UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Influência hormonal de Metil Jasmonato na biossíntese de compostos voláteis associados ao amadurecimento em tomate *Grape* (*Solanum lycopersicum*) e pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*)

Hilton César Rodrigues Magalhães

Dissertação para obtenção do grau de Mestre
em Ciência dos Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Purgatto

São Paulo

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

Influência hormonal de Metil Jasmonato na biossíntese de compostos voláteis associados ao amadurecimento em tomate *Grape* (*Solanum lycopersicum*) e pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*)

Hilton César Rodrigues Magalhães

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do grau de Mestre
em Ciência dos Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Purgatto

São Paulo

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E
PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

RM188i
i Rodrigues Magalhães, Hilton César
Influência hormonal de Metil Jasmonato na
biossíntese de compostos voláteis associados ao
amadurecimento em tomate Grape (*Solanum
lycopersicum*) e pimenta malagueta (*Capsicum
frutescens*) / Hilton César Rodrigues Magalhães. -
São Paulo, 2017.
118 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Purgatto, Eduardo

1. Compostos Voláteis. 2. Hormônios. 3. Expressão
gênica . 4. Tomate . 5. Pimenta. I. T. II.
Purgatto, Eduardo , orientador.

Hilton César Rodrigues Magalhães

Influência hormonal de Metil Jasmonato na biossíntese de compostos voláteis associados ao amadurecimento em tomate *Grape* (*Solanum lycopersicum*) e pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*)

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Eduardo Purgatto

Orientador/Presidente

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

São Paulo, de Novembro de 2017

*Aos meus pais, Hilton Magalhães (in memoriam) e
Sonia Rodrigues, pelo incentivo, carinho, atenção,
amor e por sempre acreditarem em mim.*

A minha família e amigos.

DEDICO E OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Eduardo Purgatto, o Edu, por todo o ensinamento, atenção, paciência, motivação e por ser um exemplo de profissional.

Aos professores Beatriz Cordenunsi, Luciano Freschi e Poliana Spricigo pelas importantes contribuições dadas ao trabalho na minha banca de qualificação.

Às técnicas Lúcia Justino, Luciene Lauer e Aline Santos por toda a atenção e colaboração.

Aos componentes do meu grupo de pesquisa, em especial, Laís Moro, Sílvia Rivero e Isabel Massaretto pelas inúmeras vezes em que se propuseram a ajudar, além das contribuições bastante importantes.

À Janayra Texeira e Mayra Batista pelos bons momentos de descontração no laboratório.

A todos os professores e alunos do Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos, por terem sido tão cordiais e atenciosos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade concedida para a realização desse mestrado.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), em especial a minha unidade, Embrapa Agroindústria Tropical, pelo incentivo, atenção e oportunidade.

À amiga de Embrapa, Deborah Garruti, pelas importantes ponderações, correções, além de ter aceitado ser minha orientadora acadêmica, papel que desempenhou muito bem.

A Gustavo Saavedra, que ajudou muito na viabilização da minha licença da Embrapa.

A todos os colegas e amigos da Embrapa, que sempre ajudaram e estiveram torcendo muito para a realização desse mestrado.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

RESUMO

MAGALHÃES, H. C. R. **Influência hormonal de Metil Jasmonato na biossíntese de compostos voláteis associados ao amadurecimento em tomate *Grape* (*Solanum lycopersicum*) e pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*)**. 2017. 118p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2017.

O amadurecimento é um processo complexo formado por alterações metabólicas, que ocorrem após o fruto atingir a sua maturidade fisiológica. O tomate é um fruto climatérico, usado como modelo para estudo do papel do etileno durante o amadurecimento. A pimenta é um fruto não-climatérico, pertencente à mesma família que o tomate, e por conta disso, pode apresentar similaridades no desenvolvimento de diversos atributos de qualidade durante o amadurecimento, como o aroma. A maioria dos compostos voláteis em frutos deriva dos carboidratos, lipídeos e aminoácidos, sendo a via das lipoxigenases a responsável pela formação de voláteis C6. Devido a sua importância no processo de regulação do amadurecimento em frutos, o etileno possui um papel fundamental para a formação do aroma, no entanto, outros hormônios como o metil jasmonato (MeJA), também possuem um papel importante nesse processo. O presente trabalho visa avaliar os papéis dos hormônios etileno e MeJA na formação dos compostos voláteis do aroma em tomate *Grape* (*Solanum lycopersicum*) e pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) durante o amadurecimento. Os frutos foram tratados com MeJA, Etileno, 1MCP e MeJA+1MCP, com posteriores análises de voláteis e níveis dos transcritos de genes para as enzimas lipoxigenase (LOX), álcool desidrogenase (ADH) e hidroperóxido liase (HPL), que participam da formação dos voláteis derivados da via dos ácidos graxos. Os resultados mostraram que os tratamentos hormonais causaram mudanças claras na composição do aroma de pimenta e tomate, mas muitos desses resultados deixaram evidente a natureza climatérica e não-climatérica desses frutos. Diferentemente do que aconteceu em pimenta, foi possível visualizar uma íntima relação entre MeJA e etileno na formação do aroma em tomate, principalmente nos voláteis derivados da via dos carotenoides. Em tomate, foi possível observar que a expressão dos transcritos dos genes da via dos ácidos graxos, *LOX*, *ADH* e *HPL*, e da via dos carotenoides, *CCD1A* e *CCD1B*, foi diminuída pela ação de 1MCP, mesmo quando esteve associado à MeJA. O tratamento com MeJA aumentou voláteis C6 em pimenta e tomate. Particularmente em tomate, essa elevação foi associada ao aumento na expressão de *LOXC* e *HPL*, um dia após a aplicação do hormônio. Quando o tomate se tornou completamente maduro, não foram constatadas tantas diferenças em relação aos outros tratamentos, exceto pelo aumento evidente dos compostos derivados da via dos carotenoides, beta-ionona e 6-metil-5-hepten-2-ol. No primeiro dia de tratamento com MeJA em pimenta, verificou-se um aumento evidente nos níveis da maioria dos ésteres, inclusive os hexílicos de cadeia alifática, que são derivados dos voláteis C6 da via dos ácidos graxos. Além disso, também apresentaram aumento evidente, logo no primeiro dia após o tratamento com MeJA, os compostos 2-isobutil-3-metoxipirazina e 3-careno, sendo esses dois últimos os compostos que fornecem a nota aromática mais característica de pimenta. Quando as pimentas amadureceram completamente, constatou-se um aumento estatisticamente significativo, proporcionado por MeJA, nos voláteis C6 (E)-2-hexen-1-ol, 3-hexen-1-ol e hexanal, sendo esse último um dos grandes contribuidores para o aroma desse fruto.

Palavras-chave: etileno, MeJA, compostos voláteis, frutos climatéricos, frutos não-climatéricos.

ABSTRACT

MAGALHÃES, H. C. R. **Hormone influence of Methyl Jasmonate on the biosynthesis of volatile compounds associated with maturation in tomato Grape (*Solanum lycopersicum*) and chilli pepper (*Capsicum frutescens*)**. 2017. 118p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2017.

Ripening is a complex process formed by metabolic changes that occur after fruit physiological maturity. Tomato is a climacteric fruit, used as a model to study the role of ethylene during ripening. Pepper is a non-climacteric fruit, belonging to the same family as the tomato, and because of this, may present similarities in the development of several attributes of quality during maturation, such as aroma. Most of volatile compounds in fruits derives from carbohydrates, lipids and amino acids, and lipoxygenases pathway is responsible for C6 volatiles production. Due to its importance in the fruit ripening regulation process, ethylene plays an important role in aroma production; however, other hormones, such as methyl jasmonate (MeJA), also play a significant role during fruit ripening. The present work aims to evaluate the roles of ethylene and MeJA hormones in the formation of aroma compounds in tomato Grape (*Solanum lycopersicum*) and chili pepper (*Capsicum frutescens*) during ripening. Fruits were treated with MeJA, Ethylene, 1MCP in MeJA+1MCP, followed by analysis of volatile compounds and levels of gene transcripts for the enzymes lipoxygenase (LOX), alcohol dehydrogenase (ADH) and hydroperoxide lyase (HPL), which participate of production of volatile compounds derived from the fatty acid pathway. The results showed that hormonal treatments caused changes in pepper and tomato aroma composition, but many of these results made evident the climacteric and non-climacteric nature of these fruits. Unlike what happened in pepper, it was possible to visualize an intimate relationship between MeJA and ethylene under the tomato aroma compounds, mainly in the formation of carotenoid-derived volatiles. In tomato, it was possible to observe that the expression of the fatty acid pathway gene transcripts, *LOX*, *ADH* and *HPL*, and carotenoid pathway, *CCD1A* and *CCD1B*, were reduced by 1MCP action, even when it was associated with MeJA. MeJA treatment increased C6 volatiles in pepper and tomato. Particularly in tomato, this elevation was associated with an increase in the *LOXC* and *HPL* expression, one day after the hormone treatment. When tomato became fully mature, there were not so many differences compared to the other treatments, except for the evident increase of the carotenoid-derived volatile compounds, beta-ionone and 6-methyl-5-hepten-2-ol. On the first day of treatment with MeJA in pepper, there was a clear increase in the levels of most esters, including the aliphatic chain hexils, which are derived from the C6 volatiles of the fatty acid pathway. In addition, 2-isobutyl-3-methoxypyrazine and 3-carene compounds also showed evident increase, the first two days after treatment with MeJA, the latter two being the compounds that provide the most characteristic aromatic note of pepper. When the peppers reach their complete maturation, there was an increase, under MeJA treatment, in the C6 volatiles (E)-2-hexen-1-ol, 3-hexen-1-ol and hexanal, which is one of the most important aroma compounds in peppers.

Key words: ethylene, MeJA, volatile compounds, climacteric fruits, non-climacteric fruits.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais precursores e vias de formação de compostos voláteis em plantas	23
Figura 02. Produção de compostos voláteis do aroma de plantas a partir do ácido linolênico	25
Figura 3: Biossíntese de compostos voláteis de cadeia ramificada derivados da via dos aminoácidos	26
Figura 04. Biossíntese de compostos voláteis fenólicos derivados da via dos aminoácidos mais relevantes em tomates	27
Figura 05. Biossíntese de compostos voláteis pela via dos isoprenoides em célula vegetal	28
Figura 06. Biossíntese de compostos voláteis pela via dos carotenoides	29
Figura 7. Modelo de biossíntese de etileno proposta por Yang e Hoffman (1984)	31
Figura 8. Modelo de Sinalização do Etileno	32
Figura 09. Biossíntese de metil jasmonato envolvendo cloroplasto, citoplasma e peroxissomo	35
Figura 10. Modelo de sinalização de jasmonatos em <i>Arabidopsis</i>	35
Figura 11: Perfis de produção de etileno para Tomate <i>Grape</i> (<i>Solanum lysopersicum</i>), submetidos a tratamentos hormonais	50
Figura 12. Análise colorimétrica da casca de Tomate <i>Grape</i> (<i>Solanum lysopersicum</i>), submetidos a tratamentos hormonais durante o amadurecimento	51
Figura 13. Fotos de Tomates <i>Grape</i> (<i>Solanum lysopersicum</i>), submetidos a tratamentos hormonais, durante o amadurecimento	52
Figura 14. Perfis de produção de etileno para Pimenta Malagueta (<i>Capsicum frutescens</i>), durante o primeiro experimento, submetidos a tratamentos hormonais	53
Figura 15. Análise colorimétrica da casca de Pimenta Malagueta (<i>Capsicum frutescens</i>) durante o primeiro experimento, submetidos a tratamentos hormonais	53

Figura 16. Fotos de Pimentas Malagueta (<i>Capsicum frutescens</i>) durante o primeiro experimento, submetidos a tratamentos hormonais	55
Figura 17. Perfil comparativo das expressões relativas de genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de compostos voláteis derivados de ácidos graxos em tomate <i>Grape</i> (<i>Solanum lycopersicum</i>) e pimenta malagueta (<i>Capsicum frutescens</i>), de acordo com os grupos Controle, MeJA, Etileno, 1MCP e MeJA+1MCP.	65
Figura 18. Análises multivariadas dos compostos voláteis de tomate <i>Grape</i> no Dia 01, após tratamentos hormonais. A) Análise de agrupamento hierárquico e Heatmap. B) Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) em 2D e seu respectivo gráfico em 3D.	69
Figura 19. Representação em boxplot da distribuição dos compostos voláteis C6 de tomate <i>Grape</i> no Dia 01, após tratamentos hormonais.	70
Figura 20. Análises multivariadas dos compostos voláteis de pimenta malagueta (<i>Capsicum frutescens</i>) no Dia 01, após tratamentos hormonais. A) Análise de agrupamento hierárquico e Heatmap. B) Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) em 2D e seu respectivo gráfico em 3D.	71
Figura 21. Representação em boxplot da distribuição dos compostos voláteis ésteres hexílicos de cadeia alifática de pimenta malagueta no Dia 01, após tratamentos hormonais.	71
Figura 22. Representação em boxplot da distribuição dos compostos voláteis C6 de pimenta malagueta no Dia 01, após tratamentos hormonais.	72
Figura 23. Análises multivariadas dos compostos voláteis de tomate <i>Grape</i> no Dia 02 após tratamentos hormonais. A) Análise de agrupamento hierárquico e Heatmap. B) Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) em 2D e seu respectivo gráfico em 3D.	73
Figura 24. Análises multivariadas dos compostos voláteis de pimenta malagueta no Dia 03, após tratamentos hormonais. A) Análise de agrupamento hierárquico e Heatmap. B) Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) em 2D e seu respectivo gráfico em 3D.	74
Figura 25. Análises multivariadas dos compostos voláteis de tomate <i>Grape</i> no Dia 04 após tratamentos hormonais. A) Análise de agrupamento hierárquico e Heatmap. B) Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) em 2D e seu respectivo gráfico em 3D.	75
Figura 26. Análises multivariadas dos compostos voláteis de pimenta malagueta no Dia 06, após tratamentos hormonais. A) Análise de agrupamento hierárquico e Heatmap. B) Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) em 2D e seu respectivo gráfico em 3D.	76
Figura 27. Análises multivariadas dos compostos voláteis de tomate <i>Grape</i> no Dia 08 após tratamentos hormonais. A) Análise de agrupamento hierárquico e Heatmap. B) Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) em 2D e seu respectivo gráfico em 3D.	77

Figura 28. Análises multivariadas dos compostos voláteis de pimenta malagueta no Dia 09, após tratamentos hormonais. A) Análise de agrupamento hierárquico e Heatmap. B) Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) em 2D e seu respectivo gráfico em 3D.	78
Figura 29. Análises multivariadas dos compostos voláteis de tomate <i>Grape</i> no Dia 10 após tratamentos hormonais. A) Análise de agrupamento hierárquico e Heatmap. B) Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) em 2D e seu respectivo gráfico em 3D.	80
Figura 30. Análises multivariadas dos compostos voláteis de pimenta malagueta no Dia 12 após tratamentos hormonais. A) Análise de agrupamento hierárquico e Heatmap. B) Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) em 2D e seu respectivo gráfico em 3D.	81
Figura 31. Representação em boxplot da distribuição dos compostos voláteis mais importantes do aroma de tomate <i>Grape</i> (<i>Solanum lysopersicum</i>) no Dia 10, após tratamentos hormonais.	82
Figura 32. Representação em boxplot da distribuição dos compostos voláteis mais importantes do aroma de pimenta no Dia 12, após tratamentos hormonais.	83
Figura 33. Perfil comparativo das expressões relativas de genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de compostos voláteis, CCD1A e CCD1B, derivados de carotenoides em tomate <i>Grape</i> (<i>Solanum lycopersicum</i>), de acordo com os grupos Controle, MeJA, Etileno, 1MCP e MeJA+1MCP.	84
Figura 34. Representação do metabolismo dos compostos voláteis derivados dos carotenoides com boxplot dos compostos do aroma, originados por essa via, identificados em tomate <i>Grape</i> .	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Sequência de nucleotídeos utilizados nas análises de RT-PCR.	46
Tabela 02. Descrição dos compostos voláteis, com respectivos nota aromática e precursor biossintético, identificados em tomate Grape (<i>Solanum lycopersicum</i>) por análise de SPME em GCMS.	58
Tabela 03. Descrição dos compostos voláteis, com respectivos nota aromática e precursor biossintético, identificados em pimenta malagueta (<i>Capsicum frutescens</i>) por análise de SPME em GCMS.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1MCP: 1-metilciclopropeno

AADC: *Aromatic amino acid decarboxylase*

ACC: 1-aminociclopropano 1-carboxílico

ACO: ACC oxidase

ACS: ACC sintase

ADH: Álcool desidrogenase

ANOVA: Análise de Variância

AAT: Álcool acetil transferase

CAR/DVB/PDMS: carboxeno, divinilbenzeno e polimetilsiloxano

CAS: *Chemical Abstracts Service*

CCD: *Carotenoid cleavage dioxygenase*

cDNA: DNA complementar

COMT1: Catecol-O-metiltransferase

DMAPP: Dimetilalil difosfato

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNase: Desoxirribonuclease

EIN: *Ethylene insensitive*

ERF: *Ethylene responsive fator*

FDR: *False Discovery Rate*

FPPS: Farnesila sintase

FPP: Pirofosfato de farnesila

GCMS: *Gas Chromatography Mass Spectrometry*

GPPS: Pirofosfato de geranial sintase

GGPPS: Pirofosfato de geranial geranial sintase

HPL: Hidroperóxido liase

IPP: Difosfato de isoprenila

LOX: Lipoxigenase

MeJA: Metil jasmonato

MEP: Fosfato de metileritritol

MVA: Ácido mevalônico

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PLS-DA: *Partial Least Square Discriminant Analysis*

RNA: Ácido ribonucléico

SAM: S-adenosil-L-metionina

SISAMT: ácido salicílico metiltransferase

SMAS: S-adenosil-L-metionina sintase

SPME: *Solid Phase Microextraction*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. AMADURECIMENTO DO FRUTO.....	18
1.2. COMPOSTOS VOLÁTEIS DE PIMENTA	20
1.3. COMPOSTOS VOLÁTEIS DE TOMATE	21
1.4. BIOSÍNTESE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS	22
1.5. ETILENO.....	30
1.6. METIL JASMONATO.....	34
2. OBJETIVO	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1. FRUTOS E TRATAMENTOS HORMONAIS.....	39
3.1.1. Tomates.....	39
3.1.2. Pimentas.....	41
3.2. ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS.....	42
3.3. CARACTERIZAÇÃO DO AMADURECIMENTO	43
3.3.1. Análise de etileno dos frutos	43
3.3.2. Análise de cor	44
3.4. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR QRT-PCR.....	44
3.4.1. Extração de RNA, purificação e síntese de DNA complementar (cDNA)	44
3.4.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional e Oligonucleotídeos (<i>primers</i>) utilizados na amplificação dos genes <i>LOX</i> , <i>ADH</i> e <i>HPL</i>	45
3.4.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.....	45
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1. CARACTERIZAÇÃO DO AMADURECIMENTO	48
4.1.1. Tomate Grape.....	48
4.1.2. Pimenta malagueta.....	52
4.2. COMPOSTOS VOLÁTEIS.....	55
4.2.1. Expressão dos genes que codificam as principais enzimas da via dos ácidos graxos de tomate Grape e pimenta malagueta	64
4.2.2. Comportamento dos compostos voláteis durante o amadurecimento de tomate Grape e pimenta malagueta, após tratamentos hormonais	66
4.2.3. Compostos voláteis derivados da via dos carotenoides em tomate Grape	83
5. CONCLUSÃO.....	87
6. MATERIAL SUPLEMENTAR	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

1. INTRODUÇÃO

1.1. AMADURECIMENTO DO FRUTO

O amadurecimento de um fruto é um processo fisiológico complexo que envolve mudanças bioquímicas inter-relacionadas. Essas alterações ocorrem devido a mudanças na atividade de enzimas ligadas a processos metabólicos, que, por sua vez, são decorrentes de alterações no padrão da expressão de centenas ou milhares de genes associados a processos bioquímicos no fruto. As mudanças observadas na transição do fruto verde para maduro implicam no desenvolvimento de atributos sensoriais que incluem alterações na textura, síntese e degradação de pigmentos, alterações nas concentrações de ácidos orgânicos e açúcares, além de acúmulo de compostos voláteis (DEFILIPPI, et al., 2009; KLEE, et al., 2014).

A diminuição da firmeza nos frutos, com consequente amolecimento, ocorre devido à perda de coesão entre as células. Isso acontece pela ação coordenada e interdependente de enzimas, que modificam a rede de polissacarídeos formadores da parede celular, sendo as frações mais afetadas as pectinas, que são alvos das poligalacturonases, pectina metilesterases e beta-galactosidases; e as hemiceluloses, degradadas pelas celulasas e galactosidases. Como os frutos diferem em suas características botânicas, composição de proteínas e polissacarídeos, estrutura da parede celular, metabolismo enzimático, crescimento e comportamento ao amolecimento, sabe-se que as mudanças na textura podem variar não apenas entre as espécies, mas também entre as diferentes cultivares do mesmo fruto (AMMUAYSIN et al., 2012; GOULAO et al., 2008; PALIYATH e MURR, 2008; PAYASI et al., 2009).

Durante o amadurecimento o acúmulo de açúcares é um fator importante na determinação das características sensoriais do fruto, além de ser útil como material de reserva energética para o metabolismo. O amido é um carboidrato de reserva, que é acumulado durante os primeiros momentos do desenvolvimento de muitos frutos (tomates, pimentas, kiwi, banana, manga, entre outros), mas que declina com o amadurecimento, através de enzimas como a α -amilase e β -amilase. Os carboidratos mais largamente distribuídos entre os frutos são glicose, sacarose e frutose, cujas concentrações aumentam com o amadurecimento, o que contrasta com as concentrações de ácidos orgânicos, que diminuem com o

amadurecimento (BECKLES et al., 2011; CARRARI et al., 2006; CHERIAN et al., 2014; KORTSTEE et al., 2007).

A acidez dos frutos também é um importante componente das características sensoriais e se dá, principalmente, devido à presença dos ácidos málico e cítrico, os principais ácidos orgânicos presentes em frutos maduros. A concentração desses ácidos diminui consideravelmente durante o amadurecimento, devido ao seu uso como fonte de energia na respiração e também como fonte de carbono para a produção de açúcares, tornando os frutos doces. Tem sido proposto que o ácido málico é um importante componente no metabolismo transitório de amido durante o desenvolvimento de tomates, já em pimentas, há uma correlação positiva entre os níveis de ácido málico e genes envolvidos na síntese de amido (CHERIAN et al., 2014; ETIENNE et al., 2013).

A alteração da cor também é um outro atributo de qualidade bastante importante em frutos. A mudança de cor durante o amadurecimento ocorre devido à degradação da clorofila e biossíntese de pigmentos como as antocianinas, um flavonoide derivado da via bioquímica dos fenilpropanoides e que conferem coloração de vermelho alaranjado à violeta e azul em folhas, flores, frutos. Um outro importante grupamento de pigmentos são os carotenoides, que são isoprenoides responsáveis pela coloração amarela a vermelha em flores e frutos (TANAKA et al., 2008).

Nos tomates, a produção de carotenoides acontece por meio da ação das enzimas fitoeno desaturase e fitoeno sintase, responsáveis, respectivamente, pela transformação do fitoeno em licopeno, que aumenta em cerca de 10 a 14 vezes no período do amadurecimento. Os cloroplastos também se transformam, tornando-se estruturas de armazenamento de carotenoides, os cromoplastos (DHAR et al., 2014; TOHGE et al., 2013; YUAN et al., 2015). Em pimentas, a síntese de carotenoides resulta nas cores amarela, laranja e vermelha. O fruto vermelho possui predominantemente o carotenoide capsantina. As variedades com frutos amarelos contêm primariamente luteína e alfa e beta caroteno (dependendo da variedade). Em geral, os maiores níveis de carotenoides totais são encontrados em variedades mais vermelhas (GOMEZ-GÁRCIA et al., 2013).

Durante o amadurecimento, os frutos produzem compostos voláteis que determinam características de sabor e aroma requeridas pelos consumidores. Sendo assim, eles são importantes indicadores dos estágios de maturação e qualidade de frutos. O sabor é a soma de um grande conjunto de metabólitos primários e secundários que são percebidos pelo

paladar (doce, salgado, amargo e azedo) e pelo sistema olfativo, ou seja, o sabor é a combinação das sensações de gosto e aroma. O sabor característico de um fruto resulta da combinação complexa entre açúcares, ácidos orgânicos, sais, alcaloides, flavonoides e compostos voláteis (HADI et al., 2013; FORNEY, 2008).

Todas as plantas são capazes de emitir compostos voláteis e o conteúdo e a composição dessas moléculas demanda uma variação genotípica e fenotípica. O aroma é uma mistura complexa de um grande número de compostos voláteis, cuja composição é específica para cada variedade e espécie de frutos. Apesar de diferentes frutos compartilharem muitas características odoríferas, cada fruto tem um aroma distinto que pode variar conforme a combinação dos compostos voláteis, suas concentrações ou a percepção limiar de cada composto individualmente (HADI et al., 2013; KADER, 2008).

1.2. COMPOSTOS VOLÁTEIS DE PIMENTA

As pimentas do gênero *Capsicum* são bastante populares em muitos países devido a sua cor, pungência e aroma. O estudo de aromas de pimentas tem sido largamente reportado, mas de forma descritiva em sua maioria.

Em estudo de compostos voláteis de *Capsicum frutescens*, durante três fases de amadurecimento, Liu et al. (2009) detectaram 85 compostos voláteis orgânicos sendo o 3-hexen-1-ol e o metanoato de hexila, os mais abundantes na fase verde. Na fase intermediária os compostos mais abundantes foram o 2-pentanol, ácido propanóico e 2-metilato de hexila. Já na fase mais madura o composto mais representativo foi o 3-heptadeceno.

Bogusz Junior et al. (2012) analisaram compostos voláteis de três variedades de *Capsicum* e identificaram um total de 168 compostos. Destes, 83 compostos, sendo principalmente álcoois e ésteres na *C. frutescens*, 49 compostos, sendo principalmente monoterpenos e aldeídos na *C. baccatum*, e 77 compostos, sendo principalmente ésteres e sesquiterpenos na *C. chinense*. Ziino et al. (2008) analisaram os compostos voláteis de *C. annum* e identificaram 64 compostos, entre álcoois, aldeídos, ácidos graxos, ésteres, cetonas, hidrocarbonetos, monoterpenos, sesquiterpenos e pirazinas. Verificaram que as classes químicas mais representativas foram os álcoois e aldeídos alifáticos, além de hidrocarbonetos de cadeia ramificada. Em particular, houve destaque para os seguintes compostos: hexanal, hexanol, cis-2-hexanal.

Nunes et al. (2008) e Zimmermann e Schieberle (2000) reportaram que a beta-ionona tem uma grande contribuição para o perfil aromático de pimentas no decorrer o amadurecimento. Além disso, a análise de componentes principais indicou que os compostos 3-hexen-1-ol e formiato de hexila foram os compostos mais ativos no estágio verde, enquanto que 2-pentanol e isobutirato de hexila foram os compostos mais importantes no estágio *breaker*. Já no estágio red, 3-heptadeceno foi o composto mais ativo.

Ziino et al (2008), em análise de compostos voláteis de *Capsicum annum*, identificaram 64 compostos, especificamente álcoois, aldeídos, ácidos graxos, ésteres, cetonas, hidrocarbonetos, monoterpenos, sesquiterpenos e pirazinas. As classes químicas mais representativas foram os álcoois e aldeídos alifáticos e hidrocarbonetos de cadeia ramificada. Em particular, houve destaque para os seguintes compostos: hexanal, hexanol, cis-2-hexanal.

1.3. COMPOSTOS VOLÁTEIS DE TOMATE

O sabor do tomate é constituído, principalmente, por compostos não-voláteis, como os açúcares frutose e glicose, juntamente dos ácidos cítrico e málico e de compostos voláteis típicos do sabor desse fruto (KLEE e GIOVANNONI, 2011; GÜLLER et al, 2014; MATHIEU et al, 2009).

Apesar de possuir mais de 400 substâncias voláteis já detectadas em diferentes variedades de tomate, um grupo de 15 a 20 compostos (dependendo do estudo) tem impacto na percepção humana. Esses compostos são de diferentes classes químicas e são derivados de nutrientes essenciais como aminoácidos (fenilalanina, leucina e isoleucina), ácidos graxos (ácidos linolênico e linoleico) e carotenoides (beta caroteno), o que sugere um processo de coevolução entre o tomate e seus predadores. (MATHIEU et al, 2009; RAMBLA et al, 2014; TIEMAN et al, 2006).

Sabe-se que o conteúdo da maior parte dos voláteis de tomate aumenta no decorrer do processo do amadurecimento. Isso permite inferir que a produção desses voláteis do aroma é altamente regulada ao nível transcricional de enzimas. A enzima lipoxigenase (LOX), juntamente com a hidroperóxido liase (HPL), convertem o ácido linoleico (18:2) e linolênico (18:3) em hexanal e cis-3-hexenal, além de outros C6 voláteis. O hexanal e cis-3-hexenal podem ser convertidos para hexanol e cis-3-hexenol, respectivamente, pela álcool desidrogenase (ADH). A enzima LOX também é importante na produção de compostos como 1-penten-3-ona, 1-penten-3-ol, pentanal e pentanol, compostos C5 voláteis, que juntamente

com os C6 voláteis são responsáveis pelo aroma verde do fruto e possuem papel importante no mecanismo de defesa das plantas (DUDAREVA et al., 2013; HADI et al., 2013; HASSAN et al., 2015; WANG et al., 2016).

Outros importantes compostos voláteis, encontrados no aroma do tomate, são os derivados de aminoácidos, como o fenilacetaldeído e o 3-metilbutanal, formados a partir de 2-fenilacetato e 1-nitro-3-metilbutanal por uma via enzimática ainda pouco esclarecida. Existem também os compostos são formados a partir de terpenoides (C10 e C15), cujo precursor primário é o isopreno. Finalmente vale destacar os compostos voláteis derivados de apocarotenoides, fruto da ação de enzimas carotenoide clivagem dioxigenases (CCDs), onde vale a pena destacar os compostos beta-ionona, 6-Metil-5-hepten-2-ona e geranilacetona (DEFILIPPI et al., 2009; BALDWIN et al., 2000; KRUMBEIN et al., 2004; MATHIEU et al., 2009).

O tomate é um fruto modelo nos estudos sobre o amadurecimento e as pesquisas relacionadas a seus compostos voláteis estão em estágio avançado. Nesse sentido, a abordagem sobre esse assunto se dá pelo estudo da biossíntese desses compostos do aroma.

1.4. BIOSSÍNTESE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

As vias biossintéticas da formação dos voláteis no amadurecimento de frutos são bem estabelecidas. Acredita-se que haja três grandes grupos de precursores de aromas em frutos: carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos (**Figura 1**). A partir do metabolismo de carboidratos são formados principalmente terpenos, pela via de isoprenoides; e furanonas, por vias secundárias, como o ciclo das pentoses-fosfato. A partir do metabolismo de aminoácidos são gerados alcoóis alifáticos, de cadeia ramificada ou aromáticos, carbonilas, ácidos e ésteres. Os aminoácidos podem ser precursores diretos ou indiretos, ou seja, formam compostos não-voláteis que necessitam de uma segunda transformação enzimática para a formação dos voláteis. Já o metabolismo de ácidos graxos é considerado o maior gerador de precursores de compostos voláteis, sendo catabolizados por duas grandes vias oxidativas: β -oxidação e a via das lipoxigenases (LOXs). A β -oxidação de ácidos graxos resulta na formação de acil-CoAs que são utilizadas pelas álcool aciltransferases (AAT) para a geração de ésteres voláteis. A maioria dos alcoóis, aldeídos, ácidos e ésteres encontrados no aroma de frutos são

gerados pela degradação oxidativa dos ácidos linoléico e linolênico, principais substratos das LOXs (PÉREZ e SANZ, 2008).

Figura 1. Principais precursores e vias de formação de compostos voláteis em plantas (Adaptado de Schwab et al., 2008).

A maioria dos voláteis de plantas são originados de ácidos graxos saturados e insaturados. Esses compostos são formados por basicamente três processos: α -oxidação, β -oxidação e pela via das lipoxigenases, sendo esta última a via mais importante para a produção de voláteis em tomates (RAMBLA et al, 2014). A via das LOXs origina aldeídos e álcoois C6 e C9, que são bastante importantes na contribuição do aroma em frutos. Os mais importantes substratos para a atividade de LOX são os ácidos graxos C18, ácido linolênico e, em menor grau, o ácido linoleico. A via das LOXs inicia com a catalisação da desidrogenação de ácidos graxos insaturados C18, convertendo-os em hidroperóxidos e finalmente, através da hidroperóxido liase (HPL) em compostos como os 3Z-hexenol, 2E-hexenal e 2E,6Z-nonadienal, que são isomerizados, através da catalisação da 3Z,2E-enal isomerase, formando os aldeídos C6 e C9. Em seguida, esses compostos são metabolizados pela álcool desidrogenase (ADH) para formar os álcoois correspondentes. Por fim, uma aciltransferase catalisa a formação de acetato de 3Z-hexenila a partir de 3Z-hexanol e acetil CoA. Além disso, uma 2-alcenal redutase pode reduzir o 2E-hexenal para formar o hexanal. A sequência da

reação também produz ácido jasmônico a partir dos hidroperóxidos do ácido linolênico, por uma reação de β -oxidação envolvendo as enzimas óxido aleno sintase (AOS), óxido aleno ciclase (AOC) e ácido 12-oxo-fitodienólico redutase. Em seguida, por mais uma reação de oxidação, o ácido jasmônico origina cis-jasmona e metil jasmonato, que dentre outras funções, estão envolvidos com o sistema de resposta ao estresse e produção de aroma para atração de insetos (**Figura 02**) (DEFILIPPI et al., 2009; HADI et al., 2013; RAMBLA et al., 2014; SHWAB et al., 2008).

Muitas pesquisas sobre compostos voláteis enfatizam o conteúdo de voláteis C5 e C6 como padrão de qualidade em frutos devido as suas contribuições para o aroma. Bai et al (2011), por exemplo, estudaram o efeito da refrigeração e aquecimento sobre a expressão dos genes *LOX*, *HPL* e *ADH* e verificaram que os níveis deles caem com a refrigeração e aquecimento, ocasionando diminuição de voláteis aldeídos e álcoois C6. Lan et al (2016) estudaram a evolução dos compostos voláteis livres e glicosidicamente ligados em uvas "Beibinghong" (*Vitis vinifera* *Vitis amurensis*) durante o amadurecimento e na conservação por congelamento. Os resultados mostraram que os voláteis C6 caem durante o processo de amadurecimento enquanto os terpenoides aumentam. García-Rojas et al (2016) estudaram os compostos voláteis derivados dos ácidos graxos durante o amadurecimento de abacates estocados em diferentes temperaturas. Os resultados obtidos indicaram que o etileno modulou a produção de ácido linoleico e hexanal. A expressão do gene *PamLOX* mudou, respondendo à aplicação de etileno, além disso, o estoque a frio não gerou mudanças significantes nos ácidos graxos e nível de expressão de genes, mas decresceu as concentrações de hexanal durante o amadurecimento. Por fim, devido a importância dos voláteis C5 para o aroma de tomate, Shen et al (2013) mostraram que a síntese de voláteis C5 é catalisada em parte por TomloxC, que é a mesma enzima responsável pela síntese de voláteis C6. Além disso, eles verificaram que a síntese de voláteis C5 é provavelmente independente de HPL, já que o silenciamento dos genes que expressam essa enzima ocasiona um aumento considerável desses compostos voláteis.

Figura 02. Produção de compostos voláteis do aroma de plantas a partir do ácido linolênico. AAT, acil CoA álcool transferase; ADH, álcool desidrogenase; AER, alcenal óxido redutase; AOC, aleno óxido ciclase; AOS, aleno óxido sintase; HPL, hidroperóxido liase; JMT, metil jasmonato transferase; LOX, lipoxigenase; OPR, ácido 12-oxo-fitodienpoico redutase; 3Z,2E-enal isomerase (Adaptado de Schwab et al., 2008).

Um número significativo de compostos considerados relevantes para o aroma de tomates é derivado da via dos aminoácidos, os quais podem ser agrupados em duas categorias: compostos de cadeia ramificada e compostos fenólicos. Os compostos de cadeia ramificada, advindos dessa via, possuem baixo peso molecular e alta volatilidade, alguns inclusive são considerados participantes do aroma de tomate, como 2-metilbutanal, 3-metilbutanol e 2-isobutiltiazole. A biossíntese dos compostos voláteis ramificados derivados da via dos aminoácidos não está completamente elucidada em frutos, apesar de que é bem definida em leveduras e bactérias e, nesses microorganismos, o mecanismo inicia-se com a deaminação ou transaminação do aminoácido, levando à formação do cetoácido correspondente (**Figura 03**). Subsequentemente um do α -hidroácido é formado pela ação de uma α -hidroácido desidrogenase. Uma descarboxilase pode agir sobre o cetoácido para dar origem a um aldeído, que pode ser reduzido a um álcool por uma álcool desidrogenase. Por fim, o cetoácido também pode sofrer a ação de uma cetoácido desidrogenase para formar uma acil-CoA, que, pela ação de uma fosfotransferase/quinase, dá origem a um ácido. Os álcoois, aldeídos e

ésteres de cadeia ramificada originam-se de aminoácidos de cadeia ramificada como leucina, isoleucina e valina (HADI et al., 2013; RAMBLA et al., 2014; SHWAB et al., 2008). Essa via parece ter alguma similaridade com a possível via dos aminoácidos em frutos, principalmente depois da identificação de uma pequena família de aminotransferases de aminoácidos de cadeia ramificada em tomates, que estariam implicadas com o primeiro passo do catabolismo de aminoácidos descrito acima (KOCHEVENKO et al. 2015, 2012; MALONEY et al., 2010).

Figura 3: Biossíntese de compostos voláteis de cadeia ramificada derivados da via dos aminoácidos (Adaptado de Schwab et al., 2008).

Os compostos fenólicos C6-C2, que provêm do metabolismo da fenilalanina, são provavelmente os mais importantes para o aroma do tomate. Esses compostos são originados pela descarboxilação da fenilalanina. Uma pequena família de descarboxilases chamada AADC's (*aromatic amino acid decarboxylases*) foi detectada em frutos de tomate (*LeAADC1A*, *LeAADC1B*, e *LeAADC2*) e está envolvida nas primeiras etapas da formação de voláteis derivados da fenilalanina (TIEMAN et al 2006). Esses genes codificam amina oxidases que viabilizam a produção de fenetilamina a partir de fenilalanina, que pode ser transformada em benznitrila ou 1-nitro-2-feniletano por enzimas ainda desconhecidas. Em seguida o composto 2-feniletanol, que é bastante importante para o perfil odorífero de diferentes espécies de tomate, é produzido a partir de fenilacetaldeído pela ação de fenilacetaldeído redutases PAR

1 e PAR 2. Outros grupos de compostos fenólicos também se originam a partir do catabolismo da fenilalanina (**Figura 04**).

Figura 04. Biossíntese de compostos voláteis fenólicos derivados da via dos aminoácidos mais relevantes em tomates. Os voláteis detectados em frutos estão em azul. Os genes caracterizados de tomates estão representados em vermelho. A abreviação dos genes segue: *CTOMT1*: catecol-O-metiltransferase 1; *LeAADC*: aminoácido aromático descarboxilase; *LePAR*: fenilacetaldéido redutases; *NSGT1*: non-smoky glicosiltransferase 1; *SISAMT*: ácido salicílico metiltransferase (Adaptado de RAMBLA et al., 2014).

Apesar de que o mecanismo ainda não esteja completamente descrito, assume-se que os compostos C6-C3 se originam pela ação de fenilalanina amônia liase (PAL) sobre a fenilalanina, produzindo ácido (E)-cinâmico (RAMBLA et al., 2014). Os outros passos bioquímicos a partir desse composto têm sido descritos em experimentos com tomate. Nesse sentido, o salicilato de metila é produzido devido a ação da enzima ácido salicílico metiltransferase (*SISAMT*), que age sobre o ácido salicílico. O guaiacol, um outro importante composto volátil do aroma em tomates, é formado a partir da ação da catecol-O-metiltransferase (*COMT1*) sobre o catecol. O eugenol provem da ação da eugenol sintetase sobre o acetato de coniferila (HADI et al., 2013; RAMBLA et al., 2014).

Quanto aos compostos voláteis derivados da via dos terpenoides, pode-se dizer que é uma classe que inclui uma grande variedade de compostos de estrutura complexa que estão entre os mais abundantes em tomates e pimentas.

Figura 05. Biossíntese de compostos voláteis pela via dos isoprenóides em célula vegetal. DMAPP: difosfato de dimetilalila; DXP: 1-deoxi-D-xilose-5-fosfato; DXS: 1-deoxi-D-xilose-5-sintase; DXR: 1-deoxi-D-xilose-5-redutase; FPP: fosfato de farnesila; G3P, gliceraldeído 3-fosfato; GPP: difosfato de geranila; GGPP: difosfato de geranil geranila; HMGR: hidroximetilglutaril-CoA redutase; IPP: difosfato de isopentila; MEP: metileritrol fosfato; MVA, ácido mevalônico (Adaptado de HADI et al., 2013).

Esses compostos são derivados de um precursor C₅ difosfato de isoprenila (IPP) e seu isômero alélico difosfato de dimetilalila (DMAPP), que é gerado em plantas superiores de duas maneiras independentes, localizados em compartimentos celulares separados. No citosol, IPP é derivado de duas vias longas, conhecidas por via do ácido mevalônico (MVA) que inicia-se com a condensação da acetil-CoA. Nos plastídeos, IPP é formada a partir de uma via MVA independente com piruvato e gliceraldeídos 3-fosfato como precursores diretos e fosfato de metileritritol (MEP) como intermediário chave. Existe uma espécie de interação entre as duas vias biossintéticas de IPP, particularmente dos plastídeos para o citosol (DUDAREVA et al., 2013; HADI et al., 2013). Nos plastídeos, o DMAPP gerado da via da MEP é usado por isopreno sintases para a formação do isopreno. No citosol e nos plastídeos, IPP e DMAPP são alvos de prenil transferases que produzem difosfato de prenil. No citosol a condensação

de duas moléculas de IPP e uma de DMAPP, catalisada por uma enzima pirofostato de farnesila sintase (FPPS), resulta na formação de pirofostato de farnesila (FPP) (C15), o precursor de sesquiterpenos. Nos plastídeos, a condensação de uma molécula de DMAPP catalisada por pirofostato de geranila sintase (GPPS) forma o pirofostato de geranila (C10), que é o precursor dos monoterpênos. Já a condensação de uma molécula de DMAPP com três moléculas de IPP, pela ação de pirofostato de geranil geranila (GGPPS), produz pirofostato de geranil geranila (GGPP), que é o precursor de diterpenos (**Figura 05**). Compostos como limoneno, linalool e α -terpineol estão presentes em frutos maduros e são grandes representantes de compostos voláteis terpenoides em tomates e pimentas (DUDAREVA et al., 2013; NAGEGOWDA et al., 2010; RAMBLA et al., 2014).

Os compostos voláteis derivados da via dos carotenoides são produzidos pela ação das enzimas carotenoide clivagem dioxigenases (CCDs), que catalisam a clivagem oxidativa sobre duplas ligações conjugadas dos carotenoides, formando os apocarotenoides, que sofrem transformações enzimáticas para dar origem a compostos como beta-ionona, geranilacetona e 6-metil-5-hepten-2-ona (**Figura 06**). Esses compostos voláteis podem aumentar até 10 a 20 vezes durante o amadurecimento devido à ação dos genes que codificam CCDs, *LeCCD1A* e *LeCCD1B*, já identificados em tomates (RAMBLA et al., 2014; SERRA, 2015).

Figura 06. Biossíntese de compostos voláteis pela via dos carotenoides. Os substratos de carotenoides à esquerda são clivados oxidativamente para produzir os derivados de apocarotenoides à direita (Adaptado de Schwab et al., 2008).

As alterações que ocorrem nos frutos durante o amadurecimento são o resultado de mudanças na atividade de enzimas ligadas a processos metabólicos, que, por sua vez, são decorrentes de alterações no padrão da expressão de centenas ou milhares de genes associados a processos bioquímicos no fruto. Esses processos ocorrem sob regulação de hormônios, que têm o etileno como principal representante (KLEE, et al., 2014).

1.5. ETILENO

O etileno é um hormônio que está envolvido em muitos processos do ciclo de vida do vegetal como a germinação de sementes, nodulação de raízes, abscisão de folhas, morte celular programada, senescência de flores e amadurecimento de frutos (GUO, et al., 2003). A relação do etileno com o amadurecimento, já concebida há mais de um século, levou-o a ser denominado “hormônio do amadurecimento”, em virtude de evidências que apontam uma relação estreita entre este hormônio e a expressão de genes e proteínas de diversas vias metabólicas do amadurecimento.

Os frutos têm sido classificados de acordo com a presença de elevadas taxas de produção de etileno em associação com o aumento da taxa de respiração durante o amadurecimento. Nesse sentido, são classificados em frutos climatéricos e não-climatéricos. Os frutos climatéricos apresentam um aumento na taxa de respiração e na síntese de etileno durante o amadurecimento. Em contraste, os frutos não-climatéricos não demonstram uma mudança dramática na produção de etileno endógeno e apresentam manutenção ou um declínio na taxa de respiração após a colheita. Na verdade, não existe um modelo regulatório de maturação dominante em frutos não-climatéricos, até mesmo pelo fato de existirem outros processos etileno-independentes nesses frutos (ALEXANDER, et al., 2002; BARRY, et al., 2007; DEFILIPPI, et al., 2009).

O Etileno é sintetizado a partir de intermediários do ciclo da metionina, conforme descrito por Yang e Hoffman (1984), mostrado na **Figura 07**. A primeira reação da via envolve a conversão de metionina em S-adenosilmetionina (SAM), mediada pela enzima metionina adenosiltransferase. A SAM é então convertida a ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), pela enzima ACC sintase (S-adenosil-L-metionina metiltioadenosina liase). Em seguida o ACC é convertido pela ACC oxidase (1-aminocloropropano carboxilato oxidase) a etileno, gás carbônico e ácido cianídrico na presença de oxigênio. O etileno, por sua vez, se difunde pelos tecidos e se liga aos seus receptores associados predominantemente à

quando esses receptores estão ligados ao etileno, causam a remoção dessa supressão e levam à resposta ao hormônio (**Figura 08**).

Figura 08: Modelo de Sinalização do Etileno: Na ausência do hormônio (A), a proteína CTR1 encontra-se acoplada ao receptor de etileno (na figura, representado pelo SIETR3) localizado na membrana do Retículo Endoplasmático (RE). O conjunto forma um complexo ativo que fosforila a porção C-terminal da proteína EIN2 (também, localizada na membrana do RE) inibindo a migração desta porção para o núcleo. Desta forma, a sinalização do etileno encontra-se inibida. Na ausência do etileno, as proteínas F-box ETP1/2 marcam EIN2 para a degradação pelo sistema ubiquitina/proteossomo 26S. A ligação do etileno (B) ao receptor provoca uma alteração conformacional neste que leva ao desacoplamento da proteína CTR1 e, por consequência, a cessação da fosforilação da porção C-terminal de EIN2. Esta migra para o núcleo onde irá ativar as proteínas EIN3/EILs. Estes mecanismos de migração e interação da proteínas ainda são desconhecidos. As proteínas EIN3/EILs também são marcadas por proteínas F-box (EBF1/2), na ausência de etileno, e são direcionadas a degradação. Os fatores EIN3/EILs ligam-se aos Primary Ethylene Response Elements (PERE), localizados nas regiões promotoras dos fatores de resposta a etileno (ERFs) e promovem sua transcrição. Após a tradução, estes ERFs ligam-se nas regiões GCC-box do genes responsivos a etileno (ex. fitoeno sintase, poligalacturonase, E8, etc.) promovendo sua transcrição e, por consequência, as respostas ao hormônio. (Adaptado de Jua et al. 2012)

A regulação da biossíntese de etileno é um fator crítico na preservação da qualidade de frutos. Nesse sentido, é importante entender os mecanismos pelos quais esse hormônio promove sua ação no vegetal. O armazenamento em atmosfera controlada e sob baixas taxas de oxigênio, por exemplo, reduz a produção de etileno. A absorção de etileno também é uma prática comum para facilitar a estocagem de frutos. Abordagens biotecnológicas têm buscado reduzir a produção de etileno nos tecidos vegetais através da inibição da expressão das enzimas ACC sintase e ACC oxidase, usando tecnologia de RNA anti-sentido (PALIYATH e MURR, 2008).

O desenvolvimento de novas tecnologias de cultivo, produção e manejo de pós-colheita de frutos tem priorizado rendimento, aparência e resistência à degradação física em detrimento ao sabor e o aroma. Isso acontece porque existe uma relação inversamente proporcional entre a produção de etileno e a vida pós-colheita (DEFILIPPI, et al., 2009; SONG e FORNEY, 2007).

O etileno possui relação direta com a produção de compostos voláteis de frutos. A evidência disso é baseada na observação de que há um aumento nas concentrações de compostos associados ao aroma na medida em que o processo de amadurecimento ocorre, além disso, a aplicação de inibidores de etileno resulta em mudança nessa produção. Inibidores da biossíntese ou da atividade do etileno têm sido usados como ferramentas experimentais para identificação de processos relacionados ao hormônio. Em estudos que avaliaram os efeitos de um bloqueador dos receptores de etileno, metilcloropropeno (1MCP), em bananas (GOLDING et al., 1998), maçãs (KONDO et al., 2005) e ameixas (ABDI et al., 1998) houve uma diminuição considerável na produção de compostos voláteis. Uma alternativa para unir o aumento de vida útil pós-colheita produzido por 1MCP e a manutenção da produção de voláteis tem sido o uso de metil jasmonato (MJ). Em maçãs tratadas com 1MCP e MJ houve uma diminuição na perda de voláteis em relação às que foram tratadas apenas com 1MCP (KONDO et al., 2005).

Apesar de ter um papel bastante relevante no processo de amadurecimento em frutos, o etileno não é o único hormônio que governa essas respostas. Evidências apontam que existe uma complexa rede hormonal que, em conjunto, controla vários aspectos do desenvolvimento de frutos. Nesse sentido, hormônios vegetais como auxinas, giberelinas, brassinosteróides e metil jasmonato tem sido implicados no amadurecimento de frutos climatéricos e não-climatéricos (CHERIAN et al., 2014; PECH et al., 2012).

1.6. METIL JASMONATO

Os jasmonatos, tais como ácido jasmônico (JA) e metil jasmonato (MeJA), são importantes reguladores celulares de uma ampla gama de processos, incluindo estresse biótico e abiótico, germinação de sementes e senescência foliar. O Metil Jasmonato é um regulador do crescimento da planta, que desempenha um importante papel como um sinalizador e modulador das respostas de defesa. Além disso, tem sido verificado que a aplicação foliar de MeJA viabiliza mudanças na expressão de genes responsáveis pelo aroma de frutos, produção de pólen, broto foliar, crescimento de brotos e raiz, assim como resistência à pestes e ataques de patógenos (KAUSCH et al, 2012; YAN et al., 2015; YAN et al., 2013).

Os jasmonatos estão presentes no perfume das flores de jasmim (*Jasminum* spp.) e por isso já chegaram a ser classificados apenas como produtos do metabolismo secundário. Com o avanço nos estudos sobre hormônios vegetais, sabe-se que os jasmonatos atuam como indutores na produção de metabólitos secundários em todo o reino vegetal, sendo também considerados como fitormônios (REYES-DÍAZ et al., 2016; WASTERACK, 2007).

A biossíntese de MeJA inicia-se no cloroplasto pela oxidação enzimática de ácidos graxos insaturados presentes nas membranas devido à ação das enzimas lipoxigenases (LOXs), que convertem ácido linoléico em ácido 13-hidroperóxidolinoléico. Em seguida, catalisada pelas enzimas óxido aleno sintase e óxido ciclase, há a formação de ácido 12-oxofitodienóico (12-oxo-PDA), que sofre três reações de β -redução e β -oxidação para formar (+)-7-iso-ácido jasmônico no peroxissomo. Subsequentemente o MeJA é formado pela ação de ácido jasmônico metiltransferases (JMT) (**Figura 09**) (CHERIAN et al., 2014; REYES-DÍAZ et al., 2016; WASTERACK et al., 2007).

A sinalização dos jasmonatos ocorre por meio da degradação de um repressor. As proteínas repressoras JAZ (Jasmonato-ZIM-DOMAIN) se ligam ao fator de transcrição MYC2 e inativam a expressão de jasmonatos. Na presença de níveis aumentados de jasmonato isoleucina (JA-Ile) as proteínas JAZ interagem com a subunidade F-box^{COI1} e são degradadas via proteossoma 26S. Essa degradação proteossomal neutraliza a ação de proteínas repressoras de genes induzidos por JAs e viabiliza a ação de fatores transcricionais, tais como os das famílias MYC e MYB, os quais ligam-se a promotores de genes de resposta aos jasmonatos (**Figura 10**) (CHERIAN et al., 2014; DHARMASINI et al., 2013; REYES-DÍAZ et al., 2016; WASTERACK et al., 2007).

Figura 09. Biossíntese de metil jasmonato envolvendo cloroplasto, citoplasma e peroxissomo. Esse esquema é baseado em estudos em *Arabidopsis thaliana*. Abreviações: AOC: óxido aleno ciclase; AOS: óxido aleno sintase; JMT: ácido jasmônico metil transferase; LOX: Lipoxigenase; OPC: ácido 3-oxo-2-(2'-pentenil)-ciclopentano-1-octanóico; PDA: ácido fitodienóico (Adaptado de Reyes-Díaz et al., 2016).

Figura 10. Modelo de sinalização de jasmonatos em *Arabidopsis*. (A) Em níveis intracelulares baixos de JA (JA-Ile), o complexo SCFCO11 não possui atividade de E3 ubiquinina ligase, resultando no acúmulo de proteínas JAZ que reprimem a atividade de fatores de transcrição tais como MYC2, que regula positivamente os genes responsivos a JA. (B) Em níveis intracelulares altos de JA (como por exemplo numa situação de estresse), há a promoção da ubiquitinação mediada por SCFCO11 e subsequente degradação de proteínas JAZ, via 26S proteassoma. Isso causa a anulação da repressão de fatores de transcrição que promovem a ativação de genes responsivos a JA (Adaptado de Yan e Kolomiets, 2013).

Os jasmonatos também estão associados a um papel importante no amadurecimento de frutos. Em frutos não-climatéricos, tais como framboesa e amora, o tratamento com MeJA aumentou os níveis de sólidos totais, a concentração de sacarose e glicose, além do conteúdo de antocianinas. (WANG e ZHENG, 2005; WANG et al., 2008).

Em morango, MeJA estimulou o crescimento, peso e a aquisição de cor através da rápida degradação de clorofila e incremento transiente de acumulação de antocianinas (PEREZ et al., 1997). Similarmente, em amora, framboesa e maçã, a aplicação de MeJA levou ao acúmulo de antocianinas (KONDO et al., 2000; WANG e ZHENG, 2005; WANG et al., 2008). Yao e Tian (2005) mostraram que a aplicação de MeJA em cereja é responsável pelo aumento da atividade de PAL e enzimas peroxidases no mesocarpo do fruto, indicando uma estimulação da biossíntese da lignina. Ziosi et al. (2008) reportaram que, no pêssago climatérico, a aplicação exógena de MeJA alterou a expressão de genes que modificam a parede celular desse fruto, sugerindo um possível papel de jasmonatos nessa regulação. Mustafa et al (2016) verificaram que MeJA aplicado em carambolas estocadas a 6°C por 16 dias diminuiu os efeitos de lesões por refrigeração. Os resultados mostraram que MeJA induziu respostas naturais de defesa, permitindo o acúmulo de compostos de proteção, que é importante para a elevação do valor nutracêutico do fruto.

Adicionalmente, o ácido jasmônico estimula a biossíntese de etileno em muitos frutos climatéricos (FAN et al., 1997; KONDO et al., 2007). Em pêra e tomate imaturos MeJA estimulou a expressão dos genes ACS e ACO, resultando no aumento da atividade enzimática e concentração de etileno (KONDO et al., 2007; YU et al., 2011). Em morango, com a aplicação de MeJA no estágio branco foi observado um aumento da atividade da enzima ACO, dando indícios de que estava promovendo a biossíntese de etileno (MUKKUN e SINGH, 2009). Em morango chileno (*Fragaria chiloensis*) a aplicação exógena de MeJA alterou os perfis de expressão de muitos genes relacionados ao amadurecimento incluindo aqueles relacionados com a biossíntese de ácido jasmônico e etileno (CONCHA et al., 2013).

O metil jasmonato pode acelerar o amolecimento através da despolimerização das hemiceluloses e aumentar a expressão de genes para as enzimas xiloglucana endotransglicosilase/hidrolase 1 (XTH1) e endo-1,4- β -glicosase 1 (EG1), resultando em acúmulo de antocianinas, dado que MeJA aumenta a expressão de genes que participam da via de biossíntese de antocianinas, tais como *CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR*, *ANS* e *UFGT*. Concomitantemente, com grandes quantidades de antocianinas, MeJA pode induzir a

expressão de genes tais como *LOX*, *AOS* e 12-oxofitodienoato redutase 3 (*OPR3*) em morango (*F. chiloensis*) (CONCHA et al., 2013).

Embora os relatos da literatura indiquem que tanto o etileno como o MeJA são capazes de influenciar várias das vias de reprodução de compostos voláteis já mencionadas, alguns pontos não estão completamente elucidados, como por exemplo o papel de cada um na síntese de compostos voláteis durante o amadurecimento, ou mesmo sobre a resposta da biossíntese do aroma associando frutos climatéricos e não-climatéricos.

2. OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi avaliar a correlação dos hormônios etileno e metil jasmonato na formação dos compostos voláteis do aroma em tomate *Grape* (*Solanum lycopersicum*) e pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*), durante o amadurecimento. A hipótese, neste caso, baseia-se nos precedentes da literatura, que indicam uma provável ação conjunta desses hormônios em frutos climatéricos e não-climatéricos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. FRUTOS E TRATAMENTOS HORMONAIS

3.1.1 Tomates

No mês de Abril de 2016, frutos de tomateiro da variedade *Grape* (*Solanum lycopersicum*) foram cuidadosamente coletados em uma produção local da cidade de Ibiúna, estado de São Paulo. Foram colhidos 750 frutos no estágio *mature green*, apresentando uma coloração verde clara. Os frutos foram transportados ao laboratório em caixas de isopor, sendo lavados com água corrente e mantidos por 1 minuto em solução de hipoclorito de sódio a 0,1% (v/v), para redução da carga microbiana superficial e, em seguida, enxaguados com água destilada e secos em papel toalha.

Os tomates foram divididos aleatoriamente em 5 grupos de acordo com os tratamentos, que foram realizados por exposição ao vapor dos respectivos hormônios, em concentrações previamente padronizadas em outros trabalhos com tomates no laboratório. Para MeJA, foi realizado um teste de concentração em tomate micro tom (**Figura S1 – Material Suplementar**). Os tratamentos seguem abaixo:

1. Grupo Etileno: tratamento com etileno 100ppm. O recipiente, onde os frutos ficaram acondicionados, foi hermeticamente lacrado durante 24 horas;
2. Grupo MeJA: tratamento com 100 ppm de metil jasmonato. O hormônio foi pipetado em papéis de filtro, os quais foram colados nas paredes do recipiente de acondicionamento e deixados para evaporar sobre os frutos, que permaneceram em recipiente hermeticamente lacrado por 12 horas. Logo após esse tempo, as caixas foram abertas e o hormônio foi reaplicado. As caixas foram novamente lacradas e reabertas após 12 horas da reaplicação, totalizando 24 horas de tempo de exposição ao hormônio.
3. Grupo 1MCP: tratamento com 100ppm do bloqueador de receptores de etileno, o 1-metilciclopropeno (1MCP). Os frutos foram colocados em um recipiente hermeticamente fechado com uma quantidade da referida substância em pó. Por meio de uma seringa, adicionou-se 3 mL de água deionizada através de um septo de silicone na tampa do frasco de acondicionamento dos frutos. Após 12 horas esse procedimento foi refeito para que o tratamento tivesse um tempo total de 24 horas.

4. Grupo MeJA+1MCP: tratamento com 100ppm de metil jasmonato e 100ppm de 1-metilciclopropeno. As aplicações foram iguais às descritas para os tratamentos 2 e 3. O recipiente foi reaberto após 12 horas para reaplicação dos hormônios, em seguida as caixas foram novamente lacradas por mais 12 horas, para que o tratamento tivesse um tempo total de 24 horas.
5. Grupo Controle: frutos do grupo controle foram acondicionados em recipiente fechado por 24 horas.

Após as 24 horas de cada tratamento, os respectivos recipientes foram abertos e permaneceram assim até o final das análises. O dia zero (D0) foi considerado como o dia da coleta dos frutos, que também foi o momento em que os frutos receberam os tratamentos hormonais assim que chegaram ao laboratório. O dia 02 (D2) foi considerado como *breaker*, pois foi o dia em que se evidenciou o início de mudança de cor dos frutos do grupo Controle. O experimento foi conduzido por 21 dias, momento em que todos os frutos adquiriram a coloração completamente avermelhada. No entanto, o último estágio de maturação, estágio *Red*, aconteceu no dia 10, quando os frutos do grupo Controle atingiram a coloração completamente avermelhada. Os frutos foram mantidos em sala com acesso à luz natural, temperatura de $21\pm4^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa (UR) de $80\pm5\%$.

Além da coleta do dia 0, foram realizadas outras seis coletas, dessa vez em cada tratamento, para a análise de voláteis e futuras análises de abundância de transcritos de genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de compostos voláteis. Essas coletas ocorreram nos dias 0, 1, 2, 4, 8, 10 e 21 e tiveram como critério mudanças expressivas de coloração do fruto.

Na coleta para as análises dos compostos voláteis, cinco tomates de cada tratamento foram processados separadamente, utilizando uma faca de aço inox, de modo a extrair apenas o pericarpo e casca dos frutos, que foram cuidadosamente cortados em fatias pequenas. Em seguida, colocou-se 3 g das fatias de tomate, em frascos de 20 mL, com tampa de rosca magnetizada e septo de silicone (triplicatas). Cada frasco foi adicionado de solução de NaCl 30% em água deionizada sendo, em seguida, congelados a -20°C .

Na coleta para as análises de abundância de transcritos de genes, cinco frutos de tomateiro foram processados apenas para a retirada das sementes. Os frutos processados foram gentilmente colocados, por meio de uma pinça de aço inox limpa, em tubos plásticos de 50 mL e, em seguida, congelados em nitrogênio (N_2) líquido, sendo armazenados a -80°C em ultrafreezer.

3.1.2. Pimentas

No mês de maio de 2016, frutos de pimenteira da variedade Malagueta (*Capsicum frutescens*) foram cuidadosamente coletados em uma produção local da cidade de Paraipaba, estado do Ceará. Foram coletados 650 frutos, apresentando uma coloração amarelada. Os frutos foram transportados ao laboratório em caixas de isopor, sendo lavados com água corrente e mantidos por 1 minuto em solução de hipoclorito de sódio a 0,1% (v/v), para redução da carga microbiana superficial e, em seguida, enxaguados com água destilada e secos em papel toalha.

As pimentas foram divididas aleatoriamente em 5 grupos de acordo com os tratamentos, que foram realizados por exposição aos respectivos hormônios (do mesmo modo que foi realizado para os tomates). As concentrações dos mesmos foram previamente padronizadas em outros trabalhos com pimentas no laboratório. Os tratamentos seguem abaixo:

6. Grupo Etileno: tratamento com etileno 100ppm. O recipiente, onde os frutos ficaram acondicionados, foi hermeticamente lacrado durante 24 horas;
7. Grupo MeJA: tratamento com 10 ppm de metil jasmonato. O hormônio foi pipetado em papéis de filtro, os quais foram colados nas paredes do recipiente de acondicionamento e deixado para evaporar sobre os frutos. O recipiente ficou hermeticamente lacrado por 12 horas. Logo após esse tempo, as caixas foram abertas e o hormônio foi reaplicado. As caixas foram novamente lacradas e reabertas quando completou-se 12 horas da reaplicação, totalizando 24 horas de tempo de exposição ao hormônio.
8. Grupo 1MCP: tratamento com 100 ppm do bloqueador de receptores de etileno, o 1-metilciclopropeno. Os frutos foram colocados em um recipiente hermeticamente fechado com uma quantidade da referida substância em pó. Por meio de uma seringa, adicionou-se 3 mL de água deionizada através de um septo de silicone na tampa do frasco de acondicionamento dos frutos. Após 12 horas esse procedimento foi refeito para que o tratamento tivesse um tempo total de 24 horas.
9. Grupo MeJA+1MCP: tratamento com 10 ppm de metil jasmonato e 100 ppm de 1-metilciclopropeno. As aplicações foram iguais às descritas para os tratamentos 7 e 8. O recipiente foi reaberto após 12 horas para reaplicação dos hormônios, em

seguida as caixas foram novamente lacradas por mais 12 horas, para que o tratamento tivesse um tempo total de 24 horas.

10. Grupo Controle: frutos do grupo controle foram acondicionados em recipiente fechado por 24 horas.

Após as 24 horas de cada tratamento, os respectivos recipientes foram abertos e permaneceram assim até o final das análises. O dia zero (D0) foi considerado como o dia da coleta dos frutos, que também foi o momento em que os frutos receberam os tratamentos hormonais assim que chegaram ao laboratório. O experimento foi conduzido por 12 dias, momento em que os frutos do grupo controle adquiriram a coloração completamente avermelhada. Os frutos foram mantidos em sala com acesso à luz natural, temperatura de $21\pm4^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa (UR) de $80\pm5\%$.

Além da coleta do dia 0, foram realizadas outras seis coletas, dessa vez em cada tratamento, para a análise de voláteis e futuras análises de abundância de transcritos de genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de compostos voláteis. Essas coletas ocorreram nos dias 1, 3, 6, 9 e 12 e tiveram como critério mudanças expressivas de coloração do fruto.

Na coleta para as análises dos compostos voláteis, nove pimentas de cada tratamento foram processadas separadamente, utilizando uma faca de aço inox, de modo a extrair apenas o pericarpo dos frutos, que foi cuidadosamente cortado em fatias pequenas. Em seguida, colocou-se 2,5 g das fatias de pimenta, de cada tratamento, em frascos de 20 mL, com tampa de rosca magnetizada e septo de silicone (triplicatas). Cada frasco foi adicionado de solução de NaCl 30% em água deionizada sendo, em seguida, congelados a -20°C .

Na coleta para as análises biomoleculares, outros nove frutos de pimenta foram processados, apenas para a retirada das sementes. Os frutos processados foram colocados, por meio de uma pinça de aço inox, em tubos de 50mL e, em seguida, congelados em nitrogênio (N₂) líquido, sendo armazenados a -80°C em ultrafreezer.

3.2. ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

As análises dos compostos voláteis, para ambos os frutos, foram realizadas por meio do método de microextração em fase sólida (SPME), de acordo com o método descrito por Pesis et al (2009), uma fibra de carboxeno, divinilbenzeno e polidimetilsiloxano de 100µm de espessura da Supelco® (CAR/DVB/PDMS).

Os voláteis do aroma foram acumulados por 10 minutos e a fibra para SPME foi introduzida no frasco e exposta ao *headspace* por mais 50 minutos. Uma vez capturada, a amostra foi dessorvida da fibra pela exposição ao calor do injetor do cromatógrafo (200°C) por 3 minutos. Foi utilizado o cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 6890, acoplado a um detector seletivo de massas da mesma empresa, modelo 5973. A coluna cromatográfica empregada foi a Supelcowax 10 (tamanho 30 m, 0,25 mm de diam. interno, 0,25 µm de espessura do filme). O programa de temperatura utilizado foi: rampa de 2 °C/min de 40 °C a 150 °C. A temperatura da interface entre o cromatógrafo e o detector seletivo de massas foi de 230 °C e a ionização foi feita por impacto de elétrons (70 eV) com a fonte de íons mantida a 150 °C. Os métodos usados para a identificação dos compostos voláteis foram: cálculo do índice de retenção de Kovats de cada pico do cromatograma em relação a um padrão de n-alcenos (C8 a C20), de acordo com a coluna capilar utilizada, comparados a bases de dados online (*Nist Chemistry Webbook*, *Chemspider* e *Pubchem*); espectros de massas comparados com a biblioteca NIST, versão 1.6; dados da literatura, artigos e teses.

3.3. CARACTERIZAÇÃO DO AMADURECIMENTO

3.3.1. Análise de etileno dos frutos

A estimativa de produção de etileno foi realizada por meio de amostras de ar coletadas do interior de frascos devidamente vedados e com volume conhecido. Para cada um dos cinco tratamentos utilizou-se três frascos. Para tomates pesou-se aproximadamente 20 g nos recipientes, que foram vedados e deixados em repouso por 1 hora para que houvesse o equilíbrio do *headspace*. Para pimentas foram pesados aproximadamente 15g. A amostra foi coletada por meio de aspiração de etileno gasoso, produzido pelos frutos, usando uma seringa de 1 mL. A coleta foi realizada em triplicata para cada frasco.

As amostras foram injetadas em um cromatógrafo a gás da Hewlett-Packard modelo GC-6890, equipado com detector por ionização de chama (FID). A coluna utilizada foi a HP-Plot Q (30 m, D.I. 0,53 mm). O volume de injeção foi de 1 mL e para injetar tal quantidade de ar, foi empregado o modo de injeção *pulsed splitless*, desenvolvido pela Hewlett-Packard, opcional das válvulas de injeção com EPC (*Electronic Pressure Control*).

As condições de injeção foram: pressão de 20 psi por 2 minutos, fluxo de ventilação de 20 mL/min após 30 segundos de injeção e temperatura do injetor em 200 °C. As demais

condições cromatográficas empregadas foram: corrida isotérmica a 30°C empregando hélio como gás carregador em fluxo constante de 1 mL/min; temperatura do detector em 250 °C, fluxo de ar e hidrogênio no detector em 450 mL/min e 50 mL/min, respectivamente. A estimativa da quantidade de etileno, produzida pelos frutos, levou em conta o peso exato de cada porção de fruto nos frascos, o volume do *headspace*, o tempo de coleta e foi relacionada à injeção de um padrão de 0,1 µL/L de etileno em ar sintético da *Air Liquid*.

3.3.2. Análise de cor

Para a realização da análise de cor da casca de pimenta malagueta e tomate *Grape*, foi utilizado o colorímetro Minolta Chroma Meter (Konica Minolta, Japão), modelo CR300, calibrado sob superfície branca. Foram realizadas seis leituras em cada fruto (3 leituras em lados opostos). A cor foi expressa em relação ao valor de matiz (Hue) calculado pela fórmula $H = \tan^{-1}(b/a)$, onde b (quantidade de amarelo e azul) e a (quantidade entre vermelho e verde) são valores fornecidos pelo aparelho, levando em conta o plano de cores descrito pelo método Hunter.

3.4. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR QRT-PCR

3.4.1. Extração de RNA, purificação e síntese de DNA complementar (cDNA)

As extrações de RNA total de amostras congeladas a -80°C de tomates e pimentas (grupos Controle, MeJA, Etileno, 1MCP e MeJA+1MCP), foram realizadas, em triplicata, utilizando o reagente Plant RNA reagentTM, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. A qualidade dessas extrações foi avaliada, por eletroforese em gel de agarose 1%, pela visualização, sob a luz ultravioleta, das bandas 18S e 28S de RNAs ribossomossais nos extratos corados com GelRedTM diluído (1:500).

Para a purificação e eliminação de contaminação de DNA genômico, os extratos de RNA foram tratados com o kit Ambion® DNA-freeTM DNase Treatment & Removal Reagents (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. Após essa etapa, os extratos purificados foram novamente avaliados por eletroforese em gel de agarose 1%, conforme descrito anteriormente.

Antes da conversão do RNA para cDNA, foi necessário realizar a quantificação do RNA total purificado por espectrofotometria (SAMBROOK et al., 1989) considerando uma amostra contendo 62 µg/mL e 44 µg/mL de RNA para tomate e pimenta, respectivamente. Somente as amostras de RNA total com razões A260/A280 entre 1,8 e 2,0 foram usadas na síntese de cDNA.

Para a síntese de cDNA usado nas reações de PCR quantitativa, utilizou-se o kit Improm_II™ Reverse Transcription System (Promega), que baseia-se na reação de uma transcriptase reversa com o *primer* Oligo (dT15), seguindo o protocolo do fabricante.

3.4.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional e Oligonucleotídeos (*primers*) utilizados na amplificação dos genes *LOX*, *ADH* e *HPL*

Para testar a especificidade dos *primers* antes de iniciar as análises de PCR em tempo real foram feitas amplificações do fragmento por PCR convencional como 35 ciclos, consistindo em desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento dos *primers* a 60°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1,5 minuto e extensão final a 72°C por 4 minutos. A reação de amplificação consistiu de 1 µL amostral de cDNA, 1 µL de cada solução 10 µM (*forward* e *reverse*) do *primer* analisado, 2,5 µL de dNTP 2,5µM, 1,25 µL de MgCl₂ 50mM e 0,5 µL da enzima *Taq* polimerase, completados com água *RNase-free* para um volume total de 25 µL de reação.

Os *primers* e a respectiva sequência de nucleotídeos utilizados nas análises de RT-PCR são descritos na **Tabela 01**.

3.4.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

As análises de RT-PCR foram realizadas usando o equipamento QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystem, EUA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Em cada um dos 384 poços da placa analisados, foram adicionados 5 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, EUA), 4 µL do *forward* e *reverse* do *primer* (Exxtender, BRA) e 1 µL amostral. As reações ocorreram inicialmente a 95°C por 10 minutos para desnaturação inicial, seguida por 40 ciclos de 95°C por 30 segundo para desnaturação, 60°C por 45 segundos para pareamento dos *primers* e 72 °C por 30 segundos para extensão.

Tabela 01. Sequência de nucleotídeos utilizados nas análises de RT-PCR

Fruto	Gene	Símbolo	Sentido	Sequência dos primers 5' - 3'	Referências Bibliográficas
Tomate Grape (<i>Solanum lycopersicum</i>)	<i>Lipoxygenase C</i>	<i>SILOX C</i>	<i>Foward</i>	AAATGAGCACCACAAGGAAATGTAT	QIN et al, 2011
			<i>Reverse</i>	ACCCAAGAGTTGCATGTAATTTCA	
	<i>Alcohol dehydrogenase</i>	<i>SIADH</i>	<i>Foward</i>	TGAGTACACCGTGGTTCATGTTG	QIN et al, 2011
			<i>Reverse</i>	TCCAAGGCCTGTCGAAATTC	
	<i>Hydroperoxide lyase</i>	<i>SIHPL</i>	<i>Foward</i>	GTCCACCAGTACCAAGTCAATATGC	BAI et al, 2011
			<i>Reverse</i>	GCTCCCCTTTCTTGATTTCTGTAA	
	<i>Carotenoid Cleavage Dioxygenase</i>	<i>SICCD1A</i>	<i>Foward</i>	ATGGGGAGAAAAGAAGATGATGGA	ILG et al, 2014
			<i>Reverse</i>	ATTCAAGAACAAGCCAAACTGTGA	
Pimenta Malagueta (<i>Capsicum frutescens</i>)	<i>Carotenoid Cleavage Dioxygenase</i>	<i>SICCD1B</i>	<i>Foward</i>	ATGGGGATGAATGAAGAAGATGG	ILG et al, 2014
			<i>Reverse</i>	ATTCAGGAGCAAGCCAAAATGTGA	
	<i>Actin</i>	<i>SIACT</i>	<i>Foward</i>	TGTCCCTATTTACGAGGGTTATGC	QUADRANA et al, 2013
			<i>Reverse</i>	CAGTTAAATCACGACCAGCAAGAT	
	<i>Expressed</i>	<i>SIEXP</i>	<i>Foward</i>	GCTAAGAACGCTGGACCTAATG	QUADRANA et al, 2013
			<i>Reverse</i>	TGGGTGTGCCTTTCTGAATG	
	<i>Lipoxygenase 1</i>	<i>CaLOX1</i>	<i>Foward</i>	ACGTAATCTCTGGGAAAAATGACGAT	LIM et al, 2015
			<i>Reverse</i>	ACGTGACATCAAAGGCTGATTTCGC	
	<i>Alcohol dehydrogenase</i>	<i>CfADH</i>	<i>Foward</i>	CAGGGGAATGCAAAGATTGT	Primer desenhado
			<i>Reverse</i>	CGACACATCCAACATGAACC	
	<i>Hydroperoxide lyase</i>	<i>CaHPL</i>	<i>Foward</i>	TGTAGTGGCGGTACTGGA	GULLNER et al, 2010
			<i>Reverse</i>	AAGTCTGTTTGTGCCCTCGTT	
	<i>Actin 1</i>	<i>CaACT1</i>	<i>Foward</i>	GACGTGACCTAACTGATAACCTGAT	LIM et al, 2015
			<i>Reverse</i>	CTCTCAGCACCAATGGTAATAACTT	
	<i>Enlongation Factor 1</i>	<i>CaEF1a</i>	<i>Foward</i>	TTAAGGATCTTAAGCGTGGTTATGT	LIM et al, 2015
			<i>Reverse</i>	TCTTCAAGAACTTAGGCTCCTTCTC	

A detecção de formação de *amplicons* inespecíficos foi feita a partir da curva de dissociação realizada após os 40 ciclos, de acordo com o método descrito anteriormente. Sendo que os valores de Ct para todos os genes foram normalizados utilizando-se os valores de Ct na leitura do genes constitutivos *Actina* e *Expressed* para os cDNAs de tomate *Grape*, e *Actina 1* e *Expressed* para os cDNAs de pimenta malagueta.

A expressão gênica foi determinada pelo cálculo da expressão relativa a partir dos valores de razão determinados para o dia em que os frutos chegaram ao laboratório (Dia 0),

ou seja, anterior ao início dos experimentos, adotado como valor de referência para os pontos de análise. Para o cálculo de quantificação relativa do gene alvo utilizou-se a seguinte equação:

$$R = 2^{-(\Delta Ct_{amostra} - \Delta Ct_{controle})}$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Nessa equação, a razão representa a expressão relativa do gene alvo, onde $\Delta Ct_{amostra}$ é a diferença entre o Ct do gene alvo e o Ct dos genes constitutivos nas amostras de cada ponto analisado. O $\Delta Ct_{controle}$ é a diferença entre o Ct do gene alvo e o Ct dos genes constitutivos nas amostras do dia 0, que são as amostras de referência.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados referentes às áreas dos picos dos compostos voláteis, obtidos através dos cromatogramas, foram normalizados pela mediana tratados na escala logarítmica e escalonados segundo a escala de Pareto. A partir das matrizes de correlação dos dados normalizados foram feitas análises de discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) usando o Metaboanalyst 3.0 (www.metaboanalyst.ca) (XIA et al., 2015). Para as análises de variância (ANOVA), teste de Fisher's LSD (do inglês, *Least Significant Difference test*), análise de FDR (do inglês, *False Discovery Rate*), agrupamento hierárquico e Heatmap, além do próprio Metaboanalyst 3.0, foi utilizado o programa estatístico Minitab 17.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO AMADURECIMENTO

As análises de produção de etileno e cor foram realizadas em todos os tratamentos dos dois frutos (CONTROLE, ETILENO, MeJA, 1MCP e MeJA+1MCP) com o intuito de caracterizar os estágios do amadurecimento dos tomates e pimentas, objetos de estudo deste trabalho. Além disso, essas análises buscam verificar os precedentes da literatura que indicam uma provável ação conjunta de metil jasmonato e etileno em frutos climatéricos e não-climatéricos, porém com variados graus de impacto sobre diferentes aspectos do amadurecimento.

A produção de etileno para tomate (**Figura 10**) e pimenta (**Figura 13**) foi avaliada, visto que o aumento desse hormônio é um marcador no início do amadurecimento em frutos climatéricos. A mudança de cor durante o amadurecimento de tomate *Grape* (**Figuras 11**) e pimenta malagueta (**Figura 14**) foi avaliada por registro fotográfico e por colorimetria, expressa em relação ao valor de matiz ($^{\circ}$ Hue) (**Figuras 12 e 15**).

4.1.1 Tomate *Grape*

Na análise de etileno em tomates *Grape* (**Figura 11**) do grupo Controle verifica-se o comportamento típico de um fruto climatérico no decorrer do processo de amadurecimento. A produção de etileno está praticamente em ascendência até o dia 09, quando começa a baixar gradativamente. Em um primeiro momento, os frutos climatéricos, como o tomate, produzem baixos níveis de etileno (sistema 1). Subsequentemente, evoluem para o climatério, em que há um aumento nos níveis de produção de etileno (sistema 2), sendo que, a partir disso a regulação da produção desse hormônio se torna autocatalítica. Após o estabelecimento do climatério, a produção de etileno diminui significativamente e o fruto evolui para a fase pós-climatérica (CHERIAN et al., 2014; PAUL et al., 2012). A análise por colorimetria (**Figuras 12 e 13**) evidencia o dia 10 como o dia em que os tomates chegaram à coloração completamente vermelha, logo após o pico da produção de etileno no dia 09.

No grupo Etileno, conforme a **Figura 11**, foi observado um aumento discreto acima do grupo controle no dia 02, o que está de acordo com que já é conhecido a respeito da produção autocatalítica de etileno em resposta ao tratamento exógeno desse hormônio. Em pós-colheita

de frutos climatéricos espera-se que o tratamento exógeno de etileno, na fase pré-climatérica, leve à antecipação do processo de amadurecimento e por consequência à senescência (CARA e GIOVANNONI, 2008; KEVANY et al., 2007). Esse adiantamento do amadurecimento também foi verificado na mudança de cor dos tomates pertencentes a esse grupo, pois, segundo a **Figura 12**, foram os frutos, comparados aos outros grupos, em que a coloração vermelha ficou evidenciada mais rapidamente. Isso também pode ser observado nas fotos relacionada da **Figura 13**. O etileno estimula a transcrição de mRNAs que codificam enzimas da via de síntese de carotenóides, dentre os quais o da fitoeno sintase, que é uma das principais enzimas relacionadas a este metabolismo (SURAWANG et al., 2012) e assim, é esperado que sob tratamento com etileno as mudanças de cor sejam aceleradas nos frutos.

No grupo MeJA, de acordo com a **Figura 11**, verificou-se o maior crescimento da emissão de etileno, que apresentou seu ápice no dia 09, mesmo dia de pico de etileno do grupo CONTROLE. Os jasmonatos estimulam a biossíntese de etileno em muitos frutos climatéricos. Além de tomates, outros frutos climatéricos como peras e maçãs tratados com MeJA exibiram aumento na expressão gênica de ACS e ACO, o que resulta no aumento da atividade sintética e das emissões de etileno (FAN et al., 1997; KONDO et al., 2007; MATTHEIS, 2005). A colorimetria dos frutos tratados com MeJA apresentou um pequeno atraso de mudança de cor em comparação com os grupos CONTROLE e ETILENO (**Figuras 12 e 13**).

Apesar de existirem precedentes na literatura que evidenciam MeJA como um estimulador, etileno-independente (LIU et al., 2015), da biossíntese de carotenoides em diferentes culturas como tomate (LIU et al., 2012), folha de soja (SIRHINDI et al., 2016), flor de calêndula (GHANATI e BAKHTIARIAN, 2014) e flores do gênero *Cleome* (ROCHA et al., 2013), nem todos os trabalhos apontam para a mesma direção. Fan et al. (1998), por exemplo, evidenciaram uma inibição da biossíntese de licopeno em tomates após o tratamento com MeJA. Nesse sentido, Liu et al. (2012), analisando essa discrepância, verificaram que concentrações baixas de MeJA (entre 0,05 e 0,5 μM) induziam a biossíntese de licopeno, no entanto, doses maiores (entre 5,0 e 10,0 μM) a inibiu, evidenciando que esse efeito parece ocorrer de maneira dose-resposta.

O grupo tratado com 1MCP apresentou, conforme a **Figura 11**, o ápice de emissão de etileno apenas no dia 18. O 1MCP (1-Metilciclopropeno) bloqueia irreversivelmente os receptores de etileno, atrasando o processo de amadurecimento, mas não o inibindo totalmente. Levando em consideração o grupo CONTROLE como referência e que teve o

ápice de emissão de etileno no dia 09, pode-se inferir que, na concentração de 100 ppm, o 1MCP retardou os efeitos do etileno em pelo menos 09 dias, após o qual, aparentemente, o fruto se recuperou do bloqueio. Isso também explica o resultado da colorimetria (**Figuras 12 e 13**), em que esse grupo foi o último a adquirir coloração avermelhada, o que está condizente com a literatura, pois mesmo depois do bloqueio dos receptores de etileno, os frutos retomam o processo de amadurecimento pela síntese de novos sítios de receptores de etileno (GUÍLLEN et al., 2007; TASSONI et al., 2006; WATKINS, 2008).

Figura 11. Perfis de produção de etileno para Tomate *Grape* (*Solanum lysopersicum*), submetidos a tratamentos hormonais. Grupo Controle, Grupo MeJA (tratamento com MeJA 100ppm), Grupo ETILENO (tratamento com etileno 100 ppm), Grupo 1MCP (tratamento com 1MCP 100ppm) e Grupo MeJA+1MCP (tratamento com MeJA 100ppm + 1MCP 100ppm). Barras verticais indicam erro padrão da média (n=9).

Por fim, no grupo MeJA+1MCP, assim como no grupo 1MCP, houve também um retardo da emissão de etileno, no entanto houve o ápice de produção no dia 16; um pouco antes do que foi apresentado no grupo tratado apenas com 1MCP. A partir do que foi discutido anteriormente, é possível aventar que a participação de MeJA, como indutor da biossíntese de etileno através do aumento na expressão gênica de ACS e ACO e consequente produção de etileno endógeno, faz com que haja uma atenuação do efeito bloqueador da aplicação de 1MCP.

Figura 12. Análise colorimétrica da casca de tomate *Grape* (*Solanum lycopersicum*), submetidos a tratamentos hormonais durante o amadurecimento. Grupo Controle, Grupo MeJA (tratamento com MeJA 100ppm), Grupo ETILENO (tratamento com etileno 100 ppm), Grupo 1MCP (tratamento com 1MCP 100ppm) e Grupo MeJA+1MCP (tratamento com MeJA 100ppm + 1MCP 100ppm). Barras verticais indicam desvio padrão da média (n=9).

Moualen et al (2004) fizeram aplicações pré-colheita em tomates cereja com etileno, 1MCP e 1MCP em conjunto com MeJA para estudar a abscisão do fruto no seu cacho, característica fortemente induzida pela atuação de etileno. Eles verificaram que os frutos que recebiam o tratamento de MeJA mais 1MCP, reduziram significativamente a abscisão comparados com os que receberam a aplicação apenas com MeJA. No entanto, os grupos em que houve a maior redução de abscisão foi aquele tratado apenas com 1MCP. Kondo et al (2005) verificaram que a aplicação da combinação entre MeJA e 1MCP, em maçãs, decresceu as concentrações de etileno comparado à apenas MeJA, mas a combinação apresentou quantidades maiores de etileno do que às apresentadas em grupos tratados apenas por 1MCP. Sendo assim, faz sentido que o resultado de cor para esse grupo apresentasse o segundo maior atraso para a degradação de clorofila e acúmulo de carotenoides, conforme pode ser observado nas **Figuras 12 e 13**. Todas essas evidências foram comprovadas pela replicata biológica (**Figuras S2 e S3 – Material Suplementar**).

Figura 13. Fotos de tomates *Grape* (*Solanum lycopersicum*), submetidos a tratamentos hormonais, durante o amadurecimento. Grupo Controle, Grupo MeJA (tratamento com MeJA 100ppm), Grupo ETILENO (tratamento com etileno 100 ppm), Grupo 1MCP (tratamento com 1MCP 100ppm) e Grupo MeJA+1MCP (tratamento com MeJA 100ppm + 1MCP 100ppm).

4.1.2 Pimenta malagueta

Na análise de níveis de etileno emitidos pela pimenta malagueta, ao longo do amadurecimento, percebe-se, no grupo CONTROLE (**Figura 14**), um comportamento de um fruto não-climatérico, já que a produção de etileno é baixa se compararmos com o grupo CONTROLE do tomate *Grape* (**Figura 11**). Com o amadurecimento, a coloração da pimenta foi mudando, assim como em tomates, pela degradação da clorofila e acúmulo de carotenoides (**Figuras 15 e 16**).

No grupo ETILENO, percebe-se na **Figura 14** que não houve modificação nos níveis de etileno emitidos pelos frutos tratados com etileno exógeno. Na análise de cor os frutos desse grupo apresentaram mudança de cor semelhante aos do grupo CONTROLE (**Figuras 15 e 16**). O fato do fruto ser não-climatérico, ou seja, não possuir o sistema 2 de produção de etileno, que é autocatalítico, pode explicar em parte a essa discreta modificação no fruto. Não responder à aplicação de etileno exógeno é mais uma característica do conceito clássico de fruto não-climatérico (PAUL et al., 2012).

Figura 14. Perfis de produção de etileno para pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*), durante o primeiro experimento, submetidos a tratamentos hormonais. Grupo Controle, Grupo MeJA (tratamento com MeJA 10ppm), Grupo ETILENO (tratamento com etileno 100 ppm), Grupo 1MCP (tratamento com 1MCP 100ppm) e Grupo MeJA+1MCP (tratamento com MeJA 10ppm + 1MCP 100ppm). Barras verticais indicam desvio padrão da média (n=9).

Figura 15. Análise colorimétrica da casca de Pimenta Malagueta (*Capsicum frutescens*) durante o primeiro experimento, submetidos a tratamentos hormonais. Grupo Controle, Grupo MeJA (tratamento com MeJA 10ppm), Grupo ETILENO (tratamento com etileno 100 ppm), Grupo 1MCP (tratamento com 1MCP 100ppm) e Grupo MeJA+1MCP (tratamento com MeJA 10ppm + 1MCP 100ppm). Barras verticais indicam desvio padrão da média (n=9).

No grupo MeJA, a emissão de etileno apresentou um pico significativamente elevado no dia 12 (**Figura 14**), o que aparentemente pode ter relação com a indução da biossíntese de etileno endógeno. Sudha e Ravishankar (2003), estudando a influência dos jasmonatos na produção de capsaicina em *Capsicum frutescens*, verificaram que o tratamento de MeJA nesses frutos pode levar ao aumento da produção de etileno, contudo nenhuma explicação foi aventada pelos pesquisadores. Quanto à mudança de cor, a aplicação exógena de MeJA parece não ter causado efeitos visíveis no acúmulo de carotenoides que os diferenciasses do grupo CONTROLE (**Figuras 15 e 16**).

No grupo tratado com 1MCP houve um pico de emissão de etileno e um outro um pouco maior no dia 12 (**Figura 14**). Apesar de ser um bloqueador dos receptores de etileno, o 1MCP parece ter efeito dose resposta, em que concentrações mais baixas diminuem a produção de etileno, enquanto que em doses mais altas ocorre o inverso. Esse efeito, um tanto antagônico, também foi observado em outros frutos não-climatéricos como morangos (JIANG et al., 2001; KU et al., 1999) e uvas (MCCOLLUM e PAUL, 2007), tratados com 1MCP. Uma possível hipótese sugere a existência de uma via de sinalização independente do etileno.

Quanto à colorimetria (**Figuras 15 e 16**), percebe-se que houve uma discreta desaceleração na mudança de cor, comparada ao grupo controle, mas a partir do dia 03, verifica-se que esse parâmetro se torna igual aos dos outros grupos, mostrando que 1MCP parece não ter influenciado mudanças no amadurecimento do fruto, o que está compatível com a literatura (AIZAT et al., 2013; FERNANDEZ-TRUJILLO et al., 2009).

O grupo MeJA+1MCP apresentou um aumento considerável na produção de etileno no dia 09 (**Figura 14**), provavelmente pelo efeito “reverso” assemelhando ao apresentado pelo grupo 1MCP, além do próprio efeito de MeJA que induziu a biossíntese de etileno no grupo tratado com esse hormônio e que pode ter tido um efeito sinérgico com o 1MCP nesse caso. A colorimetria nesse grupo, assim como nos outros, evidenciou que o tratamento hormonal de MeJA+1MCP não causou efeitos na mudança de cor do fruto (**Figuras 15 e 16**). Todas essas evidências foram comprovadas pela replicata biológica (**Figuras S3 e S4 – Material Suplementar**).

Figura 16. Fotos de Pimentas Malagueta (*Capsicum frutescens*) durante o primeiro experimento, submetidos a tratamentos hormonais. Grupo Controle, Grupo MeJA (tratamento com MeJA 10ppm), Grupo ETILENO (tratamento com etileno 100 ppm), Grupo 1MCP (tratamento com 1MCP 100ppm) e Grupo MeJA+1MCP (tratamento com MeJA 10ppm + 1MCP 100ppm).

4.2 COMPOSTOS VOLÁTEIS

Para a investigação da influência hormonal na biossíntese de componentes do aroma, durante o amadurecimento de tomate *Grape* e pimenta malagueta, foram realizadas análises de compostos voláteis extraídos por SPME em cada um dos tratamentos hormonais pós-colheita, durante o desenvolvimento dos frutos.

No tomate *Grape* foram identificados, segundos os critérios adotados nas análises de voláteis, 36 compostos (**Tabela 02**), sendo 11 (31%) álcoois, 16 (44%) aldeídos, 04 (11%) cetonas, 03 (8%) ésteres, 01 (3%) composto heterocíclico com enxofre e nitrogênio e 01 (3%) hidrocarboneto aromático. Apesar de os ésteres serem muito abundantes e extremamente

importantes em muitas espécies de frutos como morango (ZORRILA-FONTANESI et al., 2012), pêssego (SÁNCHEZ et al., 2012), maçãs (KONDO et al., 2005), ou mesmo algumas espécies de frutas cítricas (GONZÁLEZ-MAS et al., 2011), poucos ésteres são reportados em tomates, e, além disso, são pouco influentes no aroma do fruto, com exceção do salicilato de metila (RAMBLA et al., 2014). Goulet et al (2012) demonstraram que a alta expressão do gene de uma esterase, *SICXE1*, é o principal determinante para que haja baixa quantidade de ésteres acetato em tomate. Mais tarde, Goulet et al (2015) estudaram a atividade de uma álcool acetiltransferase (AAT1) em *Solanum lycopersicum* (tomate comercial) e em *Solanum pennellii* (tomate silvestre), em que há um maior número de ésteres. Eles perceberam que a eficiência da AAT1 no tomate silvestre era maior do que no tomate comercial.

Em tomate mais de 400 compostos voláteis já foram identificados durante o amadurecimento. No entanto, estudos apontam que em torno de 16 compostos possuem impacto direto no aroma do fruto (RAMBLA et al., 2014, WANG et al., 2016). Baseado nisso, dentre os compostos do aroma identificados em tomate *Grape* (**Tabela 02**), podem-se destacar: (Z)-3-hexenal, hexanal, (Z)-2-hexenal, (Z)-2-heptenal, benzenoacetaldeído, beta-ionona, 6-metil-5-hepten-2-ona, (Z)-3-hexenol, álcool feniletílico, 2-isobutiltiazol e salicilato de metila, como os que possuem grande impacto no aroma do tomate.

Na pimenta malagueta foram identificados, segundo os critérios de análise, 55 compostos (**Tabela 03**), sendo 7 (13%) hidrocarbonetos, 6 (11%) álcoois, 3 (5%) aldeídos, 4 (7%) cetonas, 23 (42%) ésteres, 01 (2%) hidrocarboneto aromático, 1 (2%) metoxipirazina e 10 (18%) terpenoides. Uma predominância de ésteres e terpenos já era algo esperado, levando-se em consideração que isso já foi reportado na literatura sobre compostos do aroma de pimentas do gênero *Capsicum* (BOGUSZ JÚNIOR et al, 2015; EGGINK et al, 2012).

Rodríguez-Burruezo et al (2010), fizeram análises de compostos voláteis, seguida de olfatometria, em pimentas em 16 variedades das espécies *Capsicum annum*, *Capsicum chinense* e *Capsicum frutescens*. Eles verificaram que os terpenos e ésteres eram os principais grupos de compostos identificados. Além disso, os testes olfatométricos revelaram que existem 23 compostos que exercem mais impacto no aroma dessas pimentas. Dentre esses compostos destacam-se 4-metil-pentanoato de etila, 3-metil-butanoato de hexila, 2-metil-butanoato de hexila, salicilato de metila, alfa-ionona, hexanal, 2-isobutil-3-metoxipirazina, 3-careno e beta-pineno, que foram identificados nas análises de compostos voláteis em pimenta malagueta (**Tabela 03**).

A presença de alcanos e alcenos alifáticos ou ramificados é bastante comum em pimentas do gênero *Capsicum* e a provável origem desses compostos está ligada à biossíntese e degradação da capsaicina (AZCARATE, 2010; BOGUSZ JÚNIOR et al, 2015; LIU et al, 2009). Devido às poucas fontes que tratam desse assunto e levando em consideração o fato desses hidrocarbonetos não contribuírem para o aroma de pimenta, esses compostos não foram considerados na sequência desse estudo, portanto foram trabalhados 48 compostos que têm algum impacto no aroma.

Levando em consideração os precursores biosintéticos, os voláteis identificados nas análises de componentes do aroma de tomate *Grape* são originados de quatro importantes grupos: ácidos graxos (18), aminoácidos (10), carotenoides (6) e outros isoprenoides (2) (**Tabela 02**). Já na pimenta malagueta, essa origem biosintética encontra-se da seguinte forma: ácidos graxos (21), aminoácidos (15), carotenoides (2) e isoprenoides (10).

Conforme verificado, os dois frutos apresentaram um maior número de compostos voláteis derivados de ácidos graxos, que são produzidos pela via das lipoxigenase. Nesse grupo, destacam-se os voláteis C6 e C5, que fornecem a característica de aroma verde, como a da grama cortada, e são um dos principais compostos voláteis em pimenta e tomate (KLEE, 2010; LIU et al, 2009; RAMBLA et al., 2013).

Nos tomates analisados, quatro voláteis C6 estão entre os seis compostos majoritários. Em ordem decrescente são: (E)-2-hexenal, (Z)-3-hexenal, hexanal, (Z)-3-hexen-1-ol e 1-hexanol (**Figura S6 – Material Suplementar**). Outros compostos C6, identificados em tomates, foram: (Z)-3-hexenal, (E)-3-hexenal, (Z)-2-hexenal. Já entre os voláteis C5 identificados foram: 1-pentanol, 1-penten-3-ol e pentanal, que também são identificados como compostos de aroma frutado a doce (**Tabela 02**).

Nas pimentas os voláteis C6 identificados foram: 1-hexanol, (Z)-2-hexen-1-ol, (E)-2-hexen-1-ol, hexenal, (E)-2-hexenal. Já entre os C5 voláteis foram identificados: 3-pentanona, 1-pentanol e (Z)-2-penten-1-ol (**Tabela 03**). O comportamento dos compostos do aroma dos grupos Controle de tomate *Grape* e pimenta malagueta, durante o amadurecimento, encontra-se na **Figura S8 do material suplementar**.

Tabela 02. Descrição dos compostos voláteis, com respectivos nota aromática e precursor biossintético, identificados em tomate *Grape* (*Solanum lycopersicum*) por análise de SPME em GCMS.

Composto	CAS ¹	IK Calc. ²	IK da lit. ³	Nota aromática ⁴	Precursor biossintético ⁵
Álcoois					
1-hexanol	111-27-3	1330	1339	verde, etéreo, frutado	Ácidos graxos
1-octen-3-ol	3391-86-4	1425	1427	verde, cogumelo, terra	Ácidos graxos
1-pentanol	71-41-0	1233	1255	doce, balsâmico	Ácidos graxos
1-penten-3-ol	616-25-1	1163	1164	verde, frutado	Ácidos graxos
2-etil-1-hexanol	104-76-7	1464	1462	cítrico, floral	Aminoácidos
2-metil-1-butanol	137-32-6	1190	1197	frutado, vinho, cebola	Aminoácidos
6-metil-5-hepten-2-ol	1569-60-4	1438	1431	verde, adocicado	Carotenoides
álcool feniletilico	60-12-8	1876	1876	floral	Aminoácidos
(Z)-3-hexen-1-ol	928-96-1	1358	1358	folha verde	Ácidos graxos
Aldeídos					
benzaldeído	100-52-7	1487	1494	amêndoa doce	Aminoácidos
benzenoacetaldeído	122-78-1	1558	1553	mel, floral, chocolate	Aminoácidos
decanal	112-31-2	1475	1474	cítrico, floral, adocicado	Ácidos graxos
(E,E)-2,4-hexadienal	142-83-6	1391	1395	verde, cítrico	Ácidos graxos
(E)-2-hexenal	6728-26-3	1192	1190	folha verde	Ácidos graxos
(E)-2-octenal	2548-87-0	1400	1407	Verde, cítrico, adocicado	Ácidos graxos
(E)-2-metil-2-butenal	497-03-0	1109	1113	doce, frutado	Aminoácidos
(E)-3-hexenal	6789-80-6	1182	1184	folha verde	Ácidos graxos
geranial	141-27-5	1703	1705	cítrico, limão	Carotenoides
hexanal	66-25-1	1066	1070	folha verde	Ácidos graxos
neral	106-26-3	1653	1656	cítrico, limão, adocicado	Carotenoides
nonanal	124-19-6	1392	1397	cítrico, floral	Ácidos graxos

Tabela 2 (continuação)

Composto	CAS ¹	IK calc. ²	IK da lit. ³	Nota aromática ⁴	Precursor biossintético ⁵
octanal	124-13-0	1263	1263	laranja verde	Ácidos graxos
pentanal	110-62-3	945	950	frutado	Ácidos graxos
(Z)-2-heptenal	57266-86-1	1296	1298	folha verde	Ácidos graxos
(Z)-3-hexenal	6789-80-6	1132	1139	verde, frutado	Ácidos graxos
Cetonas					
1-octen-3-ona	4312-99-6	1276	1280	terra, mofo, cogumelo	Ácidos graxos
6-metil-5-hepten-2-ona	110-93-0	1299	1301	verde, cítrico	Carotenoides
geranilacetona	3796-70-1	1830	1829	verde, frutado	Carotenoides
Compostos heterocíclicos contendo enxofre e nitrogênio					
2-isobutylthiazol	18640-74-9	1369	1378	folha verde, tomate	Aminoácidos
Ésteres					
acetato de 4-hexenila	72237-36-6	1288	1275	verde, frutado	Ácidos graxos
acetato de etila	141-78-6	883	890	verde, frutado	Ácidos graxos
salicilato de metila	119-36-8	1798	1804	Mentolado	Aminoácidos
Hidrocarboneto aromático					
tolueno	108-88-3	1027	1030	doce	Aminoácidos
Monoterpenos					
alfa-terpineol	98-55-5	1669	1669	cítrico, floral	Isoprenoides
beta-linalool	78-70-6	1522	1529	cítrico, floral	Isoprenoides
Sesquiterpeno					
beta-ionona	14901-07-6	1890	1891	verde, floral, frutado	Carotenoides

*1. Número de registro único no banco de dados do *Chemical Abstracts Service*, uma divisão da *Chemical American Society*.

*2. Índice de Kovats dos respectivos compostos voláteis, calculados em relação a n-alcanos (C8 a C20), considerando a coluna capilar Supelcowax 10. *3. Índice de Kovats obtido de bases de dados online (Nist chemistry webbook, chemspider e pubchem). *4. Referência: *The Good Scents Company*, 2013. 5 – Buttery e Ling (1993) e Schwab, Davidovich-Rikanati e Lewinsohn, 2008.

Tabela 03. Descrição dos compostos voláteis, com respectivos nota aromática e precursor biossintético, identificados em pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) por análise de SPME em GCMS.

Composto	CAS ¹	IK Calculado ²	IK da literatura ³	Nota aromática ⁴	Precursor biossintético ⁵
Hidrocarbonetos					
2-metil-tetradecano	1560-95-8	1475	1483	-	Capsaicina
pentadecano	629-62-9	1491	1500	ceroso	Capsaicina
hexadecano	544-76-3	1594	1600	ceroso suave	Capsaicina
(Z)-3-hexadeceno	34303-81-6	1581	1587	-	Capsaicina
heptadecano	629-78-7	1692	1700	-	Capsaicina
8-heptadeceno	54290-12-9	1697	1705	-	Capsaicina
2-metil-tridecano	1560-96-9	1335	1349	-	Capsaicina
Álcoois					
1-pentanol	71-41-0	1242	1230	fermentado, doce, balsâmico	Ácidos Graxos
4-metil-1-pentanol	626-89-1	1301	1318	noz	Aminoácidos
(Z)-2-penten-1-ol	1576-95-0	1292	1302	verde, etéreo	Ácidos Graxos
1-hexanol	111-27-3	1326	1329	frutado, etéreo, doce, verde	Ácidos Graxos
(Z)-2-hexen-1-ol	928-94-9	1405	1410	verde fresco, frutado	Ácidos Graxos
(E)-2-hexen-1-ol	928-95-0	1378	1401	frutado, folha verde	Ácidos Graxos
Aldeídos					
hexanal	66-25-1	1064	1066	grama verde, doce, frutado	Ácidos Graxos
(E)-2-hexenal	6728-26-3	1193	1205	folha verde	Ácidos Graxos
pentadecanal	2765-11-9	2013	2024	cera fresca	Ácidos Graxos
Cetonas					
3-pentanona	96-22-0	970	974	etéreo	Ácidos Graxos
6-metil-5-hepten-2-ona	110-93-0	1329	1340	Verde, cítrico, frutado	Carotenoides

Tabela 3 (continuação)

Composto	CAS ¹	IK calc. ²	IK da lit. ³	Nota aromática ⁴	Precursor biossintético ⁵
oxaciclodecan-2-ona	1725-04-8	2066	2082	-	Aminoácidos
Compostos heterocíclicos contendo nitrogênio					
2-isobutil-3-metoxipirazina	24683-00-9	1512	1520	Pimenta verde	Aminoácidos
Ésteres					
acetato de etila	141-78-6	880	884	etérico, frutado, doce	Ácidos Graxos
4-metil-pentanoato de etila	25415-67-2	1187	1197	frutado	Aminoácidos
heptanoato de metila	106-73-0	1246	1241	doce, frutado, verde	Ácidos Graxos
isobutirato de 2-metil-pentila	84254-82-0	1214	1203	frutado	Aminoácidos
3-metil-butanoato de pentila	25415-62-7	1332	1341	frutado	Aminoácidos
2-metil-propionato de hexila	2349 - 09-7	1355	1366	doce, verde, frutado	Aminoácidos
2,2-dimetil-propionato de hexila	5434-57-1	1336	1337	doce, floral, verde, frutado	Aminoácidos
isovalerato de 2-metil-butila	2445-77-4	1311	1317	frutado, herbal, terroso	Aminoácidos
2-metil-butanoato de hexila	10032-15-2	1397	1425	verde, frutado	Aminoácidos
3-metil-butanoato de hexila	10032-13-0	1416	1420	doce, verde, frutado	Aminoácidos
valerato de hexila	1117-59-5	1463	1487	frutado, verde	Ácidos Graxos
isopentanoato de 3-hexenila	35154-45-1	1433	1440	verde, frutado, floral	Aminoácidos
pentanoato de (Z)-3-hexenila	35852-46-1	1446	1455	verde, frutado, maçã	Ácidos Graxos
2-etil-hexanoato de hexila	20748-87-2	1495	1516	frutado	Ácidos Graxos
2-metil-butanoato de hexila	50862-12-9	1525	1518	frutado, maçã	Aminoácidos
hexanoato de hexila	6378-65-0	1529	1525	verde, herbal, doce	Ácidos Graxos
hexanoato de (Z)-3-hexenila	31501-11-8	1599	1626	verde, frutado, ceroso, abacaxi	Ácidos Graxos
hexanoato de heptila	6976-72-3	1659	1683	verde	Ácidos Graxos
salicilato de metila	119-36-8	1737	1735	doce, fenólico, balsâmico	Ácidos Graxos
nonanoato de hexila	6561-39-3	1884	1900	frutado, verde, conhaque	Ácidos Graxos
2-metil-butanoato de benzila	56423-40-6	1866	1880	frutado	Aminoácidos

Tabela 3 (continuação)

Composto	CAS ¹	IK calc. ²	IK da lit. ³	Nota aromática ⁴	Precursor biossintético ⁵
decanoato de hexila	10448-26-7	1917	1874	verde fresco	Ácidos Graxos
benzoato de hexila	6789-88-4	2043	2056	doce, aromático, frutado	Aminoácidos
Hidrocarboneto aromático					
tolueno	108-88-3	1025	1026	doce	Aminoácidos
Monoterpenos					
beta-pineno	127-91-3	1084	1096	madeira seca,	Isoprenoides
D-limoneno	5989-27-5	1166	1160	cítrico	Isoprenoides
alfa-felandreno	99-83-2	1181	1189	cítrico, herbal	Isoprenoides
3-careno	13466-78-9	1198	1226	Cítrico, pimentão vermelho	Isoprenoides
beta-ocimeno	13877-91-3	1211	1189	cítrico, floral, madeira	Isoprenoides
estireno	100-42-5	1288	1291	doce, balsâmico, floral	Isoprenoides
o-cimeno	527-84-4	1266	1274	verde, cítrico	Isoprenoides
Sesquiterpenos					
alfa-ionona	127-41-3	1840	1857	frutado, madeira, floral	Carotenoides
beta-elemeno	515-13-9	1553	1608	herbal, ceroso, fresco	Isoprenoides
valenceno	4630-07-3	1720	1726	doce, fresco, cítrico, madeira	Isoprenoides
delta-cadineno	29350-73-0	1717	1730	herbal, madeira	Isoprenoides

*1. Número de registro único no banco de dados do *Chemical Abstracts Service*, uma divisão da *Chemical American Society*.

*2. Índice de Kovats dos respectivos compostos voláteis, calculados em relação a n-alcenos (C8 a C20), considerando a coluna capilar Supelcowax 10. *3. Índice de Kovats obtido de bases de dados online (Nist chemistry webbook, chemspider e pubchem). *4. Referência: *The Good Scents Company*, 2013. 5 – Buttery e Ling (1993) e Schwab, Davidovich-Rikanati e Lewinsohn, 2008.

Um grande número de compostos voláteis pode ter como precursor os aminoácidos. Esses compostos são divididos em dois subgrupos: os voláteis de cadeia ramificada e voláteis fenólicos (WANG et al., 2016). Dentre os compostos do primeiro subgrupo, na análise de compostos voláteis de tomate *Grape*, foram identificados: 2-etil-hexanol, acetato de 4-hexen-1-ol, 2-metil-butanol, (E)-2-metil-2-butenal e 2-isobutiltiazol. Os compostos voláteis desse subgrupo contribuem para um aroma frutado, doce e cítrico. Os compostos 2-metil-butanol,

(E)-2-metil-2-butenal e 2-isobutiltiazol são os que mais contribuem para o aroma em tomate, sendo que este último tem notas aromáticas que remetem ao cheiro característico de tomate (GÜLER e SEKERLI, 2013; RAMBLA et al., 2015).

O 2-isobutiltiazol foi detectado apenas nos dia 10 e 21 de maturação dos tomates nos grupos Controle, MeJA e Etileno. Nos grupos 1MCP e MeJA+1MCP, esse composto foi detectado apenas no dia 21, quando os frutos desses grupos amadureceram, o que sugere a dependência da síntese desse composto pela sinalização do etileno na fase climatérica.

Nas pimentas, dentre os compostos derivados de aminoácidos, vale destacar os ésteres desse fruto. Os ésteres metílicos e etílicos são os responsáveis pelas notas aromáticas frutadas. Vale ressaltar que os seis compostos majoritários identificados em pimenta malagueta foram ésteres. Na ordem decrescente foram: 2-etil-hexanoato de hexila, isovalerato de 2-metil-butila, 2,2-dimetil-propionato de hexila, isobutirato de 2-metil-pentila, valerato de hexila e hexanoato de hexila (**Figura S2 – Material Suplementar**).

Por fim, é interessante destacar a identificação da metoxipirazina 2-isobutil-3-metoxipirazina, que é o composto considerado como um dos mais importantes em pimentas do gênero *Capsicum*, pois tem a nota aromática de pimenta verde (BOGUSZ JÚNIOR et al, 2015; PINO et al, 2011; RODRÍGUEZ-BURRUEZO et al, 2010).

As pirazinas são tão características do aroma de pimenta que, mesmo em outros produtos como vinhos tintos derivados de uvas Carbenet Sauvignon ou Sauvignon Blanc, as notas aromáticas que conferem ao produto são descritas como “pimenta verde”, “pimentão” e “pungente” (GUILLAUMIE et al, 2013).

Quanto aos derivados dos apocarotenoides, no tomate foram identificados os compostos geranial, neral, geranilacetona, beta-ionona, 6-metil-5-hepten-2-ol e 6-metil-5-hepten-2-ona. Os compostos desse grupo são classificados por apresentar notas aromáticas descritas como florais e frutadas. Além disso, vale ressaltar que esses compostos geralmente encontram-se em pequenas concentrações em tomates, mas, ao mesmo tempo, contribuem muito para a percepção do aroma do fruto porque possuem limiares de detecção aromática (*thresholds*) baixos, ou seja, não precisam de grandes quantidades para serem distinguidos (RAMBLA et al., 2014; TIEMAN et al., 2012). Um fato observado diz respeito ao geranial, neral, geranilacetona e beta-ionona que só foram detectados a partir do dia 04 nos grupos Controle, MeJA e Etileno. Já nos grupos 1MCP e MeJA+1MCP, esses compostos só foram identificados no dia 21. O composto 6-metil-5-hepten-2-ona se tornou majoritário entre os voláteis de tomate quando o tomate atingiu a sua coloração plenamente vermelha, no dia 10 pós-colheita.

Na pimenta, os compostos identificados como derivados dos apocarotenoides foram alfa-ionona e 6-metil-5-hepten-2-ona. Não houve uma modificação significativa nas concentrações desses dois compostos com o amadurecimento.

Os monoterpenos alfa-terpineol e beta-linalool foram identificados nas análises de voláteis de tomate *Grape* e têm como precursores os isoprenoides. Possuem notas aromáticas cítrica e floral, mas aparentemente não possuem uma contribuição tão importante para o aroma do tomate, comparado aos outros já comentados (RAMBLA et al., 2014). Na pimenta malagueta, os compostos terpênicos, sejam mono ou sesquiterpenos, representaram o segundo maior grupo, sendo que suas notas aromáticas são descritas como frutada, amadeirada e floral. Dentre os compostos identificados, destaca-se o 3-careno, que é o composto terpênico que mais contribui para o aroma de pimenta (AZCARATE, 2010; BOGUSZ JÚNIOR et al, 2012; PINO et al, 2011).

4.2.1 Expressão dos genes que codificam as principais enzimas da via dos ácidos graxos de tomate *Grape* e pimenta malagueta

Levando em consideração a importância para o aroma de pimenta e tomate dos voláteis C5 e C6, produtos da metabolização dos ácidos linoleico e linolênico, foram realizadas análises de transcritos dos genes que codificam as enzimas lipoxigenase (LOX), álcool desidrogenase (ADH) e hidroperóxido liase (HPL) de acordo com cada tratamento hormonal durante o amadurecimento (**Figura 17**).

A LOXC é a principal enzima envolvida na formação de compostos voláteis derivados dos ácidos graxos em tomate. Para avaliar o papel fisiológico da LOXC na geração de voláteis aldeídos e álcoois C6, Chem et al (2004) produziram tomateiros transgênicos com reduzidas quantidades de LOXC sem alterar os níveis das outras isoformas (A, B, D e E). Eles verificaram que a depleção de LOXC levou à redução dos níveis de alguns compostos voláteis, inclusive hexanal, hexenal e hexenol.

De acordo com a **Figura 17**, no tomate controle, a expressão de *LOXC* apresentou um pico no dia 04 e decaiu até do dia de amadurecimento total de fruto (estágio *red* – dia 10). A expressão do gene *HPL* para tomates também seguiu uma tendência parecida, mas com menos intensidade. Já a expressão do gene *ADH* para tomate cresceu com o amadurecimento do fruto. Essas tendências estão de acordo com Yilmaz et al (2002), que mediram a atividade das enzimas LOX, HPL e ADH em três estágios do amadurecimento.

Na pimenta malagueta a expressão do gene *LOX1* apresentou um aumento no primeiro dia, seguido de diminuição no dia 03 e um aumento no dia 09, com pequena queda no dia 12. Tendências de aumento e queda também foram observadas na expressão dos outros genes *ADH1* e *HPL* para pimenta. Não existem muitas fontes sobre o comportamento desses transcritos de genes em *Capsicum frutescens*, no entanto, Matsui et al (1997) já haviam realizado medições da atividade das enzimas HPL e LOX em *C. annum* e os resultados mostraram que ambas enzimas aumentaram com o amadurecimento.

Figura 17. Perfil comparativo das expressões relativas de genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de compostos voláteis derivados de ácidos graxos em tomate *Grape* (*Solanum lycopersicum*) e pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*), de acordo com os grupos Controle, MeJA, Etileno, 1MCP e MeJA+1MCP. LOX = lipoxigenase, HPL = hidropéroxido liase, ADH = álcool desidrogenase. Barras verticais indicam erro padrão da média (n=9). ANOVA *one-way* foi usada como teste de significância seguida de teste de Tukey para comparações múltiplas, apenas entre os respectivos dias de cada tratamento hormonal.

Por fim, avaliando os resultados de uma forma geral, é fácil perceber o quanto o bloqueio de receptores de etileno, nos grupos 1MCP e MeJA+1MCP, impactou na diminuição da expressão dos genes avaliados, principalmente em tomate *Grape*, o que demonstra a importância do etileno na formação dos compostos voláteis nesse fruto climatérico, o que está compatível com a literatura correspondente. Li et al (2016), por exemplo, trataram pera com 1MCP e perceberam mudanças na composição volátil do fruto, além de uma diminuição nos níveis de transcritos de *PuLOX* e *PuAAT*. Xiaotang et al (2016) investigaram os efeitos de 1MCP sobre a biossíntese de compostos voláteis e expressão de genes em maçã. Dentre outros resultados eles verificaram que 1MCP e etileno geralmente produzem efeitos antagônicos em relação aos transcritos de genes investigados.

Em pimenta malagueta, dentre os transcritos de genes analisados, percebe-se que 1MCP teve um baixo impacto comparado ao tomate. Isso pode ser observado pela baixa diferenciação estatística apresentada por esse grupo em pimenta. Não há muitos dados na literatura que possam embasar esses resultados, no entanto, deve-se levar em consideração a característica não-climatérica da pimenta malagueta para explicar o baixo impacto de um bloqueador de receptores de etileno sobre transcritos relacionados à biossíntese de compostos voláteis dos ácidos graxos, a principal via de compostos do aroma para esse fruto (**Tabela 03**).

Os resultados dos níveis dos transcritos dos genes ligados aos voláteis dos ácidos graxos de cada tratamento hormonal, durante o amadurecimento de tomate *Grape* e pimenta malagueta, foram também avaliados de acordo com o comportamento dos respectivos compostos do aroma, que apresentaram diferença significativa segundo ANOVA de Fisher para $p < 0,05$.

4.2.2 Comportamento dos compostos voláteis durante o amadurecimento de tomate *Grape* e pimenta malagueta, após tratamentos hormonais

Com o objetivo de identificar os constituintes do aroma, cujos níveis foram alterados após a aplicação dos tratamentos hormonais, foram realizadas análises estatísticas sobre os dados encontrados (ANOVA, Fisher's LSD). Inicialmente os dados foram submetidos a uma Análise de Variância de um fator de Fisher (*one-way* ANOVA), sendo destacados apenas os compostos que apresentavam diferenças significativas ($p < 0,05$).

De acordo com as análises de compostos do aroma de tomate *Grape*, foram identificados 28 compostos nos dias 01 e 02 do amadurecimento, sendo que foram considerados 20 e 16 compostos respectivamente, segundo a ANOVA de um fator. No dia 04, foram identificados 34 compostos, sendo considerados 24. No dia 08, foram identificados 36 compostos e considerados 26. Já no dia 10, foram identificados 37 compostos e considerados 31. Finalmente, foram considerados 14 compostos, de 35 identificados no dia 21 (**Figura S9 – Material Suplementar**). O dia 21 apresentou a menor quantidade de compostos estatisticamente significantes. Isso pode ter ocorrido em função dos tomates nos grupos MeJA, Etileno e Controle, já estarem senescentes. Além disso, o comportamento dos compostos voláteis não apresentou uma segregação clara frente aos tratamentos hormonais, como ocorreu nos outros dias, portanto o dia 21 não foi incluso na discussão (**Figura S11 – Material Suplementar**).

As análises de compostos voláteis de pimenta malagueta possibilitaram a identificação de 47 compostos voláteis nos dias 01 e 03, apresentando 33 compostos com diferença significativa para ambos os dias. A partir do dia 06 foram identificados 48 compostos, sendo que 36 compostos apresentaram diferenças significativas para esse dia. No dia 09 foram 27 e no dia 12 apenas 13 compostos, dentre o total de 48 compostos identificados (**Figura S10 – Material Suplementar**). Mesmo sendo observada uma quantidade tão baixa de compostos apresentando diferenças estatisticamente significativas, o dia 12 foi considerado no decorrer dessa discussão, por se tratar do dia de amadurecimento pleno da pimenta malagueta, além de servir como comparativo em relação às análises em tomate *Grape*.

Com base nas 36 substâncias odoríferas identificadas na análise de compostos voláteis de tomate da variedade *Grape*, foi aplicada a análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) (**Figura 18B**), no sentido de agrupar os componentes voláteis individuais responsáveis pela diferenciação dos tratamentos hormonais. Os dados foram normalizados pela mediana, tratados na escala logarítmica e escalonados segundo a escala de Pareto usando a plataforma Metaboanalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>).

Assim como mostrado na **Figura 18B**, os tratamentos do Dia 01 estão claramente separados uns dos outros, o que demonstra que os hormônios tiveram impactos diferenciados sobre o perfil de compostos voláteis de tomate *Grape*, logo depois de 24 horas da aplicação. Os campos semitransparentes, em que as replicadas estão dispostas, indicam um intervalo de confiança de até 95%. Nas pimentas, pode-se observar por meio da **Figura 20B**, que os

tratamentos hormonais também tiveram considerável impacto sobre o perfil do aroma do fruto logo no primeiro dia.

Para facilitar a visualização das mudanças causadas pelos tratamentos hormonais sobre a composição do aroma em tomate e pimenta, foram plotados apenas os compostos que apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos *heatmaps*, segundo a ANOVA de um fator de Fisher ($p < 0,05$).

O efeito dos tratamentos hormonais sobre os compostos do aroma de tomate *Grape* do Dia 01, comparados ao grupo Controle, são apresentados na **Figura 18A**. Os compostos voláteis estão agrupados hierarquicamente no *heatmap*, obedecendo tendências de mudanças. Pode-se observar que existem dois grandes agrupamentos que formam um padrão de comportamento. No agrupamento 1, percebe-se que há uma grande quantidade de compostos voláteis que estão em níveis mais baixos no grupo Controle em relação aos demais, mostrando claramente que há uma profunda mudança causada pelos tratamentos hormonais sobre os compostos voláteis de tomate *Grape* nesse ponto. Já nos compostos do agrupamento 2, percebe-se que os níveis dos compostos voláteis do controle estão um pouco mais elevados do que nos outros grupos.

O tratamento com MeJA foi o que mais alterou os níveis dos compostos voláteis no Dia 01 do tomate. Esse tratamento hormonal foi o que apresentou as maiores quantidades dos voláteis C6 (Z)-2-hexenal, (E)-2-hexenal e (Z)-3-hexen-1-ol, que têm como precursor metabólico a via dos ácidos graxos (**Figura 19**). Interessante observar também foi que o grupo MeJA+1MCP também apresentou elevação nesses compostos C6, mesmo na presença de um bloqueador de receptores de etileno. Além desses compostos, MeJA+1MCP apresentou elevação nos níveis do volátil C6 (Z)-3-hexenal e do volátil C5 1-pentanol, ambos derivados da via das lipoxigenases.

Nesse dia 01 MeJA também aumentou os níveis de expressão do gene *LOXC* em tomates. O mesmo aconteceu no tratamento com etileno, no entanto MeJA aumentou também os níveis de expressão de *HPL* em maior grau do que no grupo Etileno (**Figura 17**). Como pode ser observado na **Figura 06**, a enzima HPL é necessária para a produção dos aldeídos C6, possível explicação para o grupo MeJA apresentar níveis maiores de voláteis C6 do que no grupo Etileno.

Figura 18. Análises multivariadas dos compostos voláteis de tomate *Grape* no **Dia 01**, após tratamentos hormonais. A) Análise de grupamento hierárquico e *Heatmap*. Em A, as cores vermelhas e azul indicam altos e baixos níveis de compostos, respectivamente. B) Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) em 2D e seu respectivo gráfico em 3D. Grupo Controle (CTRL), Grupo MeJA (tratamento com MeJA 100ppm), Grupo ETILENO (tratamento com etileno 100 ppm), Grupo 1MCP (tratamento com 1MCP 100ppm) e Grupo MeJA+1MCP (tratamento com MeJA 10ppm + 1MCP 100ppm). Todos os compostos apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$), de acordo com a ANOVA de um fator de Fisher.

Vale ressaltar que os níveis de genes expressos para *ADH* nos dois tratamentos aparece praticamente igual (**Figura 17**), o que indica que as etapas da síntese de voláteis C6, catalisadas por LOXC e HPL, parecem ser, ao menos parcialmente, reguladas em nível transcripcional por MeJA e Etileno. O comportamento dos voláteis C6 durante o amadurecimento de tomate *Grape*, após tratamentos hormonais, pode ser visto com detalhes por meio da **Figura S12 do material suplementar**.

Figura 19. Representação em *boxplot* da distribuição dos compostos voláteis C6 de tomate *Grape* no **Dia 01**, após tratamentos hormonais. Os gráficos com um asterisco (*) apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$), de acordo com a ANOVA de um fator de Fisher.

O *heatmap* apresentado na **Figura 20A**, referente aos compostos voláteis de pimenta malagueta, que apresentaram diferenças significativas ($p < 0,005$), de acordo com os tratamentos hormonais, evidenciou um aumento significativo, proporcionado por MeJA, sobre a maioria dos ésteres, muitos deles ésteres hexílicos de cadeia alifática (**Figura 21**). Provavelmente isso pode ter sido o motivo para que esse grupo não apresentasse níveis elevados de voláteis C6 em relação aos outros (**Figura 22**). Os voláteis C6 podem ter sofrido ação de álcool acetiltransferases e se transformado em ésteres hexílicos (**Figura 06**). Não existem muitos trabalhos que tratam sobre esse assunto em pimentas, portanto fica difícil embasar essa teoria sobre o que já existe na literatura. Em todo caso, na **Figura S13 do material suplementar**, existe foi construído um esquema baseado no do tomate, do que pode ter havido com os voláteis C6 de pimenta malagueta.

O tratamento com etileno foi o que apresentou os maiores níveis de *LOX1* e *HPL*, embora o aumento da expressão de *LOX1* não tenha sido estatisticamente diferenciado em relação aos outros tratamentos (**Figuras 17**). Apesar disso, o grupo etileno não apresentou o mesmo desempenho que MeJA, principalmente no tocante aos voláteis C6 ou ésteres hexílicos (**Figuras 21 e 22**), o que pode evidenciar que outras isoformas para as enzimas *LOX*, *HPL* e *ADH* podem estar envolvidas nesse processo em pimenta. A mesma explicação pode servir para o grupo Controle, que também apresentou elevados níveis de transcritos no dia 01, no entanto não houve correspondência em nos níveis de voláteis C5 e C6.

Figura 20. Análises multivariadas dos compostos voláteis de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) no **Dia 01**, após tratamentos hormonais. A) Análise de grupamento hierárquico e *Heatmap*. Em A, as cores vermelhas e azul indicam altos e baixos níveis de compostos, respectivamente. B) Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) em 2D e seu respectivo gráfico em 3D. Grupo Controle (CTRL), Grupo MeJA (tratamento com MeJA 10ppm), Grupo ETILENO (tratamento com etileno 100 ppm), Grupo 1MCP (tratamento com 1MCP 100ppm) e Grupo MeJA+1MCP (tratamento com MeJA 10ppm + 1MCP 100ppm). Todos os compostos apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$), de acordo com a ANOVA de um fator de Fisher.

Figura 21. Representação em *boxplot* da distribuição dos compostos voláteis ésteres hexílicos de cadeia alifática de pimenta malagueta no **Dia 01**, após tratamentos hormonais. Os gráficos com um asterisco (*) apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$), de acordo com a ANOVA de um fator de Fisher.

Figura 22. Representação em *boxplot* da distribuição dos compostos voláteis C6 de pimenta malagueta no **Dia 01**, após tratamentos hormonais. Os gráficos com um asterisco (*) apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$), de acordo com a ANOVA de um fator de Fisher.

O aumento proporcionado por MeJA sobre as enzima LOX de pimenta e tomate é um resultado compatível com que já foi evidenciado em trabalhos recentes com outros frutos como morango (CONCHA et al, 2013), melão (JIE-YING et al, 2016), pêssigo (WEI et al, 2017), banana (QI et al, 2016) e o próprio tomate, quando Yu et al (2009) trataram tomates comerciais com MeJA e verificaram que as lesões causadas por *Botrytis cinérea* diminuíram concomitantemente aos aumentos de LOX e seus radicais superóxidos formados.

Um fato curioso é que MeJA+1MCP do dia 01, assim como em tomates, aumentou os níveis de voláteis C6 e C5 em pimentas, apesar de que não houve aumento correspondente na expressão dos genes *LOX1*, *HPL* ou *ADH* (**Figura 17**). Os referidos compostos são: hexanal, (E)-2-hexen-1-ol, 1-hexanol, (E)-2-hexenal, (Z)-2-penten-1-ol e 3-pentanona. Além desses, vale ressaltar que os grupos MeJA e MeJA+1MCP também elevaram os níveis de 3-careno e 2-isobutil-metoxipirazina, que, assim como discutido anteriormente, dão nota aromática característica de pimenta.

No Dia 02 após os tratamentos hormonais em tomate (estágio *breaker*), percebe-se que os tratamentos permanecem claramente diferentes em relação ao grupo Controle (**Figura 23B**). Já no gráfico de PLS-DA do dia 03 das pimentas, revela que os grupos etileno e MeJA não se distinguem, enquanto que os outros tratamentos hormonais estão bem diferenciados (**Figura 24B**).

Quanto ao *heatmap* do dia 02 dos tomates, verifica-se que o agrupamento hierárquico dos tratamentos hormonais apresenta uma relação mais próxima entre os grupos Controle, MeJA e Etileno e uma outra entre os grupos 1MCP e MeJA+1MCP, já evidenciando os efeitos do bloqueador de receptores de etileno (**Figura 23A**). O tratamento com MeJA já não apresenta as maiores quantidades de compostos voláteis representativos do aroma de tomate como no Dia 01 (**Figura 18A**). Isso pode ter ocorrido em razão do forte aumento de muitos compostos do aroma logo no primeiro dia.

Figura 23. Análises multivariadas dos compostos voláteis de tomate *Grape* no **Dia 02** após tratamentos hormonais. A) Análise de grupamento hierárquico e *Heatmap*. Em A, as cores vermelhas e azul indicam altos e baixos níveis de compostos, respectivamente. B) Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) em 2D e seu respectivo gráfico em 3D. Grupo Controle (CTRL), Grupo MeJA (tratamento com MeJA 100ppm), Grupo ETILENO (tratamento com etileno 100 ppm), Grupo 1MCP (tratamento com 1MCP 100ppm) e Grupo MeJA+1MCP (tratamento com MeJA 10ppm + 1MCP 100ppm). Todos os compostos apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$), de acordo com a ANOVA de um fator de Fisher.

Figura 24. Análises multivariadas dos compostos voláteis de pimenta malagueta no **Dia 03**, após tratamentos hormonais. A) Análise de agrupamento hierárquico e *Heatmap*. Em A, as cores vermelhas e azul indicam altos e baixos níveis de compostos, respectivamente. B) Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) em 2D e seu respectivo gráfico em 3D. Grupo Controle (CTRL), Grupo MeJA (tratamento com MeJA 10ppm), Grupo ETILENO (tratamento com etileno 100 ppm), Grupo 1MCP (tratamento com 1MCP 100ppm) e Grupo MeJA+1MCP (tratamento com MeJA 10ppm + 1MCP 100ppm). Todos os compostos apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$), de acordo com a ANOVA de um fator de Fisher.

No *heatmap* dos compostos do aroma de pimenta malagueta do dia 03, percebe-se um forte aumento, no controle, de uma faixa de compostos pertencentes ao agrupamento 1, marcado na **Figura 24A**. Dentre os compostos que apresentam essa elevação, destacam-se voláteis C6 como 3-hexen-1-ol, (E)-2-hexenal, (E)-2-hexen-1-ol, que não foi correspondida pelos transcritos de genes da **Figura 17** para o dia 03. Interessante observar que, essa elevação de níveis de voláteis, dentro desse agrupamento, não é seguida nos grupos que contêm bloqueador de receptores de etileno (1MCP e MeJA+1MCP), uma divisão que também acontece nos voláteis de tomate. O grupo 1MCP apresenta níveis baixos de 2-isobutil-3-metoxipirazina e 3-careno, compostos que apresentam nota aromática característica de pimenta, desde o primeiro dia após o tratamento hormonal. Essa possível dependência de

etileno, para os itens desse agrupamento, faz com que os grupos Controle, MeJA e Etileno estejam hierarquicamente mais próximos. Um fato interessante a ser apontado é que as pimentas tratadas com MeJA apresentaram, nesse dia 03, elevados níveis de itens importantes para o aroma do fruto como 2-metil-butanoato de hexila, 3-metil-butanoato de hexila, hexanoato de hexila, 2-isobutil-3-metoxipirazina e 3-careno (**Figura S7 – Material Suplementar**). Todos esses itens estão aumentados em MeJA desde o dia 01.

Figura 25. Análises multivariadas dos compostos voláteis de tomate *Grape* no **Dia 04** após tratamentos hormonais. A) Análise de grupamento hierárquico e *Heatmap*. Em A, as cores vermelhas e azul indicam altos e baixos níveis de compostos, respectivamente. B) Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) em 2D e seu respectivo gráfico em 3D. Grupo Controle (CTRL), Grupo MeJA (tratamento com MeJA 100ppm), Grupo ETILENO (tratamento com etileno 100 ppm), Grupo 1MCP (tratamento com 1MCP 100ppm) e Grupo MeJA+1MCP (tratamento com MeJA 10ppm + 1MCP 100ppm). Todos os compostos apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$), de acordo com a ANOVA de um fator de Fisher.

De acordo com a **Figura 25B**, o perfil dos voláteis no dia 4 após o tratamento hormonal em tomate, possui tendências mais nítidas. Os grupos Controle, Etileno e MeJA estão mais

próximos. Os grupos de tratamentos hormonais do dia 06 nas pimentas não parecem distinguir tanto MeJA de MeJA+1MCP, o que evidencia a natureza não-climática da pimenta, pois o bloqueio dos receptores de etileno não foi o suficiente para distinguir as alterações no comportamento dos compostos do aroma em pimenta no dia 06 (**Figura 26B**).

No *heatmap* da **Figura 25A**, percebe-se que os grupos Controle, MeJA e Etileno permanecem hierarquicamente agrupados. Isso acontece por conta dos compostos derivados da via dos carotenoides, beta-ionona, neral, geranilacetona, 6-metil-5-hepten-1-ol e 6-metil-5-hepten-1-ona já começam a ser facilmente identificados nos grupos supracitados. Esses compostos são derivados da via dos carotenoides (**Figura 06**). Segundo a análise dos transcritos de genes de tomate da **Figura 17**, os níveis de *LOXC* do grupo controle estão bem diferenciados em relação aos demais grupos, no entanto, não há a constatação de aumento de voláteis C6 nesse grupo para esse dia (**Figura S6 – Material Suplementar**).

Figura 26. Análises multivariadas dos compostos voláteis de pimenta malagueta no **Dia 06**, após tratamentos hormonais. A) Análise de agrupamento hierárquico e *Heatmap*. Em A, as cores vermelhas e azul indicam altos e baixos níveis de compostos, respectivamente. B) Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) em 2D e seu respectivo gráfico em 3D. Grupo Controle (CTRL), Grupo MeJA (tratamento com MeJA 10ppm), Grupo ETILENO (tratamento com etileno 100 ppm), Grupo 1MCP (tratamento com 1MCP 100ppm) e Grupo MeJA+1MCP (tratamento com MeJA 10ppm + 1MCP 100ppm). Todos os compostos apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$), de acordo com a ANOVA de um fator de Fisher.

No *heatmap* da **Figura 26A** percebe-se que, no dia 06 após os tratamentos hormonais, existem dois agrupamentos. O agrupamento 1, permite visualizar uma alteração nos níveis dos compostos do aroma em pimenta malagueta, proporcionada por todos os tratamentos em relação ao controle, que possui o nível desses compostos diminuídos frente aos demais. Nesse agrupamento, MeJA apresenta níveis maiores, comparado ao controle, de alguns compostos como 2-isobutil-3-metoxipiramina; os ésteres importantes para o aroma de pimenta, 4-metil-pentanoato de etila, 3-metil-butanoato de hexila; os voláteis C6 e C5, 3-hexen-1-ol, (E)-2-hexen-1-ol, 1-hexanol, 3-pentanona, (Z)-2-penten-1-ol, além do 1-pentanol que aparece no agrupamento 2 (**Figura S8 – Material Suplementar**). Nesse mesmo agrupamento, vale destacar a presença do derivado dos carotenoides de pimenta 6-metil-5-hepten-2-ona, que também aparece em níveis elevados no grupo MeJA.

Figura 27. Análises multivariadas dos compostos voláteis de tomate *Grape* no **Dia 08** após tratamentos hormonais. A) Análise de agrupamento hierárquico e *Heatmap*. Em A, as cores vermelhas e azul indicam altos e baixos níveis de compostos, respectivamente. B) Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) em 2D e seu respectivo gráfico em 3D. Grupo Controle (CTRL), Grupo MeJA (tratamento com MeJA 100ppm), Grupo ETILENO (tratamento com etileno 100 ppm), Grupo 1MCP (tratamento com 1MCP 100ppm) e Grupo MeJA+1MCP (tratamento com MeJA 10ppm + 1MCP 100ppm). Todos os compostos apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$), de acordo com a ANOVA de um fator de Fisher.

No Dia 08 após os tratamentos hormonais em tomate, o gráfico PLS-DA mostra que os grupos estão diferenciados (**Figura 27B**). Em pimenta, os grupos MeJA, Controle e MeJA+1MCP não se diferenciam (**Figura 28B**). Ao contrário do que acontece em tomate, os grupos MeJA e MeJA+1MCP apresentam perfis de aroma mais similares em pimenta. Provavelmente isso se deve à menor dependência ao etileno para a formação dos compostos voláteis em pimenta.

Figura 28. Análises multivariadas dos compostos voláteis de pimenta malagueta no **Dia 09**, após tratamentos hormonais. A) Análise de grupamento hierárquico e *Heatmap*. Em A, as cores vermelhas e azul indicam altos e baixos níveis de compostos, respectivamente. B) Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) em 2D e seu respectivo gráfico em 3D. Grupo Controle (CTRL), Grupo MeJA (tratamento com MeJA 10ppm), Grupo ETILENO (tratamento com etileno 100 ppm), Grupo 1MCP (tratamento com 1MCP 100ppm) e Grupo MeJA+1MCP (tratamento com MeJA 10ppm + 1MCP 100ppm). Todos os compostos apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$), de acordo com a ANOVA de um fator de Fisher.

Quanto aos compostos voláteis dispostos no *heatmap* do dia 08 em tomate, vale destacar os níveis dos compostos do agrupamento 1 (**Figura 27A**). Nesse agrupamento, percebe-se que há um comportamento semelhante entre os compostos dos grupos MeJA,

Etileno e Controle, que apresentam níveis aumentados de compostos derivados da via dos carotenoides, como 6-metil-5-hepten-2-ona, geranilacetona, neral e geranial. O tratamento com MeJA ainda apresenta um aumento bem diferenciado em 6-metil-5-hepten-2-ol, um outro derivado dos carotenoides. Apesar do aumento estatisticamente significativo nos níveis dos transcritos de *HPL* e *ADH* para esse dia (**Figura 17**), o grupo de frutos tratados com MeJA não exibiu níveis de aldeídos ou álcoois de maneira diferenciada frente aos demais tratamentos hormonais. Vale destacar que esse aumento de expressão de genes coincidiu com o início do pico climatérico de tomate apresentado no dia 09 para esse grupo de frutos (**Figura 11**).

Ainda no dia 08 dos tomates, percebe-se que os voláteis C5 e C6 estão aumentados em 1MCP e MeJA+1MCP, que aparentemente os aumentam em relação aos outros tratamentos hormonais, mas se levarmos em consideração a **figuras S7 do material complementar**, existe uma tendência para que esses compostos voláteis, pela ação das enzimas LOX, HPL e ADH, decresçam. O que provavelmente está acontecendo é que esses compostos não estão sendo metabolizados na mesma velocidade que os dos grupos Controle, MeJA e Etileno.

Em pimentas, o comportamento dos compostos voláteis do dia 09, mostrado na **Figura 28A**, permite visualizar um aumento substancial ocorrido no grupo do Etileno. Esse aumento conta com oito ésteres, além de 3-careno e 2-isobutil-metoxipiramina. O que também chama atenção é a relação hierárquica entre MeJA, 1MCP e MeJA+1MCP, bem diferente do que ocorre em tomate.

Quanto ao Dia 10, quando os tomates tornaram-se totalmente avermelhados (estágio *red*), percebe-se que todos os tratamentos hormonais ainda estão bem diferenciados em relação ao grupo Controle (**Figura 29B**). Por outro lado, conforme pode ser observado na **Figura 30B**, os grupos de cada tratamento para as pimentas não se diferenciaram tanto quando esses frutos alcançaram a maturidade.

No que se refere ao comportamento dos compostos voláteis do tomate após 10 dias dos tratamentos hormonais verifica-se, na **Figura 29A**, que o comportamento antagônico de aumento e diminuição de níveis de compostos voláteis, assim como ocorreu no Dia 08, ainda permanece na comparação dos grupos MeJA, Etileno e Controle, em relação aos grupos 1MCP e MeJA+1MCP, principalmente no tocante aos compostos derivados da via dos carotenoides, que permanecem diminuídos nos dois últimos grupos citados. Dentre esses compostos, cabe ressaltar o 6-metil-5-hepten-2-ona, que é um derivado de licopeno e que

apresentou um aumento expressivo nos grupos Controle, Etileno e MeJA, facilmente observado nos cromatogramas desses grupos (**Figura S6 – Material Suplementar**). Essa diferença dos grupos Controle, MeJA e Etileno em relação a 1MCP e MeJA+1MCP, por conta da formação dos compostos derivados dos carotenoides, será tratada mais adiante.

Figura 29. Análises multivariadas dos compostos voláteis de tomate *Grape* no **Dia 10** após tratamentos hormonais. A) Análise de grupamento hierárquico e *Heatmap*. Em A, as cores vermelhas e azul indicam altos e baixos níveis de compostos, respectivamente. B) Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) em 2D e seu respectivo gráfico em 3D. Grupo Controle (CTRL), Grupo MeJA (tratamento com MeJA 10ppm), Grupo ETILENO (tratamento com etileno 100 ppm), Grupo 1MCP (tratamento com 1MCP 100ppm) e Grupo MeJA+1MCP (tratamento com MeJA 10ppm + 1MCP 100ppm). Todos os compostos apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$), de acordo com a ANOVA de um fator de Fisher.

Por meio da **Figura 31**, que mostra o resultado dos tratamentos hormonais, no tomate amadurecido, sobre os compostos que apresentam maior impacto no aroma desse fruto (Dia 10), percebe-se que os tratamentos com bloqueador dos receptores de etileno, 1MCP e MeJA+1MCP, apresentaram muita similaridade de perfil, o que demonstra uma certa dependência de MeJA em relação ao etileno no fruto climatérico como o tomate. O perfil dos compostos do aroma dos grupos Controle, Etileno e MeJA comprovou isso, pois apresentou

comportamentos bastante parecidos, apesar de que MeJA aumentou, de forma diferenciada, os níveis de alguns compostos como beta-ionona e 6-metil-5-hepten-2-ol.

A pimenta madura (dia 12) apresentou apenas 13 compostos com diferenciação significativa em relação aos tratamentos hormonais (**Figura 30A**). Apesar disso, o tratamento com MeJA aumentou os C6 voláteis (E)-2-hexen-1-ol, 3-hexen-1-ol e hexanal, sendo esse último um dos maiores contribuidores para o aroma de pimentas (RODRÍGUEZ-BARRUEZO et al, 2010). Esse importante aumento em C6 voláteis não teve a correspondência na expressão dos genes *LOX1*, *ADH1* e *HPL*, relacionado à via das lipoxigenases em pimenta, o que sugere talvez que outras enzimas podem estar envolvidas ou os transcritos escolhidos podem não ser os mais representativos para a síntese de tais compostos do aroma (**Figura 17**).

Figura 30. Análises multivariadas dos compostos voláteis de pimenta malagueta no **Dia 12** após tratamentos hormonais. A) Análise de grupamento hierárquico e *Heatmap*. Em A, as cores vermelhas e azul indicam altos e baixos níveis de compostos, respectivamente. B) Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) em 2D e seu respectivo gráfico em 3D. Grupo Controle (CTRL), Grupo MeJA (tratamento com MeJA 10ppm), Grupo ETILENO (tratamento com etileno 100 ppm), Grupo 1MCP (tratamento com 1MCP 100ppm) e Grupo MeJA+1MCP (tratamento com MeJA 10ppm + 1MCP 100ppm). Todos os compostos apresentam diferenças significativas para $p < 0,05$, de acordo com a ANOVA de um fator de Fisher.

Levando em consideração os compostos apontados como os mais importantes para o aroma em pimenta, além dos voláteis C6 já citados, destacam-se aumentos proporcionados por MeJA, que apesar de não terem diferenciação estatística, são compostos que já apresentavam aumentos em outros dias do amadurecimento desse frutos, como os compostos 3-careno e 2-isobutil-3-metoxipirazina, além do outro volátil C6 1-hexanol (**Figura 32**). Aparentemente o tratamento com MeJA em pimenta, apesar de ter apresentado menos compostos estatisticamente significativos que em tomate, demonstrou alterar mais compostos importantes para o aroma que esse fruto.

Figura 31. Representação em *boxplot* da distribuição dos compostos voláteis mais importantes do aroma de tomate *Grape* (*Solanum lycopersicum*) no **Dia 10**, após tratamentos hormonais. Os gráficos com um asterisco (*) apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$), de acordo com a ANOVA de um fator de Fisher.

Figura 32. Representação em *boxplot* da distribuição dos compostos voláteis mais importantes do aroma de pimenta no **Dia 12**, após tratamentos hormonais. Os gráficos com um asterisco (*) apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$), de acordo com a ANOVA de um fator de Fisher.

4.2.3 Compostos voláteis derivados da via dos carotenoides em tomate *Grape*

Levando em consideração as diferenças associadas aos compostos voláteis derivados dos carotenoides em tomate *Grape*, foram realizadas análise dos transcritos de *CCD1A* e *CCD1B*, genes que codificam duas dioxigenases clivadoras de carotenoides e que são associadas à produção desses compostos do aroma (**Figura 33**). Apesar de apresentar níveis bem diferenciados nos histogramas de cada tratamento, não houve diferenciação estatisticamente significativa em *CCD1B*.

Para facilitar o entendimento dos compostos voláteis dessa via, a **Figura 34** representa o metabolismo dos voláteis derivados da via dos carotenoides identificados. Geranilacetona e beta-ionona, derivados do zeta-caroteno e beta-caroteno, respectivamente, não foram detectados nos dois primeiros dias em tomate *Grape*. Os compostos geranial e neral aparentemente são derivados do licopeno, mas não está muito claro o papel das CCDs na síntese desses compostos.

Os compostos 6-metil-5-hepten-2-ona e seu derivado 6-metil-5-hepten-2-ol, que são provenientes do licopeno, não apresentaram muita diferenciação de níveis entre os

tratamentos hormonais nos dois primeiros dias, nem mesmo no grupo Etileno, que apresentou um aumento significativo para *CCD1A* logo no dia 01. Aparentemente não existe necessariamente uma correspondência entre os níveis de transcritos para *CCD1A* e *CCD1B* e os compostos voláteis correspondentes, porque esses compostos dependem mais do conteúdo dos respectivos precursores carotenoides para serem sintetizados (KLEE e GIOVANNONNI, 2011; LEWINSOHN et al, 2005; VOGEL et al, 2010). Gao et al (2008) utilizaram tomates transgênicos com ACC sintase suprimida para estudar a relação entre licopeno e voláteis derivados dos carotenoides. Os resultados mostraram uma significativa redução de licopeno e voláteis do aroma. No entanto, quando os tomates eram tratados com licopeno externo havia a conversão de 6-metil-5-hepten-2-ona em 6-metil-5-hepten-2-ol, indicando que uma forte inibição de etileno não tinha efeito nas enzimas da biossíntese de derivados de carotenoides. O decréscimo desses dois compostos quando da supressão de ACS ocorreu devido à diminuição do acúmulo de licopeno e não a produção de etileno.

Figura 33. Perfil comparativo das expressões relativas de genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de compostos voláteis, *CCD1A* e *CCD1B*, derivados de carotenoides em tomate *Grape* (*Solanum lycopersicum*), de acordo com os grupos Controle, MeJA, Etileno, 1MCP e MeJA+1MCP. LOX = lipoxigenase, HPL = hidroperóxido liase, ADH = álcool desidrogenase. Barras verticais indicam erro padrão da média (n=9). ANOVA *one-way* foi usada como teste de significância seguida de teste de Tukey para comparações múltiplas, apenas entre os respectivos dias de cada tratamento hormonal.

Figura 34. Representação do metabolismo dos compostos voláteis derivados dos carotenoides com *boxplot* dos compostos do aroma, originados por essa via, identificados em tomate *Grape*. Adaptado de Zhang et al (2015).

Uma correlação aparentemente existente nos experimentos aqui relatados indicou que MeJA, no dia 08, apresentou níveis estatisticamente significativos em relação aos outros

tratamentos hormonais para *CCD1A* e que também apresentou níveis mais elevados de 6-metil-5-hepten-2-ona e 6-metil-5-hepten-2-ol, que são compostos importantes para o aroma de tomate. Esses compostos também estão bastante elevados no grupo MeJA para o dia 10 após os tratamentos hormonais. MeJA também aumentou os níveis de beta-ionona no dia 10, apesar de não ter apresentado diferença significativa em relação aos outros tratamentos hormonais, mas sem correspondência de aumento de níveis dos transcritos *CCD1A* e *CCD1B*. Vale ressaltar que o compostos 6-metil-5-hepten-2-ol está aumentado no grupo MeJA desde do dia 02. Nesses casos, MeJA pode ter aumento a quantidade de substrato, no caso o licopeno, como já foi descrito antes na literatura (FAN et al, 1998; LIU et al, 2012). No entanto, não foi evidenciada uma mudança de cor tão diferenciada em relação aos grupos Controle e Etileno (**Figura 12**).

5. CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que os tratamentos hormonais causaram mudanças, em diferentes graus, na composição do aroma de tomate e pimenta durante o amadurecimento, no entanto muitos desses resultados deixaram evidente a natureza climatérica e não-climatérica desses frutos. Nos tomates, foi possível observar a importância do etileno durante o amadurecimento desse fruto. A expressão dos genes *CCD1A* e *CCD1B* foi diminuída pela ação de 1MCP, mesmo quando esteve associado à MeJA. Isso também foi observado pelo atraso na mudança de cor desse fruto, o que não ocorreu em pimenta. Essa associação entre grupos que continham ou não o bloqueador de receptores de etileno também ficou evidente no resultado da análise dos transcritos de *LOX*, *ADH* e *HPL* do tomate, que foram bem menos expressos nos grupos contendo 1MCP, tendo reflexo direto na formação do aroma relacionados a via dos ácidos graxos e que não foi muito alterada em pimenta.

Em relação aos tratamentos com MeJA, foi possível constatar que esse hormônio possui um importante papel na formação dos compostos do aroma de tomate e pimenta, regulando de forma positiva principalmente os compostos derivados da via dos ácidos graxos. No entanto, o impacto de MeJA ocorreu, mais pronunciadamente, nos primeiros dias após o tratamento hormonal em ambos os frutos, principalmente elevando os níveis de voláteis C6 em tomates e ésteres metílicos, derivados dos voláteis C6, em pimenta. Esses aumentos foram concomitantes ao crescimento dos níveis dos transcritos de *LOX*, *HPL* e *ADH*, sendo que em tomates houve uma maior diferenciação em relação aos outros tratamentos hormonais, comparado à pimenta. No períodos intermediários do amadurecimento de tomate e pimenta, os resultados não apenas de MeJA, mas dos outros tratamentos hormonais passaram a interagir pouco com o comportamento dos transcritos de genes citados, muito em função da complexidade desse processo, que pode envolver outras enzimas, principalmente para pimenta, que apresentou menos interação e não possui tantos trabalhos científicos envolvendo esse tema.

No tomate maduro, MeJA causou mais alterações nos compostos beta-ionona e 6-metil-5-hepten-2-ol, que são derivados da via dos carotenoides. Ademais, as grandes modificações dos primeiros dias não se mostraram duradouras. Já na pimenta madura, o tratamento com MeJA aumentou os níveis de compostos importantes para o aroma de pimenta como 2-isobutil-3-metoxipirazina e 3-careno. Além disso, houve um aumento estatisticamente

significativo nos voláteis C6 (E)-2-hexen-1-ol, 3-hexen-1-ol e hexanal, sendo esse último um dos grandes contribuidores para o aroma desse fruto.

Estudos em outros frutos climatéricos e não-climatéricos podem melhor evidenciar se os efeitos observados neste trabalho também se estendem a outras espécies e, particularmente, se as respostas ao MeJA guardam algum grau de similaridade com o observado em tomate e pimenta, ou se são variáveis de espécie para espécie.

6. MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura S1. Cromatogramas e fotos de frutos de tomateiro (*Solanum lysopersicum* cv 'Micro Tom'), durante o amadurecimento, submetidos ao tratamento de MeJA nas concentrações de 10ppm e 100ppm e comparados ao grupo controle.

Figura S2. Fotos de tomates *Grape* (*Solanum lysopersicum*) como replicata biológica, submetidos a tratamentos hormonais, durante o amadurecimento. Grupo Controle, Grupo MeJA (tratamento com MeJA 100ppm), Grupo ETILENO (tratamento com etileno 100 ppm), Grupo 1MCP (tratamento com 1MCP 100ppm) e Grupo MeJA+1MCP (tratamento com MeJA 100ppm + 1MCP 100ppm).

Figura S3. Análise colorimétrica e etileno de tomate *Grape* (*Solanum lysopersicum*), como replicata biológica, submetidos a tratamentos hormonais durante o amadurecimento. Grupo Controle, Grupo MeJA (tratamento com MeJA 100ppm), Grupo ETILENO (tratamento com etileno 100 ppm), Grupo 1MCP (tratamento com 1MCP 100ppm) e Grupo MeJA+1MCP (tratamento com MeJA 100ppm + 1MCP 100ppm). Barras verticais indicam desvio padrão da média (n=9).

Figura S4. Fotos de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) como replicata biológica, submetidos a tratamentos hormonais, durante o amadurecimento. Grupo Controle, Grupo MeJA (tratamento com MeJA 10ppm), Grupo ETILENO (tratamento com etileno 100 ppm), Grupo 1MCP (tratamento com 1MCP 100ppm) e Grupo MeJA+1MCP (tratamento com MeJA 100ppm + 1MCP 100ppm).

Figura S5. Análise colorimétrica e etileno de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*), como replicata biológica, submetidos a tratamentos hormonais durante o amadurecimento. Grupo Controle, Grupo MeJA (tratamento com MeJA 100ppm), Grupo ETILENO (tratamento com etileno 100 ppm), Grupo 1MCP (tratamento com 1MCP 100ppm) e Grupo MeJA+1MCP (tratamento com MeJA 100ppm + 1MCP 100ppm). Barras verticais indicam desvio padrão da média (n=9).

Figura S6. Cromatogramas do perfil de compostos voláteis de tomate *Grape* após 10 dias dos tratamentos hormonais, comparados ao Controle do dia 00. Grupo Controle (CTRL), Grupo MeJA (tratamento com MeJA 10ppm), Grupo ETILENO (tratamento com etileno 100 ppm), Grupo 1MCP (tratamento com 1MCP 100ppm) e Grupo MeJA+1MCP (tratamento com MeJA 10ppm + 1MCP 100ppm). Os números representam os compostos majoritários, mas a ordem não representa aumento ou diminuição. São eles: (1) - acetato de etila; (2) - Hexanal; (3) - (Z)-3-hexenal; (4) - (E)-2-hexenal; (5) - 1-hexanol; (6) - (Z)-3-hexen-1-ol; (7) - 6-metil-5-hepten-2-ona

Figura S7. Cromatogramas do perfil de compostos voláteis de pimenta malagueta após 12 dias dos tratamentos hormonais, comparados ao Controle do dia 00. Grupo Controle (CTRL), Grupo MeJA (tratamento com MeJA 10ppm), Grupo ETILENO (tratamento com etileno 100 ppm), Grupo 1MCP (tratamento com 1MCP 100ppm) e Grupo MeJA+1MCP (tratamento com MeJA 10ppm + 1MCP 100ppm). Os números representam os compostos majoritários, mas a ordem não representa aumento ou diminuição. São eles: (1) - acetato de etila; (2) isobutirato de 2-metil-pentila; (3) - 2,2-dimetil-propionato de hexila; (4) - isovalerato de 2-metil-butila; (5) - isobutirato de 2-metil-pentila; (6) - 2-etil-hexanoato de hexila ; (7) - hexanoato de hexila

Figura S8. Heatmaps com o comportamento dos compostos voláteis dos grupos Controle (CTRL) de tomate *Grape* e pimenta malagueta durante o amadurecimento. As cores vermelho e azul indicam altos e baixos níveis de compostos, respectivamente.

Figura S9. Compostos do aroma de tomate *Grape* (*Solanum lysopersicum*), que apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$), de acordo com a ANOVA de um fator de Fisher.

Figura S10. Compostos do aroma de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*), que apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$), de acordo com a ANOVA de um fator de Fisher.

Figura S11. Heatmap apresentando os compostos do aroma de tomate Grape (*Solanum lycopersicum*) do **dia 21** e representação dos compostos com diferenças significativas ($p < 0,05$) (em vermelho), de acordo com a ANOVA de um fator de Fisher.

Figura S12. Representação do possível metabolismo dos compostos voláteis C6 identificados (em *boxplot*), derivados dos ácidos graxos em tomate *Grape* (*Solanum lycopersicum*). Adaptado de Zhang et al (2015).

Figura S13. Representação do possível metabolismo dos compostos voláteis C6 identificados (em *boxplot*), derivados dos ácidos graxos em pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*). Adaptado de Zhang et al (2015).

Figura S14. Representação em *boxplot* da distribuição dos compostos voláteis mais importantes do aroma de tomate no **Dia 10** da replicata biológica, após tratamentos hormonais.

Figura S15. Heatmap apresentando os compostos do aroma de tomate *Grape* (*Solanum lycopersicum*) do **dia 10** da replicata biológica, após tratamentos hormonais.

Figura S16. Representação em *boxplot* da distribuição dos compostos voláteis mais importantes do aroma de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) no **Dia 12** da replicata biológica, após tratamentos hormonais.

Figura S17. Heatmap apresentando os compostos do aroma de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) do dia 12 da replicata biológica, após tratamentos hormonais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIZAT, W.M.; ABLE, J.A.; STRANGOULIS, J.C.; ABLE, A.J. Characterization of ethylene pathway components in non-climacteric capsicum. *Plant Biology*, v. 13, p. 01-14, 2013.
- ALEXANDER, L.; GRIERSON, D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, v. 53, n. 377, p. 2039-2055, 2002.
- AMENT, K.; KANT, M.R., SABELIS, M.W., HARING, M.A.; SHUURINK, R.C. Jasmonic Acid Is a Key Regulator of Spider Mite-Induced Volatile Terpenoid and Methyl Salicylate Emission in Tomato. *Plant Physiology*, v. 135, p. 2025-2037, 2004.
- AMNUAYSIN, N.; JONES, M.I.; SERAYPHEAP, K. Changes in activities and gene expression of enzymes associated with cell wall modification in peel of hot water treated bananas. *Scientia Horticulturae*, v. 142, p. 98-104, 2012.
- ARIMBOOR, R.; NATARAJAN, R.B.; MENON, K.R.; CHANDRASEKHAR, L.P.; MOORKOTH, V. Red pepper (*Capsicum annuum*) carotenoids as a source of natural food colors: analysis and stability – a review. *Journal of Food Science Technology*, v. 52, p. 1258-1271, 2015.
- ASNIN, L; PARK, W. Isolation and analysis of bioactive compounds in Capsicum peppers. *Food Science and Nutrition*, v. 52, p. 254-289, 2015.
- AYALA-ZAVALA, J.F.; WANG, S.Y.; WANG, C.Y.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A. Methyl jasmonate in conjunction with ethanol treatment increases antioxidant capacity, volatile compounds and postharvest life of strawberry fruit. *European Food Research and Technology*, v.221, p. 731-738, 2005.
- AZCARATE, C; BARRINGER, S. Effect of enzyme activity and frozen storage on jalapeno pepper volatiles by selected ion flow tube – mass spectrometry. *Journal of Food Science*, v. 75, p. 710-721, 2010.
- BAI, J; BALDWIN, E; IMAHORI, Y; KOSTENYUK, I; BURNS, J; BRECHT, J. Chilling and heating may regulate C6 volatile aroma production by different mechanisms in tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, v. 60, p. 111-120, 2011.

BAI, J; BALDWIN, E; IMAHORI, Y; KOSTENYUK; BURNS, J; BRECHT, J. Chilling and heating may regulate C6 volatile aroma production by different mechanisms in tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, v. 60, p. 111-120, 2011.

BALDASSARRE, V; CABASSI, G; SPADAFORA, N; APRILE, A; MULLER, C; ROGERS, H; FERRANTE, A. Wounding tomato fruit elicits ripening-stage specific changes in gene expression and production of volatile compounds. *Journal of Experimental Botany*, v. 66, p. 1511-1526, 2015.

BALOGH, A; KONCZ, T; TISZA, V; KISS, E; HESZKY, L. The effect of 1MCP on the expression of several ripening-related genes in strawberries. *Hort Science*, v. 40, p. 2088-2090, 2005.

BALTAZAR, A.; ESPINA-LUCERO, J.; RAMOS-TORRES, I.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. Effect of methyl jasmonate on properties of intact Tomato fruit monitored with destructive and nondestructive tests. *Journal of Food Engineering*. v. 80, 1086-1095, 2007.

BAPAT, V.A.; TRIVEDI, P.K.; GHOSH, A.; SANE, V.A. Ripening of fleshy fruit: Molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnology Advances*, v. 28, p. 98-10, 2010.

BARRY, C. S.; GIOVANNONI, J. J. Ethylene of fruit ripening. *Journal Growth Regulation*, v. 26, p.143-159, 2007.

BARZEGAR, T.; DELSHAD, M.; KASHI, A.K.; MAUVE, C.; GHASHGHAIE, J. Sugar accumulation pattern and contents in development fruits of two Iranian melon cultivars. *Iranian Journal of Plant Physiology*, v. 5, p. 1353-1359, 2015.

BECKLES, D.M.; HONG, N.; STAMOVA, L.; LUENGWILAI, K. Biochemical factors contributing to tomato fruit sugar content: a review. *Fruits*, v. 67, p. 49-64, 2012.

BLANCH, G.P.; FLORES, G.; DEL CASTILLO, M.L.R. Influence of methyl jasmonate in conjunction with ethanol on the formation of volatile compounds in berries belonging to the Rosaceae. *Postharvest Biology and Technology*, v.62, p.168–178, 2011.

BOGUSZ JUNIOR, S.; TAVARES, A.M.; TEIXEIRA FILHO, J.; ZINI, C.A.; GODOY, H.T. Analysis of the volatile compounds of Brazilian chilli peppers (*Capsicum spp.*) at two stages of maturity by solid phase micro-extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Research International*, v. 48, p. 98-107, 2012.

BOGUSZ JUNIOR, S; MARÇO, P.H; VALDERRAMA, P; DAMASCENO, F; ARANDA, M; ZINI, C; CARAMÃO, E; MELO, A; TEXEIRA FILHO, J; GODOY, T. Analysis of volatile compounds in *Capsicum* spp. By headspace solid-phase microextraction and GC x CG-TOFMS. *Analytical Methods*, v. 7, 521-529, 2015.

BORGHESI, E.; FERRANTE, A.; GORDILLO, B.; RODRÍGUEZ-PULIDO, F.J.; GIACOMO, C.; TRIVELLINI, A.; MENSUALI-SODI, A.; MALORGIO, F.; HEREDITA, F.J. Comparative physiology during ripening in tomato rich-anthocyanins fruits. *Plant Growth Regulation*, v. 80, p. 207-214, 2016.

BOTONDI, R.; DE SANTIS, D.; BELLINCONTRO, A.; VIZOVITIS, K.; MENCARELLI, F. Influence of Ethylene Inhibition by 1-Methylcyclopropene on Apricot Quality, Volatile Production, and Glycosidase Activity of Low- and High-Aroma Varieties of Apricots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p. 1189-1200, 2003.

CAI, C; CHEN, K; XU, W; ZHANG, W; LI, X; FERGUSON, I. Effect of 1MCP on postharvest quality of loquat fruit. *Postharvest Biology and Technology*, v. 40, p. 155-162, 2006.

CAO, H.; WANG, J.; DONG, X.; HAN, Y.; MA, Q.; DING, ZHAO, F.; ZHANG, J.; CHEN, H.; XU, J.; DENG, X. Carotenoid accumulation affects redox status, starch metabolism, and flavonoid/anthocyanin accumulation in citrus. *Plant Biology*, v. 14, p. 15-27, 2015.

CARA, B.; GIOVANNONI, J.J. Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. *Plant Science*, v. 175, p.106–113, 2008.

CARRARI, F.; FERNIE, A. Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany*, v. 57, p. 1883-1897, 2006.

CASTELLARIN, S.D.; GAMBETTA, G.A.; WADA, H.; KRASNOW, M.N.; CRAMER, G.R.; PETERLUNGER, E.; SHACKEL, K.A.; MATTHEWS, M.A. Characterization of major ripening events during softening in *Grape*: turgor, sugar accumulation, abscisic acid metabolism, color development, and their relationship with growth. *Journal of Experimental Botany*, v. 67, p. 709-722, 2016.

CHEN, G; HACKETT, R; WALKER, D; TAYLOR, A; LIN, Z; GRIERSON, D. Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (TomloxC) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds. *Plant Physiology*, v. 136, p. 2641-2651, 2004.

CHEONG, J.J., CHOI, Y.D. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in Genetics*, v.19, n. 7, p. 409-413, 2003.

CHERIAN, S.; FIGUEROA, C.R.; NAIR, H. Movers and Shakers in the regulation of fruit ripening: a cross-dissection of climacteric versus non-climacteric fruit. *Journal of Experimental Botany*, v. 65, p. 4705–4722, 2014.

CLARK, J.E. Taste and flavour: their importance in food choice and acceptance. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 57, p. 639-643, 1998.

CONCHA, C.M.; FIGUEROA, N.E.; POBLETE, L.A.; ONATE, F.A.; SHWAB, W.; FIGUEROA, C.R. Methyl jasmonate treatment induces changes in fruit ripening by modifying the expression. Of several ripening genes in *Fragaria chiloensis* fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 70, p. 433-444, 2013.

CONTRERAS, C; BEAUDRY, R. Lipxygenase-associated apple volatile and their relationship with aroma perception during ripening. *Postharvest Biology and Technology*, v. 82, p. 28-38, 2013.

CONTRERAS, C; TJELLSTROM, H; BEAUDRY, R. Relationships between free and esterified fatty acids and LOX-derived volatiles during ripening in apple. *Postharvest Biology and Technology*, v. 112, p. 105-113, 2016.

CUMPLIDO-LASO, G; MEDINA-PUCHE, L; MOYANO, E; HOFFMAN, T; SINZ, Q; RING, L; STUDART-WITTKOWSKI, C; CABALLERO, J; SCHWAB, W; MUNOZ-BLANCO, J; BLANCO-PORTALES, R. The fruit ripening-related gene FaAAT2 encodes an acyl transferase involved in strawberry aroma biogenesis. *Journal of Experimental Botany*, v. 63, p. 4275-4290, 2012.

DAI, Z.W.; LÉON, C.; FEIL, R.; LUNN, J.E.; DELROT, S.; GOMÈS, E. Metabolic profiling reveals coordinated switches in primary carbohydrate metabolism in *Grape* berry (*Vitis vinifera* L.), a non-climacteric fleshy fruit. *Journal of Experimental Botany*, v. 64, p. 1345-1355, 2013.

DAR, T; UDDIN, M; KHAN, M; HAKEEM, K; JALEEL, H. Jasmonates counter plant stress: A review. *Environmental and Experimental Botany*, v. 1115, p. 49-57, 2015.

DAVIDOVICH-RIKANATI, R.; LEWINSOHN, E.; BAR, E.; LIJIMA, Y.; PICHERSKY, E.; SITRIT, Y. Overexpression of the lemon basil α -zingiberene synthase gene increases both mono- and sesquiterpene contents in tomato fruit. *The Plant Journal*, v. 56, 228–238, 2008.

DEFILIPPI, B.G.; MANRÍQUEZ, D.; LUENGWILAI, K.; GONZÁLEZ-AGUERO, M. Aroma Volatiles: Biosynthesis and Mechanisms of Modulation During Fruit Development. *Advances in Botanical Research*, v. 50, p 1-37, 2009.

DESNOUES, E.; GIBON, Y.; BALDAZZI, V.; GÉNARD, M.; TURIN-QUILOT, B. Profiling sugar metabolism during fruit development in peach progeny with different fructose-to-glucose ratios. *Plant Biology*, v. 14, p. 336-349, 2014.

DHAR, M. K.; SHARMA, R.; KOUL, A.; KAUL, S. Development of fruit color in Solanaceae: a story of two biosynthetic pathways. *Briefings in Functional Genomics*, v. 15, p. 02-14, 2014.

DHARMASIRI, S.; JAYAWEERA, T.; DHARMASIRI, N. Plant hormone signalling: current perspectives on perception and mechanisms of action. *Journal of Science*, v. 42, p. 01-17, 2013.

DUDAREVA, N.; KLEMPIEN, A.; MUHLEMANN, J.K.; KAPLAN, I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Physiologist*, v. 198, 16-32, 2013.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of Plant Volatiles. *Plant Physiology*, v. 135, p. 1893-1902, 2004.

EGGINK, P.M.; TIKUNOV, Y.; MALIEPAARD, C.; HAANSTRA, J.P.W.; DE ROOIJ, H.; VOGELAAR, A.; GUTTELING, E.W.; FREYMARK, G.; BOVY, A.G.; VISSER, R.G.F. Capturing flavors from *Capsicum baccatum* by introgression in sweet pepper. *Theoretical and Applied Genetics*, v.127, p. 373-390, 2014.

ETIENNE, A.; GÉNARD, M.; LOBIT, P.; MBEGUIÉ, M.; BUGAUD, C. What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells. *Journal of Experimental Botany*, v. 35, p. 1-19, 2013.

FABI, J.P., CORDENUNSI, B.R., BARRETO, G.P de M., MERCADANTE, A.Z., LAJOLO, F.M., NASCIMENTO, J.R.O. Papaya fruit ripening: response to ethylene and 1-methylcyclopropene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 6118-6123, 2007.

FAN, X.; MATHEIS, J.P.; FELLMAN, J.K.; PATTERSON, M.E. Effect of Methyl Jasmonate on Ethylene and Volatile Production by Summerred Apples Depends on Fruit Developmental Stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, p. 208-211, 1997.

FAN, X.; MATTHEIS, J.P.; FELLMAN, J.K. A role for jasmonates in climacteric fruit ripening. *Planta*, v. 204, p. 444-449, 1998.

FERNÁNDEZ-TRUJILLO, J.P.; SERRANO, J.M.; MARTÍNEZ, J.A. Quality of red sweet pepper fruit treated with 1MCP during a simulated post-harvest handling chain. *Food Science in Technology International*, v. 15, p. 23-30, 2009.

FERRANDINO, A; CARLOMAGNO, A; BALDASSARRE, S; SCHUBERT, A. Varietal and pre-fermentative volatile during ripening of *Vitis vinífera* cv Nebbiolo berries from three growing áreas. *Food Chemistry*, v. 135, p. 2340-2349, 2012.

GAI-HUA, Q; XIAO-XIAO, Q; YONG-JIE, Q; ZHENG-HUI, G; XING-KAI, Y; HAI-FA, P; YI-LIU, X. Identification and expression patterns of alcohol dehydrogenase genes involving in ester volatile biosynthesis in pear fruit. *Science Direct*, v. 16, p. 1742-1750, 2017.

GAO, H.; ZHU, H.; SHAO, Y.; CHEN, A.; LU, C.; ZHU, B.; LUO, Y. Lycopene accumulation affects the biosynthesis of some carotenoid-related volatiles independent of ethylene in tomato. *Journal of integrative Plant Biology*, v. 50, p. 991-996, 2008.

GARCIA, C; STEVENSON, R; ATKINSON, R; WINZ, R; QUEK, S.Y. Changes in the bound aroma profiles of 'Hayward' and 'Hort16a' kiwifruit (*Actinidia* spp.) during ripening and GC-olfactometry analysis. *Food Chemistry*, v. 137, p. 45-54, 2013.

GARCÍA-ROJAS, M; MORGAN, A; GUDENSCHWAGER, O; ZAMUDIO, S; CAMPOS-VARGAS, R; GONZÁLEZ-AGUERO, M; DEFILIPPI, B. Biosynthesis of fatty acids-derived volatiles in 'Hass' avocado is modulated by ethylene and storage conditions during ripening. *Scientia Horticulturae*, v. 202, p. 91-98, 2016.

GHANATI, F.; BAKHTIARIAN, S. Effect of methyl jasmonate and silver nanoparticles on production of secondary metabolites by *Calendula officinalis* L (Asteraceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 13, p. 1783-1789, 2014.

GOMÉZ-GARCÍA, M.R.; OCHOA-ALEJO, N. Biochemistry and molecular biology of carotenoid biosynthesis in chilli peppers (*Capsicum* spp.). *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, p. 19025-19053, 2014.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A, FORTIZ, J.; CRUZ, R.; BAEZ, R.; WANG, C.Y. Methyl Jasmonate Reduces Chilling Injury and Maintains Postharvest Quality of Mango Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 515-519, 2000.

GONZÁLIZ-AGUILAR, G.A.; BUTTA, J.G.; WANG, C.Y. Methyl jasmonate and modified atmosphere packaging (MAP) reduce decay and maintain postharvest quality of papaya 'Sunrise'. *Postharvest Biology and Technology*, v. 28, p. 361-370, 2003.

GOULAO, L.F.; OLIVEIRA, C.M. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Food Science & Technology*, v.19, p. 04-25, 2008.

GOULET, C; KAMUYOSHIHARA, Y; LAM, N; RICHARD, T; TAYLOR, M; TIEMAN, D; KLEE, H. Divergence in the enzymatic activities of a tomato and *Solanum pennellii* alcohol acyltransferase impacts fruit volatile ester composition. *Molecular Plant*, v. 8, p. 153-162, 2015.

GOULET, C; MAGEROY, M; LAM, N; ABBYE FLOYSTAD, A; TIEMAN, D; KLEE, H. Role of an esterase in flavor volatile variation within the tomato clade. *Plant Biology*, v. 109, p. 19009-19014, 2012.

GRIERSON, D.; FRAY, R. Control of ripening in transgenic tomatoes. *Euphytica*, v. 79, p. 251-263, 1994.

GUÍLLEN, F.; CASTILLO, S.; ZAPATA, P.J.; MARTÍNEZ-ROMERO, D.; VALERO, D.; SERRANO, M. Efficacy of 1-MPC treatment in tomato fruit 2. Effect of cultivar and ripening stage at harvest. *Postharvest Biology and Technology*, v. 42, p. 235-242, 2006.

GÜLER, Z.; SEKERLI, Y.E. Distribution of volatile compounds in organic tomato (*Lycopersicon esculentum*) at different ripening stages. *Academic Food Journal*, v. 11, p. 06-13, 2013.

GUILLAUMIE, S; ILG, A; RÉTY, S; BRETTE, M; TROSSAT-MAGNIN, C; DECROOCQ, S; LÉON, C; KEIME, C; YE, T; BALTENWECK-GUYOT, R; CLAUDEL, P; BORDENAVE, L; VANBRABANT, S; DUCHÊNE, E; DELROT, S; DARRIET, P; HUGUENEY, P; GOMÈS, E. Genetic Analysis of the biosynthesis of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine, a major grape-derived aroma compound impacting wine quality. *American Society of Plant Biologists*, v. 162, p. 604-615, 2013.

GULLNER, G; KUNSLER, A; KIRÁLY, L; POGÁNY, M; TÓBIÁS, I. Up-regulated expression of lipoxygenase and divinyl ether synthase genes in pepper leaves inoculated with Tobamoviruses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 74, p. 387-393, 2010.

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

HADI, M.A.M.; ZHANG, F.J.; WU, F.F.; ZHOU, C.H.; TAO, J. Advances in Fruit Aroma Volatile Research. *Molecules*, v. 18, p. 8200-8229, 2013.

HAN, Y; BARRINGER, S. Fomation of volatile in the lipoxigenase pathway as affected by fruit type and temperature. *Journal of Experimental Food Chemistry*, v. 1, p. 3-7, 2016.

HASSAN, M; ZAINAL, Z; ISMAIL, I. Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biothechnology. *Plant Biotechnology Journal*, v. 13, p. 727-739, 2015.

HIRAO, T.; OKAZAWA, A.; HARADA, K.; KOBAYASHI, A.; MURANAKA, T.; HIRADA, K. Green leaf volatile enhance methyl jasmonate response in Arabidopsis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 114, p. 540-545, 2012.

HOSSAIN, M.Z; HOSSAIN, M.D; FUJITA, M. Induction of pumpkin glutathione S-transferases by different stresses and its possible mechanisms. *Biologia Plantarum*, v. 50, p. 210-218, 2006.

ILG, A; BRUNO, M; BEYER, P; AL-BABILI, S. Tomato carotenoid cleavage dioxygenases 1A and 1B: relaxed double bond specificity leads to a plenitude of dialdehydes, mono-apocarotenoids and isoprenoid volatiles. *Federation of European Biochemical Societies*, v. 4, p. 584-593, 2014.

JELÉN, H; GRACKA, A. Analysis of black pepper volatile by solid phase microextraction-gas chromatography: A comparison of terpenes profiles with hydrodistillation. *Journal of Chromatography*, v. 1418, p. 200-209, 2015.

JIE-YING, L; CHIONG, J; QI, S; YU-FAN, T; SONG-XIAO, C; XIAO-OU, G; YA-ZHONG, J; HONG-YAN, Q. Effects of abiotic stress and hormones on the expressions of five 13-CmLOXs and enzyme activity in oriental melon (*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino). *Journal of Integrative Agriculture*, v. 15, p. 326-338, 2016.

JU, C.; CHANG, C. Mechanistic Insights in ethylene perception and signal transduction. *American Society of Plant Biologists*, v. 169, p. 85-95, 2015.

JU, Y.; LIU, M.; ZHAO, H.; MENG, J.; FANG, Y. Effect of exogenous abscisic acid and methyl jasmonate on anthocyanin composition, fatty acids, and volatile compounds of cabernet sauvignon (*Vitis vinífera*) Grape berries. *Molecules*, v. 21, p. 3-15, 2016.

KADER, A.A. Flavor quality of fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 88, p. 1863-1868, 2008.

KAUSCH, K.; SOLOLEV, A.P.; GOYAL, R.K.; FATIMA, T.; LAILA-BEEVI, R.; SAFTNER, R.A.; HANDA, A.K.; MATTOO, A. K. Methyl jasmonate deficiency alters cellular metabolome, including the aminome of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. *Amino acids*, v. 42, p. 843-856, 2012.

KAZAN, K.; MANNERS, J.M. Jasmonate Signaling: Toward an Integrated View. *American Society of Plant Biologists*, v. 146, p. 1459-1468, 2008.

KEVANY, B.; TIEMAN, D.M.; TAYLOR, M.G.; CIN, V.D.; KLEE, H.J. Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. *The Plant Journal*, v. 51, p. 458-467, 2007.

KLEE, H.J. Improving the flavor of fresh fruits: genomics, biochemistry, and biotechnology. *New Phytologist*, v. 187, p. 44-56, 2010.

KLEE, J.K.; GIOVANNONI, J.J. Genetics and Control of Tomato Fruit Ripening and Quality Attributes. *Annual Review of Genetics*, v. 45, p. 41-59, 2011.

KOCHEVENKO, A.; KLEE, H.J.; FERNIE, A.R.; ARAÚJO, W.L. Molecular identification of a further branched-chain aminotransferase 7 (BCAT7) in tomato plants. *Journal of Plant Physiology*, v. 169, p. 437-443, 2012.

KOHLMANN, M.K.; BACHMANN, A.; WEICHERT, H.; KOLBE, A.; BALKENHOHL, WASTERNACK, C.; FEUSSNER, I. Formation of lipoxygenase-pathway-derived aldehydes in barley leaves upon methyl jasmonates treatment. *European Journal of Biochemistry*, v. 260, p. 885-895, 1999.

KONDO, S.; SETHA, S.; RUDELL, D.R.; BUCHANAN, D.A.; MATHEIS, J.P. Aroma volatile biosynthesis in apples affected by 1MCP and methyl jasmonate. *Postharvest Biology and Technology*, v. 36, p. 61-68, 2005.

KONDO, S.; YAMADA, H.; SETHA, S. Effect of jasmonates differed at fruit ripening stages on 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase and ACC oxidase gene expression in pears. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 132, p. 120-125, 2007.

KORKMAZ, A.; HAYALOGLU, A.; ATASOY, A. Evaluation of the volatile compounds of fresh ripened *Casicum annuum* and its spice pepper (dried red pepper flakes na *isot*). *Food Science and Technology*, v. 84, 842-850, 2017.

KORTSTEE, A.J.; APPELDOORN, N.J.G.; OORTWIJN, M.E.P.; VISSER, R.G.F. Differences in regulation of carbohydrate metabolism during early fruit development between domesticated tomato and two wild relatives. *Planta*, v. 226, p. 929-939, 2007.

KRUMBEIN, A.; PETERS, P.; BRUCKNER, B. Flavour compounds and a quantitative descriptive analysis of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) of different cultivars in short-term storage. *Postharvest Biology and Technology*, v. 32, p. 15-28, 2004.

KUMAR, R.; KHURANA, A.; SHARMA, A.K. Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. *Journal of Experimental Botany*, v. 65, p. 4561-4575, 2014.

LAMA, K; ALKALAI-TUVIA, S; PERZELAN, Y; FALLIK, E. Nutritional qualities and aroma volatiles of harvested red pepper fruits stored at suboptimal temperatures. *Scientia Horticulturae*, v. 213, p. 42-48, 2016.

LAN, Y.B; QIAN, X; YANG, Z.J; XIANG, X.F; YANG, W.Y; LIU, T; ZHU, B.Q; PAN, Q.H; DUAN, C.Q. Striking changes in volatile profiles at sub-zero temperatures during over-ripening of 'Beibinghong' grapes in Northeastern China. *Food Chemistry*, v. 212, p. 172-182, 2016.

LEWINSOHN, E; SITRIT, Y; BAR, E; AZULAY, Y; MEIR, A; ZAMIR, D; TADMOR, Y. Carotenoid pigmentation affects the volatile composition of tomato and watermelon fruits, as revealed by comparative genetic analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 3142-3148, 2005.

LI, G; JIA, H; LI, J; LI, H; TENG, Y. Effects of 1MCP on volatile production and transcription of ester biosynthesis related genes under cold storage in 'Ruenerli' pear fruit (*Pyrus ussuriensis* Maxim.). *Postharvest Biology and Technology*, v. 111, p. 168-174, 2016.

LI, G; JIA, H; LI, J; WANG, Q; ZHANG, M; TENG, Y. Emissions of volatile esters and transcription of ethylene- and aroma-related genes during ripening of 'Pingxiangli' pear fruit (*Pyrus ussuriensis* Maxim). *Scientia Horticulturae*, v. 170, p. 17-23, 2014.

LI, L; LICHTER, A; CHALUPOWICZ, D; GAMRASNI, D; GOLDBERG, T; NERYA, O; BEN-ARIE, R; PORAT, R. Effects of the ethylene-action inhibitor 1-methylcyclopropene on postharvest quality of non-climacteric fruit crops. *Postharvest Biology and Technology*, v. 111, p. 322-329, 2016.

LI, Y.; QI, H.; JIN, Y.; TIAN, X.; LINLIN, S.; QIU, Y. Role of ethylene in the biosynthetic pathway of related-aroma volatiles derived from fatty acids in oriental sweet melon. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v, 141, p. 327-338, 2016.

LIAO, Y; XU, Y; ZHANG, Z; WEI, J. Molecular cloning and sequence analysis of lipoxygenase (AsLOX1) gene in *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg and its expression responding to MeJA and crush wounding treatment. *Plant Gene*, v. 2, p. 10-16, 2015.

LIM, C; HAN, S; HWANG, I; KIM, D; HWANG, B; LEE, S. The pepper lipoxygenase CaLOX1 plays a role in osmotic, drought and high salinity stress response. *Plant and Cell Physiology*, v. 56, p. 930-942, 2015.

LIU, L.; SHAO, Z.; ZHANG, M.; WANG, Q. Regulation of carotenoid metabolism in tomato. *Molecular Plant*, v. 8, p. 29-39, 2015.

LIU, L.; WEL, J.; ZHANG, M.; ZHANG, M.; ZHANG L.; LI, C.; WANG, Q. Ethylene independent induction of lycopene biosynthesis in tomato fruits by jasmonates. *Journal of Experimental Botany*, v. 63, p. 5751-5761, 2012.

LIU, R.; XIONG, K.; CHAO-LUO, Y.; ZE-DAI, X.; MIN-LIU, Z.; TONG-XUE, W. Changes in volatile compounds of a native Chinese chilli pepper (*Capsicum frutescens* var) during ripening. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 44, p. 2470-2475, 2009.

LUKÍC, I; ZANTÍC, M; SPIKA, M; LUKIC, M; KOPRIVNJAK, O; BUBOLA, K. Complex interactive effects of ripening degree, malaxation duration and temperature on Oblica cv. virgin oil, phenols, volatiles and sensory quality. *Food Chemistry*, v. 232, p. 610-620, 2017.

LUNING, P; CAREY, A; ROOZEN, J; WICHERS, H. Characterization and occurrence of lipoxygenase in bell peppers at different ripening stages in relation to the formation of volatile flavor compounds. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 43, p. 1493-1500, 1995.

LUNING, P; RIJK, T; WICHERS, H; ROOZEN, J. Gas chromatography, mass spectrometry, and sniffing port analysis of volatile compounds of fresh bell peppers (*Capsicum annum*) at different ripening stages. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 42, 977-983, 1994.

MAINARDI, J.A.; PURGATTO, E.; VIEIRA, A.; BASTOS, W. A.; CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J.R.O.; LAJOLO, F.M. Effects of ethylene and 1- methylcyclopropene (1MCP) on gene expression and activity profile of -1,4-glucanphosphorylase during banana ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 7294-7299, 2006.

MALONEY, G.; KOCHVENKO, A.; TIEMAN, D.M.; TOHGE, T.; KRIEGER, U.; ZAMIR, D.; TAYLOR, M.G.; FERNIE, A.R.; KLEE, H.J. Characterization of the branched-chain amino acid aminotransferase enzyme family in tomato. *American Society of Plant Biologists*, v. 153, p. 925-936, 2010.

MATHIEU, S.; CIN, V.C.; FEI, Z.; LI, H.; BLISS, P.; TAYLOR, M.G.; KLEE, H.J.; TIEMAN, D.M. Flavour compounds in tomato fruits: identification of loci and potential pathways affecting volatile composition. *Journal of Experimental Botany*, v. 60, n. 1, p. 325-337, 2009.

MATSUI, K.; SHIBATA, Y.; TATEBA, H.; HATANAKA, A.; KAJIKARA, T. Changes of lipoxygenase and fatty acid hydroperoxide lyase activities in bell pepper fruits during maturation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 61, p. 199-221, 1997.

MERCHANTE, C.; ALONSO, J.M.; STEPANOVA, A.N. Ethylene signaling: simple ligand, complex regulation. *Plant Biology*, v. 16, p. 554-560, 2013.

MONERUZZAMAN, K.M.; HOSSAIN, A.B.M.S.; SANI, W.; SAIFUDDIN. Effect of Stages of Maturity and Ripening Conditions on the Biochemical Characteristics of Tomato. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, v. 4, n. 4, p. 336-344, 2008.

MOU, W.; LI, D.; LUO, Z.; MAO, L.; YING, T. Transcriptomic analysis reveals possible influences of ABA on secondary metabolism of pigments, flavonoids and antioxidants in tomato fruit during ripening. *Plos one*, v. 10, p. 01-26, 2015.

MUR, L.A.; PRATS, E.; PIERRE, E.; HALL, M.A.; HEBESTRUP, K.H. Integrating nitric oxide into salicylic acid and jasmonic acid/ethylene plant defense pathways. *Plant Science*, v. 4, p. 01-07, 2015.

MUSTAFA, M.; ALI, A.; SEYMOUR, G.; TUCKER, G. Enhancing the antioxidant content of carambola (*Averrhoa carambola*) during cold storage and methyl jasmonates treatments. *Postharvest Biology and Technology*, v. 118, p. 79-86, 2016.

NAGEGOWDA, D.A. Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. *FEBS letters*, v. 584, p. 2965-2973, 2010.

NIINEMETS, U.; KANNASTE, A.; COPOLOVICI, L. Quantitative patterns between plant volatile emissions induced by biotic stresses and the degree of damage. *Plant Science*, v. 4, p. 01-15, 2013.

OSORIO, S.; SCOSSA, F.; FERNIE, A.R. Molecular regulation of fruit ripening. *Plant Science*, v. 198, p. 01-07, 2013.

PAGAMAS, P.; NAWATA, E. Sensitive stages of fruit and seed development of chili pepper (*Capsicum annuum* L. var. Shishito) exposed to high-temperature stress. *Scientia Horticulturae*, v. 117, p. 21-25, 2008.

PALIYATH, G.; MURR, D. Biochemistry of Fruits. *Postharvest Biology and Technology of Fruits, Vegetables, and Flowers*, v. 03, p. 19-50, 2008.

PANIAGUA, C.; POSÉ, S.; MORRIS, V.J.; KIRBY, A.R.; QUESADA, M.A.; MERCADO, J.A. Fruit softening and pectin disassembly: an overview of nonstructural pectin modifications assessed by atomic force microscopy. *Annals of Botany*, v. 114, p. 1375-1385, 2014.

PAUL, V.; PANDEY, R.; SRIVASTAVA, G.C. Tomato fruit ripening: regulation of ethylene production and its response. *Indian Journal of Plant Physiology*, v. 16, p. 117-131, 2011.

PAYASI, A.; NAGENDRA, N.M.; CHAVES, A.L.S.; SIGH, R. Biochemistry of fruit softening: an overview. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, v. 15, p. 103-1013, 2009.

PECH, J.C.; PURGATTO, E.; BOUZAYEN, M.; LATCH, A. Ethylene and fruit ripening. *Annual Plant Reviews*, v. 44, p. 275-304, 2012.

PEREIRA, R.C.A.; CRISÓSTOMO, J.R. Agronegócio da Pimenta no Ceará. In: *Congresso Brasileiro de Olericultura*, 51. Horticultura Brasileira 29. Viçosa: ABH.S6009-S6015.

PESIS, E.; IBAÑEZ, A.M.; PHU, M.L.; MITCHAM, E.J.; EBELER, S.E.; DANDEKAR, A.M. Superficial Scald and bitter pit development in cold-stored transgenic apples suppressed ethylene biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, p. 2786-2792, 2009.

PINO, J; FUENTES, V; BARRIOS, O. Volatile constituents of Cachucha peppers (*Capsicum chinense* Jacq.) grown in Cuba. *Food Chemistry*, v. 125, p. 860-864, 2011.

POEL, B; VANDENDRIESSCHE, T; HERTOOG M; NICOLAI, B; GEERAERD, A. Detached ripening of non-climacteric strawberry impairs aroma profile and fruit quality, *Postharvest Biology and Technology*, v. 95, p. 70-80, 2014.

QI, H.; HUA, L.; ZHAO, L.; ZHOU, L. Carbohydrate metabolism in tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) seedlings and yield and fruit quality as affected by low night temperature and subsequent recovery. *African journal of Biotechnology*, v. 10, p. 5743-5749, 2011.

QI, X; XIAO, Y; FAN, Z; CHEN, J; LU, W; KUANG, J. A banana fruit transcriptional repressor MaERF10 interacts with MaJAZ3 to strengthen the repression of JA biosynthetic genes involved in MeJA-mediated cold tolerance. *Postharvest Biology and Technology*, v. 120, p. 222-231, 2016.

QUADRADA, L; ALMEIDA, J; OTAIZA, S; DUFFY, T; CORREIA DA SILVA, J; DE GODOY, F; ASÍS, R; BERMÚDEZ, L; FERNIE, A; CARRARI, F; ROSSI, M. Transcriptional regulation of tocoferol biosynthesis in tomato. *Plant Molecular Journal*, v. 81, p. 309-325, 2013.

QUIN, G; WANG, Y; CAO, B; WANG, W; TIAN, S. Unraveling the regulatory network of the MADS box transcription factor RIN in fruit ripening. *The Plant Journal*, v. 70, p. 243-255, 2012.

RAMBLA, J.L.; ALFARO, C.; MEDINA, A.; ZARZO, M.; PRIMO, J.; GRANELL, A. Tomato fruit volatile profile are highly dependent on sample processing and capturing methods. *Metabolomics*, v. 11, p. 1708-1720, 2015.

RAMBLA, J.L.; ALFARO, C.; MEDINA, A.; ZARZO, M.; PRIMO, J.; GRANELL, A. Tomato fruit volatile profiles are highly dependent on sample processing and capturing methods. *Metabolomics*, v. 11, p. 1708-1720, 2015.

RAMBLA, J.L.; TIKUNOV, Y.M.; MONFORTE, A.J.; BOVY, A.G.; GRANELL, A. The expanded tomato fruit volatile landscape. *Journal of Experimental Botany*, v. 65, p. 4613-4623, 2014.

RÉ, M.D.; GONZALEZ, C.; SDRIGOTTI, M.A.; SORREQUIETA, A.; VALLE, E.M.; BOGGIO, S.B. Ripening tomato fruit after chilling storage alters protein turnover. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 92, p. 1490-1496, 2012.

REINBOTHE, C; SPRINGER, A; SAMOL, I; REINBOTHE, S. Plant oxylipins: role of jasmonic acid during programmed cell death, defence and leaf senescence. *Federation of European Biochemical Societies*, v. 276, p. 4666-4681, 2009.

REYES-DIAZ, M.; LOBOS, T.; CARDEMIL, L.; NUNES-NESI, A.; RETAMALES, J.; JAAKOLA, R.; ALBERDI, M.; RIBERA-FONSECA, A. Methyl Jasmonate: an alternative for improving the quality and health properties of fresh fruits. *Molecules*, v. 21, p. 567-584, 2016.

ROCHA, A.S.; ROCHA, E.K.; ALVES, L.; MORAES, B.A.; CASTRO, T.C.; ALBARELLO, N.; GURGEL, C.S. Production and optimization through elicitation of carotenoid pigments in the in vitro cultures of *Cleome rosea* Vahl (Cleomaceae). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, v. 24, p. 105-113, 2015.

RODRÍGEZ-BURRUEZO, A; KOLLMANNBERGER, H; GONZÁLEZ-MAS, M; NITZ, S; NUEZ, F. HS-SPME Comparative analysis of genotypic diversity in the volatile fraction and aroma-contributing compounds of *Capsicum* fruits from the *annuum-chinense-frutescens* complex. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 4388-4400, 2010.

ROHWER, C.L.; ERWIN, J.E. Horticultural applications of jasmonates: A review. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, v. 83, p. 283-304, 2008.

SANTNER, A.; ESTELLE, M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. *Nature*, v. 459, p. 1071-1078, 2009.

SCHWAB, W.; DAVIDOVICH-RIKANATI, R.; LEWINSOHN, E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal*, v. 54, p. 713-732, 2008.

SERRA, S. Recent advances in the synthesis of carotenoid-derived flavours and fragrances. *Molecules*, v. 20, p. 12817-12840, 2015.

SEYMOR, G.B.; OSTERGAARD, L.; CHAPMAN, N.H.; KNAPP, S.; MARTIN, C. Fruit development and ripening. *Annual Review of Plant Biology*. v63, p. 111-1123, 2013.

SEYMOUR, G.B.; CHAPMAN, N.H.; CHEW, B.L.; ROSE, K.C. Regulation of ripening and opportunities for control in tomato and other fruits. *Plant Biotechnology Journal*, v. 11, p. 269-278, 2013.

SHAKED, R.; ROSENFELD, K.; PRESSMAN, E. The effect of low night temperatures on carbohydrates metabolism in developing pollen grains of pepper in relation to their number and functioning. *Scientia Horticulturae*, v. 102, p. 29-36, 2008.

SHEN, J; TIEMAN, D; JONES, J; TAYLOR, M; SCHMELZ, E; HUFFAKER, A; BIES, D; CHEN, K; KLEE, H. A 13-lipoxygenase, TomloxC, is essential for synthesis of C5 flavour volatile in tomato. *Journal of Experimental Botany*, v. 65, p. 419-428, 2014.

SHI, J.; MA, C.; QI, D.; Lv, H.; YANG, T., PENG, Q.; CHEN, Z.; LIN, L. Transcriptional responses and flavor volatiles biosynthesis in methyl jasmonate-treated tea leaves. *Plant Biology*, v. 15, p. 1-20, 2015.

SHIOJIRI, K.; KISHIMOTO, K.; OZAWA, R.; URASHIMO, S.; ARIMURA, G.; HORIUCHI, J.; NISHIOKA, T.; MATSUI, K.; TAKABAYASHI, J. Changing green leaf volatile biosynthesis in plants: an approach for improving plant resistance against both herbivores and pathogens.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 103, p. 16672-16676, 2006.

SIMKIN, A. SCHWARTZ, S; AULDRIDGE, M; TAYLOR, M; KLEE, H. The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatile beta-ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *The Plant Journal*, v. 40, p. 882-892, 2004.

SIRHINDI, G.; MIR, M.A.; ABD-ALLAH, E.F.; AHMAD, P.; GUCEL, S. Jasmonic acid modulates the physio-biochemical attributes, antioxidant enzyme activity, and gene expression in *Glycine max* under nickel toxicity. *Plant Science*, v. 7, p. 01-12, 2016.

SONG, J.; FORNEY, C. Flavour volatile production and regulation in fruit. *Canadian Journal of Plant Science*, v. 88, p. 537-550, 2007.

SOUZA, P.A.; SIMOES, A.N.; PUIATTI, M.; JUNIOR, J.G.; VIEIRA, M.R.S. Carbohydrate metabolism and quality of fruits from the *Cucumis* genus. *Journal of Agricultural Research*, v. 7, p. 101-105, 2013.

SURAWANG, S.; RATTANAPANONE, N.; TAYLOR, A.J. Quantitative analysis of volatile flavor compounds in two transgenic tomato fruits using APCI-MS technique. *Journal of Natural Science*, v. 11, p. 169-176, 2012.

TAN, C; ALI, Z; ZAINAL, Z. MnSOD and 9-LOX gene expression. Along with antioxidant changes of *Capsicum annuum* cv. Kulai during postharvest treatment. *Scientia Horticulturae*, v. 213, p. 403-409, 2016.

TANDON, K.S.; BALDWIN, E.A., SHEWFELT, R.L. Aroma perception of individual volatile compounds in fresh tomatoes (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) as affected by the medium of evaluation. *Postharvest Biology and Technology*, v. 20, p. 261-268, 2000.

TASSONI, A.; WATKINS, C.B.; DAVIES, P.J. Inhibition of the ethylene response by 1MCP in tomato suggests that polyamines are not involved in delaying ripening, but may moderate the rate of ripening or over-ripening. *Journal of Experimental Botany*, v. 57, p. 3313-3325, 2006.

TIEMAN, D.; BLISS, P.; MCLNTYRE, L.M.; BLANDON-UBEDA, A.; BIES, D; ODABASI, A.Z.; RODRÍGUEZ, G.R. The chemical interactions underlying tomato flavor preferences. *Current Biology*, v. 22, p. 1035-1039, 2012.

TIES, P; BARRIGER, S. Influence of lipid content and lipoxygenase on flavor volatiles in the tomato peel and flesh. *Journal of Food Chemistry*, v. 77, p. 830-837, 2012.

TOHGE, T.; ALSEEKH, S.; FERNIE, A.R. On the regulation and function of secondary metabolism during fruit development and ripening. *Journal of Experimental Botany*, v. 65, p. 4599-4611, 2014.

TZORTZAKIS, N, ECONOMAKIS, C. Maintaining postharvest quality of the tomato fruit by employing methyl jasmonates and ethanol vapor treatment. *Journal of Food Quality*, v. 30, p. 567-580, 2007.

TZORTZAKIS, N.; CHRYSARGYRIS, A.; SIVAKUMAR, D.; LOULAKAKIS, K. Vapour or dipping applications of methyl jasmonate, vinegar and sage oil for pepper fruit sanitation towards grey mould. *Postharvest Biology and Technology*, v. 118, p. 120-127, 2016.

VICENTE, A.R.; SALADIÉ, M.; ROSE, J.K.; LABAVITCH, J.M. The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: looking to the future. *Journal of the Science of food and Agriculture*, v. 87, p. 1435-1448, 2007.

VIDAL, M. F. Informe Rural ETENE: Produção e área colhida de tomate no Nordeste. *Banco do Nordeste*, v. 4, n. 21, 2010.

VOGEL, J; TIEMAN, D; SIMS, C; ODABASI, A; CLARK, D; KLEE, H. Carotenoid content impacts flavor acceptability in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal Science of Food and Agriculture*, v. 90, p. 2233-2240, 2010.

WANG, L.; BALDWIN, E.A.; BAI, J. Recent advance in aromatic volatile research in tomato fruit: the metabolism and regulation. *Food Bioprocess Technology*, v. 9, p. 203-216, 2016.

WANG, L.; BALDWIN, E.A.; ZHAO, W.; PLOTTO, A.; SUN, X.; WANG, Z.; BRECHT, J.K.; BAI, J.; YU, Z. Supression of volatile production in tomato fruit exposed to chilling temperature and alleviation of chilling injury by a pre-chilling heat treatment. *Food Science and Technology*, v. 62, p. 115-121, 2015.

WANG, L; BALDWIN, E; PLOTTO, A; LUO, W; RATHORE, S; YU, Z; BAI, J. Effect of methyl salicylate and methyl jasmonates pre-treatment on the volatile profile in tomato fruit subjected to chilling temperature. *Postharvest Biology and Technology*, v. 108, p. 28-38, 2015.

WASTERACK, C. Jasmonate: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*, v. 100, p. 681-697, 2007.

WASTERACK, C.; HAUSE, B. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*, v. 111, p. 1021-1058, 2013.

WATKINS, C.B. Overview of 1-methylcyclopropene trials and uses for edible horticultural crops. *HortScience*, v. 43, p. 86-94, 2008.

WEI, J; WEN, X; TANG, L. Effect of methyl jasmonic acid on peach fruit ripening progress. *Scientia Horticulturae*, v. 220, p. 206-213, 2017.

WHITE, P.J. Recent advances in fruit development and ripening: an overview. *Journal of Experimental Botany and Fruit Development and Ripening Special Issue*, v. 53, n. 377, p. 1995-2000, 2002.

XIA, J.; SINELNIKOV, I.V.; HAN, B.; WISHART, D.A. MetaboAnalyst 3.0 – making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Research*, v. 43, p. 251-257, 2015.

XIAOTANG, Y; JUN, S; LINA, D; FORNEY, C; LESLIE, C; SHERRY, F; WISMER, P; ZHAOQI. Ethylene and 1MCP regulate major volatile biosynthetic pathways in apple fruit. *Food Chemistry*, v. 194, p. 325-336, 2016.

YAN, C.; XIE, D. Jasmonate in plant defence: sentinel or double agent? *Plant Biotechnology Journal*, v. 13, p. 1233-1240, 2015.

YAN, L.; ZHAI, Q.; WEI, J.; LI, S.; WANG, B.; HUANG, T.; DU, M.; SUN, J.; KANG, L.; LI, C.B.; LI, C. Role of tomato lipoxygenase D in wound-induced jasmonate biosynthesis and plant immunity to insect herbivores. *PLOS genetics*, v. 9, p. 01-16, 2013.

YAN, Y; CHEN, J; LI, X. Methyl jasmonates as modulator of Cd toxicity in *Capsicum frutescens* var. *fasciculatum* seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 98, p. 203-209, 2013.

YAN, Z.; CHEN, J.; LI, X. Methyl jasmonate as modulator of cd toxicity in *Capsicum frutescens* var. *fasciculatum* seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 98, p. 203-209, 2013.

YILMAZ, E. The Chemistry of Fresh Tomato Flavor. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, v. 25, p. 149-155, 2001.

YILMAZ, E; SCOTT, J; SHEWFELT, R. Effects of harvesting maturity and off-plant ripening on the activities of lipoxygenase, hydroperoxide lyase, and alcohol dehydrogenase enzymes in fresh tomato. *Journal of food biochemistry*, v. 26, p. 443-457, 2002.

YU, M. SHEN, L.; ZHANG, A.; SHENG, J. Methyl jasmonate-induced defence responses are associated with elevation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in *Lycopersicon esculentum* fruit. *Journal of Plant Physiology*, v. 168, p. 1820-1827, 2011.

YU, M.; SHEN, L.; FAN, B.; ZHAO, D.; ZHENG, Y.; SHENG, J. The effect of MeJA on ethylene biosynthesis and induced disease resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. *Postharvest Biology and Technology*, v. 54, p. 153-158, 2009.

YUAN, H.; ZHANG, J.; NAGESWARAN, D.; LI, L. Carotenoid metabolism and regulation in horticultural crops. *Horticulture Research*, v. 2, p. 15036-15046, 2015.

ZADRA, C.; BORGOGNI, A.; MARUCCHINI, A. Quantification of jasmonic acid by SPME in tomato plants stressed by ozone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 9317–9321, 2006.

ZHONG, S.; LIN, Z.; GRIERSON, D. Tomato ethylene receptor-CTR interactions: visualization of NEVER-RIPE interactions with multiple CTRs at the endoplasmic reticulum. *Journal of experimental Botany*, v. 4, p. 965-972, 2008.

ZHOW, X.; DONG, L.; LI, Q.; WANG, J.W.; JI, S.J. Low temperature conditioning prevents loss of aroma-related esters from 'Nanguo' pears during ripening at room temperature. *Postharvest Biology and Technology*, v. 100, p. 23-32, 2015.

ZIINO, M.; CONDURSO, C.; ROMEO, V.; TRIPODI, G.; VERZERA, A. Volatile compounds and capsaicinoid content of fresh hot peppers (*Capsicum annuum* L.) of different Calabrian varieties. *Science of Food and Agriculture*, v. 89, p. 774-780, 2009.

ZIMMERMANN, M.; SHIEBERLE, P. Important odorants of sweet bell pepper powder (*Casicum annumm* cv. *annumm*): differences between samples of Hugarian and Morrocan origin. *European Food Research and Technology*, v. 211, p. 175-180, 2000.