HANAMURA; HAGIWARA; KAWAGISHI, 2005). Na acerola, a quercetina foi um composto presente durante todo o desenvolvimento do fruto e no estádio maduro foi observado o maior conteúdo. Os resultados obtidos mostram que apesar da diminuição no conteúdo de vitamina C (Tabela 2), em acerolas maduras outro poderoso antioxidante, a quercetina, é acumulado, acrescentando ao fruto suas propriedades nutricionais antioxidantes. Em todos os clones de aceroleira, a principal quercetina identificada no estádio maduro foi a quercetina-3-ramnosídeo, levando em

consideração o íon molecular em m/z 449 e o fragmento com m/z 303. Contudo, outra quercetina, a quercetina-3-glucosídeo, também foi identificada nos estádios imaturo (VPI) e maduro (MV) dos clones II 47/1 e BRS 236. No estágio maduro, os frutos do clone BRS 237 apresentaram maior conteúdo de quercetina, 33,49 mg. 100 g⁻¹ MS, o que pode estar associado ao seu elevado conteúdo de flavonóides amarelos. Hanamura, Hagiwara e Kawagishi (2005) caracterizaram e isolaram polifenóis de acerola e também identificaram a quercetina 3-ramnosídeo entre os fenólicos presente nessa fruta.

A intensa cor vermelha característica da acerola, um dos mais importantes indicadores de maturação e de qualidade comestível, é devida aos pigmentos antocianicos sintetizados durante o amadurecimento dessa fruta. O conteúdo de antocianinas se manteve baixo até o estágio vermelho predominante (VMP) apresentando, no entanto, um rápido aumento com o amadurecimento (MV). Entre os clones avaliados, os maiores conteúdos de antocianinas foram apresentados pelos II 47/1 e BRS 237 com 17,12 e 17,30 mg. 100g⁻¹ polpa, respectivamente, o que é evidenciado pela cor vermelho intenso característica da casca e da polpa no estágio maduro.

O hormônio etileno é conhecido por regular a síntese de antocianina durante o amadurecimento de frutos como consequência de um desequilíbrio homeostático, caracterizado pelo aumento da produção das EROS que agem como sinalizadores para a regulação da atividade de enzimas-chave envolvidas na síntese de antocianinas (PUERTA-GOMEZ; CISNEROZ-ZEVALLOS, 2011; REYES; VILLARREAL; CISNEROS-ZEVALLOS, 2007). O acúmulo de antocianinas durante a maturação também foi encontrado em ameixa (USENIK *et al.*, 2008), romã (SCHWARTZ *et al.*, 2009) e *Vaccinium macrocarpon* (CELIK *et al.*, 2008). Estudo realizado por Musser *et al.* (2004) mostrou que o conteúdo de antocianinas em acerola variava com a cultivar entre 3,8 à 47,4 mg. 100g⁻¹ polpa.

Na acerola, a principal antocianina identificada foi a cianidina-3-ramnosídeo, levando em consideração o íon molecular em m/z 433 e um fragmento com m/z 287. Os resultados mostraram que o acúmulo de cianidina no final do período de crescimento, bem como os elevados valores, foram encontrados nos frutos maduros, o que está diretamente relacionado com o conteúdo de antocianinas totais. Os frutos maduros dos clones II 47/1 e BRS 237 apresentaram o maior conteúdo de cianidina com 169,45 e 241,11 mg. 100 g⁻¹ MS, respectivamente. Os clones II 47/1 e BRS 236 também apresentaram cianidina-3-ramnosídeo e cianidina-3-glucosídeo (íon de m/z 449 e fragmento com m/z 287) no estágio verde predominante (V).

Tabela 4 - Mudanças nos compostos fenólicos durante o desenvolvimento de frutos de cinco clones de aceroleira cultivados na Chapada do Apodi, Limoeiro do Norte, CE.

Clones	Estádio	Polifenóis solúveis totais (PST)	Flavonóides amarelos	Quercetina-3-ramnosídeo	Antocianinas totais	Cianidina-3-ramnosídeo
		mg EAG.100g ⁻¹ polpa	mg.100g ⁻¹ polpa	mg. 100 g ⁻¹ MS	mg. 100g ⁻¹ polpa	mg. 100 g ⁻¹ MS
II 47/1	VPI	4202 ± 2,15 CDb	6,02 ± 0,74 ABb	19,83 ± 1,49 BCab	0,72 ± 0,17 Aa	-
	VP	1310 ± 1,00 Aa	6,35 ± 0,31 Bb	12,67 ± 1,81 Aba	1,39 ± 0,23 Ba	28,23 ± 7,90 Aa
	VMP	1684 ± 0,48 Ba	4,13 ± 0,30 Aa	16,70 ± 0,33 Bab	2,66 ± 0,24 Bb	57,00 ± 12,09 Bb
	MV	1679 ± 1,59 Ba	7,84 ± 0,45 Bc	24,80 ± 1,10 BCb	17,72 ± 0,91 Cc	169,45 ± 12,52 Dc
BRS 235	VPI	3116 ± 1,69 Bb	6,68 ± 0,66 Bb	17,87 ± 0,76 Aba	0,45 ± 0,31 Aab	-
	VP	1351 ± 0,29 Aa	5,00 ± 0,11 Aa	22,24 ± 6,18 Ca	0,30 ± 0,04 Aa	22,71 ± 1,66 Aa
	VMP	1215 ± 0,74 Aba	4,43 ± 0,14 ABa	19,25 ± 4,98 Ba	1,31 ± 0,16 Ab	27,84 ± 1,61 Aa
	MV	969 ± 0,74 ABa	6,46 ± 0,26 Ab	21,77 ± 3,50 Ba	6,49 ± 0,28 Ac	58,52 ± 1,19 Ab
BRS 236	VPI	4371 ± 9,92 Db	5,12 ± 0,15 Aa	28,18 ± 3,63 Ca	0,19 ± 0,10 Aa	-
	VP	1641 ± 1,09 Aa	4,70 ± 0,21 Aa	21,54 ± 2,97 Bca	0,65 ± 0,10 Aa	24,30 ± 4,96 Aa
	VMP	1294 ± 2,15 ABa	5,70 ± 0,35 Ba	19,57 ± 2,92 Ba	1,88 ± 0,21 Aa	46,07 ± 6,59 ABb
	MV	1099 ± 0,89 ABa	9,28 ± 0,27 CDb	23,59 ± 0,05 Ba	9,12 ± 0,46 ABb	148,03 ± 9,53 Cc
BRS 237	VPI	2131 ± 2,77 Ab	8,75 ± 1,10 Cb	9,91 ± 5,50 Aa	1,82 ± 0,29 Ba	-
	VP	949 ± 0,99 Aa	5,35 ± 0,70 ABa	13,71 ± 3,84 ABCa	1,64 ± 0,12 Ba	32,75 ± 5,32 Aa
	VMP	888 ± 0,39 Aa	5,23 ± 0,37 ABa	24,80 ± 3,98 Bb	4,21 ± 0,37 Cb	92,07 ± 9,43 Cb
	MV	1021 ± 0,57 ABa	10,06 ± 0,69 Dc	33,49 ± 3,61 Cb	17,30 ± 1,01 Cc	241,11 ± 11,11 Ec
BRS 238	VPI	3630 ± 1,10 BCb	5,40 ± 0,19 ABa	8,55 ± 1,22 Aa	0,79 ± 0,04 ABa	-
	VP	1501 ± 0,24 Aa	4,94 ± 0,26 Aa	6,23 ± 2,22 Aa	1,16 ± 0,15 ABab	41,83 ± 8,46 Aa
	VMP	1237 ± 0,35 ABa	4,87 ± 0,25 ABa	6,57 ± 2,11 Aa	2,14 ± 0,20 ABb	42,71 ± 2,66 ABa
	MV	931 ± 0,45 Aa	8,10 ± 0,28 BCb	12,81 ± 3,85 ABa	7,42 ± 0,18 Ac	104,87 ± 15,00 Bb

*Verde pequeno e imaturo (VPI); verde predominante (VP); vermelho predominante (VMP); maduro e vermelho (MV).

* Para cada variável, letra minúscula diferente indica diferença estatística em P<0.05 entre os estádios de acordo com teste de Tukey. Para cada variável, diferente letra maiúscula indica diferença estatística em P<0.05 entre as cultivares de acordo com teste de Tukey.

Em acerola, observamos que apesar da quercetina estar presente durante todo o período de desenvolvimento e amadurecimento, seu conteúdo foi muito menor quando comparado ao de cianidina, principalmente nos frutos maduros, o que pode explicar a coloração vermelha da acerola nesse estágio. Segundo Hanamura, Hagiwara e Kawagishi (2005), a antocianina cianidina-3-ramnosídeo identificada em acerola mostrou uma forte capacidade de neutralização do radical superóxido (O_2^-), semelhante à apresentada pela quercetina e os autores explicaram que a atividade antioxidante está fortemente correlacionada com o número de hidroxilas do anel B da estrutura dos polifenóis.

De acordo com De Rosso *et al.* (2008), a cianidina 3-ramnosídeo foi também a principal antocianina encontrada em acerolas 'Waldy Cati 30' e 'Olivier' variando de 76 a 78% do conteúdo de antocianinas totais. Brito *et al.* (2007) identificaram em acerolas cianidina 3-ramnosídeo (70%) e pelargonidina-3-ramnosídeo (30%) como as principais antocianinas. Desta forma, podemos considerar que na fase final do amadurecimento da acerola, o intenso aumento do conteúdo de antocianinas totais a torna o principal polifenol presente nos frutos maduros, como também foi evidenciado por Hanamura, Uchida e Aoki (2008).

4.3. Atividades das enzimas antioxidantes

Sendo o amadurecimento de frutos descrito como um fenômeno oxidativo, surgiram indagações como, se o aumento do estresse oxidativo que acompanha o amadurecimento estaria associado a uma redução da capacidade de catabolizar as EROS pelas enzimas antioxidantes. Pois, observamos que em acerolas os componentes antioxidantes não enzimáticos (Tabelas 2 e 4) não são os únicos responsáveis pela neutralização das EROS e proteção celular contra os danos oxidativos promovido pela peroxidação lipídica (Tabela 6). Assim, a atividade das enzimas antioxidantes foram determinadas durante o desenvolvimento da acerola (Tabela 5).

A enzima dismutase do superóxido (SOD), pertence a uma classe de metaloenzimas que catalisa a degradação do ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2), e tem sido considerada como uma defesa essencial contra a potencial toxicidade do oxigênio (HUANG *et al.*, 2007). Ao longo do desenvolvimento da acerola, a atividade da enzima SOD diminuiu, embora não fossem observadas mudanças significativas nos clones BRS 235 e BRS 236. Contudo, apesar da redução observada, no estágio maduro, os frutos dos clones de aceroleira apresentaram maior atividade da SOD quando comparada as observadas por Oliveira *et al.* (2011). A redução da atividade da SOD

Tabela 5 - Mudanças na atividade de enzimas antioxidantes, na peroxidação lipídica e na atividade antioxidante total (AAT) durante o desenvolvimento de frutos de cinco clones de aceroleira cultivados na Chapada do Apodi, Limoeiro do Norte, CE.

Clones	Estádio	SOD	CAT	APX	Peroxidação Lipídica	AAT
		10 ² UAE. mg ⁻¹ proteína	10 ² μmol H ₂ O ₂ . mg ⁻¹ proteína min	μmol H ₂ O ₂ . mg ⁻¹ proteína min	nmol MDA. g ⁻¹ polpa	μM Trolox. g ⁻¹ polpa
II 47/1	VPI	129,33 ± 4,17 Dc	456,82 ± 37,87 Bc	183,91 ± 15,57 Bb	28,79 ± 3,13 ABab	148,64 ± 10,04 Bc
	VP	49,87 ± 4,70 Ab	444,82 ± 43,11 ABb	183,41 ± 29,52 ABb	20,67 ± 1,19 Aa	96,67 ± 15,16 Aa
	VMP	28,77 ± 1,14 Aa	332,40 ± 19,29 ABab	130,25 ± 14,32 ABab	32,98 ± 1,06 ABb	125,43 ± 4,76 Cb
	MV	22,96 ± 1,37 Aa	227,95 ± 25,67 ABa	96,51 ± 13,37 Aa	73,68 ± 1,50 Cc	119,97 ± 1,06 Db
BRS 235	VPI	61,73 ± 0,84 Ba	224,83 ± 7,80 Aa	110,66 ± 5,93 Aa	36,64 ± 1,01 Ba	148,13 ± 9,41 Bc
	VP	65,82 ± 0,40 Ba	351,60 ± 16,69 Aab	158,84 ± 20,95 Aab	35,54 ± 1,70 Ba	120,20 ± 4,86 Bb
	VMP	64,55 ± 1,62 Ca	455,51 ± 22,22 Bb	179,72 ± 40,08 Bb	40,05 ± 3,73 BCab	108,16 ± 13,63 BCab
	MV	62,65 ± 2,19 Ca	291,72 ± 24,34 ABab	141,96 ± 9,86 ABab	46,10 ± 2,27 Bb	91,44 ± 5,75 BCa
BRS 236	VPI	47,80 ± 5,52 Aa	310,99 ± 19,65 Aa	98,25 ± 10,42 Aa	36,72 ± 2,13 Ba	160,46 ± 4,87 Bc
	VP	85,82 ± 3,56 Cc	618,19 ± 46,52 Cb	235,68 ± 19,71 Bc	34,76 ± 4,38 Ba	124,60 ± 8,53 Bb
	VMP	64,50 ± 7,32 Cb	532,48 ± 14,96 Cb	147,82 ± 29,24 ABab	33,28 ± 2,82 ABa	99,75 ± 10,66 Ba
	MV	50,28 ± 3,14 Ba	349,05 ± 27,47 Ba	161,82 ± 49,56 Bb	48,76 ± 1,07 Bb	105,61 ± 2,26 CDab
BRS 237	VPI	181,61 ± 3,47 Ed	917,61 ± 49,70 Cc	365,38 ± 21,29 Cc	36,96 ± 7,00 Ba	111,42 ± 1,89 Ab
	VP	100,79 ± 4,27 Dc	510,59 ± 23,70 BCb	225,41 ± 24,00 Bb	39,43 ± 6,50 Ba	87,13 ± 4,84 Aa
	VMP	81,27 ± 3,84 Db	457,57 ± 35,30 BCb	174,11 ± 3,46 Bab	43,23 ± 1,80 Ca	91,70 ± 9,52 ABab
	MV	61,25 ± 1,61 Ca	290,25 ± 13,06 ABa	125,40 ± 6,42 ABa	79,89 ± 7,04 Cb	75,59 ± 3,96 ABa
BRS 238	VPI	75,22 ± 3,39 Cb	637,63 ± 25,28 Bc	198,95 ± 30,26 Bb	26,67 ± 2,15 Aa	123,00 ± 8,44 Ab
	VP	43,15 ± 1,40 Aa	398,40 ± 38,03 ABb	123,54 ± 4,42 Aa	22,45 ± 0,89 Aa	101,43 ± 10,60 ABb
	VMP	43,78 ± 5,36 Ba	216,45 ± 11,72 Aa	98,52 ± 9,85 Aa	24,11 ± 1,51 Aa	76,11 ± 10,12 Aa
	MV	43,15 ± 0,73 Ba	170,66 ± 5,06 Aa	94,59 ± 2,57 Aa	34,27 ± 0,46 Ab	59,75 ± 0,26 Aa

*Verde pequeno e imaturo (VPI); verde predominante (VP); vermelho predominante (VMP); maduro e vermelho (MV).

* Dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT); peroxidase do ascorbato (APX).

* Para cada variável, letra minúscula diferente indica diferença estatística em P<0.05 entre os estádios de acordo com teste de Tukey. Para cada variável, diferente letra maiúscula indica diferença estatística em P<0.05 entre as cultivares de acordo com teste de Tukey.

ocorreu de forma mais intensa nos frutos dos clones II 47/1, de 12.933 para 2.296 UAE. mg^{-1} proteína, e BRS 237, de 18.161 para 6.125 UAE. mg^{-1} proteína. Para estes dois clones, o declínio na atividade da SOD foi concomitante com o aumento da peroxidação lipídica (Tabela 6). Contudo, apenas no clone BRS 237 foi observado uma correlação negativa entre a SOD e a peroxidação lipídica com o amadurecimento. Resultados similares também foram relatados para polpa de laranja (HUANG *et al.*, 2007) e tomate (MONDAL *et al.*, 2004).

As enzimas antioxidantes catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) estão envolvidas com a neutralização de H_2O_2 nas células vegetais. Os resultados mostram que a atividade da CAT difere significativamente entre os clones. Com o amadurecimento, nos clones II 47/1, BRS 238 e BRS 237 foi observado um declínio significativo, enquanto que nos clones BRS 235 e BRS 236 não houve mudanças significativas. Os clones BRS 237 e BRS 238 apresentaram uma progressiva redução, três vezes maior quando comparada com o clone II 47/1, entre os estádios verde pequeno e imaturo e maduro e vermelho, de 91.761 (VPI) para 29.025 (MV) $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína} \cdot \text{min}^{-1}$ e de 63.763 (VPI) para 17.066 (MV) $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína} \cdot \text{min}^{-1}$, respectivamente.

Assim como observamos na atividade da SOD, o declínio na atividade da CAT nos clones II 47/1 e BRS 237, também podem estar associado ao aumento da peroxidação lipídica evidenciado pela correlação negativa entre essas variáveis (Tabela 6). O clone BRS 236 mostrou a maior atividade da CAT no estágio maduro e vermelho (MV), 34.905 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína} \cdot \text{min}^{-1}$, embora não tenha diferido estatisticamente dos clones BRS 237, BRS 235 e II 47/1. A diminuição na atividade da CAT foi também relatada em polpa de laranja (HUANG *et al.*, 2007) e em amoras (WANG; JIAO, 2001).

Os clones de aceroleira apresentaram comportamento diferente quanto a participação dessas enzimas no controle do aumento da peroxidação lipídica ao longo do amadurecimento (Tabela 6). Nos frutos do clone BRS 237, as enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX apresentaram uma correlação negativa com a peroxidação lipídica ao longo do amadurecimento, o que indica o seu envolvimento na regulação do estresse oxidativo, enquanto nos clones II 47/1 e BRS 236, apenas as enzimas antioxidantes CAT e APX exibiram correlação negativa com a peroxidação lipídica. Nos frutos dos clones BRS 238 e BRS 235 não observamos a participação das enzimas antioxidantes no controle da peroxidação lipídica indicando que provavelmente os antioxidantes não enzimáticos estejam envolvidos na regulação do aumento do estresse oxidativo.

4.4. Atividade antioxidante total e peroxidação de lipídeos

A atividade antioxidante total (AAT) para os cinco clones de aceroleira foi significativamente reduzida durante o desenvolvimento (Tabela 5) e a maior AAT foi observada nos frutos no estágio verde pequeno e imaturo (VPI). Estes resultados podem ser justificados pela redução ocorrida nos conteúdos de polifenóis (Tabela 4) e de vitamina C (Tabela 2). No estágio maduro, os frutos dos clones II 47/1 e BRS 236 apresentaram os maiores valores com 119,97 e 105,61 μM Trolox. g^{-1} polpa, respectivamente, podendo estar associados ao elevado conteúdo de vitamina C, de polifenóis totais e de quercetina observado nesses clones. Righetto *et al.* (2005) também atribuíram a atividade antioxidante total em acerola não somente ao seu alto conteúdo de vitamina C, mas também aos compostos fenólicos. Em estudo realizado por Oliveira *et al.* (2011) foi observado que a AAT do clone de aceroleira II 47/1 estava fortemente correlacionada com o conteúdo de SS, assim como os polifenóis e a vitamina C, entretanto, para o clone BRS 235 a AAT e a vitamina C estavam negativamente correlacionados com o conteúdo de SS, de polifenóis e de antocianinas. Portanto, as variáveis podem contribuir de forma diferente para AAT em relação a cada clone de acerola, como podemos observar no clone BRS 237, o qual apresentou elevado conteúdo de todas as variáveis fenólicas avaliadas, mas comparativamente baixo conteúdo de vitamina C e não apresentou uma alta AAT. Em ameixas, Puerta-Gomez e Cisneros-Zevallos (2011), observaram que a atividade antioxidante estava fortemente correlacionada com o conteúdo de fenóis, mas não com o conteúdo de antocianinas e explicaram que as antocianinas representam apenas uma fração (20%) do conteúdo total de fenóis e não influenciariam na atividade antioxidante global.

Os lipídeos constituintes da membrana celular são altamente suscetíveis à oxidação pela ação das espécies reativas do oxigênio (EROS) e, assim, o estabelecimento de um estresse oxidativo induziria ao acúmulo de produtos da peroxidação lipídica, como malondialdeído (MDA) (JIMENEZ *et al.*, 2002a; YANG *et al.*, 2008). Portanto, o grau de peroxidação lipídica pode ser utilizado como um indicador do estresse oxidativo e seria esperado um aumento com o amadurecimento de frutos, pois esse processo do desenvolvimento é considerado um fenômeno oxidativo, o que resultaria em uma perda da integridade da membrana (JIMENEZ *et al.*, 2002a), característica do amaciamento dos frutos.

Foi observado um aumento significativo do grau de peroxidação lipídica entre os estádios VMP e MV indicando a ocorrência de um aumento do desequilíbrio oxidativo ao longo do processo de amadurecimento da acerola (Tabela 5). Entre os clones estudados, no

estádio maduro, o mais elevado grau de peroxidação lipídica foi observada nos frutos do BRS 237 e do II 47/1, 73,68 e 79,89 nmol MDA. g⁻¹ polpa, respectivamente. Ao analisarmos a participação do sistema de defesa antioxidante, ao longo do amadurecimento da acerola, sobre a peroxidação lipídica (Tabela 6) evidenciamos que a vitamina C é o principal antioxidante atuante no controle desse processo oxidativo, pois nos cinco clones de aceroleira analisados observamos uma correlação inversa entre o conteúdo de vitamina C e o grau de peroxidação lipídica. Desta forma, a vitamina C, além da sua importância sobre a nutrição humana, é responsável pelo equilíbrio redox e pela proteção das frutas.

Tabela 6 - Correlação entre as variáveis antioxidantes e o grau de peroxidação lipídica através do coeficiente de Pearson durante o desenvolvimento de frutos de cinco clones de aceroleira cultivados na Chapada do Apodi, Limoeiro do Norte, CE.

Variáveis	Coeficiente de Correlação				
	Peroxidação Lipídica (nmol MDA.g ⁻¹ polpa)				
	II 47/1	BRS 235	BRS 236	BRS 237	BRS 238
CAT (10 ² µmol H ₂ O ₂ . mg ⁻¹ proteína. min ⁻¹)	-0,674 *	-	-0,585 *	-0,684 **	-
APX (µmol H ₂ O ₂ .mg ⁻¹ proteína. min ⁻¹)	-0,788 **	-	-	-0,647 *	-
SOD (10 ² UAE. mg ⁻¹ proteína)	-	-	-	-0,627 *	-
Antocianinas Totais (mg. 100g ⁻¹ polpa)	0,977 **	0,853 **	0,837 **	0,934 **	0,867 **
Flavonóides Amarelos (mg. 100g ⁻¹ polpa)	0,605 *	-	0,833 **	0,637 *	0,934 **
Polifenóis (mg EAG.100g ⁻¹ polpa)	-	-	-	-	-
Vitamina C Total (mg. 100g ⁻¹ polpa)	-0,773 **	-0,800 **	-0,566 *	-0,802 **	-0,569 *
AAT(µM Trolox. g ⁻¹ polpa)	-	-0,726 **	-	-0,690 **	-0,578 *

* Catalase (CAT); peroxidase do ascorbato (APX); dismutase do superóxido (SOD); Atividade antioxidante total (AAT).

* Correlação variáveis x peroxidação lipídica considerando P ≤ 0.05

** Correlação variáveis x peroxidação lipídica considerando P ≤ 0.01

Estudos têm evidenciado que durante o amadurecimento de frutos as injúrias oxidativas são aceleradas devido um declínio do seu sistema antioxidante resultando na formação de radical superóxido e o acúmulo de peróxido de hidrogênio levando a peroxidação de lipídeos e proteínas, o que pode ser utilizado como um indicador de maturidade (JIMÉNEZ *et al.*, 2002b).

Segundo Wang e Jiao (2001), a redução de danos na membrana celular tem sido associada a um aumento na defesa antioxidante contra as EROS. Esses autores observaram que o amadurecimento de quatro cultivares de amoras pretas (*Rubus* SP.) foi acompanhado por uma diminuição na atividade de enzimas antioxidantes e nos componentes antioxidantes não enzimáticos resultando em um aumento do estresse oxidativo e peroxidação de lipídeos. Em tomates, Jiménez *et al.* (2002a) observaram que o acúmulo de H₂O₂ no estágio *breaker* coincidiu com a diminuição na atividade de enzimas antioxidantes promovendo danos oxidativos refletidos no aumento da peroxidação de lipídeos e oxidação de proteínas nesse estágio. Mondal *et al.* (2004) avaliando o sistema antioxidante durante o amadurecimento de duas cultivares de tomate, Seleção-7 (vida útil curta) e ARTH-3 (vida útil longa), observaram que esse processo do desenvolvimento foi acompanhado por um progressivo aumento no estresse peroxidativo/oxidativo e a cultivar com vida útil curta apresentou maior estresse oxidativo quando comparada a cultivar com vida útil longa, o qual estava associado a uma baixa atividade das enzimas antioxidantes podendo esse evento ser responsável por mediar muitas das mudanças físico-químicas que facilitam o amadurecimento precoce dessa cultivar.

5. CONCLUSÃO

O amadurecimento dos frutos dos clones de aceroleira foi acompanhado por um estresse oxidativo progressivo evidenciado, principalmente por uma redução no conteúdo de vitamina C e, em menor grau pela atividade de enzimas antioxidantes e pelo conteúdo de compostos bioativos, que contribui para a qualidade pós-colheita de frutas;

Na acerola, cianidina 3-ramnosídeo e quercetina foram identificados como os principais polifenóis, que, juntamente com a vitamina C são os principais contribuintes para o seu potencial antioxidante e elevado valor nutricional;

Os frutos dos clones II 47/1, BRS 237 e BRS 236 nos estádios de desenvolvimento verde pequeno e imaturo e maduro e vermelho apresentaram os melhores resultados para a maioria das variáveis avaliadas.

REFERÊNCIAS

ADRIANO, E.; LEONEL, S.; EVANGELISTA, R.M. Qualidade de fruto da aceroleira cv. Olivier em dois estádios de maturação. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. E, p. 541-545, 2011.

ALVAREZ-SUAREZ, J.M.; DEKANSKI, D.; RISTIC, S.; RADONJIC, N.V.; PETRONJEVIC, N.D.; GIAMPIERI, F.; ASTOLFI, P.; GONZALÉZ-PARAMÁS, A.M.; SANTOS-BUELGA, C.; TULIPANI, S.; QUILES, J.L.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. Strawberry polyphenols attenuate ethanol-induced gastric lesions in lesions in rats by activation of antioxidant enzymes and attenuation of MDA increase. **Plusone**. v. 6, n. 10, p. 1-11, 2011.

ARAÚJO, P.S.R.; MINAMI, K. Acerola. In: LOPES, R., PAIVA, J.R. **Melhoramento de fruteiras tropicais: Aceroleira**. Viçosa: UFV, 2002. p. 63-100.

ASENJO, C. F.; PENALOZA, A.; MEDINA, P. Characterization of ascorbase present in the fruit of the *Malphigia punicifolia* L. **Federation of America Societies for Experimental Biology**. Bethesda, v.29, n. 1, p.1, 1960.

ASSIS, S.A.; LIMA, D.C.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development. **Food Chemistry**, v. 74, p. 133-137, 2001.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY - A. O. A. C. **Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 18. ed. Maryland: AOAC, 2005.

BASHIR, H.A.; ABU-GOUKH, A.A. Compositional changes during guava fruit ripening. **Food Chemistry**. v. 80, p. 557-563, 2003.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.

BEERS JR, R.F.; SIZER, I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, p. 133-140, 1952.

BRITO, E.S.; ARAÚJO, M.C.P.; ALVES, R.E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B.A.; NOVOTNY, J.A. Anthocyanins present in selected tropical fruits: Acerola, Jambolão, Jussara and Guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, p. 9389-9394, 2007.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

CASTREJÓN, A.D.R.; EICHHOLZ, I.; ROHN, S.; KROH, L.W.; HUYSKENS-KEIL, S. Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. **Food Chemistry**. v. 109, p. 564-572, 2008.

- ÇELİK, H.; ÖZGEN, M.; SERÇE, S.; KAYA, C. Phytochemical accumulation and antioxidante capacity at four maturity stages of cranberry fruit. **Scientia Horticulturae**. v. 117, p. 345-348, 2008.
- DE ROSSO, V.V.; HILLEBRAND, S.; MONTILLA, E.C.; BOBBIO, F.O.; WINTERHALTER, P.; MERCADANTE, A.Z. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* D.C) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 21, p. 291-299, 2008.
- FRANCIS, F.J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, 1982. p. 181-207.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.
- GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 13^o Edição, Piracicaba, Nobel, 1990, 468p.
- HANAMURA, T.; HAGIWARA, T.; KAWAGISHI, H. Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* D.C) fruit. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v. 69, p. 280-286, 2005.
- HANAMURA, T.; MAYAMA, C.; AOKI, H.; HIRAYAMA, Y.; SHIMIZU, M. Antihyperglycemic effect of polyphenols from acerola (*Malpighia emarginata* D.C) fruit. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 70, p. 1813-1820, 2006.
- HANAMURA, T.; USHIDA, E.; AOKI, H. Changes of the composition in acerola (*Malpighia emarginata* D.C) fruit in relation to cultivar, growing region and maturity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 88, p. 1813-1820, 2008.
- HARUENKIT, R.; POOVARODOM, S.; VEARASILP, S.; NAMIESNIK, J.; SLIWKA-KASZYNSKA, M.; PARK, Y.S.; HEO, B.G.; CHO, J.Y.,; JANG, H.G.,; GORINSTEIN, S. Comparison of bioactive compounds, antioxidant and antiproliferative activities of Mon Thong durian during ripening. **Food Chemistry**. v. 118, p. 540-547, 2010.
- HEATH, R.L; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives in Biochemistry and Biophysics**. v. 125, p. 189-198, 1968.
- HUANG, R.; XIA, R.; HU, L.; LU, Y.; WANG, M. Antioxidant activity and oxygenscavenging system in orange pulp during fruit ripening and maturation. **Scientia Horticulturae**, v. 113, p. 166 - 172, 2007.
- HUBER, L.S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Flavonóis e flaconas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**. v. 19, n. 1, p. 97-108, 2008
- HWANG, J.; HODIS, H.N.; SEVANIAN, A. Soy and alfalfa extracts become potent low-density lipoprotein antioxidants in the presence of acerola cherry extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, p. 308-314, 2002.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3°. ed. São Paulo, 1985. v. 1.

JIMENEZ, A.; CREISSEN, G.; KULAR, B.; FIRMIN, J.; ROBINSON, S.; VERHOEYEN, M.; MULLINEAUX, P. Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. **Planta**. v. 214, p. 751-758, 2002a.

JIMÉNEZ, A.; GÓMEZ, J.M.; NAVARRO, E.; SEVILLA, F. Changes in the antioxidative systems in mitochondria during ripening of pepper fruits. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 40, p. 515-520, 2002b

KALT, W.; LAWAND, C.; RYAN, D.; MC DONALD, J.E.; DONNER, H. Oxygen radical absorbing capacity, anthocyanin and phenolic content of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) during ripening and storage. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. v. 128, p. 917-923, 2003.

KULKARNI, A.; ARADHYA, S.M. Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. **Food Chemistry**. v. 93, p. 319-324, 2005.

LACAN, D.; BACCOU, J. High levels of antioxidant enzymes correlate with delayed senescence in nonnetted muskmelon fruits. **Planta**, v. 204, p. 377-382, 1998.

LARRAURI, J.A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, p. 1390-1393, 1997.

LIMA, V.L.A.G.; MÉLO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, D.E.S. Avaliação do teor de antocianinas em polpa de acerola congelada proveniente de 12 frutos de diferentes aceroleiras (*Malpighia emarginata* D.C). **Ciencia y Tecnología Alimentaria**. v. 23, p. 101-103, 2003.

LIMA, V.L.A.G.; MÉLO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; PRAZERES, F.G.; MUSSER, R.S.; LIMA, D.E.S. Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. **Food Chemistry**. v. 90, p. 565-568, 2005.

LIN, L.Z.; HARNLY, J. A screening method for 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, p. 1084-1096, 2007.

McGUIRE, R.G. Reporting of objective colour measurements. **Hort Science**, Alexandria, v.27, p.1254-1255, 1992.

MENICHINI, F; TUNDIS, R; BONESI, M; LOIZZO, M.R; CONFORTI, F; STATTI, G; DE CINDIO, B; HOUGHTON, P.J; MENICHINI, F. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. **Food Chemistry**, v. 114, p. 553-560, 2009.

MEZADRI, T.; VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* D.C) fruits and derivatives. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 21, p. 282-290, 2008.

MIRANDA, M.R.A.; SILVA, F.S.; ALVES, R.E.; FILGUEIRAS, H.A.C.; ARAÚJO, N.C.C. Storage of two types of sapodilla under ambient condition. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 24, n. 3, p. 644-646, 2002.

MONDAL, K.; SHARMA, N.S.; MALHOTRA, S.P.; DHAWAN, K.; SINGH, R. Antioxidant systems in ripening tomato fruits. **Biologia Plantarum**. v. 48, n. 1, p. 49-53, 2004.

MUSSER, R. D. S.; LEMOS, M. A.; DE LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. D. A.; LEDERMAN, I. E.; DOS SANTOS, V. F. Características físico-químicas de acerola do banco ativo de germoplasma em Pernambuco. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 24, p. 556-561, 2004.

NAGAPRASHANTHA, L.D.; VATSYAYAN, R.; SINGHAL, J.; FAST, S.; RODDY, R.; AWASTHI, S.; SINGHAL, S.S. Anti-cancer effects of novel flavonoid vicenin-2 as a single agent and in synergistic combination with docetaxel in prostate cancer. **Biochemical Pharmacology**. v. 82, n. 9, p. 1100-1109, 2011.

NAKANO, Y.; ASADA, K. hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplast. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 867-880, 1981.

NEUHOUSER, M. L. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. **Nutrition and Cancer**. v. 50, p. 1-7, 2004.

NOGUEIRA, R.J.M.C.; MORAES, J.A.P.V.; BURITY, H.A.; SILVA-JÚNIOR, F.S. Efeito do estágio de maturação dos frutos nas características físico-químicas de acerola. **Revista Pesquisa Agrônômica Brasileira**. v. 37, n. 4, p. 463-470, 2002.

OLIVEIRA, L.S.; RUFINO, M.S.M.; MOURA, C.F.H.; CAVALCANTI, F.R.; ALVES, R.E.; MIRANDA, M.R.A. The influence of processing and long-term storage on the antioxidant metabolism of acerola (*Malpighia emarginata* D.C) purée. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v. 23, n. 2, p. 151-160, 2011.

OBANDA, M.; OWUOR, P.O. Flavonol composition and caffeine content of green leaf as quality potential indicators of Kenyan black teas. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 74, p. 209-215, 1997.

PAIVA, J.R. **Clones de aceroleira**. Folders. Brasília: EMBRAPA-CNPAT, 2003. Disponível em <<http://www.cnpat.embrapa.br>> Acesso em 22 de Setembro de 2009.

PRASANNA, V.; PRABHA, T.N.; THARANATHAN, R.N. Fruit ripening phenomena- An overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 47, p. 1-19, 2007.

PUERTA-GOMEZ, A.F; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Postharvest studies beyond fresh market eating quality: Phytochemical antioxidant changes in peach and plum fruit during ripening and advanced senescence. **Postharvest Biology and Technology**. v. 60, p. 220-224, 2011.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

REYES, L.R.; VILLARREAL, J.E.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissue. **Food Chemistry**. v. 101, p. 1254–1262, 2007.

RIGHETTO, A.M.; NETTO, F.M.; CARRARO, F. Chemical composition and antioxidant activity of juice from mature and immature acerola (*Malpighia emarginata* D.C). **Food Science and Technology International**. v. 11, n. 4, p. 315-321, 2005.

ROGIERS, S.Y.; KUMAR, G.N.M.; KNOWLES, N.R. Maturation and ripening of fruit of *Amelanchier alnifolia* Nutt. are accompanied by increasing oxidative stress. **Annals of Botany**, v. 81, p. 203-211, 1998.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. **Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS.+**. Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. 4 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 128).

SHWARTZ, E.; GLAZER, I.; BAR-YA'AKOV, I.; MATITYAHU, I.; BAR-ILA, I.; HOLLAND, D.; AMIR, R. Changes in chemical constituents during the maturation and ripening of two commercially important pomegranate accessions. **Food Chemistry**. v. 115, p. 965-973, 2009.

STROHECKER, R.; HENNING, H.M. **Análisis de vitaminas: métodos comprobados**. Madrid: Paz Montalvo, 1967. 428 p.

THAIPHANIT, S.; ANPRUNG, P. Physicochemical and flavor changes of fragrant banana (*Musa acuminata* AAA group “gross michel”) during ripening. **Journal of Food Processing and Preservation**. v. 34, p. 366-382, 2010.

USENIK, V.; KASTELEC, D.; VEBERIC, R.; STAMPAR, F. Quality changes during ripening of plums (*Prunus domestica* L.). **Food Chemistry**. v. 111, p. 830-836, 2008.

VENDRAMINI, A.L.; TRUGO, L.C. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia punicifolia* L.) at three stages of maturity. **Food Chemistry**. v. 71, p. 195-198, 2000.

VVEDENSKAYA, I.O.; VORSA, N. Flavonoid composition over fruit development and maturation in America cranberry, *Vaccinium macrocarpon* Ait. **Plant Science**. v. 167, p. 1043-1054, 2004.

ZEASHAN, H.; AMRESH, G.; SINGH, S.; RAO, C.V. Hepatoprotective activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals. **Food Chemistry**. v. 46, n. 11, p. 3417-3421, 2008.

ZHU, S.; SUN, L.; LIU, M.; ZHOU, J. Effect of nitric oxide on reactive oxygen species and antioxidant enzymes in kiwifruit during storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 88, p. 2324–2331, 2008.

YANG, S; SU, X; PRASAD, K.N; YANG, B; CHENG, G; CHEN, Y; YANG, E; JIANG, Y. Oxidation and peroxidation of postharvest banana fruit during softening. **Pakistan Journal of Botany**. v. 40, n. 5, p. 2023-2029, 2008.

YANG, Z.; ZHENG, Y.; CAO, S. Effect of high oxygen atmosphere storage on quality, antioxidant enzymes, and DPPH-radical scavenging activity of Chinese bayberry fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 176-181, 2009.

WANG, S.Y.; JIAO, H. Changes in oxygen-scavenging systems and membrane lipid peroxidation during maturation and ripening in blackberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, p. 1612-1619, 2001.

CAPÍTULO 3

METABOLISMO ANTIOXIDANTE DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS DE CLONES DE SAPOTIZEIRO (*Manilkara zapota* L.)

RESUMO

Reações envolvendo espécies reativas do oxigênio (EROS) são uma característica intrínseca do amadurecimento de frutos, desta forma o sistema antioxidante de defesa exerce uma importante função ao longo do seu desenvolvimento. O objetivo desse trabalho foi analisar as principais mudanças no sistema antioxidante e sua significância durante o desenvolvimento do sapoti (*Manilkara zapota* L.). Frutos de duas cultivares de sapoti, ‘Sapota Tropical’ e ‘Sapoti Ipa-curú’, provenientes da Estação Experimental do Vale do Curú da Embrapa Agroindústria Tropical, foram marcados em um estágio inicial de maturação, com 10 mm de diâmetro transversal, colhidos após 90, 120, 150 e 180 dias (maturidade fisiológica) de desenvolvimento, em adição os frutos na maturidade fisiológica amadureceram em laboratório a 25 °C e 60% de U.R, e analisados quanto aos parâmetros de qualidade pós-colheita, compostos antioxidantes, atividade antioxidante total (AAT), atividade das enzimas antioxidante e a integridade da membrana celular. O amadurecimento promoveu mudanças desejáveis na qualidade do sapoti. O conteúdo de flavonóides amarelos, polifenóis solúveis totais (PST) e vitamina C diminuíram significativamente ao longo do desenvolvimento dos sapotis e os frutos colhidos aos 90 dias apresentaram o maior conteúdo de compostos antioxidantes. Durante o desenvolvimento dos sapotis houve uma diminuição da AAT resultante principalmente da redução do conteúdo dos compostos fenólicos, os flavonóides amarelos e os polifenóis totais, pois o sapoti não é considerado uma boa fonte de vitamina C. A atividade das enzimas antioxidantes dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) diminuiu ao longo do amadurecimento o que contribuiu para um aumento do estresse oxidativo, evidenciado pelo aumento da peroxidação de lipídeos (PL), sendo, portanto necessário para facilitar muitas das mudanças relacionadas com a maturação do sapoti. Além disso, em sapotis, as enzimas antioxidantes mostraram estar envolvidas no equilíbrio entre a produção e a eliminação das EROS, formadas pela degradação dos lipídios de membrana, mantendo a integridade dos frutos. O amadurecimento do sapoti foi acompanhado por um progressivo estresse oxidativo devido, principalmente, a diminuição da atividade de enzimas antioxidantes.

Palavras-chave: *Manilkara zapota* L.; atividade antioxidante; enzimas antioxidantes; compostos bioativos; amadurecimento.

1. INTRODUÇÃO

O sapoti (*Manilkara zapota* L.) é um fruto tropical nativo do México e da América Central com grande potencial agrônômico de reconhecido sabor doce levemente adstringente e característico aroma delicado, o que torna esse fruto tão interessante para exploração comercial (BRITO; NARAIN, 2002; MA *et al.*, 2003). Esse fruto contém as vitaminas A, B1, B2 e B5, além de cálcio, ferro e fósforo e quando maduro apresentam alta concentração de fenólicos totais (4,5%), mas baixo conteúdo de vitamina C (12 mg 100 g⁻¹) (MIRANDA *et al.*, 2002; OLIVEIRA; AFONSO; COSTA, 2011).

O sapoti apresenta uma atividade antioxidante extremamente elevada e a contribuição do ascorbato para a sua atividade antioxidante total é muito baixa (<0,1%) sugerindo que os compostos fenólicos, conhecidos por suas propriedades antioxidantes na saúde humana, bem como seus efeitos no retardo e/ou prevenção da oxidação de alimentos, são os principais contribuintes (NEUHOUSER, 2004; LEONG; SHUI, 2002). Ma *et al.* (2003) identificaram em sapotis dois fenólicos derivados do ácido clorogênico e relataram em estudos posteriores o elevado potencial antioxidante desses fenólicos, bem como o seus efeitos citotóxicos *in vitro* contra células cancerosas do cólon humano. Shui, Wong e Leong (2004) relataram que em estudos anteriores a elevada concentração de taninos em sapotis imaturos poderia ser responsável por sua alta atividade antioxidante.

O estágio de maturação é um importante fator que influencia a qualidade de frutas e hortaliças, pois durante o amadurecimento as inúmeras modificações bioquímicas, fisiológicas e estruturais que ocorrem são responsáveis por determinarem seus atributos sensoriais e propriedade antioxidante (MENICHINI *et al.*, 2009). Estudos têm evidenciado que reações envolvendo espécies reativas do oxigênio (EROS) são uma característica intrínseca do amadurecimento de frutos e que a perda gradual na habilidade de neutralizar as EROS, devido a mudanças nos componentes antioxidantes dos frutos, pode ser central para muitas das alterações metabólicas associadas com o amadurecimento (JIMÉNEZ *et al.*, 2002; ROGIERS *et al.*, 1998). Desta forma, o estresse oxidativo ocasionado como consequência do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas do oxigênio e a atividade do sistema antioxidante podem ser requisitos para mediar muitas das mudanças estrutural e físico-química que caracterizam o amadurecimento dos frutos.

2. OBJETIVO

Investigar as mudanças nos componentes enzimáticos e não enzimáticos do sistema de defesa antioxidante e o papel dos mesmos na degradação de membranas biológicas durante desenvolvimento e amadurecimento de frutos de clones de sapotizeiro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção e manuseio dos frutos

Frutos de duas cultivares de sapotizeiro, Sapota Tropical (BRS 228) e Sapoti Ipacuru (BRS 227), provenientes da Estação Experimental do Vale do Curu da Embrapa Agroindústria Tropical, localizada em Paraipaba - CE, foram marcados em um estágio inicial do desenvolvimento em Maio de 2009 com temperatura e pluviosidade média de 30,4 °C e 252,8 mm, respectivamente, medindo 10 mm de diâmetro transversal, e colhidos após 90, 120, 150 e 180 dias (maturidade fisiológica).

A Estação Experimental do Vale do Curu está entre os paralelos 3° 17' e 39° 15' Sul e distante 100 km de Fortaleza. O clima é do tipo Bsh'i (Köppen) com maior concentração de chuvas ocorrendo de fevereiro a maio, e o restante do ano é seco. A média de precipitação anual é 1050 mm e de temperatura 27 °C, segundo a Estação Meteorológica de Pentecoste, CE.

Foram colhidos vinte frutos para cada estágio do desenvolvimento e transportados acondicionados em caixas de colheita, forradas com espuma de poliestireno, para o Laboratório de Fisiologia e Tecnologia Pós-Colheita da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, CE. Vinte frutos excedentes colhidos aos 180 dias após a marcação foram deixados amadurecer no laboratório em condição ambiente de 25 °C e 60% U.R por aproximadamente dez dias.

3.2. Condução do experimento

No laboratório de Fisiologia e Tecnologia Pós-Colheita da Embrapa Agroindústria Tropical, os frutos nos diferentes estágios de maturação foram separados em quatro repetições, contendo cinco frutos e inicialmente analisados quanto as variáveis físicas como massa, comprimento e diâmetro.

A polpa dos frutos das cultivares de sapotizeiro, em diferentes estágios do desenvolvimento e maduro, foi extraída e processada utilizando um liquidificador doméstico e, para facilitar o processo adicionou-se água destilada em quantidade igual ao peso dos frutos, resultando em uma diluição de 1:1. O homogeneizado foi analisado quanto as variáveis físico-químicas e químicas, compostos antioxidantes e atividade antioxidante total, análises conduzidas no Laboratório de Fisiologia e Tecnologia Pós-Colheita. Quanto à atividade das enzimas antioxidante e integridade da membrana celular, as análises foram realizadas no

Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Frutos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará.

3.3. Análises físicas

3.3.1. Massa

Cinco unidades dos frutos íntegros de sapoti, de cada cultivar, nos diferentes estádios de maturação foram pesadas utilizando uma balança analítica (Mark 3100) de precisão de 0,01 g e o peso foi expresso em g.

3.3.2. Tamanho

As medidas dos diâmetros transversal e longitudinal foram realizadas com o auxílio de um paquímetro digital (Modelo SC-6) com escala graduada em milímetros.

3.4. Análises físico-químicas e químicas

3.4.1. Acidez titulável (AT)

A acidez titulável foi determinada por titulação volumétrica com solução de NaOH 0,1 N até pH 8,2, conforme IAL (1985). Aproximadamente 1 g da polpa foi pesada e diluída em 50 mL de água destilada, fenolftaleína 1% foi utilizada como indicador. A solução de NaOH 0,1 N foi adicionada lentamente até a mudança de cor para levemente róseo. Os resultados foram expressos em percentagem de ácido málico.

3.4.2. Sólidos solúveis (SS)

A polpa dos frutos foi filtrada em papel de filtro e, em seguida, o conteúdo de sólidos solúveis foi medido utilizando um refratômetro digital (Atago modelo PR-101 Pallette), variando de 0 a 45 °Brix, com compensação automática de temperatura, de acordo com metodologia recomendada por AOAC (2005). Os resultados foram expressos em °Brix.

3.4.3. Relação sólidos solúveis e acidez titulável (SS/AT)

A variável SS/AT foi obtida através da relação entre o conteúdo de sólidos solúveis e acidez titulável apresentada pela polpa dos frutos.

3.4.4. pH

O pH foi medido diretamente na polpa dos frutos utilizando um potenciômetro digital (Mettler DL 12) com membrana de vidro, conforme metodologia recomendada pela AOAC (2005).

3.5. Atividades das enzimas antioxidantes

3.5.1. Obtenção do extrato enzimático

Alíquota de 2 g da polpa homogeneizada foram diluídas em 10 mL de tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 7,0), contendo ácido etilenodiamino tetra-ácetico (EDTA) 0,1 mM, e centrifugadas a 3248 g por 40 minutos a 4 °C, com base na metodologia adaptada de Yang, Zheng e Cao (2009). O sobrenadante (extrato enzimático) foi utilizado para determinar o conteúdo de proteínas totais e a atividade das enzimas antioxidantes.

3.5.2. Proteínas solúveis totais

O conteúdo de proteínas solúveis totais foi determinado segundo Bradford (1976) utilizando como padrão albumina sérica bovina – BSA - (SIGMA). Alíquota de 0,1 mL do extrato enzimático foi adicionada a 1 mL do reagente de Bradford e homogeneizada utilizando agitador de tubos tipo Vortex. Após 15 minutos de reação, as leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro (Pharmacia, modelo Biotech Ultrospec 2000) a 595 nm. Os resultados foram expressos em mg de proteína. g⁻¹ de polpa.

3.5.3. Atividade da Dismutase do superóxido

A atividade da dismutase do superóxido (SOD) foi determinada segundo Giannopolitis e Ries (1977) baseada na fotorredução do azul de nitrotetrazolio (NBT) pela luz na presença de riboflavina e metionina. Alíquota de 0,05 mL do extrato enzimático foi diluído em 1 mL do tampão fosfato de potássio a 50 mM, (pH 7,8) contendo EDTA 0,1 mM e metionina 19,5 mM. Na ausência de luz, foram adicionados 0,15 mL de NBT 750 mM e 0,3 mL de riboflavina 10 mM. A mistura de reação foi exposta à luz sob uma lâmpada fluorescente de 20 W por 15 minutos e a absorbância monitorada espectrofotometricamente a 560 nm. Os resultados foram expressos em UAE. mg⁻¹ de proteína, considerando que uma

unidade de atividade enzimática da SOD (UAE) é definida como a quantidade da enzima requerida para promover 50% de inibição da taxa de fotorredução do NBT (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971).

3.5.4. Atividade da Catalase

A atividade da catalase (CAT) foi determinada conforme método descrito por Beers Júnior e Sizer (1952), com base na redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em banho-maria a 30 °C, 1,39 mL do tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), contendo EDTA 0,1 mM, foi aquecido durante 5 minutos. Após aquecimento foram adicionados 0,06 mL de H_2O_2 0,5 M e 0,05 mL do extrato enzimático, iniciando a reação. A atividade da CAT foi monitorada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm durante 10 minutos e quantificada utilizando o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 ($36 M^{-1} \cdot cm^{-1}$). Os resultados foram expressos em $\mu mol H_2O_2 \cdot mg^{-1}$ de proteína. min^{-1} .

3.5.5. Atividade da Peroxidase do ascorbato

A atividade da peroxidase do ascorbato (APX), baseada na oxidação do ascorbato pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), foi determinada conforme metodologia descrita por Nakano e Asada (1981). Em banho-maria a 30 °C, 1,35 mL do tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0), contendo EDTA 0,25 mM, foi aquecido durante 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 0,05 mL do extrato enzimático, 0,05 mL de H_2O_2 0,5 M e 0,05 mL de ácido ascórbico 15 mM, iniciando a reação. A taxa de oxidação do ascorbato pelo H_2O_2 foi monitorada pelo decréscimo da absorvância a 290 nm durante 10 minutos, sendo quantificada como Índice de Oxidação do Ascorbato, utilizando o coeficiente de extinção do ascorbato ($2,8 mM^{-1} \cdot cm^{-1}$). Os resultados foram expressos em $\mu mol H_2O_2 \cdot mg^{-1}$ de proteína. min^{-1} .

3.6. Peroxidação de lipídeos

A taxa de peroxidação de lipídeos foi determinada conforme Zhu *et al.* (2008) baseado na formação de malondialdeído (MDA), um produto secundário da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados.

Alíquota de 2 g da polpa foi adicionada a 10 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% e centrifugada a 3248 g durante 20 minutos a 4 °C. Em tubos de ensaio, 0,75 mL do

sobrenadante foram adicionados a 3 mL da solução de TCA 20% contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% e incubados durante 30 minutos a 95 °C. Após a incubação, os tubos foram imediatamente resfriados em banho de gelo e centrifugados a 3.000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. As absorbâncias do sobrenadante foram monitoradas espectrofotometricamente a 532 nm e corrigidas para turbidez inespecífica subtraindo a absorbância a 600 nm, obtendo a leitura específica da absorbância. O conteúdo de MDA foi calculado utilizando coeficiente de extinção molar de $155 \text{ nmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (HEATH; PACKER, 1968) e expressos em nmol. g^{-1} de polpa.

3.7. Compostos antioxidantes e atividade antioxidante total

3.7.1. Flavonóides amarelos

Os flavonóides amarelos foram determinados conforme metodologia desenvolvida por Francis (1982). Pesou-se aproximadamente 1 g da polpa e adicionou-se 30 mL da solução extratora etanol-HCl 1,5 N na proporção 85:15. As amostras foram homogeneizadas utilizando um homogeneizador de tecidos tipo “Turrax” por 2 minutos e transferidas para um balão volumétrico âmbar de 50 mL, aferindo-se o volume com a solução extratora. O conteúdo do balão foi acondicionado em frasco âmbar e deixado descansar por 12 horas em refrigerador a 4 °C. Posteriormente, o material foi filtrado utilizando papel de filtro qualitativo 80 g/m^2 e o filtrado teve sua absorbância analisada espectrofotometricamente a 374 nm. O conteúdo de flavonóides amarelos foi calculado utilizando coeficiente de extinção molar $76,6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e os resultados foram expressos em $\text{mg. } 100 \text{ g}^{-1}$ de polpa.

3.7.2. Vitamina C

O conteúdo de ácido ascórbico foi determinado por titulação direta com solução de Tillman (2,6-dicloro-fenol-indofenol, 0,02% - DFI) de acordo com Strohecker e Henning (1967). Amostra de 1 g da polpa foi diluída em 50 mL de ácido oxálico 0,5%. Alíquota de 5 mL do extrato preparado foi diluída em 50 mL de água destilada e titulada com solução de Tillman até mudança de cor permanente. Os resultados foram expressos em $\text{mg. } 100 \text{ g}^{-1}$ de polpa.

3.7.3. Polifenóis solúveis totais

O extrato utilizado para determinar o conteúdo de polifenóis solúveis totais (PST) e a atividade antioxidante total foi obtido conforme metodologia de Larrauri, Ruperez e Saura-Calixto (1997). Amostra de 2 g da polpa foi adicionada a 40 mL da solução de metanol 50%, homogeneizada e deixada em repouso por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, o material foi centrifugado a 16000 g, por 15 minutos a 20 °C, e o sobrenadante recolhido. O precipitado dessa extração foi ressuspense em 40 mL da solução de acetona 70%, homogeneizado, deixado em repouso por 1 h à temperatura ambiente e centrifugado a 16000 g por 15 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi recolhido, colocado em balão volumétrico junto ao primeiro e o volume aferido para 50 mL com água destilada.

O conteúdo de polifenóis solúveis totais (PST) foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteau (OBANDA; OWUOR, 1997) adaptado por Rufino *et al.* (2006). Em ambiente escuro, 1 mL do extrato foi homogeneizado com 1 mL da solução de Folin-Ciocalteau (1 N), 2 mL da solução de carbonato de sódio anidro (Na₂CO₃) 20% e 2 mL de água destilada. Após 30 minutos de repouso, as leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro (Pharmacia, modelo Biotech Ultraspec 2000) a 700 nm. O conteúdo de PST foi calculado com base em uma curva padrão de doses crescentes de ácido gálico 98% (0 – 50 µg), utilizado como referência, e os resultados foram expressos em mg de equivalente a ácido gálico (EAG). 100 g⁻¹ de polpa.

3.7.4. Atividade antioxidante total

A atividade antioxidante total (AAT) foi determinada pelo método ABTS conforme metodologia desenvolvida por Re *et al.* (1999) adaptada por Rufino *et al.* (2006). A técnica envolve a produção direta do radical cromóforo ABTS^{•+} através da reação de oxidação entre a solução ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) 7 mM com a solução de persulfato de potássio 140 mM mantida no escuro à temperatura ambiente por 12 - 16 horas antes de ser utilizada. A solução ABTS^{•+} foi diluída em etanol absoluto para uma absorvância de 0,70 ± 0,02 a 734 nm.

A AAT foi avaliada com base em uma curva padrão linear utilizando como antioxidante de referência o composto 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico (Trolox, Sigma) a 2000 µM, preparado com etanol absoluto, utilizando concentrações entre 100 e 2000 µM. Em ambiente escuro, alíquota de 0,03 mL da solução do

Trolox foi adicionada a 3 mL da solução ABTS⁺. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (Pharmacia, modelo Biotech Ultrospec 2000) a 734 nm, 6 minutos após a adição da solução do radical. A partir dessa curva foi obtida a equação 1, da qual calculou-se a absorbância referente a 1000 µM de Trolox. Seguindo os mesmos procedimentos utilizados na determinação da curva padrão do Trolox, obtivemos a equação 2 utilizando alíquota de 0,03 mL do extrato, preparado conforme descrito no item 2.7.3, em três diferentes concentrações. A AAT da amostra foi calculada substituindo na equação 2 a absorbância equivalente a 1000 µM de Trolox. O valor obtido corresponde à concentração da amostra equivalente a 1000 µM de Trolox e os resultados foram expressos em capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) (µM Trolox. g⁻¹ de polpa).

3.8. Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi desenvolvido em um delineamento inteiramente casualizado em regime fatorial 2 x 5 (cultivar x estágio de desenvolvimento) tendo como tratamento os estádios de desenvolvimento. As amostras foram divididas em 4 repetições, cada uma representando uma unidade experimental composta por 5 frutos e as análises foram realizadas em triplicata.

Os dados foram submetidos à análise de variância realizada com auxílio do programa computacional SISVAR versão 3.01 e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (GOMES, 1990).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Qualidade pós-colheita

Mudanças importantes ocorreram nas variáveis físicas e físico-químicas ao longo do desenvolvimento e do amadurecimento de sapoti (Tabela 7). Em ambas as cultivares, ‘Sapota Tropical’ e ‘Sapoti Ipa-Curu’, a variável massa progressivamente aumentou com o avanço do crescimento até a maturação, variando de 30,99 para 150,95 g e de 26,17 para 142,93 g, respectivamente. O processo de amadurecimento resultou em uma suave perda de massa para as duas cultivares após o climatérico, apresentando os frutos maduros 121,46 g, na ‘Sapota Tropical’, e 115,34 g na ‘Sapoti Ipa-Curu’, não havendo diferença significativa entre elas. A massa média apresentada pelas duas cultivares analisadas nesse estudo foram inferiores as encontradas por Araújo Neto (2000), entre 145,90 e 173,40 g. A perda de massa fresca após o climatérico pode ser devido à perda de água provocada pela diferença de pressão de vapor entre o fruto e o ambiente, além da respiração (MORAIS, 2005). O aumento na massa do sapoti com a maturação também foi relatada em outros estudos (BRITO; NARAIN, 2002; MIRANDA *et al.*, 2003; MIRANDA *et al.*, 2008). Este mesmo comportamento também foi observado durante o amadurecimento do mamão (SHATTIR; ABU-GOUKH, 2010), romã (SHWARTZ *et al.*, 2009) e ameixa (USENIK *et al.*, 2008).

Os sapotis aumentaram em tamanho durante todo o seu desenvolvimento (Tabela 7). Os frutos atingem seu tamanho máximo a partir do sexto mês de desenvolvimento (180 dias) e, portanto sua maturidade fisiológica. Segundo Araújo-Neto (2000) e Miranda (2002), os frutos ao sexto mês de desenvolvimento atingem um platô em seu crescimento. O aumento da massa está diretamente associado a um aumento do tamanho dos frutos, caracterizado pelo crescimento e aumento do volume celular. A massa consiste em uma das variáveis que melhor representa a grande variabilidade dessa espécie. Contudo, os resultados mostram que as cultivares avaliadas aqui não apresentaram diferença significativa entre si ao longo do desenvolvimento e maturação, o que pode ser devido às condições de cultivo e/ou climáticas, pois em geral os frutos da cultivar Sapota Tropical são maiores do que os da Sapoti Ipa-Curu, como relatado por Miranda (2002).

Segundo Shwartz *et al.* (2009), o conteúdo de sólidos solúveis (SS) é uma das variáveis mais largamente medidas durante o amadurecimento de frutos, o qual caracteriza sua qualidade comestível.

Tabela 7 - Mudanças na qualidade pós-colheita durante o desenvolvimento de frutos de duas cultivares de saptizeiro cultivadas em Paraipaba - CE.

Estádio (Dias)	Cultivar	Massa	Diâmetro longitudinal	Diâmetro transversal	Sólidos solúveis (SS)	Acidez titulável (AT)	pH	SS/AT
		g	mm	mm	°Brix	% ác. malic		
90	Sapota	30,99 ± 1,08 Aa	37,45 ± 2,88 Aa	37,81 ± 3,28 Aa	8,20 ± 0,29 Aa	0,29 ± 0,02 Ad	5,21 ± 0,01 Aa	27,89 ± 1,77 Aa
	Sapoti	26,17 ± 2,22 Aa	37,15 ± 4,16 Aa	35,81 ± 1,68 Aa	8,87 ± 0,04 Aab	0,31 ± 0,01 Ad	5,43 ± 0,03 Bb	28,21 ± 0,87 Aa
120	Sapota	61,78 ± 5,77 Aa	47,60 ± 3,62 Ab	47,86 ± 3,79 Bb	8,35 ± 1,23 Aa	0,23 ± 0,01 Ac	5,47 ± 0,07 Ab	36,59 ± 5,68 Aa
	Sapoti	41,63 ± 3,29 Aa	42,75 ± 5,14 Ab	41,18 ± 3,05 Ab	7,65 ± 0,39 Aa	0,22 ± 0,01 Ac	5,55 ± 0,04 Ab	34,79 ± 2,12 Aa
150	Sapota	102,42 ± 4,27 Ab	57,90 ± 3,90 Bc	55,91 ± 3,69 Bc	9,60 ± 0,22 Aab	0,11 ± 0,01 Aa	5,58 ± 0,04 Bb	91,38 ± 10,72 Ab
	Sapoti	84,44 ± 9,50 Ab	53,30 ± 6,87 Ac	52,11 ± 5,30 Ac	9,62 ± 1,10 Ab	0,10 ± 0,01 Aa	5,42 ± 0,12 Ab	92,92 ± 8,09 Ab
180	Sapota	150,95 ± 24,70 Abc	61,50 ± 5,63 Acd	60,58 ± 5,57 Ad	11,22 ± 0,27 Ab	0,12 ± 0,02 Aa	5,56 ± 0,05 Bb	96,70 ± 11,77 Ab
	Sapoti	142,93 ± 7,52 Abc	59,40 ± 5,58 Ad	58,12 ± 4,74 Ad	11,05 ± 0,30 Aab	0,12 ± 0,02 Aa	5,37 ± 0,05 Ab	99,14 ± 15,42 Ab
Maduro	Sapota	121,46 ± 30,87 Ac	62,75 ± 5,54 Ad	62,03 ± 5,25 Bd	20,87 ± 0,48 Ac	0,17 ± 0,02 Ab	5,09 ± 0,05 Aa	125,31 ± 13,61 Ac
	Sapoti	115,34 ± 9,67 Ac	60,40 ± 5,58 Ad	59,12 ± 4,74 Ad	23,92 ± 0,85 Bc	0,16 ± 0,02 Ab	5,23 ± 0,05 Ba	150,15 ± 17,52 Bc

*Para cada variável, letra minúscula diferente indica diferença estatística em P<0.05 entre os estádios de acordo com teste de Tuckey. Para cada variável, diferente letra maiúscula indica diferença estatística em P<0.05 entre as cultivares de acordo com teste de Tuckey.

O conteúdo de SS nos sapotis aumentou significativamente com o amadurecimento (Tabela 7), variando de 8,20 para 20,87 °Brix na cultivar Sapota Tropical e de 8,87 para 23,92 °Brix na cultivar Sapoti Ipa-Curu. No estágio maduro, os frutos da 'Sapoti Ipa-Curu' apresentaram um conteúdo de SS significativamente maior do que os da 'Sapota Tropical'. Os resultados mostram que o acúmulo do conteúdo de SS iniciou aos 180 dias após a marcação. Estudos anteriores também relataram aumento no conteúdo de SS nessas cultivares de sapoti com o processo do amadurecimento (MIRANDA *et al.*, 2003; MIRANDA *et al.*, 2008). Roy e Joshi (1997) encontraram em frutos maduros da cultivar Kalipatti conteúdo de sólidos solúveis em torno de 24 °Brix, resultado superior ao apresentado nesse estudo.

O amido é considerado a principal substância de reserva de energia nos frutos e a maioria dos frutos utiliza os açúcares obtidos a partir da hidrólise do amido como fonte de energia para a manutenção do metabolismo celular após o desligamento da planta (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Contudo, em estudo realizado por Miranda (2002), em sapotis até o estágio de maturidade fisiológica, correspondendo aos 180 dias, o amido apresentou padrão de acúmulo inverso ao dos açúcares solúveis, indicando a hidrólise do amido como origem dos mesmos. Semelhante ao estudo realizado por este autor, como os frutos de ambas as cultivares de sapoti, ao longo do desenvolvimento estão ligados a planta, o aumento significativo do conteúdo de SS é devido, principalmente, a importação dos açúcares assimilados pela planta através da fotossíntese, assim como pelo metabolismo do látex, pois estudos publicados mostraram que durante a maturação do sapoti, o látex é metabolizado e transformado em sacarose por ação das enzimas do próprio látex ou dos fungos que compõem a microflora do fruto (PATHAK; BHAT, 1952). Desta forma, apenas nos frutos maduros podemos considerar que o acúmulo de SS pode ser devido à hidrólise do amido como mencionado por Chitarra e Chitarra (2005), pois o amadurecimento das cultivares de sapoti ocorreu após seu desligamento da planta.

A acidez titulável também foi utilizada para identificar a qualidade dos frutos. Ao longo do desenvolvimento, a acidez titulável dos sapotis apresentou uma diminuição significativa (Tabela 7) concomitante ao aumento no conteúdo de SS. Durante o amadurecimento, a acidez titulável nas cultivares estudadas diminuiu de 0,29 para 0,17% de ácido málico na 'Sapota Tropical' e de 0,31 para 0,16% de ácido málico na 'Sapoti Ipa-Curu', não sendo observado diferença estatística significativa entre elas. A acidez titulável do sapoti é muito baixa quando comparada a da acerola (OLIVEIRA *et al.*, 2011) e da jaboticaba (RUFINO *et al.*, 2009). De fato, o sapoti é um fruto de baixa acidez, pois nos frutos maduros

das cultivares indianas Cricket ball e Oblong, a acidez titulável foi de 0,06 e 0,09%, respectivamente (SELVARAJ; PAL, 1984). Enquanto Alves, Filgueiras e Moura (2000), encontraram 0,12% de acidez. O declínio da AT tende a ocorrer com a maturação de frutos em decorrência do seu uso como substrato no processo respiratório ou de sua conversão em açúcares, sendo um processo importante para promover o sabor característico dos frutos (CHITARRA; CHITARRA, 2005; KULKARNI; ARADHYA, 2005). A redução da acidez titulável com o amadurecimento também foi relatada em outros frutos, como a murta (FADDA; MULAS, 2010) e goiaba (BASHIR; ABU-GOUKH, 2003).

O sabor doce e agradável do sapoti maduro está diretamente relacionado ao declínio da acidez titulável, bem como do pH (BRITO; NARAIN, 2002). Os valores do pH diminuíram ligeiramente com a maturação dos frutos (Tabela 7), de 5,21 à 5,09 e de 5,43 à 5,23 para ‘Sapota Tropical’ e ‘Sapoti Ipa-Curu’, respectivamente. Ao longo do desenvolvimento dos frutos, o pH diferiu significativamente entre as cultivares de sapoti e aparentemente estavam relacionados com a acidez. O pH dos frutos maduros de ambas as cultivares aumentou no início do desenvolvimento e declinou até a maturação, comportamento também relatado por Alves, Filgueiras e Moura (2000) e Araújo Neto *et al.* (2001), que encontraram valores de pH variando entre 5,26 até 5,67.

A relação SS/AT é indicativa do sabor do fruto e, em sapotis o seu intenso sabor adocicado é evidenciado pela elevada relação SS/AT observada (Tabela 7), quando comparada a acerola (OLIVEIRA *et al.*, 2011), caracterizada pela baixa acidez associada ao elevado conteúdo de SS. Durante o amadurecimento a relação SS/AT aumentou de 27,89 para 125,31 na ‘Sapota Tropical’ e de 28,21 para 150,15 na ‘Sapoti Ipa-Curu’, no entanto a cultivar Sapoti Ipa-Curu apresentou uma relação SS/AT significativamente maior do que a observada na ‘Sapota Tropical’, assim podemos considerar que o sabor desta cultivar é, conseqüentemente menos ácida e mais doce.

4.2. Compostos antioxidantes não enzimáticos

As mudanças nos compostos antioxidantes durante o desenvolvimento das cultivares de sapoti estão apresentadas na Tabela 8.

O conteúdo de polifenóis solúveis totais (PST) diminuiu significativamente ao longo do desenvolvimento dos frutos de ambas as cultivares, principalmente entre os 150 dias e o estágio maduro. Aos 90 dias, os sapotis apresentaram o maior conteúdo de PST, 1663,82 mg EAG. 100 g⁻¹ na ‘Sapota Tropical’ e 2090,90 mg EAG. 100 g⁻¹ na ‘Sapoti Ipa-Curu’,

sendo observado uma diferença estatística significativa entre elas. Kulkarni e Aradhya (2005) relataram que a diminuição no conteúdo de fenólicos totais durante o amadurecimento está associado a um redução da adstringência do fruto, o que consiste em uma característica sensorial desejável na qualidade comestível do fruto e isso é resultante do processo de polimerização dos fenólicos ou da sua oxidação pela atividade da enzima polifenoloxidase (SHWARTZ *et al.*, 2009).

Tabela 8 - Mudanças nos compostos antioxidantes durante o desenvolvimento de frutos de duas cultivares de sapotizeiro cultivadas em Paraipaba, CE.

Estádio (Dias)	Cultivar	Polifenóis solúveis	Flavonóides amarelos	Vitamina C total
		totais 10 ² mg EAG. 100g ⁻¹ polpa	mg. 100g ⁻¹ polpa	mg. 100g ⁻¹ polpa
90	Sapota	16,64 ± 1,61 Ad	11,44 ± 3,40 Bb	23,62 ± 1,97 Ac
	Sapoti	20,91 ± 1,22 Bd	6,91 ± 0,73 Ab	25,23 ± 1,71 Ab
120	Sapota	13,15 ± 1,15 Ac	5,35 ± 2,25 Aa	21,84 ± 0,55 Ac
	Sapoti	13,22 ± 1,20 Ac	3,26 ± 1,40 Aab	24,85 ± 2,11 Bb
150	Sapota	10,31 ± 2,41 Bc	6,62 ± 0,64 Aa	17,99 ± 2,10 Ab
	Sapoti	7,70 ± 1,33 Ab	4,08 ± 1,83 Aab	21,84 ± 0,55 Bb
180	Sapota	6,20 ± 0,26 Ab	5,59 ± 1,35 Aa	16,08 ± 1,55 Ab
	Sapoti	5,29 ± 0,68 Ab	3,24 ± 1,84 Aab	14,33 ± 2,35 Ab
Maduro	Sapota	1,63 ± 0,22 Aa	3,16 ± 1,69 Aa	11,40 ± 1,69 Aa
	Sapoti	0,67 ± 0,69 Aa	1,70 ± 0,88 Aa	12,16 ± 0,88 Aa

*Para cada variável, letra minúscula diferente indica diferença estatística em P<0.05 entre os estádios de acordo com teste de Tuckey. Para cada variável, diferente letra maiúscula indica diferença estatística em P<0.05 entre as cultivares de acordo com teste de Tuckey.

Miranda *et al.* (2008) relataram que durante o amadurecimento de sapoti, há predomínio de formas poliméricas o que justifica a redução em parte da sua adstringência. Desta forma, a diminuição do conteúdo de PST possivelmente é devido a sua polimerização contribuindo para a redução da adstringência do sapoti maduro. Nos últimos anos, o conhecimento das propriedades antioxidantes dos polifenóis despertou um novo interesse em

relação aos seus possíveis efeitos benéficos à saúde. Um estudo realizado em sapoti, Ma *et al.* (2003) apresentaram dois novos compostos fenólicos 4-metil-O-galoilclorogenato e ácido 4-O-clorogênico e relataram a elevada capacidade antioxidante apresentada por estes polifenóis, bem como o seu potencial carcinogênico *in vitro* contra células cancerosas do colon humano.

O amadurecimento dos frutos das cultivares de sapotis resultou em uma diminuição significativa do conteúdo de flavonóides amarelos de 11,44 para 3,16 mg. 100 g⁻¹ polpa e de 6,91 para 1,70 mg. 100 g⁻¹ polpa em 'Sapota Tropical' e 'Sapoti Ipa-Curu', respectivamente. O maior conteúdo de flavonóides amarelos foi observado na fase inicial do desenvolvimento dos sapotis, aos 90 dias após a marcação, destacando a 'Sapota Tropical' pelo maior conteúdo de flavonóides amarelos, diferindo estatisticamente da 'Sapoti Ipa-Curu'.

Estudos demonstram que o consumo de alimentos ricos em flavonóides previne problemas cardiovasculares e câncer em seres humanos (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2011; NAGAPRASHANTHA *et al.*, 2011; NEUHOUSER, 2004). Além de sua propriedade antioxidante, os flavonóides também contribuem para as características de qualidade dos produtos alimentares frescos e industrializados incluindo a adstringência, o sabor, a textura e a cor (HARUENKIT *et al.*, 2010; VVEDENSKAYA; VORSA, 2004).

As cultivares de sapoti apresentaram um padrão semelhante de declínio do conteúdo de vitamina C com o amadurecimento, de 23,62 para 11,40 mg. 100 g⁻¹ de polpa em 'Sapota Tropical' e de 25,23 para 12,16 mg. 100 g⁻¹ de polpa em 'Sapoti Ipa-Curu'. Em frutos das cultivares Cricket ball e Oblong, o conteúdo de vitamina C diminuiu de 10 e 5 mg. 100 g⁻¹ de polpa nos frutos fisiologicamente maduros para 8 e 4 mg. 100 g⁻¹ de polpa quando maduros, respectivamente (SELVARAJ; PAL, 1984). Brito e Narain (2002), também relataram um declínio significativo no conteúdo de vitamina C entre os estádios fisiologicamente maduro e maduro. Segundo Yahia, Conterás-Padilla e Gonzáles-Aguilar (2001), a diminuição no conteúdo de vitamina C pode ser explicada por sua auto-oxidação ou oxidação por ação de enzimas como, ascorbato oxidase e peroxidase. Perdas no conteúdo de vitamina C têm sido freqüentemente relatada durante o desenvolvimento de frutos como goiaba (BASHIR; ABU-GOUKH, 2003) e morango (FERREYRA *et al.*, 2007). O sapoti não é considerado uma boa fonte nutricional de vitamina C, frutos no estágio maduro apresentam baixo conteúdo dessa vitamina quando comparada a acerola (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

O ácido ascórbico (vitamina C) e seus derivados são compostos essenciais para os tecidos vegetais apresentando funções antioxidantes, atuando como cofator enzimático e regulador do crescimento vegetal, bem como é uma vitamina importante para a dieta humana, exercendo funções como formação do tecido conjuntivo, transporte de íons e proteção da

célula contra radicais livres, além disso, sua deficiência dá origem a uma doença caracterizada por hemorragias subcutâneas, o escorbuto (BARATA-SOARES *et al.*, 2004; GOMEZ; LAJOLO, 2008; MIRANDA, 2002). Em frutos, o conteúdo do ácido ascórbico é afetado por diversos fatores como variedade, condições de cultivo e manuseio na colheita e pós-colheita (GOMEZ; LAJOLO, 2008). Alves, Filgueiras e Moura (2000) analisaram sapotis maduros provenientes de cultivos no Estado do Ceará e encontraram um conteúdo de vitamina C de 12,26 mg 100 g⁻¹ de polpa, enquanto Leong e Shui (2002) analisando sapotis maduros provenientes do mercado de Singapura encontraram um conteúdo de 2,0 mg 100 g⁻¹ de polpa.

4.3. Atividades das enzimas antioxidantes

Mudanças na capacidade de catabolizar enzimaticamente as EROS têm sido relatadas durante o amadurecimento de frutos, assim a atividade das enzimas antioxidantes foram determinadas durante o desenvolvimento das cultivares de sapoti (Tabela 9).

A atividade da enzima dismutase do superóxido (SOD) diminuiu significativamente ao longo do amadurecimento dos frutos das cultivares de sapoti principalmente entre os 120 e 150 dias após a marcação, de 6228 para 1071 UAE. mg⁻¹ proteína na ‘Sapota Tropical’ e de 6630 para 1265 UAE. mg⁻¹ proteína na ‘Sapoti Ipa-Curu’. A maior atividade da SOD foi observada aos 90 dias após a marcação na cultivar ‘Sapoti Ipa-Curu’, 9590 UAE. mg⁻¹ proteína. A SOD cataliza a dismutação do ânion superóxido (O_2^-) na mitocôndria, prevenindo a formação do radical hidroxila (OH^-) considerado como o radical mais deletério (JIAO; WANG, 2000; ARORA *et al.*, 2002). Contudo, como produto de sua atividade esta enzima libera ao meio celular uma outra EROS o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). No entanto, a elevada atividade da SOD no início do desenvolvimento do sapoti influenciou a atividade das enzimas catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) envolvidas com a dismutação do H_2O_2 .

As cultivares de sapoti apresentaram uma redução significativa na atividade da CAT ao longo do amadurecimento (Tabela 9) de 349,80 e 370,09 $\mu\text{mol } H_2O_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteina} \cdot \text{min}^{-1}$ aos 90 dias para 7,20 e 16,20 $\mu\text{mol } H_2O_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteina} \cdot \text{min}^{-1}$ no estágio maduro para ‘Sapota Tropical’ e ‘Sapoti Ipa-Curu’, respectivamente. O declínio mais drástico na atividade da CAT foi observado com o amadurecimento dos frutos. No entanto, em nossos resultados observamos que a atividade da CAT nos frutos da cultivar Sapoti Ipa-Curu apresentou um aumento significativo entre os 150 e 180 dias após a marcação o que pode estar associado ao ligeiro aumento da atividade da SOD observado nesse mesmo período (Tabela 9), assim uma

tentativa de controle por parte dessas enzimas antioxidantes da peroxidação de lipídeos (Tabela 9).

A enzima APX exerce uma função fundamental na remoção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através do ciclo ascorbato-glutationa, no qual utiliza o ascorbato como doador de elétrons (JIAO; WANG, 2000). Em nossos resultados, a atividade da APX, de forma semelhante à atividade da SOD e da CAT, diminuiu significativamente ao longo do desenvolvimento de ambas as cultivares de sapoti de 82,63 para 1,50 $\mu\text{mol } H_2O_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína} \cdot \text{min}^{-1}$ na ‘Sapota Tropical’ e de 64,15 para 3,47 $\mu\text{mol } H_2O_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína} \cdot \text{min}^{-1}$ na ‘Sapoti Ipa-Curu. O declínio mais intenso foi observado com o amadurecimento entre os 180 dias após a marcação e o estágio maduro. A atividade da enzima APX foi significativamente maior do que a da CAT, sugerindo que esta seja a enzima-chave no catabolismo do peróxido de hidrogênio e, juntamente com a SOD são as principais enzimas antioxidantes em sapoti.

A diminuição na atividade das enzimas SOD, CAT e APX ao longo do amadurecimento também foi evidenciada em amoras pretas (WANG; JIAO, 2001), em polpa de laranja (HUANG *et al.*, 2007) e em tomates (MONDAL *et al.*, 2004). A maior atividade dessas enzimas antioxidantes, evidenciada no estágio inicial do desenvolvimento do sapoti, sugere que estas podem estar envolvidas no equilíbrio entre a produção e a eliminação das EROS mantendo a integridade dos frutos. Os resultados mostraram que o desenvolvimento e o amadurecimento dos saptotis foram acompanhados pela diminuição na atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e APX), envolvidas no catabolismo das EROS e isso contribuiu para um aumento do estresse oxidativo associado com o amadurecimento sendo, portanto, necessário para facilitar muitas das mudanças relacionadas com sua maturação.

Tabela 9 - Mudanças na atividade de enzimas antioxidantes, na peroxidação lipídica e na atividade antioxidante total (AAT) durante o desenvolvimento de frutos de duas cultivares de sapotizeiro cultivadas em Paraipaba, CE.

Estádio (Dias)	Cultivar	SOD 10 ² UAE.mg ⁻¹ protein	CAT 10 ¹ μmol H ₂ O ₂ mg ⁻¹ proteína. min ⁻¹	APX 10 ¹ μmol H ₂ O ₂ .mg ⁻¹ proteína. min ⁻¹	Peroxidação lipídica nmol MDA. g ⁻¹ polpa	AAT 10 ² μM Trolox. g ⁻¹ polpa
90	Sapota	82,76 ± 8,78 Ac	34,98 ± 5,45 Ab	82,63 ± 9,92 Bc	60,03 ± 9,04 Aab	23,83 ± 4,22 Ad
	Sapoti	95,90 ± 2,25 Bd	37,00 ± 4,42 Ab	64,15 ± 2,71 Ab	66,50 ± 4,40 Aab	24,82 ± 1,12 Ad
120	Sapota	62,28 ± 16,20 Ab	57,22 ± 19,13 Bb	81,09 ± 6,26 Bc	80,55 ± 19,56 Abc	14,95 ± 0,60 Ac
	Sapoti	66,30 ± 6,42 Ac	25,32 ± 2,78 Ab	68,29 ± 3,89 Ab	72,96 ± 12,17 Ab	15,36 ± 2,09 Ac
* 150	Sapota	10,71 ± 1,53 Aa	48,02 ± 10,62 Ab	55,07 ± 4,90 Ab	42,85 ± 4,43 Aa	6,49 ± 0,17 Ab
	Sapoti	12,65 ± 0,38 Aa	50,85 ± 13,21 Ab	58,96 ± 1,53 Ab	31,83 ± 3,94 Aa	6,79 ± 0,30 Ab
180	Sapota	23,21 ± 1,94 Aa	53,59 ± 31,28 Ab	62,02 ± 2,79 Ab	38,61 ± 6,03 Aa	4,24 ± 1,25 Ab
	Sapoti	25,11 ± 3,72 Aa	118,29 ± 3,46 Bc	67,68 ± 6,98 Ab	28,78 ± 6,20 Aa	3,38 ± 0,44 Ab
Maduro	Sapota	26,38 ± 4,20 Aa	0,72 ± 0,20 Aa	1,50 ± 0,34 Aa	104,25 ± 13,31 Ac	0,13 ± 0,02 Aa
	Sapoti	45,38 ± 10,11 Bb	1,62 ± 0,35 Aa	3,47 ± 2,65 Aa	101,56 ± 21,37 Ac	0,12 ± 0,03 Aa

* Dismutase do superóxido (SOD); catalase (CAT); peroxidase do ascorbato (APX).

*Para cada variável, letra minúscula diferente indica diferença estatística em P<0.05 entre os estádios de acordo com teste de Tuckey. Para cada variável, diferente letra maiúscula indica diferença estatística em P<0.05 entre as cultivares de acordo com teste de Tuckey.

4.4. Atividade antioxidante total e peroxidação de lipídeos

A atividade antioxidante total (AAT) das cultivares de sapoti foi significativamente reduzida durante o desenvolvimento (Tabela 9) e a maior AAT foi observada nos frutos, de ambas as cultivares, colhidos aos 90 dias após a marcação, 2382,90 $\mu\text{M Trolox. g}^{-1}$ polpa para 'Sapota Tropical' e 2481,99 $\mu\text{M Trolox. g}^{-1}$ polpa para 'Sapoti Ipa-Curu'. A diminuição mais drástica foi observada com o amadurecimento, entre os estádios 180 dias e maduro de 424 para 13 $\mu\text{M Trolox. g}^{-1}$ polpa e de 338 para 12 $\mu\text{M Trolox. g}^{-1}$ polpa para 'Sapota Tropical' e 'Sapoti Ipa-Curu', respectivamente. Os resultados obtidos para a AAT em sapoti podem ser justificados principalmente pela redução do conteúdo dos seus compostos fenólicos, os flavonóides amarelos e os polifenóis totais (Tabela 8). Leong e Shui (2002) também relataram que a elevada capacidade antioxidante encontrada nos sapotis imaturos não é atribuída à vitamina C, uma vez que como mencionado anteriormente, o sapoti não é considerado uma boa fonte dessa vitamina. A contribuição da vitamina C para a atividade antioxidante total do sapoti é muito baixa, menor que 0,1% sugerindo que a atividade antioxidante deve-se principalmente aos compostos fenólicos (LEONG; SHUI, 2002).

Em estudo realizado por Shui, Wong e Leong (2004), também foi relatada uma drástica diminuição na atividade antioxidante no início do amadurecimento do sapoti associado ao declínio do conteúdo de polifenóis totais. Esses autores também observaram que o elevado conteúdo de taninos encontrado em sapoti imaturo pode ser responsável por sua alta atividade antioxidante e que como este tende a diminuir com o amadurecimento, promovendo melhora na qualidade do sapoti, também acarreta em redução do seu potencial antioxidante.

Os processos oxidativos que ocorrem durante a maturação dos sapotis foram também medidos pelo grau de peroxidação lipídica, determinado pelo acúmulo de produtos da peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA) (JIMENEZ *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2008). Nas cultivares de sapotis estudadas, o amadurecimento foi acompanhado pelo aumento substancial do conteúdo de MDA (Tabela 9) de 60,03 para 104,25 nmol MDA. g^{-1} polpa para 'Sapota Tropical' e de 66,50 para 101,56 nmol MDA. g^{-1} polpa para 'Sapoti Ipa-curu'. Koc *et al.* (2004) relataram que a oxidação e peroxidação de lipídios, bem como de proteínas de membranas ocorrem devido a ação das EROS. Os resultados mostram que o aumento da peroxidação lipídica com o amadurecimento em ambas as cultivares pode ser devido a um aumento nas reações de oxidação realizadas pelas EROS como consequência da diminuição da atividade das enzimas antioxidantes (Tabela 9), visto que uma correlação negativa foi

observada entre a peroxidação lipídica e as enzimas antioxidantes (Tabela 10). Desta forma, os antioxidantes não enzimáticos que contribuem para a AAT não são os principais responsáveis pela neutralização das EROS e proteção celular contra danos oxidativos no sapoti. Estudos realizados em banana (YANG *et al.*, 2008), tomate (MONDAL *et al.*, 2004.) e amoras pretas (WANG; JIAO, 2001) também relataram o aumento da peroxidação lipídica com o amadurecimento.

Sendo o amaciamento uma das principais características do amadurecimento, estudos evidenciaram que além da ação de enzimas hidrolíticas da parede celular, o amaciamento pode ser devido a oxidação e peroxidação de lipídeos de membrana causados pelas EROS (MORAIS *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2008). Estudos anteriores mostraram que o amadurecimento de sapoti ocorria concomitante redução da firmeza do fruto, justificado por um aumento dos espaços intercelulares, pelo declínio da turgescência celular e, principalmente, por modificações no metabolismo dos carboidratos da parede celular, sendo considerados os processos mais importantes da perda da firmeza do sapoti com o amadurecimento (MIRANDA *et al.*, 2008; MORAIS *et al.*, 2008). Contudo, nesse estudo, os resultados obtidos mostram que o aumento da peroxidação lipídica como consequência da diminuição da capacidade de neutralização das EROS pela enzimas antioxidantes, também pode contribuir para o amaciamento do sapoti.

Os polissacarídeos constituintes da matrix da parede celular sofrem clivagens durante o amadurecimento de frutos e essas modificações são responsáveis pela diminuição da firmeza do tecido nos frutos maduros. No entanto, há evidências que o amaciamento de frutos envolve, além de degradações hidrolíticas, degradações oxidativas. De acordo com Dumville e Fry (2003), Brennan e Frenkel (1977) foram os primeiros a sugerir que a produção do radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), através do H_2O_2 e do $\cdot\text{O}_2^-$, poderia iniciar o amadurecimento de frutos promovendo danos oxidativos aos lipídeos da membrana plasmática, bem como cisões em polissacarídeos e evidenciaram que danos a membrana plasmática durante o amadurecimento pode construtivamente aumentar a liberação no interior do apoplasto de certos solutos protoplásmicos com função não enzimática de solubilizar pectinas amaciando o fruto, como o ascorbato. Outros estudos também têm mostrado a ocorrência de mecanismos oxidativos no amadurecimento de frutos. Rogiers *et al.* (1998) observaram em melão (*Amelanchier alnifolia*) um aumento na oxidação de glutatona e lipídeos de membrana, sugerindo intensa ação dos radicais $\cdot\text{O}_2^-$ e $\cdot\text{OH}$. Jiménez *et al.* (2002) evidenciaram que o amadurecimento de tomates foi acompanhado pelo aumento na concentração de H_2O_2 e

oxidação de lipídeos e proteínas. Yang *et al.* (2008) observaram a existência de uma relação entre a oxidação e a peroxidação de lipídeos de membranas e proteínas, causadas pelas EROS, e o amaciamento de banana.

Assim, a produção excessiva de EROS com a respiração no climatérico pode causar danos aos constituintes celulares como proteínas e lipídeos levando a perda da integridade e funcionalidade da membrana contribuindo, conseqüentemente, para o amaciamento dos frutos.

Tabela 10 - Correlação entre as variáveis antioxidantes e o grau de peroxidação lipídica através do coeficiente de Pearson durante o desenvolvimento de frutos de duas cultivares de sapotizeiro cultivadas em Paraipaba, CE.

Variáveis	Coeficiente de Correlação	
	Peroxidação Lipídica (nmol MDA.g ⁻¹ polpa)	
	‘Sapota Tropical’	‘Sapoti Ipa-Curu’
CAT (10 ² μmol H ₂ O ₂ . mg ⁻¹ proteína. min ⁻¹)	- 0.605*	- 0.468*
APX (μmol H ₂ O ₂ . mg ⁻¹ proteína. min ⁻¹)	- 0.525**	- 0.507*
SOD (10 ² UAE. mg ⁻¹ proteína)	-	- 0.706**
Flavonóides amarelos (mg. 100g ⁻¹ polpa)	-	-
Polifenóis Totais (mg EAG.100g ⁻¹ polpa)	-	-
Vitamin C Total (mg. 100g ⁻¹ polpa)	-	-
AAT (μM Trolox. g ⁻¹ polpa)	-	-

* Catalase (CAT); peroxidase do ascorbato (APX); dismutase do superóxido (SOD); atividade antioxidante total (AAT).

* Correlação variáveis x peroxidação lipídica considerando P ≤ 0.05

** Correlação variáveis x peroxidação lipídica considerando P ≤ 0.01

5. CONCLUSÃO

O amadurecimento do sapoti foi acompanhado por um estresse oxidativo progressivo evidenciado pelo aumento da peroxidação lipídica devido, principalmente, a diminuição da atividade de enzimas antioxidantes e, em menor grau pelo conteúdo dos compostos fenólicos funcionais;

Sapotis imaturos, colhidos aos 90 dias após a marcação, de ambas as cultivares estudadas apresentaram elevada atividade antioxidante atribuída, principalmente, ao alto conteúdo de compostos fenólicos.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-SUAREZ, J.M.; DEKANSKI, D.; RISTIC, S.; RADONJIC, N.V.; PETRONIJEVIC, N.D.; GIAMPIERI, F.; ASTOLFI, P.; GONZALÉZ-PARAMÁS, A.M.; SANTOS-BUELGA, C.; TULIPANI, S.; QUILES, J.L.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. Strawberry polyphenols attenuate ethanol-induced gastric lesions in lesions in rats by activation of antioxidant enzymes and attenuation of MDA increase. **Plusone**. v. 6, n. 10, p. 1-11, 2011.
- ALVES, R.E.; FILGUEIRAS, H.A.C.; MOURA, C.F.H. Sapoti. In: **Caracterização de frutas nativas da América Latina**. Jaboticabal FUNEP, 2000, p. 55-58. (Série Frutas Nativas).
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY - A. O. A. C. **Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 18. ed. Maryland: AOAC, 2005.
- ARAUJO-NETO, S.E. **Desenvolvimento, maturação e determinação do ponto de colheita do sapoti (*Manilkara achras*)**. Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Escola Superior de Agricultura de Mossoró, Mossoró-RN, 2000, 100p.
- BASHIR, H.A.; ABU-GOUKH, A.A. Compositional changes during guava fruit ripening. **Food Chemistry**. v. 80, p. 557-563, 2003.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.
- BEERS JR, R.F.; SIZER, I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry**. v. 195, p. 133-140, 1952.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRITO, E. S.; NARAIN, N. Physical and chemical characteristics of sapota fruit at different stages of maturation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 37, n. 4, p. 567-572, 2002.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: Ed. ESAL/FAEPE, 2005. 785 p.
- DUMVILLE, J.C.; FRY, S.C. Solubilisation of tomato fruit pectins by ascorbate: a possible non-enzymic mechanisms of fruit softening. **Planta**. v. 217, p. 951-961, 2003.
- FADDA, A.; MULAS, M. Chemical changes during myrtle (*Myrtus communis* L.) fruit development and ripening. **Scientia Horticulturae**. v.125, p. 477-485, 2010.
- FERREYRA, R.M.; VIÑA, S.Z.; MUGRIDGE, A. CHAVES, A.R. Growth and ripening season effects on antioxidant capacity of strawberry cultivar Selva. **Scientia Horticulturae**. v. 112, p. 27-32, 2007.
- FRANCIS, F.J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, 1982. p. 181-207.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**. v. 59, p. 309-314, 1977.

GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 13^o Edição, Piracicaba, Nobel, 1990, 468p.

GOMEZ, M.L.P.A.; LAJOLO, F.M. Ascorbic acid metabolism in fruits: Activity of enzymes involved in synthesis and degradation during ripening in mango and guava. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 88, p. 756-762, 2008.

HARUENKIT, R.; POOVARODOM, S.; VEARASILP, S.; NAMIESNIK, J.; SLIWKA-KASZYNSKA, M.; PARK, Y.; HEO, B.; CHO, J.; JANG, H.G.; GORINSTEIN, S. Comparison of bioactive compounds, antioxidant and antiproliferative activities of Mon Thong durian during ripening. **Food Chemistry**. v. 118, p. 540-547, 2010.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives in Biochemistry and Biophysics**. v. 125, p. 189-198, 1968.

HUANG, R.; XIA, R.; R.H.; HU, L.; LU, Y.; WANG, M. Antioxidant activity and oxygenscavenging system in orange pulp during fruit ripening and maturation. **Scientia Horticulturae**. v. 113, p. 166-172, 2007.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3^o. ed. São Paulo, 1985. v. 1.

JIAO, H.; WANG, S.Y. Correlation of antioxidant capacities to oxygen radical scavenging enzyme activities in blackberry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 48, p. 5672-5676, 2000.

JIMENEZ, A.; CREISSEN, G.; KULAR, B.; FIRMIN, J.; ROBINSON, S.; VERHOEYEN, M.; MULLINEAUX, P. Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. **Planta**. v. 214, p. 751-758, 2002.

KOC, A.; GASH, A.P.; RUTHERFORD, J.C.; KIM, H.Y.; GLADYSHEV, V.N. Methionine sulfoxide reductase regulation of yeast lifespan reveals reactive oxygen species-dependent and independent components of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**. v. 101, n. 21, p. 7999-8004, 2004.

KULKARNI, A.; ARADHYA, S.M. Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. **Food Chemistry**. v. 93, p. 319-324, 2005.

LARRAURI, J.A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 45, p. 1390-1393, 1997.

LEONG, L.P.; SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in the Singapore markets. **Food Chemistry**. v. 76, p. 69-75, 2002.

MA, J.; LUO, X.D.; PROTIVAS, P.; YANG, H.; MA, C.; BASILE, M.J.; WEINSTEIN, J.B.; KENNELLY, E.J. Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manilkara zapota* (sapodilla). **Journal of Natural Products**. v. 66, n. 7, p. 69-75, 2003.

MENICHINI, F; TUNDIS, R; BONESI, M; LOIZZO, M.R; CONFORTI, F; STATTI, G; DE CINDIO, B; HOUGHTON, P.J; MENICHINI, F. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. **Food Chemistry**, v. 114, p. 553-560, 2009.

MIRANDA, M.R.A. **Alterações fisiológicas e histológicas durante o desenvolvimento, maturação e armazenamento refrigerado do sapoti**. 2002. 136p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MIRANDA, M.R.A., BENBADIS, A.K., FILGUEIRAS, H.A.C., ALVES, R.E. Alterações físicas e químicas durante o desenvolvimento e maturação do sapoti. **Proceedings of Interamerican Society for Tropical Horticulture**. v. 47, p. 259-261, 2003.

MIRANDA, M.R.A., FILGUEIRAS, H.A.C., ALVES, R.E., SOARES, A.A., BENBADIS, A.K. Physico-chemical and histological characterization of the development of sapodilla. **Revista Ciência Agronômica**. v. 39, n. 4, p. 575-582, 2008.

MIRANDA, M.R.A; SILVA, F.S; ALVES, R.E; FILGUEIRAS, H.A.C; ARAÚJO, N.C.C. Armazenamento de dois tipos de sapoti sob condição de ambiente. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 24 (3), p. 644-646, 2002

MONDAL, K.; SHARMA, N.S.; MALHOTRA, S.P.; DHAWAN, K.; SINGH, R. Antioxidant systems in ripening tomato fruits. **Biologia Plantarum**. v. 48, n. 1, p. 49-53, 2004.

MORAIS, P.L.D. **Qualidade e bioquímica de parede celular de sapoti [Manilkara zapota (L.) Von Royen] submetido ao 1-metilciclopropano**. 2005. 144p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

NAGAPRASHANTHA, L.D.; VATSYAYAN, R.; SINGHAL, J.; FAST, S.; RODY, R.; AWASTHI, S.; SINGHAL, S.S. Anti-cancer effects of novel flavonoid vicenin-2 as a single agent and in synergistic combination with docetaxel in prostate cancer. **Biochemical Pharmacology**. v. 82, n. 9, p. 1100-1109, 2011.

NAKANO, Y.; ASADA, K. hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplast. **Plant Cell Physiology**., v. 22, p. 867-880, 1981.

NEUHOUSER, M. L. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutrition and Cancer*. v. 50, p. 1-7, 2004.

OBANDA, M.; OWUOR, P.O. Flavonol composition and caffeine content of green leaf as quality potential indicators of Kenyan black teas. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 74, p. 209-215, 1997.

OLIVEIRA, V.S.; AFONSO, M.R.A.; COSTA, J.M.C. Physico chemical and hygroscopic behavior of sapodilla lyophilized. **Revista Ciência Agronômica**. v. 52, n. 2, p. 342-348, 2011.

OLIVEIRA, L.S.; RUFINO, M.S.M.; MOURA, C.F.H.; CAVALCANTI, F.R.; ALVES, R.E.; MIRANDA, M.R.A. The influence of processing and long-term storage on the antioxidant metabolism of acerola (*Malpighia emarginata* D.C) purée. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v. 23, n. 2, p. 151-160, 2011.

PATHAK, S.; BHAT, J.V. Studies on the carbohydrate metabolism of *Achras zapota* L. fruit, **Journal of the University of Bombay**, p. 11-20, 1952.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

ROY, S.K.; JOSHI, G.D. **Sapota**. In: MITRA, 1997. p. 387-395.

ROGIERS, S.Y.; KUMAR, G.N.M.; KNOWLES, N.R.; Maturation and ripening of fruit of *Amelanchier alnifolia* Nutt. are accompanied by increasing oxidative stress. **Annals of Botany**, v. 81, p. 203-211, 1998.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. **Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS.+**. Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. 4 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 128).

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; SILVEIRA, M.R.S.; MOURA, C.F.H. Quality for fresh consumption and processing of some non-traditional tropical fruits from Brazil. **Fruits**. v. 64, p. 361-370, 2009.

SHATTIR, A.E.; ABU-GOUKH, A.A. Physico-chemical changes during growth and development of papaya fruit: Physical changes. **Agriculture and Biology Journal of North America**. v. 1, n. 5, p. 866-870, 2010.

SHUI, G. H.; LEONG, L. P. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds of fruit juices and drinks by highperformance liquid chromatography. **Journal Chromatography**. v. 977, p. 89-96, 2002.

SHUI, G.; WONG, S.P.; LEONG, L.P. Characterization of antioxidants and change of antioxidant levels during storage of *Manilkara zapota* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 7834-7841, 2004.

SHWARTZ, E.; GLAZER, I.; BAR-YA'AKOV, I.; MATITYAHU, I.; BAR-ILA, I.; HOLLAND, D.; AMIR, R. Changes in chemical constituents during the maturation and ripening of two commercially important pomegranate accessions. **Food Chemistry**. v. 115, p. 965-973, 2009.

SELVARAJ, Y.; PAL, D.K., Changes in the chemical composition and enzyme activity of two sapodilla (*Achras zapota*) cultivars during development and ripening. **Journal Horticultural Science**, v.59, n. 2, p. 275-281, 1984.

STROHECKER, R.; HENNING, H.M. **Analisis de vitaminas: métodos comprobados**. Madrid: Paz Montalvo, 1967. 428 p.

USENIK, V.; KASTELEC, D.; VEBERIC, R.; STAMPAR, F. Quality changes during ripening of plums (*Prunus domestica* L.). **Food Chemistry**. v. 111, p. 830-836, 2008.

VVEDENSKAYA, I.O.; VORSA, N. Flavonoid composition over fruit development and maturation in American cranberry, *Vaccinium macrocarpon* Ait. **Plant Science**. v. 167, p. 1043-1054, 2004.

YAHIA, E.M., CONTERAS-PADILLA, M., GONZALEZ-AGUIAR, G. Ascorbic acid content in relation to ascorbic acid oxidase activity and polyamine content in tomato and bell pepper fruits during development, maturation and senescence. **Lebensm.-Wiss. Technology**, v. 34, p. 452-457, 2001.

YANG, S; SU, X; PRASAD, K.N; YANG, B; CHENG, G; CHEN, Y; YANG, E; JIANG, Y. Oxidation and peroxidation of postharvest banana fruit during softening. **Pakistan Journal of Botany**. v. 40, n. 5, p. 2023-2029, 2008.

YANG, Z.; ZHENG, Y.; CAO, S. Effect of high oxygen atmosphere storage on quality, antioxidant enzymes, and DPPH-radical scavenging activity of Chinese bayberry fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, p. 176-181, 2009.

ZHU, S.; SUN, L.; LIU, M.; ZHOU, J. Effect of nitric oxide on reactive oxygen species and antioxidant enzymes in kiwifruit during storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 88, p. 2324–2331, 2008.

WANG, S.Y; JIAO, H.J. Changes in oxygen-scavenging systems and membrane lipid peroxidation during maturation and ripening in blackberry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 49, p. 1612-1619, 2001.