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

**Regulação hormonal da biossíntese de antocianinas
em framboesas (*Rubus idaeus*) no período pós-colheita**

Laís Moro

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Purgatto

São Paulo
2013

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

**Regulação hormonal da biossíntese de antocianinas
em framboesas (*Rubus idaeus*) no período pós-colheita**

Laís Moro

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Purgatto

São Paulo
2013

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.

Moro, Laís

M867r Regulação hormonal da biossíntese de antocianinas em framboesas (*Rubus idaeus*) no período pós-colheita / Laís Moro. -- São Paulo, 2013.

85p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Orientador: Purgatto, Eduardo

1. Bioquímica dos alimentos 2. Pigmentos: Bioquímica 3. Hormônio: Bioquímica vegetal 4. Framboesa: Ciência dos alimentos I. T. II. Purgatto, Eduardo, orientador.

641.1 CDD

Laís Moro

**Regulação hormonal da biossíntese de antocianinas
em framboesas (*Rubus idaeus*) no período pós-colheita**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Eduardo Purgatto
Orientador/Presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, 17 de junho de 2013

*Aos meus pais, Domingos e Mari, pelo incentivo,
amor, carinho e paciência.*

A Giovani, pelo amor, incentivo, companheirismo.

A minha família e amigos.

DEDICO E OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A meu orientador, Eduardo Purgatto, pela oportunidade, conhecimento, incentivo, paciência e amizade ao longo destes anos;

A professora Dr. Neuza pelo conhecimento, incentivo e apoio em diversos momentos.

Aos professores do departamento de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo;

Aos professores Dr. João Roberto e Dr. Ricardo Klugue pelas sugestões dadas ao trabalho;

A professora Dr. Maria Teresa e Vinicius B. Ribeiro pelo uso do termocilizador.

A Dr. Renata Vieira da Mota, do Núcleo Tecnológico EPAMIG Uva e Vinho, com o auxílio ao contato com produtores de morango;

A Jaqueline Tezotto pela indicação do produtor de framboesas;

Aos amigos e colegas do laboratório e do departamento aos quais compartilhamos conhecimentos.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade cedida à realização deste mestrado e a todos os funcionários;

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) por conceder a bolsa inicial para o desenvolvimento do trabalho;

A FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo concedimento da bolsa e apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Diz Antonio Machado:

“Golpe a golpe, passo a passo,
Caminhante, não há caminho,
O caminho é feito ao andar.
Andando, se faz o caminho
E se você olhar para trás
Tudo o que verá são as marcas
De passos que algum dia
Seus pés tornarão a percorrer.
Caminhante, não há caminho,
O caminho é feito ao andar”

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVO	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 FRUTOS E TRATAMENTOS HORMONAIS	30
3.2 RESPIRAÇÃO E PRODUÇÃO DE ETILENO.....	30
3.3 COR	31
3.4 QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES SOLÚVEIS	32
3.5 ÁCIDOS ORGÂNICOS.....	32
3.6 FENÓLICOS TOTAIS.....	33
3.7 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES E ÁCIDOS FENÓLICOS.....	33
3.8 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	34
3.9 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (AIA), ÁCIDO ABSCÍSICO (ABA)	34
3.10 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE METIL-JASMONATO (MJ).....	35
3.11 ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA POR QRT-PCR	36
3.11.1 Extração de RNA, purificação e síntese de cDNA.....	36
3.11.2 <i>Primers</i> utilizados na amplificação dos genes da ANS, DFR e MYB	37
3.11.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real	37
3.12 ANÁLISE DOS RESULTADOS	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 EFEITOS SOBRE O ETILENO, RESPIRAÇÃO, COR E NÍVEIS DE AÇÚCARES E ÁCIDOS ORGÂNICOS	39
4.2 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONÓIDES E ÁCIDOS FENÓLICOS	50
4.3 ANÁLISES HORMONAIS.....	60
4.4 ANÁLISE DA EXPRESÃO GÊNICA.....	65
5. CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via biossintética dos flavonóides com destaque para as antocianidinas.....	16
Figura 2: Mecanismos de transporte de flavonóides.....	19
Figura 3: Modelo de biossintese de etileno proposta por Yang e Hoffamn (1984).....	22
Figura 4: Modelo de biossintese de auxinas.....	24
Figura 5: Principais intermediários na biossintese de ABA.	26
Figura 6: Formação do metil-jasmonato.....	27
Figura 7: Evolução na produção de etileno em framboesas (<i>Rubus idaeus</i>) cv. Autumn Bliss.....	40
Figura 8: Evolução na respiração framboesas (<i>Rubus idaeus</i>) cv. Autumn Bliss.....	41
Figura 9: Análise de cor em framboesas (<i>Rubus idaeus</i>) cv. Autumn Bliss.....	42
Figura 10: Evolução na cor de framboesas (<i>Rubus idaeus</i>) cv. Autumn Bliss.....	44
Figura 11: Quantificação de glicose (A), frutose (B) e de sacarose (C) e açúcar total (D), em framboesas vermelhas (<i>Rubus idaeus</i>) cv. Autumn Bliss.....	45
Figura 12: Quantificação de ácidos málico (A) e cítrico (B) em (<i>Rubus idaeus</i>) cv. Autumn Bliss.....	50
Figura 13: Conteúdo de Compostos fenólicos solúveis totais em framboesas vermelhas (<i>Rubus idaeus</i>) cv. Autumn Bliss.....	51
Figura 14: Conteúdo de ácido elágico livre (A) e total (B) em framboesas vermelhas (<i>Rubus idaeus</i>) cv. Autumn Bliss.....	53
Figura 15: Conteúdo de epicatequina em framboesas vermelhas (<i>Rubus idaeus</i>) cv. Autumn Bliss.....	54
Figura 16: Conteúdo de quercitina em framboesas vermelhas (<i>Rubus idaeus</i>) cv. Autumn Bliss.....	56
Figura 17: Cromatograma de flavonóides em framboesas vermelha (<i>Rubus idaeus</i>) Autumn Bliss.....	57
Figura 18: Conteúdo de cianidina em framboesas vermelhas (<i>Rubus idaeus</i>) cv. Autumn Bliss.....	58
Figura 19: Quantificação de AIA livre em (<i>Rubus idaeus</i>) cv. Autumn Bliss.....	61
Figura 20: Quantificação de ácido abscísico (ABA) livre em (<i>Rubus idaeus</i>) cv. Autumn Bliss.....	62
Figura 21: Quantificação de metil-jasmonato em (<i>Rubus idaeus</i>) cv. Autumn Bliss.....	64
Figura 22: Expressão Relativa de MYB (A), DFR Dihidroflavonol Redutase (B), ANS Antocianina Sintase (C), para framboesas Autumn Bliss.....	67
Figura 23: Fenótipo de morangos contendo o vetor <i>Agrobacterium</i> pBI-121 e infiltrados com pBI-DFRi, para o silenciamento de gene DFR.....	71
Figura 24: Fluxograma esquemático dos tratamentos realizados em framboesas Autumn Bliss.....	75
Figura 25: Esquema com o cronograma das análises realizadas para framboesas Autumn Bliss tratadas com 100µM de ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), e metil-jasmonato (MJ) e controle (CNTR).....	76
Figura 26: Esquema com o cronograma das análises realizadas para framboesas Autumn Bliss tratadas com 100µM de ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC).....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência de nucleotídeos e tamanho esperado para o produto de amplificação de genes que codificam as enzimas ANS, DFR e dos genes MYB 10 e β -actina (Chen *et al*, 2012)38

Tabela 2: Perda de massa (%) de framboesas *Rubus idaeus*. cv. Autumn Bliss, colheita de 2013 armazenadas a 5°C durante 5 dias.....47

RESUMO

MORO, L. **Regulação hormonal da biossíntese de antocianinas em framboesas (*Rubus idaeus*) no período pós-colheita.** 2013 85 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Nos frutos, a cor é fundamental para a aceitabilidade inicial do consumidor, especialmente para os chamados “pequenos frutos” como morangos e framboesas, sendo um critério tradicional para a apreciação e seleção do estado de maturação. Em framboesas (*Rubus idaeus*), as pesquisas têm focado a síntese de antocianinas, os pigmentos mais abundantes nesta espécie. Seus precursores provem da via de biossíntese dos fenilpropanóides, porém os fatores que regulam a atividade dessa via metabólica ainda são pouco conhecidos. Sabe-se que alguns hormônios como o etileno, o ácido indol-3-acético (AIA), o ácido abscísico (ABA) e o metil-jasmonato (MJ) estão relacionados à inibição da síntese ou aumento no acúmulo destes flavonóides. Neste contexto, o objetivo do trabalho é avaliar o efeito destes fatores hormonais sobre a biossíntese de antocianinas em framboesas da cultivar (cv.) Autumn Bliss. Foram avaliados os efeitos dos hormônios sobre as características físico-químicas e fisiológicas dos frutos (açúcares solúveis, ácidos orgânicos, respiração, síntese de etileno, cor), conteúdo de compostos fenólicos e flavonóides. Também foram quantificados os níveis de AIA livre, ABA e MJ e a expressão relativa das enzimas antocianidina sintase (ANS), dihidroflavonol redutase (DFR) e do fator de transcrição MYB10, regulador da transcrição de genes da via de biossíntese de antocianinas em framboesas. As alterações mais significativas foram observadas no tratamento com MJ, para o qual os frutos apresentaram acentuada produção de etileno (sem efeito sobre a respiração) e também na cor, mais acentuada nos frutos maduros deste grupo em comparação com os frutos do grupo controle. O MJ também induziu aumento nos níveis de expressão relativa de MYB, ANS e DFR, nos dois primeiros dias pós-colheita. Outro grupo que se destacou foi o tratado com AIA por apresentar inibição na síntese de antocianinas e compostos fenólicos, a qual foi correlacionada à inibição da transcrição do MYB e ANS. O ABA por sua vez, inibiu o acúmulo de transcritos da DFR, de forma correlata ao menor acúmulo de antocianinas. Exceto pelo ACC, que não produziu efeitos significativos em nenhum dos parâmetros avaliados, os resultados indicam que o metabolismo de antocianinas deve ser regulado por múltiplos sinais hormonais.

Palavras-chave: antocianinas, etileno, ácido abscísico, auxina, metil jasmonato, *Rubus idaeus*.

ABSTRACT

MORO, L. **Hormonal regulation on anthocyanin biosynthesis in raspberry (*Rubus idaeus*) on postharvest.** 2013 85 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The color is fundamental for the fruits, for the initial acceptability of the consumers, is a factor that influence the appreciation and selection of the maturity stage, especially for berries, like strawberries and raspberries. In raspberries (*Rubus idaeus*), the research have focused on the anthocyanin biosynthesis, the pigments most frequent on this species. Their precursors came from the phenylpropanoid pathway but the factors that regulate this metabolic pathway remain unclear. There are evidences that some phytohormones as ethylene, indole-3-acetic acid (IAA) abscisic acid (ABA) and methyl jasmonate (MJ) are related to the inhibition or increase of these flavonoids on fruits. In this context, the aim of this study is to evaluate the effect of these phytohormones on the anthocyanin pathway in raspberries *Autumn Bliss*. It was evaluated the effects of these phytohormones in some physico-chemical and physiologic characteristics of these fruits (soluble sugars, organic acids, respiration, ethylene biosynthesis, color), phenolic compounds and flavonoid content. Also, it was quantified the auxin, ABA and MJ levels, and the relative transcript levels of anthocyanidin synthase (ANS), dihydroflavonol 4-reductase (DFR) and the transcriptional factor MYB10, a transcriptional regulator of the anthocyanin pathway in raspberries. The most significant alterations were observed on MJ treatment, in which the ethylene production in berries reach the highest levels (without effect on the respiration) and the most intense red color on ripe fruits in comparison with the control group. MJ also induced the increase on relative expression of MYB, ANS and DFR two days after harvest prior to the anthocyanin accumulation. Other noticeable effect was detected in the IAA group in which anthocyanin synthesis and phenolic compound content were inhibited and related to the inhibition of MYB and ANS transcription. ABA inhibited the DFR transcript accumulation, related to the delay in anthocyanins synthesis in relation to control group. Except by ACC, that did not have significant effects in any of the evaluated parameters, the results suggest that the anthocyanin metabolism might be regulate for multiple hormonal signs.

Keywords: anthocyanins, ethylene, abscisic acid, auxin, metyl jasmonate, *Rubus idaeus*.

1. INTRODUÇÃO

Característica da Framboesa (*Rubus idaeus*)

A framboeseira pertence à família *Rosaceae*, gênero *Rubus*, que também inclui plantas herbáceas, perenes e bienais, sendo subdividida em um elevado número de sub-gêneros (SOUZA *et al.*, 2007).

Caracteriza-se por ser uma espécie arbustiva de porte semiereto ou rasteiro, apresentando espinhos nas hastes, em menor grau que a amora-preta (*Rubus* sp.). A produção da framboesa dá-se em cachos que se localizam na extremidade das hastes. Os frutos são agregados (com cerca de 2 a 4 g) de coloração amarela, vermelha, púrpura ou negra, de sabor ácido a doce-ácido. Trata-se de um fruto composto, apresentando de 75 a 85 drupéolas, cada qual contendo uma semente. As drupéolas arranjam-se de forma espiral à volta do receptáculo. Quando colhida, é separada do receptáculo, deixando um orifício. A facilidade em separar o fruto, depende da variedade, sendo que em colheitas mecânicas, a maior preferência é por frutas de fácil remoção (GONÇALVES *et al.*, 2011; STRIK, 2007).

Caracteriza-se por ser um fruto de clima temperado, sendo cultivada em regiões de baixas temperaturas (durante o inverno) e amenas (no verão). O período de floração inicia no final de outubro e as primeiras produções em meados de novembro, se estendendo até o final de maio (GONÇALVES *et al.*, 2011).

Apesar de possuir uma área de produção inferior em relação às espécies de clima tropical e subtropical, as frutas de clima temperado têm uma importância socioeconômica destacada em diversas regiões do Brasil, seja como cultivo para o consumo dos frutos *in natura*, muitas vezes associado ao agroturismo, seja para aproveitamento pela indústria (FACHINELLO *et al.*, 2011). Seu cultivo ocorre em regiões com temperaturas baixas, necessitando de temperaturas inferiores a 7°C em pelo menos 250 horas anuais. Alguns plantios foram estabelecidos na Serra da Mantiqueira (nas cidades de Gonçalves, Campos do Jordão e Santo Antônio do Pinhal) em São Paulo, e outros estados produtores são Minas Gerais, Rio Grande do Sul, (em Caxias do Sul e Vacaria e em outras regiões de altitude) (GONÇALVES *et al.*, 2011; PIO, 2011; PAGOT, 2010).

A framboesa é largamente consumida no mundo seja como fruta fresca, processada para geléias, concentrados e como ingredientes adicionados em alimentos (BOBINAITE *et al.*, 2012).

Apesar de todas as características de rusticidade de sua implantação e manejo, os frutos são extremamente delicados exigindo cuidados na colheita, manuseio e acondicionamento para o transporte (GONÇALVES *et al.*, 2011; STRIK, 2007).

Através de uma colheita adequada, pode-se obter o máximo das características de qualidade. O índice de maturação é baseado na coloração da superfície, mas também são consideradas a concentração de sólidos solúveis e a acidez titulável. A firmeza do fruto é, em geral, um importante atributo que influencia a aparência e também proporciona facilidade no momento da colheita. As paredes celulares nos frutos da framboeseira apresentam mudanças com o decorrer do amadurecimento como a diminuição de celulose e pectina decorrente de reações hidrolíticas, induzidas por isoformas de celulase (E.C. 3.2.1.4) e poligalacturonase (E.C. 3.2.1.15) (TALCOTT 2007; HAFFNER, *et al.*, 2002; MITCHAM *et al.*; 1998).

Os açúcares predominantes nas framboesas são a frutose, glicose e sacarose. Suas concentrações são dependentes do grau de maturação ou tempo de colheita e armazenamento. No início da maturação, a sacarose geralmente predomina como carboidrato primário, sendo convertida em glicose e frutose no amadurecimento, mesmo após a colheita e durante o armazenamento (TALCOTT, 2007; WANG, 2003).

O sabor doce, conferido pelos açúcares, é contrabalanceado pelos ácidos orgânicos, que exercem grande impacto na qualidade sensorial de framboesas. O ácido cítrico é o ácido orgânico predominante em framboesas vermelhas, apresentando-se dez vezes mais elevado que o ácido málico (segundo mais abundante) até a colheita. Ambos estão presentes em elevados níveis quando o fruto está em estágio imaturo. Esta concentração diminui com o decorrer do amadurecimento, durante o qual são utilizados como substratos para a respiração, ou como fonte de carbono na síntese de açúcares. Concentrações elevadas de ácidos orgânicos e um baixo pH são muito importantes para a preservação dos frutos, e influenciam na cor dos pigmentos no interior dos tecidos, principalmente das antocianinas (WANGA *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2007; TALCOTT, 2007; WANG, 2003).

As framboesas contêm uma série de vitaminas, minerais e compostos fitoquímicos que são benéficos a saúde e estão relacionados com a diminuição do risco de doenças crônicas não-transmissíveis. Estes compostos fitoquímicos podem funcionar como antioxidantes, diminuindo danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS). As propriedades antioxidantes da framboesa vermelha estão associadas ao elevado conteúdo de ácidos fenólicos, ácido elágico, antocianinas e elagitaninos, sendo estes dois últimos os principais compostos fenólicos (aproximadamente 85% do conteúdo total) e representam 50% do poder antioxidante total (BRADISH *et al.*, 2012).

Destacam-se, entre as antocianinas, a cianidina com suas glicosilações como cianidina-3-soforosídeo, cianidina-3-glucosídeo, cianidina-3-glucorutinosídeo e cianidina-3-rutinosídeo (BOBINAITE *et al.*, 2012). Os fatores que regulam a biossíntese de antocianinas em framboesas durante o amadurecimento dos frutos ainda é pouco conhecida, contudo evidências indicam que vários hormônios podem influenciar sua síntese, fato já observado em diversas cultivares de morangos e uvas.

Biossíntese de antocianinas

Os flavonóides são produzidos através da via dos fenilpropanóides, que também gera outros metabólitos secundários, incluindo lignanos, ligninas, estilbenos e ácidos hidroxicinâmicos. Tal via está presente em diferentes células e compartimentos devido às suas múltiplas funções em interações planta-ambiente (AGATI *et al.*, 2012; GIUSTI *et al.*, 2009).

As antocianinas compõem uma classe de flavonóides crucial para a coloração avermelhada de frutos como a framboesa e outros chamados “pequenos frutos”. Nas plantas desenvolvem múltiplas funções, incluindo proteção contra a exposição solar e radiação ultravioleta, proteção contra radicais livres e a atração de animais para a dispersão de sementes (HE *et al.*, 2010).

O primeiro passo é catalisado pela fenilalanina amônia-liase (PAL; EC 4.3.1.4), através da desaminação não oxidativa da L- fenilalanina a ácido cinâmico, uma reação muito importante na regulação do fluxo de carbono desta via (KUMAR & ELLIS; 2001).

As enzimas que estão envolvidas na biossíntese de antocianinas estão localizadas nas membranas do retículo endoplasmático ou no citoplasma. Neste último compartimento ocorrem os últimos passos de sua produção, sendo as antocianinas posteriormente transportadas e armazenadas no vacúolo.

Uma das enzimas-chave na via biossintética dos flavonóis é a chalcona sintase (CHS) (Figura 1), uma poliketídeo sintase que catalisa a síntese de 2', 4, 4', 6' tetrahidroxichalcona (THC), a partir de 1 mol de 4-cumaroil-CoA e 3 mols de malonil-CoA (Tanaka et al 2008). A THC é rapidamente isomerizada para (2S)-naringerina pela chalcona isomerase (CHI). A (2S) nangerina é hidroxilada na terceira posição pela flavona 3 hidroxilase (F3H) com produção de (2R,3R) dihidrocampferol, um hidroflavonol. A F3H pertence à família OGD (do inglês 2-OxoGlutarate-dependent Dioxygenases) e também catalisa a hidroxilação do eriodictiol e pentahidroxilflavonóides para dihidroquercetina e dihidromiricetina. A flavonóide 3' hidroxilase (F3'H) e a flavonóide 3', 5' hidroxilase (F3'5'H), são enzimas que catalisam a hidroxilação do dihidrocampferol (DHC) para formar 2R,3R dihidroquercetina e dihidromiricetina, respectivamente. A F3'H e a F3'5'H determinam a hidroxilação do anel B dos flavonóides e antocianinas e são necessários para a produção de cianidina e delphinidina. Os dihidroxiflavonóides são reduzidos para corresponder a 3,4-cis-leucoantocianidinas através da ação da 4-dihidroxiflavonol redutase (DFR). A antocianidina sintase (ANS) também chamada de leucoantocianidina dioxigenase, é classificada na família das OGDs, e cataliza a síntese de antocianinas coloridas. As modificações de antocianidinas são decorrentes da atividade catalítica de um a grande variedade de glicosiltransferases:UDP-glicose-dependentes existentes nas espécies vegetais.

Figura 1: Via biossintética dos flavonóides com destaque para a formação das antocianidinas. CHS – chalcona sintase; CHI – chalcona isomerase; FNS – flavona sintase; FLS – flavonol sintase; F3H – flavanona 3-hidroxilase; F3'H – flavonóide 3'-hidroxilase; F3'5'H - flavonóide 3', 5'-hidroxilase; DFR – dihidroflavonol redutase; ANS – antocianidina sintase; GT – glicosiltransferases; AT – aciltransferases; MT – metiltransferases. Adaptado de Tanaka et al. 2008

O transporte intracelular desde sua síntese até o sítio de armazenamento é crucial (ANDERSEN et al., 2010; HE et al., 2010). Existem duas vias principais que transportam derivados de flavonóides do retículo endoplasmático: o transporte

intracelular para o vacúolo e o transporte extracelular para a parede celular (Figura 2) (AGATI et al.,2012).

Existem dois transportadores principais para catalisar o transporte de flavonóides: MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*) que podem estar envolvidos no transporte intracelular das antocianinas e glutathione transferases (GST) com o auxílio de transportadores ativos (*ATP-binding cassette*) que pertencem a família de proteínas associadas à multirresistência (MRP) (AGATI et al.,2012; HE et al., 2010).

Flavonóides conjugados com GST são acumulados no vacúolo por transportadores do tipo ABC (Figura 2-A). Flavonóides glicosilados, como antocianinas, apigeninas e catequinas, podem utilizar o mecanismo de transporte secundário através de proteínas MATE e MRP (Figura 2-B). Um terceiro tipo é o transporte vesicular (Figura 2-C). Neste tipo, ocorre o acúmulo em várias vesículas pequenas que, em seguida, se unem (aglutinam) em um corpo único e grande e se unem ao vacúolo. A estrutura vacuolar que acumula antocianina costuma ser nomeada como inclusão vacuolar antociânica (AVI) e, em seu interior, pode ser encontrada uma mistura complexa de antocianinas, proantocianidinas e outros compostos, cujas estruturas não estão devidamente caracterizadas (AGATI et al.,2012; ANDERSEN et al., 2010; HE et al., 2010).

Figura 2: Mecanismos de transporte de flavonóides. CHS – chalcona sintase; CHI – chalcona isomerase; F3H – flavanona 3-hidroxilase; FLS – flavonol sintase; F3'H – flavonóide 3'-hidroxilase; FS – flavona sintase; F3'5'H - flavonóide 3', 5'-hidroxilase; GST – glutatona transferase.

Além da conservação estrutural e funcional dos genes da biossíntese de antocianinas entre diversas espécies, em estudos recentes, constatou-se que ela é controlada por um sistema regulatório comum, consistindo em um complexo ternário dos fatores de transcrição MYB-bHLH-WD40 (PETRONI & TONELLI, 2011; WANG *et al.*, 2010). Os fatores MYB recebem tal nome devido à semelhança estrutural com os fatores de transcrição c-MYB (*myeloblastosis*) de mamíferos. A sigla para os fatores bHLH deriva do nome em inglês **b**asic-**H**elix-**L**oop-**H**elix, motivo estrutural característico desta família. Os fatores de transcrição WD40 recebem este nome por possuírem um motivo específico composto de 40 aminoácidos que terminam em triptofano (W) e ácido aspártico (D).

De acordo com PETRONI & TONELLI (2011), em cultivares de uva tinta, a síntese de antocianina é controlada por dois genes MYB (VvMYBA1 e VvMYBA2), que regulam a transcrição dos mRNAs codificadores das UDP glicose: flavonóide-

3-O-glicosiltransferases (UGT). Os genes que codificam estas enzimas são inativos em algumas cultivares, devido a uma inserção gênica na região promotora de VvMYBA1 e substituições não conservativas na região codificadora de VvMYBA2. A expressão dos genes MYB está fortemente correlacionada com o acúmulo de antocianinas, bem como a biossíntese de flavonóides. Em particular, a expressão do gene MYB10 foi relacionada com os níveis de antocianinas em flores e frutos da família *Rosaceae*. Outro fator de transcrição pertencente à família MADS-box, homólogo do gene TDR4 de tomate, está associado ao acúmulo de antocianinas durante o amadurecimento dos frutos de mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.), por meio do controle da expressão de um gene do tipo R2R3-MYB, denominado VmMYB2. Quando o VmTDR4 foi silenciado, a expressão de VmMYB2, assim como a expressão dos genes que codificam a chalcona sintase, dihidroflavona redutase e antocianina sintase foram reduzidos e resultaram em teores 2-3 vezes menores de antocianinas (PETRONI & TONELLI, 2011; Chen *et al.*, 2012).

O tipo de antocianinas, assim como sua concentração podem ser influenciados por diversos fatores, tais como: regulação hormonal, gênero, espécie, fitormônios, cultivar/genótipo (fatores genéticos); maturidade do fruto, idade da planta, estação da colheita, localização, luminosidade (radiação solar) temperatura e outros fatores de stress bióticos e abióticos (fatores ambientais) (LEE *et al.*, 2012).

Em relação aos fatores citados, destaca-se aqui o papel do fitormônios, pois sua aplicação pode influenciar tanto positivamente como negativamente a expressão de genes envolvidos na biossíntese de antocianinas com efeitos diretos sobre a produção e acúmulo destes pigmentos. Existem precedentes na literatura que parecem indicar que hormônios como as auxinas, ácido abscísico, ácido jasmônico e o etileno, possuem efeitos tanto na diminuição como no aumento do conteúdo de antocianinas em diversos frutos.

HORMÔNIOS VEGETAIS

Os hormônios vegetais são mensageiros químicos que em baixas concentrações regulam o metabolismo, crescimento e desenvolvimento vegetal (TAIZ & ZEIGER, 2004; KERBAUY, 2004).

Dentre as várias classes hormonais cujos efeitos em frutos foram registrados destaca-se o etileno, reconhecido pela regulação de diversos processos relacionados ao amadurecimento de frutos climatéricos e não-climatéricos (VILLARREAL *et al.*, 2010); o ácido 3 indol-acético (AIA) reconhecido por retardar o amadurecimento (NITSCH, 1955); o ácido abscísico (ABA) indutor de dormência em sementes e também conhecido por acelerar o amadurecimento em frutos climatéricos (ZHANG *et al.*, 2009) e o metil-jasmonato (MJ) relacionado ao sistema de defesa da planta em resposta a fatores bióticos e abióticos (WANG *et al.*, 2007). Dentre estes, ABA e MJ são reconhecidos por sua influência positiva na síntese de antocianinas em uvas e morangos, respectivamente (HE *et al.*, 2010, MORENO *et al.*, 2010).

Etileno

O etileno (C₂H₄) atua em processos de desenvolvimento vegetal, como expansão celular, diferenciação celular, florescimento, senescência e abscisão e amadurecimento de frutos. Em relação a este último aspecto, uma expressiva literatura liga o etileno à regulação do amadurecimento em frutos climatéricos (TAIZ & ZEIGER, 2004). Contudo, várias evidências têm implicado o etileno como regulador de processos do amadurecimento de frutos não-climatéricos.

Sua biossíntese (descrita por Yang e Hoffman, 1984) ocorre a partir da conversão do aminoácido metionina em etileno através de diversas reações enzimáticas (Figura 3). A S-adenosil-metionina (SAM), um dos produtos do ciclo de Yang, é convertida em ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) pela ação da enzima ACC sintase (ACS). O ACC é então metabolizado pela enzima ACC-oxidase (ACO), por uma reação de oxidação que necessita de O₂ e ferro e que é ativada pelo CO₂ para produzir etileno. Nem todo o ACC é convertido em etileno, pois parte poder ser convertido a n-manolil ACC que é acumulado no vacúolo (TAIZ, 2009; YANG & HOFFMAN, 1984).

O mecanismo de produção de etileno de modo autocatalítico foi identificado através do estudo da expressão de genes envolvidos na biossíntese de etileno: ACO e ACS, durante a transição entre os baixos níveis de produção de etileno

(Sistema I), como no amadurecimento de frutos não climatéricos e no período que antecede o pico da respiração em frutos climatéricos, e o início do climatério (Sistema II, Peach *et al.*, 2012; YANG & HOFFMAN, 1984).

Figura 3: Modelo de biossíntese de etileno proposta por Yang e Hoffamn (1984). Adaptado de Pech *et al.* (1995) SAM: S-adenosil-metionina; MTR: 5'-Metiltiorribose; MTR-1P: 5'-Metiltiorribose-1-P; ACS: ACC sintase; ACC: ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano KMB: ácido α -ceto- γ -metiltiobutírico ACCMT: ácido aminooxiacético aminoeto-xivinilglicina; ACO: ACC-oxidase.

A aplicação de etileno em bagas de uva estimulou a expressão de enzimas diretamente relacionadas com a síntese de antocianinas, como a ANS. Em

morangos, a atividade da fenilalanina amônia liase, enzima necessária para o acúmulo de antocianinas durante o amadurecimento, também apresentou aumento nos frutos tratados com o hormônio, em comparação a frutos não-tratados. O tratamento com 1-metilciclopropeno, um antagonista do etileno, apresentou os efeitos contrários (HE *et al.*, 2010; VILLARREAL *et al.*, 2010).

Auxina

O ácido indol-3-acético (AIA) é a principal auxina encontrada na maioria das plantas. Sua síntese é realizada no meristema caulinar, em folhas jovens, sementes e frutos em desenvolvimento a partir de vias dependentes de triptofano ou a partir do antranilato em vias que contam com a participação de diversas enzimas (Figura 4) (KERBAUY, 2005).

A existência de múltiplas rotas de biossíntese de AIA torna difícil as plantas serem deficientes em auxina e é provavelmente um reflexo de sua importância no desenvolvimento vegetal (TAIZ *et al.*, 2004).

A proteína YUCCA (YUC) destaca-se por catalisar um passo muito importante na via dependente de triptofano, participando da conversão da triptamina (TAM) em N-hidrosil-TAM (HTAM), que após vários passos de modificações gera o AIA (TROMAS & RECHENMANN; 2010)

Figura 4: Modelo de biossíntese de auxinas. Adaptado de Tromas & Rechenmann (2010) TRP: triptofano; IPA: ácido indol 3-pirúvico; TAM: triptamina; IAAld: Indol 3-acetaldeído; HTAM: n-hidrosiltriptamina; IAM: indol 3-acetamina; IAOx: indol 3 acetaldoxima; IAN: indol 3-acetonitrila; CL: camalexina; IG: indolilmetil-glicosinolato; AMI1: codifica para indol 3-acetamida hidrolase; CYP79B2,3;TAA1: triptofano aminotransferase de *Arabidopsis*; YUC; YUCCA, uma *flavin monooxygenase-like proteins*; NIT nitrilase, SUR1,2: genes que codificam para enzimas de síntese de IG.

As auxinas estão relacionadas a diversas mudanças que ocorrem em plantas em desenvolvimento, como a iniciação de raízes laterais, a abscisão foliar, a diferenciação vascular, a formação de gemas florais e o desenvolvimento do fruto e das sementes (TAIZ *et al.*, 2004).

Em pêssago foram identificados os genes envolvidos na biossíntese, transporte e sinalização de auxina cuja expressão é aumentada durante o amadurecimento do mesocarpo do pêssago. Em um caso, aparentemente único entre os frutos, a síntese de etileno climatérico é estimulado pela auxina, através da regulação da transcrição do gene que codifica uma isoforma específica da ACS. (Soto, 2012).

Em morangos, os efeitos das auxinas são conhecidos desde os clássicos trabalhos de Nitsch nos anos 1950, quando foi demonstrado que a auxina, sintetizada nos aquênios, inibia as alterações de cor no receptáculo. A remoção dos aquênios provocava o aceleração das mudanças de coloração e a aplicação de

auxina nos locais dos quais eram removidos, inibia o desenvolvimento da cor vermelha (NITSCH, 1955).

Ácido Abscísico

O ácido abscísico (ABA) é um hormônio vegetal que regula diversos processos durante o ciclo de vida da planta, sendo relacionado à dormência de sementes e gemas, assim como variadas respostas ao estresse hídrico (DAVIES, 2004). Em frutos não climatéricos, como morangos, também está associado à expansão celular, degradação de clorofila e ao amadurecimento (Ji *et al.*, 2012).

O ABA é sintetizado no citosol, através da via biossintética do ácido mevalônico, e no cloroplasto pela via do metil eritritol fosfato (Figura 5) (DAVIES, 2004).

Nos plastídeos, são sintetizados os derivados de isopentil fosfato (IPP), as xantofilas, que são precursoras de ABA. Diversas reações enzimáticas são necessárias para a síntese de ABA. Uma delas, catalisada pela zeaxantina epoxidase (ZEP), destaca-se por converter a zeaxantina em violaxantina. Estudos indicam este ser um passo importante na biossíntese do ABA, visto que mudanças em seu padrão de expressão gênica estão fortemente associadas a alterações nos níveis de ABA em sementes e raízes (Liotenberg *et al.*, 1999).

Figura 5: Principais intermediários na biossíntese de ABA. Adaptado de Liotenberg *et al.*, (1999). IPI: IPP isomerase; GGPS: GGPP synthase; PSY: fitoeno sintase; PDS: fitoeno desnaturase, ZDS: ξ caroteno hidroxilase; LCYB: licopeno β - ciclase; CHYB: β caroteno hidroxilase; ZEP: zeaxantina epoxidase; VDE: violaxantina de-epoxidase; NCED: 9-*cis*- epoxicarotenoide dioxigenase.

A adição de ABA em cultura de células de uva em suspensão estimulou a produção de antocianinas de modo correlato ao aumento da atividade da chalcona isomerase (CHI). Em aplicações diretas sobre os frutos, o ABA aumentou o teor de antocianinas na casca da uvasendo, este correlacionado à indução da transcrição dos genes de CHS, CHI, DFR e UFGT, assim como do fator de transcrição

VvMYBA1, regulador da expressão de vários genes associados a biossíntese de antocianinas na uva (HE *et al.*, 2010).

Ácido Jasmonico

Os jasmonatos desempenham um importante papel na defesa vegetal. O ácido jasmônico (AJ) é sintetizado a partir do ácido linolênico que é liberado principalmente das membranas dos plastídeos e convertido pela rota de sinalização de octodecanóides (TAIZ & ZEIGER, 2004; KERBAUY, 2004). Especificamente, a oxigenação do ácido linolênico, pela enzima lipoxigenase (LOX), gera o ácido 13-hidroxi-linolênico, o qual é convertido pela aleno-óxido sintase (AOS), a enzima passo-limitante da biossíntese do AJ (SOTO, *et al.*, 2012). O ácido jasmonico produzido é modificado no citosol para a produção de seus derivados, como o metil jasmonato, um metil éster aromático do ácido jasmônico, convertido pela ação de uma carboxi-metil transferase (JMT), sendo a reação reversa catalisada pela metil-jasmonato esterase (MJE)(Figura 6) KOO *et al.*, (2009).

Figura 6: Formação do metil-jasmonato, um metil éster do ácido jasmônico. Adaptado de KOO *et al.*, (2009). JMT: carboxi-metil transferase; MJE: metil-jasmonato esterase. MeJa: Metil-Jasmonato

Por ser volátil, o metil jasmonato pode estar envolvido na comunicação entre plantas (*interplant communication*), participando em diversas atividades, como promotor da senescência ou indutor da torção das gavinhas entre outras (GANSSER *et al.*, 1997).

Dentre os diversos experimentos realizados com o ácido jasmônico, tanto em uvas (HE *et al.*, 2010) quanto em morangos (MORENO *et al.*, 2010), foi possível observar o aumento na síntese e acúmulo de antocianinas. Framboesas, tratadas

com 100 μ M de metil jasmonato (MJ) armazenadas durante 10 dias a 10°C, apresentaram maior retenção da coloração vermelha brilhante, que é considerada mais atrativa para o consumidor. Em tratamentos pré-colheita, o MJ além de aumentar os teores de antocianinas, aumentou o conteúdo de flavonóides e outros compostos fenólicos (ROHWER *et al.*, 2008; WANG, 2003).

As evidências citadas acima são alguns exemplos dos efeitos de hormônios vegetais na biossíntese de antocianinas em fruto. Contudo, ainda há poucos estudos que relacionam a aplicação de hormônios na síntese de antocianinas durante o amadurecimento de framboesas, e menos ainda sobre os possíveis mecanismos regulatórios envolvidos, como seus precursores e derivados, assim como as vias de transdução deste sinal, enzimas afetadas e sua regulação.

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos hormônios vegetais etileno, auxina, ácido abscísico e metil-jasmonato sobre a biossíntese de antocianinas durante amadurecimento de framboesas vermelhas (*Rubus idaeus*) cv Autumn Bliss.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 FRUTOS E TRATAMENTOS HORMONAIS

Framboesas (*Rubus Idaeus*) cv Autumn Bliss, foram colhidas nas primeiras horas do dia, no ponto de maturação branco, com grau Brix de 7.5 ± 1.0 , em Ibiúna, São Paulo. Em seguida, foram transportados para o Laboratório de Química Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos da FCF-USP em caixas de poliestireno expandido contendo barras de gel térmico. Após seleção, os frutos receberam, através de aspersão, a aplicação de soluções de ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), metil-jasmonato (MJ) todos dissolvidos ou dispersos em água destilada. As soluções foram preparadas em uma concentração de 100 μM , sendo aplicadas 2 vezes com um intervalo de 12 horas. O grupo controle recebeu a aspersão somente de água destilada.

Os frutos foram armazenados em câmaras B.O.D a $5^\circ\text{C} \pm 0,5$, contendo bandejas com 3 litros de água destilada, com o objetivo de manter a umidade relativa, sendo os tratamentos AIA, ABA e ACC armazenados em uma mesma B.O.D e os demais, armazenados separadamente. Cada câmara continha uma lâmpada de 11W, que permaneceu ligada por períodos controlados (~ 10 horas), visto que o estímulo luminoso é imprescindível para a síntese de antocianinas. Foram avaliados diariamente, durante 5 dias, os efeitos sobre a respiração, síntese de etileno e cor através de espectrometria de reflectância. Também foram congeladas amostras em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para as análises posteriores.

Um fluxograma esquemático da amostragem e um esquema com a cronologia das análises realizadas encontram-se nos Anexos I e II respectivamente.

3.2 RESPIRAÇÃO E PRODUÇÃO DE ETILENO

A estimativa de CO_2 foi realizada pela aplicação de amostras de ar do interior de jarros hermeticamente fechados por 1 hora, com capacidade de 0.34 litros, contendo 10 framboesas. As amostras foram injetadas em cromatógrafo a gás da

Hewlett-Packard modelo GC-6890 equipado com detector de condutividade térmica. A coluna utilizada foi a HP-Plot Q (30 m, D.I. 0,53 mm).

As condições cromatográficas foram: injeção com divisor de amostra (split) em taxa de 50:1 e temperatura de 250°C; volume de injeção 1ml; corrida isotérmica a 30°C empregando hélio como gás carregador em fluxo constante de 4ml/min; temperatura do detector em 250°C utilizando como referência fluxo de hélio a 7ml/min. A estimativa da quantidade de CO₂ foi feita em relação a injeção de 1 mL de padrão de CO₂ 326 nL/L em ar sintético da Air Liquid.

Para a análise de etileno, foi empregado o mesmo equipamento e a mesma coluna cromatográfica, porém com detecção por ionização de chama. O volume de injeção foi de 10 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 utilizadas nos modelos de cromatógrafo a gás desta empresa.

As condições de injeção foram: pressão de 20 psi por 2 minutos, fluxo de ventilação de 5 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 foi feita em relação à injeção de um padrão de 0,1 nL/L de etileno em ar sintético da Air Liquid.

3.3 COR

O método utilizado para avaliação da cor dos frutos foi o descrito por FABI *et al.* (2007) utilizando um colorímetro HunterLab ColorQuest XE (Hunter Associates Laboratories). A cor foi expressa em relação ao ângulo 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 QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES SOLÚVEIS

Os açúcares solúveis foram extraídos 0,25 g de fruto triturado, com etanol 80% a 80°C por três vezes, a cada extração foi centrifugada a 10000 x *g* por 15 min a temperatura ambiente, os sobrenadantes foram combinados e o volume foi levado a 25 mL.

Uma alíquota de 2 mL do extrato etanólico foi evaporada em concentrador a vácuo a 45°C e o volume (2 mL) reconstituído com água. Os açúcares solúveis foram determinados por cromatografia a líquido com detecção por amperometria de pulso em um sistema Dionex DX-500, equipado com coluna Carbpac PA1 (4x250mm), em corrida isocrática com fluxo de 1mL/min de NaOH 18mM, durante 25 min (MAINARDI *et al.* 2006). Para as curvas de calibração foram utilizados padrões de glicose, frutose e sacarose (Sigma).

3.5 ÁCIDOS ORGÂNICOS

A extração dos ácidos orgânicos das amostras foi realizada em triplicata, com porções de água deionizada na proporção de 1:4 (0,5 g de fruto triturado para 2,0 mL de água deionizada). Cada amostra foi processada em homogeneizador do tipo Potter por 1 min, mantida em banho de gelo e centrifugada a 10000 x *g* por 10 min a 4°C. Os sobrenadantes foram recolhidos e filtrados em membranas de nitrocelulose de 0,45 µm de poro. Em seguida, foram injetadas em sistema cromatográfico HP 1100 equipado com detector de arranjo diodos. A coluna cromatográfica empregada foi a REZEX ROA-Organic Acid H+ (300, 7.8 mm, 8 µm tamanho de partícula) com fase móvel de ácido fosfórico a 0.1%, com fluxo de 0,5mL/ min. O monitoramento foi feito a 210 nm

As amostras foram injetadas em duplicatas e os resultados expressos em g em 100g de amostra (b.u). As curvas de calibração foram feitas com padrões dos ácidos: málico, succínico, cítrico e tartárico (Supelco).

3.6 FENÓLICOS TOTAIS

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada através do método espectrofotométrico de *Folin-Ciocalteu* (SWAIN E HILLIS, 1959). A partir de cada extrato metanólico dos frutos, utilizou-se 0.5 µL adicionados a 200 µL de metanol e 2 mL de água destilada, juntamente com 0.25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos a temperatura ambiente, foram adicionados 0.25 mL de solução saturada de carbonato de sódio, os tubos permaneceram em banho a 37°C durante 30 min. As leituras a 765nm foram realizadas em espectrofotômetro Ultrospec 2000 UV/Visible, Amersham Biosciences, Cambridge, UK. O conteúdo de fenólicos totais foi calculado utilizando-se curva padrão de ácido gálico. Os fenólicos totais foram expressos como ácido gálico equivalente por 100g de amostra (b.u).

3.7 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES E ÁCIDOS FENÓLICOS

A extração dos flavonóides foi realizada de acordo com o método descrito por Pinto *et al.* (2008), em metanol/água/ácido acético na proporção de 70:30:5 (v:v:v), com Ultra-Turrax (Polytron®-Kinematica GmbH, Kriens-Luzern, Suíça), por 1 minuto a velocidade 4. Os extratos obtidos foram filtrados a vácuo utilizando papel de filtro Nalgon com 3 micras de porosidade. O resíduo foi re-extraído mais 2 vezes, posteriormente concentrado em rotavaporador (RE 120 – Büchi, Flawil, Suíça), em temperaturas de banho de 40°C (até ~20mL). O volume foi ajustado para 25mL em balão volumétrico com água deionizada. Uma alíquota foi eluída em coluna de 1 g de Poliamida (CC 6, Macherey-Nagel), preparada em seringa própria de 6 mL (HPLC Technology). As colunas foram pré-condicionadas pela passagem de 20 mL de metanol e 50 mL de água. Após a passagem dos extratos aquosos, as colunas foram lavadas com 20mL de água e a eluição dos flavonóides foi realizada com 50 mL de metanol seguido de 50 mL de metanol:amônio (99,5:0,5 v:v). O fluxo através da coluna foi controlado por meio de manifold (Visiprep 24 DL Supelco, Bellefonte, PA). Os eluatos foram completamente secos através de rotaevaporação sob vácuo a 40°C, ressuspensas em 1 mL de metanol:ácido acético (99:5 v/v) e filtrados, utilizando-se filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore Ltd., Bedford,

E.U.A.) de 0,45 m de poro, para a quantificação de flavonóides, utilizou-se Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE).

3.8 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A quantificação de flavonóides foi realizada por CLAE de acordo com Price *et al.* (1999) através do cromatógrafo Agilent Technologies 1260 Infinity, equipado com injetor automático de amostras, bomba quaternária e detector com arranjo de diodo (DAD), controlado pelo software LC1260. A coluna utilizada foi a Prodigy 5 ODS3 (250 x 4,60 mm) (Phenomenex Ltd., Reino Unido) com fluxo de 1mL/min, e eluição com gradiente de solventes constituído por (A) água: ácido fórmico (99:0.5 v/v) e (B) acetonitrila. O gradiente de solvente foi na proporção de 10% B por 5 min, aumentado para 20% B após 15 min, para 25% B após 25 min, para 35% B após 33min e para 90% durante 1min e a seguir re-equilibrada nas condições iniciais por 10 min. Os flavonóides foram expressos como agliconas. A identificação foi realizada através da comparação pelo espectro de absorção. As amostras foram injetadas em duplicatas e os resultados expressos em mg por 100g de amostra (b.u). As curvas de calibração foram feitas com padrões: Cianidina Aglicona (Extrasynthese), Quercitina (Sigma), Epicatequina (Sigma), Ácido Elágico (Sigma) as injeções foram em triplicata, em cinco diferentes concentrações.

3.9 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (AIA), ÁCIDO ABSCÍSICO (ABA)

A extração de AIA e ABA das framboesas foram realizada segundo o método de LUDWIG-MÜLLER *et al.* (2008), com algumas modificações.

Foram homogeneizados cerca de 0.5 g das amostras previamente trituradas em nitrogênio líquido, juntamente com 500µL de mistura extratora composta de isopropanol:ácido acético 95:5. Adicionou-se em seguida 1 µg de padrão marcado [¹³C₆] ácido indol-3-acético (C-IAA) (Cambridge Isotopes) e [²H₆] (+) – *cis, trans* ácido abscísico (Olchemin Ltda). A mistura foi agitada em *vortex* por aproximadamente 1 min. seguida de agitação (600 rpm) a 4°C por 2 horas. O

homogenato foi centrifugado durante 10 min. a $14000 \times g$ a 4°C . O sobrenadante foi transferido para novo microtubo, e o volume foi reduzido a aproximadamente 20-50 μL . O pH foi verificado e ajustado entre 3,5 e 2,5 utilizando HCl 1N. Foram adicionados 500 μL de acetato de etila, seguido de agitação e centrifugação durante 5 min a $14000 \times g$ a 4°C . A fase superior foi coletada e transferida para novo microtubo, sendo esta etapa repetida duas vezes. As frações orgânicas foram combinadas e secas completamente em fluxo de nitrogênio. A amostra foi ressuspensa em 100 μL de metanol e transferida para vial, aonde foram adicionados 50 μL de trimetilsilil-diazometano, o frasco foi fechado imediatamente permanecendo em temperatura ambiente por 30 min. A amostra foi seca novamente em fluxo de nitrogênio, ressuspensa com 20 μL de acetato de etila e levada para análise de CG-MS. Através de injetor automático (Agilent modelo ALS 7683) foram injetados 1 μL da amostra em modo *Splitless*.

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo a gás Hewlett-Packard modelo 6890 acoplado ao detector por espectrometria de massa, modelo 5973. A coluna utilizada foi a HP-1701 (30 m, D.I. 0,25 mm, 0,50 μm de espessura do filme interno) tendo hélio como gás carreador, com fluxo de 1 mL/min. A coluna foi mantida a temperatura de 150°C por 3 min. seguida de rampa de temperatura de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, até 210°C e $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 260°C . Foram monitorados os íons com relação massa/carga (m/z) em 130 e 189 (correspondentes ao AIA endógeno) e 136 e 195 (correspondentes ao padrão interno de AIA marcado). Quanto ao ABA foram monitorados os íons: 134, 162, 190 (correspondentes ao ABA endógeno) e 138, 166 e 194 (referentes ao padrão interno de ABA marcado). As concentrações endógenas de AIA foram obtidas pela relação entre as áreas dos picos nos cromatogramas extraídos em m/z 130 e 136 e para o ABA, 162 e 166.

3.10 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE METIL-JASMONATO (MJ)

A extração de metil jasmonato foi realizada de acordo com o método descrito por Zadra *et al.* (2006) com modificações. Aproximadamente 0,5 g de fruto foi homogeneizado com metanol na proporção de 1:2 (w/v) e 10 μL do padrão interno (metil heptanoato na concentração de 10 mg/mL), através de vortex por aproximadamente 1 min. O homogeneizado foi centrifugado a $10000 \times g$ por 15 min

a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um vial no qual foi exposto a fluxo de nitrogênio até secagem completa. Adicionou-se 1mL de NaCl (30% w/v) e realizou-se a exposição a fibras de micro-extração em fase sólida de Carbowax/Divinilbenzeno/Polidimetilsiloxano (Supelco), durante um período de 30 min a 60°C com agitação.

Para a análise referência negativa (branco), a fibra foi exposta na solução salina sendo que, para evitar contaminação, a mesma foi aquecida a 250°C por 15 min no final da análise cromatográfica.

As determinações dos níveis de metil-jasmonato foram feitas por CG-EM-MSI, conforme protocolo descrito por Zadra *et al.* (2006) com modificações. A coluna utilizada nas separações foi a HP 5 (30 m, x 320 µm, 0,25 µm) tendo hélio como gás carreador, com fluxo de 1.4 mL/min. A coluna foi mantida a 60°C por 1 min. seguida de rampa de temperatura de 18 °C até 280°C aonde permaneceu por 9 min.

Foram monitorados os íons com relação massa/carga (m/z) em 151 e 224 (correspondentes ao MJ endógeno), 74 e 87 (correspondentes ao padrão interno de metil heptanoato). As concentrações foram obtidas pela relação entre as áreas dos picos nos cromatogramas extraídos em m/z 224 e 87.

3.11 ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA POR QRT-PCR

3.11.1 Extração de RNA, purificação e síntese de cDNA

Para a extração de RNA total das framboesas (grupos controle AIA, ABA e MJ, durante o período da colheita até o 4 DPC), foram utilizadas amostras congeladas e armazenadas a -80°C. Sendo realizadas três extrações por amostra, utilizando o reagente Plant RNA reagentTM da Invitrogen, seguindo as instruções do fabricante.. A quantificação e qualidade dos RNAs obtidos foi avaliada pelas absorbâncias a 260 e 280 nm utilizando a placa de leitura de Nanodrop no equipamento Synergy H1 Hybrid (BioTek Instruments) e por eletroforese em gel de agarose 1%. As amostras foram misturadas com o corante GelRed (Qiagen) diluído (1:500) e avaliado pela aparência das bandas dos RNAs ribossomais e ausência de sinais de degradação (presença de arraste nas bandas).

Para a purificação e eliminação de contaminação por DNA genômico foi utilizado o kit Ambrion® DNA-free™ DNase Treatment & Removal Reagents , seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

A conversão do RNA para cDNA , para as reações de RT-PCR, foi feita por meio da reação de transcrição reversa com o *primer* Oligo(dT₁₅) do kit ImProm II™ Reverse Transcription System (Promega) seguindo as recomendações do fabricante.

3.11.2 *Primers* utilizados na amplificação dos genes da ANS, DFR e MYB

Os *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real referente aos genes das enzimas ANS, DFR e do fator de transcrição MYB e do controle da reação β -actina, foram obtidos de Chen *et al.*(2012).

Tabela 1: Sequência de nucleotídeos e tamanho esperado para o produto de amplificação de genes que codificam as enzimas ANS, DFR e dos genes MYB 10 e β -actina (Chen *et al*, 2012).

Gene	<i>Amplicon</i>	Sentido	Sequência
ANS	56pb	Forward	5'-GGCCTCGGGAAAAATTCAAG-3'
		Reverse	5'-GCCCCGGAAGCATTGTTTG-3'
DFR	63pb	Forward	5'-ACAGTTCTGAAGGCTGGTGTGTTTAC-3'
		Reverse	5'-CTTCTGGTGCTCTTCGACATACA-3'
MYB10	115pb	Forward	5'-CCATCAGCATCACCACCTA-3'
		Reverse	5'-CACCTGTTCTGTCAATGAG-3'
β -Actina	57pb	Forward	5'-TGACAATGGGACTGGAATGGT-3'
		Reverse	5'-GCCCTGGGAGCATCATCA-3'

3.11.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

Inicialmente, foram realizadas análises para testar a especificidade dos *primers* com a amostra, assim como uma otimização das condições, como concentração de cDNA e *primers*, para as amplificações de cada fragmento para cada gene (ANS e MYB).

Para as reações de PCR em Tempo Real utilizou-se o kit SYBR® Green RT-PCR da Applied Biosystems sendo as amplificações realizadas em um

termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems). Todas as reações foram feitas de acordo com as recomendações do fabricante.

As amostras foram aplicadas em duplicata, juntamente com um controle positivo da reação (pool de amostras) e um controle negativo. As condições da corrida seguiram as recomendações de Chen *et al* (2012), com modificações, 95°C por 5min, 40 ciclos de 95°C por 30s, 57°C por 30s e 72°C por 30s.

A detecção de DNA contaminante (se existente) foi confirmada 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 gene da β -actina, Chen *et al.* (2012), de cada amostra.

Para o cálculo de expressão gênica relativa, utilizou-se, como referência para os demais dias pós-colheita, o dia da colheita dos frutos (0 DPC). Através da equação:

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

$$R = 2^{-[\Delta Ct amostra - \Delta Ct controle]}$$

Aonde:

ΔCt amostra é a diferença entre o Ct do gene alvo e o Ct do gene constitutivo (β -actina) nas amostras de cada ponto analisado, ΔCt controle é a diferença entre o Ct do gene alvo e o Ct do gene constitutivo nas amostras de referência (COLHEITA).

3.12 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para a análise dos resultados utilizou-se o programa Graphpad Prism versão 5.01 da GraphPad Software, CA, USA. A comparação de médias foi realizada por ANOVA ($p < 0,005$) e *two-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EFEITOS SOBRE O ETILENO, RESPIRAÇÃO, COR E NÍVEIS DE AÇÚCARES E ÁCIDOS ORGÂNICOS

Os resultados da análise de produção de etileno (Figura 7) indicam padrões de evolução similares em todos os grupos. Exceto para o grupo tratado com MJ, que apresentou valores significativamente mais altos que o grupo controle a partir do 2DPC. Ao final do período, todos os tratamentos induziram a produção em valores mais elevados do que o grupo controle, sendo que o grupo que se destacou foi o MJ, que induziu a síntese do hormônio, curiosamente, mais do que o próprio precursor do etileno, o ACC.

Figura 7: Evolução na produção de etileno em framboesas (*Rubus idaeus*) cv. Autumn Bliss para os tratamentos Controle (CNTR), ácido indol-3-acético (AIA), ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), ácido abscísico (ABA) e metil-jasmonato (MJ) armazenados por 5 dias a 5°C. Os símbolos indicam a média e as barras verticais indicam o erro (n=3). b para $P < 0.01$, c para $P < 0.001$ em comparação ao grupo Controle DPC- dias pós-colheita.

Este efeito estimulatório do grupo MJ na produção de etileno, também foi observado por Gansser *et al.*, (1997) e Yu, *et al.*, (2009) em fatias de tomate tratadas

com MJ. Por meio de um aumento no conteúdo de ACC, assim como um aumento da atividade de ACC oxidase (E.C 1.4.3) e ACC sintase (E.C 4.4.1.14).

Resultado semelhante também foi encontrado para morangos “Pajaro” em estudos de Mukkun e Singh (2009), que detectaram aumento na síntese de etileno nos três primeiros dias após a aplicação de MJ.

A intensidade respiratória é uma medida muito importante do metabolismo do fruto, sendo muitas vezes considerado um importante parâmetro na avaliação do tempo de armazenamento, uma vez que altas taxas respiratórias podem ser associadas a uma curta vida pós-colheita (HARLLER *et al.*, 1941).

Os padrões respiratórios (Figura 8), foram similares entre os grupos, havendo aumento para os frutos do grupo controle em 2 DPC. O tratamento com MJ, apesar do alto estímulo na produção de etileno, não induziu alterações na respiração, apresentando valores menores ou próximos ao grupo controle.

Figura 8: Evolução na respiração framboesas (*Rubus idaeus*) cv. Autumn Bliss para os tratamentos Controle (CNTR), ácido indol-3-acético (AIA), ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), ácido abscísico (ABA) e metil-jasmonato (MJ) armazenados por 5 dias a 5°C. Os símbolos indicam a média e as barras verticais indicam o erro (n=3). a para $P < 0.05$, b para $P < 0.01$ em relação ao grupo Controle DPC- dias pós-colheita.

Tomando por base os valores encontrados no grupo controle, tanto a produção de etileno quanto a respiração apresentaram valores similares aos encontrados no amadurecimento pós-colheita de framboesas da cultivar Heritage (Perkins-Veazie, 1992).

Concordando com trabalho de Purgatto *et al.*, (2002), realizado com fatias de banana tratadas com AIA, não houveram diferenças significativas nas taxas respiratórias entre os frutos tratados e o grupo controle.

Em outros estudos com framboesas e tratamentos hormonais, não foram avaliadas as taxas respiratórias dos frutos (WANG *et al.*, 2005). Salientando a importância deste trabalho, demonstrando a influência dos tratamentos realizados sobre a respiração de framboesas.

Na análise de cor, com o decorrer do período, houve uma diminuição no ângulo de matiz (Figura 9), devido à rápida evolução na coloração dos frutos, logo após o primeiro dia da colheita (Figura 10). Nota-se que nos frutos tratados com MJ, no 5º DPC, apresentam aparência de sobremaduro.

Figura 9: Análise de cor em framboesas (*Rubus idaeus*) cv. Autumn Bliss para os tratamentos Controle (CNTR), ácido indol-3-acético (AIA), ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), ácido abscísico (ABA) e metil-jasmonato (MJ) armazenadas por 5 dias a 5°C. Os símbolos indicam a média e as barras verticais indicam o erro (n=3). DPC- dias pós-colheita.

O armazenamento de framboesas a 5°C mantêm uma cor vermelha aceitável por 3 ou 4 dias de armazenamento, porém, em seguida, a fruta desenvolve uma coloração vermelha muito escura, lembrando frutos sobremaduros. Após 5 dias, a aparência de sobremaduro e a perda da firmeza são extremas (NUNES, 2008).

Sabe-se que, dentre outros aspectos, existe uma grande influencia do genótipo na coloração dos frutos. Após a colheita, os frutos tendem a diminuir a luminosidade, se tornando mais escuros. Para diversas framboesas é relatada a diminuição dos valores de L. a. e b. com o aumento do tempo de armazenamento, sendo também fatores que influenciam este processo, a temperatura e a cultivar (KRÜGER *et al.*, 2012; NUNES, 2008).

Diante destes resultados, observa-se que não houveram diferenças significativas para o ângulo de matiz, ao passo que a figura 5 expressa diferenças, especialmente no 1º e 2º DPC. Esta divergência pode estar associada a metodologia da avaliação da cor dos frutos, visto que para o ângulo de matiz foram avaliados 5 pontos de cada fruto. Enquanto para a Figura 5 podemos observar um fruto que representa todo o tratamento, composto por 12 frutos. Sendo uma análise visual, captamos a influência de fatores como a copigmentação, posição do fruto no momento da análise, entre outros.

Figura 10: Evolução na cor de framboesas (*Rubus idaeus*) cv. Autumn Bliss para os tratamentos controle (CNTR), ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) e metil-jasmonato (MJ) armazenados por 5 dias a 5°C. DPC- dias pós-colheita.

Outra análise para verificar os possíveis efeitos dos tratamentos hormonais em parâmetros além dos envolvidos na formação da cor foi à quantificação dos açúcares solúveis em framboesas (glicose, frutose e sacarose) apresenta-se na (Figura 11). O conteúdo de açúcares totais foi representado como a soma dos três açúcares citados.

Figura 11: Quantificação de glicose (A), frutose (B) e de sacarose (C) e açúcar total (D), em framboesas vermelhas (*Rubus idaeus*) cv. Autumn Bliss para os tratamentos controle (CNTR), ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) e metil-jasmonato (MJ) armazenados por 5 dias a 5°C. Os símbolos indicam a média e as barras verticais indicam o erro (n=3). a para $P < 0.05$, b para $P < 0.01$, c para $P < 0.001$ em relação ao grupo Controle m.f - massa fresca, DPC- dias pós-colheita.

Para a glicose (Figura 11 - A) observou-se que o grupo CNTR apresentou as menores concentrações durante boa parte do tempo pós-colheita. A partir do 3DPC, as maiores concentrações foram encontradas nos grupos ABA, ACC e MJ. O grupo AIA apresenta diferenças significativas apenas em 2 e 5 DPC.

A frutose (Figura 11 - B) destaca-se por ser o açúcar predominante. Sendo, ao paladar, mais doce que a glicose e a sacarose, concentrações maiores de frutose podem ser desejadas, impactando diretamente nas características sensoriais dos frutos. Pode-se observar que o perfil visto para a glicose se repete para frutose, havendo maiores concentrações para os grupos tratados a partir de 3DPC, enquanto para o grupo tratado com AIA, ocorre em 2 e 5 DPC.

A sacarose (Figura 11 - C) foi encontrada em menores quantidades que a frutose, apresentando perfil muito similar a glicose, com conteúdos de 2.98 mg sacarose/g m. f. para o grupo controle e 5.34 mg sacarose/g m. f para o grupo tratado com ABA no 5º DPC.

Sendo a clivagem da sacarose fonte de glicose e frutose, o aumento destes monossacarídeos está correlacionado a diminuição nos níveis de sacarose ao longo do amadurecimento das framboesas de todos os grupos. A diminuição também foi observada para glicose e a frutose, indicando que estes açúcares estejam sendo utilizados para outros processos, como respiração e fornecimento de esqueleto carbônico para a biossíntese de outras moléculas. Para o grupo controle, a diminuição do conteúdo de açúcares ocorre inicialmente entre o primeiro e o segundo dia pós-colheita, quando as taxas respiratórias e de produção de etileno praticamente duplicam. Os dados indicam que para conservar este perfil de elevadas taxas respiratórias, o conteúdo de açúcar continua a diminuir. Interessante ressaltar que apesar da baixa temperatura de armazenamento (5°C) os frutos conseguem manter vários de seus metabolismos bastante ativos, o que é bastante evidente pelas rápidas mudanças de coloração.

Para os açúcares totais, pode-se observar na figura 11 (D) que ocorre sua diminuição para os grupos CNTR e AIA, enquanto para os demais, ocorre aumento. Ao final do período, os frutos tratados apresentaram maiores conteúdos que os frutos CNTR.

Os valores encontrados são maiores do que os citados por Souza (2007) e diferem de Cordenunsi *et al.*, (2003) em estudos com morangos armazenados a 6°C, que observaram queda no conteúdo da sacarose. Em trabalho subsequente de Cordenunsi *et al.*,(2005), morangos armazenados sob baixas temperaturas (6°C) apresentaram aumento no conteúdo de sacarose. Dentre as possíveis fontes de carbono sugeridas para esta síntese pós-colheita em frutos de modo geral, estão o amido, ácidos orgânicos e açúcares provenientes da desestruturação da parede celular. Assim como morangos, a framboesa não possui amido suficiente para essa síntese, logo é possível que as demais fontes estejam implicadas no aumento do nível de açúcares solúveis durante o armazenamento.

Estas diferenças encontradas neste trabalho estão em acordo com as observados no trabalho de KRÜGER *et al.*, (2011), que salientam que as concentrações de açúcares variam, dentre outros fatores, devido ao grau de colheita e as condições de armazenamento, visto que em seu trabalho, a baixa temperatura não influenciou o teor de sólidos solúveis. Salienta-se aqui a importância de realizar a análise de especiação dos açúcares de maneira a identificar variações que, por vezes, não são detectadas pelos refratômetros na leitura de sólidos solúveis. Acrescenta-se que os dados obtidos estão em acordo também com os valores encontrados por WANG *et al.*, (2009) .

Em estudos com framboesas armazenadas a 10°C, WANG (2003) detectou maior concentração de açúcares em frutos tratados com MJ. Em um trabalho posterior em três cultivares de amoras (*Rubus sp.*), os maiores teores de sólidos solúveis foram encontrados em frutos tratados com 0.01 e 0.1mM de MJ (Wang *et al.*, 2008) evidenciando a influencia deste hormônio na conservação do conteúdo de açúcares durante o período pós-colheita em framboesas. Contudo, não há informações sobre os efeitos sobre os genes codificadores de enzimas das vias de biossíntese de açúcares, para afirmar se o aumento no conteúdo se dá em decorrência de anabolismo.

Se avaliarmos, individualmente cada açúcar, os grupos de frutos tratados apresentam um conteúdo final maior que o grupo controle. Sendo que para todos os açúcares solúveis a partir do 2DPC há um aumento e similaridade nos perfis para os grupos ABA, ACC e MJ. Ao passo que o grupo CNTR segue com as menores concentrações e, de modo similar, o grupo AIA.

Sabe-se que os pequenos frutos são bastante suscetíveis à desidratação, especialmente a framboesa que possui um orifício em seu interior. Assim, foi realizado um ensaio independente com frutos de framboesa da cv Autumn Bliss (colhida em 2013), nas mesmas condições de ensaio realizadas em 2012 do grupo controle. Em uma temperatura de 5°C durante 5 dias de armazenamento, foi possível confirmar a grande perda de água do fruto com o decorrer do período, como pode ser observado na tabela abaixo:

Tabela 2: Perda de massa (%) de framboesas *Rubus idaeus*. cv. Autumn Bliss, colheita de 2013 armazenadas a 5°C durante 5 dias.

Perda de massa (%)					
	1 DPC	2 DPC	3 DPC	4 DPC	5 DPC
Média	3.67	8.12	12.44	19.72	26.40
DP	1.64	2.61	3.48	5.65	7.68

Aparentemente a perda de água poderia explicar o ligeiro aumento nos açúcares solúveis nos grupos tratados com os hormônios (levando em consideração que todos apresentassem também este padrão). Contudo, isto não se aplicaria ao grupo controle, que apresentou redução no conteúdo de açúcares ao longo do período pós-colheita. Deste modo, pode-se sugerir que, ao menos, os tratamentos promovem uma aparente manutenção do conteúdo de açúcares. Apesar da aparência não demonstrar um efeito maior de perda de água nos frutos tratados, seria necessário averiguar se os hormônios avaliados neste trabalho exerceriam algum efeito na retenção de água durante o amadurecimento o que levaria a um efeito de concentração de soluto. Esta hipótese, contudo, não responderia totalmente pelos efeitos observados sobre os níveis de açúcares, visto que os níveis de ácidos orgânicos, aparentemente, não foram afetados (Figura 7).

Para minimizar as perdas decorrentes da desidratação, aconselha-se manter durante o armazenamento, uma umidade relativa ao redor de 90 a 95% (ANTUNES, & RASSEIRA, 2004). Importante salientar que em nossos experimentos, um recipiente contendo água foi colocado dentro das câmaras de armazenamento dos frutos.

Em relação aos ácidos orgânicos, durante os 5 dias após a colheita (Figura 12) foram encontrados valores médios de ácido cítrico em torno de 2.02 g/100g m.f e 0.31g/100g m.f de ácido málico no 3 DPC, quando as diferenças entre os tratamentos, para este último, foram as mais expressivas.

A concentração de ácidos orgânicos diminui com a maturação em alguns frutos, uma vez que podem ser utilizados como fonte de energia na respiração ou como fonte de carbono para a síntese de açúcares. Além disso, os ácidos orgânicos destacam-se por contribuírem com as características sensoriais de framboesas, podendo também ser um indicativo de maturidade do fruto (NUNES, 2008; SOUZA, 2007). Em cultivares de framboesa vermelha os principais ácidos encontrados são o cítrico (2.06 g/100g m.f) e o málico (0.80g/100g m.f) (SOUZA, 2007).

Figura 12: Quantificação de ácidos málico (A) e cítrico (B) em (*Rubus idaeus*) cv. Autumn Bliss para os tratamentos controle (CNTR), ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) e metil-jasmonato (MJ) armazenados por 5 dias a 5°C. Os símbolos indicam a média e as barras verticais indicam o erro (n=3). a para $P < 0.05$ em relação ao grupo Controle, m.f – massa fresca, DPC – dias pós-colheita.

A concentração de ácido cítrico encontrada nos frutos, independente do tratamento, foi aproximadamente 10 vezes maior que a de ácido málico. Dados semelhantes foram vistos por ÇEKIC & OZGEN (2010) e WANG (2003) e Ancos *et al.*, (1999) que encontrou 1.67g de ácido cítrico/100g f.w em trabalho com framboesas *Autumn Bliss* cultivadas na Espanha e colhidas no ponto considerado como comercial.

De modo geral, observa-se que os hormônios vegetais afetam alguns parâmetro do amadurecimento, como as taxas respiratórias e de produção de

etileno, havendo uma manutenção do conteúdo de açúcares solúveis, ao passo que não interferem nos níveis de ácidos orgânicos. Destaca-se o MJ pelo estímulo a produção de etileno, sem indução da respiração.

4.2 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONÓIDES E ÁCIDOS FENÓLICOS

Compostos fenólicos são metabólitos secundários das plantas que determinam importantes características de qualidade sensorial e nutricional em frutas, vegetais e outras plantas (LEE *et al.*,2012).

Em framboesas, o conteúdo de compostos fenólicos (Figura 13) aumentou com o decorrer do período, o que era esperado, visto que os frutos foram colhidos com a cor branca, e todos os grupos apresentaram mudanças de cor decorrentes da biossíntese de antocianinas.

Enquanto para os frutos controle, notou-se um aumento entre os dias 3 e 4 pós-colheita, o grupo ACC, alcançou maiores concentrações que o grupo CNTR a partir do 2º DPC. Estes valores encontrados para os frutos tratados com ACC coincidem com o elevado conteúdo de ácido elágico total encontrado no mesmo período neste grupo. No grupo ABA o aumento no conteúdo de compostos fenólicos foi similar ao grupo controle, só diferindo estatisticamente em 3DPC. Ligeira inibição da síntese de fenólicos totais foi observada no grupo AIA, diferindo dos demais grupos, sendo que as diferenças foram mais evidentes nos dias 4 e 5 após a colheita.

Figura 13: Conteúdo de Compostos fenólicos solúveis totais em framboesas vermelhas (*Rubus idaeus*) *Autumn Bliss* para os tratamentos (CNTR), ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) armazenados por 5 dias a 5°C. Os símbolos indicam a média e as barras verticais indicam o erro (n=3). b para $P < 0.01$, c para $P < 0.001$ em relação ao grupo Controle, m.f – massa fresca, DPC – dias pós-colheita.

Os valores encontrados para o grupo controle estão em acordo com trabalhos anteriores encontrados na literatura (NUNES, 2008; MILIVOJEVIĆ *et al.*, 2011). No grupo tratado com MJ foram detectados níveis de compostos fenólicos totais ligeiramente menores que no grupo controle, mas aos 5DPC os valores foram semelhantes, indicando pouco efeito do hormônio sobre este parâmetro do amadurecimento.

De acordo com as análises por CLAE, foram obtidos os conteúdos de ácido elágico total e livre, quercitina, epicatequina e para as antocianinas foram identificados derivados de cianidina.

O ácido elágico é um derivado dimérico de ácido gálico presente no vacúolo das células vegetais em suas formas livre ou ligada. Em framboesas, o conteúdo de ácido elágico livre corresponde apenas à menor parte do conteúdo de ácido elágico total. Após hidrólise ácida, o ácido elágico pode ser liberado dos elagitaninos, uma complexa classe de polifenóis, pertencente ao grupo dos taninos hidrolisáveis

(MULLEN *et al.*, 2003; LANDETE, 2011). A ocorrência de elagitaninos e seus derivados em alimentos da dieta é mais restrita do que outros compostos fenólicos, sendo limitada principalmente a frutas como framboesas, amoras, amoras silvestres, morango, romã, e algumas espécies de nozes, amêndoas e frutos secos (MONTROYA, *et al.*, 2010).

Nas framboesas tanto no grupo controle como nos grupos tratados com hormônios, o conteúdo (figura 14-A) variou, para o ácido elágico livre, de 1,62 a 4,03 mg/100g m.f aumentando no decorrer do período do experimento, com os maiores valores encontrados no grupo controle. Para os demais tratamentos destacou-se o MJ por apresentar níveis de ácido elágico livre menores que o grupo controle em praticamente todo período (exceto 1DPC).

Os valores de ácido elágico livre estão em acordo com os encontrados por Moreno *et al.*, (2009) em framboesas cv. Autumn Bliss em diferentes estádios de maturação.

Para o conteúdo de ácido elágico total (Figura 14-B), houve aumento em todos os grupos com o decorrer da maturação. Para o MJ, com exceção do 3DPC, suas concentrações se equiparam ao grupo controle, sendo este último juntamente com ACC, a apresentar as maiores concentrações no final do período, não diferindo estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

Os valores encontrados nestes experimentos foram maiores que os avaliados por Pinto, *et al.*, (2008) em morangos da cv. Dover (47 mg/100g f.w). Tais resultados sugerem a framboesa como um fruto promissor para estudos relacionados ao ácido elágico.

Figura 14: Conteúdo de ácido elágico livre (A) e total (B) em framboesas vermelhas (*Rubus idaeus*) cv. Autumn Bliss para os tratamentos controle (CNTR), ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) e metil-jasmonato (MJ) armazenados por 5 dias a 5°C. Os símbolos indicam a média e as barras verticais indicam o erro (n=3). a para $P < 0.05$, b para $P < 0.01$, c para $P < 0.001$ em relação ao grupo Controle, m.f – massa fresca, DPC- dias pós-colheita.

Em relação aos níveis de epicatequina, uma proantocianidina (figura 15), no grupo ACC foram encontrados os menores valores. O grupo MJ apresentou valores relativamente maiores que os demais grupos durante a maior parte do período,

sendo ultrapassado apenas no 5º DPC pelo grupo controle, Os demais grupos (AIA e ABA), apresentaram algumas flutuações nos valores, mas estes se equipararam em ambos os grupos.

Figura 15: Conteúdo de epicatequina em framboesas vermelhas (*Rubus idaeus*) cv. Autumn Bliss para os tratamentos controle (CNTR), ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) e metil-jasmonato (MJ) armazenados por 5 dias a 5°C. Os símbolos indicam a média e as barras verticais indicam o erro (n=3). a para $P < 0.05$, b para $P < 0.01$, c para $P < 0.001$ em relação ao grupo Controle, m.f massa fresca, DPC-dias pós-colheita.

Destaca-se o 1DPC, por apresentar as maiores concentrações de epicatequina (exceto para ACC). Este aumento pode estar associado à queda nos níveis de cianidina (Figura 18), (exceto para o grupo ABA) no segundo dia pós-colheita. A epicatequina é uma leucoantocianidina, cuja origem provem da ação da antocianidina redutase – ANR (E.C. 1.3.1.77) que converte a antocianidina cianidina em 2,3-cis-flavanóis, através da redução mediada por NADPH (GAGNÉ, *et al.*, 2009).

A epicatequina também é um importante precursor para a formação de proantocianidina. Em morangos, o aumento de epicatequina esteve associado à

diminuição de antocianina, assim como a atividade de UDP glicose: flavonóide-3-O-glicosiltransferases (UFGT), uma importante enzima encontrada ao final da via biossintética da antocianina, havendo um redirecionamento da via biossintética dos flavonóides quando *FaGT1* foi silenciado. Não havendo mudanças nos níveis expressos de antocianidina redutase (ANR) que converte antocianidina a leucocianidina, mas, alterando a disponibilidade de substrato, no caso cianidina (RASMUSSEN, 2009; GRIESSE *et al.*, 2008).

Em *Arabidopsis*, já foram caracterizados os genes *BANYULS* (*BAN*) que codificam a expressão de ANR. Expressão ectópica de *BAN* em pétalas de flores de tabaco e folhas de *Arabidopsis* resultou na diminuição de antocianinas e acúmulo de proantocianidinas, como taninos condensados, sugerindo a existência de interações entre as antocianidinas e as vias biossintéticas de proantocianidinas (WANG *et al.*, 2013; RASMUSSEN, 2009). Assim, tendo em vista os resultados, é possível observar interações entre estas vias biossintéticas, através do aumento do conteúdo de epicatequina no 1DPC, enquanto os níveis de cianidinas em 2DPC diminuem.

No entanto, não foram encontrados na literatura resultados que evidenciem o efeito de hormônios vegetais sobre a produção de epicatequina.

A quercitina é conhecida por ser um poderoso antioxidante, além das evidências de suas propriedades redutoras da pressão arterial (ANTTONEN & KARJALAINEN, 2005). Em plantas, desenvolve múltiplas funções, podendo se complexar com íons de cobre e ferro, inibir a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), assim como reduzir o conteúdo de ROS depois de formados (AGATI *et al.*, 2012). Neste estudo, seu conteúdo foi avaliado, tendo em vista a sua importância para a via biossintética da cianidina.

Os níveis de quercitina (Figura 16) variaram no decorrer do período, de 0,32 a 1,87 mg/100g m.f. Para o grupo MJ não houveram mudanças significativas no conteúdo sendo detectadas, de modo similar ao grupo ACC, concentrações menores que as encontradas no grupo controle. Aos 5 dias após a colheita, as maiores concentrações foram encontradas para o grupo AIA. Para os frutos tratados com ABA, os maiores níveis de quercitina se destacaram no 2º DPC. Os valores

encontrados para a quercitina concordam com os encontrados por ANTTONEN & KARJALAINEN (2005).

Figura 16: Conteúdo de quercitina em framboesas vermelhas (*Rubus idaeus*) cv. Autumn Bliss para os tratamentos controle (CNTR), ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) e metil-jasmonato (MJ) armazenados por 5 dias a 5°C. Os símbolos indicam a média e as barras verticais indicam o erro (n=3). a para $P < 0.05$, c para $P < 0.001$ em relação ao grupo Controle, m.f – massa fresca, DPC- dias pós-colheita.

Quanto às antocianinas foram identificados nas framboesas *Autumn Bliss*, derivados glicosilados de cianidina (Figura 17) por meio de CLAE e detecção por espectrofotometria UV-visível (através do detector de arranjo de diodos).

Figura 17: Cromatograma de flavonóides em framboesas vermelha (*Rubus idaeus*) cv. Autumn Bliss analisado por cromatografia líquida de alta eficiência. Picos (1, 2, 3, 4) quantificados como derivados de cianidina.

Algumas antocianinas, como a cianidina-3-glicosídeo estão presentes em framboesas imaturas (verdes). Outras antocianinas, como cianidina soforosídeo, cianidina glicosilrutinosídeo e pelargonidina glicosil rutinosídeo, são encontradas especialmente quando a cor vermelha se desenvolve (BEEKWILDER *et al.*, 2005).

Em nosso estudo não encontramos derivados de pelargonidina, nem de seu precursor, o campferol. Esta pode ser uma característica desta seleção da cultivar *Autumn Bliss* plantada no Brasil, embora o conteúdo de pelargonidina seja normalmente pequeno em comparação com outras antocianinas. Em framboesas *Autumn Bliss* cultivadas no México, foram encontrados conteúdos de pelargonidina-3-soforosídeo próximas de 0,5% do conteúdo total de antocianinas, o que pode ser considerado pequeno se comparado a cianidina-3-soforosídeo, cujos valores médios perfizeram 46,2% (MORENO *et al.*, 2009). Enquanto em framboesas *Autumn Bliss* cultivadas na China, a antocianina predominante foi a cianidina-3-soforosídeo e as pelargonidinas mais abundantes foram a pelargonidina-3-glicosídeo e a pelargonidina-3-rutinosídeo contendo 0.48 e 0.33 mg/100g de massa fresca, respectivamente (CHEN *et al.*, 2013).

Outra possibilidade que pode explicar estas diferenças seria consequência da adaptação desta cultivar às condições no Brasil, envolvendo fatores como

localização, condições climáticas, período de colheita. Mais estudos com outras amostras desta cultivar seriam necessários para corroborar esta hipótese.

Em framboesas, o conteúdo de antocianinas aumentou com o decorrer do amadurecimento, refletindo na mudança de cor dos frutos (Figura 18). Durante o ensaio, até o terceiro dia pós-colheita os grupos ABA e ACC apresentaram perfil distinto dos demais, representando os valores máximo e mínimo encontrados nestes dias (2DPC e 3DPC, respectivamente). Ao final, foi possível distinguir, aos 4 e 5 dias após a colheita, elevadas concentrações no grupo de frutos tratados com MJ.

Figura 18: Conteúdo de cianidina em framboesas vermelhas (*Rubus idaeus*) cv. Autumn Bliss para os tratamentos controle (CNTR), ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) e metil-jasmonato (MJ) armazenados por 5 dias a 5°C. Os símbolos indicam a média e as barras verticais indicam o erro (n=3). a para $P < 0.05$, b para $P < 0.01$, c para $P < 0.001$ em relação ao grupo Controle, m.f – massa fresca, DPC- dias pós-colheita

Em morangos, nos quais foi silenciado um gene da 9-*cis*-epóxicarotenóide dioxigenase, (*FaNCED1*) que codifica uma enzima essencial para a biossíntese de ABA, foram detectados baixos níveis do hormônio e os frutos não desenvolveram cor (JIA *et al.*, 2011), indicando um papel relevante do ABA para a síntese de antocianinas nestes frutos. No entanto, em nosso trabalho, esta resposta não foi

obtida, framboesas tratadas com ABA, diferiram do grupo controle apenas em 2 DPC.

Também em morangos, o aumento no conteúdo de antocianinas foi observado em decorrência do tratamento dos frutos com MJ, em comparação com frutos não tratados (MORENO *et al.*, 2010). Os resultados concordam com os nossos, visto que frutos tratados com MJ, apresentaram elevadas concentrações nos dias 4 e 5 após a colheita.

A ligação entre o MJ e a resposta na síntese de antocianina foi também identificada em *Arabidopsis thaliana*, na qual ao menos dois genes (COI1 e DFR), foram induzidos em função do tratamento com ácido jasmônico, e associados ao maior acúmulo de antocianina, em comparação com plantas não tratadas com o hormônio.

Em cultura de células em suspensão preparadas a partir das bagas de uvas, o tratamento com MJ em combinação com sacarose induziu o acúmulo de transcritos que codificam enzimas envolvidas na produção de antocianinas (MORENO *et al.*, 2010).

Para frutos tratados com AIA, os níveis de cianidina foram menores que os encontrados no grupo controle apenas nos primeiros dias, apresentando concentrações próximas ao final do período. Já foi indicado para cultura de células de petúnia que elevados níveis de auxina aumenta o gradiente de prótons transmembrana, tendo elevada regulação de H^+ através da atividade de ATPase. Enquanto a produção de antocianina esta associada a baixos gradientes de prótons, através da regulação da expressão de PAL, indicando assim o mecanismo de ação entre os elevados níveis de auxina e os baixos níveis de produção de antocianinas (DEROLES, 2009).

Este efeito negativo das auxinas durante a maturação dos frutos e a redução na coloração por meio da diminuição da concentração de antocianina, também foi observada em outros frutos não-climatéricos como morangos e uvas (GONZÁLEZ *et al.*, 2012 GIVEN, *et al.*, 1988).

4.3 ANÁLISES HORMONAIIS

O trabalho realizado com o grupo ACC mostrou que os resultados mais promissores foram obtidos com os demais grupos.

Embora não hajam resultados acerca dos efeitos do etileno sobre os outros parâmetros descritos a seguir, em vista da complexidade e custo das análises hormonais e de expressão gênica, optou-se por seguir com as avaliações sem o grupo ACC. As análises hormonais foram realizadas para a avaliação do conteúdo de auxina livre, ABA e MJ, para os frutos tratados com AIA, ABA, MJ e o grupo CNTR. O intuito foi não apenas avaliar o conteúdo dos hormônios nos frutos, mas também verificar se a aplicação de um hormônio alterou o conteúdo de outro hormônio e suas mudanças durante o amadurecimento das framboesas.

Detectou-se maiores níveis de cada um dos hormônios testados nos frutos tratados com o respectivo hormônio, como era esperado. De maneira geral os demais grupos apresentaram perfis hormonais semelhantes. Este comportamento pode estar ligado às diferentes regulações e respostas dos frutos dependente do estágio de amadurecimento em que os tratamentos foram aplicados.

Para os níveis de auxina livre (Figura 19), foi possível observar as maiores concentrações para o grupo AIA 24 horas logo após o tratamento (435,3 ng AIA livre/g framboesa b.u). Nos demais grupos, não houve diferenças significativas em comparação com o grupo CNTR até o 3º dia após a colheita. Contudo, entre o 3 e 5 DPC os níveis de AIA aumentaram no grupo controle atingindo níveis aproximadamente de 3 a 5 vezes maiores do que os encontrados no grupo ABA e MJ.

Figura 19: Quantificação de AIA livre em (*Rubus idaeus*) cv. Autumn Bliss para os tratamentos controle (CNTR), ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA) e metil-jasmonato (MJ) armazenados por 5 dias a 5°C. Os símbolos indicam a média e as barras verticais indicam o erro (n=3). a para $P < 0.05$, c para $P < 0.001$ em relação ao grupo Controle, m.f – massa fresca, DPC- dias pós-colheita.

Os resultados encontrados para framboesas tratadas com ABA foram similares aos encontrados por Gonzalez *et al.*, (2012) que, após aplicar ABA em uvas *Cabernet Sauvignon*, não observaram diferenças nos níveis de auxina livre.

Os níveis de auxina livre aumentaram no grupo tratado com AIA logo após 24 horas do tratamento, sendo que esta concentração não diminuiu, com o decorrer do período. Este perfil difere do trabalho de Purgatto *et al.*, (2002) que observaram em bananas tratadas com AIA que, 72 horas após o tratamento, a auxina livre declinava a níveis próximos aos do grupo controle, sendo esta diminuição atribuída a conjugação nas formas AIA amida e AIA ester.

Os resultados indicam que estes mecanismos de conjugação da auxina livre, podem não operar em framboesas da mesma forma e com a mesma velocidade observada em bananas.

As menores concentrações de auxina livre foram encontradas nos frutos tratados com MJ durante todo período pós-colheita. Embora não haja indicações na literatura, os resultados levantam a possibilidade do MJ interferir com o metabolismo

de AIA em framboesas, reduzindo os níveis da forma livre do hormônio. Contudo, estudos mais focados nos mecanismos que regulam os níveis de auxina no fruto (síntese, conjugação e degradação) seriam necessários para corroborar tal hipótese.

Mesmo com os altos níveis de auxina livre encontrados nos frutos tratados com AIA, houve síntese de antocianinas neste grupo, apesar do ligeiro atraso observado na biossíntese de cianidina no 3º DPC (Figura 13). Em conjunto os resultados reforçam a hipótese de que a síntese de antocianinas em framboesas pode ser um processo dependente não apenas de um hormônio, mas sim um evento que envolve um “cross’talk” entre vários hormônios.

Em relação aos níveis de ácido abscísico (Figura 20), nos frutos tratados com este hormônio, ao final do período, a concentração foi 165 vezes maior que a detectada nos frutos do grupo controle (10.77 ng ABA/g massa fresca e 0.065 ng ABA/g massa fresca respectivamente).

Figura 20: Quantificação de ácido abscísico (ABA) livre em (*Rubus idaeus*) cv. Autumn Bliss para os tratamentos controle (CNTR), ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA) e metil-jasmonato (MJ) armazenados por 5 dias a 5°C. Os símbolos indicam a média e as barras verticais indicam o erro (n=3). a para $P < 0.05$, c para $P < 0.001$ em relação ao grupo Controle, m.f – massa fresca, DPC- dias pós-colheita.

No grupo tratado com ABA, apesar de algumas flutuações, observou-se uma tendência de aumento contínuo de seu conteúdo até o final do ensaio. Curiosamente, para os frutos tratados com auxina, o conteúdo de ABA foi superior ao encontrado nos frutos do grupo controle, sugerindo que o tratamento com AIA influencia algum ponto da via biossintética de ABA.

Ainda assim, mais estudos devem ser feitos para elucidar esta ligação entre estes dois hormônios, visto que a síntese de ABA é um processo de múltiplas etapas que são mediados por diferentes genes e enzimas, em cada estágio de desenvolvimento dos frutos, que também reagem em função de mudanças ambientais. Já foi mencionado que uma das enzimas envolvidas na biossíntese de ABA, a NCED (9-cis-epoxicarotenoid dioxigenase) é positivamente relacionada com o acúmulo deste hormônio (Soto *et al.*, 2013). Sua expressão aumenta com o decorrer do amadurecimento em frutos não climatéricos como uva e cereja. No entanto, foi observado que os efeitos de ABA são fortemente influenciados pelo estágio fisiológico no momento da aplicação do hormônio, podendo também ser catabolizado, através de esterificação, para ABA-glicosil ester e hidroxilação, que gera um intermediário instável (PIOTROWSKA & BAJGUZ, 2011).

Em polpa de morangos (*Fragaria x ananassa*) da cv. Albion, Ji *et al.*, (2012) observaram dois picos no conteúdo de ABA. O primeiro ocorre do estágio verde para o branco e o outro ocorre durante a mudança para o estágio de colheita, sendo este acúmulo de ABA acompanhado pelo aumento da expressão de *FaNCED2* neste mesmo período.

Em cereja 'Satohnishiki' a concentração de ABA atingiu seu máximo próximo a 35 dias após plena floração diminuindo seu conteúdo até a colheita, enquanto para uvas, a diminuição do conteúdo de ABA foi observada da maturação até a colheita (KONDO *et al.*, 2000). Tendo em conta tais precedentes, o comportamento dos frutos do grupo controle, no que se refere aos níveis de ABA, parece seguir o encontrado em uvas e cerejas.

O conteúdo de metil jasmonato (Figura 21) aumentou com o decorrer do período, especialmente para os frutos tratados com o hormônio. Nos demais grupos, houve um aumento entre a colheita e o 1 DPC, restando praticamente sem variações até o final do período de armazenamento.

Este aumento no conteúdo de metil jasmonato para todos os grupos no 1 DPC, pode ser decorrente de atividades comuns para todos os tratamentos, como o estresse gerado na colheita e o armazenamento refrigerado dos frutos. Visto que os jasmonatos são induzidos como resposta a diferentes tipos de estresse, ativando um eficiente sistema de resposta e acúmulo (PIOTROWSKA & BAJGUZ 2011; KOO *et al.*, 2009).

Destaca-se que os jasmonatos em geral têm diferentes efeitos para frutos de diferentes espécies, sendo este efeito diretamente dependente do estágio de maturação e da concentração aplicada. A atividade biológica é atribuída às formas livres dos jasmonatos. Assim como para outros hormônios vegetais, também existem processos para a homeostase hormonal, como a glicosilação e a conjugação com aminoácidos (PIOTROWSKA & BAJGUZ 2011).

Figura 21: Quantificação de metil-jasmonato em (*Rubus idaeus*) cv. Autumn Bliss para os tratamentos controle (CNTR), ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA) e metil-jasmonato (MJ) armazenados por 5 dias a 5°C. Os símbolos indicam a média e as barras verticais indicam o erro (n=3). c para $P < 0.001$ em relação ao grupo Controle, m.f – massa fresca, DPC- dias pós-colheita.

O aumento na expressão de lipoxigenase (LOX), induzido pelo MJ, pode resultar em uma resposta (*feedback*) positiva na biossíntese de ácido jasmônico. Foi relatada a diminuição da expressão de três genes de LOX durante o

amadurecimento de pêssegos, mas quando tratados com MJ, os mesmos foram estimulados.

Kondo *et al.*, (2000) revelaram uma associação entre o ácido jasmônico e metil jasmonato durante o desenvolvimento de maçãs e cerejas. As concentrações de ácido jasmônico e metil jasmonato são maiores nas sementes do que na polpa apresentando perfis semelhantes em ambos, sendo a concentração de metil jasmonato maior nos estádios iniciais de desenvolvimento, diminuindo até a colheita para ambos os frutos.

Em morangos 'Kent' imaturos, foram detectados elevado conteúdo de metil jasmonato que diminuiu constantemente com o decorrer do amadurecimento (GANSSE *et al.*, 1997).

Em estudos com folhas de tabaco tratados com MJ, 24 horas após o tratamento, apresentavam como principal produto o ácido jasmônico, podendo ser conjugado e armazenado ou convertido pela ação de uma carboxi-metil transferase (JMT) a MJ (PIOTROWSKA & BAJGUZ 2011; KOO *et al.*, 2009). Em estudos com tomate, YU *et al.*, (2009) hipotetizaram que após a aplicação de MJ, o mesmo pode ter sido convertido rapidamente em outros derivados de ácido jasmônico, o que pode ter contribuído para a elevação de seu conteúdo em frutos tratados. O que pode ter ocorrido nos frutos tratados com MJ neste trabalho.

4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

A avaliação da expressão relativa dos genes que codificam duas enzimas chave na biossíntese de antocianinas em diversos frutos, a antocianidina sintase (ANS), dihidroflavonol redutase (DFR) e o fator de transcrição MYB10 (Figura 22) tiveram como referência o dia em que os frutos foram colhidos e receberam os tratamentos. O fator MYB10 de *Rubus idaeus* está fortemente correlacionado a síntese de antocianinas, sendo um dos prováveis reguladores da transcrição da ANS e da DFR (Chen *et al.*, 2012).

Esta análise possibilitou avaliar as mudanças na transcrição dos genes que ocorrem durante o amadurecimento das framboesas na pós-colheita ou resultantes

dos tratamentos. Embora seja importante salientar que a avaliação de transcrição reflita mudanças na ativação de uma via metabólica, podem ocorrer outros tipos de regulação (por ex., pós transcricionais ou pós-traducionais) que podem influenciar a efetiva atividade enzimática.

Figura 22: Expressão Relativa de MYB (A), DFR Dihidroflavonol Redutase (B), ANS Antocianina Sintase (C), para framboesas *Autumn Bliss* tratadas com 100 μ M de ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) e metil-jasmonato (MJ) e Controle (CNTR), armazenados por 5 dias a 5°C. (continua...)

(continuação...) As barras verticais indicam a média e as barras verticais indicam o erro (n=3). a para $P < 0.05$, b para $P < 0.01$, c para $P < 0.001$ em relação ao grupo Controle DPC- dias pós-colheita.

No grupo controle, o transcrito de MYB10 (Figura 22 A) teve pico de síntese detectado em 2DPC, com declínio subsequente. O perfil foi bem correlacionado ao encontrado para os transcritos da DFR e ANS (Figura 22 B e C, respectivamente). Em conjunto, o perfil de transcrição dos três elementos foi bem correlacionado ao aumento na síntese de cianidina (Figura 18) e as mudanças de cor observada no grupo controle, representativo do comportamento normal das framboesas durante o amadurecimento.

Os resultados apontam um declínio na expressão relativa do fator de transcrição MYB10 (Figura 22 A), para os frutos tratados com AIA (apesar de ser significativo apenas em 2 DPC com $p < 0.001$). Para os frutos tratados com MJ, observou-se o estímulo na transcrição do MYB10, no 1 DPC, assim como nos frutos tratados com ABA. Para o grupo de framboesas tratadas com MJ, observou-se um declínio menos súbito do que o encontrado nos demais grupos.

Em relação ao perfil de transcrição da DFR (Figura 22 B), nos frutos do grupo controle, os níveis relativos de transcritos praticamente triplicaram no 2DPC. O grupo ABA apresentou os menores níveis de transcrição, em comparação ao grupo controle, aumentando apenas no 4º DPC. Para os frutos tratados com MJ, apenas no 2º DPC seus valores de destacaram, não diferindo do controle nos demais dias pós-colheita. Apesar de não ser estatisticamente diferente em relação ao controle do mesmo dia, houve uma mudança no perfil encontrado no grupo AIA, havendo um acréscimo para a expressão da DFR com o decorrer do período.

Os perfis de variação dos níveis de transcrição da ANS (Figura 22 C) nos frutos do grupo controle indicam o maior acúmulo em 2 DPC. Já os frutos tratados com AIA tiveram os menores valores em comparação com o grupo controle, em praticamente todo o amadurecimento, sugerindo a inibição do hormônio sobre a expressão deste gene. Em 1 DPC, os maiores valores foram encontrados nos grupos tratados com ABA e MJ. Estas variações na expressão de ANS, nos frutos CNTR e tratados com ABA e MJ, coincidem com o aumento encontrado nos níveis do fator de transcrição MYB, em cada respectivo grupo.

Para os frutos tratado com ABA, observa-se níveis maiores de cianidina que os demais grupos em 2 DPC. No entanto, esta concentração corresponde à mesma encontrada no grupo controle em 1DPC. Possivelmente, estes níveis de cianidina encontrados no grupo ABA sejam provenientes de um atraso da síntese. No entanto, apesar destas variações, o conteúdo de cianidina foi, na maior parte do tempo, o mesmo para todos, exceto pelo grupo MJ.

Os resultados apontam que MYB e ANS apresentam uma correlação temporal. Apresentando perfis muito semelhantes, especialmente nos grupos CNTR, ABA e MJ. Esta relação também foi observada por Chen *et al.*, (2012) durante o amadurecimento de framboesa negra, *Rubus* spp.

Já foi demonstrado em outros estudos que os genes MYB, juntamente com os genes R2R3, constituem uma família com 126 membros identificados em *Arabidopsis*, sua correlação com a regulação da biossíntese de antocianinas foi estabelecida em morangos, uvas e maçãs, especialmente quanto ao fator *MYB10* (WANG *et al.*, 2010; LAI *et al.*, 2010).

Devido aos perfis de transcrição da biossíntese de antocianinas, os genes são divididos em dois grupos: antecipados e tardios. Compõem os genes antecipados, CHS e CHI, que são necessários para a biossíntese de flavonas e flavonóis, enquanto os tardios incluem DFR e ANS, necessários para a biossíntese de antocianinas. Os genes tardios são transcritos nas fases finais do amadurecimento, estando relacionados à regulação por fatores R2R3-MYB (LAI *et al.*, 2010). Nossos resultados demonstraram esta correlação temporal entre MYB, ANS e DFR, apresentando perfil semelhante para o grupo controle, ocorrendo um aumento nos níveis de transcrição de 1 para 2 DPC .

As alterações observadas na expressão relativa de MYB, DFR e ANS (Figura 22) têm correlação com os níveis de antocianinas (cianidina – Figura 18) e seu precursor (quercitina - Figura 16). Importante lembrar que a DFR cataliza a conversão de dihidroflavonóis, como a quercitina, em leucocianidina, como a leucocianidina, precursor das antocianinas, que por meio da ação da ANS forma cianidina.

Os níveis de AIA endógeno encontrados no grupo tratado com este hormônio foram aproximadamente 200X maiores que no grupo controle, durante todo o

período avaliado. Embora tenha sido detectado atraso na biossíntese de antocianinas nos frutos tratados com AIA, ainda assim o hormônio não foi capaz de inibir a síntese de antocianinas. Curiosamente os níveis de expressão relativa de ANS e MYB apresentaram-se diminuídos em relação ao controle, nos frutos tratados com AIA. Os genes aqui estudados estão correlacionados a biossíntese de antocianinas, conforme os dados obtidos na literatura. Contudo, não é possível descartar que outros fatores de transcrição da família MYB, assim como genes codificadores de isoformas de DFR e ANS possam também estar relacionados à síntese de antocianinas em framboesas. Os resultados encontrados nos frutos tratados com AIA sugerem esta possibilidade.

Apesar de ABA não apresentar as maiores concentrações de antocianina durante todo o período, como já foi constatado em uvas e morangos (HE *et al.*, 2010; JIA *et al.*, 2011), foi observada a diminuição dos níveis de expressão relativa de DFR nos dois primeiros dias pós-colheita. Sabe-se que os diferentes isômeros de ABA, podem induzir diferentemente a expressão de genes e sua resposta fisiológica (GONZÁLEZ *et al.*, 2012). Em nosso estudo utilizamos o isômero 2-cis 4-trans ácido abscísico, o que pode ter influenciado esta diminuição dos níveis de expressão relativa de DFR. Aparentemente, para os frutos tratados com AIA e ABA não há uma correlação temporal entre os níveis de expressão relativa de MYB, ANS e DFR e as mudanças observadas nos níveis de antocianinas. Conforme citado acima, tais resultados podem ser indicativos da participação de outros fatores de transcrição e de outras isoformas de ANS e DFR na síntese de antocianinas em framboesas. Tais isoformas poderiam apresentar diferentes comportamentos frente à sinalização do AIA e do ABA. Assim, os genes estudados neste trabalho, apesar de serem afetados pelos hormônios, não seriam os únicos responsáveis pela biossíntese de antocianinas em *Rubus*, o que poderia explicar o fato da síntese dos pigmentos ter sido apenas parcialmente afetada.

Lin *et al.*, (2013) por meio do silenciamento da DFR em morangos, via RNAi mostraram que, em comparação aos frutos contendo apenas o vetor *Agrobacterium* pBI-121 (Figura 23-a1 e a2), frutos infiltrados com pBI-DFRi, apresentaram sua coloração reduzida (figura 23- b1 e b2)

Figura 23: Fenótipo de morangos contendo o vetor *Agrobacterium* pBI-121 (a1 e a2), e infiltrados com pBI-DFR_i, para o silenciamento de gene DFR, (b1 e b2). Adaptado de Lin *et al.*, (2013).

Nota-se que o silenciamento da DFR, não inibe totalmente a formação de pigmentos no morango. Foram identificados 2 picos na atividade da DFR, o primeiro relacionado com a biossíntese de flavan-3-óis e o segundo correspondendo a biossíntese de flavonóides e antocianinas. Diante destes resultados, os autores sugerem a existência de mais de uma forma da DFR, regulada por diferentes mecanismos.

Em análise proteômica de morangos (*Fragaria annanassa*) foram identificados duas formas antocianidina sintase (ANS), e duas dihidroflavonol redutase (DFR) (BIANCO *et al.*, 2009)

Chemler *et al.*, (2009) demonstraram que em algumas plantas, a DFR apresenta certa especificidade de substrato detectado, por exemplo, em extratos protéicos de flores de petúnia. Nestes não foram observadas reduções eficientes do campferol, o precursor da pelargonidina, o que explicaria a incapacidade desta espécie em acumular esta antocianina. No mesmo estudo, as DFRs de diversas espécies catalizaram a redução *in vitro* de quercitina e miricetina com eficiência similar.

Todas estas observações parecem corroborar a hipótese levantada neste trabalho da possibilidade de mais de uma isoforma de ANS e DFR serem atuantes na biossíntese de antocianinas em framboesas.

Apesar das alterações nos níveis da expressão relativa das enzimas avaliadas, para framboesas tratadas com MJ, o conteúdo de quercitina (precursor da antocianina) manteve seus níveis em todo o período, o que possivelmente tenha colaborado para o aumento do conteúdo de cianidina após o 4 DPC indicando o papel do MJ como um fator indutor, não apenas da síntese de antocianinas, mas também de outros flavonóides. Durante todo o período, os níveis de auxina livre encontrados para os frutos tratados com MJ, foram menores que o grupo controle. Uma vez que os resultados sugerem a auxina como um fator de inibição na biossíntese de antocianinas, suas baixas concentrações, proporcionadas pelo tratamento com MJ, podem ter contribuído para as maiores concentrações dos pigmentos durante o amadurecimento. Assim como os maiores níveis de etileno, encontrado a partir do 3 DPC, em frutos tratados com MJ. Salienta-se que os níveis de expressão relativa de ANS e DFR, apresentam-se maiores, nos dias pós-colheita 1 e 2, respectivamente, comparados ao controle, precedendo o aumento da concentração de cianidina aos 3 e 4 DPC.

5. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho acrescentaram informações importantes sobre a interrelação entre hormônios vegetais e a síntese de antocianinas e flavonóides em framboesas. Em maior ou menor grau, os hormônios estudados foram capazes de afetar um ou mais aspectos do metabolismo de pigmentos em framboesas corroborando a hipótese de que as vias associadas são influenciadas por múltiplos sinais hormonais.

Para os frutos tratados com AIA, foi possível observar que para framboesas os mecanismos de conjugação da auxina livre podem não atuar da mesma forma e com a mesma velocidade, conforme observado em outros frutos, como bananas. Houve uma diminuição no conteúdo de antocianinas, flavonóides e ácidos fenólicos, associadas a diminuição dos níveis de transcritos de ANS e MYB. Enquanto para frutos tratados com ABA, foi observada uma similaridade entre os perfis de ANS e MYB, havendo uma diminuição dos níveis de expressão relativos de DFR nos dois primeiros dias pós-colheita.

Aparentemente, para AIA e ABA não há uma correlação temporal entre os níveis de expressão relativa de MYB, ANS e DFR e os níveis de antocianinas, sugerindo a existência de genes codificadores para outros fatores de transcrição e de outras isoformas das enzimas relacionadas ao metabolismo de pigmentos em framboesas, diferencialmente responsivos aos hormônios em questão. Os precedentes da literatura reforçam esta conclusão.

Dentro das condições estabelecidas neste trabalho, o tratamento com MJ apresentou a maior relação com os níveis de antocianinas. O conteúdo de quercitina (precursor da antocianina) manteve seus níveis durante todo o período. O hormônio também foi capaz de estimular o aumento na transcrição de genes associados a via de sinalização e síntese de pigmentos nos frutos. Estas variações estão correlacionadas às maiores concentrações de cianidina ao final do período, sugerindo o MJ como um indutor não apenas do metabolismo de síntese de antocianinas, mas também de outros flavonóides. O mecanismo provável envolve o aumento na expressão do fator de transcrição MYB10, associado ao aumento na

expressão dos genes da antocianidina sintase (ANS) e dihidroflavonol redutase (DFR) nos primeiros dias pós-colheita.

ANEXO I

Figura 24: Fluxograma esquemático dos tratamentos realizados em framboesas *Autumn Bliss*. CNTR – controle; ABA – ácido abscísico; AIA – ácido indol-3-acético; ACC – ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano; MJ – metil-jasmonato.

ANEXO II

Figura 25: Esquema com o cronograma das análises realizadas para framboesas *Autumn Bliss* tratadas com 100µM de ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), e metil-jasmonato (MJ) e controle (CNTR), armazenados por 5 dias a 5°C.

Figura 26: Esquema com o cronograma das análises realizadas para framboesas *Autumn Bliss* tratadas com 100µM de ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) armazenados por 5 dias a 5°C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGATI, G. AZZARELLO, E. POLLASTRI, S. TATTINI, M. **Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance.** Plant Science vol.196 pg. 67– 76. 2012.

ALI, L, SVENSSON, B. ALSANIUS, B. W. OLSSON M. E. **Late season harvest and storage of Rubus berries - Major antioxidant and sugar levels.** Scientia Horticulturae. 129. 376–381p. 2011.

ANDERSEN, O. M.; JORDHEIM, M. **Anthocyanins** In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). 2010.

ANTTONEN, M. J. KARJALAINEN, R. O. **Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry.** Journal of Food Composition and Analysis v.18 p.759–769, 2005.

ANTUNES, L. E. C; RASSEIRA, M. C. B. **Aspectos Técnicos da Cultura da Amora-preta.** Embrapa, Documento 122, Pelotas, RS. 2004

BIANCO, L., LOPEZ, L., SCALONE, A.G, DI CARLI, M. DESIDERIO, A. BENVENUTO, E. PERROTTA, G. **Strawberry proteome characterization and its regulation during fruit ripening and in different genotypes.** Journal of proteomics v.72 pg.586 – 607. 2009

BOBINAITE R.; VIŠKELIS, P.; VENSKUTONIS, P. R.; **Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (Rubus spp.) cultivars.** Food Chemistry 132 1495–1501p. 2012.

BOWER J.H., BIASI, W.V. MITCHAM E.J. **Effects of ethylene and 1-MCP on the quality and storage life of strawberries.** Postharvest Biology and Technology 28 417_ 423p 2003.

BRADISH, C. M.; VEAZIE, P. P.; FERNANDEZ, G. E.; XIE, G.; JIA, W. **Comparison of Flavonoid Composition of Red Raspberries (Rubus idaeus L.) Grown in the Southern United States.** J. Agric.Food Chem. 60. 5779–5786p. 2012.

ÇEKIC, C, OZGEN, M. **Comparison of antioxidant capacity and phytochemical properties of wild and cultivated red raspberries (*Rubus idaeus* L.).** Journal of Food Composition and Analysis 23, 540–544p. 2010.

CHEMLER, J.A, LEONARD, E. KOFFAS, A.G. **Flavonoid Biotransformations in Microorganisms.** In: Anthocyanins – Biosynthesis, functions and applications. Pg 191-255. 2009.

CHEN,L. XIN, X. ZHANG, Z. YUAN, Q. **Phytochemical properties and antioxidant capacities of commercial raspberry varieties.** Journal of Functional Foods v.5 pg. 508–515. 2013

CORDENUNSI, B. R. NASCIMENTO, J. R. O. FILHO, R. A., PURGATTO, E. LAJOLO F. M. **Metabolismo de carboidratos no amadurecimento de frutos.** In: Tópicos de qualidade e pós-colheita de frutas. Campinas, 285p. 2008.

CORDENUNSI, B. R. GENOVESE, M. I. NASCIMENTO, O. J. R, HASSIMOTTO, N. M. A., SANTOS, R.J LAJOLO, F.M **Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars.** Food Chemistry 91 113–121p. 2005.

CORDENUNSI, B. R. NASCIMENTO, J. R. O. LAJOLO F. M. **Physico-chemical changes related to quality of five strawberry fruit cultivars during cool-storage.** Food Chemistry 83 167–173p. 2003.

DEROLES, S. **Anthocyanin Biosynthesis in Plant Cell Cultures: A potential source of natural colourants.** In: Anthocyanins – Biosynthesis, functions and applications. Pg 107-167. 2009.

DAVIES, P. J. **The plant hormones: their nature, occurrence, and functions.** In: **Plant Hormones: physiology, biochemistry and molecular biology.** Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 1995, v.2, p. 1-12.

FACHINELLO, J. C.; PASA, M. D.; SCHMITZ, J. D.; BETEMPS, D. L. **Situação e Perspectivas da Fruticultura de Clima Temperado no Brasil.** Rev. Bras. Frutic, Jaboticabal, SP. Vol. Especial, E 109-120, Outubro 2011.

FERNANDES V C., DOMINGUES V F., FREITAS V, MATOS, C D. MATEUS N. **Strawberries from integrated pest management and organic farming: Phenolic composition and antioxidant properties.** Food Chemistry v.134 pg.1926–1931 2012.

GAGNE', S. LACAMPAGNE, S. CLAISSE, O. GE'NY, L. **Leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase gene expression and activity in flowers, young berries and skins of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet-Sauvignon during development.** Plant Physiology and Biochemistry v.47 pg.282–290. 2009.

GIUSTI, M. M.; WALLACE, T. C. **Handbook of Natural Colorants**, Part IV: Application in Technical Use and Consumer Products, Chapter 16: Flavonoids as Natural Pigments 20p. 2009.

GIVEN, N. K. VENIS, M. A. GRIERSON, D. **Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit.** Planta 174: pg. 402-406 1988.

GONÇALVES E. D.; PIO, R; CAPRONI, C. M.; ZAMBON C. R; SILVA L. F. O; LVARENGA, A. A **Implantação, cultivo e pós-colheita de framboesa no Sul de Minas Gerais.** Circular Técnica n 145, ISSN 0103-4413, EPAMIG Sul de Minas. set. 2011.

GONZÁLEZ, A. S. OLEA, P. BORDEU, E. ALCALDE, J. A. GÉNY, L. **S-Absciscic acid, 2-chloroethylphosphonic acid and indole-3-acetic acid treatments modify grape (*Vitis vinifera* L. 'Cabernet Sauvignon') hormonal balance and wine quality.** Vitis. n.51 v.2, pg. 45–52 2012.

GRIESSE, M, HOFFMANN, T. BELLIDO, M. L. ROSATI, C. FINK, B. KURTZER, R. AHARONI, A. MUÑOZ-BLANCO J. SCHWAB. W. **Redirection of flavonoid biosynthesis through the down-regulation of an anthocyanidin glucosyltransferase in ripening strawberry fruit.** Plant Physiology, Vol. 146, pg. 1528–1539, April 2008.

GUO, J. HAN, W. WANG, M.H **Ultraviolet and environmental stresses involved in the induction and regulation of anthocyanin biosynthesis: A review.** African Journal of Biotechnology Vol. 7 (25), pp. 4966-4972, 29, 2008.

HE, F. MU, L. YAN, G-L., LIANG N-N, PAN, Q-H., WANG, J. REEVES M. J. DUAN C-Q **Biosynthesis of Anthocyanins and Their Regulation in Colored Grapes.** *Molecules* 15, 9057-9091p, 2010.

HAFFNER, K.; ROSENFELD H. J.; SKREDE, G.; WANG, L **Quality of red raspberry *Rubus idaeus* L. cultivars after storage in controlled and normal atmospheres.** *Postharvest Biology and Technology* 24, 279–289p. 2002.

HALLER, M. H ROSE, D. H HARDING, P. L. **Studies on the respiration of strawberry and raspberry fruits.** Circular 613, United States Department of agriculture. Washington, D.C. September, 1941.

HANCOCK, J. F., SONG, G-Q.; SINK K. C. **Berry Crops** Compendium of Transgenic Crop Plants: Transgenic Temperate Fruits and Nuts. Chapter 5: 40p. 2008.

JI, H.F, CHAI, Y. M, LI, C. L LU,D LUO,J.J QIN,L. SHEN, Y.Y. **Abscisic Acid Plays an Important Role in the Regulation of Strawberry Fruit Ripening.** *Plant Physiology*, Vol. 157, pg. 188–199. September, 2011.

KAFKAS E. KOSAR M. PAYDAS, S. KAFKAS S. K. H. C. BASSER **Quality characteristics of strawberry genotypes at different maturation stages.** *Food Chemistry* 100 1229–1236p. 2007.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**, 1 ed Rio de Janeiro, Guanabara, 2004.

KONDO, S. TOMIYAMA, A. **Changes of endogenous jasmonic acid and methyl jasmonate in apples and sweet cherries during fruit development.** *J. AMER. SOC. HORT. SCI.* v.125 n.3 pg 282–287. 2000.

KOO, A. J. K. HOWE, G. A. **The wound hormone jasmonate.** *Phytochemistry* v.70 pg.1571–1580. 2009.

KRÜGER, E. DIETRICH, H. SCHÖPPLEIN, E, RASIM, S, KÜRBEL, P. **Cultivar, storage conditions and ripening effects on physical and chemical qualities of red raspberry fruit.** Postharvest Biology and Technology 60, 31–37p. 2011.

KUMAR, A. ELLIS, B. E. **The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry. structure, expression, and evolution.** Plant Physiology, Vol. 127, pg. 230–239, September 2001.

LANDETE, J.M. **Review - Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health.** Food Research International v.44 pg.1150–1160. 2011.

LEE, J. DOSSETT M. FINN, C. E. **Rubus fruit phenolic research: The good, the bad, and the confusing.** Food Chemistry 130 pg. 785–796. 2012.

LIOTENBERG, S. NORTH, H. MARION-POLL, A **Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants.** Plant Physiol. Biochem. v. 37 n. 5, pg. 341–350. 1999.

MILIVOJEVIĆ, J. M., NIKOLIĆ, M. D. MAKSIMOVIĆ, J. J. D. RADIVOJEVIĆ D. D. **Generative and fruit quality characteristics of primocane fruiting red raspberry cultivars.** Turk J Agric For 35 289-296p. 2011.

MITCHAM E. J., CRISOSTO C.H., KADER A A. **Bushberries: Blackberry, Blueberry, Cranberry, Raspberry: Recommendations for Maintaining Postharvest Quality.** Department of Plant Sciences, University of California, Davis, CA 95616 Disponível em:
<http://postharvest.ucdavis.edu/PFfruits/Bushberries/> Acessado em: 08 jun.12.

MONTOYA, O, A. VAILLANT, F., COZZANO, S. MERTZ, C. PÉREZ, A. M, CASTRO, M. V. **Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) during three edible maturity stages.** Food Chemistry, v.119. p.1497–1501, 2010.

MORENO, F. P; MONAGAS, M.; BLANCH, G. P. BARTOLOMÉ, B. CASTILLO, M. L. R. **Enhancement of anthocyanins and selected aroma compounds in strawberry fruits through methyl jasmonate vapor treatment.** *Eur Food Res Technol* 230: 989–999 p. 2010.

MORENO, F. P, BLANCH, G. P. Flores, G. CASTILLO, M. L. R. **Impact of postharvestmethyl jasmonate treatment on the volatile composition and flavonol content of strawberries** *J Sci Food Agric*; **90**: 989–994p. 2010.

MORENO, F. P BLANCH, G. P. FLORES, G. CASTILLO, A. L. R. **Impact of postharvestmethyl jasmonate treatment on the volatile composition and flavonol content of strawberries.** *J Sci Food Agric*; **90**: 989–994p.2010.

MUKKUN, L, SINGH, Z. **Methyl jasmonate plays a role in fruit ripening of ‘Pajaro’ strawberry through stimulation of ethylene biosynthesis.** *Scientia Horticulturae* 123 5–10p. 2009.

MULLEN, W, YOKOTA,T, LEAN,M. E.J. CROZIER, A. **Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC–MSn.** *Phytochemistry*, v. 64 617–624, 2003.

NITSCH, J.P. **Free auxins and free tryptophane in the strawberry.** *Plant Physiol.* **30**: 33-39, 1955.

NUNES, M.CN. Raspberry; Strawberry In: **Color Atlas of Postharvest Quality of Fruits and Vegetables.** Ed.1st edition. John Wiley & Sons, Inc, 2008. 448 pp.

PAGOT, E.; **Situação e Perspectivas da produção de Pequenas Frutas: Cenário da Produção de Pequenas Frutas;** V Simpósio do Morango e IV Encontro sobre PequenasFrutas e Frutas Nativas no Mercosul. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2010. 219 p.

PECH, J. C. LATCHÉ, A. BOUZAYEN, M. **Ethylene Biosynthesis.** In: *PlantHormones: physiology, biochemistry and molecular biology.* Amsterdam: KluwerAcademic Publishers, 1995, v.2, p. 1-12.

PERKINS-VEAZIE P.M., HUBER, D.J. BRECHT J.K. **Characterization of ethylene production in developing strawberry fruit.** Plant Growth Regulation 17: 33-39, 1995.

PETRONI, K., TONELLI, C. **Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs.** Plant Science 181 219–229p. 2011.

PILJAC-ŽEGARAC J., ŠAMEC, D. **Antioxidant stability of small fruits in postharvest storage at room and refrigerator temperatures.** Food Research International 44 345–350p. 2011.

PINTO, M. S, LAJOLO F. M GENOVESE, M. I. **Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (Fragaria x ananassa Duch.)** Food Chemistry 107 1629–1635p. 2008.

PIO, R. **Como cultivar framboesas;** Jornal Toda Fruta. Disponível em: <http://www.todafruta.com.br/portal/icNoticiaAberta.asp?idNoticia=16165> acessado em 10 de junho de 2011.

PIOTROWSKA, A. BAJGUZ, A. **Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates – Review.** Phytochemistry v.72 pg. 2097–2112. 2011.

RASMUSSEN, S. **Biosynthesis and manipulation of flavonoids in forage legumes.** In: Anthocyanins – Biosynthesis, functions and applications. Pg 257-281. 2009.

ROHWER C. L. ERWIN J. E. **Horticultural applications of jasmonates: A review** Journal of Horticultural Science & Biotechnology 83 (3) 283–304p. 2008.

SOTO, A., RUIZ, K. B. RAVAGLIA, D. COSTA, G. TORRIGIANI, P. **ABA may promote or delay peach fruit ripening through modulation of ripening- and hormone-related gene expression depending on the developmental stage.** Plant Physiology and Biochemistry v.64 pg.11-24. 2013.

SOTO, A. RUIZ, K. B. ZIOSI, V. COSTA, G. TORRIGIANI, P. **Ethylene and auxin biosynthesis and signaling are impaired by methyl jasmonate leading to a transient slowing down of ripening in peach fruit.** *Journal of Plant Physiology* v.169 pg.1858– 1865. 2012.

SOUZA, M. B; et al.; **FRAMBOESA – Qualidade Pós-Colheita.** *Agro* 556. Nº 6 2007. 35p.

STRIK, B. C. **Berry crops: Worldwide area and production systems;** *Berry fruit: Value-added products for health promotion; Chapter 1:* 2007, 48p.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. *J. Sci. Food Agric.* 10, 63-68, 1959.

TAIS, L; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal** [Plant physiology], 3 ed Porto Alegre: Artmed Editora, 2004, 720p

TALCOTT, S.T. **Chemical components of Berry Fruits;** *Berry fruit: Value-added products for health promotion. Chapter 2:* 2007, 22p.

TANAKA, Y. SASAKI N, OHMIYA, A **Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids.** *Plant J.* 54: 733–749, 2008.

TIAN, M.S. PRAKASH, S. ELGAR, H.J. YOUNG, H. BURMEISTER D.M. ROSS G.S. **Responses of strawberry fruit to 1-Methylcyclopropene (1-MCP) and ethylene.** *PLANT GROWTH REGULATION* Vol. 32, 83-90p, 2000.

VILLARREAL, N.M., BUSTAMANTE, C.A., CIVELLO, P.M., MARTINEZ, G.A. **Effect of ethylene and 1-MCP treatments on strawberry fruit ripening.** *J. Sci. Food Agric.* 90: 683- 689, 2010.

WANG, C. Y. **Maintaining postharvest quality of raspberries with natural volatile compounds.** *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 869–875p, 2003.

WANG, K. L. BOLITHO, L., GRAFTON, K. KORTSTEE, A, KARUNAIRETNAM, S. MCGHIE, T.K. ESPLEY, V. R., HELLENS, R.G., ALLAN, A.C., **An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae.** BMC Plant Biology, 2010.

WANG, L. JIANG, Y. YUAN. L. LU, W. YANG, L. KARIM, A. LUO, A. **Isolation and characterization of cdnas encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase from *Populus trichocarpa*.** Plos One,v.8 May 2013.

WANG, S Y, BOWMAN, L. DING, M. **Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp.) and promotes antiproliferation of human cancer cells.** Food Chemistry 107, 1261–1269p. 2008.

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

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.