



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

MARCELA CRISTINA RABELO

**EFEITOS DA LUZ PULSADA SOBRE O METABOLISMO DE VITAMINA C E
COMPOSTOS FENÓLICOS EM ACEROLA (*Malpighia emarginata* DC)**

FORTALEZA

2016

MARCELA CRISTINA RABELO

EFEITOS DA LUZ PULSADA SOBRE O METABOLISMO DE VITAMINA C E
COMPOSTOS FENÓLICOS EM ACEROLA (*Malpighia emarginata* DC)

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular 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: Dra. Maria Raquel Alcântara de Miranda

FORTALEZA-CEARÁ

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- R114e Rabelo, Marcela Cristina.
Efeitos da luz pulsada sobre o metabolismo de vitamina C e compostos fenólicos em acerola (*Malpighia emarginata* DC)./ Marcela Cristina Rabelo. – 2016.
76 f. : il., color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2016.
Orientação: Profa. Dra. Maria Raquel Alcântara de Miranda
1. Acerola. 2. Antioxidantes. 3. Bioquímica. I. Título.

CDD 574.192

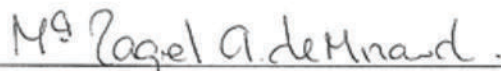
MARCELA CRISTINA RABELO

EFEITOS DA LUZ PULSADA SOBRE O METABOLISMO DE VITAMINA C E
COMPOSTOS FENÓLICOS EM ACEROLA (*Malpighia emarginata* DC)

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade
Federal do Ceará como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Doutor em Bioquímica.

Aprovada em: 16/02/2016

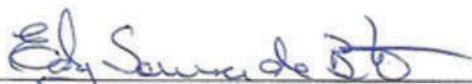
BANCA EXAMINADORA




Dra. Maria Raquel Alcântara de Miranda (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará



Dr. Renato de Azevedo Moreira
Universidade de Fortaleza



Dr. Edy Souza de Brito
EMBRAPA/Agroindústria Tropical



Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira
Universidade Federal do Ceará



Dr. José Hélio Costa
Universidade Federal do Ceará

Agradecimentos

A Deus, pela saúde e paz, e à minha família pelo apoio incondicional.

Aos CNPq e Projeto INCT-Frutos Tropicais/CNPq, na pessoa do coordenador o Dr. Narendra Narain professor da Universidade Federal de Sergipe pela concessão das bolsas de doutorado e sanduíche, respectivamente.

À professora Dra. Maria Raquel Alcântara de Miranda pela orientação, compreensão e confiança, em nome da Universidade Federal do Ceará e do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica onde obtive minha formação profissional.

Ao professor Dr. Luís Cisneros-Zevallos e seu auxiliar, o pesquisador Dr. Woo Young Bang, pelo acolhimento e suporte científico no desenvolvimento desse trabalho na Texas A&M University, no Texas-EUA.

Aos pesquisadores Dr. Ricardo Elesbão Alves, Dr. Ebenézer Oliveira Silva e Dr. Edy Souza de Brito como representantes da EMBRAPA Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE pelo apoio na realização desse trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Frutos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará pela convivência agradável e amizade durante todos os anos em que trabalhei/estudei neste.

Resumo

Irradiações com baixas doses de LP vêm sendo utilizadas para preservar a qualidade nutricional de frutos tropicais altamente perecíveis por causar um aumento/proteção no conteúdo de compostos antioxidantes durante o armazenamento pós-colheita. Contudo, o mecanismo pelo qual a LP atua ativando o sistema antioxidante em tecidos vegetais ainda não foi estabelecido. Nesse trabalho foi investigado os efeitos do tratamento com LP (dois pulsos de $0,3 \text{ J.cm}^{-2}$) sobre o metabolismo da vitamina C e de compostos fenólicos em relação à síntese, degradação e aos sinais que controlam essas vias em acerola (*Malpighia emarginata* DC) durante o armazenamento pós-colheita. Os frutos tratados e armazenados por 7 dias a 10°C mostraram uma significativa menor redução no conteúdo de vitamina C e de compostos fenólicos. O tratamento foi capaz de ativar, a nível protéico, a última enzima da via de biossíntese do ácido ascórbico, desidrogenase da L-galactona-1,4-lactona (GalDH, EC 1.3.2.3), e mudou a composição de compostos fenólicos por meio da ativação da via de biossíntese, evidenciada pela atividade da fenilalanina amônia liase (PAL, EC 4.3.1.24). Além disso, a produção de EROs também foi induzida pela LP imediatamente após o tratamento (tempo 0) e após o período de armazenamento (tempo 7) por ativação da respiração mitocondrial e da oxidase do NADPH (EC 1.6.99.6), respectivamente. Esses resultados sugerem que a LP reduz as perdas de vitamina C e compostos fenólicos em acerola por causar alterações no metabolismo de síntese desses compostos em um mecanismo mediado por EROs. Dessa forma, esse trabalho mostrou os efeitos benéficos da LP na manutenção da qualidade nutricional de acerolas durante o armazenamento pós-colheita e forneceu informações para o entendimento do mecanismo de ação pelo qual esse tratamento pode atuar, o que pode servir como base para o desenvolvimento de tecnologias que visam a redução das perdas e o acúmulo de antioxidantes em produtos vegetais.

Palavras-chave: acerola, luz pulsada, ácido ascórbico, compostos fenólicos, EROs.

Abstract

EFFECTS OF PULSED LIGHT ON THE METABOLISM OF VITAMIN C AND PHENOLIC COMPOUNDS IN ACEROLA (*Malpighia emarginata* DC)

PL irradiation at low doses has been used to preserve nutraceutical value of the tropical fruits, highly perishable, by enhancing antioxidant systems during postharvest storage. However, the PL mediated mechanism inducing the antioxidant systems remains unknown. Here we investigated the effects of PL on degradation of vitamin C and phenolic compounds in acerola (*Malpighia emarginata* DC) during postharvest storage to elucidate the mechanism inducing the antioxidant systems. The fruits, stored at 10 °C for 7 days after a hormetic PL irradiation (two pulses of 0.3 J.cm²), showed significantly less degradation of vitamin C and phenolic compounds than the control without the PL challenge. The treatment activated the L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (EC 1.3.2.3), a key enzyme for vitamin C biosynthesis, and changed composition of phenolic compounds, through new phenolic biosynthesis, in acerola during postharvest storage. It also induced ROS productions at the early (0 day) and late (7 days) times during postharvest storage through the mitochondrial electron transport chain and the NADPH oxidase (EC 1.6.99.6), respectively. These prove that the PL protects vitamin C and phenolic compounds from degradation in acerola by altering ascorbic acid and phenolic metabolism through a ROS-mediated mechanism. Altogether, our data first showed the beneficial effects of PL on maintenance of nutraceutical quality in acerola during postharvest storage and supplied new insights into understanding of mechanism by which PL irradiation enhance the antioxidant system in fruits.

Keywords: acerola, pulsed light, ascorbic acid, phenolics compounds, ROS.

LISTA DE ABREVIATURAS

APX	Peroxidase do ascorbato
AsA	Ácido ascórbico reduzido
DHA	Ácido dehidroascórbico
DHAR	Redutase do dehidroascorbato
GR	Redutase da glutaciona
LP	Luz pulsada
MDHAR	Redutase do monodehidroascorbato
PAL	Fenilalanina amônia liase
SOD	Dismutase do superóxido
PPO	Polifenol oxidase
GSSG	Glutaciona oxidada
GSH	Glutaciona reduzida
GalDH	Desidrogenase da L-galactona-1,4-lactona
UV	Ultravioleta
EROs	Espécies reativas de oxigênio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NOX	Oxidase do NADPH
GMP	Pirofosforilase da GDP-manose
GDP	Guanosina difosfato
GME	GDP-manose-3,5-epimerase
GGP	Fosforilase da GDP-L-galactose
GDH	Deshidrogenase da L-galactose
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
AO	Oxidase do ascorbato
CoA	Coenzima A
MF	Massa fresca
MS	Massa seca
DNA	Ácido desoxiribonucléico
RNA	Ácido ribonucléico
PCR	Reação em cadeia da polimerase

RT-PCR	PCR precedida de reação da enzima Transcriptase Reversa
AC	Ácido clorogênico
C _{NC}	Concentração não corrigida
CAC _{AsA}	Concentração de ácido clorogênio relativo à concentração de AsA
MTS	Sal 5-(3-carboximetoxifenil)-2 (4,5dimetiltiazol)-3-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
DPI	Difenileneiodonio
PVP	Polivinilpirrolidona
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
DTT	Ditiotreitol
K _s	Taxa de síntese
K _d	Taxa de degradação
N.I.	Não identificado

Sumário

<i>Seção</i>	<i>Pag.</i>
1. Introdução	10
2. Revisão Bibliográfica	12
2.1 Estresse abiótico e <i>hormesis</i>	12
2.1.1 Tecnologia pós-colheita da luz pulsada	15
2.2 Metabolismo da vitamina C	17
2.2.1 Biossíntese da vitamina C	18
2.2.2 Catabolismo da vitamina C	21
2.2.3 Estresses abióticos e o metabolismo da vitamina C	22
2.3 Metabolismo de compostos fenólicos	24
2.3.1 Biossíntese de compostos fenólicos	24
2.3.2 Catabolismo de compostos fenólicos	27
2.3.3 Estresses abióticos e o metabolismo de compostos fenólicos	28
2.4 Frutos da aceroleira	29
3. Objetivos	32
4. Material e Métodos	33
4.1 <i>Material vegetal</i>	33
4.2 <i>Tratamento com luz pulsada</i>	33
4.3 <i>Avaliações do metabolismo de vitamina C</i>	34
4.3.1 <i>Determinação de vitamina C</i>	34
4.3.2 <i>Atividade da desidrogenase da L-galactona-1,4-lactona (GalDH, EC 1.3.2.3)</i>	34
4.3.3 <i>Análise de expressão gênica de enzimas da via de biossíntese da vitamina C</i>	35
4.4 <i>Avaliações do metabolismo de compostos fenólicos</i>	36
4.4.1 <i>Determinação de conteúdo de compostos fenólicos totais</i>	36
4.4.2 <i>Determinação de perfil de fenólicos</i>	37
4.4.3 <i>Atividade da fenilalanina amônia liase (PAL, EC 4.3.1.24)</i>	38
4.4.4 <i>Atividade da polifenoloxidase (PPO, EC 1.14.18.1)</i>	39
4.5 <i>Metabolismo respiratório e radicais livres</i>	40
4.5.1 <i>Análise de atividade mitocondrial</i>	40
4.5.2 <i>Atividade da oxidase do NADPH (NOX, EC 1.6.3.1)</i>	40

4.5.3	<i>Determinação de radicais livres totais</i> -----	41
4.6	<i>Quantificação de proteínas totais</i> -----	41
4.7	<i>Análise estatística</i> -----	42
5.	Resultados e discussão -----	43
5.1	<i>Efeitos da LP no metabolismo de vitamina C</i> -----	43
5.2	<i>Efeitos da LP no metabolismo de compostos fenólicos</i> -----	48
5.3	<i>Efeitos da LP sobre a respiração e produção de EROs</i> -----	54
6.	Conclusão -----	61
	Referências -----	63

1. Introdução

O consumo de frutas e hortaliças tem aumentado nos últimos anos devido ao sabor atrativo e ao valor nutricional apreciável por apresentar compostos antioxidantes tais como vitamina C e compostos fenólicos. No entanto, a elevada perecibilidade limita o consumo e a vida útil desses produtos, os quais sofrem consideráveis perdas qualitativas e quantitativas após a colheita (GONZALEZ-AGUILAR et al., 2010a).

Diversas tecnologias são utilizadas com objetivos de prolongar a vida útil e manter a qualidade após a colheita dos frutos. Muitas dessas tecnologias se baseiam na indução de condições brandas de estresse ou em doses horméticas, com a finalidade de ativar o sistema de defesa vegetal com possível manutenção ou até melhoria dos fitoquímicos presentes nos produtos vegetais (CISNEROS-ZEVALLOS, 2003; GONZALEZ-AGUILAR et al., 2010b). A luz pulsada (LP) é uma evolução da tecnologia que utiliza a luz ultravioleta (UV) e consiste na exposição a pulsos intensos e curtos (1 μ s a 0,1 s) de luz policromática que vai do UV ao infravermelho próximo (100 a 1100 nm) emitida por lâmpadas de gás xenônio. O maior poder de emissão e de penetração da LP, quando comparado ao UV, pode induzir estresse e estimular uma elevada produção de compostos bioativos com o objetivo de minimizar os danos causados pela radiação, nos tecidos vegetais (RODOV; VINOKUR; HOREV, 2012).

Alguns estudos recentes mostram que tratamentos pós-colheita com LP (entre 0,2-10 J.cm⁻²) têm se mostrado eficientes em promover manutenção na firmeza, cor e aumento na vida útil de diversos frutos, além de causar aumento no conteúdo de compostos fenólicos totais e de outros compostos antioxidantes como carotenóides e vitamina C (CHARLES et al., 2013; KOYYALAMUDI et al., 2011; LOPES et al., 2015; PATARO; SINIK; CAPITOLI; DONSI; et al., 2015; RODOV et al., 2012). Esses resultados sugerem que doses horméticas de LP podem estimular o sistema antioxidante como um mecanismo de defesa contra o estresse, podendo aumentar a qualidade e a extensão da vida pós-colheita de frutos. Apesar das recentes descobertas, o mecanismo pelo qual a LP pode aumentar o nível de antioxidantes em tecidos vegetais permanece desconhecido.

A acerola (*Malpighia emarginata* DC) é um fruto tropical considerado como alimento funcional devido à elevada concentração de nutraceuticos como vitamina C e compostos fenólicos, o que faz desse fruto um ótimo modelo para o estudo do metabolismo desses compostos (DE ASSIS et al., 2008; SIMAO, SALIM, 1971). No entanto, a perecibilidade

desses frutos faz com que os mesmos apresentem elevadas perdas na qualidade nutricional após a colheita. Dessa forma, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de técnicas pós-colheita, que aumentem a qualidade e /ou reduza as perdas nutricionais, bem como prolonguem a vida útil desses frutos.

O objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos do tratamento com LP sobre o metabolismo de vitamina C e de compostos fenólicos em relação à sua síntese, composição e degradação durante o armazenamento pós-colheita de acerolas.

2. Revisão Bibliográfica

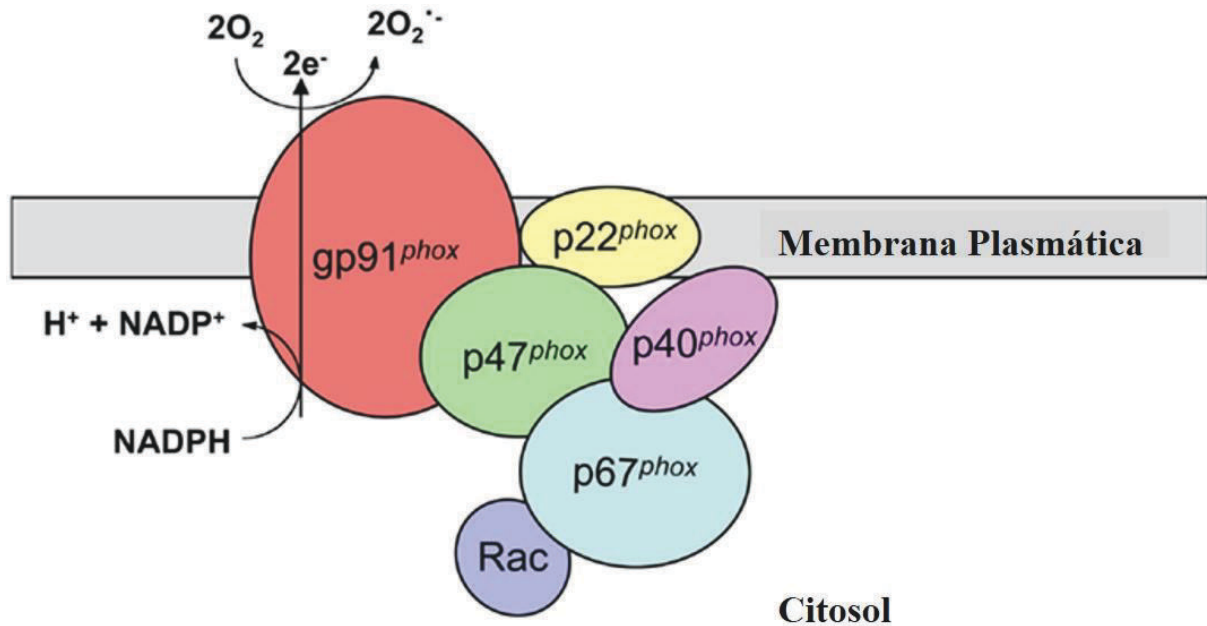
2.1 Estresse abiótico e *hormesis*

Condições ambientais desfavoráveis para o crescimento, desenvolvimento e produção normal de plantas, como déficit hídrico, salinidade, poluição, luz intensa, frio e calor extremos são denominadas de estresses abióticos. Nessas condições, processos intracelulares são desencadeados e culminam na expressão de uma fração do potencial genético da planta refletindo em um crescimento desordenado (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os estresses abióticos influenciam vias metabólicas como a respiratória e de defesa como o metabolismo secundário. Em condições normais, radicais livres são formados no metabolismo celular por enzimas que participam da respiração mitocondrial ou por reações não enzimáticas entre o oxigênio e outros compostos orgânicos. No entanto, em condições estressantes os radicais livres se acumulam em concentrações mais altas induzindo um estresse oxidativo que resulta tanto na sinalização de vias de defesa quanto em danos fisiológicos diretos, como a deterioração de membranas e a mutação de DNA (MITTLER, 2002; WANG; JIAO, 2001).

Em plantas, além da respiração mitocondrial (MITTLER, 2002), outras fontes de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser ativadas em resposta aos estresses como a enzima nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (oxidase do NADPH ou NOX) localizada na membrana plasmática de células vegetais, cuja reação está ilustrada na Figura 1 (SAGI; FLUHR, 2006b). Em resposta às EROs produzidas, um sistema de defesa antioxidante é ativado com participação de enzimas e compostos não enzimáticos do metabolismo secundário, como fenólicos (JACOBO-VELÁZQUEZ et al., 2011). Como exemplo, o radical superóxido (O_2^-) produzido é degradado pela enzima dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1) resultando na liberação de oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual, por sua vez, pode ser neutralizado por peroxidases (POX) ou pela catalase (CAT, EC 1.11.1.6); ou o acúmulo dessas espécies reativas pode resultar na ativação da enzima oxidase alternativa (AOX), na cadeia de elétrons da mitocôndria como uma forma de reduzir a produção desses compostos tóxicos e reduzir o estresse oxidativo (MAXWELL; WANG; MCINTOSH, 1999); ou ainda, as EROs podem atuar como sinalizadores na indução da expressão gênica e atividade da fenilalanina amônia liase (PAL) estimulando a produção de compostos fenólicos (HEREDIA, 2006; SURJADINATA, 2006).

Figura 1. Estrutura e reação da enzima oxidase do NADPH vegetal.



FONTE: journal.frontiersin.org

O conhecimento dos benefícios e potenciais de uso de metabólitos secundários como os compostos fenólicos na agricultura e na medicina vêm estimulando o desenvolvimento de estratégias que levem ao aumento da concentração desses compostos nos tecidos vegetais. Uma técnica que vem sendo avaliada, principalmente em frutos e hortaliças, é a exposição destes a estresses abióticos horméticos (CISNEROS-ZEVALLOS, 2003). O termo *hormesis* refere-se a algum benefício causado pela aplicação de baixas doses de um agente prejudicial (LUCKEY, 1980) e a aplicação de estresses horméticos induzem processos intracelulares que causariam mudanças positivas na homeostase e na resistência do organismo como um todo à condições adversas, além de ser um potencial estímulo para a produção de metabólitos secundários (GEMS; PARTRIDGE, 2008).

Assim, a exposição controlada a estresses abióticos vem sendo utilizada em pré-colheita para aumentar a qualidade e o rendimento de produtos vegetais, ainda no campo (HOWELL et al., 2001). Um exemplo disso é o aumento no conteúdo de vitamina C em plantas, de um modo geral, expostas à elevada intensidade luminosa, mesmo que este não seja um fator essencial para a síntese desse composto, ou a uma baixa frequência de irrigação, como foi observado para alho-poró (*Allium porrum*) (LEE; KADER, 2000). Estudos mostraram que o estresse hídrico pode aumentar os níveis de pungência de pimentas

(ESTRADA et al., 1999), enquanto que a coloração da casca de maçãs (*Malus domestica*) pode ser intensificada com o acúmulo de antocianinas pela aplicação de Etefon® e de uma mistura de fósforo e cálcio (LI, Z.; GEMMA; IWAHORI, 2002).

Em pós-colheita, o desenvolvimento de estresses abióticos controlados são a base de muitas tecnologias empregadas como ferramentas para prolongar a vida útil, manter ou até mesmo incrementar a qualidade de frutas e hortaliças (KADER, 2002). Como exemplo dessas tecnologias, tem-se o corte para o processamento mínimo (SALTVEIT, 1996) e a modificação da atmosfera de armazenamento com concentrações controladas de O₂ e CO₂ ou etileno para controlar os processos de amadurecimento e desverdecimento (KAYS, 1991).

O esclarecimento sobre o mecanismo fisiológico pelo qual os estresses horméticos induzem o acúmulo de metabólitos secundários é crítico para permitir o uso de produtos vegetais como biofábricas de compostos nutracêuticos (JACOBO-VELÁZQUEZ et al., 2011). Vários organismos procariotos e alguns eucariotos têm sido modificados geneticamente para promover maior produção de metabólitos de interesse, porém, a engenharia metabólica é uma técnica complexa e cara, além de organismos geneticamente modificados serem severamente questionados quanto às questões de potencial e segurança ambiental (SZYBALSKI, 1985). Assim, a aplicação de estresses abióticos em pós-colheita de frutos e hortaliças representa uma tecnologia relativamente mais barata, prática e efetiva que permite o acúmulo de metabólitos nutracêuticos, uma vez que os tecidos tratados (estressados) podem ser submetidos a um processamento com finalidade de recuperar e purificar os metabólitos de interesse com potencial aplicação nas indústrias de suplementos dietéticos e farmacêuticos (JACOBO-VELÁZQUEZ et al., 2011).

Alguns exemplos do emprego de estresses abióticos com tal objetivo foram encontrados em alface, no qual o tratamento com etileno induziu a atividade da PAL promovendo aumento no conteúdo de compostos fenólicos (HYODO; KURODA; YANG, 1978); em cenouras (*Daucos carota*) e batatas (*Solanum tuberosum*), que, quando cortadas, apresentam alteração no metabolismo desses compostos (HEREDIA; CISNEROS-ZEVALLOS, 2009; TORRES-CONTRERAS et al., 2014) e em ‘blueberries’ (*Vaccinium myrtillum*), morangos (*Fragaria x ananassa*) e ‘bayberries’ chineses (*Myrica rubra*), que expostos à atmosfera rica em oxigênio, apresentam aumento na concentração de compostos fenólicos (AYALA-ZAVALA et al., 2007; YANG; ZHENG; CAO, 2008; ZHENG et al., 2003). A irradiação pós-colheita com luz ultravioleta na faixa C (UV-C) em baixas doses prolongou a vida útil e preservou a qualidade de maçãs, tomate (*Solanum*

lycopersicum), laranjas (*Citrus sinensis*), uvas (*Vitis vinífera*), manga (*Mangifera indica*) e pêssego (*Prunus persica*) por retardar os processos de amadurecimento e senescência, enquanto que elevadas doses de irradiações causaram efeitos negativos (CANTOS; ESPÍN; TOMÁS-BARBERÁN, 2001; D'HALLEWIN et al., 1999; GONZÁLEZ-AGUILAR et al., 2004; GONZÁLEZ-AGUILAR; ZAVALA-GATICA; TIZNADO-HERNÁNDEZ, 2007; GONZÁLEZ-AGUILAR et al., 2001; GONZALEZ-AGUILAR; WANG; BUTA, 2004; LU et al., 1991; MAHARAJ; ARUL; NADEAU, 1999; PERKINS-VEAZIE; COLLINS; HOWARD, 2008; POMBO et al., 2009).

2.1.1 Tecnologia pós-colheita de luz pulsada

Luz pulsada (LP) é uma tecnologia não térmica emergente que envolve o uso de pulsos luminosos intensos, de curta duração e com um amplo espectro, que foi desenvolvida inicialmente com o objetivo de promover a inativação microbiana na superfície de diversos produtos (DUNN; OTT; CLARK, 1995). Nesse tratamento, a energia eletromagnética é acumulada em um capacitor durante frações de segundos e então liberada na forma de luz em um curto intervalo de tempo (de nano a milissegundos), resultando em amplificação da potência com consumo mínimo de energia (DUNN et al., 1995). A luz emitida inclui amplo espectro de comprimentos de onda (de 100 a 1100 nm): ultravioleta (100-400 nm), luz visível (400-700 nm) e infravermelho (700-1100 nm) (BARBOSA-CANOVAS et al., 1999).

No tratamento com LP, a faixa do espectro referente à luz UV-C (200-280 nm) é a mais importante em termos de efeitos sobre organismos vivos e depende da intensidade em $J.cm^{-2}$ e do número de pulsos (BARBOSA-CANOVAS et al., 1999). A exposição a doses horméticas de UV-C resulta no estabelecimento de um estresse oxidativo com alteração da expressão de genes e na atividade de enzimas de defesa (WANG; FREI, 2011). Estudos sobre o efeito da radiação UV-C durante o armazenamento pós-colheita de morango, goiaba (*Psidium guajava*), banana (*Musa* sp.) e mamão (*Carica papaya*) mostraram aumento significativo na capacidade antioxidante e manutenção da qualidade (ALOTHMAN; BHAT; KARIM, 2009a;2009b; ERKAN; WANG; WANG, 2008; RIVERA-PASTRANA et al., 2013). Em mangas, a irradiação com UV-C causou acúmulo de poliaminas, compostos relacionados com a prevenção de danos oxidativos e da perda de qualidade, e de antioxidantes como ácido ascórbico e β -caroteno (GONZÁLEZ-AGUILAR et al., 2007). Em tomates, na maturidade fisiológica, a radiação UV-C aumentou significativamente o conteúdo de licopeno, de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total (BRAVO et al., 2012).

O conteúdo de vitamina C de brócolis e da casca de maçã também aumentou após o tratamento com UV-C (HAGEN et al., 2007; LEMOINE et al., 2007). Contudo, tratamentos com radiação UV apresentam diversas desvantagens como baixa penetração e baixo poder de emissão.

Além da maior penetrabilidade, a aplicação de LP resulta em temperaturas mais baixas devido ao curto tempo de duração dos pulsos e ao sistema de resfriamento aplicado entre os pulsos. Por ser um tratamento não térmico, a aplicação de LP reduz os danos que as elevadas temperaturas poderiam causar à produtos alimentícios (KRISHNAMURTHY; DEMIRCI; IRUDAYARAJ, 2004). Dessa forma, tratamentos com LP podem ser considerados como uma tecnologia mais moderna do uso de luz UV (PATARO; SINIK; CAPITOLI; DONSI; et al., 2015).

Todavia, o maior poder de emissão e de penetração da LP podem induzir um estresse, o que pode estimular uma elevada produção de compostos bioativos em tecidos vegetais com o objetivo de minimizar os danos causados pela radiação (RODOV et al., 2012). Dessa forma, nos últimos anos, a aplicação de LP tem atraído o interesse de pesquisadores não apenas pelo fato de promover uma inativação não térmica de microrganismos, mas também como um tratamento de preservação pós-colheita (OMS-OLIU; MARTÍN-BELLOSO; SOLIVA-FORTUNY, 2010; RIBEIRO; ALVARENGA, 2012). Além disso, o pequeno tempo de exposição (segundos para LP e minutos ou horas para luz UV contínua) necessário para que o tratamento cause os efeitos desejados pode promover a utilização da tecnologia de LP em escala industrial (RODOV et al., 2012).

Apesar desse elevado potencial citado, há poucos estudos na literatura que investigam os efeitos da aplicação hormética de LP no processamento pós-colheita de frutas e hortaliças para incremento da qualidade nutricional destes. Alguns estudos recentes mostram que LP ($0,2-10 \text{ J cm}^{-2}$) promove um eficiente aumento no conteúdo de vitamina D2 em cogumelos (*Agaricus bisporus*) (KOYYALAMUDI et al., 2011), aumento no conteúdo de antocianinas e compostos fenólicos totais em figos (*Ficus carica*) (RODOV et al., 2012) e ativação de vias de biossíntese de compostos com elevada capacidade antioxidante (carotenoides totais, licopeno e fenólicos totais) em tomates e maçãs (PATARO; SINIK; CAPITOLI; DONSI; et al., 2015). Em mangas minimamente processadas, a aplicação de LP (8 J cm^{-2}) prolongou a vida útil através da manutenção da firmeza e da cor (CHARLES et al., 2013). Em mangas “Tommy Atkins” não processadas, a aplicação de dois pulsos de LP ($0,6 \text{ J cm}^{-2}$) provocou um aumento na atividade da PAL, com conseqüente aumento na concentração de compostos fenólicos, além de desencadear um acúmulo de outros antioxidantes não enzimáticos

(carotenóides e vitamina C) e enzimáticos na polpa desses frutos, em um processo mediado por EROs (LOPES et al., 2015).

Apesar dos efeitos já observados sobre o metabolismo de produtos vegetais, não há relatos na literatura sobre o mecanismo e as rotas de sinalização pelas quais a LP poderia promover a ativação dessas vias antioxidantes e consequente extensão da vida de prateleira desses.

2.2 Metabolismo da vitamina C

A estrutura do ácido L-ascórbico é composta por um anel 1,4 lactona estável derivado de açúcares (hexoses) e contém grupos enediol nos carbonos 2 e 3. A hidroxila presente no C₃ tem um pK_a de 4,13, o que faz com que em pH fisiológico (aproximadamente 7,0) o ácido L-ascórbico encontre-se na forma de ânion monovalente, o L-ascorbato. A dissociação da segunda hidroxila ocorre em pH 11,6 (DAVEY et al., 2000).

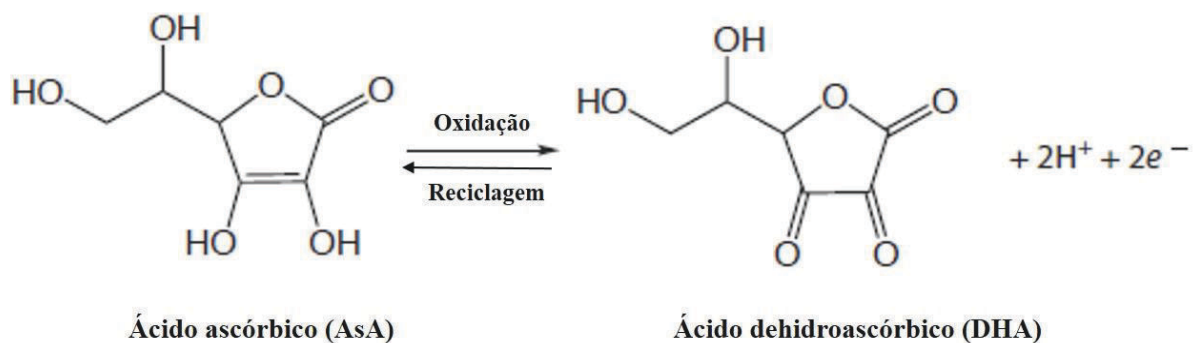
O ácido ascórbico desempenha funções essenciais no metabolismo vegetal, onde funciona como cofator de enzimas envolvidas nos processos de expansão e divisão celular e como co-substrato para a biossíntese de fitormônios como o etileno e o ácido giberélico (DAVEY et al., 2000). Além disso, essa molécula apresenta função antioxidante, sendo capaz de interagir enzimática e não-enzimaticamente com EROs formadas em decorrência do metabolismo aeróbico, bem como nos processos de fotossíntese, lignificação da parede celular e em resposta à condições de estresse, as quais podem causar danos irreparáveis à toda maquinaria biomolecular da célula (HUANG et al., 2007).

Em células vegetais, a maior parte do ácido ascórbico está localizada no citoplasma, e cerca de 5 % é transportada através da membrana plasmática para a região do apoplasto, onde representa a primeira linha de defesa contra EROs produzidos em decorrência das perturbações ambientais e auxilia nos processos de formação da parede da célula, extensão e divisão celular (BARNES; ZHENG; LYONS, 2002; SMIRNOFF, 2001). Algumas pesquisas mais recentes sugerem o envolvimento do ácido ascórbico em processos oxidativos induzidos por estresse, como em resposta ao déficit hídrico (FOTOPOULOS et al., 2008).

Os benefícios associados à saúde humana do ácido ascórbico tanto em sua forma reduzida (ácido ascórbico) quanto oxidada (ácido dehidroascórbico) advêm de sua participação na síntese de colágeno e consequente, formação de cartilagem, ossos, gengivas, pele e dentes, reforço na atividade de leucócitos e outros componentes do sistema

imunológico e efeito protetor contra doenças associadas ao estresse oxidativo, como câncer, formação de catarata, doenças cardiovasculares e envelhecimento (DIPLOCK et al., 1998). Estas funções devem-se grandemente a sua capacidade antioxidante, a qual apresenta um diferencial em relação a outros antioxidantes como os α -tocoferol, carotenóides e compostos fenólicos por não gerar produtos tóxicos ou radicais como resultado de sua ação antioxidante (DAVEY et al., 2000). As estruturas do ácido ascórbico nas formas reduzida e oxidada estão ilustradas na Figura 2.

Figura 2. Estrutura das formas reduzida (AsA) e oxidada (DHA) da vitamina C.



Fonte: Autor (2016).

Devido à ausência de uma das enzimas da via biossintética do ácido ascórbico em mamíferos, a espécie humana não consegue sintetizá-lo, portanto deve obtê-lo através de sua alimentação, principalmente por frutas e hortaliças (STONE, 1984).

As concentrações de ácido ascórbico em vegetais são determinadas pelo balanço entre suas taxas de biossíntese, oxidação e reciclagem (FOYER et al., 1991). O entendimento desses mecanismos em partes comestíveis de plantas, como é o caso dos frutos, é importante para estabelecer os mecanismos que controlam os níveis de vitamina C nesses produtos a fim de produzir/selecionar alimentos com maior valor nutricional e capacidade antioxidante.

2.2.1 Biossíntese da vitamina C

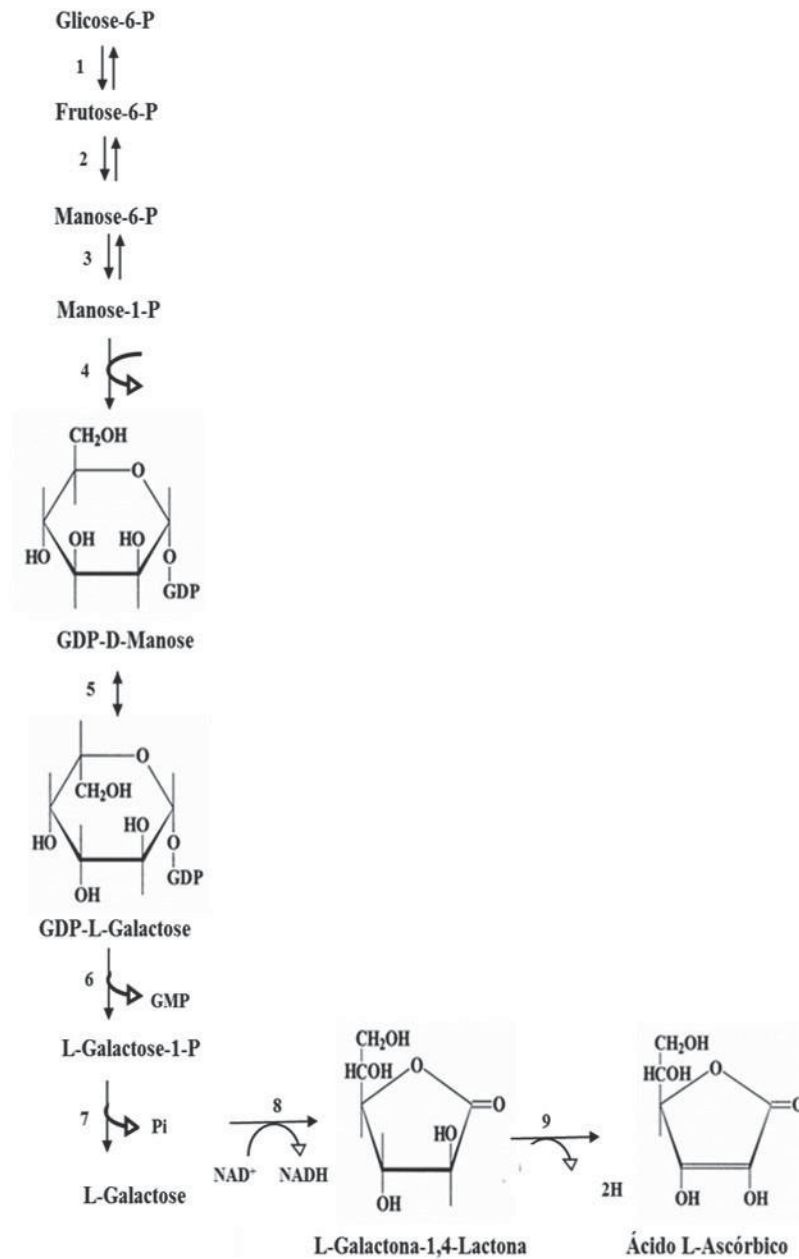
A principal via para a biossíntese de ácido ascórbico em plantas é a que converte glicose-6-fosfato em ácido ascórbico via GDP-D-manose, GDP-L-galactose e L-galactose, conhecida como via Smirnoff-Wheeler (WHEELER; JONES; SMIRNOFF, 1998). Porém,

alguns estudos sugerem a existência de rotas alternativas para a síntese desse composto em vegetais. Como a via que parte do ácido galacturônico, onde ácido L-galactônico é formado através de uma reação de redução e então convertido à L-galactona-1,4-lactona. Essa via foi proposta por AGIUS et al. (2003) após a identificação da enzima redutase do ácido galacturônico em morangos silvestres (*Fragaria vesca*). Outra rota existente é a do mio-inositol, onde uma fosfatase converte o inositol-1-fosfato em mio-inositol e este é convertido em ácido glucurônico pela enzima oxigenase do mio-inositol (EC 1.13.99.1) de *Arabidopsis thaliana* (LORENCE et al., 2004).

Na principal via proposta, a de Smirnoff-Wheeler (Figura 3), a conversão da D-manose-1-P em GDP-D-manose, catalisada por ação da enzima pirofosforilase da GDP-manose (GMP, E.C 2.7.7.13) é crítica para a determinação dos níveis de ácido ascórbico em algumas espécies vegetais, uma vez que a inibição da atividade dessa enzima causa uma evidente redução nas concentrações desse composto (CONKLIN et al., 1999; KELLER; KOSSMANN, 1999). ALÓS; RODRIGO; ZACARÍAS (2013) observaram que a expressão do gene que codifica uma isoforma de GMP é constante nos estádio iniciais do desenvolvimento de pimenta (*Capsicum annuum* L.) e decresce gradualmente nos estádios finais. BADEJO et al. (2007) observaram que há uma correlação positiva entre os níveis de ácido ascórbico e a atividade dessa enzima no decorrer do amadurecimento de acerola (*Malpighia glabra*), sendo sua reação considerada umas das principais para a biossíntese de vitamina C nesse fruto. Já, IOANNIDI et al. (2009) concluíram que essa correlação é negativa em tomates, provando que a expressão da GMP é regulada de formas diferentes entre as diferentes espécies vegetais.

A conversão da GDP-D-manose em L-galactose inicia-se com uma reação de epimerização nos carbonos 3 e 5 (C3 e C5), catalisada pela enzima epimerase da 3,5-GDP-D-manose (GME, EC 5.1.3.18). As reações subsequentes catalisadas pelas enzimas fosforilase da GDP-L galactose (GGP, EC 5.1.3.18) e fosfatase da L-galactose-1-fosfato (GPP, EC 3.1.3.25) promovem a liberação de L-galactose, a qual é oxidada pela desidrogenase da L-galactose (GDH, EC 1.1.1.48) para formar L-galactona-1,4-lactona. Este último é então oxidado a ácido ascórbico, por ação da enzima desidrogenase da L-galactona-1,4-lactona (GalDH, EC 1.3.2.3), onde o citocromo c atua como acceptor de elétrons (ÔBA et al., 1994; SMIRNOFF, 2001; WHEELER et al., 1998).

Figura 3. Via proposta para a biossíntese de ácido ascórbico em plantas superiores segundo SMIRNOFF; RUNNING; GATZEK (2004). As enzimas que catalisam as reações dessa via estão numeradas de 1-9, onde 1: hexose fosfato isomerase; 2: fosfomanose isomerase; 3: fosfomanose mutase; 4: pirofosforilase da GDP-manose (GMP); 5: GDP-manose-3,5-epimerase (GME); 6: fosforilase da GDP-L-galactose (GGP); 7: fosfato fosfatase da L-galactose; 8: desidrogenase da L-galactose (GDH); 9: desidrogenase da L-galactona-1,4-lactona (GalDH).



Fonte: (SMIRNOFF et al., 2004).

Estudos com extratos de plantas revelam que a desidrogenase da L-galactona-1,4-lactona (GalDH) é um monômero de 56 a 57 kDa e altamente específica para seus substratos, L-galactona-1,4-lactona e citocromo c. Essa enzima está localizada na membrana mitocondrial interna como um componente do complexo I da cadeia transportadora de elétrons (CTE), embora também haja a possibilidade de ela estar entre os complexos III e IV (BARTOLI; PASTORI; FOYER, 2000; MILLAR et al., 2003).

A importância da atividade dessa enzima para a regulação dos níveis de ácido ascórbico em plantas já foi evidenciada por ÔBA et al. (1994), que detectaram um estímulo na atividade da GalDH seguido por um aumento na concentração de ascorbato em tubérculos de batata. Já, TABATA et al. (2001) observaram que inibição da expressão dessa enzima causa uma deficiência de ascorbato em plantas de tabaco transgênicas. Condições ambientais que possam causar um estresse oxidativo também estimulam a atividade da GalDH como observado em batatas minimamente processadas, nas quais um aumento na concentração de EROs aumentou significativamente a atividade dessa enzima (TUDELA et al., 2003).

PATERAKI et al. (2004) encontraram uma correlação entre os níveis de transcritos de GalDH e o aumento no conteúdo de ascorbato durante o amadurecimento de melão (*Cucumis melo*). Já, NASCIMENTO et al. (2005) analisando a biossíntese de ascorbato em morango, observaram que não há aumento significativo na expressão da GalDH no decorrer do desenvolvimento desse fruto, assim como não houve alterações na atividade dessa enzima e nos níveis de ascorbato. Esses autores também reportaram que, mesmo não havendo uma correlação entre os níveis de mRNA e a atividade da GalDH, a expressão do gene dessa enzima pode contribuir para a regulação global da atividade enzimática e níveis de ácido ascórbico em morangos.

2.2.2 Catabolismo da vitamina C

O ácido ascórbico pode sofrer oxidação não enzimática, atuando diretamente como antioxidante ao doar elétrons para EROs, e enzimática, quando funciona como uma agente redutor em reações catalisadas por enzimas como a peroxidase do ascorbato (APX) e a oxidase do ascorbato (AO).

As peroxidases vegetais são enzimas que contêm ferro como cofator e que utilizam um substrato como agente redutor do peróxido de hidrogênio (HODGES, 2003). No caso da APX o ascorbato é o agente redutor, o qual será oxidado a monodehidroascorbato (MDHA) para auxiliar na redução do H_2O_2 à água. Essa enzima é a principal removedora do H_2O_2 produzido

nos cloroplastos, onde está localizada, e é capaz de promover a desintoxicação mesmo em baixas concentrações dessa EROs devido à sua elevada afinidade por ela (ZIMMERMANN; ZENTGRAF, 2005). COCETTA et al. (2012) observaram que a expressão da APX é maior nos estádios 1 e 3 de mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.). Em pimentas, essa enzima é constantemente expressa durante todo o seu desenvolvimento (ALÓS et al., 2013).

A oxidase do ascorbato pertence à classe de oxidases que possuem cobre ligado e catalisa a oxidação do ácido ascórbico à MDHA, com concomitante redução do oxigênio molecular (O_2) à água (LOEWUS, 1980). É uma enzima que está localizada na parede celular vegetal e modula os processos de expansão e divisão celular, sendo altamente expressa em tecidos vegetais em crescimento (AL-MADHOUN; SANMARTIN; KANELIS, 2003; KATO; ESAKA, 2000).

Independente da forma de oxidação, para manter níveis estáveis de ácido ascórbico na célula, é necessário que haja um processo de reciclagem, do contrário o *pool* de ascorbato cairia em questão de horas (ASADA, 1992). A via de reciclagem do ascorbato-glutationa proposta por FOYER; HALLIWELL (1976) começa a partir da ação oxidativa das enzimas APX e AO. O primeiro produto formado é o radical monodehidroascorbato (MDHA), o qual apresenta uma constante de decaimento de $2,8 \times 10^5 \text{ M.s}^{-1}$ em pH 7,0 (FOYER et al., 1991). O MDHA pode ser reduzido de volta à ascorbato por ação da enzima redutase do monodehidroascorbato (MDHAR, EC 1.6.5.4), a qual utiliza o poder redutor do NADH. Pelo fato de MDHA ser um radical, duas moléculas desse composto podem ser espontaneamente convertidas em ascorbato e dehidroascorbato (DHA), que é instável em meio aquoso, onde sofre uma clivagem hidrolítica que dá origem ao ácido 2,3-dicetogulônico. Em meio biológico, no entanto, o DHA pode ser convertido em ácido ascórbico por ação da enzima redutase do dehidroascorbato (DHAR, EC 1.8.5.1), a qual utiliza a glutatona reduzida (GSH) como agente redutor. A glutatona oxidada (GSSG) liberada como produto dessa reação é regenerada por ação da enzima redutase da glutatona, (GR, EC 1.8.1.7) às custas do poder redutor do NADPH.

2.2.3 Estresses abióticos e o metabolismo da vitamina C

Pelo fato da última enzima da via de biossíntese da vitamina C em plantas, a GalDH fazer parte do complexo da CTE mitocondrial, uma relação positiva entre a taxa de respiração celular e a síntese de ácido ascórbico já foi evidenciada em mitocôndrias de plantas. Indicando que esse processo metabólico coordena a síntese desse antioxidante e que é

estimulado por situações de estresse (MILLAR et al., 2003). Dessa forma, sinais que modulam a taxa de respiração mitocondrial também promovem um impacto sobre a produção de ácido ascórbico e conseqüentemente sobre as respostas às situações de estresse oxidativo (MILLAR et al., 2003). Diferente da enzima terminal que produz ácido ascórbico em animais e fungos, a GalDH vegetal não produz H_2O_2 como subproduto de sua reação (SMIRNOFF, 2001). Tal característica deve ter a finalidade de evitar uma oxidação excessiva da CTE e danos às enzimas envolvidas no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, pelo fato de a mitocôndria vegetal ser muito sensível à inibição oxidativa de sua funcionalidade (NULTON-PERSSON; SZWEDA, 2001; SWEETLOVE et al., 2002). Além disso, o *status* redox da CTE em plantas parece ser crítico para o controle do *status* redox da célula como um todo (DUTILLEUL et al., 2003).

Estudos sobre estresse oxidativo também têm demonstrado uma relação positiva entre a atividade de outras enzimas da via Smirnoff-Wheeler e enzimas da via ascorbato-glutationa de reciclagem e os níveis de ácido ascórbico; plantas estressadas mostram um aumento na quantidade de transcritos e na atividade de todas as enzimas envolvidas na biossíntese e reciclagem (DOWDLE et al., 2007; GILL; TUTEJA, 2010). Estudos mostram que a irradiação de folhas de *Arabidopsis thaliana* com luz de elevada intensidade provoca um aumento de EROs e um incremento no conteúdo de ácido ascórbico, o qual é acompanhado por uma maior expressão e atividade da GGP (DOWDLE et al., 2007; MÜLLER-MOULÉ, 2008; YABUTA et al., 2007). Em tomates submetidos à sombra, os níveis de ácido ascórbico declinam, uma resposta pode estar ligada a uma redução na expressão da GGP (MASSOT et al., 2012). Transcritos de GGP de tomates aumentaram significativamente 3 h após a planta ser transferida de um ambiente com condições de anóxia para um ambiente com atmosfera normal; nenhum resultado semelhante foi observado em resposta ao tratamento térmico dessas plantas (IOANNIDI et al., 2009), mostrando que o aumento na concentração de EROs pode ser um pré-requisito para que ocorra uma regulação nas vias metabólicas que levam ao acúmulo de vitamina C em resposta à situação de estresse por déficit de oxigênio.

O estudo da expressão e atividade de enzimas que contribuem para a síntese, catabolismo e reciclagem do ácido ascórbico pode contribuir para o entendimento dos mecanismos que podem levar ao acúmulo dessa molécula em alguns órgãos vegetais em determinados períodos do seu desenvolvimento. O entendimento do funcionamento e integração das vias biossintética e de reciclagem e dos efeitos que alterações nas condições ambientais, tais como as situações de estresse, podem causar devem auxiliar no progresso da

engenharia genética de plantas e na otimização de tecnologias pós-colheita a fim de produzir frutos com um maior conteúdo de vitamina C.

2.3 Metabolismo de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário das plantas, os quais apresentam um grupo fenol: um grupo hidroxila funcional e um anel aromático. Estes constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos: alguns são solúveis apenas em solventes orgânicos, outros são ácidos carboxílicos e glicosídeos solúveis em água e há, ainda, aqueles que são grandes polímeros solúveis (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Do ponto de vista do metabolismo antioxidante, os compostos fenólicos são classificados como antioxidantes primários que atuam principalmente na eliminação de espécies reativas, retardando ou inibindo a etapa inicial, ou etapas em progresso, da oxidação de lipídios, a qual causaria a formação de compostos voláteis como aldeídos e cetonas que causam o denominado “ranço” de alimentos (ALAMED et al., 2009).

Os antioxidantes fenólicos interagem, preferencialmente, com o radical peroxil por ser este mais prevalente na etapa da autoxidação e por possuir menor energia do que outros radicais, fato que favorece a abstração do seu hidrogênio. O radical fenoxil resultante, embora relativamente estável, pode interferir na reação de propagação ao reagir com um radical peroxil, via interação entre radicais. O composto formado, por ação da luz ultravioleta e temperaturas elevadas, poderá originar novos radicais, comprometendo a eficiência do antioxidante, que é determinada pelos grupos funcionais presentes e pela posição que ocupam no anel aromático, bem como pelo tamanho da cadeia desses grupos (DECKER, 1998).

2.3.1 Biossíntese de compostos fenólicos

Quando as primeiras plantas surgiram a partir das algas verdes ancestrais, elas tiveram que encarar condições ambientais difíceis, incluindo a menor disponibilidade de água, radiação UV e a susceptibilidade ao ataque de patógenos microbianos (KENRICK; CRANE, 1997). A emergência da via de biossíntese dos compostos fenólicos está entre umas das mais importantes adaptações das plantas que as permitiram habitar o ambiente terrestre e a sobreviver sob diferentes condições adversas (FERRER et al., 2008).

Os fenilpropanóides são os precursores da maioria dos compostos fenólicos que desempenham funções no metabolismo das plantas como flavonóides, isoflavonóides,

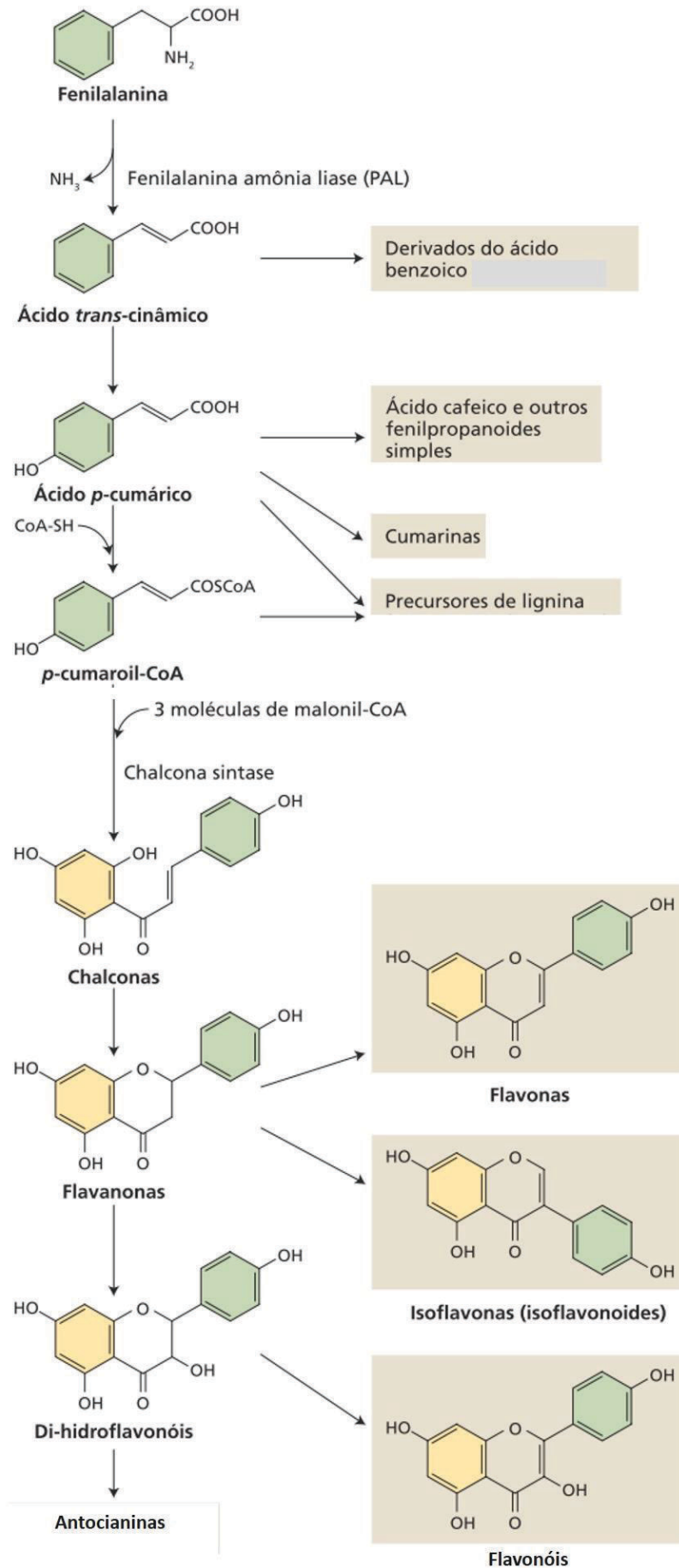
cumarinas e estilbenos. Esses compostos apresentam uma função importante na defesa de plantas contra patógenos e outros predadores, bem como na proteção contra radiação UV e como moléculas reguladoras nos processos de transdução de sinal e comunicação com outros organismos (FERRER et al., 2008).

Na maioria das espécies que apresentam a via metabólica dos fenilpropanoides, transformações enzimáticas redirecionam o fluxo de carbonos provenientes do metabolismo primário, onde o aminoácido fenilalanina é utilizado como substrato, para o metabolismo secundário (Figura 4). A desaminação não oxidativa da L-fenilalanina, catalisada pela enzima fenilalanina amônia liase (PAL, EC 4.3.1.24), resulta na formação de ácido *trans*-cinâmico, o “esqueleto” de fenilpropanoides que originará os demais (FERRER et al., 2008). A PAL, por catalisar a primeira etapa na via de síntese dos fenilpropanoides, consiste em um ponto importante na regulação entre os metabolismos primário e secundário, o que faz com que essa enzima seja extensivamente estudada.

Essa enzima é codificada por uma pequena família de genes vegetais que possuem quatro membros em *Arabidopsis thaliana* (*PAL1* – *PAL4*) (RAES et al., 2003), sendo amplamente distribuída no citoplasma, plastídios, mitocôndrias e microcorpos de células de plantas superiores (HANSON, 1981; MACDONALD; D'CUNHA, 2007). Sua massa molecular varia entre 270 a 330 kDa em uma estrutura tetramérica, constituída por quatro cadeias polipeptídicas idênticas. O pH ótimo para a reação da PAL varia entre 8 e 8,7, sem requerer qualquer cofator (MACHEIX; FLEURIET, 1990).

Reações subsequentes à PAL levam a síntese de flavonoides e ácidos fenólicos simples, os quais são os compostos fenólicos mais comuns. Os flavonoides apresentam um esqueleto difenilpropano e sua eficiência como neutralizador de espécies reativas depende do número de grupos hidroxila e de suas posições (FERRER et al., 2008).

Figura 4. Biossíntese de fenólicos a partir da fenilalanina. Fonte: (TAIZ; ZEIGER, 2013).



Antocianinas e flavonoides são compostos fenólicos com elevada capacidade antioxidante que se acumulam durante o desenvolvimento de frutos (SOUZA et al., 2014). Dentre estes, as antocianinas do tipo cianidina e os flavonoides amarelos do tipo quercetina apresentam forte capacidade de neutralização do radical superóxido, onde tal capacidade antioxidante parece estar relacionada ao número de hidroxilas presentes na estrutura desses polifenóis (HANAMURA; HAGIWARA; KAWAGISHI, 2005; SOUZA et al., 2014).

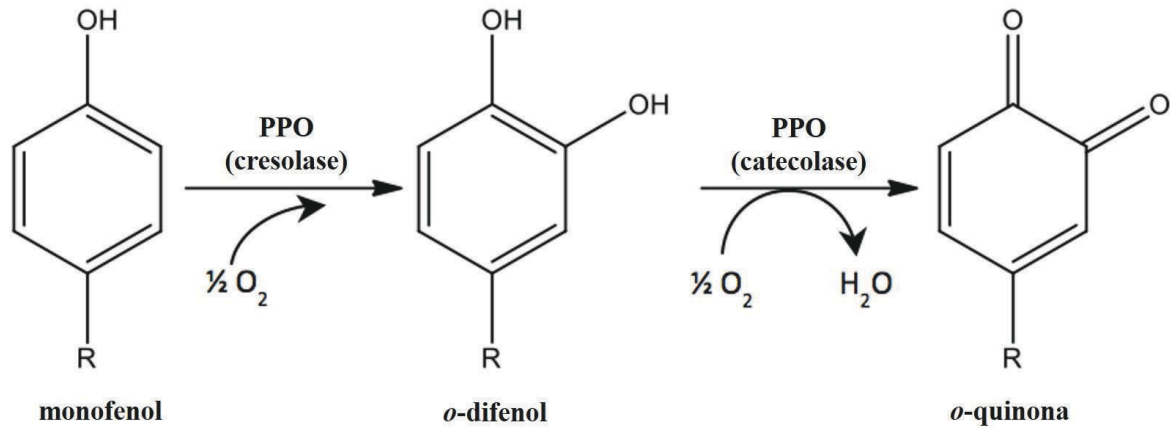
2.3.2 Catabolismo de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos podem ser oxidados não-enzimaticamente por oxidação química ou por ação de enzimas. Essas reações de oxidação provocam o escurecimento de alimento ricos nesses compostos (MANZOCCO et al., 2000). A influência dessas reações na capacidade antioxidante de frutos é largamente estudada. A oxidação de fenólicos leva a perda de sua capacidade antioxidante; contudo, algumas pesquisas sugerem que fenólicos parcialmente oxidados podem exibir capacidade antioxidante maior do que aqueles não oxidados (DA PORTO et al., 2000; DE GAULEJAC et al., 1999; NICOLI; ANESE; MANZOCCO, 1999).

O escurecimento observado quando a maioria das frutas e hortaliças sofre danos mecânicos por corte, trituração ou processamento, é oriunda de reações catalisadas pela enzima polifenoloxidase (PPO, EC 1.14.18.1). A ação dessa enzima em vários produtos vegetais *in natura* acarreta perdas econômicas consideráveis, além de diminuição da qualidade nutritiva e alteração do sabor (ARAÚJO, 2004).

A polifenoloxidase é uma enzima que contém cobre e é capaz de catalisar dois diferentes tipos de reação: a hidroxilação de monofenóis a *o*- difenóis e a de hidrogenação de *o*- difenóis a *o*- quinonas (Figura 5). As quinonas produzidas conduzem uma série de reações não enzimáticas que produzem pigmentos e melanina de cor marrom escura. Na maioria dos tecidos vegetais, essa enzima está localizada nos plastídios, enquanto que seus substratos localizam-se no vacúolo celular. Dessa forma, a atividade da PPO só ocorre quando há a ruptura de tecidos e a liberação do conteúdo desses compartimentos, o que proporciona o encontro da enzima com seu substrato (YORUK; MARSHALL, 2003).

Figura 5. Reação catalisada pela enzima polifenoloxidase (PPO).



Fonte: (YORUK; MARSHALL, 2003)

A localização celular da PPO pode indicar o envolvimento dessa enzima com a fotossíntese. Uma elevada atividade desta parece ocorrer em cloroplastos com atividade intensa, onde há uma elevada taxa de liberação de O_2 (TOLBERT, 1973), indicando que a PPO pode atuar na manutenção do equilíbrio oxidativo sob condições ambientais adversas na presença de oxigênio ou de EROs (BOECKX et al., 2015). Além disso, é possível que essa enzima atue indiretamente estimulando o metabolismo secundário, especificamente na síntese de compostos fenólicos, o que poderia promover uma maior dissipação de energia quando sob excesso de luminosidade (GRACE; LOGAN, 2000).

2.3.3 Estresses abióticos e o metabolismo de compostos fenólicos

Estudos têm demonstrado que a expressão de genes que codificam a PAL é influenciada por uma grande variedade de estímulos ambientais como patógenos, injúrias, deficiência nutricional, temperaturas extremas, radiação UV, dentre outros (DIXON; PAIVA, 1995; EDWARDS et al., 1985; LAWTON et al., 1983; LIANG et al., 1989). ABREU et al. (2002) estudaram substâncias de interesse farmacológico de *Hypericum brasiliense Choisy* e verificaram que a produção de metabólitos secundários era estimulada em resposta às condições de estresse. De acordo com o modelo proposto por JACOBO-VELÁZQUEZ et al. (2011), as EROs, mais especificamente o radical superóxido, produzidas como resultado do aumento da atividade da NOX sob situações de estresse, atuam como sinalizadores que irão

desencadear uma maior expressão e atividade da PAL, o que culminará com uma maior produção de compostos fenólicos que atuarão na defesa celular contra o estresse.

Como já foi exposto anteriormente, os compostos fenólicos vêm sendo largamente estudados devido às suas propriedades benéficas para a saúde humana. E que diferentes subgrupos desses compostos apresentam diferentes características reativas e, conseqüentemente devem apresentar diferentes taxas de síntese e degradação quando tecidos vegetais são submetidos à condições de estresse que desencadeiam uma alteração no metabolismo destes. O entendimento de como estresses abióticos influenciam no conteúdo desses antioxidantes em tecidos vegetais utilizados na alimentação humana parece ser fundamental como ferramenta para incremento na qualidade nutricional destes produtos.

2.4 Frutos da aceroleira

A aceroleira, *Malpighia emarginata* DC, é originária da América Tropical e pertence à família Malpighiaceae. Seu fruto é conhecido como acerola ou cereja das Antilhas e quando maduro, apresenta coloração variando do vermelho ao vermelho-escuro, tamanho entre 1 a 3 cm de diâmetro, peso entre 2 a 10 g e sabor predominantemente ácido (SIMAO, SLIM, 1971). O Nordeste brasileiro é a região onde a aceroleira melhor se adaptou incentivando a instalação de grandes empreendimentos agroindustriais em torno da cultura (DE PAIVA et al., 1999). No Ceará, uma área de 2.854 ha plantados produziu 16.527 toneladas de acerola, em 2013 (ADECE, 2013).

A acerola ficou conhecida por ser uma ótima fonte de vitamina C, tornando-se popular como um alimento funcional entre os consumidores mais preocupados em manter a saúde, os quais preferem obter essa vitamina de fontes naturais, por ser melhor absorvida pelo organismo humano se comparada à fontes sintéticas (DE ASSIS et al., 2008). A maior parte de sua produção é comercializada em forma de polpa, que tem sido largamente utilizada no enriquecimento vitamínico do suco de outras frutas, e a pasta de seus frutos verdes como matéria-prima para a fabricação de cápsulas de vitaminas (MENEZES et al., 2009).

OLIVEIRA et al. (2012) relataram conteúdos de vitamina C em cinco clones de aceroleira que variavam entre 2.453 e 3.756 mg.100 g⁻¹ MF no início do desenvolvimento desses frutos, chegando à valores entre 1.201 e 1.820 mg.100 g⁻¹ MF quando completamente maduros. SOUZA et al. (2014) também observaram um decréscimo, cerca de 40%, no conteúdo dessa vitamina no decorrer do amadurecimento de clones de acerola. Apesar dessa redução, a concentração de vitamina C nesses frutos quando maduros (> 1.000 mg.100 g⁻¹MF) ainda é bastante elevada quando comparado a outros frutos comercialmente importantes e

conhecidos como ricos nesse composto, tais como laranja (em média 62,50 mg.100 g⁻¹MF), goiaba (em média 135,70 mg.100 g⁻¹MF) e caju (em média 279,37 mg.100 g⁻¹MF) (COUTO; CANNIATTI-BRAZACA, 2010; LOPES et al., 2012; SILVA et al., 2010). Tal redução pode ocorrer devido a menores taxas de biossíntese e reciclagem nos estádios mais tardios do desenvolvimento. BADEJO; FUJIKAWA; ESAKA (2009) observaram que há picos de mRNA que codificam as enzimas GMP e GalDH durante as fases de maturação de acerola, os quais decaem quando o fruto já está maduro, ou seja, a concentração de ácido ascórbico em acerola mostra uma correlação positiva com os níveis de expressão dos genes envolvidos na biossíntese desse composto.

Já em relação à reciclagem do ácido ascórbico, ELTELIB et al. (2011) encontraram uma elevada correlação entre a atividade e a abundância de mRNA das enzimas MDHAR e DHAR em resposta ao amadurecimento de acerola. Nesse estudo também foi observado que a expressão dessas duas enzimas de reciclagem é regulada à nível transcricional pelo baixo conteúdo de ácido ascórbico. Além disso, pesquisas recentes visam a produção de plantas transgênicas a partir da inserção de genes que codificam algumas enzimas do metabolismo da vitamina C provenientes de acerola. ELTELIB; FUJIKAWA; ESAKA (2012) inseriram o gene que codifica a enzima MDHAR de acerola em tabaco a fim de que este apresentasse uma maior concentração de ácido ascórbico e, com isso, uma maior resistência às condições ambientais de estresse.

A excepcionalidade do conteúdo de vitamina C das acerolas pode ser ratificada através de análises de PCR em tempo real, com as quais foi evidenciado que os mRNA dos genes que codificam as enzimas de biossíntese do ácido ascórbico eram muito mais abundantes em acerola do que em *Arabidopsis thaliana*. Os níveis de expressão das enzimas GMP, GME e GDH em acerola foram 30 à 100 vezes maior em acerola e para GGP e GalDH, foi 700 e 5 vezes maior, respectivamente (BADEJO et al., 2009). Esses resultados corroboram com o elevado conteúdo de vitamina C em acerolas.

Em adição à vitamina C, os frutos de aceroleira também são uma excelente fonte de outros antioxidantes como fenólicos, tais como as antocianinas e fenólicos mais simples (DELVA; GOODRICH, 2010; HANAMURA et al., 2005). Nesses frutos, cianidina, pelagornidina e quercetina são os polifenóis mais encontrados, os quais apresentam uma elevada capacidade antioxidante (HANAMURA et al., 2005). De acordo com SOUZA et al. (2014), antocianinas e flavonoides amarelos são os polifenóis mais abundantes nos clones Flor Branca, Florida Sweet e BRS 366 de acerola, nos quais o conteúdo de antocianinas

aumenta no decorrer do processo de amadurecimento. Segundo (OLIVEIRA et al., 2012), o conteúdo de antocianinas em acerola pode variar entre 0,19 e 47,4 mg.100 g⁻¹MF.

Cianidina-3-raminosídeo e pelargonidina-3-raminosídeo parecem ser as principais antocianinas presentes nesses frutos (DE BRITO et al., 2007; DE ROSSO et al., 2008; SOUZA et al., 2014). A quercetina 3-raminosídeo é o flavonóide amarelo mais abundante encontrado em uma diversidade de clones de acerola já estudados (OLIVEIRA et al., 2012; SOUZA et al., 2014).

Pelo fato de já ter sido evidenciado que aplicações de estresses horméticos causam um acúmulo de compostos antioxidantes em frutos e hortaliças (CISNEROS-ZEVALLOS, 2003), o uso de tratamentos brandos, bem como o entendimento de como esses atuam na fisiologia dos frutos, poderiam funcionar como técnicas para incrementar a qualidade nutricional de acerolas, além de possivelmente torná-las atrativas e consumíveis por um maior período de tempo.

3. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo geral analisar os efeitos do tratamento pós-colheita com LP ($0,6 \text{ J.cm}^{-2}$) sobre o metabolismo de vitamina C e de compostos fenólicos em frutos de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC) durante o armazenamento refrigerado.

Para chegar ao objetivo geral, os objetivos específicos são:

- Analisar os efeitos da LP sobre o conteúdo de vitamina C total bem como de suas formas reduzida e oxidada em acerolas imediatamente após o tratamento e ao final de sete dias de armazenamento refrigerado;
- Observar como a LP afeta a atividade da última enzima da via de biossíntese do ácido ascórbico bem como a expressão gênica de outras as enzimas dessa via;
- Analisar como a LP influencia a concentração de compostos fenólicos totais, seu perfil, sua biossíntese e degradação enzimática;
- Observar se o tratamento com baixas doses de LP é capaz de ativar as vias de biossíntese de EROs induzindo um estresse oxidativo que poderia desencadear processos de defesa nas células vegetais;
- Avaliar o potencial uso da LP como indutor de estresse hormético com a finalidade de aumentar a concentração de compostos nutracêuticos em acerola durante o período de armazenamento pós-colheita.

4. Materiais e Métodos

4.1 Material vegetal

Acerolas (*Malpighia emarginata* DC) maduras (2 kg) foram adquiridas em comércio local de Fortaleza, CE, selecionadas de acordo com a cor vermelha e tamanho máximo e então, transportadas ao Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Frutos da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza. Antes do tratamento, os frutos foram lavados usando água destilada e divididos em dois lotes, onde um seria submetido ao tratamento e o outro como controle.

4.2 Tratamento com luz pulsada

O tratamento com luz pulsada foi realizado no aparelho XeMaticA-2LXL (SteriBeam[®] GmbH, Alemanha) do Laboratório de Processos Agroindustriais da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza, CE). Os frutos foram tratados com dois pulsos com energia de 0,3 J.cm⁻² cada. Após o tratamento, metade dos frutos tratados foi imediatamente processada e armazenada a -80 °C em Ultra-freezer Revco Value Plus (Thermo Fischer Scientific[®], Asheville, NC-EUA), consistindo estes nas amostras tratadas (LP⁺) do tempo 0, enquanto que a outra metade foi armazenada a 10 °C por sete dias, consistindo nas amostras tratadas (LP⁺) do tempo 7. Os frutos do grupo controle foram submetidos às mesmas condições de armazenamento sem a exposição a luz pulsada. Os frutos controle e tratados utilizados nas avaliações de expressão gênica foram imediatamente submetidos ao congelamento em nitrogênio (N₂) líquido ainda íntegros e depois, liofilizados e então, processados.

As amostras foram processadas em um liquidificador doméstico (Arno Optimix Plus 550 W, São Paulo, SP) e desidratadas em liofilizador (Liotop[®] L202, São Carlos, SP). As amostras liofilizadas foram maceradas com N₂ líquido para a obtenção de um pó fino, acondicionadas em sacos à vácuo até que fossem avaliadas como descrito a seguir sob supervisão do Dr. Luis Cisneros-Zevallos no Department of Horticultural Sciences da Texas A&M University na cidade de College Station, Texas, Estados Unidos.

4.3 Avaliações do metabolismo de vitamina C

4.3.1 Determinação de vitamina C

O conteúdo de vitamina C total e de suas formas reduzida, AsA, e oxidada, DHA foram mensurados de acordo com o método proposto por CHEN, J.; WANG (2002). Amostra (100 mg) foi homogeneizada em Ultra-Turrax® (IKA, Staufen, Alemanha) com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5%, filtrada em quatro camadas de tecido de trama fina e centrifugada em centrífuga 5417 C (Eppendorf AG®, Hamburg, Alemanha) a 16.000 xg por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi usado como extrato para a determinação de vitamina C.

Para a quantificação de AsA, uma mistura contendo 50 µL do extrato, tampão fosfato 10 mM (pH 7,7), TCA 2%, ácido fosfórico 8,8%, 2,2-bipiridil 0,8% e tricloreto de ferro 0,3% foi incubada a 37 °C por 60 min e então, absorvância foi monitorada a 525 nm em leitor de microplacas (Synergy HT, Bio-Tek® Instruments, Inc., VT-EUA). Para a quantificação de vitamina C total, uma mistura contendo 50 µL de extrato, tampão fosfato 5 mM (pH 7,7) e DTT 0,01 mM foi mantida em repouso a temperatura ambiente (25 °C) por 10 min. Após esse período, foram adicionados TCA 2%, ácido fosfórico 8,8%, 2,2-bipiridil 0,8% e tricloreto de ferro 0,3%; a mistura foi mantida a 37 °C por 60 min e em seguida a absorvância foi medida a 525 nm. O DHA foi quantificado a partir da diferença entre a concentração de vitamina C total e de AsA. Uma curva padrão de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich®, MO-EUA) foi utilizada no cálculo das análises e os resultados foram expressos em mg.100 g⁻¹ massa seca (MS).

4.3.2 Atividade da desidrogenase da L-galactona-1,4-lactona (GaldH, EC 1.3.2.3)

A atividade da enzima foi determinada de acordo com ÔBA et al. (1994). Inicialmente, as mitocôndrias foram extraídas de 300 mg de amostra suspensas em 4 mL de solução extratora gelada composta pelo tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,4), sacarose 400 mM, 2% de polivinilpirrolidona (PVP) e β-mercaptoetanol 50 mM por homogeneização da mistura por 2 min em Ultraturax®. A solução final foi filtrada e centrifugada a 500 xg por 10 min a 4 °C. O sobrenadante resultante foi coletado e novamente centrifugado a 10.000 xg por 10 min a 4 °C. O precipitado foi ressuspensão em tampão Tris-HCl (pH 7,4) contendo sacarose 400 mM e novamente centrifugado a 10.000 xg por 10 min a 4 °C. Essa etapa de lavagem foi realizada duas vezes e o precipitado final resultou na fração mitocondrial.

O ensaio de atividade da GalDH foi realizado com um extrato proteico preparado a partir da fração mitocondrial, a qual foi resuspensa em solução contendo tampão Tris-HCl (pH 7,4), sacarose 0,4 M, EDTA 1 mM e 01% (v/v) de Triton X-100, incubada por 1 h a 4 °C e então, centrifugada a 10.000 xg por 10 in a 4 °C. O sobrenadante foi separado e usado como extrato de proteínas mitocondriais para análise de atividade enzimática.

A atividade da GalDH foi mensurada a partir de uma mistura composta por 10 µL de extrato protéico mitocondrial e citocromo *c* 80 mM, a qual foi incubada por 10 min a temperatura ambiente (25 °C) e teve em seguida, a adição do substrato enzimático L-galactona-1,4-lactona (L-Gal) 4,6 mM, que desencadeou o início da reação. O aumento na absorbância a 550 nm, causado pela redução do citocromo *c* ($\epsilon = 21,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), foi monitorado a cada 1 min por 30 min. Uma unidade de atividade foi definida com a quantidade de enzima requerida para oxidar 1 ηmol de L-Gal (equivalente a formação de 2 ηmol de citocromo *c* reduzido) por minuto e expressa como ηmol L-Gal oxidada.mg⁻¹proteína.min⁻¹.

4.3.3 *Análise de expressão gênicas das enzimas da via de biossíntese da vitamina C*

Para extração de RNA total e qRT-PCR, 100 mg de amostra macerada em N₂ líquido foram submetidas à extração de RNA total utilizando RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen®), seguindo orientações do fabricante. O extrato de RNA total foi tratado com DNase I, para evitar possíveis contaminações com DNA, e então analisado qualitativa e quantitativamente por eletroforese em gel de agarose 1% e por espectrofotometria em aparelho NanoDrop ND-1000 (NanoDrop® Technologies). Para a síntese de cDNA, 200 ηg de RNA total foram reversamente transcritos com o auxílio do kit SuperScript III first-strand synthesis supermix (Invitrogen), seguindo as orientações do fabricante. Finalmente, soluções contendo cDNA foram usadas para PCR em tempo real (qRT-PCR), para a qual foi utilizado Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®), de acordo com instruções do fabricante. A amplificação foi realizada em 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems®). A sequência dos *primers* utilizados está listada na Tabela 1 e foram adquiridos pela Integrated DNA Technologies (IDT). A expressão relativa de cada gene foi normalizada pela utilização do gene para actina e foi calculada seguindo o método comparativo Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$), também conhecido como método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

Tabela 1. Sequências de iniciadores (*Primers*) utilizados nas análises de expressão gênica.

<i>Primer</i>	Sequência
<i>MgGMP-F</i>	5'-TTGTCGAGTCGGGAGTTAGA-3'
<i>MgGMP-R</i>	5'-CAACCGATGATGCTGCTAGATA-3'
<i>MgGME-F</i>	5'-CCTCTAGTGCTTGCATCTATCC-3'
<i>MgGME-R</i>	5'-CTAGCTTCTCCAAGCCGTAAG-3'
<i>MgGGP-F</i>	5'-AGGCTTCTTGCAGAGGTTTC-3'
<i>MgGGP-R</i>	5'-CTCACTGCTATTGCCACTGTAT-3'
<i>MgGDH-F</i>	5'-GAACTGAAGGCTGCATGTAAAG-3'
<i>MgGDH-R</i>	5'-CCAGCACGGTTGGTATATCTT-3'
<i>MgGalLDH-F</i>	5'-GAGCATGCAGGACCTTGATTA-3'
<i>MgGalLDH-R</i>	5'-GCTGTCCACCGTTGTTCTAT-3'
<i>MgACT-F</i>	5'-GGGCATCGGAAACGTTTCAGCACCG-3'
<i>MgACT-R</i>	5'-CGTTCACCACTACTGCTGAACGAG-3'

4.4 Avaliação do metabolismo dos compostos fenólicos

4.4.1 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais

Para a extração de compostos fenólicos, amostras (100 mg) foram suspensas em 1,5 mL de solução com 80% de etanol e 1% de HCl. A mistura foi homogeneizada em agitador orbital (MS Orbital Shaker, Major Science, Saratoga, CA-EUA) por 12 h a 4 °C em velocidade de 60 rpm. A solução resultante foi então centrifugada a 10000 xg por 20 min a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado na quantificação de compostos fenólicos. A determinação utilizou o reagente Folin-Ciocalteu 13 mM e carbonato de sódio (Na₂CO₃) 53,5 mM, de acordo com a metodologia proposta por SWAIN; HILLIS (1959). A mistura foi mantida em repouso por 2 h a temperatura ambiente (25 °C) e então, a absorbância foi monitorada a 725 nm. Uma curva padrão de ácido clorogênico (AC, Sigma-Aldrich®, MO-EUA) foi utilizada como padrão para os cálculos. Todavia, como o conteúdo de vitamina C em acerola é alto, esta poder interferir na quantificação de fenólicos pelo reagente de Folin então, os valores

foram corrigidos como mostrado na equação 1, de acordo com (SÁNCHEZ-RANGEL et al., 2013). Os resultados foram expressos em mg de ácido clorogênico.100 g⁻¹ MS.

Equação 1:

$$C_C = C_{NC} - CAC_{AsA}.$$

Onde, C_C: concentração de AC corrigida expressa em mg AC.100 g⁻¹MS; C_{NC}: concentração não corrigida de AC expressa em mg AC.100 g⁻¹MS; CAC_{AsA}: concentração de AC relativa à concentração de AsA nas amostras usadas em mg AsA.100 g⁻¹MS e corrigida para AC, onde 1 mg de AsA corresponde a 1,43 mg de AC.

4.4.2 Determinação do perfil de compostos fenólicos

Para a determinação dos tipos de fenólicos presentes nas acerolas no decorrer do armazenamento, 30 mg de amostra liofilizada foram homogeneizados por 12 h a 4 °C com 1 mL de metanol 85% para a obtenção do extrato bruto. Esse extrato foi fracionado utilizando cartuchos C-18, em quatro frações, ácidos fenólicos (F1), antocianinas (F2), flavonóis (F3) e antocianinas poliméricas/proantocianidinas (F4) como foi proposto por (OSZMIANSKI; RAMOS; BOURZEIX, 1988).

Inicialmente, o pH do extrato bruto foi ajustado para 7,0 com NaOH 5 N. Uma alíquota de 10 mL desse extrato foi adicionada ao cartucho SEP Pack C18 (55-105 µm, Waters® Corp., Milford, MA), previamente condicionado com 25 mL de metanol 100% e 25 mL de água ultra-pura e ajustado o pH para 7,0. Os compostos fenólicos neutros presentes no extrato bruto foram adsorvidos ao cartucho, enquanto que os ácidos foram eluídos e coletados. O cartucho C-18 foi lavado com 25 mL de água, com a qual foram carreados alguns fenólicos, formando uma solução cujo pH foi ajustado para 2,0. Essa solução resultante foi então adicionada a outro cartucho C-18 previamente condicionado com 25 mL de metanol 100% e acidificado com 25 mL de água ultra-pura, pH 2. Os ácidos fenólicos ligados à matriz do segundo cartucho (F1) foram, então eluídos com 25 mL de metanol 100%. O primeiro cartucho foi também acidificado a pH 2,0 e 25 mL de uma solução 16% de acetonitrila (pH 2,0) foi utilizada para eluir as antocianinas (F2). Os flavonóis (F3) foram eluídos a partir do primeiro cartucho por posterior adição de 25 mL de acetato de etila 100%, enquanto que para a obtenção de antocianinas poliméricas e proantocianidinas (F4), foi utilizado 25 mL de metanol 100%.

As frações foram então submetidas à secagem por evaporação do respectivo solvente a 45 °C utilizando um rotaevaporador (Sevant® speedvac SC 100, CA-EUA). Finalmente, as frações foram ressuspensas em metanol 85%, mantendo uma concentração final de fenólicos por fração de 5 mg.mL⁻¹.

Compostos fenólicos individuais foram identificados com base no tempo de retenção, espectro de absorção no UV e sua relação massa/carga (m/z), através de LC-MS/MS (Thermo® Finnigan, CA-EUA). As eluições foram realizadas com solvente A, o qual consistia de acetonitrila e metanol (1:1 com 0,5% de ácido fórmico) e solvente B (água com 0,5% de ácido fórmico). O gradiente de eluição foi composto por acetonitrila/metanol (1:1), ácido fórmico (0,5:99,5, v/v) (solvente A) e ácido fórmico-água (0,5:99,5) (solvente B). As condições de eluição utilizadas foram: 0 – 2 min, A 2%, B 98%; 3 – 5 min, A 5%, B 95%, 5 – 30 min, A 20%, B 80%; 30 – 72 min, A 35%, B 65 %; 72 – 83 min, A 100%, B 0%; 83 – 85 min foi isocrático, A 100%; 87 – 90 min A 2%, 98% até as condições iniciais. O cromatograma foi monitorado a 330, 280 e 210 nm, e um espectro completo entre 200 – 600 nm. Nitrogênio foi usado como gás de solvatação a 275 °C e uma taxa de fluxo de 60 L.h⁻¹, e o gás He foi utilizado como um gás de arraste. O espectro de massa foi obtido em LCQ Deca XO Max MSⁿ system (Thermo® Finnigan, CA-EUA) equipado com um auto injetor, uma bomba quaternária Surveyor 2000 e um detector Surveyor® UV 2000 PDA. A corrida foi monitorada no software Xcalibur® versão 1.3. As separações foram conduzidas usando o Phenomenex® (Torrance, CA, EUA) Synergi 4 µm Hydro-RP 80^a (150 mm x 4,6 mm x 3 mm) com uma coluna C18.

4.4.3 Atividade da fenilalanina amônia liase (PAL, EC 4.3.1.24)

A atividade da PAL foi mensurada a partir da quantificação de ácido *trans*-cinâmico, a partir de uma mistura de reação, por LC-MS, baseado no método proposto por KIM et al. (2015), com algumas modificações. Inicialmente, um extrato foi preparado a partir de 400 mg de amostra homogeneizados com 16 mL de solução tampão borato 50 mM (pH 8,5) contendo β-mercaptoetanol 5 mM por 5 s e então, filtrado através de quatro camadas de tecido de trama fina. A solução resultante foi centrifugada a 12.000 xg a 4 °C por 20 min, o sobrenadante foi filtrado através de microfiltros Microcon (Millipore® 10000 MWCO, Alemanha), sendo o filtrado considerado o extrato protéico.

A atividade da enzima foi determinada por uma mistura com 235 µL de tampão, 80 µL do extrato protéico e 35 µL de L-fenilalanina 100 mM. Nas amostras controle (de reação),

água ultrapura foi utilizada em substituição ao substrato. A solução de reação foi mantida em repouso a 37 °C por 60 min e então, a reação foi paralisada por adição de 35 µL de ácido acético glacial. Em seguida, 750 µL de acetato de etila foram adicionados ao produto da reação (ácido *trans*-cinâmico), formando uma mistura final da qual foram retirados 500 µL que foi concentrado em rotaevaporador (Labconco®, MO-EUA). Após uma ressuspensão deste em 50 µL de metanol 50%, a determinação da concentração de ácido *trans*-cinâmico, proporcional a atividade da PAL, foi determinada por LC-MS.

A quantificação de ácido *trans*-cinâmico foi realizada a partir da injeção de 10 µL do extrato metanólico preparado anteriormente em sistema HPLC/MS (Thermo® Finnigan, CA-EUA). Os compostos foram separados em uma coluna 4µ Hydro-RP-80A° 150 mm x 2 mm (Luna, Phenomenex®, CA-EUA) de fase reversa mantida a 25 °C. A fase móvel foi constituída de água (solvente A) e metanol:acetonitrila (60:40, v/v, solvente B), ambos com pH ajustado com ácido fórmico para 4,5. O sistema de gradiente de solvente utilizado foi 0/100, 3/90, 10-15/75, 16/70, 25/25, 30/10, 32-34/0, 35-40/100 (min/ % fase A) a um fluxo constante de 0,2 mL.min⁻¹. O espectro de massa foi obtido em aparelho espectrômetro de massa LCQ Deca XP Max Ion Trap Mass Spectrometer acoplado a uma saída de PDA e equipado com uma fonte de Z-spray ESI e a corrida realizada através do software Xcalibur 1.3 (ThermoFinnigan® Surveyor, CA-EUA). As separações foram conduzidas usando o Phenomenex® (Torrance, CA, EUA) Synergi 4 µm Hydro-RP 80^a (2 mm x 150 mm) com uma coluna C18 e um fluxo de 200 µL.min⁻¹ a partir de um eluente PDA. Os cromatogramas foram monitorados a 330, 280, 210 nm e um espectro completo avaliado entre 200 - 600 nm. Gás nitrogênio foi usado como gás de solvatação, a 275 °C e a um fluxo de 60 L.h⁻¹. Uma curva padrão foi construída a partir de diferentes concentrações de ácido *trans*-cinâmico (Sigma-Aldrich, MO-EUA) e os resultados foram expressos como µmol ácido t-cinâmico.h⁻¹g⁻¹MS.

4.4.4 Atividade da polifenoloxidase (PPO, EC 1.14.18.1)

A extração e atividade da PPO foram realizadas de acordo com o método proposto por SOJO et al. (1998). Uma amostra (100 mg) liofilizada foi homogeneizada em 2 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH7,0) contendo PVP 2% e Tritin X-100 4% em Ultraturrax® e em seguida, mantida em repouso a 4 °C por 30 min. Após esse período, a mistura foi centrifugada a 10.000 xg por 15 min a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado como extrato proteico.

A atividade da PPO foi mensurada a partir da mistura que consistiu do extrato, suspenso em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) e catequina 30 mM. A absorvância foi monitorada a 395 nm e a atividade enzimática foi representada como uma variação na densidade ótica ($\Delta D.O$) . mg^{-1} proteína.min⁻¹.

4.5 Metabolismo respiratório e produção de radicais livres

4.5.1 Análise de atividade mitocondrial

Como indicador da taxa respiratória a atividade mitocondrial foi determinada pelo método que utiliza o sal 5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4,5-dimetiltiazol)-3-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS) de acordo com instruções do fabricante (Promega®). Mitocôndrias foram extraídas a partir de 300 mg de amostra homogeneizadas por 2 min em 4 mL de solução extratora gelada composta pelo tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,4), sacarose 400 mM, 2% de PVP e β -mercaptoetanol 50 mM. A solução final foi filtrada e centrifugada a 500 xg por 10 min a 4 °C. O sobrenadante resultante foi novamente centrifugado a 10.000 xg por 10 min a 4 °C e o precipitado foi ressuspenso em solução de tampão Tris-HCl (pH 7,4) com sacarose 400 mM e submetido a uma nova centrifugação a 10.000 xg por 10 min a 4 °C. Essa etapa de lavagem foi realizada duas vezes e precipitado resultou na fração mitocondrial, a qual foi ressuspensa em solução tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) contendo sacarose 400 mM, e utilizada na análise de atividade.

O MTS é um sal tetrazólio sintético capaz de reduzir *in vitro* a formazana por ação de enzimas desidrogenases, onde o NADPH atua como agente redutor. A análise MTS foi realizada a partir do kit Cell Titer 583 96R Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation (Promega®). Para isso, uma mistura contendo 30 μL da fração mitocondrial, tampão fosfato de potássio 20 mM (pH 7,4), succinato 20 mM e 50 μL de solução MTS foi mantida em repouso a 37 °C por 2 h. Após esse período, a formazana liberada foi quantificada por absorvância a 490 nm, sendo proporcional à atividade de desidrogenases mitocondriais. O teor de proteínas da fração mitocondrial foi determinado e utilizado para normalizar a quantidade de mitocôndrias extraídas das amostras controle e tratadas. Os resultados finais foram então expressos como atividade mitocondrial relativa (%) por μg de proteína, utilizando a amostra controle do tempo 0 como referencial de 100%.

4.5.2 Atividade da oxidase do NADPH (NOX, EC 1.6.3.1)

Por catalisar a síntese de radical superóxido (EROs), a atividade da NOX foi determinada de acordo com AGARWAL et al. (2005). Para iniciar a extração das proteínas, as membranas celulares foram isoladas através da homogeneização de 0,5 g de amostras com tampão Tris-HCl 50 mM, sacarose 250 mM, EDTA 3 mM, DTT 1 mM, L-cisteína 3,6 mM, MgCl₂ 0,2 mM, 0,6% de PVP e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 0,5 mM. A mistura foi filtrada através de quatro camadas de tecido de trama fina e então, centrifugada a 10.000 xg por 45 min a 4 °C. O sobrenadante foi separado para a precipitação de proteínas da membrana e centrifugado em ultracentrífuga Himac CP80WX (Hitachi[®], Japão) a 65.000 xg por 30 min e 4 °C. O precipitado, consistindo da fração com as membranas biológicas foi resuspenso em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,0), sacarose 250 mM e PMSF 0,5 mM sendo utilizado como extrato protéico

Para a determinação da atividade, uma mistura com 10 µL do extrato, tampão Tris-HCl 0,5 mM (pH 7,2), os substratos NADPH 100 µM e citocromo *c* 0,5 mM foi preparada. Metade das amostras foi tratada com o inibidor difenileneiodonio (DPI) 350 µM específico da NOX como controle para averiguar se a produção do radical é realmente proveniente da ação dessa enzima. A atividade da NOX é medida por absorbância a 550 nm, a qual reflete a taxa de redução do citocromo *c* ($\epsilon = 21,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) por radicais superóxidos formado a partir da atividade enzimática. Os resultados foram expressos em $\eta\text{mol O}_2\bullet^{-}\mu\text{g de proteína}^{-1}\text{min}^{-1}$.

4.5.3 Determinação de radicais livres totais

EROs foram mensuradas usando diacetato de 2,7-diclorofluorescina (DCFDA), como descrito anteriormente por JAMBUNATHAN (2010). Amostras (100 mg) foram homogeneizadas com 700 µL de tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,2) e então, centrifugadas a 12.000 xg por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi separado e usado como extrato. Uma mistura contendo extrato diluído (10x) e DCFDA 10 µM foi mantida no escuro por 10 min e então, a fluorescência foi mensurada à uma excitação de 485 nm e uma emissão de 528 nm em um leitor de microplacas (Synergy HT, Bio-Tek[®] Instruments, Inc., VT-EUA). Os resultados foram representados como intensidade de fluorescência relativa entre o controle (100%) e as amostras tratadas por grama de massa seca ($\text{g}^{-1} \text{MS}$).

4.6 Quantificação de proteínas

Todos os extratos utilizados para determinação de atividade enzimática e de taxa respiração pelo método de MTS foram quantificados quanto ao conteúdo de proteínas totais pelo método colorimétrico do ácido biciconínico segundo o kit Pierce[®] BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL-EUA).

4.7 Análise estatística

Os dados foram analisados usando o teste t de Student ou análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Tukey, utilizando o software JMP[®] pro v. 10.0. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão, onde letras diferentes mostram diferença significativa ($P < 0,05$).

5. Resultados e Discussão

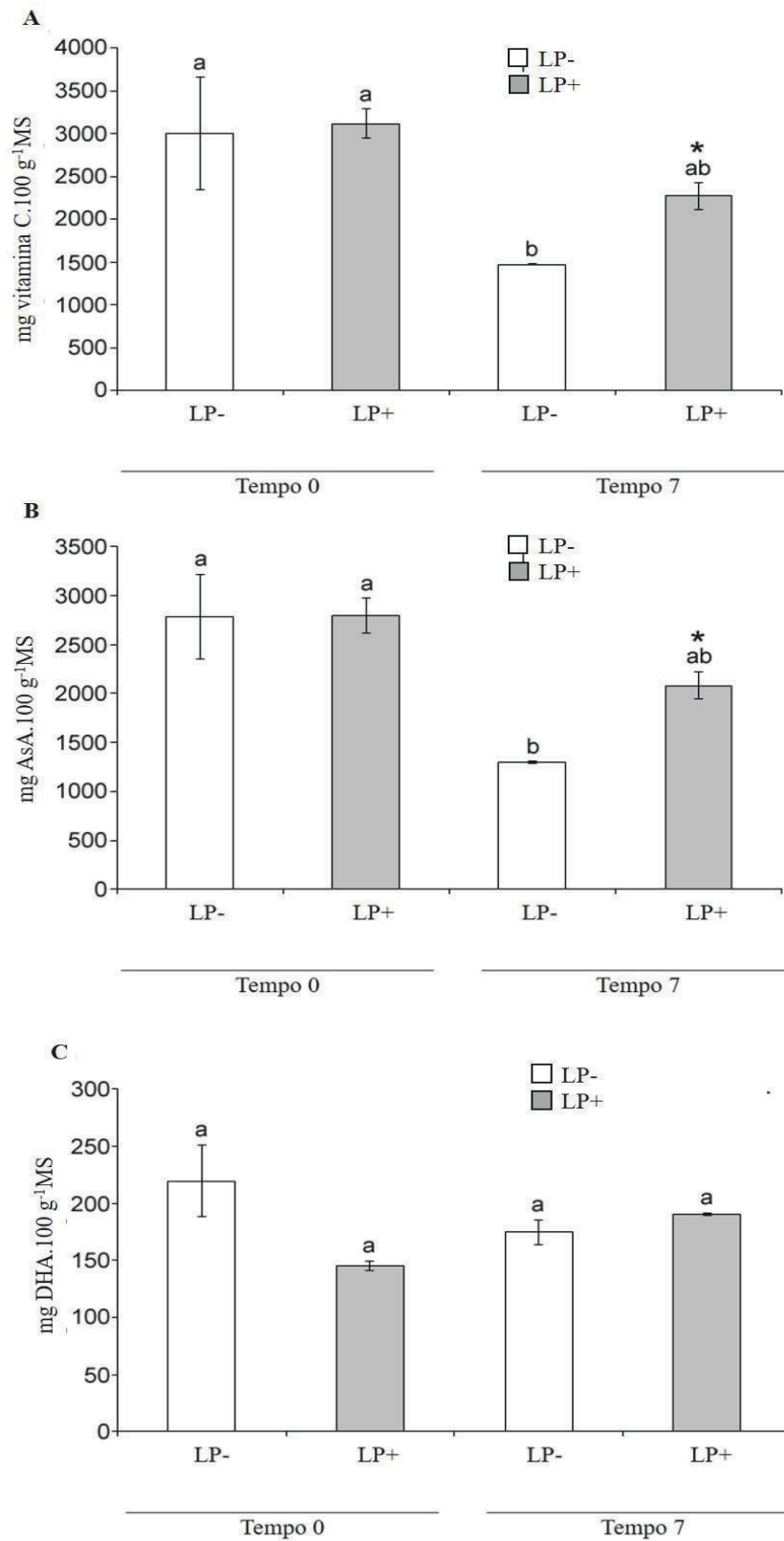
5.1 Efeito da LP no metabolismo de vitamina C

A irradiação de acerolas com LP reduziu significativamente as perdas relativas no conteúdo total de vitamina C após 7 dias de armazenamento, quando comparado ao controle (Figura 6A). No tempo 0, as amostras apresentaram um conteúdo similar de vitamina C total em torno de $3.000 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{MS}$, o qual caiu para $1.450 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{MS}$ nas amostras controle e não se alterou significativamente nas amostras tratadas após o armazenamento. Como essa vitamina se apresentar nas formas reduzida (AsA) e oxidada (DHA), estas foram analisadas separadamente. Após o armazenamento das acerolas, a LP causou uma menor queda na quantidade de AsA, (de 2.850 para $2.050 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{MS}$ nas amostras tratadas e 2.840 para $1.350 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{MS}$ nas amostras tratadas), (Figura 6B) enquanto que nenhuma diferença significativa foi observada em relação ao conteúdo de DHA (Figura 6C), quando comparado ao controle. Esses resultados indicam que o tratamento LP foi capaz de proteger a vitamina C, mais precisamente em sua forma reduzida AsA, contra a degradação ou promoveu uma maior taxa de reciclagem durante o armazenamento pós colheita em acerola.

Mangas minimamente processadas tratadas com LP ($8 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$) também apresentaram uma menor queda na concentração de vitamina C total após 7 dias de armazenamento quando comparadas ao controle (CHARLES et al., 2013). A exposição à luz é capaz aumentar o conteúdo de AsA em folhas de acerola, folhas de *A. thaliana*, em maçã, tomate e arroz (BADEJO et al., 2009; ELTELIB et al., 2011; FUKUNAGA; FUJIKAWA; ESAKA, 2010; LI, M. et al., 2009; TABATA et al., 2001). IOANNIDI et al. (2009) propuseram que a luz poderia desempenhar um importante papel na regulação da expressão da enzima redutase do monodehidroascorbato (MDHAR, EC 1.6.5.4), uma enzima que atua na reciclagem do ácido ascórbico.

Em plantas de kiwi submetidas a 50% de sombreamento, houve um aumento significativo no conteúdo de DHA e menor acúmulo de vitamina C, a medida que o fruto se desenvolvia após a antese (LI et al., 2010). Já, tomates submetidos a luz UV-B apresentaram um maior acúmulo de vitamina C total quando comparado ao controle, não causando, no entanto, alterações no *status* redox desse composto nesses frutos (CASTAGNA et al., 2013). Sob estresse salino, o conteúdo de ácido ascórbico foi significativamente maior em folhas de aceroleira, o que pode ser resultante de uma maior taxa de síntese e/ou reciclagem desse composto quando o tecido é estressado (ELTELIB et al., 2011).

Figura 6. Concentração de vitamina C total (A), AsA (B) e DHA (C) em acerolas controle (LP-) e tratadas com luz pulsada (LP+) após a colheita (tempo zero) e armazenamento a 10 °C por sete dias (tempo7). Letras diferentes representam diferença significativa a $P < 0,05$.

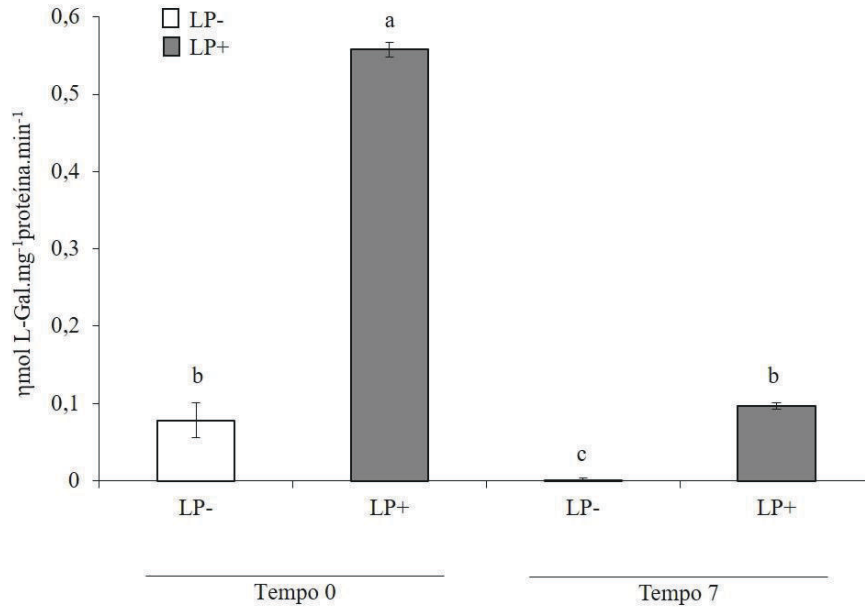


A enzima GalDH catalisa a oxidação de L-galactona-1,4-lactona em ácido ascórbico, na última etapa da via de biossíntese do ácido ascórbico (Smirnoff, Running, & Gatzek, 2004). Como pode ser observado na Figura 7, a atividade da GalDH, 0,08 $\eta\text{mol L-Gal oxidada.mg}^{-1}\text{proteína.min}^{-1}$ (controle), aumenta significativamente imediatamente após o tratamento com LP (0,57 $\eta\text{mol L-Gal oxidada.mg}^{-1}\text{proteína.min}^{-1}$). A atividade dessa enzima cai drasticamente em ambas as amostras após 7 dias de armazenamento, praticamente desaparecendo em acerolas controle, porém mantendo-se ainda ativa nas amostras tratadas (atividade em torno de 0,09 $\eta\text{mol L-Gal oxidada.mg}^{-1}\text{proteína.min}^{-1}$).

A elevada atividade dessa enzima é a principal responsável pelo acúmulo de ácido ascórbico durante as fases iniciais do desenvolvimento de frutos de *Ribes nigrum* L. (HANCOCK et al., 2007). Outros resultados mostraram que o sombreamento a partir da antese, causou uma redução nos níveis de ácido ascórbico em kiwi devido a uma menor taxa de expressão e de atividade da GalDH nesses frutos quando comparados aos frutos que se desenvolveram sob a luz (LI et al., 2010).

Todas as enzimas da via de biossíntese do ácido ascórbico em plantas estão localizadas no citosol, com exceção da GalDH, a qual está inserida na membrana mitocondrial interna, como parte da cadeia transportadora de elétrons (CTE), onde funciona como local de fluxo alternativo de elétrons que pode auxiliar na dissipação de energia; além disso, já foi evidenciada uma clara relação entre a taxa de respiração celular e a de síntese de ácido ascórbico em plantas (MILLAR et al., 2003). De acordo com BARTOLI et al. (2006), a regulação da atividade da GalDH pela luz ou pelo fluxo de elétrons da CTE mitocondrial são cruciais para determinar o conteúdo de vitamina C em tecidos vegetais. Em tomates, nos quais o gene da GalDH (*SlGalDH*) foi silenciado, observou-se, além de um decréscimo de vitamina C, uma redução na taxa de crescimento e expansão celular, bem como uma mudança na atividade mitocondrial por meio de alterações no ciclo de Krebs e CTE, o que confirma a importante função dessa enzima na síntese de ascorbato, respiração celular e no desenvolvimento de tecidos vegetais (ALHAGDOW et al., 2007).

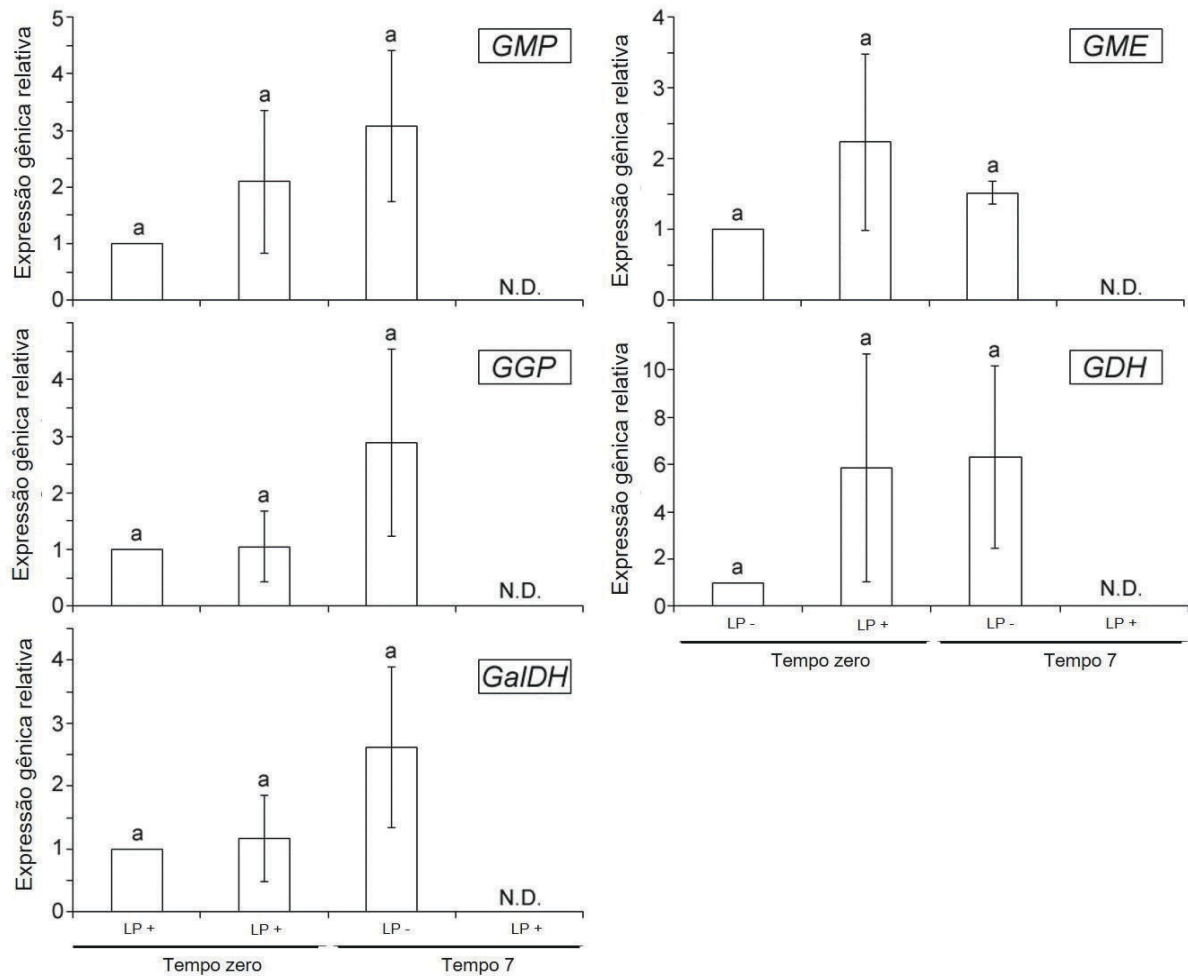
Figura 7. Atividade da GalDH em acerolas controle (LP-) e tratadas com luz pulsada (LP+) após a colheita (tempo zero) e armazenamento a 10 °C por sete dias. Letras diferentes representam diferença significativa a $P < 0,05$.



Os efeitos do tratamento pós-colheita com LP na expressão de genes da via de biossíntese de vitamina C podem ser observados na Figura 8. No tempo zero, a LP não alterou significativamente a expressão dos genes que codificam as enzimas GMP, GME, GGP, GDH e GalDH, que compõem a principal rota de síntese do ácido ascórbico. Após o armazenamento das amostras controle, a expressão dos genes avaliados também não se alterou. Todavia, não se pode comparar com as amostras tratadas, pois a solução de RNA proveniente dessa amostra apresentou uma coloração escura, impedindo a detecção do sinal de fluorescência correspondente à amplificação durante a PCR para todos os *primers* utilizados, um indicativo de oxidação dos RNAs dessa amostra (Figura 8).

Diversos autores têm reportado que a luz é um dos principais fatores ambientais que regulam o conteúdo de vitamina C em tecidos vegetais (BARTOLI et al., 2009; CHEN, Z.; GALLIE, 2004; TABATA et al., 2001). A expressão de genes relacionados à via de biossíntese de ácido ascórbico tem sido estudada principalmente em folhas, os quais parecem ser regulados pela luz. YABUTA et al. (2007) observaram que a expressão de *GMP* e *GGP* aumentaram quando folhas de *A. thaliana* foram mantidas sob luz contínua e decresceram nesses órgãos quando as plantas eram movidas para o escuro. Para os genes *GME*, *GDH* e *GalDH*, resultados contraditórios em termos de influência da luz têm sido reportados.

Figura 8. Expressão relativa, por *real time* RT-PCR, de genes que codificam enzimas da via Smirnoff-Wheeler de biossíntese do ácido ascórbico em acerolas controle (LP-) e tratadas com luz pulsada (LP+) após a colheita (tempo zero) e armazenamento a 10 °C por sete dias. Letras diferentes representam diferença significativa a $P < 0,05$. ND refere-se à resultados não detectados.



Como a degradação de vitamina C total, principalmente da forma reduzida, foi menor nas amostras tratadas após o armazenamento, pode-se concluir que a LP influencia o equilíbrio das taxas de síntese (K_s) e degradação/utilização (K_d) desse composto, levando à um $K_s < K_d$. Contudo, o menor declínio dessa vitamina nas amostras tratadas com LP quando comparado ao controle, indica que a síntese de foi estimulada pela LP, $K_s (LP-) < K_s (LP+)$. Outro indicativo dessa influência positiva da LP foi o aumento da atividade da GalDH após a irradiação (tempo zero) e um declínio significativamente menor em sua atividade após 7 dias de armazenamento quando comparado ao controle.

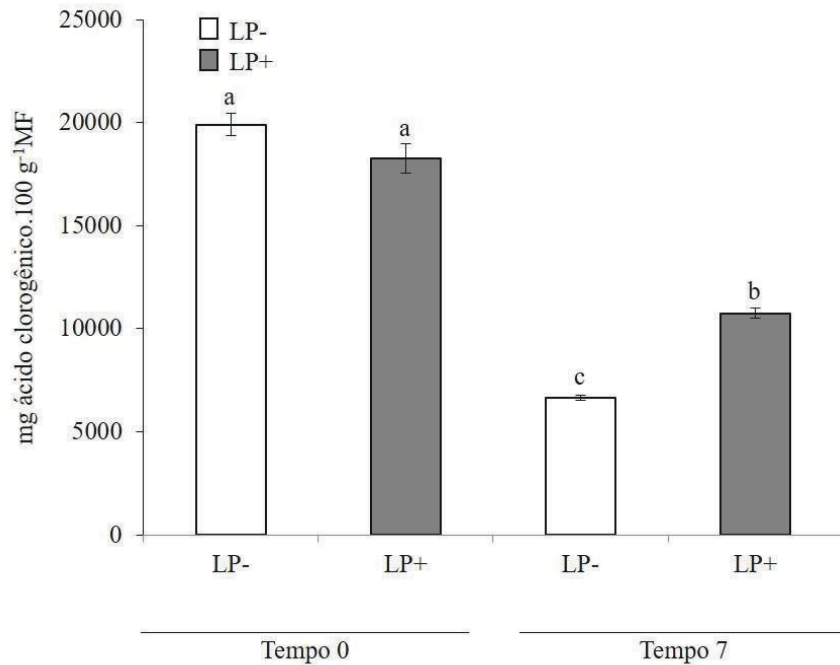
O aumento na atividade da GalDH mediado pela LP pode ser devido a fatores que agem no nível transcricional ou pós-transcricional. A LP pode induzir mudanças conformacionais na estrutura da proteína, ativando e/ou aumentando sua atividade catalítica, ou desencadear a expressão do gene *GalDH* através de vias de sinalização desconhecidas, o que resultaria em um aumento na atividade da GalDH. Como o tratamento não influenciou a expressão dos genes que codificam as enzimas da via de biossíntese do ácido ascórbico, pode-se concluir que o estímulo da atividade da GalDH causada pela LP deve ter ocorrido por meio de alteração estrutural.

5.2 Efeito da LP no metabolismo de compostos fenólicos

A concentração de compostos fenólicos totais (Figura 9) caiu significativamente após 7 dias de armazenamento pós-colheita tanto nas amostras controle (de 19.970 para 5.010 mg de ácido clorogênico.100 g⁻¹MS), quanto nas tratadas (18.855 para 8.990 mg de ácido clorogênico.100 g⁻¹MS). Porém, nas amostras irradiadas com LP, o conteúdo de fenólicos totais se manteve significativamente mais alto durante o armazenamento. Esses resultados indicam que o tratamento com LP protegeu os compostos fenólicos contra a degradação em acerolas armazenadas. Em mangas ‘Tommy Atkins’, tratamento com LP na mesma dose aplicada nesse estudo (dois pulsos de 0,3 J.cm⁻²) causou um aumento de 130% e 197% no conteúdo de compostos fenólicos na polpa e casca desse fruto, respectivamente, após 7 dias de armazenamento (LOPES et al., 2015).

Diversos trabalhos têm mostrado que a exposição à doses horméticas de luz UV-C (200 – 280 nm) provoca um aumento na concentração de compostos fenólicos totais em mangas, antocianinas em morangos, flavonoides em *blueberries* e fenólicos estilbenos em uvas (CANTOS et al., 2001; ERKAN et al., 2008; GONZÁLEZ-AGUILAR et al., 2007; WANG; CHEN; WANG, 2009). Outras formas de estresse, como o corte, também causou um aumento significativo no conteúdo de fenólicos em cenouras no decorrer de 8 dias de armazenamento; tal incremento na concentração desses compostos ocorreu devido a um estímulo na atividade da PAL logo após o estresse, o que resultou em uma aumento na capacidade antioxidante desse produto (SURJADINATA; CISNEROS-ZEVALLOS, 2012).

Figura 9. Concentração de compostos fenólicos totais em acerolas controle (LP-) e tratadas (LP+) após a colheita (tempo zero) e armazenamento a 10 °C por sete dias. Letras diferentes representam diferença significativa a $P < 0,05$.



O perfil de compostos fenólicos encontrados nos frutos tratados e não tratados (Figura 10) mostrou a presença de vários picos semelhantes apenas nas frações de flavonóis (F3) e procianidinas/polímeros de antocianinas (F4). Alguns picos foram identificados por espectrometria de massa como sendo cianidina 3-raminosídeo (pico 3), pelargonidina (pico 4) e ácido eucômico (pico 5), apresentados na Tabela 2, os quais se acumularam após a exposição à LP (tempo 0). Além disso, após os sete dias de armazenamento das amostras tratadas, houve síntese de novos compostos como as antocianidinas feonidina 3-xilopiranosídeo (pico 1) e pelargonidina 3-raminosídeo (pico 2). Dessa forma, pode-se concluir que a LP induz mudanças na composição de compostos fenólicos em acerola.

A aplicação de LP também causou uma alteração no perfil de compostos fenólicos em mangas, causando um aumento de 170% na síntese de mangiferina nesses frutos (LOPES et al., 2015). O estresse por corte ou associado a outras formas como exposição à luz UV e hiperoxia, provoca a síntese específica do fenólico ácido cafeoilquínico (CQA) e um acúmulo de ácido chiquímico (metabólito primário), o qual pode ser utilizado pela PAL para promover a síntese de compostos de defesa do metabolismo secundário (BECERRA-MORENO et al.,

2012; HEREDIA, 2006; HEREDIA; CISNEROS-ZEVALLOS, 2009; SURJADINATA, 2006).

Figura 10. Cromatograma do perfil de compostos fenólicos das frações de flavonóis (F3) e procianidinas/polímeros de antocianinas (F4) de acerolas controle e tratadas com LP após a colheita (A e C) e sete dias de armazenamento a 10 °C (B e D).

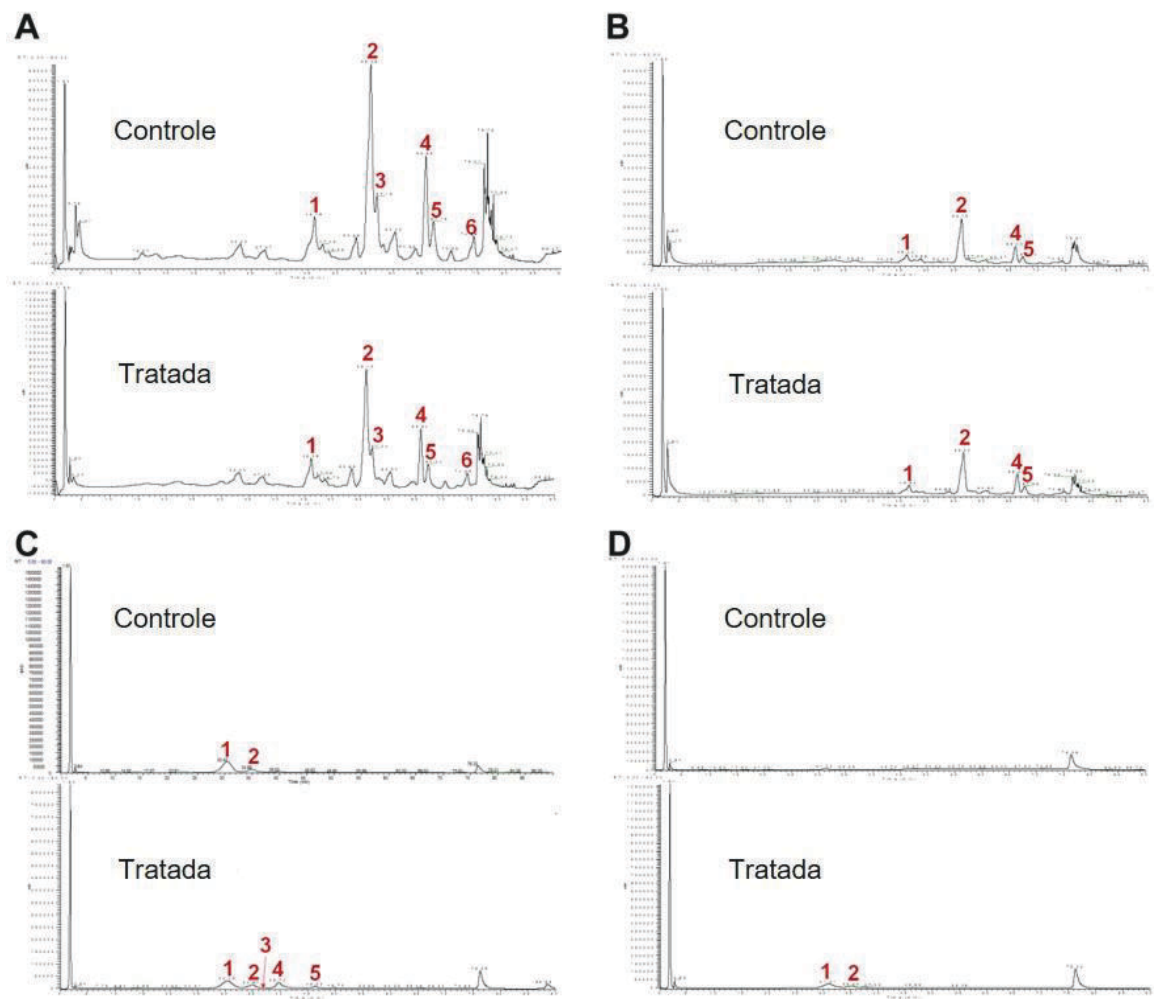


Tabela 2. Perfil por LC-MS, das frações de flavonóis (F3) e procianidinas/polímeros de antocianinas (F4) de compostos fenólicos de acerolas controle (LP-) e tratadas com luz pulsada (LP+) após a colheita (tempo zero) e armazenamento a 10 °C por sete dias (tempo sete).

Frações (UV, nm)	Pico Nº.	Tempo de retenção (min)	MS [M+H]	MS/MS	Identificação	Tempo 0		Tempo 7	
						LP-	LP+	LP-	LP+
F3 ^a (348)	1	46.2/ 46.6	448		Kaempferol 3- O-glucosídeo	+	+	+	+
	2	55.0/ 56.16/ 56.52	447	301/447	Q-3-O-ramnose (quercetina)	+	+	+	+
	3	57.2	263	111/113/ 139/150/ 153/161/ 218/263	N.I. ^c	+	+	-	-
	4	66.38/ 66.38	431	285/431	Cianidina 3- ramnosídeo	+	+	+	+
	5	67.68/ 67.34	461	314/461	Metoxi- kaempferol glucosídeo	+	+	-	-
	6	73.54/ 74.22	336	145/163/ 275/293/ 366	N.I. ^c	+	+	-	-
F4 ^b (400-550)	1	30.43	449	241/285/ 303	Feonidina-3- xilopiranosídeo	+	+	-	+
	2	34.9	415	191/268/ 352/369/ 380/414	Pelargonidina 3-ramnosídeo	+	+	-	+
	3	37.8	433	253/269/ 286/299/ 328	Cianidina 3- ramnosídeo	-	+	-	-
	4	39.7	285	147/191/ 241/285	Pelargonidina	-	+	-	-
	5	46.43	241	186/197/ 208/218/ 241/242/ 243	Ácido euômico	-	+	-	-

^a Fração F3 que contém flavonóis; ^b Fração F4 que contém procianidinas/antocianinas poliméricas;

^c N.I. indica um composto não identificado.

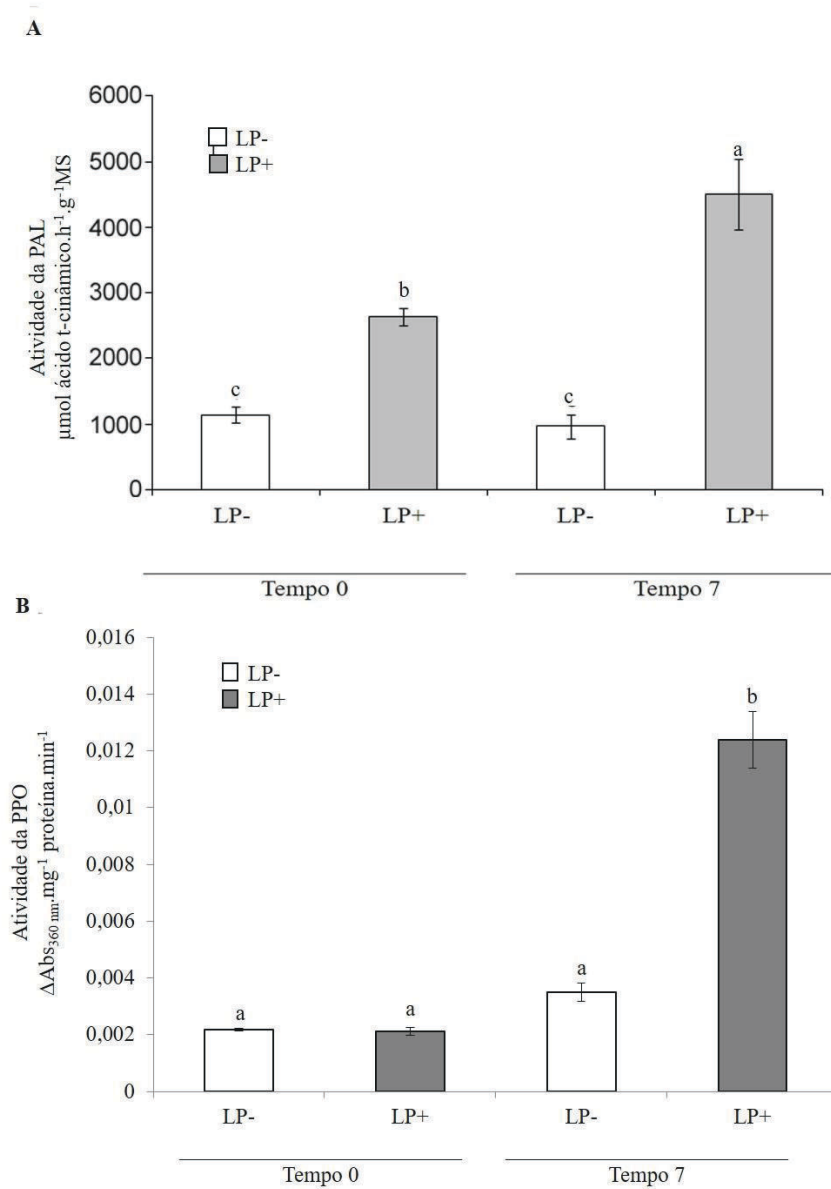
A LP influenciou a biossíntese causando um aumento significativo na atividade da enzima PAL que catalisa a primeira etapa da via biossintética, imediatamente após o tratamento e que se manteve durante o armazenamento (Figura 11A). Esses resultados corroboram com os observados para o perfil de compostos fenólicos (Figura 10) indicando que a LP induziu a síntese de alguns compostos fenólicos em acerola. Um tratamento semelhante (dois pulsos de luz com $0,3 \text{ J.cm}^{-2}$) também induziu um aumento na atividade da PAL em mangas armazenadas por 7 dias (LOPES et al., 2015).

Uma vez que o conteúdo total de fenólicos diminuiu durante o armazenamento pós-colheita das acerolas, a degradação desses compostos foi investigada a partir da análise da enzima PPO (Figura 11B), que catalisa a oxidação de compostos fenólicos. Inicialmente a atividade dessa enzima foi em torno de $0,002 \Delta_{\text{Abs}360 \text{ nm}} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{proteína} \cdot \text{min}^{-1}$, não diferindo significativamente entre as amostras tratadas e controle. Após 7 dias de armazenamento, a atividade da PPO aumentou significativamente nas amostras tratadas, em torno de 600%, sugerindo que a LP induz um aumento na degradação de compostos fenólicos; nas amostras não tratadas, a atividade desta enzima permaneceu estatisticamente inalterada.

Resultados semelhantes aos aqui apresentados, como o aumento na atividade da PPO foram encontrados por (CHARLES et al., 2013). Esses autores submeteram mangas minimamente processadas a LP (8 J.cm^{-2}) e após 7 dias de armazenamento, observaram que a atividade da PPO aumentou 50%, em relação ao controle, porém o conteúdo de compostos fenólicos totais e a atividade da PAL não se alterou significativamente durante o armazenamento. Esses autores sugeriram que o aumento na atividade da PPO durante o armazenamento desses frutos tratados com LP seria um indicativo de estresse oxidativo.

Assim como observado com a vitamina C, LP manteve níveis mais altos de fenólicos em acerola. Em um estudo prévio realizado por REYES; VILLARREAL; CISNEROS-ZEVALLOS (2007), os autores propuseram que o conteúdo total de fenólicos mensurados em uma determinada amostra é resultado do balanço entre sua taxa de síntese (K_s) e de degradação ou utilização (K_d). Dessa forma, o decréscimo observado na concentração desses compostos em amostras tratadas e controle durante o armazenamento de acerolas (Figura 9), estaria associada à uma $K_s < K_d$. O tratamento também estimulou a atividade da PAL, a enzima primordial na síntese de compostos fenólicos. Assim, o menor decréscimo observado nas amostras irradiadas evidencia que a taxa de síntese nestas é maior do que nas amostras controle, ou seja, $K_{s(LP-)} < K_{s(LP+)}$.

Figura 11. Atividade da PAL (A) e PPO (B) em acerolas controle (LP-) e tratadas com luz pulsada (LP+) após a colheita (tempo zero) e armazenamento a 10 °C por sete dias. Letras diferentes representam diferença significativa a $P < 0,05$.



A K_d representa um decréscimo no conteúdo de fenólicos e pode ser atribuída parcialmente à oxidação catalisada por enzimas como a oxidase de polifenóis (PPO) (TOMÁS-BARBERÁN; ESPIN, 2001). Nesse estudo, a atividade da PPO aumentou significativamente nas amostras tratadas com LP após 7 dias de armazenamento (Figura 11B). Dessa forma, $K_d (LP-) < K_d (LP+)$ possivelmente ocorre como um mecanismo de defesa vegetal em resposta ao estresse (MAYER, 2006). Porém, concomitante ao aumento na atividade oxidativa da PPO, a LP também desencadeou a biossíntese de novos compostos fenólicos

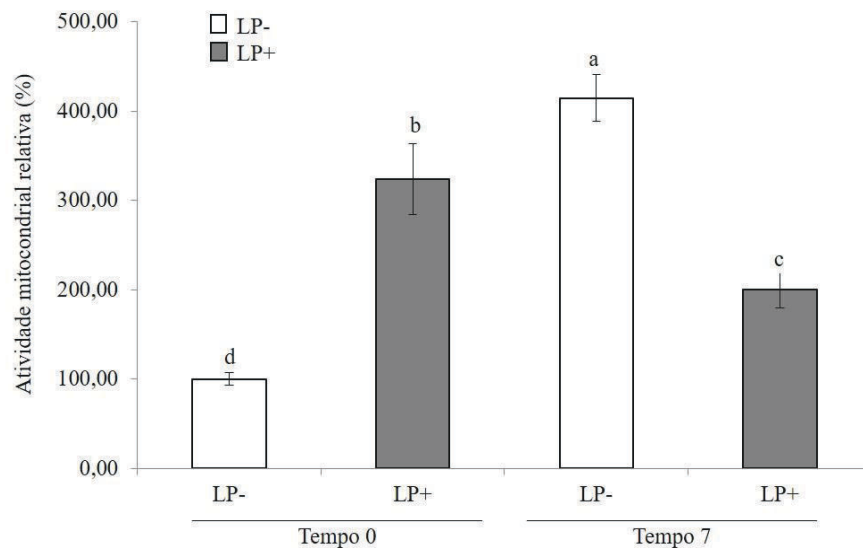
imediatamente após o tratamento, como a cianidina 3-raminosídeo, pelargonidina e ácido eucomico (Figura 10) e as antocianinas, feonidina 3-raminosídeo e pelargonidina 3-raminosídeo após 7 dias de armazenamento (Tabela 2). Portanto, esses resultados evidenciam que a LP afetou o equilíbrio entre a síntese e de degradação dos fenólicos com uma elevada concentração após o armazenamento e um perfil diferencial dos fenólicos, a despeito da elevada taxa de degradação observada pela atividade da PPO.

5.3 *Efeito da LP sobre a respiração e produção de EROs*

Como referencial da atividade respiratória das acerolas, a atividade de enzimas desidrogenases que compõem a CTE mitocondrial foi determinada (Figura 12). Os resultados mostram que elas foram estimuladas pelo tratamento com LP (aumento de 220%), quando comparadas ao controle. Após o armazenamento, essa atividade caiu pela metade nas amostras tratadas, enquanto que um aumento significativo de 300% foi observado nas amostras controle.

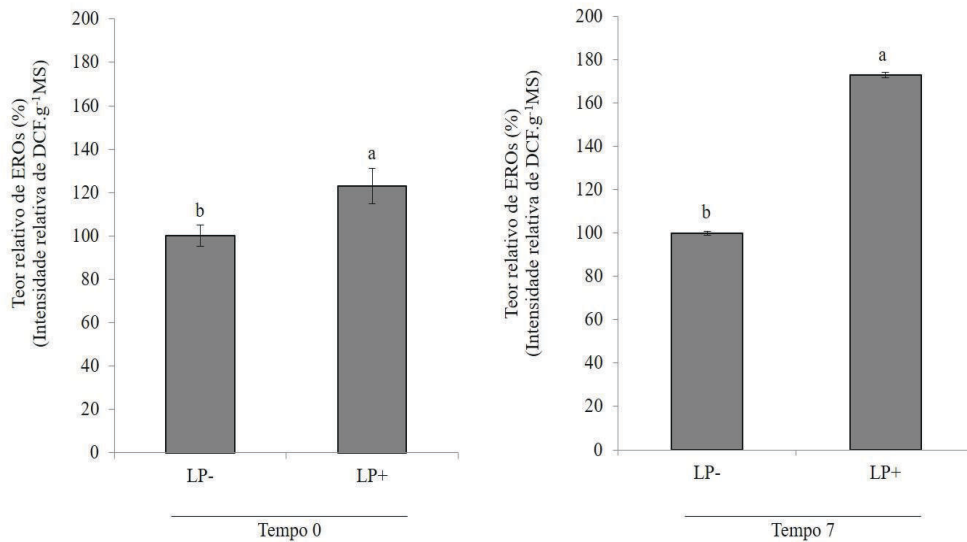
Em tomates submetidos à estresse por elevadas temperaturas, a atividade mitocondrial também foi maior quando comparado ao controle (CHENG et al., 1988). A atividade dessas enzimas, além de refletir a taxa de respiração celular, também pode refletir a produção de radicais livres, uma vez que estas são importantes fontes de EROs, levando a um desequilíbrio oxidativo sob situações de estresse (NOURIAN; RAMASWAMY; KUSHALAPPA, 2003; SAGI; FLUHR, 2006a). O aumento inicial da respiração e de seus subprodutos EROs indicam uma resposta de estresse das acerolas ao tratamento com LP, mas que com o decréscimo observado após o armazenamento, isso teria sido contornado por mecanismos de defesa antioxidante.

Figura 12. Atividade relativa de enzimas desidrogenases da mitocôndria de acerolas controle (LP-) e tratadas com luz pulsada (LP+) após a colheita (tempo zero) e armazenamento a 10 °C por sete dias. Letras diferentes representam diferença significativa a $P < 0,05$.



As análises feitas sobre a produção de radicais livres em diferentes sítios intracelulares mostram que a LP induziu um aumento significativo de 30% da concentração total (Figura 13), no tempo 0 e em 70% no tempo 7, quando comparado ao controle. Em mangas (polpa) tratadas com LP ($0,6 \text{ J.cm}^{-2}$) também foi observado um aumento significativo na concentração de H_2O_2 após 7 dias de armazenamento (LOPES et al., 2015). Na literatura, há várias citações sobre como estresses abióticos, tais como baixas e elevadas temperaturas, déficit hídrico e atmosfera rica em ozônio causam um aumento na produção de EROs em tecidos vegetais (JIN et al., 2006; MEHLHORN; TABNER; WELLBURN, 1990; SAIRAM; SRIVASTAVA; SAXENA, 2000; SALA; LAFUENTE, 2004).

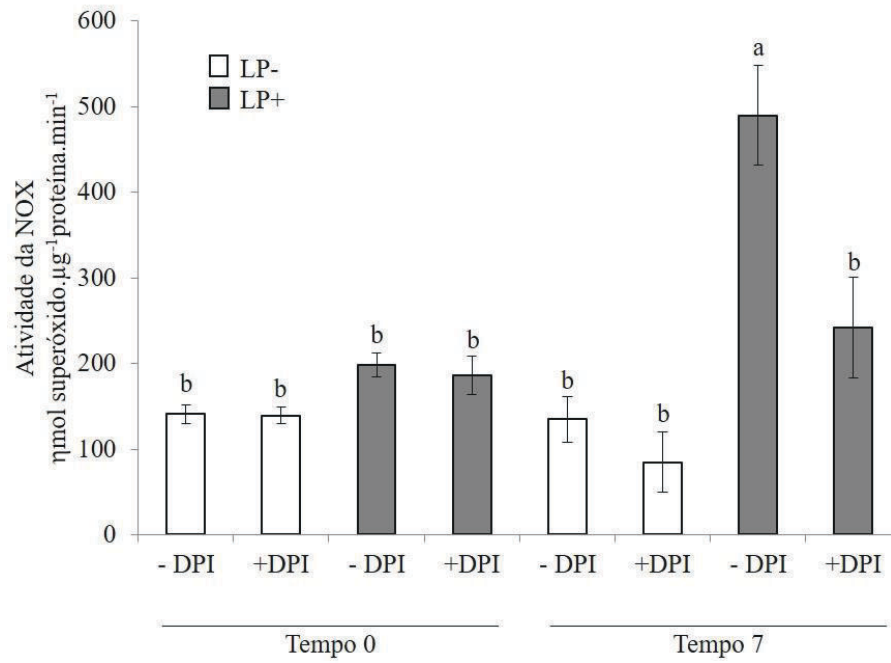
Figura 13. Teor relativo de EROs em acerolas controle (LP-) e tratadas com luz pulsada (LP+) após a colheita (tempo zero) e armazenamento a 10 °C por sete dias. Letras diferentes representam diferença significativa a $P < 0,05$.



A atividade da NOX da membrana plasmática (Figura 14) sofreu um aumento significativo com o tratamento com LP, após o armazenamento, enquanto que o aumento na atividade mitocondrial aumentou imediatamente após a irradiação com LP (Figura 12).

Uma indução na atividade da NOX foi recentemente reportada como um mecanismo de defesa de *A. thaliana* ao estresse salino, onde as EROs produzidas por essa enzima estimulavam o acúmulo de prolina como forma de tolerância ao estresse (BEN REJEB; LEFEBVRE-DE VOS; et al., 2015). Além disso, sob tais condições de estresse, a atividade da NOX mostrou-se como sendo responsável por desencadear a ativação do sistema antioxidante de defesa, por ativação das enzimas catalase (CAT, EC 1.11.16), peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) e redutase da glutathione (GR, EC 1.6.4.2) também no modelo vegetal *A. thaliana* (BEN REJEB; BENZARTI; et al., 2015). Portanto, os resultados mostram que a produção de EROs estimulada pela LP pode ocorrer imediatamente através do aumento da respiração mitocondrial (Figura 12) e posteriormente, pela atividade da NOX.

Figura 14. Produção de superóxido pela atividade específica da NOX em acerolas controle (LP-) e tratadas com luz pulsada (LP+) após a colheita (tempo zero) e armazenamento a 10 °C por sete dias. Letras diferentes representam diferença significativa a $P < 0,05$.



Diversos estudos vêm sendo realizados sobre os efeitos da radiação na pós-colheita de frutos e muitos focam no espectro do UV-C, o componente mais abundante da LP, como ferramenta para manter a qualidade e prolongar a vida útil desses através de alterações metabólicas (ALOTHMAN et al., 2009a;2009b; ERKAN et al., 2008; PERKINS-VEAZIE et al., 2008; RIVERA-PASTRANA et al., 2013; SHEN et al., 2013). Dentre esses, há resultados que mostram que LP pode retardar os processos de amadurecimento e senescência por ativação do metabolismo antioxidante. Os resultados aqui apresentados mostram que a LP manteve níveis mais elevados de vitamina C e fenólicos durante o armazenamento pós-colheita de acerola.

GONZALEZ-AGUILAR et al. (2010a) afirmaram que a luz UV-C induz a produção de EROs como o radical superóxido que atuaria como um sinalizador primário, desencadeando uma cascata de reações químicas que levaria à formação de outras EROs e promoveria um sistema de defesa antioxidante. No presente trabalho, a concentração de EROs também aumentou imediatamente após a exposição à LP, quando comparado ao controle, se mantendo mais alta mesmo após o armazenamento (Figura 13).

A LP pode influenciar a produção de EROs e o metabolismo de acerola de diferentes formas. Inicialmente, a LP promoveria a produção direta de radicais livres através de reações fotoquímicas, uma vez que seus fótons emitidos apresentam energia suficiente para destruir ligações químicas (KOVACS; KERESZTES, 2002). Contudo, neste trabalho, esse efeito direto da LP parece não ter sido o principal contribuinte para a produção de EROs devido ao curto tempo de exposição à radiação e a baixa dose aplicada ($0,3 \text{ J.cm}^{-2}$ por pulso).

Uma segunda possibilidade parte do princípio que a luz UV-C, proveniente da LP, poderia induzir a produção de superóxido através do aumento na respiração mitocondrial, o qual desempenha um importante papel como sinal primário que desencadeará uma resposta secundária de defesa (GILL; TUTEJA, 2010). Nossos resultados dão suporte a essa afirmação uma vez que foi observado um aumento na atividade mitocondrial e, conseqüentemente na produção de EROs imediatamente após a irradiação com LP (Figuras 12 e 13), enquanto que a atividade da NOX aumentou apenas após o tratamento. De acordo com o modelo proposto por JACOBO-VELÁZQUEZ et al. (2011), sob situações de estresse, as EROs produzidas pela NOX, mais especificamente o radical superóxido, agem como sinalizadores que irão desencadear uma maior expressão e a atividade da PAL culminando com uma maior produção de compostos fenólicos que atuarão na defesa celular contra o estresse.

Um repentino aumento de EROs induzido por luz UV-C também foi observado em mitocôndrias de *Arabidopsis* (GAO et al., 2008). Em plantas adaptadas à estresses abióticos, as mitocôndrias têm sido implicadas como as principais responsáveis pela geração de EROs, como forma de dissipar o excesso de energia (GILL; TUTEJA, 2010; NOCTOR; DE PAEPE; FOYER, 2007). Isso ocorre quando a CTE dessa organela possui energia livre suficiente para reduzir diretamente o O_2 , o que é considerado a forma primária de produção de EROs; os complexos I e III da CTE mitocondrial são conhecidos como sítios de produção de superóxido (GILL; TUTEJA, 2010). Sob condição de excesso de energia por altas doses de LP, EROs podem ser geradas tanto no complexo I quanto no II da CTE. Subseqüentemente, essa rápida geração de espécies reativas pode reduzir ou inibir sua produção tardia por mecanismos de dissipação de energia, como já foi demonstrado em mitocôndrias de plantas de trigo (PASTORE et al., 2002; PASTORE et al., 2007).

O complexo I da CTE mitocondrial inclui desidrogenases cujas atividades refletem a taxa de atividade respiratória. Nas amostras controle desse estudo (Figura 12), a atividade mitocondrial aumentou significativamente após 7 dias, indicando que a respiração celular aumenta durante o armazenamento pós-colheita de acerola. Já é bem estabelecido que o desenvolvimento de deterioração e senescência de produtos vegetais após a colheita é

geralmente proporcional à taxa respiratória, e um resultado similar foi observado em batatas e pêssego (NOURIAN et al., 2003; YANG et al., 2014). Ao contrário das amostras controle, a atividade mitocondrial foi significativamente menor após 7 dias de armazenamento das amostras tratadas com LP (Figura 8), o que pode ser devido aos mecanismos de dissipação de energia desencadeados pela produção de EROs. Além disso, o complexo I da CTE de mitocôndrias vegetais inclui a enzima GalDH responsável pela biossíntese de ácido ascórbico (HEAZLEWOOD; HOWELL; MILLAR, 2003; MILLAR et al., 2003), a qual foi ativada imediatamente após a irradiação com LP (Figura 7), presumivelmente através de uma regulação pós-transcricional.

Dessa forma, o excesso de energia, devido a exposição à LP, no complexo I da CTE pode contribuir para mudanças estruturais da GalDH, levado à um aumento de sua atividade ao mesmo tempo em que causa uma rápida produção de EROs após o tratamento. De acordo com ZSIGMOND et al. (2011), sob condição de elevado estresse energético na CTE, a ativação da GalDH e uma consequente maior produção de ácido ascórbico teria a finalidade de auxiliar no desvio do fluxo de elétrons e na produção de um composto antioxidante que protegeria a integridade das membranas mitocondriais e a manutenção do processo respiratório celular.

Uma terceira possibilidade para explicar a produção de EROs por LP seria através da atividade da NOX localizada na membrana plasmática, como uma resposta secundária ao estresse ambiental. Esse fato foi também evidenciado pelos resultados obtidos nesse trabalho, onde a atividade da NOX foi ativada das amostras tratadas resultando no aumento de EROs, após 7 dias de armazenamento. Esse aumento na atividade da NOX pode ser atribuído a um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} , o qual atuaria como sinalizador para ativar essa enzima (DEMIDCHIK et al., 2009) e possivelmente à um aumento na expressão do gene *NOX* (MARINO et al., 2012). Uma vez que o radical superóxido é formado, ele pode ser dismutado em H_2O_2 por ação da SOD, o que pode funcionar como um sinal chave na indução da expressão de genes que codificam a síntese da PAL e da enzima sintase da chalcona (CHS), responsáveis pelas vias de biossíntese de metabólitos secundários com capacidade antioxidante (ABARCA; MARTÍN; SABATER, 2001; GONZALEZ-AGUILAR et al., 2010a; JENKINS, 1997).

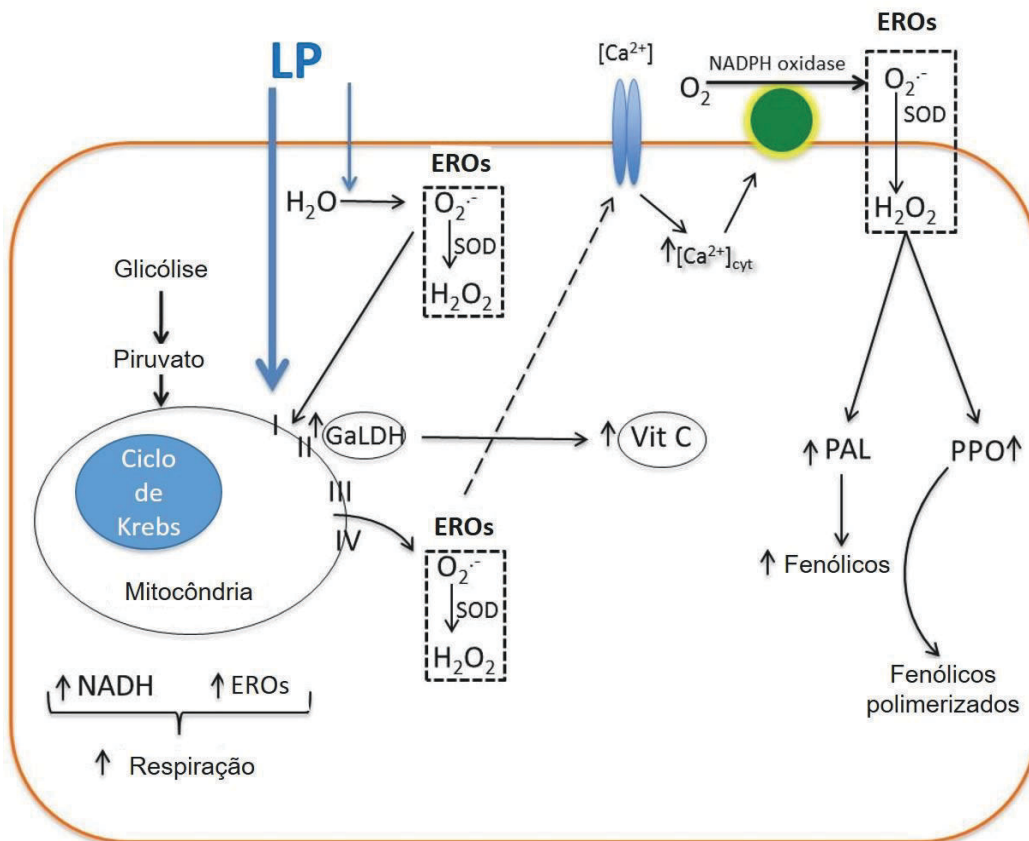
Qualquer uma das possíveis explicações para a influência de LP sobre as EROs resulta na ativação de mecanismos de defesa com acúmulo de antioxidantes como a vitamina C e os compostos fenólicos que são nutraceuticos importantes para a saúde humana. As informações aqui apresentadas comprovam que a exposição a LP em doses baixas induz a um efeito

hormético nas células da polpa da acerola com aumento da qualidade fitoquímica do fruto, mesmo após 7 dias de armazenamento sob refrigeração. Além de manter a qualidade ao longo do armazenamento refrigerado, o que pode ser interessante do ponto de vista comercial por aumentar a vida de prateleira desses frutos, o tratamento de acerolas com LP também pode ser explorado, a partir dos resultados mostrados nesse trabalho, como uma ferramenta para o uso desses frutos como biofábricas de fitoquímicos para a fabricação de suplementos alimentares e terapêuticos.

6. Conclusão

No presente trabalho, foi mostrado que o tratamento com doses horméticas ($0,6 \text{ J.cm}^{-2}$) de LP em acerola protege a vitamina C e os compostos fenólicos contra a degradação através de alterações em seus metabolismos mediadas por EROs. Além disso, foram fornecidos novos esclarecimentos sobre como a LP melhoraria a capacidade antioxidante de frutos, como está descrito no modelo de ação apresentado na Figura 15.

Figura 15. Modelo proposto para explicar o mecanismo de ação da LP sobre o metabolismo da vitamina C e de compostos fenólicos durante o armazenamento refrigerado de acerola.



Fonte: Autor.

Em linhas gerais, propõem-se que a LP deposita um excesso de energia na CTE mitocondrial de plantas, acarretando em um aumento nos níveis de EROs e um incremento na atividade das enzimas GalDH e PAL imediatamente após o tratamento. As EROs produzidas inicialmente funcionariam como sinalizadores primários para a ativação do metabolismo secundário de defesa vegetal, induzindo a expressão de *NOX* e *PPO*, e a ativação imediata a nível protéico da GalDH e PAL protegeriam o *pool* de vitamina C e fenólicos contra a

degradação por alteração no equilíbrio entre K_s e K_d no metabolismo de ambos os compostos durante o armazenamento pós-colheita. Adicionalmente, as EROs geradas pela atividade da NOX, tardiamente após o tratamento, desempenhariam um importante papel como sinalizadores secundários possivelmente induzindo a síntese de compostos fenólicos por aumento na atividade da PAL. Tal indução poderia manter os elevados níveis de fenólicos no fruto devido à uma maior K_s em relação à K_d . Dessa forma, este estudo pode contribuir para o desenvolvimento de técnicas avançadas a fim de incrementar a qualidade nutricional e reduzir as perdas durante o armazenamento pós-colheita de frutos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, D.; MARTÍN, M.; SABATER, B. Differential leaf stress responses in young and senescent plants. **Physiol. Plantarum**, v. 113, n. 3, p. 409-415, 2001.

ABREU, I. et al. Isolamento e produção de substâncias de interesse farmacológico de *Hypericum brasiliense* Choisy. **Isolamento e produção de substâncias de interesse farmacológico de *Hypericum brasiliense* Choisy**, 2002.

ADECE. Agência de Desenvolvimento do Estado do Ceará S/A. 2013. Disponível em: <http://www.adece.ce.gov.br/phocadownload/Agronegocio/perfil_da_producao_de_frutas_brasil_ceara_2013_frutal.pdf>.

AGARWAL, S. et al. Role of ABA, salicylic acid, calcium and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes induction in wheat seedlings. **Plant Sci.**, v. 169, n. 3, p. 559-570, 2005.

AGIUS, F. et al. Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. **Nature biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 177-181, 2003.

AL-MADHOUN, A. S.; SANMARTIN, M.; KANELIS, A. K. Expression of ascorbate oxidase isoenzymes in cucurbits and during development and ripening of melon fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 27, n. 2, p. 137-146, 2003.

ALAMED, J. et al. Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2969-2976, 2009.

ALHAGDOW, M. et al. Silencing of the mitochondrial ascorbate synthesizing enzyme L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase affects plant and fruit development in tomato. **Plant physiology**, v. 145, n. 4, p. 1408-1422, 2007.

ALÓS, E.; RODRIGO, M. J.; ZACARÍAS, L. Transcriptomic analysis of genes involved in the biosynthesis, recycling and degradation of L-ascorbic acid in pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). **Plant science**, v. 207, p. 2-11, 2013.

ALOTHMAN, M.; BHAT, R.; KARIM, A. Effects of radiation processing on phytochemicals and antioxidants in plant produce. **Trends Food Sci.Tech.**, v. 20, n. 5, p. 201-212, 2009a.

_____. UV radiation-induced changes of antioxidant capacity of fresh-cut tropical fruits. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.**, v. 10, n. 4, p. 512-516, 2009b.

ARAÚJO, J. Química de alimentos: teoria e prática. In: (Ed.). **Química de alimentos: teoria e prática**: UFV, 2004.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, n. 2, p. 235-241, 1992.

AYALA-ZAVALA, J. F. et al. High oxygen treatment increases antioxidant capacity and postharvest life of strawberry fruit. **Food technology and biotechnology**, v. 45, n. 2, p. 166, 2007.

BADEJO, A. A.; FUJIKAWA, Y.; ESAKA, M. Gene expression of ascorbic acid biosynthesis related enzymes of the Smirnoff-Wheeler pathway in acerola (*Malpighia glabra*). **Journal of plant physiology**, v. 166, n. 6, p. 652-660, 2009.

BADEJO, A. A. et al. 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, n. 9, p. 665-672, 2007.

BARBOSA-CANOVAS, G. V. et al. **Preservation of foods with pulsed electric fields**. Academic Press, 1999. ISBN 0080539467.

BARNES, J.; ZHENG, Y.; LYONS, T. Plant resistance to ozone: the role of ascorbate. In: (Ed.). **Air pollution and plant biotechnology**: Springer, 2002. p.235-252. ISBN 4431683909.

BARTOLI, C. G.; PASTORI, G. M.; FOYER, C. H. Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. **Plant physiology**, v. 123, n. 1, p. 335-344, 2000.

BARTOLI, C. G. et al. Control of ascorbic acid synthesis and accumulation and glutathione by the incident light red/far red ratio in *Phaseolus vulgaris* leaves. **FEBS Lett**, v. 583, n. 1, p. 118-122, 2009.

BARTOLI, C. G. et al. Inter-relationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 8, p. 1621-1631, 2006.

BECERRA-MORENO, A. et al. Plants as Biofactories: Glyphosate-Induced Production of Shikimic Acid and Phenolic Antioxidants in Wounded Carrot Tissue. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 45, p. 11378-11386, Nov 14 2012.

BEN REJEB, K. et al. NADPH oxidase-dependent H₂O₂ production is required for salt-induced antioxidant defense in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of plant physiology**, v. 174, p. 5-15, Feb 1 2015.

BEN REJEB, K. et al. Hydrogen peroxide produced by NADPH oxidases increases proline accumulation during salt or mannitol stress in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, v. 208, n. 4, p. 1138-1148, Dec 2015.

BOECKX, T. et al. Polyphenol oxidase in leaves; is there any significance to the chloroplastic localization? **Journal of Experimental Botany**, p. erv141, 2015.

BRAVO, S. et al. The influence of post-harvest UV-C hormesis on lycopene, beta-carotene, and phenolic content and antioxidant activity of breaker tomatoes. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 296-302, Nov 2012.

CANTOS, E.; ESPÍN, J. C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Postharvest induction modeling method using UV irradiation pulses for obtaining resveratrol-enriched table grapes: a new “functional” fruit? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 5052-5058, 2001.

CASTAGNA, A. et al. Effect of postharvest UV-B irradiation on nutraceutical quality and physical properties of tomato fruits. **Food Chemistry**, v. 137, n. 1, p. 151-158, 2013.

CHARLES, F. et al. Pulsed light treatment as new method to maintain physical and nutritional quality of fresh-cut mangoes. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 18, p. 190-195, 2013.

CHEN, J.; WANG, X. Experimental instruction of plant physiology. **South China University of Technology Press, Guangzhou**, p. 124, 2002.

CHEN, Z.; GALLIE, D. R. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. **The Plant Cell**, v. 16, n. 5, p. 1143-1162, 2004.

CHENG, T.-S. et al. The effect of high-temperature stress on ripening of tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). **Journal of plant physiology**, v. 132, n. 4, p. 459-464, 1988.

CISNEROS-ZEVALLOS, L. The use of controlled postharvest abiotic stresses as a tool for enhancing the nutraceutical content and adding-value of fresh fruits and vegetables. **JOURNAL OF FOOD SCIENCE-CHICAGO-**, v. 68, n. 5, p. 1560-1567, 2003.

COCETTA, G. et al. Ascorbic acid metabolism during bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit development. **Journal of plant physiology**, v. 169, n. 11, p. 1059-1065, 2012.

CONKLIN, P. L. et al. Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 7, p. 4198-4203, 1999.

COUTO, M. A. L.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Quantification of vitamin C and antioxidant capacity of citrus varieties. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 30, p. 15-19, 2010.

D'HALLEWIN, G. et al. Scoparone and scopoletin accumulation and ultraviolet-C induced resistance to postharvest decay in oranges as influenced by harvest date. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 124, n. 6, p. 702-707, 1999.

DA PORTO, C. et al. Antiradical properties of commercial cognacs assessed by the DPPH test. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 9, p. 4241-4245, 2000.

DAVEY, M. W. et al. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 825-860, 2000.

DE ASSIS, S. A. et al. Acerola: importance, culture conditions, production and biochemical aspects. **Fruits**, v. 63, n. 02, p. 93-101, 2008.

DE BRITO, E. S. et al. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 23, p. 9389-9394, 2007.

DE GAULEJAC, N. S. C. et al. The influence of various phenolic compounds on scavenging activity assessed by an enzymatic method. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 8, p. 1081-1090, 1999.

DE PAIVA, J. R. et al. Seleção massal de acerola em plantio comercial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 3, p. 505-511, 1999.

DE ROSSO, V. V. et al. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC–PDA–MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 4, p. 291-299, 2008.

DECKER, E. Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of foods to maximize oxidative stability. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 6, p. 241-248, 1998.

DELVA, L.; GOODRICH, R. Anthocyanin identification, vitamin C content, and antioxidant capacity of acerola (*Malpighia emarginata* DC) juices. Proceedings Florida State Horticulture Society, 2010. p.223-227.

DEMIDCHIK, V. et al. Plant extracellular ATP signalling by plasma membrane NADPH oxidase and Ca²⁺ channels. **Plant J.**, v. 58, n. 6, p. 903-913, 2009.

DIPLOCK, A. et al. Functional food science and defence against reactive oxidative species. **British Journal of Nutrition**, v. 80, n. S1, p. S77-S112, 1998.

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

DOWDLE, J. et al. Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-l-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. **The Plant Journal**, v. 52, n. 4, p. 673-689, 2007.

DUNN, J.; OTT, T.; CLARK, W. Pulsed-light treatment of food and packaging. **Food Technology**, v. 49, n. 9, p. 95-98, 1995.

DUTILLEUL, C. et al. Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. **The Plant Cell**, v. 15, n. 5, p. 1212-1226, 2003.

EDWARDS, K. et al. Rapid transient induction of phenylalanine ammonia-lyase mRNA in elicitor-treated bean cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 20, p. 6731-6735, 1985.

ELTELIB et al. Gene expression of monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase during fruit ripening and in response to environmental stresses in acerola (*Malpighia glabra*). **Journal of plant physiology**, v. 168, n. 6, p. 619-627, 2011.

ELTELIB; FUJIKAWA, Y.; ESAKA, M. Overexpression of the acerola (*Malpighia glabra*) monodehydroascorbate reductase gene in transgenic tobacco plants results in increased ascorbate levels and enhanced tolerance to salt stress. **South African Journal of Botany**, v. 78, p. 295-301, 2012.

ERKAN, M.; WANG, S. Y.; WANG, C. Y. Effect of UV treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity and decay in strawberry fruit. **Postharvest Biol. Tec.**, v. 48, n. 2, p. 163-171, 2008.

ESTRADA, B. et al. Pungency level in fruits of the Padrón pepper with different water supply. **Scientia horticulturae**, v. 81, n. 4, p. 385-396, 1999.

FERRER, J.-L. et al. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 356-370, 2008.

FOTOPOULOS, V. et al. Altered stomatal dynamics in ascorbate oxidase over-expressing tobacco plants suggest a role for dehydroascorbate signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 4, p. 729-737, 2008.

FOYER, C. H.; HALLIWELL, B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta**, v. 133, n. 1, p. 21-25, 1976.

FOYER, C. H. et al. The role of ascorbate in plants, interactions with photosynthesis, and regulatory significance. **Current topics in plant physiology (USA)**, 1991.

FUKUNAGA, K.; FUJIKAWA, Y.; ESAKA, M. Light regulation of ascorbic acid biosynthesis in rice via light responsive cis-elements in genes encoding ascorbic acid biosynthetic enzymes. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 74, n. 4, p. 888-891, 2010.

GAO, C. et al. Implication of reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction in the early stages of plant programmed cell death induced by ultraviolet-C overexposure. **Planta**, v. 227, n. 4, p. 755-767, 2008.

GEMS, D.; PARTRIDGE, L. Stress-response hormesis and aging: "that which does not kill us makes us stronger". **Cell metabolism**, v. 7, n. 3, p. 200-203, 2008.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G. et al. Methyl jasmonate treatments reduce chilling injury and activate the defense response of guava fruits. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 313, n. 3, p. 694-701, 2004.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G.; ZAVALA-GATICA, R.; TIZNADO-HERNÁNDEZ, M. Improving postharvest quality of mango 'Haden' by UV-C treatment. **Postharvest Biol. Tec.**, v. 45, n. 1, p. 108-116, 2007.

GONZALEZ-AGUILAR, G. A. et al. Improvement of the antioxidant status of tropical fruits as a secondary response to some postharvest treatments. **Trends Food Sci. Tech.**, v. 21, n. 10, p. 475-482, 2010a.

_____. Improvement of the antioxidant status of tropical fruits as a secondary response to some postharvest treatments. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 10, p. 475-482, 2010b.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G. et al. Use of UV-C irradiation to prevent decay and maintain postharvest quality of ripe 'Tommy Atkins' mangoes. **International journal of food science & technology**, v. 36, n. 7, p. 767-773, 2001.

GONZALEZ-AGUILAR, G.; WANG, C. Y.; BUTA, G. J. UV-C irradiation reduces breakdown and chilling injury of peaches during cold storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 5, p. 415-422, 2004.

GRACE, S. C.; LOGAN, B. A. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 355, n. 1402, p. 1499-1510, 2000.

HAGEN, S. F. et al. Phenolic contents and other health and sensory related properties of apple fruit (*Malus domestica* Borkh., cv. Aroma): Effect of postharvest UV-B irradiation. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, n. 1, p. 1-10, 2007.

HANAMURA, T.; HAGIWARA, T.; KAWAGISHI, H. Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 69, n. 2, p. 280-286, 2005.

HANCOCK, R. D. et al. L-Ascorbic acid accumulation in fruit of *Ribes nigrum* occurs by in situ biosynthesis via the L-galactose pathway. **Functional Plant Biology**, v. 34, n. 12, p. 1080-1091, 2007.

HANSON, K. R. Phenylalanine ammonia-lyase: mirror-image packing of D- and L-phenylalanine and D- and L-transition state analogs into the active site. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 211, n. 2, p. 575-588, 1981.

HEAZLEWOOD, J. L.; HOWELL, K. A.; MILLAR, A. H. Mitochondrial complex I from *Arabidopsis* and rice: orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits. **Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.**, v. 1604, n. 3, p. 159-169, 2003.

HEREDIA, J. The enhancement of fresh produce antioxidant capacity by wounding stress and phytohormones. **Ph. D. Thesis**, 2006.

HEREDIA, J.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. The effect of exogenous ethylene and methyl jasmonate on pal activity, phenolic profiles and antioxidant capacity of carrots (*Daucus carota*) under different wounding intensities. **Postharvest Biology and Technology**, v. 51, n. 2, p. 242-249, 2009.

HODGES, D. M. **Postharvest oxidative stress in horticultural crops**. Food Products Press, 2003. ISBN 1560229624.

HOWELL, A. et al. Horticultural factors affecting antioxidant capacity of blueberries and other small fruit. **HortTechnology**, v. 11, n. 4, p. 523-528, 2001.

HUANG, R. et al. Antioxidant activity and oxygen-scavenging system in orange pulp during fruit ripening and maturation. **Scientia horticulturae**, v. 113, n. 2, p. 166-172, 2007.

HYODO, H.; KURODA, H.; YANG, S. F. Induction of phenylalanine ammonia-lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet spotting caused by ethylene. **Plant physiology**, v. 62, n. 1, p. 31-35, 1978.

IOANNIDI, E. et al. Expression profiling of ascorbic acid-related genes during tomato fruit development and ripening and in response to stress conditions. **Journal of Experimental Botany**, p. ern322, 2009.

JACOBO-VELÁZQUEZ, D. A. et al. Plants as biofactories: physiological role of reactive oxygen species on the accumulation of phenolic antioxidants in carrot tissue under wounding and hyperoxia stress. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6583-6593, 2011.

JAMBUNATHAN, N. Determination and detection of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and electrolyte leakage in plants. In: (Ed.). **Plant Stress Tolerance**: Springer, 2010. p.291-297. ISBN 1607617013.

JENKINS, G. UV and blue light signal transduction in Arabidopsis. **Plant Cell Environ.**, v. 20, n. 6, p. 773-778, 1997.

JIN, J. et al. Regulation of ascorbate peroxidase at the transcript level is involved in tolerance to postharvest water deficit stress in the cut rose (*Rosa hybrida* L.) cv. Samantha. **Postharvest Biology and Technology**, v. 40, n. 3, p. 236-243, 2006.

KADER, A. A. **Postharvest technology of horticultural crops**. UCANR Publications, 2002. ISBN 1879906511.

KATO, N.; ESAKA, M. Expansion of transgenic tobacco protoplasts expressing pumpkin ascorbate oxidase is more rapid than that of wild-type protoplasts. **Planta**, v. 210, n. 6, p. 1018-1022, 2000.

KAYS, S. J. **Postharvest physiology and handling of perishable plant products**. Van Nostrand Reinhold Inc., 1991. ISBN 0442239122.

KELLER, R.; KOSSMANN, J. Antisense inhibition of the GDP-mannose pyrophosphorylase reduces the ascorbate content in transgenic plants leading to developmental changes during senescence. **The Plant Journal**, v. 19, n. 2, p. 131-141, 1999.

KENRICK, P.; CRANE, P. R. The origin and early evolution of plants on land. **Nature**, v. 389, n. 6646, p. 33-39, 1997.

KIM, J. I. et al. Indole Glucosinolate Biosynthesis Limits Phenylpropanoid Accumulation in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, p. tpc. 15.00127, 2015.

KOVACS, E.; KERESZTES, A. Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. **Micron**, v. 33, n. 2, p. 199-210, 2002.

KOYYALAMUDI, S. R. et al. Concentration of vitamin D 2 in white button mushrooms (*Agaricus bisporus*) exposed to pulsed UV light. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 7, p. 976-979, 2011.

KRISHNAMURTHY, K.; DEMIRCI, A.; IRUDAYARAJ, J. Inactivation of *Staphylococcus aureus* by pulsed UV-light sterilization. **Journal of Food Protection®**, v. 67, n. 5, p. 1027-1030, 2004.

LAWTON, M. A. et al. Rapid Induction of the Synthesis of Phenylalanine Ammonia-Lyase and of Chalcone Synthase in Elicitor-Treated Plant Cells. **European journal of Biochemistry**, v. 129, n. 3, p. 593-601, 1983.

LEE, S. K.; KADER, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, n. 3, p. 207-220, 2000.

LEMOINE, M. L. et al. Influence of postharvest UV-C treatment on refrigerated storage of minimally processed broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 6, p. 1132-1139, 2007.

LI et al. Shading the whole vines during young fruit development decreases ascorbate accumulation in kiwi. **Physiologia Plantarum**, v. 140, n. 3, p. 225-237, 2010.

LI, M. et al. Influence of light on ascorbate formation and metabolism in apple fruits. **Planta**, v. 230, n. 1, p. 39-51, 2009.

LI, Z.; GEMMA, H.; IWAHORI, S. Stimulation of 'Fuji' apple skin color by ethephon and phosphorus-calcium mixed compounds in relation to flavonoid synthesis. **Scientia horticulturae**, v. 94, n. 1, p. 193-199, 2002.

LIANG, X. et al. Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during plant development and by environmental cues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 24, p. 14486-14492, 1989.

LOEWUS, F. A. L-Ascorbic acid: metabolism, biosynthesis, function. **The Biochemistry of plants: a comprehensive treatise (USA)**, 1980.

LOPES, M. M. D. A. et al. Bioactive compounds and total antioxidant capacity of cashew apples (*Anacardium occidentale* L.) during the ripening of early dwarf cashew clones. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 3, p. 325-332, 2012.

LOPES, M. M. D. A. et al. Low Fluence Pulsed Light Enhanced Phytochemical Content and Antioxidant Potential of 'Tommy Atkins' Mango Peel and Pulp. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 2015.

LORENCE, A. et al. myo-Inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. **Plant physiology**, v. 134, n. 3, p. 1200-1205, 2004.

LU, J. et al. THE EFFECT OF ULTRAVIOLET IRRADIATION ON SHELF-LIFE AND RIPENING OF PEACHES AND APPLES. **Journal of Food Quality**, v. 14, n. 4, p. 299-305, 1991.

LUCKEY, T. D. **Hormesis with ionizing radiation**. CRC press Boca Raton, FL, 1980. ISBN 0849358418.

MACDONALD, M. J.; D'CUNHA, G. B. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 85, n. 3, p. 273-282, 2007.

MACHEIX, J.-J.; FLEURIET, A. **Fruit phenolics**. CRC press, 1990. ISBN 0849349680.

MAHARAJ, R.; ARUL, J.; NADEAU, P. Effect of photochemical treatment in the preservation of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Capello) by delaying senescence. **Postharvest Biology and Technology**, v. 15, n. 1, p. 13-23, 1999.

MANZOCCO, L. et al. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 9-10, p. 340-346, 2000.

MARINO, D. et al. A burst of plant NADPH oxidases. **Trends Plant Sci.**, v. 17, n. 1, p. 9-15, 2012.

MASSOT, C. et al. Light affects ascorbate content and ascorbate-related gene expression in tomato leaves more than in fruits. **Planta**, v. 235, n. 1, p. 153-163, 2012.

MAXWELL, D. P.; WANG, Y.; MCINTOSH, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 14, p. 8271-8276, 1999.

MAYER, A. M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. **Phytochemistry**, v. 67, n. 21, p. 2318-2331, 2006.

MEHLHORN, H.; TABNER, B. J.; WELLBURN, A. R. Electron spin resonance evidence for the formation of free radicals in plants exposed to ozone. **Physiologia Plantarum**, v. 79, n. 2, p. 377-383, 1990.

MENEZES, A. et al. Estudo comparativo do pó da acerola verde (*Malpighia emarginata* DC) obtido em estufa por circulação de ar e por liofilização. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 11, p. 1-8, 2009.

MILLAR, A. H. et al. Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. **Plant Physiol.**, v. 133, n. 2, p. 443-447, 2003.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MÜLLER-MOULÉ, P. An expression analysis of the ascorbate biosynthesis enzyme VTC2. **Plant molecular biology**, v. 68, n. 1-2, p. 31-41, 2008.

NASCIMENTO, J. R. O. D. et al. L-Ascorbate biosynthesis in strawberries: L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase expression during fruit development and ripening. **Postharvest Biology and Technology**, v. 38, n. 1, p. 34-42, 2005.

NICOLI, M. C.; ANESE, M.; MANZOCCO, L. Oil stability and antioxidant properties of an oil tomato food system as affected by processing. **Advances in food sciences**, v. 21, n. 1-2, p. 10-14, 1999.

NOCTOR, G.; DE PAEPE, R.; FOYER, C. H. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. **Trends Plant Sci.**, v. 12, n. 3, p. 125-134, 2007.

NOURIAN, F.; RAMASWAMY, H.; KUSHALAPPA, A. Kinetics of quality change associated with potatoes stored at different temperatures. **LWT-Food Sci. Tec.**, v. 36, n. 1, p. 49-65, 2003.

NULTON-PERSSON, A. C.; SZWEDA, L. I. Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 26, p. 23357-23361, 2001.

ÔBA, K. et al. L-Galactono- γ -lactone dehydrogenase: partial characterization, induction of activity and role in the synthesis of ascorbic acid in wounded white potato tuber tissue. **Plant Cwll Physiol.**, v. 35, n. 3, p. 473-478, 1994.

OLIVEIRA, L. D. S. et al. Antioxidant metabolism during fruit development of different acerola (*Malpighia emarginata* DC) clones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 32, p. 7957-7964, 2012.

OMS-OLIU, G.; MARTÍN-BELLOSO, O.; SOLIVA-FORTUNY, R. Pulsed light treatments for food preservation. A review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 1, p. 13-23, 2010.

OSZMIANSKI, J.; RAMOS, T.; BOURZEIX, M. Fractionation of phenolic compounds in red wine. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 39, n. 3, p. 259-262, 1988.

PASTORE, D. et al. Reactive oxygen species inhibit the succinate oxidation-supported generation of membrane potential in wheat mitochondria. **FEBS lett.**, v. 516, n. 1, p. 15-19, 2002.

PASTORE, D. et al. Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress a case study: durum wheat mitochondria. **J. Exp. Bot.**, v. 58, n. 2, p. 195-210, 2007.

PATARO, G. et al. The influence of post-harvest UV-C and pulsed light treatments on quality and antioxidant properties of tomato fruits during storage. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 30, p. 103-111, Aug 2015.

PATARO, G. et al. The influence of post-harvest UV-C and pulsed light treatments on quality and antioxidant properties of tomato fruits during storage. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 30, p. 103-111, 2015.

PATERAKI, I. et al. Molecular characterization and expression studies during melon fruit development and ripening of L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 403, p. 1623-1633, 2004.

PERKINS-VEAZIE, P.; COLLINS, J. K.; HOWARD, L. Blueberry fruit response to postharvest application of ultraviolet radiation. **Postharvest Biol. Tec.**, v. 47, n. 3, p. 280-285, 2008.

POMBO, M. A. et al. UV-C irradiation delays strawberry fruit softening and modifies the expression of genes involved in cell wall degradation. **Postharvest Biology and Technology**, v. 51, n. 2, p. 141-148, 2009.

RAES, J. et al. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 133, n. 3, p. 1051-1071, 2003.

REYES, L. F.; 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, n. 3, p. 1254-1262, 2007.

RIBEIRO, C.; ALVARENGA, N. Prospects of UV radiation for application in postharvest technology. 2012.

RIVERA-PASTRANA, D. M. et al. Effect of UV-C irradiation and low temperature storage on bioactive compounds, antioxidant enzymes and radical scavenging activity of papaya fruit. **J. Food Sci. Tech.**, p. 1-9, 2013.

RODOV, V.; VINOKUR, Y.; HOREV, B. Brief postharvest exposure to pulsed light stimulates coloration and anthocyanin accumulation in fig fruit (*Ficus carica* L.). **Postharvest Biology and Technology**, v. 68, p. 43-46, 2012.

SAGI, M.; FLUHR, R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. **Plant Physiol.**, v. 141, n. 2, p. 336-340, 2006a.

_____. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. **Plant physiology**, v. 141, n. 2, p. 336-340, 2006b.

SAIRAM, R.; SRIVASTAVA, G.; SAXENA, D. Increased antioxidant activity under elevated temperatures: a mechanism of heat stress tolerance in wheat genotypes. **Biologia Plantarum**, v. 43, n. 2, p. 245-251, 2000.

SALA, J. M.; LAFUENTE, M. A. T. Antioxidant enzymes activities and rindstaining in 'Navelina' oranges as affected by storage relative humidity and ethylene conditioning. **Postharvest Biology and Technology**, v. 31, n. 3, p. 277-285, 2004.

SALTVEIT, M. E. Physical and physiological changes in minimally processed fruits and vegetables. **PROCEEDINGS-PHYTOCHEMICAL SOCIETY OF EUROPE**, 1996. Oxford University Press Inc. p.205-220.

SÁNCHEZ-RANGEL, J. C. et al. The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. **Anal. Methods**, v. 5, n. 21, p. 5990-5999, 2013.

SHEN, Y. et al. Effect of UV-C treatments on phenolic compounds and antioxidant capacity of minimally processed Satsuma mandarin during refrigerated storage. **Postharvest Biol. Tec.**, v. 76, p. 50-57, 2013.

SILVA, D. S. D. et al. Stability of bioactive compounds of unsweetened tropical guava juice obtained by hot fill and aseptic processes. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 30, n. 1, p. 237-243, 2010.

SIMAO, S. **Manual de fruticultura**. 1971

SIMAO, S. **Manual de fruticultura**. Editora Agronômica 'CERES', 1971.

SMIRNOFF, N. L-ascorbic acid biosynthesis. **Vitamins & Hormones**, v. 61, p. 241-266, 2001.

SMIRNOFF, N.; RUNNING, J. A.; GATZEK, S. Ascorbate biosynthesis: a diversity of pathways. **Vitamin C: its Functions and Biochemistry in Animals and Plants**, p. 7-29, 2004.

SOJO, M. M. et al. Monophenolase activity of latent banana pulp polyphenol oxidase. **J. Agri. Food Chem.**, v. 46, n. 12, p. 4931-4936, 1998.

SOUZA, K. O. D. et al. Antioxidant compounds and total antioxidant activity in fruits of acerola from cv. Flor Branca, Florida Sweet and BRS 366. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 2, p. 294-304, 2014.

STONE, I. Fifty years of research on ascorbate and the genetics of scurvy. **J Orthomol Psychiat**, v. 13, n. 4, p. 280, 1984.

SURJADINATA, B. Wounding and ultraviolet radiation stresses affect the phenolic profile and antioxidant capacity of carrot tissue. **Ph. D. Thesis**, 2006.

SURJADINATA, B.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Biosynthesis of phenolic antioxidants in carrot tissue increases with wounding intensity. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 615-624, 2012.

SWAIN, T.; HILLIS, W. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 63-68, 1959.

SWEETLOVE, L. et al. The impact of oxidative stress on *Arabidopsis* mitochondria. **The Plant Journal**, v. 32, n. 6, p. 891-904, 2002.

SZYBALSKI, W. Genetic engineering in agriculture. **Science**, v. 229, n. 4709, p. 112-113, 1985.

TABATA, K. et al. Generation and properties of ascorbic acid-deficient transgenic tobacco cells expressing antisense RNA for L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase. **The Plant Journal**, v. 27, n. 2, p. 139-148, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª 2013.

TOLBERT, N. Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts. **Plant physiology**, v. 51, n. 2, p. 234-244, 1973.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ESPIN, J. C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. **J. Sci. Food Agri.**, v. 81, n. 9, p. 853-876, 2001.

TORRES-CONTRERAS, A. M. et al. Plants as biofactories: Stress-induced production of chlorogenic acid isomers in potato tubers as affected by wounding intensity and storage time. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 61-66, 2014.

TUDELA, J. A. et al. L-galactono- γ -lactone dehydrogenase activity and vitamin C content in fresh-cut potatoes stored under controlled atmospheres. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 15, p. 4296-4302, 2003.

WANG; CHEN, C.-T.; WANG, S. Y. Changes of flavonoid content and antioxidant capacity in blueberries after illumination with UV-C. **Food Chemistry**, v. 117, n. 3, p. 426-431, 2009.

WANG; FREI, M. Stressed food—The impact of abiotic environmental stresses on crop quality. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 141, n. 3, p. 271-286, 2011.

WANG; 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, n. 3, p. 1612-1619, 2001.

WHEELER, G. L.; JONES, M. A.; SMIRNOFF, N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. **Nature**, v. 393, n. 6683, p. 365-369, 1998.

YABUTA, Y. et al. Light regulation of ascorbate biosynthesis is dependent on the photosynthetic electron transport chain but independent of sugars in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 10, p. 2661-2671, 2007.

YANG, Z. et al. Respiratory activity and mitochondrial membrane associated with fruit senescence in postharvest peaches in response to UV-C treatment. **Food Chem.**, v. 161, p. 16-21, 2014.

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, n. 1, p. 176-181, 2008.

YORUK, R.; MARSHALL, M. R. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 27, n. 5, p. 361-422, Nov 2003.

ZHENG, Y. et al. Effect of high-oxygen atmospheres on blueberry phenolics, anthocyanins, and antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 24, p. 7162-7169, 2003.

ZIMMERMANN, P.; ZENTGRAF, U. The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 10, n. 3, p. 515, 2005.

ZSIGMOND, L. et al. Enhanced activity of galactono-1, 4-lactone dehydrogenase and ascorbate–glutathione cycle in mitochondria from Complex III deficient Arabidopsis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 809-815, 2011.