**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Pós-colheita e potencial antioxidante de alfaces ‘Piraroxa’ e ‘Vanda’

Silce Adeline Danelon Guassi

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2012**

Silce Adeline Danelon Guassi
Bacharel em Ciências dos Alimentos

Pós-colheita e potencial antioxidante de alfaces ‘Piraroxa’ e ‘Vanda’

Orientador:
Prof. Dr. **RICARDO ALFREDO KLUGE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Guassi, Silce Adeline Danelon
Pós-colheita e potencial antioxidante de alfaces 'Piraroxa' e 'Vanda' / Silce Adeline
Danelon Guassi.- - Piracicaba, 2012.
82 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Alface 2. Antioxidantes 3. Compostos fenólicos 4. Conservação de alimentos pelo
frio 5. Pigmentos vegetais 6. Pós-colheita I. Título

CDD 635.52
G917p

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

AGRADECIMENTOS

À minha família, sempre presente em todos os momentos e base de todas as minhas conquistas e, em especial, aos meus pais e irmãos, pelo apoio incondicional e incentivo constante, por serem modelos de admiração como pessoas e profissionais e pela dedicação que me motiva a continuar crescendo;

Ao Prof. Dr. Ricardo Alfredo Kluge, pela orientação, amizade, confiança e apoio, por todas as oportunidades de aprendizado durante os últimos sete anos, pelo incentivo constante e por ter sido, em todos os momentos, não somente um orientador, mas um parceiro;

Ao Prof. Dr. Severino Matias de Alencar e à técnica Adna Prado, pela disponibilidade da infraestrutura para a realização de parte das análises bioquímicas e pela solicitude, apoio e compreensão;

Ao Prof. Dr. Angelo Pedro Jacomino e ao técnico Marcos José Trevisan pela disponibilidade da infraestrutura para a realização dos experimentos e pelo auxílio na condução dos mesmos;

A todos os pós-graduandos e ex-pós-graduandos do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Pós-Colheita (ESALQ/USP) e em especial aos meus queridos amigos Carol, Daniela, Fabiana, Juan, Ivan e Maria Luiza, a quem devo a quase totalidade da minha bagagem científica, experiência prática e prazer pela pesquisa;

Às queridas companheiras de mestrado Gabriela, Jaqueline e Natália, que vivenciaram comigo essa trajetória, sempre presentes nesse processo de construção;

A todos os estagiários e ex-estagiários da família pós-colheita e em especial aos queridos Adriano, Lígia, Liliane, Mayla e Marcos, cuja parceria foi fundamental para a realização deste projeto;

Aos queridos amigos Daniele, Diego e Felipe, parceiros eternos;

À Aline Peregrina Puga, amiga e parceira de todas as horas;

Aos funcionários do Departamento de Ciências Biológicas, em especial à Cidinha, Cristina, Fábio, Lígia e Márcia;

Aos funcionários do Departamento de Agroindústrias, Alimentos e Nutrição, em especial ao Fábio, profissional dedicado e exemplar;

Às bibliotecárias e a todos os funcionários das bibliotecas do campus “Luiz de Queiroz”, pela atenção, solicitude e presteza;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo;

A todos os que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste projeto.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	11
LISTA DE SÍMBOLOS.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Generalidades sobre a cultura.....	17
2.2 Armazenamento refrigerado.....	19
2.3 Polifenoloxidase.....	20
2.4 Potencial antioxidante.....	21
2.4.1 Compostos fenólicos.....	22
2.4.2 Pigmentos.....	23
2.4.3 Métodos analíticos utilizados para a avaliação do potencial antioxidante.....	25
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Colheita das hortaliças e preparo das amostras.....	29
4.2 Condução dos experimentos.....	29
4.3 Delineamento experimental e análise dos resultados.....	30
4.4 Determinações.....	30
4.4.1 Produção de etileno.....	30
4.4.2 Taxa respiratória.....	30
4.4.3 Coloração das folhas.....	31
4.4.4 Perda de massa fresca.....	31
4.4.5 Clorofila e carotenoides.....	31
4.4.6 Antocianinas.....	31
4.4.7 Aparência.....	32
4.4.8 Atividade da polifenoloxidase.....	32
4.4.9 Potencial antioxidante.....	32
4.4.9.1 Compostos fenólicos.....	33
4.4.9.2 Atividade sequestrante do radical livre DPPH.....	33

4.4.9.3 Auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 Produção de etileno.....	35
5.2 Taxa respiratória.....	37
5.3 Coloração das folhas.....	39
5.4 Perda de massa fresca.....	45
5.5 Clorofila e carotenoides.....	47
5.6 Antocianinas.....	53
5.7 Aparência.....	55
5.8 Atividade específica da enzima PPO.....	61
5.9 Potencial antioxidante.....	63
5.9.1 Compostos fenólicos.....	65
5.9.2 Atividade sequestrante do radical livre DPPH.....	68
5.9.3 Auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	72
6 CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS.....	77

RESUMO

Pós-colheita e potencial antioxidante de alfaces ‘Piraroxa’ e ‘Vanda’

‘Piraroxa’ e ‘Vanda’ são cultivares de alface cujos comportamentos pós-colheita ainda não foram caracterizados. Um dos diferenciais destas cultivares pode estar relacionado ao seu alto potencial antioxidante como resultado da ação de seus compostos fenólicos. A fim de avaliar os parâmetros pós-colheita e a viabilidade do uso destas cultivares como fontes de antioxidantes, o presente trabalho teve como objetivo investigar suas respostas fisiológicas e bioquímicas, comparando-as entre si em diferentes temperaturas de armazenamento e em épocas de colheita distintas. Tanto no verão quanto no inverno, as hortaliças foram armazenadas por 28 dias à 0°C e 95-97%UR e por quatro dias em condição ambiente monitorada. Em todas as condições de armazenamento e períodos de colheita, não houve diferença entre as cultivares e tendências decrescentes foram observadas para a produção de etileno e as taxas respiratórias. O armazenamento refrigerado proporcionou acentuado declínio destas variáveis. Já em condição ambiente, na colheita de verão, a cv. Vanda apresentou produção superior de etileno e, na colheita de inverno, a cv. Piraroxa apresentou taxas respiratórias mais elevadas. Os parâmetros de coloração permaneceram constantes. As cultivares apresentaram tendências similares entre si, tanto para a perda de massa fresca quanto para o conteúdo de clorofila e carotenoides, e o armazenamento refrigerado e as altas umidades relativas mostraram-se eficazes para o controle da perda de massa. O conteúdo de antocianinas foi influenciado pela temperatura de armazenamento, mas não pela época de colheita, e não demonstrou estar diretamente relacionado ao potencial antioxidante da cv. Piraroxa. As características de qualidade representadas pela aparência das hortaliças foram preservadas, em armazenamento refrigerado, até o 28º dia e, em condição ambiente, até o primeiro e segundo dias. A atividade da polifenoloxidase (PPO) e o potencial antioxidante das hortaliças foram influenciados pela época de colheita, mas não pela temperatura de armazenamento. A cv. Vanda apresentou atividade da PPO superior na colheita de verão e a cv. Piraroxa apresentou potencial antioxidante superior em todas as condições de armazenamento e épocas de colheita. O teor de compostos fenólicos e a atividade sequestrante do radical livre DPPH apresentaram valores superiores na colheita de verão para ambas as cultivares, com tendências à constância de valores, enquanto o sistema-modelo β -caroteno/ácido linoleico demonstrou tendências crescentes, com elevações significativas a partir do segundo dia de armazenamento em condição ambiente e a partir do 21º dia de armazenamento refrigerado. Os parâmetros fisiológicos analisados evidenciaram grande similaridade em relação ao comportamento pós-colheita das duas cultivares e a durabilidade e manutenção das características qualitativas das hortaliças durante o armazenamento refrigerado foi extremamente satisfatória. Em contrapartida, o armazenamento, tanto em condição ambiente monitorada quanto em refrigeração, não demonstrou constituir-se como técnica válida para a maximização do potencial antioxidante das hortaliças, embora a alface constitua fonte dietética importante de antioxidantes.

Palavras-chave: *Lactuca sativa* L.; Antocianinas; Compostos fenólicos; Armazenamento refrigerado

ABSTRACT

Postharvest and antioxidant potential of ‘Piraroxa’ and ‘Vanda’ lettuce

‘Piraroxa’ and ‘Vanda’ are lettuce cultivars whose postharvest behavior has not yet been characterized. One of the differentials of these cultivars may be related to its high antioxidant potential as a result of its phenolic compounds action. In order to evaluate the postharvest parameters and feasibility of using these cultivars as sources of antioxidants, this study aimed to investigate their physiological and biochemical responses, comparing them to each other at different storage temperatures and at different harvest times. Vegetables were stored for 28 days at 0°C and 95-97%RH and for four days at ambient monitored condition regardless of summer or winter seasons. In all storage conditions and harvest periods there was no difference between cultivars and decreasing trends were observed for ethylene production and respiratory rates. Cold storage provided dramatic decline of these variables. At ambient condition, however, cv. Vanda showed higher production of ethylene in the summer harvest and cv. Piraroxa had higher respiratory rates in the winter harvest. Color parameters remained constant. Cultivars showed similar trends among one another for both weight loss and the content of chlorophyll and carotenoids. Also, cold storage and high relative humidity were effective for the control of weight loss. Anthocyanins content was influenced by storage temperature, not by the harvest season, and did not show to be directly related to the antioxidant potential of cv. Piraroxa. Vegetables quality appeared to be preserved on cold storage until day 28, and at ambient condition until the first and second days. Polyphenol oxidase (PPO) activity and antioxidant potential of vegetables were influenced by harvest time, but not by the storage temperature. ‘Vanda’ showed higher PPO activity in the summer harvest and ‘Piraroxa’ showed higher antioxidant potential in all storage conditions and harvest times. Phenolic content and free radical scavenging activity of DPPH showed higher values in summer harvest for both cultivars, with constant value tendencies, while the model system β -carotene/linoleic acid showed increasing trends, with significant increases in the second day of storage at ambient condition and after 21 days of refrigerated storage. The physiological parameters analyzed showed great similarity to postharvest behavior of the two cultivars, and the durability and maintenance of vegetables quality during refrigerated storage were extremely satisfactory. In contrast, both ambient and refrigerated monitored storages did not show as valid techniques for maximizing the antioxidant potential of vegetables, although lettuce constitutes an important source of dietary antioxidants.

Keywords: *Lactuca sativa* L.; Anthocyanins; Phenolic compounds; Cold storage

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade Antioxidante
AC	Antocianinas
BCAL	β -Caroteno/Ácido Linoleico
BHT	Hidroxitolueno Butilado
BU	Base Úmida
CF	Compostos Fenólicos
DPPH	Radical 2,2'-Difenil-1-Picrilhidrazil
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EAG	Equivalentes ao Ácido Gálico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LMV	Lettuce Mosaic Virus
PA	Potencial Antioxidante
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPO	Polifenoloxidase
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
UA	Unidade de Atividade

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
%UR	porcentagem de umidade relativa
α	alfa
β	beta
γ	gama
$\mu\text{g g}^{-1}$	micrograma por grama
μL	microlitro
μmol	micromol
a^*	parâmetro de coloração expresso do verde (-) para o vermelho (+)
b^*	parâmetro de coloração expresso do azul (-) para o amarelo (+)
C_2H_4	etileno
CO_2	gás carbônico
Fe^{2+}	ferro bivalente ou íon ferro em sua forma ferrosa
g	grama
h^{-1}	por hora
ha^{-1}	por hectare
HCl	ácido clorídrico
Hue	ângulo de coloração que expressa a relação entre os parâmetros a^* e b^*
Kg^{-1}	por kilo
KJ g^{-1}	kilojoule por grama
M	molar
mg g^{-1}	miligrama por grama
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
N	normal
nm	nanômetros
ppm	partes por milhão
rpm	rotações por minuto
L	luminosidade (expressa do preto (0) para o branco (100))
v/v	volume/volume
xg	unidade de força centrífuga

1 INTRODUÇÃO

A caracterização do comportamento pós-colheita de novas cultivares é fundamental para a identificação de etapas ou processos metabólicos passíveis de manipulação para a promoção da qualidade, a redução de perdas e o aumento da vida útil de hortaliças. Além disso, possibilita a obtenção de informações que podem ser utilizadas como ferramentas básicas para o desenvolvimento de tecnologias ou adoção de tratamentos que visem a maximizar tais benefícios. Assim, ampliar os recursos disponíveis para estes fins pode evitar o dispêndio de incrementos na produção e proporcionar maior sintonia entre os agentes da cadeia produtiva.

Concomitantemente, a comparação do comportamento pós-colheita de cultivares novas com outras já existentes pode proporcionar o desenvolvimento de adaptações alternativas ou tecnologias específicas para a preservação de características desejáveis, já que as análises comparativas podem constituir-se como avaliações adicionais para que o alcance destes objetivos possa tornar-se mais claro e coerente.

Estudos epidemiológicos têm evidenciado os efeitos benéficos de uma dieta à base de frutas e hortaliças e tais efeitos têm sido atribuídos, pelo menos em partes, à ação de metabólitos secundários que já demonstraram reduzir o risco de diversas doenças cardiovasculares, câncer e aterosclerose, além de doenças relacionadas à idade, como as neurodegenerativas. Estes fitoquímicos podem proporcionar benefícios por meio de sua ação antioxidante ou por meio de outros mecanismos, que incluem a expressão de determinados genes ou processos de sinalização celular. Independentemente das vias, contudo, compostos fenólicos (CF) e diversas outras substâncias contidas em fontes vegetais têm enorme potencial para proporcionar melhorias à saúde da população (GARCÍA-MACÍAS et al., 2007).

Pesquisas com diversas hortaliças demonstraram que a alface crespa apresentou o maior teor de CF e a maior atividade antioxidante (AA) (TIVERON, 2010; MELO et al., 2006). Neste sentido, o consumo regular de alface já foi indicado para a prevenção de doenças cardiovasculares por seu efeito benéfico sobre o metabolismo de lipídeos e a oxidação de tecidos (NICOLLE et al., 2004), para a redução de danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio (LEE et al., 2009) e tem sido incentivado por seus benefícios por diversos autores (MELO et al., 2006; HEDGES; LISTER, 2005).

Desse modo, as altas taxas mundiais de seu consumo per capita associadas à alta AA específica de seus CF sugerem que esta hortaliça pode constituir-se como uma importante fonte de antioxidantes na dieta cotidiana da população (LIU et al., 2007; CALDWELL, 2003).

Por isso, este trabalho teve como objetivo investigar as respostas fisiológicas e bioquímicas relacionadas à caracterização do comportamento pós-colheita das cultivares Piraroxa e Vanda, bem como ao potencial destas como fonte de antioxidantes na dieta.

A comparação de uma nova cultivar com outra, já consagrada, possibilitou, ainda, a determinação de parâmetros qualitativos que possam indicar a necessidade de manutenção ou incremento de características desejáveis.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Generalidades sobre a cultura

A alface pertence à família Asteraceae e à subfamília Cichoriaceae. É uma planta herbácea, com caule diminuto e não ramificado ao qual se prendem as folhas. Estas são relativamente grandes, podendo ser lisas ou crespas, fechando-se ou não em uma cabeça. As raízes são do tipo pivotante, apresentando ramificações curtas e finas, podendo atingir aproximadamente 0,6 metros de profundidade quando cultivadas em solo. A coloração das folhas é variada, podendo apresentar-se esverdeadas, amareladas, verde escuras, avermelhadas, arroxeadas ou totalmente roxas. Desenvolve-se melhor sob temperaturas amenas, florescendo a partir do pendoamento sob dias longos e temperaturas elevadas (FILGUEIRA, 2008).

É a hortaliça folhosa de maior importância no Brasil, sendo cultivada em todo o território nacional e compondo uma parcela significativa dos vegetais que integram a dieta diária da população, tanto por seu sabor e qualidade nutritiva quanto por seu baixo custo. Normalmente, é produzida em cinturões verdes próximos aos grandes centros consumidores devido à sua rápida perecibilidade no período pós-colheita oriunda de seu alto teor de água e grande área foliar. É a mais consumida domesticamente e a mais comercializada, sendo também a mais cultivada em decorrência de seu manejo fácil, ciclo rápido (de 45 a 60 dias), alta produtividade e retorno rápido do capital investido (BORCIONI, 2008).

É fonte de fitonutrientes, como vitaminas A, B1, B2, C e E, carotenoides e sais minerais, tais como cálcio e ferro (KIM et al., 2007) conforme Tabela 1. Em geral, é consumida *in natura*, o que vai de encontro a uma das principais tendências de consumo atuais, relacionada à aquisição de hábitos saudáveis que proporcionem maior qualidade de vida.

Tabela 1 - Características nutricionais de alface verde (em peso seco)

Energia (KJ g ⁻¹)	9,40
Fibras (mg g ⁻¹)	260
Vitamina C (µg g ⁻¹)	840 ± 11
Vitamina E (µg g ⁻¹)	577 ± 14
Luteína (µg g ⁻¹)	176 ± 13
Xantofilas não identificadas equivalentes à luteína (µg g ⁻¹)	114 ± 8
β-caroteno (µg g ⁻¹)	66 ± 2,3
Compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico (mg g ⁻¹)	28,5 ± 1,1

Fonte: Nicolle et al. (2004)

Sua produtividade normal pode alcançar de 80.000 a 120.000 plantas ha⁻¹ em campo (TRANI et al., 2005), sendo que a maior produção ocorre entre os meses de abril e dezembro. Entre os meses de janeiro e março, devido à incidência de chuvas, principalmente, há redução na oferta e consequente aumento de preço do produto (MORETTI; MATTOS, 2006).

Dentre as folhosas comercializadas pela Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), alface, repolho e couve correspondem a quase 80% do volume total, do qual, no quinquênio 2007-2011, a alface teve uma participação de 82%. Além disso, das 28.815 toneladas de alface comercializadas em 2011, mais de 79% eram de alface crespa (FNP, 2012a, 2012b; ROCHA, 2010).

No mercado nacional, a preferência pela alface crespa é um fato único na alfavicultura mundial (TRANI et al., 2005). Dentre as cultivares verdes do tipo crespa, a ‘Vanda’ é, no Brasil e mais especificamente no estado de São Paulo, a mais consagrada. De acordo com os produtores da região, é uma cultivar vigorosa e resistente, que proporciona facilidade de cultivo e transporte, com ótimo padrão comercial e retorno financeiro.

Embora as cultivares de coloração avermelhada ou arroxeadas correspondam a menos de 5% do mercado de alfaces, para os produtores e consumidores é fundamental que a oferta de produtos hortícolas seja constante durante o ano todo. Neste caso, além de proporcionar redução da sazonalidade, a ‘Piraroxa’ é menos suscetível a doenças típicas da cultura e possui maior valor agregado. Além disso, o uso de alfaces de coloração vermelha e arroxeadas na composição de saladas pode constituir-se como um diferencial para o aumento de sua atratividade e o estímulo de seu consumo por crianças. Nos EUA, as variedades vermelhas já são consideradas especialidades no segmento de folhosas e o aumento do consumo de saladas prontas tem aumentado sua demanda nas grandes redes de fornecedores de alimentos prontos (SALA; COSTA, 2005).

A ‘Piraroxa’ foi desenvolvida entre os anos de 2001 e 2004 via melhoramento genético (método genealógico) e apresenta plantas grandes e vigorosas, folhas crespas semieretas, coloração vermelha intensa e brilhante e pendoamento mais lento em relação a outras variedades, o que pode permitir a ampliação do período de colheita. É resistente à *Bremia lactucae*, *Thielaviopsis basicola* e LMV patótipo II, além de constituir-se como a primeira cultivar tropicalizada para o segmento de alface vermelha no Brasil, sendo recomendada para o cultivo anual, tanto em condições de temperatura amena quanto em temperaturas mais elevadas (SALA; COSTA, 2005).

2.2 Armazenamento refrigerado

No Brasil, a maior parte das hortaliças ainda é comercializada em pequenos varejos, como feiras, quitandas, mercadinhos e sacolões locais, além de supermercados, atacadistas e intermediários, dos quais poucos possuem estruturas refrigeradas adequadas (SATO et al., 2008; MACHADO; SILVA, 2004).

Contudo, não somente o tempo de prateleira de muitos vegetais pode ser estendido pelo uso de baixas temperaturas, mas principalmente sua qualidade pode ser preservada pelo uso do frio. Neste sentido, o armazenamento refrigerado tem sido a principal técnica utilizada para preservar a qualidade dos alimentos.

A manutenção da umidade relativa no interior das câmaras frias também é fundamental, já que, no caso de hortaliças folhosas, a colheita interrompe o suprimento de água para o vegetal e a perda de água por transpiração pode determinar perdas quantitativas e qualitativas, acelerando a deterioração pelo aumento da taxa de algumas reações de origem predominantemente catabólica (FINGER; VIEIRA, 1997).

Neste caso, o déficit de pressão de vapor é altamente dependente da temperatura e da umidade relativa do ar, fator determinante para seu papel no resfriamento de produtos perecíveis frescos, já que, como força condutora no processo de evaporação, determina em grande extensão a perda de massa do produto. Assim, a redução da temperatura e a manutenção da umidade relativa aumentam a conservação pós-colheita de folhosas porque diminuem a diferença de pressão de vapor entre a planta e o meio, reduzindo a perda de água, o déficit hídrico e a ação de enzimas catalíticas (CHITARRA; CHITARRA, 2006, 2005).

Por isso, os efeitos do armazenamento refrigerado têm sido largamente avaliados em folhosas, de maneira que diversos atributos físicos e químicos têm sido utilizados como indicadores de qualidade (AGÜERO et al., 2008).

Assim, estudos fisiológicos, principalmente relativos à atividade respiratória e à evolução da produção de etileno por vegetais armazenados em baixas temperaturas, são fundamentais, já que, após a colheita, a respiração torna-se o principal processo fisiológico a ser controlado pela refrigeração e o estudo do metabolismo dos vegetais pode, portanto, elucidar uma série de problemas tecnológicos relacionados com a obtenção de produtos de qualidade (KADER, 2002).

2.3 Polifenoloxidase

A alface é altamente suscetível ao escurecimento enzimático, fenômeno responsável por perdas nutricionais, funcionais e organolépticas que incluem desde o escurecimento dos tecidos vegetais até o desenvolvimento de sabores e odores indesejáveis.

A enzima polifenoloxidase (*PPO*, *EC 1.10.3.1*) participa das principais reações relacionadas com o escurecimento enzimático incluindo, principalmente, a oxidação de CF na presença de oxigênio. Ela catalisa duas reações: a orto-hidroxilação de monofenóis a orto-difenóis e a oxidação destes em orto-quinonas, que sofrem subsequentes reações até a formação de pigmentos escuros (MURATA et al., 2004; KRAVAYAN; AYDEMIR, 2001).

Contudo, ao contrário das frutas, que possuem grande quantidade de polifenóis, hortaliças como a alface não contêm polifenóis suficientes para provocar o aparecimento de sintomas de escurecimento enzimático rapidamente. Por isso, o tempo que estas hortaliças levam para manifestar tais sintomas é atribuído à síntese *de novo* de polifenóis, de maneira que a biossíntese de polifenóis pode ser considerada como um fator limitante para o escurecimento enzimático nestes vegetais (MURATA et al., 2004). Portanto, alguns inibidores do escurecimento enzimático também podem atuar como antioxidantes (ALTUNKAYA; GÖKMEN, 2008; CALDWELL, 2003).

Em alfaces, a aplicação de cisteína apresentou grande potencial inibidor da atividade da PPO ao mesmo tempo em que contribuiu significativamente para o aumento da AA das hortaliças (ALTUNKAYA; GÖKMEN, 2008). Concomitantemente, em alfaces 'Lollo Rosso', a avaliação do efeito das condições de extração de antioxidantes sobre a capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC) das amostras demonstrou que o uso de ácido fórmico inibiu a atividade da PPO ao mesmo tempo em que possibilitou a obtenção de maiores valores para o potencial antioxidante (PA) das mesmas (CALDWELL, 2003).

Desse modo, identificar etapas ou processos metabólicos passíveis de manipulação em relação ao conteúdo antioxidante de hortaliças pode implicar também em aumento da vida útil e prevenção de perdas sensoriais e nutricionais resultantes do escurecimento enzimático.

Assim, o uso de tecnologias pós-colheita visando à inibição da PPO, ao acúmulo de CF e, ou, ao aumento de sua estabilidade, poderia constituir uma ferramenta importante para a modificação do PA de vegetais.

2.4 Potencial antioxidante

Radicais livres são moléculas extremamente reativas porque possuem um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada orbital. Desse modo, são chamados antioxidantes primários todas as substâncias capazes de inibir ou impedir reações de oxidação por meio da acepção ou inativação de radicais livres, de maneira a interromper a cadeia de reações oxidativas pela doação de elétrons ou de íons de hidrogênio de grupos hidroxila fenólicos. Já os antioxidantes secundários possuem efeito sinérgico, já que são capazes de reduzir a velocidade das reações de oxidação, mas não de converter radicais livres em compostos estáveis (REGITANO D'ARCE, 2006).

A autooxidação é um processo lento que se procede via reações em cadeia que incluem processos de indução, propagação e terminação. Durante a indução, radicais alquil são formados e, na fase de propagação, reagem com moléculas de oxigênio formando radicais peróxidos e hidroperóxidos. A terminação procede, então, por meio da associação de dois radicais, formando um produto estável (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995).

Neste caso, um antioxidante pode ligar-se competitivamente ao oxigênio, retardar a etapa de iniciação, interromper a etapa de propagação pela destruição ou pela ligação dos radicais livres, inibir catalisadores ou estabilizar hidroperóxidos (REGITANO D'ARCE, 2006).

Uma reação de oxidação pode ser afetada por diversos fatores e, dentre eles, o primordial é a presença de oxigênio (REGITANO D'ARCE, 2006). Dessa forma, o organismo humano produz radicais livres constantemente a partir de processos metabólicos normais, principalmente por meio da respiração.

Já o estresse oxidativo está associado ao desequilíbrio da produção de radicais livres e, portanto, ao aumento da suscetibilidade a desordens humanas crônico-degenerativas (PHILPOTT; LIM; FERGUSON, 2009). Suas consequências podem incluir danos a proteínas e ao ácido desoxirribonucléico (DNA), oxidação de lipídios presentes nas membranas celulares, inativação enzimática e mutações genéticas, com consequente aumento dos riscos de ocorrência de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, envelhecimento precoce, processos inflamatórios, mutagênese e angiogênese (LEE et al., 2009; HODGSON; CROFT, 2006; MOON; WANG; MORRIS, 2006; NIJVELDT et al., 2001).

Neste caso, os antioxidantes podem atuar tanto na prevenção da formação de radicais livres e mutações quanto na neutralização de sua ação, na reparação de danos oxidativos e na eliminação de moléculas danificadas (NIJVELDT et al., 2001).

Em ratos, por exemplo, o consumo de uma dieta rica em gorduras e colesterol suplementada com folhas de alface vermelha por quatro semanas mostrou decréscimos significativos dos níveis totais de colesterol LDL e os índices de aterosclerose foram 46% inferiores em relação aos ratos do grupo controle. Além disso, os índices de peroxidação lipídica também foram significativamente reduzidos, bem como foram incrementados o conteúdo de antioxidantes séricos e enzimas antioxidativas, contribuindo para a redução dos riscos de doenças cardiovasculares (LEE et al., 2009).

Resultados similares foram demonstrados por Nicolle et al. (2004) indicando, ainda, aumento dos níveis plasmáticos de ácido ascórbico e α -tocoferol, efeito que pode ser atribuídos tanto à presença de quantidades significativas de fibras e moléculas antioxidantes quanto ao efeito sinérgico de ambas.

2.4.1 Compostos fenólicos

CF são substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila. Englobam uma enorme gama de substâncias que, por sua constituição química, possuem propriedades antioxidantes. Dentre estes compostos estão os flavonoides, largamente distribuídos na natureza, bastante diversificados e que consistem de dois anéis aromáticos interligados por três carbonos que geralmente formam uma estrutura heterocíclica oxigenada (SOARES, 2002; BRAVO, 1998). Podem ser encontrados na forma de ésteres, glicosídeos ou ligados a proteínas e outros polímeros nas paredes celulares (CHITARRA; CHITARRA, 2006).

Nas plantas, tais compostos fitobioativos desempenham importantes papéis fisiológicos como metabólitos secundários (KIM et al., 2007) essenciais para a pigmentação (e, conseqüentemente, para a atração de agentes polinizadores), crescimento, reprodução e resistência a patógenos.

Dentre os flavonoides presentes nos vegetais, a quercetina é o mais encontrado, sempre em formas glicosiladas (ARABBI; GENOVESE; LAJOLO, 2004) e embora alguns vegetais contenham altos níveis de flavonoides, a maior parte da AA em alfaces pode ser atribuída especificamente à presença de CF como os ésteres mono e dicafeicos, além dos ácidos tartárico e quínico (ALTUNKAYA; GÖKMEN, 2008; CALDWELL, 2003).

Esta correlação entre o conteúdo de CF e o PA de amostras vegetais tem sido demonstrada por diversos autores em diferentes frutas e hortaliças e a partir de diversas metodologias (ALTUNKAYA; GÖKMEN, 2008; GARCÍA-MACÍAS et al., 2007; HEIMLER et al., 2007; MELO et al., 2006; ABDILLE et al., 2005; CALDWELL, 2003).

Neste sentido, níveis significativos de substâncias antioxidantes e CF têm sido detectados em alfaces, tanto hidrossolúveis (como AC e vitamina C) quanto lipossolúveis (como luteínas e tocoferol) (ALTUNKAYA; GÖKMEN, 2008; NICOLLE et al., 2004).

O ácido cafeico e seus derivados são os principais CF encontrado em alfaces verdes, enquanto flavonoides em geral já foram identificados em grandes quantidades em alfaces vermelhas (LLORACH et al., 2008) e, neste caso, as últimas podem conter teores de CF superiores às cultivares verdes em até quatro vezes (HASSIMOTTO; GENOVESE; LAJOLO, 2005).

Dentre as cianidinas, grupo preponderante de flavonoides em alfaces vermelhas, a quercetina é a principal (ARABBI; GENOVESE; LAJOLO, 2004) e possui PA (mensurado pela atividade quelante de íons Fe^{2+}) significativamente superior ao ácido cafeico, flavonoide com o maior poder sequestrador de espécies reativas de oxigênio (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008; HEIMLER et al., 2007).

Considerando-se, ainda, que, dentre os vegetais consumidos pela população brasileira, a alface é a segunda maior fonte de flavonoides e a época de colheita e as diferenças entre as cultivares são fatores determinantes para a variabilidade do conteúdo destes compostos, o estudo do conteúdo destas substâncias e dos fatores que os influencia torna-se essencial (ARABBI; GENOVESE; LAJOLO, 2004).

2.4.2 Pigmentos

A preferência de um produto pelo mercado consumidor depende, não somente de uma composição balanceada de nutrientes, mas, principalmente, da relação entre aspectos nutricionais e sensoriais. Dentre estes aspectos, a cor é um dos principais parâmetros a ser avaliado em um alimento, já que é o atributo que mais facilmente desperta sua atenção (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

Os principais pigmentos contidos em alfaces de diferentes cultivares são: clorofila, β -caroteno, luteína, zeaxantina e antocianinas (AC) (HEDGES; LISTER, 2005).

As AC são os flavonoides responsáveis pela coloração característica de frutas e hortaliças vermelhas e arroxeadas. Em folhosas, estes pigmentos são majoritariamente encontrados na forma de complexos cianidina-3-glucosídeo, moléculas cuja ação é influenciada pelo número de hidroxilas do anel β da molécula. Neste caso, os radicais peroxil específicos cianidinas-3-malonilglucosídeo e quercetinas-3-glucosídeo são os compostos bioativos de maior AA encontrados em extratos de folhas de alface vermelha (CALDWELL, 2003).

Quando ingeridas como parte da dieta, as AC possuem AA relacionada à prevenção ou reversão de danos ao DNA por espécies reativas. Neste caso e como regra geral, é possível estabelecer uma correlação entre a coloração, o conteúdo de polifenóis e sua AA, embora esta relação não possa ser aplicada com exatidão em relação ao poder antioxidante que estes flavonoides podem representar (HEIMLER et al., 2007).

Em experimentos conduzidos por Hassimotto, Genovese e Lajolo (2005), amostras ricas em AC exibiram maior PA em relação àquelas que não continham este pigmento (mesmo sendo ricas em flavonoides, como as quercetinas) e até mesmo em relação ao antioxidante sintético hidroxitolueno butilado (BHT).

Assim como a clorofila, os pigmentos carotenoides são encontrados no interior dos cloroplastos e apresentam-se, na célula, como complexos associados a frações ou moléculas lipídicas. No entanto, enquanto a clorofila é um pigmento verde, os carotenoides podem apresentar variações que vão do amarelo ao vermelho alaranjado. Ambos estão altamente associados, já que a cor verde da clorofila pode mascarar o conteúdo de carotenoides visível a olho nu, assim como a síntese de carotenoides pode ocorrer concomitantemente à degradação da clorofila (CHITARRA; CHITARRA, 2006, 2005; SPOTO; GUTIERREZ, 2006).

Neste sentido, a queda do teor de clorofila em folhas de alface está diretamente relacionada ao decréscimo da qualidade visual na aparência das hortaliças, já que a desintegração do aparelho fotossintético é o evento central do desenvolvimento de senescência de folhas e envolve a degradação da maioria dos componentes dos cloroplastos e não apenas de proteínas (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Por isso, a coloração e o conteúdo de clorofila têm sido alguns dos principais índices de qualidade para folhosas (AGÜERO et al., 2008).

Além disso, a clorofila possui papel relevante para o PA de hortaliças, tanto por sua atividade pró-oxidante quanto por seu efeito antioxidante. No primeiro caso, a clorofila age como pigmento sensibilizante durante as reações de fotoxidação, formando moléculas extremamente reativas de oxigênio singlete (REGITANO D'ARCE, 2006). Já no segundo caso, estes pigmentos podem atuar, tanto interagindo com hidroperóxidos e inibindo sua ação na ausência de luz, quanto, juntamente com pigmentos carotenoides, induzindo a ação de enzimas da fase II, o que pode, pelo menos em partes, explicar o efeito do consumo de vegetais na proteção do organismo contra cânceres (FAHEY et al., 2005).

Dentre os carotenoides mais comumente encontrados em vegetais estão o α , β e γ -caroteno, licopenos e xantofilas (SPOTO; GUTIERREZ, 2006). São compostos isoprenoides contendo até quinze duplas ligações conjugadas que atuam como cromóforos por sua

habilidade em absorver a luz na região visível e por seu poder corante (CHITARRA; CHITARRA, 2006).

O PA destes pigmentos está majoritariamente associado à mitigação de moléculas de oxigênio singlete e radicais peróxido e ao sequestro de intermediários reativos gerados durante processos fotooxidativos (SIES; STAHL, 2003). Neste caso, sua estrutura molecular, composta basicamente de uma cadeia longa de hidrocarbonetos e uma série de duplas ligações conjugadas centrais alternadas, é a principal responsável por estas propriedades (HEDGES; LISTER, 2005).

Assim, os carotenoides podem agir como antioxidantes primários, inativando radicais livres, ou secundários, retirando o excesso de energia do oxigênio singlete e dissipando-o na forma de calor (REGITANO D'ARCE, 2006).

2.4.3 Métodos analíticos utilizados para a avaliação do potencial antioxidante

Diferentes métodos têm sido empregados para mensurar a resistência de uma determinada molécula à oxidação quando na presença de antioxidantes em potencial. A maior parte dos testes analíticos é conduzida em emulsões ou meios lipídicos com o objetivo de proporcionar um encurtamento da fase de indução na tentativa de minimizar a reação em cadeia subsequente, tanto por meio do uso de altas temperaturas quanto pelo aumento do suprimento de oxigênio. Nestes casos, a AA pode ser determinada a partir de compostos puros ou extratos vegetais, tanto pela medida do consumo de oxigênio quanto pela medida da produção de hidroperóxidos ou outros produtos de reações de degradação (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

O sistema modelo β -caroteno-ácido linoleico se utiliza, portanto, de três dos principais fatores que afetam uma reação de oxidação: a presença de um ácido graxo poliinsaturado (o ácido linoleico) e de oxigênio, e a temperatura alta. Em emulsão, o ácido linoleico entra em contato com o oxigênio e, submetida à temperatura alta na presença de um antioxidante conhecido (o β -caroteno), a reação de oxidação se inicia. Espectrofotometricamente, a reação é monitorada em um período de tempo específico ou em intervalos pré-determinados. Desse modo, o sistema mensura a capacidade de um extrato vegetal em inibir a reação de oxidação comparativamente à ação do β -caroteno (controle).

Já a avaliação da AA por meio da medida do sequestro do radical livre 2,2'-Difenil-1-Picrilhidrazil (DPPH[•]) é um método rápido e fácil conduzido por meio da reação deste radical estável com o composto específico ou extrato em meio extrator (geralmente um solvente). A redução do DPPH é, então, monitorada pelo decréscimo da absorbância da solução em um

comprimento de onda específico (515 nm), de acordo com a reação abaixo (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Assim, os principais fatores que influenciam as metodologias analíticas, os resultados e a própria ação dos antioxidantes são: a natureza e a composição da amostra, bem como o antioxidante empregado; a estrutura da molécula antioxidante e o número de moléculas de hidrogênio dos grupamentos hidroxila disponíveis para reação; o tipo de solvente, sua polaridade e sua afinidade com o substrato; e as condições de extração (CALDWELL, 2003; BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar as respostas fisiológicas e bioquímicas relacionadas à caracterização do comportamento pós-colheita e do potencial antioxidante das cultivares de alface Piraroxa e Vanda em épocas de colheita e condições de armazenamento distintas.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar a influência da época de colheita sobre os aspectos qualitativos, a durabilidade e o potencial antioxidante das hortaliças, bem como determinar os benefícios do armazenamento refrigerado sobre tais aspectos;
- Obter informações que possam ser utilizadas para o desenvolvimento de tecnologias ou adoção de tratamentos pós-colheita que visem a maximizar o potencial antioxidante e promover a qualidade das hortaliças.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Pós-Colheita do Departamento de Ciências Biológicas (Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo – ESALQ/USP), em Piracicaba-SP.

4.1 Colheita das hortaliças e preparo das amostras

As hortaliças foram colhidas manualmente, pela manhã, com as folhas tenras e sem início de pendoamento, entre 50 e 70 dias após a semeadura, em uma propriedade comercial na cidade de Piracicaba-SP, de onde foram transportadas até o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Pós-Colheita (ESALQ/USP).

Imediatamente após sua recepção, as hortaliças foram previamente selecionadas para a homogeneização do lote quanto ao tamanho, cor e ausência de danos, insetos e outros contaminantes nas folhas.

Todas as unidades foram sanitizadas antes do armazenamento, etapa que foi realizada pela imersão das hortaliças em soluções de 100-150 ppm de cloro ativo por 5-10 min e secagem em bancadas forradas com papel absorvente.

4.2 Condução dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos em épocas de colheita distintas (janeiro/fevereiro e julho/agosto) e as hortaliças foram submetidas ao armazenamento em câmara fria por 28 dias à 0°C e 95-97%UR (temperatura ótima para o armazenamento) e por quatro dias em condição ambiente (em que as hortaliças são comumente mantidas e comercializadas) monitorada diariamente, duas vezes ao dia, via termohigrógrafo (KADER, 2002).

As análises fisiológicas foram realizadas imediatamente após a recepção das hortaliças (tempo 0) e, na temperatura de 0°C, nos dias 7, 14, 21 e 28, enquanto em condição ambiente, nos dias um, dois e três na colheita de verão e um, dois, três e quatro na colheita de inverno.

Em todos os dias, após as análises fisiológicas, as três unidades da repetição tiveram suas folhas casualmente uniformizadas para o recolhimento de amostras que foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas sob congelamento e protegida da luz até a condução das análises bioquímicas.

4.3 Delineamento experimental e análise dos resultados

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 x 2 referente a duas épocas de colheita, duas cultivares e duas temperaturas de armazenamento.

Para as variáveis relacionadas à produção de etileno e taxa respiratória, foram utilizadas cinco repetições com uma unidade, enquanto que, para as análises fisiológicas, foram utilizadas quatro repetições compostas de três hortaliças cada. As análises bioquímicas foram realizadas em triplicata.

Os dados foram submetidos a análises exploratórias, pelas quais foram verificados padrões de homogeneidade de variâncias, número de repetições, pontos discrepantes e escala. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste LSD (Least Significant Difference) ($p \leq 0,05$) pelo Sistema SAS (Statistical Analysis System) através do método de Potência Ótima de Box e Cox (1964).

4.4 Determinações

4.4.1 Produção de etileno: hortaliças de cada repetição foram transferidas para recipientes com volume de 3600-5000 mL, que foram fechados hermeticamente durante duas horas. Para a análise da produção de etileno, foram injetadas amostras de gás de 0,5 mL de cada recipiente em cromatógrafo a gás, marca Thermo, modelo Trace GC Ultra, equipado com um detector de ionização por chama (FID). As temperaturas da coluna, injetor e detector foram de 100, 140 e 250°C, respectivamente. A produção de etileno foi expressa em $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, a partir da concentração de etileno, da massa da hortaliça, do volume do espaço livre no recipiente e do tempo de fechamento;

4.4.2 Taxa respiratória: foi quantificada pela produção de CO_2 no interior do mesmo recipiente utilizado para a determinação da produção de etileno, sob as mesmas condições e seguindo-se os mesmos procedimentos. Para o monitoramento da composição gasosa, as amostras foram injetadas em um analisador de gases marca Illinois Instruments, modelo 6600 Oxygen/Carbon Dioxide Headspace Analyzer. A taxa respiratória foi expressa em $\text{mL CO}_2 \text{ Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, a partir da concentração de CO_2 no recipiente, do volume do espaço livre, da massa da hortaliça e do tempo de fechamento;

4.4.3 Coloração das folhas: foi determinada por meio do uso do equipamento Minolta Chroma Meter CR-300, determinando-se os valores dos parâmetros L, a* e b*. Foram realizadas quatro leituras em quatro folhas de cada hortaliça da repetição;

4.4.4 Perda de massa fresca: foi determinada pela diferença entre os pesos das unidades em relação ao peso inicial ao longo dos períodos de armazenamento estabelecidos;

4.4.5 Clorofila e carotenoides: as quantidades de clorofila total, a e b, bem como as quantidades de carotenoides totais foram determinadas de acordo com a metodologia de Lichtenthaler (1987). As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e alíquotas de 0,5 g foram adicionadas de 5 mL de solução extratora de acetona 80% à 4°C. As soluções foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 min à 4°C, quando foram realizadas as leituras em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 645, 663 e 470 nm. Os teores de carotenoides totais, clorofila a, b e total foram obtidos pelas seguintes fórmulas:

$$\text{Carotenoides} = \frac{1000 (\text{Absorbância } 470 \text{ nm}) - 1,82 (\text{Clorofila } a) - 85,02 (\text{Clorofila } b)}{198}$$

$$\text{Clorofila } a = 12,7 (\text{Absorbância } 663 \text{ nm}) - 2,7 (\text{Absorbância } 645 \text{ nm})$$

$$\text{Clorofila } b = 22,9 (\text{Absorbância } 645 \text{ nm}) - 4,7 (\text{Absorbância } 663 \text{ nm})$$

$$\text{Clorofila Total} = 8,0 (\text{Absorbância } 663 \text{ nm}) + 20,2 (\text{Absorbância } 645 \text{ nm})$$

4.4.6 Antocianinas: foram quantificadas de acordo com a metodologia proposta por Lees e Francis (1972). As folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e os pigmentos foram extraídos com uma solução de etanol 95% e HCl 1,5 N (85:15 v/v). As folhas maceradas e a solução permaneceram em contato à 4°C por 12 horas, quando as amostras foram filtradas e os resíduos lavados com a solução extratora até a remoção completa dos pigmentos. Após um período de repouso em completa ausência de luz por 2 horas à temperatura ambiente, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro, a 535 nm. Os resultados foram expressos em mg de AC por 100 g e o teor de AC foi obtido de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Antocianinas Totais} = \frac{\text{Absorbância} \times \text{Fator de Diluição}}{98,2}$$

$$\text{Onde: Fator de Diluição} = \left(\frac{\text{Volume do Extrato}}{\text{Volume da Alíquota}} \right) \times 100$$

4.4.7 Aparência: foi analisada via avaliações visuais realizadas pela autora, de acordo com a escala informal de notas abaixo:

- Folhas de coloração brilhante e sem indícios de escurecimento, com aparência de frescor. Base sem indícios de podridão ou escurecimento.
- Folhas de coloração brilhante, com leves indícios de escurecimento, com aparência de frescor. Base sem indícios de podridão, com leves indícios de escurecimento.
- Folhas com indícios de escurecimento e murchamento, com leve redução da aparência de frescor. Base sem indícios de podridão, porém com indícios de escurecimento.
- Folhas de coloração opaca e sem viço, murchas e com escurecimento visível. Base com leves indícios de podridão e escurecimento visível. Não indicada para consumo e comercialização.
- Folhas em estágio avançado de escurecimento e murchamento. Base em estágio avançado de podridão e escurecimento. Imprópria para consumo e inaceitável para comercialização.

4.4.8 Atividade da Polifenoloxidase: foi determinada pela metodologia proposta por Matsuno e Uritani (1972). As folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e alíquotas de 0,5 g foram adicionadas de 5 mL de tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 6,0. As soluções foram centrifugadas a 10.000 rpm à 4°C durante 10 min e adicionadas de 0,85 mL de solução de catecol 0,1 M. Os extratos foram incubados em banho-maria durante 30 min à 30°C e a atividade enzimática foi interrompida pela adição de 0,7 mL de ácido sulfúrico 5%. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, a 395 nm, e atividade foi expressa em UA/min/g;

4.4.9 Potencial antioxidante: as análises para a avaliação do PA das amostras foram realizadas a partir dos extratos hidroalcoólicos obtidos por meio da maceração das folhas em nitrogênio líquido e da adição de 20 mL de etanol 80% às alíquotas de 2 g. As soluções foram submetidas à agitação em vórtex e em aparelho de ultrassom por 5 min, quando foram centrifugadas a 5000 xg por 15 min e filtradas. O PA das amostras foi avaliado a partir do teor de CF (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999), do método do sequestro do radical DPPH (MENSOR et al., 2001) e do sistema modelo β -caroteno/ácido linoleico (BCAL), por meio do uso de BHT e α -tocoferol como padrões (EMMONS; PETERSON; PAUL, 1999).

4.4.9.1 Compostos Fenólicos: 0,5 mL dos extratos hidroalcoólicos foram adicionados de 2,5 mL de solução de Folin-Ciocalteu 10%, agitados em vórtex e mantidos em repouso por 5 min, quando foram adicionados de 2 mL de solução de carbonato de sódio 4%. Após nova agitação e repouso por duas horas em ausência de luz, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 740 nm. Os resultados foram expressos em BU (base úmida), em equivalentes ao ácido gálico (mg EAG g⁻¹ de alface).

4.4.9.2 Atividade sequestrante do radical livre DPPH: 500 µL dos extratos hidroalcoólicos foram adicionados de 3 mL de etanol e 300 µL de DPPH 0,5 mM. Após agitação em vórtex e repouso por 45 min em ausência de luz, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 517 nm. Os resultados foram expressos em BU, em equivalentes ao Trolox (µmol TEAC g⁻¹ de alface).

4.4.9.3 Auto-oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico: para a obtenção da emulsão, 3 mL de uma solução β-caroteno/clorofórmio (10 mg de β-caroteno em 100 mL de clorofórmio) foram adicionados de 40 mg de ácido linoleico e 400 mg de tween 40. O clorofórmio foi removido com a utilização de uma corrente de gás nitrogênio, o resíduo obtido foi adicionado de 100 mL de água (previamente aerada por 30 min) e a emulsão foi agitada. 50 µL dos extratos hidroalcoólicos foram adicionados de 3 mL da emulsão, agitados em vórtex e incubados em banho-maria à 50°C. As reações de oxidação foram monitoradas a partir de leituras em espectrofotômetro a 470 nm nos tempos inicial (após a agitação e antes da incubação) e final (após duas horas de incubação). Os resultados foram expressos em BU, em porcentagem de inibição relativa comparada ao controle (diluição 1:5 v/v do extrato hidroalcoólico), de acordo com o cálculo abaixo:

$$\text{Atividade Antioxidante (\%)} = \left[\frac{\text{Taxa de Degradação do Controle (DRc)} - \text{Taxa de Degradação da Amostra (DRs)}}{\text{DRc}} \right] \times 100$$

$$\text{Onde: DRc} = \ln \left[\frac{\text{Absorbância Inicial} / \text{Absorbância Final}}{120} \right]$$

$$\text{DRs} = \ln \left[\frac{\text{Absorbância Inicial} / \text{Absorbância Final}}{120} \right]$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de etileno

Na colheita de verão, diferenças significativas foram observadas entre as cultivares em todos os dias de análise em condição ambiente, nos quais a cv. Vanda apresentou produção superior de etileno. Sob armazenamento refrigerado, entretanto, diferenças entre as cultivares foram observadas apenas na caracterização (tempo 0) (Figura 1). Em todos os casos, o tamanho e vigor da cv. Vanda em relação à cv. Piraroxa foram determinantes para esta variável. Já na colheita de inverno, as cultivares não apresentaram diferenças significativas em todos os períodos analisados e em ambas as temperaturas de armazenamento (Figura 2).

Tendências decrescentes foram observadas para ambas as cultivares em todas as condições de armazenamento e períodos de colheita (Figuras 1 e 2) exceto para as alfaces colhidas no verão e armazenadas em condição ambiente (Figura 1a). Neste caso, a produção crescente de etileno pode ter sido responsável por acelerar a senescência e reduzir a durabilidade das hortaliças, que puderam ser analisadas somente até o terceiro dia de armazenamento, permanecendo comercializáveis até o primeiro dia apenas para a cv. Vanda e até o segundo dia para a cv. Piraroxa, enquanto que, na colheita de inverno, as hortaliças foram analisadas até o quarto dia, permanecendo comercializáveis até o segundo dia.

As tendências observadas para a produção de etileno das hortaliças submetidas ao armazenamento refrigerado também foram demonstradas por Mattos et al. (2008) nas quatro horas subsequentes ao armazenamento de folhas inteiras da cultivar Verônica, reiterando o retardo das taxas metabólicas das hortaliças em refrigeração.

A produção de etileno média de hortaliças folhosas à 20°C pode ser considerada muito baixa, entre 0,01 e 0,1 $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (KADER, 2002). Neste caso, a média obtida para a produção de etileno das hortaliças pôde ser considerada satisfatória dentro dos limites propostos pelo autor. No entanto, a produção de etileno foi, em todas as condições, inferior a 4 $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e, segundo Reid (2002), valores inferiores a 0,01 $\text{mL C}_2\text{H}_4 \text{ Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ podem não influenciar os aspectos fisiológicos e tecnológicos pós-colheita.

Figura 1 - Produção de etileno em alfaces colhidas no verão e armazenadas à 23-26°C e 64-69% UR (a) e à 0°C e 95-97% UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=5)

Figura 2 - Produção de etileno em alfaces colhidas no inverno e armazenadas à 21-23°C e 66-76% UR (a) e à 0°C e 95-97% UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=5)

5.2 Taxa respiratória

Tendências decrescentes foram observadas em todas as temperaturas e épocas de colheita para ambas as cultivares (Figuras 3 e 4) e o armazenamento refrigerado proporcionou acentuado declínio das taxas respiratórias, contribuindo, ainda, para a redução das diferenças entre as cultivares (Figuras 3b e 4b). Neste caso, tais diferenças foram observadas apenas para as hortaliças colhidas no inverno e armazenadas em condição ambiente (Figura 4a), indicando que a cv. Piraroxa apresentou taxas metabólicas mais elevadas nesta condição.

Em condição ambiente, as folhosas normalmente respiram em taxas estabilizadas e apresentam declínio gradual da atividade respiratória nos estádios finais da senescência (CHITARRA; CHITARRA, 2005), o que corrobora as tendências observadas. Já em armazenamento refrigerado, a produção de dióxido de carbono foi um eficiente indicativo do

metabolismo das cultivares, reiterando a eficácia do uso do frio para o retardo das taxas metabólicas e a conservação das hortaliças.

O decréscimo das taxas respiratórias ao longo do armazenamento refrigerado também foi observado por Mattos et al. (2008) e comportamentos análogos foram demonstrados em alfaces ‘Shizuka’, ‘Cisco’ e ‘Shizuko’ armazenadas à 20°C (CHANDRA et al., 2006; SUTHUMCHAI et al., 2006) e em alfaces ‘Shizuka’ e ‘Cisco’ à 5°C (CHANDRA et al., 2008; SUTHUMCHAI et al., 2007).

Os valores obtidos apresentaram-se compatíveis às médias para taxas respiratórias de alfaces armazenadas à 5°C, que podem ser consideradas altas e equivalem a valores aproximados entre 20 e 40 mg de CO₂ Kg⁻¹ h⁻¹ (KADER, 2002).

Figura 3 - Produção de dióxido de carbono em alfaces colhidas no verão e armazenadas à 23-26°C e 64-69%UR (a) e à 0°C e 95-97%UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=5)

Figura 4 - Produção de dióxido de carbono em alfaces colhidas no inverno e armazenadas à 21-23°C e 66-76% UR (a) e à 0°C e 95-97% UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=5)

5.3 Coloração das folhas

Os parâmetros L, a^* e b^* permaneceram constantes ao longo de ambos os períodos de armazenamento para ambas as cultivares, tanto na colheita de verão (Figuras 5, 6 e 7), quanto na colheita de inverno (Figuras 8, 9 e 10), evidenciando, ainda, as diferenças significativas entre a coloração das duas cultivares. Oscilações de coloração foram observadas para a ‘Piraroxa’ ao longo dos períodos de armazenamento, tendo sido atribuídas ao fato de que a coloração desta cultivar não é uniforme em toda a folha.

Assim, as análises de coloração evidenciaram que as variações no conteúdo de pigmentos (Figuras 13 a 16, 18 e 19) podem não ser visíveis a olho nu, já que o colorímetro utiliza sensores que simulam o modo como o olho humano vê a cor.

Valores constantes com pequenas oscilações foram observados para o parâmetro L mensurado em alfaces ‘Shizuka’ e ‘Cisco’ armazenadas em refrigeração (5°C) (CHANDRA et al., 2008), assim como os parâmetros L, a^* e b^* (representados pelo ângulo Hue) para alfaces ‘Shisuko’ armazenadas sob a mesma temperatura (SUTHUMCHAI et al., 2007). Entretanto, valores crescentes para tais parâmetros foram demonstrados durante o armazenamento de folhas de alface à 5°C e à 25°C (LEE, 2008) e, em contrapartida, tendências decrescentes para os parâmetros L, a^* e b^* (representados pelo ângulo Hue) foram obtidas em alfaces ‘Shizuka’ e ‘Shisuko’ armazenadas à 20°C (SUTHUMCHAI et al., 2006).

Figura 5 - Parâmetro L para coloração das folhas em alfaces colhidas no verão e armazenadas à 23-26°C e 64-69%UR (a) e à 0°C e 95-97%UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4)

Figura 6 - Parâmetro a^* para coloração das folhas em alfaces colhidas no verão e armazenadas à 23-26°C e 64-69% UR (a) e à 0°C e 95-97% UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4)

Figura 7 - Parâmetro b^* para coloração das folhas em alfaces colhidas no verão e armazenadas à 23-26°C e 64-69% UR (a) e à 0°C e 95-97% UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4)

Figura 8 - Parâmetro L para coloração das folhas em alfaces colhidas no inverno e armazenadas à 21-23°C e 66-76%UR (a) e à 0°C e 95-97%UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4)

Figura 9 - Parâmetro a^* para coloração das folhas em alfaces colhidas no inverno e armazenadas à 21-23°C e 66-76%UR (a) e à 0°C e 95-97%UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4)

Figura 10 - Parâmetro b^* para coloração das folhas em alfaces colhidas no inverno e armazenadas à 21-23°C e 66-76%UR (a) e à 0°C e 95-97%UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4)

5.4 Perda de massa fresca

As cultivares apresentaram tendências similares ao longo dos períodos de armazenamento tanto na colheita de verão quanto na colheita de inverno (Figuras 11 e 12) e o armazenamento refrigerado e as altas umidades relativas mostraram-se eficazes para o controle da perda de massa fresca em ambos os períodos de colheita (Figuras 11b e 12b). As cultivares apresentaram aumento significativo do percentual de perda apenas no 28º dia e, na colheita de inverno, contudo, o maior percentual de perda de massa fresca (de 11 a 21%, aproximadamente, contra 2 a 3% na colheita de verão) foi atribuído à relação superfície/volume das folhas, maiores, mais vigorosas e com maior área superficial.

Em condição ambiente, a perda de massa fresca da cv. Piraroxa foi significativamente superior a cv. Vanda na colheita de inverno (Figura 12a), já que a primeira apresentou taxas

metabólicas superiores, evidenciadas pela maior produção de dióxido de carbono (Figura 4a). Na colheita de verão, entretanto, o percentual de perda de massa fresca apresentou-se superior (15 a 17%, aproximadamente, contra 8 a 12% na colheita de inverno) em decorrência das próprias condições ambiente, com temperaturas mais elevadas (23-26°C contra 21-23°C na colheita de inverno) e umidade relativa inferior (64-69%UR contra 66-76%UR, respectivamente). Já na colheita de inverno, o maior percentual de perda no primeiro dia em relação aos demais foi atribuído ao aumento das taxas metabólicas subsequente ao estresse da colheita (Figura 12a).

Tendências e percentuais de perda análogos foram observados em alfaces armazenadas à 5°C e 25°C (LEE, 2008) e em alfaces ‘Shizuka’, ‘Cisco’ e ‘Shizuko’ armazenadas à 20°C (CHANDRA et al., 2006; SUTHUMCHAI et al., 2006).

Figura 11 - Percentual de perda de massa fresca em alfaces colhidas no verão e armazenadas à 23-26°C e 64-69%UR (a) e à 0°C e 95-97%UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=8)

Figura 12 - Percentual de perda de massa fresca em alfaces colhidas no inverno e armazenadas à 21-23°C e 66-76%UR (a) e à 0°C e 95-97%UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=8)

5.5 Clorofila e carotenoides

Foram observadas tendências similares e correlações estatisticamente significativas entre o conteúdo de clorofila e o de pigmentos carotenoides para ambas as cultivares, em todas as temperaturas de armazenamento e épocas de colheita (Figuras 13 a 17). Neste caso, a associação entre os pigmentos está relacionada ao aumento do potencial energético do sistema metabólico nas folhas, já que os pigmentos carotenoides protegem a clorofila e o aparelho fotossintético contra a fotodegradação (CHITARRA; CHITARRA, 2006).

As diferenças entre as cultivares foram evidenciadas em todos os períodos de análise para todos os parâmetros estabelecidos (Figuras 13 a 16) exceto para os dias 0, 1 e 2 da colheita de inverno, quando as cultivares não diferiram entre si (Figuras 14 e 16). Tais

diferenças reiteram o fato de que a coloração forte das AC geralmente mascara pigmentos carotenoides e clorofilas e a variação na coloração entre cultivares da mesma espécie é geralmente decorrente da diferença das quantidades presentes destes pigmentos (CHITARRA; CHITARRA, 2006).

Diferentes tendências para o conteúdo de clorofila de alfaces cv. Lores foram observadas de acordo com as diferentes zonas de recolhimento das folhas (externas, medianas e internas), demonstrando que o comportamento desta variável foi decrescente para as folhas externas e constante para as folhas medianas e internas durante os vinte e oito dias de armazenamento refrigerado (0-2°C e 97-99%UR) (AGÜERO et al., 2008). Tais observações podem explicar o comportamento variável do conteúdo de clorofila obtido, já que as amostragens foram compostas de folhas externas, medianas e internas, recolhidas aleatoriamente.

Desse modo, não foi possível estabelecer correlações acerca do comportamento das cultivares e suas interações com as temperaturas de armazenamento e épocas de colheita estabelecidas.

Figura 13 - Teor de clorofila em folhas de alfaces colhidas no verão e armazenadas em à 23-26°C e 64-69%UR (a) e à 0°C e 95-97%UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4)

Figura 14 - Teor de clorofila em folhas de alfaces colhidas no inverno e armazenadas à 21-23°C e 66-76%UR (a) e à 0°C e 95-97%UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4)

Figura 15 - Teor de carotenoides em folhas de alfaces colhidas no verão e armazenadas à 23-26°C e 64-69% UR (a) e à 0°C e 95-97% UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4)

Figura 16 - Teor de carotenoides em folhas de alfaces colhidas no inverno e armazenadas à 21-23°C e 66-76%UR (a) e à 0°C e 95-97%UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4)

Figura 17 - Correlação entre o conteúdo de clorofila e carotenoides em folhas de alfaces colhidas no verão e no inverno e armazenadas em condição ambiente monitorada e em refrigeração

5.6 Antocianinas

O conteúdo de AC não foi influenciado pela época de colheita para ambas as cultivares e a temperatura de armazenamento representou influência apenas para a cv. Piraroxa, já que a cv. Vanda apresentou conteúdo constante de AC ($1\text{-}2\text{ mg }100\text{g}^{-1}$) em ambas as temperaturas de armazenamento e épocas de colheita (Figuras 18 e 19). Contudo, outros autores reportaram a ausência de AC em alfaces de coloração verde por métodos de maior precisão, via testes *in vitro* (MULABAGAL et al., 2010) ou HPLC (LLORACH et al., 2008; ARABBI; GENOVESE; LAJOLO, 2004). Neste caso, é possível que as AC estejam presentes como metabólitos secundários, desempenhando funções não relacionadas à pigmentação, ou que tenham sido quantificadas como erro experimental.

As funções de tais compostos fitobioativos como agentes de defesa e proteção contra patógenos podem ter sido determinantes para a elevação do conteúdo de AC em condição ambiente nos segundo e terceiro dias na colheita de verão e terceiro e quarto dias na colheita de inverno (Figuras 18a e 19a), períodos em que as hortaliças já se apresentavam impróprias para comercialização.

Já as elevações observadas no sétimo dia de armazenamento refrigerado (Figuras 18b e 19b) foram decorrentes da ativação do metabolismo destes pigmentos pela temperatura baixa. Em frutos de *Citrus sinensis* L. Osbeck, o mesmo pico foi observado no sexto dia de armazenamento à 4°C e os autores demonstraram que a transcrição dos principais genes relacionados à biossíntese de AC também aumentou significativamente entre os terceiro e sexto dia de armazenamento (CRIFÒ et al., 2012). O aumento contínuo na transcrição destes genes também não foi detectado durante o armazenamento refrigerado, o que significa que tais picos podem ser resultantes de processos pós-transcricionais relacionados à biossíntese de AC (CHRISTIE; ALFENITO; WALBOT, 1994).

Neste sentido, diversos autores reiteram o fato de que a temperatura é um dos principais fatores de influência para o metabolismo das AC, observando relações inversamente proporcionais entre a temperatura e o acúmulo e a estabilidade destes pigmentos nos tecidos. Neste caso, tal parâmetro afeta direta ou parcialmente a expressão gênica das AC, provocando o aumento da transcrição de genes, ativando enzimas-chave do metabolismo fenilpropanoide como a fenilalanina amônia-liase, catalisando reações envolvidas na biossíntese de flavonoides e AC, ou regulando a atividade e, ou, a cinética das enzimas envolvidas como a chalcona isomerase (CRIFÒ et al., 2012; NISSIM-LEVI et al., 2003; SHAKED-SACHRAY et al., 2002; SHVARTS; BOROCHOV; WEISS, 1997; CHRISTIE; ALFENITO; WALBOT, 1994).

Figura 18 - Conteúdo de antocianinas em folhas de alfaces colhidas no verão e armazenadas à 23-26°C e 64-69%UR (a) e à 0°C e 95-97%UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4)

Figura 19 - Conteúdo de antocianinas em folhas de alfaces colhidas no inverno e armazenadas à 21-23°C e 66-76%UR (a) e à 0°C e 95-97%UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4)

5.7 Aparência

Ao longo do período de armazenamento refrigerado, as características de qualidade representadas pela aparência das hortaliças foram preservadas até o 28º dia (Figuras 21 e 23). Em condição ambiente (23-26°C e 64-69%UR na colheita de verão e 21-23°C e 66-76%UR na colheita de inverno), as hortaliças puderam ser analisadas somente até o terceiro dia de armazenamento na colheita de verão, permanecendo comercializáveis apenas até o primeiro dia para a cv. Vanda e até o segundo dia para a cv. Piraroxa, enquanto que, na colheita de inverno, as hortaliças foram analisadas até o quarto dia, permanecendo comercializáveis até o segundo dia (Figuras 20 e 22).

Alfaces ‘Lores’ tiveram sua qualidade visual comprometida a partir do vigésimo dia de armazenamento a 0-2°C e 97-99%UR, incluindo escurecimento em graus inaceitáveis nas

folhas externas e nas nervuras medianas da base, além de perda significativa de textura e descoloração das folhas externas (AGÜERO et al., 2008). Em contrapartida, alfaces armazenadas à 25°C apresentavam aspecto visual inaceitável para comercialização somente a partir do terceiro dia de armazenamento (LEE, 2008).

A cultivar Vanda apresentou maior suscetibilidade à podridão e a queimaduras nas folhas, enquanto a ‘Piraroxa’ apresentou características de aparência mais aceitáveis. Contudo, estas características não foram analiticamente mensuradas e, portanto, para experimentos futuros, recomenda-se a definição de uma análise sensorial a partir de uma escala de aceitabilidade para a classificação das hortaliças em relação ao seu potencial de comercialização.

A durabilidade e manutenção das características qualitativas das hortaliças durante o armazenamento refrigerado foi extremamente satisfatória e pode indicar avanços para sua estocagem por estabelecimentos comerciais e serviços de alimentação, além de representar uma excelente possibilidade para o transporte de alfaces para regiões em que estas hortaliças não são produzidas.

Figura 20 - Aparência de alfaces 'Piraroxa e 'Vanda' colhidas no verão e armazenadas à 23-26°C e 64-69%UR

Figura 21 - Aparência de alfaces 'Piraroxa' e 'Vanda' colhidas no verão e armazenadas à 0°C e 95-97%UR

Figura 22 - Aparência de alfaces 'Piraroxa' e 'Vanda' colhidas no inverno e armazenadas à 21-23°C e 66-76%UR

Figura 23 - Aparência de alfaces 'Piraroxa' e 'Vanda' colhidas no inverno e armazenadas à 0°C e 95-97%UR

5.8 Atividade específica da enzima PPO

Na colheita de verão, as cultivares não apresentaram diferenças significativas entre si (Figura 24). Em condição ambiente monitorada, a atividade da PPO apresentou-se levemente decrescente ao longo do armazenamento (Figura 24a) e, em armazenamento refrigerado, constante, com declínio a partir do 21º dia para ambas as cultivares (Figura 24b). Já na colheita de inverno, apresentou tendências similares de comportamento para ambas as cultivares em condição ambiente monitorada (Figura 25a) e tendências distintas ao longo do período de armazenamento refrigerado (Figuras 25b).

A época de colheita representou um fator de influência apenas para a cv. Vanda, que apresentou atividade superior na colheita de verão em relação à colheita de inverno e, portanto, maior suscetibilidade ao escurecimento enzimático nessa época (Figuras 24 e 25).

Não houve influência da temperatura de armazenamento e os valores para esta variável permaneceram elevados, com oscilações crescentes (Figuras 24 e 25).

Neste sentido, diversos trabalhos relacionam a atividade da PPO ao conteúdo de CF em alfaces, já que tais compostos servem como substratos para a atividade da enzima (ALTUNKAYA; GÖKMEN, 2008; DEGL'INNOCENTI et al., 2007; TOMÁS-BARBERÁN et al., 1997). Assim, mudanças no metabolismo de CF que conduzem ao acúmulo do ácido cafeico e seus derivados podem ocasionar, concomitantemente, aumento da atividade da PPO, que utilizaria tais moléculas como substratos para as reações características do escurecimento enzimático (TOMÁS-BARBERÁN et al., 1997).

Além disso, este comportamento pode ter sido resultante da exposição das hortaliças a fatores abióticos significativos, como o estresse oxidativo decorrente do frio, o uso de outras moléculas que não somente os CF como substratos, a atividade de demais enzimas envolvidas no processo de escurecimento, além da própria colheita e do tempo de armazenamento prolongado.

A influência de fatores abióticos também foi demonstrada em seis cultivares de alface submetidas a diferentes temperaturas pré-colheita. Neste caso, as hortaliças cultivadas em temperaturas menores, com médias de 20°C e 13°C (dia e noite), apresentaram atividades mais elevadas para a PPO, de maneira que a atividade da enzima foi inversamente proporcional ao aumento da temperatura durante o cultivo. Os autores concluíram, portanto, que as baixas temperaturas também podem induzir ao aumento da atividade da PPO (CHON et al., 2012). Contudo, não somente a temperatura, mas também a luminosidade e o conteúdo de CF nas folhas estão envolvidos com a atividade da PPO na pré-colheita (CHUTICHUDET; CHUTICHUDET, 2011).

Considerando-se, ainda, que a perda da compartimentalização celular e da integridade das membranas também pode ocorrer em processos de senescência ou estresse oxidativo durante o armazenamento, o uso de substâncias inibidoras da atividade da PPO pode constituir-se como uma opção de manejo viável para a indução do aumento do PA em hortaliças, já que a inibição da PPO poderia induzir ao acúmulo de CF.

É importante ressaltar, ainda, que, em alfaces, a atividade específica da PPO apresenta diferenças significativas de acordo com o tecido analisado (vascular ou fotossintético), embora não apresente diferenças em relação à localização das folhas (internas ou externas) (FUKUMOTO; TOIVONEN; DELAQUIS, 2002). Tais observações podem explicar o comportamento variável da atividade desta enzima, já que as amostragens, aleatórias, foram compostas de folhas com quantidades variáveis e não mensuradas de tecidos.

Figura 24 - Atividade específica da enzima PPO em alfaces colhidas no verão e armazenadas à 23-26°C e 64-69%UR (a) e à 0°C e 95-97%UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4)

Figura 25 - Atividade específica da enzima PPO em alfaces colhidas no inverno e armazenadas à 21-23°C e 66-76%UR (a) e à 0°C e 95-97%UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4)

5.9 Potencial Antioxidante

As cultivares apresentaram diferenças significativas em relação a todas as variáveis avaliadas, em ambas as épocas de colheita e em todos os períodos de análise, exceto para o conteúdo de CF e a atividade sequestrante do radical DPPH nos dias 0 da colheita de inverno em ambas as temperaturas de armazenamento (Figuras 28 e 30) e para a porcentagem de inibição relativa ao controle no sistema BCAL na colheita de inverno, nos dias 0 em ambas as temperaturas de armazenamento (Figura 33) e nos dias 7 e 14 de armazenamento refrigerado (Figura 33b).

A temperatura de armazenamento não representou um fator de influência significativo para nenhuma das variáveis, para ambas as cultivares e épocas de colheita (Figuras 27 a 30,

32 e 33). Entretanto, o contrário foi demonstrado por Altunkaya e Gökmen (2008) e, de acordo com os autores, o conteúdo de CF e a AA em alfaces decresceu mais rapidamente quando as hortaliças foram armazenadas à 25°C em relação ao armazenamento à 4°C.

Embora tenham sido observados picos no 7º dia de armazenamento refrigerado em relação à atividade sequestrante do radical livre DPPH nas alfaces colhidas no inverno (Figura 30b) e em relação ao sistema BCAL nas alfaces colhidas no verão (Figura 32b), não foram estabelecidas correlações estatisticamente significativas entre o conteúdo de AC e o PA das amostras (Figura 26). Contudo, o conteúdo de pigmentos carotenoides da cv. Piraroxa foi significativamente superior em relação à cv. Vanda em ambas as épocas de colheita e temperaturas de armazenamento (Figuras 15 e 16). Desse modo, ainda que as AC já tenham sido apontadas como as principais responsáveis pela AA elevada em diversas cultivares de alface vermelhas ou arroxeadas (LIU et al., 2007; HASSIMOTTO; GENOVESE; LAJOLO, 2005; CALDWELL, 2003), é provável que estes compostos não estejam necessariamente relacionados ao mecanismo basal relativo ao PA destas hortaliças, mas sim à associação e aos efeitos sinérgicos destas moléculas à outros compostos de alta e reconhecida AA, como outros CF, carotenoides e vitaminas C e E, e à atividade de enzimas antioxidativas como a superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, ascorbato redutase e glutathione redutase (ZHOU et al., 2009; ALTUNKAYA; GÖKMEN, 2008; CHITARRA; CHITARRA, 2006; NICOLLE et al., 2004; SIES; STAHL, 2003).

Em vegetais comestíveis, as AC são parte de uma complexa mistura no interior das estruturas celulares, de modo que tais moléculas possuem diferentes afinidades para o sequestro de espécies reativas distintas. As AC vacuolares, por exemplo, possuem maior atividade sequestrante em relação às AC livres e, desse modo, alguns alimentos podem constituir excelentes fontes de AC, mas possuírem baixo PA. É importante ressaltar, portanto, o fato de que não é adequado generalizar a relação entre altos teores de AC e os benefícios para a saúde que a AA destas substâncias podem proporcionar (PHILPOTT; LIM; FERGUSON, 2009).

Em estudos com uvas e tomates, a contribuição das AC para a AA dos frutos também foi considerada pequena, enquanto o contrário foi observado para os flavonoides e outros compostos fenólicos (ORAK, 2007; MES; MYERS, 2004). Já em estudos com alface vermelha, o alto conteúdo de flavonoides não foi atribuído à presença de AC, mas ao alto teor de quercetinas (ARABBI; GENOVESE; LAJOLO, 2004).

Contudo, tanto as AC quanto os CF presentes em alfaces possuem potencial significativo para a atividade inibitória das reações de peroxidação lipídica e da atividade de

enzimas oxidativas, como a cicloxigenase, embora os extratos de alfaces de coloração vermelha possuam maior potencial inibitório em relação aos extratos de alfaces verdes (MULABAGAL et al., 2010).

Figura 26 - Correlações entre o conteúdo de antocianinas e o teor de compostos fenólicos (a), a atividade sequestrante do radical DPPH (b) e a porcentagem de inibição relativa pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico (c) em folhas de alfaces colhidas no verão e no inverno e armazenadas em condição ambiente monitorada e em refrigeração

5.9.1 Compostos Fenólicos

O conteúdo de CF apresentou tendência à constância de valores ao longo de todos os períodos de armazenamento e em ambas as épocas de colheita, tanto para a ‘Piraroxa’ quanto para a ‘Vanda’. A época de colheita influenciou significativamente ambas as cultivares, evidenciando valores superiores na colheita de verão em relação à colheita de inverno (Figuras 27 e 28).

O conteúdo de flavonoides e CF em folhosas pode ser altamente influenciado pela época de colheita, bem como a capacidade antioxidante de alfaces vermelhas pode estar sujeita à luminosidade, aumentando proporcionalmente aos níveis de radiação UV (ZHOU et al., 2009; GARCÍA-MACÍAS et al., 2007; ARABBI; GENOVESE; LAJOLO, 2004).

Arabbi, Genovese e Lajolo (2004) demonstraram que tais fatores foram significativos apenas para a alface lisa, para a qual o conteúdo de flavonoides foi superior na colheita de inverno. Para a alface vermelha, embora o conteúdo total de flavonoides não tenha sido influenciado, houve uma redução significativa no teor de quercetina, compensada por um aumento da produção de luteolina na colheita de verão.

Diferenças significativas para o conteúdo de CF entre cultivares de diferentes colorações também foram observadas por Llorach et al. (2008) e Hassimotto, Genovese e

Lajolo (2005), de maneira que, entre as cultivares analisadas, as de coloração avermelhada tiveram maior teor de CF em relação às de coloração verde.

A quantidade de glicosídeos de cianidinas nas alfaces vermelhas pode ser superior às alfaces verdes em mais de dez vezes (GARCÍA-MACÍAS et al., 2007) e considerando-se, a alta correlação entre o conteúdo de cianidinas e o PA em alfaces, tais fatores reproduzem claramente um dos principais mecanismos pelos quais, para todas as variáveis relacionadas à AA das hortaliças, a cv. Piraroxa apresentou teores superiores a cv. Vanda.

Os resultados obtidos concordam com os valores demonstrados por García-Macías et al. (2007), Heimler et al. (2007), Hassimotto, Genovese e Lajolo (2005), bem como com os diversos estudos compilados por Huber e Rodriguez-Amaya (2008), que demonstram que o conteúdo de flavonoides pode ser influenciado por fatores como cultivar, estação do ano, luminosidade e clima. Discorda, entretanto, de outros estudos compilados pelos mesmos autores, nos quais a temperatura de armazenamento e o tempo de estocagem representaram fatores de influência significativos ao conteúdo destes compostos em diversas espécies de hortaliças.

Figura 27 - Conteúdo de compostos fenólicos em alfices colhidas no verão e armazenadas em à 23-26°C e 64-69% UR (a) e à 0°C e 95-97% UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). EAG = equivalentes ao ácido gálico

Figura 28 - Conteúdo de compostos fenólicos em alfaces colhidas no inverno e armazenadas à 21-23°C e 66-76%UR (a) e à 0°C e 95-97%UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). EAG = equivalentes ao ácido gálico

5.9.2 Atividade sequestrante do radical livre DPPH

Assim como o teor de CF (Figuras 27 e 28), a atividade sequestrante do radical livre DPPH foi significativamente influenciada pela época de colheita, apresentando valores superiores na colheita de verão em relação à colheita de inverno (Figuras 29 e 30). Da mesma forma, os resultados obtidos para tais variáveis foram similares e apresentaram correlações estatísticas significativas (Figuras 27 a 31), o que reitera a relação entre o conteúdo de CF e o PA das amostras de acordo com a metodologia do sequestro do radical DPPH.

Exceções foram observadas apenas em relação à tendência levemente crescente da cv. Vanda em temperatura ambiente monitorada na colheita de verão (Figura 29a) e ao pico no 7º dia de armazenamento refrigerado nas alfaces da cv. Piraroxa colhidas no inverno (Figura 30b).

A época de colheita também demonstrou constituir um fator de influência dentre vinte e cinco cultivares de alface, de maneira que o teor de CF e o PA apresentaram valores superiores em julho (o que seria equivalente à colheita de verão) em relação à colheita de setembro (o que seria equivalente à colheita de inverno). Os autores observaram, ainda, uma alta correlação entre as variáveis analisadas, além de demonstrarem que as hortaliças que apresentavam pigmentação vermelha continham maior conteúdo de CF e atividade sequestrante do radical DPPH superior (LIU et al., 2007).

Os estudos de Llorach et al. (2008) também mostraram que as alfaces de coloração avermelhada apresentaram AA superior às de coloração verde por este método. Neste caso, tais relações se estabelecem porque, embora a alface contenha níveis relativamente baixos de fitoquímicos com ação antioxidante, os extratos de alface vermelha contêm compostos com alta atividade sequestrante de radicais peroxil, como o ácido cafeico (CALDWELL, 2003).

Dentre vinte compostos testados para a atividade sequestrante do radical DPPH, o ácido cafeico, juntamente com o ácido gálico e o ácido gentísico, demonstraram as mais altas AA pelo método do sequestro do DDPH. Assim, não somente o número de radicais hidroxil, mas também suas posições na molécula seriam fundamentais, em especial para o segundo e o terceiro grupamentos, já que, quando nas posições orto ou para, possuem AA superior em relação à posição meta (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995).

Figura 29 - Atividade sequestrante do radical livre DPPH em alfaces colhidas no verão e armazenadas à 23-26°C e 64-69%UR (a) e à 0°C e 95-97%UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). TEAC = equivalentes ao Trolox

Figura 30 - Atividade sequestrante do radical livre DPPH em alfaces colhidas no inverno e armazenadas à 21-23°C e 66-76%UR (a) e à 0°C e 95-97%UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). TEAC = equivalentes ao Trolox

Figura 31 - Correlação entre o teor de compostos fenólicos e a atividade sequestrante do radical DPPH em folhas de alfaces colhidas no verão e no inverno e armazenadas em condição ambiente monitorada e em refrigeração

5.9.3 Auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

Tendências crescentes foram observadas para ambas as cultivares, épocas de colheita e temperaturas de armazenamento (Figuras 32 e 33), com elevações significativas a partir do segundo dia de armazenamento em condição ambiente monitorada (Figuras 32a e 33a) e a partir do 21º dia de armazenamento refrigerado (Figuras 32b e 33b).

A influência da época de colheita foi observada apenas na avaliação realizada imediatamente após a colheita, com valores superiores na colheita de inverno em relação à colheita de verão para ambas as cultivares e temperaturas de armazenamento (Figuras 32 e 33). Esta observação pode indicar uma opção de manejo viável em relação a esta variável, já que as alfaces, não sendo submetidas ao armazenamento (ou seja, comercializadas e consumidas após intervalos curtos subsequentes a colheita) e colhidas no inverno podem apresentar PA superior às colhidas no verão de acordo com este sistema-modelo.

Os resultados obtidos por esta metodologia apresentaram correlações estatisticamente significativas, porém baixas (inferiores a 50%), em relação ao teor de CF e a atividade sequestrante do radical DPPH (Figura 34). Tal diversidade de valores também foi observada por Melo et al. (2006), que obteve, para as amostras de alface crespa, eficácia moderada para sequestro do radical DPPH e baixo percentual de inibição da oxidação do sistema BCAL.

Neste caso, a grande diversidade de métodos, diretos e indiretos, de extração e quantificação de antioxidantes disponíveis atualmente, além da ampla gama de fatores que os influenciam, desde as próprias características das amostras até o uso de diferentes solventes e condições de manipulação e armazenamento, são aspectos fundamentais a serem considerados. Vale ressaltar também que todos os métodos possuem vantagens e limitações, de maneira que é de suma importância que a AA de amostras vegetais seja determinada a partir de diferentes metodologias e pontos de vista.

Neste sentido, embora a alface crespa tenha apresentado, juntamente com o açafrão e o aspargo, a maior AA pelo sistema BCAL dentre vinte e duas hortaliças analisadas (TIVERON, 2010), a alface vermelha apresentou baixa AA a partir da mesma metodologia (HASSIMOTTO; GENOVESE; LAJOLO, 2005).

Figura 32 - Auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico em alfaces colhidas no verão e armazenadas à 23-26°C e 64-69% UR (a) e à 0°C e 95-97% UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4)

Figura 33 - Auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico em alfaces colhidas no inverno e armazenadas à 21-23°C e 66-76% UR (a) e à 0°C e 95-97% UR (b). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4)

Figura 34 - Correlações entre o teor de compostos fenólicos (a), a atividade sequestrante do radical DPPH (b) e a porcentagem de inibição relativa pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico em folhas de alfaces colhidas no verão e no inverno e armazenadas em condição ambiente monitorada e em refrigeração

6 CONCLUSÕES

- Os parâmetros fisiológicos analisados evidenciaram grande similaridade em relação ao comportamento pós-colheita das duas cultivares, o que significa que a ‘Piraroxa’ pode representar uma cultivar de alto valor agregado, em decorrência de sua coloração e de seus atributos nutricionais e agrônômicos, sem que isso a diferencie de outras cultivares ao longo da cadeia produtiva;
- A durabilidade e manutenção das características qualitativas das hortaliças durante o armazenamento refrigerado foi extremamente satisfatória e pode indicar avanços para sua estocagem por estabelecimentos comerciais e serviços de alimentação, além de representar uma excelente possibilidade para o transporte de alfaces para regiões em que estas hortaliças não são produzidas;
- O conteúdo de antocianinas foi influenciado pela temperatura de armazenamento e não demonstrou estar diretamente relacionado ao potencial antioxidante da cv. Piraroxa;
- A atividade da enzima polifenoloxidase não foi influenciada pela temperatura de armazenamento e a cv. Vanda apresentou atividade superior na colheita de verão;
- As variáveis relacionadas ao potencial antioxidante das hortaliças foram influenciadas pela época de colheita, apresentando valores superiores na colheita de verão. A cv. Piraroxa apresentou teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante superior a cv. Vanda em ambas as épocas de colheita e condições de armazenamento;
- A alface constitui fonte dietética importante de antioxidantes.

REFERÊNCIAS

- ABDILLE, M.H.; SINGH, R.P.; JAYAPRAKASHA, G.K.; JENA, B.S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, London, v. 90, n. 4, p. 891-896, 2005.
- AGÜERO, M.V.; BARG, M.V.; YOMMI, A.; CAMELO, A.; ROURA, S.I. Postharvest changes in water status and chlorophyll content of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and their relationship with overall visual quality. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 73, n. 1, p. S47-S55, 2008.
- ALTUNKAYA, A.; GÖKMEN, V. Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content on fresh lettuce (*Lactuca sativa*). **Food Chemistry**, London, v. 107, n. 3, p. 1173-1179, 2008.
- ARABBI, P.R.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 5, p. 1124-1131, 2004.
- BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química do processamento de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2001. 143 p.
- BORCIONI, E. **Equações de estimativa do crescimento do sistema radicular e produção de fitomassa de alface hidropônica**. 2008. 74 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.
- BOX, G.E.P.; COX, D.R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society**, Series B (Methodological), London, v. 26, n. 2, p. 211-252, 1964.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.
- CALDWELL, C.R. Alkylperoxyl radical scavenging activity of red leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 16, p. 4589-4595, 2003.
- CHANDRA, D.; MATSUI, T.; SUZUKI, H.; KOSUGI, Y. Postharvest changes in some physiological traits and activities of ammonia-assimilating enzymes in lettuce during storage. **Asian Journal of Plant Sciences**, Faisalabad, v. 5, n. 2, p. 378-384, 2006.
- _____. Changes in some physio-biochemical characteristics in lettuce during storage at low temperature. **Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v. 8, n. 2, p. 398-403, 2008.
- CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.

_____. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: glossário.** Lavras: UFLA, 2006. 256 p.

CHON, S.U.; BOO, H.O.; HEO, B.G.; GORINSTEIN, S. Anthocyanin content and the activities of polyphenol oxidase, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in lettuce cultivars. **International Journal of Food Science and Nutrition**, Abingdon, v. 63, n. 1, p. 45-48, 2012.

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

CHUTICHUDET, B.; CHUTICHUDET, P. Shading application on controlling the activity of polyphenol oxidase and leaf browning of 'Grand Rapids' lettuce. **International Journal of Agricultural Research**, Faisalabad, v. 6, n. 5, p. 400-409, 2011.

CRIFÒ, T.; PETRONE, G.; LO CICERO, L.; LO PIERO, A.R. Short cold storage enhances the anthocyanin contents and level of transcripts related to their biosynthesis in blood oranges. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, n. 1, p. 476-481, 2012.

DEGL'INNOCENTI, E.; PARDOSSI, A.; TOGNONI, F.; GUIDI, L. Physiological basis of sensitivity to enzymatic browning in 'lettuce', 'escarole' and 'rocket salad' when stored as fresh-cut products. **Food Chemistry**, London, v. 104, n. 1, p. 209-215, 2007.

EMMONS, C.L.; PETERSON, D.M.; PAUL, G.L. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. In vitro antioxidant activity and content of phenolic and tocol antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 12, p. 4894-4898, 1999.

FAHEY, J.W.; STEPHENSON, K.K.; DINKOVA-KOSTOVA, A.T.; EGNER, P.A.; KENSLER, T.W.; TALALAY, P. Chlorophyll, chlorophyllin and related tetrapyrroles are significant inducers of mammalian phase 2 cytoprotective genes. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 26, n. 7, p. 1247-1255, 2005.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na plantação e comercialização de hortaliças.** 3. ed. Viçosa: UFV, 2008. 421 p.

FINGER, F.L.; VIEIRA, G. **Controle da perda pós-colheita de água em produtos hortícolas.** Viçosa: UFV, 1997. 29 p.

FNP CONSULTORIA E COMÉRCIO. Alfaca. In. _____. **Agrianual 2012: anuário da agricultura brasileira.** São Paulo, 2012a. p. 137.

_____. Hortifrutícolas. In. _____. **Agrianual 2012: anuário da agricultura brasileira.** São Paulo, 2012b. p. 316-319.

FUKUMOTO, L.R.; TOIVONEN, P.M.A.; DELAQUIS, P.J. Effect of wash water temperature and chlorination on phenolic metabolism and browning of stored Iceberg lettuce photosynthetic and vascular tissues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 16, p. 4503-4511, 2002.

GARCÍA-MACÍAS, P.; ORDIDGE, M.; VYSINI, E.; WAROONPHAN, S.; BATTEY, N.H.; GORDON, M.H.; HADLEY, P.; JOHN, P.; LOVEGROVE, J.A.; WAGSTAFFE, A. Changes in the flavonoid and phenolic acid contents and antioxidant activity of red leaf lettuce (*Lollo Rosso*) due to cultivation under plastic films varying in ultraviolet transparency. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 25, p. 10168-10172, 2007.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 8, p. 2928-2935, 2005.

HEDGES, L.J.; LISTER, C.E. **Nutritional attributes of salad vegetables**. New Zealand Institute for Crop and Food Research Limited, 2005 (Crop and Food Research Confidential Report, 1473). Disponível em: <<http://www.vegetables.co.nz>>. Acesso em: 13 jun. 2012.

HEIMLER, D.; ISOLANI, L.; VIGNOLINI, P.; TOMBELLI, S.; ROMANI, A. Polyphenol content and antioxidative activity in some species of fresh consumed salads. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 5, p. 1724-1729, 2007.

HODGSON, J.M.; CROFT, K.D. Dietary flavonoids: effect on endothelial function and blood pressure. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 86, n. 15, p. 2492-2498, 2006.

HUBER, L.S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 1, p. 97-108, 2008.

KADER, A.A. **Postharvest technology of horticultural crops**. 3rd ed. Oakland: University of California, 2002. 535 p.

KIM, H.J.; FONSECA, J.M.; CHOI, J.H.; KUBOTA, C. Effect of methyl jasmonate on phenolic compounds and carotenoids of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 25, p. 10366-10372, 2007.

KRAVAYAN, D.; AYDEMIR, T. Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). **Food Chemistry**, London, v. 74, n. 2, p. 147-154, 2001.

LEE, J.H. Extending shelf-life of leaf lettuce using active packaging. **Journal of Food Technology**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 14-19, 2008.

LEE, J.H.; FELIPE, P.; YANG, Y.H.; KIM, M.Y.; KWON, O.Y.; SOK, D.E.; KIM, H.C.; KIM, M.R. Effects of dietary supplementation with red-pigmented leafy lettuce (*Lactuca sativa*) on lipid profiles and antioxidant status in C57BL/6J mice fed a high-fat high-cholesterol diet. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 101, n. 8, p. 1246-1254, 2009.

LEES, D.H.; FRANCIS, F.J. Standardization of pigment analysis in cranberries. **HortScience**, Alexandria, v. 7, n. 1, p. 83-84, 1972.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, New York, v. 148, p. 350-382, 1987.

LIU, X.; ARDO, S.; BUNNING, M.; PARRY, J.; ZHOU, K.; STUSHNOFF, C.; STONIKER, F.; YU, L.; KENDALL, P. Total phenolic content and DPPH[•] radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 40, n. 3, p. 552-557, 2007.

LLORACH, R.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, A.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; GIL, M.I.; FERRERES, F. Characterization of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. **Food Chemistry**, London, v. 108, n. 3, p. 1028-1038, 2008.

MACHADO, M.D.; SILVA, A.L. Distribuição de produtos provenientes da agricultura familiar: um estudo exploratório da produção de hortaliças. **Organizações Rurais e Agroindustriais**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 67-80, 2004.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 13, n. 6, p. 1091-1101, 1972.

MATTOS, L.M.; MORETTI, C.L.; CHITARRA, A.B.; CHITARRA, M.I.F. Atividade respiratória e evolução de etileno em alface crespa minimamente processada armazenada sob duas temperaturas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1985-1990, 2008.

MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; LEAL, F.L.L.; CAETANO, A.C.S.; NASCIMENTO, R.J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, London, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

MES, P.J.; MYERS, J.R. Increasing anthocyanin content in tomato fruit for improved antioxidant activity. **HortScience**, Alexandria, v. 39, n. 4, p. 869, 2004.

MOON, Y.J.; WANG, X.; MORRIS, M.E. Dietary flavonoids: effect on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 20, n. 2, p. 187-210, 2006.

MORETTI, C.L.; MATTOS, L.M. **Processamento mínimo de alface crespa**. Brasília, 2006. 7 p. (Comunicado Técnico, 36). Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br>>. Acesso em: 20 jun. 2012.

MULABAGAL, V.; NGOUAJIO, M.; NAIR, A.; ZHANG, Y.; GOTTUMUKKALA, A.L.; NAIR, M.G. *In vitro* evaluation of red and green lettuce (*Lactuca sativa*) for functional food properties. **Food Chemistry**, London, v. 118, n. 2, p. 300-306, 2010.

MURATA, M.; TANAKA, E.; MINOURA, E.; HOMMA, S. Quality of cut lettuce treated by heat shock: prevention of enzymatic browning, repression of phenylalanine ammonia-lyase activity and improvement on sensory evaluation during storage. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 68, n. 3, p. 501-507, 2004.

NICOLLE, C.; CARDINAULT, N.; GUEUX, E.; JAFFRELO, L.; ROCK, E.; MAZUR, A.; AMOUROUX, P.; RÉMÉSY, C. Health effect of vegetable-based diet: lettuce consumption improves cholesterol metabolism and antioxidant status in the rat. **Clinical Nutrition**, Edinburgh, v. 23, n. 4, p. 605-614, 2004.

NIJVELDT, R.J.; NOOD, E.V.; HOORN, D.E.C.V.; BOELEN, P.G.; NORREN, K.V.; LEEUWEN, P.A.M.V. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 74, n. 4, p. 418-425, 2001.

NISSIM-LEVI, A.; KAGAN, S.; OVADIA, R.; OREN-SHAMIR, M. Effects of temperature, UV-light and magnesium on anthocyanin pigmentation in cocoplum leaves. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 78, n. 1, p. 61-64, 2003.

ORAK, H.H. Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 111, n. 3, p.235-241, 2007.

PHILPOTT, M.; LIM, C.C.; FERGUSON, L.R. Dietary protection against free radicals: a case for multiple testing to establish structure-activity relationships for antioxidant potencial of anthocyanic plant species. **International Journal of Molecular Science**, Basel, v. 10, n. 3, p. 1081-1103, 2009.

REGITANO D'ARCE, M.A.B. Deterioração de lipídeos – ranço. In: OETTERER, M.; REGITANO D'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2006. p. 243-299.

REID, M.S. Ethylene in postharvest technology. In: KADER, A.A. **Postharvest technology of horticultural crops**. 3rd ed. Oakland: University of California, 2002. p. 149-162.

ROCHA, I.L. **As famílias botânicas das hortaliças folhosas**. Instituto Brasileiro de Qualidade em Horticultura, 2010. Disponível em: <<http://www.hortibrasil.org.br>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

SALA, F.C.; COSTA, C.P. 'PIRAROXÁ': Cultivar de alface crespa de cor vermelha intensa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 158-159, 2005.

SATO, G.S.; MARTINS, S.S.; CARVALHO, Y.M.C.; MILANI, A.A.; CUNHA, R.P. Uma abordagem sobre a comercialização de hortaliças produzidas na região do Alto Tietê. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 36-45, 2008.

SHAKED-SACHRAY, L.; WEISS, D.; REUVENI, M.; NISSIM-LEVI, A.; OREN-SHAMIR, M. Increased anthocyanin accumulation in aster flowers at elevated temperatures due to magnesium treatment. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 114, n. 4, p. 559-565, 2002.

SHVARTS, M.; BOROCHOV, A.; WEISS, D. Low temperature enhances petunia flower pigmentation and induces chalcone synthase gene expression. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 99, n. 1, p. 67-72, 1997.

SIES, H.; STAHL, W. Non-nutritive bioactive constituents of plants: lycopene, lutein and zeaxanthin. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, Bern, v. 73, n. 2, p. 95-100, 2003.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, New York, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SPOTO, M.H.F.; GUTIERREZ, A.S.D. Qualidade pós-colheita de frutas e hortaliças. In: OETTERER, M.; REGITANO D'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2006. p. 403-252.

SUTHUMCHAI, W.; MATSUI, T.; KAWADA, K.; KOSUGI, Y. Changes in acid invertase activity and sugar contents in lettuce during storage at ambient temperature. **Asian Journal of Plant Sciences**, Faisalabad, v. 5, n. 2, p. 304-310, 2006.

_____. Sugar metabolizing enzymes activities in lettuce head during low temperature storage. **Asian Journal of Plant Sciences**, Faisalabad, v. 6, n. 4, p. 568-576, 2007.

TIVERON, A.P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. 102 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; GIL, M.I.; CASTAÑER, M.; ARTÉS, F.; SALTVEIT, M.E. Effect of selected browning inhibitors on phenolic metabolism in stem tissue of harvested lettuce. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 3, p. 583-589, 1997.

TRANI, P.E.; TIVELLI, S.W.; PURQUERIO, L.F.V.; AZEVEDO FILHO, J.A. **Hortaliças: alface (*Lactuca sativa* L.)**. Campinas: IAC, Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Horticultura, 2005. (Boletim, 200). Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Alface>>. Acesso em: 25 maio 2012.

ZHOU, Y.H.; ZHANG, Y.Y.; ZHAO, X.; YU, H.J.; SHI, K.; YU, J.Q. Impact of light variation on development of photoprotection, antioxidants, and nutritional value in *Lactuca sativa* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 12, p. 5494-5500, 2009.