

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

11201200
Filder

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA DOS ALIMENTOS
ÁREA DE BROMATOLOGIA

**Metabolismo do ácido ascórbico durante o
desenvolvimento e amadurecimento da manga (*Mangifera
indica* L. var. Keitt) e amadurecimento da goiaba branca
(*Psidium guajava* L. var. Paloma)**

MARIA LUIZA PASSANEZI ARAÚJO GOMEZ

**Tese para a obtenção do grau de
DOUTOR**

**Orientador:
Prof. Tit. Dr. Franco Maria Lajolo**

São Paulo
2003

17412

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005125

Ficha Catalográfica

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

Gomez, Maria Luiza Passanezi Araújo
G633m Metabolismo do ácido ascórbico durante o desenvolvimento
e amadurecimento da manga (*Mangifera indica* L. var. Keitt) e
amadurecimento da goiaba branca (*Psidium guajava* var. Paloma) /
Maria Luiza Passanezi Araújo Gomez. -- São Paulo, 2003.
102p.

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

Orientador: Lajolo, Franco Maria

1. Bromatologia 2. Bioquímica dos alimentos 3. Frutas :
Pós colheita : Tecnologia de alimentos 4. Vitamina C : Ciência
dos alimentos I. T. II. Lajolo, Franco Maria, orientador.

641 CDD

MARIA LUIZA PASSANEZI ARAÚJO GOMEZ

Metabolismo do ácido ascórbico durante o desenvolvimento e amadurecimento da manga (*Mangifera indica* L. var. Keitt) e amadurecimento da goiaba branca (*Psidium guajava* var. Paloma)

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Prof. Titular Franco M. Lajolo

Prof. Dr. Carlos Henrique de Mesquita
1º Examinador

Profa. Dra. Ana Carolina M. Arisi
2º Examinador

Prof. Dra. Beatriz R. Cordenunsi
3º Examinador

Prof. Dr. João Roberto O. do Nascimento
4º Examinador

Prof. Dr. Marcos S. Buckeridge
1º Suplente

Profa. Dra. Marilene DeVuono C. Penteado
2º Suplente

SÃO PAULO, 20 DE MARÇO DE 2003.

AGRADECIMENTOS

Gostaria inicialmente de agradecer a Deus, pela vida e pela oportunidade renovada de aperfeiçoamento.

Aos meus pais, por me darem o suporte necessário, intelectual, material e emocional, para que este trabalho pudesse ser realizado.

Às minhas irmãs, Kiki e Titi, que tanto torceram e incentivaram. A toda a minha família, Vô Octávio, Márcio, e todos que me incentivaram, apoiaram e valorizaram.

Ao meu marido, João Manoel, pela compreensão e respeito às minhas decisões.

À minha sogra, Vitória e ao meu sogro, Jesus (in memoriam) pelo apoio e incentivo,

Ao meu filho Arthur, por suportar, à sua forma, minha ausência, e pelo seu amor incondicional, que renova diariamente minhas forças para a luta.

À minha amiga Karina, por compreender minhas mancadas e furos nos finais de semana, e ainda assim continuar minha amiga...

Ao Prof. Tit. Franco Maria Lajolo, que não só me deu o peixe, como principalmente me ensinou a pescar. Pela confiança, apoio, e exemplo de magnitude.

À Profa. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi, que mais que amiga, me trouxe e me manteve no meio científico, me apresentou o que eu descobri ser o que eu mais amo fazer, e que sempre está presente, para auxiliar, apontar, ouvir, aconselhar...

Ao Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento, pelo empréstimo da sonda de cDNA, pela ajuda incondicional, pela possibilidade de trabalho, pelos conselhos e pela amizade.

À Profa. Dra. Maria Inés Genovese, pela alegria e entusiasmo contagiante, por me auxiliar tanto nas tarefas acadêmicas quanto nas pessoais, pela amizade e exemplo.

Ao Prof. Dr. Eduardo Purgatto, eterno Verdinho, não tenho nem palavras para agradecer seu apoio, sua ajuda e sua amizade...

Às Profas. Elizabeth, Tullia, Marilene, Bernadete e demais Professores do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, que em algum momento me auxiliaram, sendo por meio de uma aula, de uma explicação, de uma opinião sobre o meu trabalho, ou pelo empréstimo de algum equipamento.

Aos amigos queridos, que tornam o fardo mais leve, pela grande e forte amizade:

Adair, a quem devo grande parte deste trabalho. Pela prontidão em ajudar, explicar, refazer, montar e desmontar, instalar, e além de tudo, pela amizade.

Alberto, pela ajuda em diversos momentos.

Adriana, Drik's, que em tão pouco tempo se tornou uma querida.

Ana Cris, pelo revezamento no HPLC (conversando a gente se entende), pela amizade tão sincera.

Ana Paula, amiga, pelo exemplo de dedicação ao trabalho e à família, e pelo "empréstimo" das amostras de manga.

Anderson, pela ajuda, pela companhia e pelas dicas sobre o trabalho.

Eliana, pelas conversas tão descontraídas.

Giselli, por todas as correções da língua inglesa.

Guillermo, pelo incentivo e conselhos em momentos difíceis.

Janaína, pelo carinho e pela amizade.

Jacqueline, pelo exemplo de força, dedicação, alegria, vida, pelas conversas, almoços, lanches e conselhos...

Lúcia, pelas tantas elucubrações, pela ajuda em tantos momentos, pela amizade tão sólida, pelo exemplo de força de vontade, de luta, de amor à vida. Por todos os conselhos e lenços.

Marisa, pelo exemplo de batalha, alegria, força, amizade.

Márcia, por fornecer condições de trabalho, e pelos almoços tão divertidos, pela conversa leve e descontraída...

Marcinha (estagiária) sempre tão querida.

Maurício, que em tão pouco tempo se tornou uma pessoa a quem eu devo agradecer demais.

Neuza, pelas discussões tão proveitosas, pelas conversas e risadas.

Paola, pela amizade e companhia nas noites, finais de semana e feriados.

Renata e Priscila, pelas discussões e pela amizade a longa distância.

Ricardo, por todos os biscoitos de morango ou doce de leite, que me deram mais energia para continuar o trabalho!

Rose, pela amizade e carinho, e exemplo de perseverança e fé, e pelo empréstimo da coluna de HPLC.

Stella, pela irreverência e alegria.

Tânia, pela companhia nas noites de trabalho afora...

Aos demais colegas que iniciam suas jornadas, a todos perseverança e trabalho.

A Ana Vlândia, Rogério, Renato, Thomas, Fabiana, Jonas e todos os demais colegas do departamento que fazem do bloco 14 um local de fácil vivência.

À Profa. Dra. Sílvia Berlanga e à técnica Clarissa, do Depto. Análises Clínicas e Toxicológicas, pelo empréstimo do analisador de cintilação líquida.

Ao Prof. Gioielli, pelo empréstimo do analisador de textura.

Ao Prof. Carlos Henrique Mesquita, pela ajuda e pelas idéias sobre infiltração de compostos radioativos.

Ao pessoal da Secretaria do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Mônica, Catarina e Tânia, a Isabel e Ângela, que sempre prontas para auxiliar.

Ao pessoal da Secretaria de Pós-Graduação, Jorge, Elaine e Benê, pela ajuda e carinho.

Às queridas Joana e Lurdinha, pelas boas condições do ambiente de trabalho, além do cafezinho sempre necessário.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

E a todos que, de alguma forma, fizeram parte deste trabalho, muito obrigada.

Dedico este trabalho ao meu pai,
Antônio e à minha mãe, Amélia
pela realização de um sonho.

E ao meu filho Arthur, pelo presente e futuro.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO ASCÓRBICO E SEUS DERIVADOS.....	4
2.2. FUNÇÕES NOS VEGETAIS.....	6
2.3. METABOLISMO DO ÁCIDO ASCÓRBICO EM VEGETAIS.....	8
2.4. VARIAÇÃO DO CONTEÚDO DE ÁCIDO ASCÓRBICO NOS VEGETAIS	15
2.5. RELAÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO COM MECANISMOS DE AMADURECIMENTO E SENESCÊNCIA.....	17
2.6. EFEITOS DO ARMAZENAMENTO NO CONTEÚDO DE ÁCIDO ASCÓRBICO	22
2.6.1. <i>Efeitos do armazenamento sob refrigeração</i>	22
2.6.2. <i>Efeito do Uso de Atmosferas Controladas</i>	23
2.7. REAÇÕES ENZIMÁTICAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DO ÁCIDO ASCÓRBICO.....	25
2.7.1. <i>Reação de Síntese: Papel da L-Galactono-1,4-Lactona Desidrogenase</i> ..	25
2.7.2. <i>Degradação do Ácido Ascórbico: atividade das enzimas Ascorbato Oxidase e Ascorbato Peroxidase</i>	27
2.7.3. <i>Regeneração do Ácido Ascórbico: ação das enzimas Monodesidroascorbato Redutase (MDHAR) e Desidroascorbato redutase (DHAR)</i>	32
3. OBJETIVOS	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. MATERIAIS.	37
4.2. ANÁLISE DE TEXTURA.	38
4.3. ANÁLISE DA RESPIRAÇÃO E PRODUÇÃO DE ETILENO.....	38
4.4. INFILTRAÇÃO COM L-[1- ¹⁴ C]-GALACTOSE NA GOIABA BRANCA E MANGA KEITT.....	38
4.5. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.	39
4.5.1. <i>Extração da AO, APX, MDHAR e DHAR</i>	39
4.5.2. <i>Extração da GLDHase</i>	39
4.6. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.	40
4.7. ANÁLISE DE ÁCIDOS ASCÓRBICO E DESIDROASCÓRBICO.....	42
4.8. ANÁLISE DE ÁCIDO OXÁLICO.	42
4.9. EXTRAÇÃO DO RNA E NORTHERN BLOTTING.	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1. PARTE I: ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE MANGA VAR. KEITT E GOIABA BRANCA VAR. PALOMA.....	45
5.1.1. <i>Evolução nos Teores de Ácidos Ascórbico e Desidroascórbico e Correlação com a Atividade das Enzimas Envolvidas na sua Síntese, Degradação e Regeneração.</i>	45
5.2. PARTE II: COMPORTAMENTO DO SISTEMA METABÓLICO DO ÁCIDO ASCÓRBICO NA GOIABA BRANCA, SUBMETIDA À REFRIGERAÇÃO.....	57

5.2.1. <i>Parâmetros fisiológicos: Influência da Temperatura na Respiração e Produção de Etileno, e nas Modificações de Textura da Goiaba</i>	58
5.2.2. <i>Evolução dos Teores de Ácidos Ascórbico e Desidroascórbico e Correlação com as Atividades das Enzimas Relacionadas ao seu Metabolismo</i>	61
5.3. PARTE III: INFILTRAÇÃO DAS FATIAS DE GOIABA BRANCA E MANGA KEITT COM L-[1- ¹⁴ C]-GALACTOSE: QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS ASCÓRBICO, DESIDROASCÓRBICO E OXÁLICO FORMADOS..	71
5.3.1. <i>Goiaba Branca</i>	71
5.3.2. <i>Manga Keitt</i>	75
5.4. PARTE IV: NORTHERN BLOTTING: L-GALACTONO-1,4-LACTONA DESIDROGENASE	77
5.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
6. CONCLUSÕES	82
7. BIBLIOGRAFIA	83
8. RESUMO	99
9. ABSTRACT	101

LISTA DAS FIGURAS

Figura 1.	Estrutura tridimensional do ácido ascórbico.....	5
Figura 2.	Esquema da reação de degradação do ácido ascórbico a ácido dicetogúônico com formação do monoânion intermediário monodesidroascorbato.....	5
Figura 3.	Esquema do ciclo celular eucariótico.....	7
Figura 4.	Esquema simplificado das reações necessárias para a conversão da D-glicose em ácido ascórbico.....	9
Figura 5.	Via de síntese do ascorbato apresentada por Loewus (1956) utilizando as ozonas como precursoras do ácido ascórbico.....	9
Figura 6.	Via de síntese do ascorbato pelo mecanismo de inversão das cadeias carbônicas.....	10
Figura 7.	Via Smirnoff-Wheeler de biossíntese do ácido ascórbico...	12
Figura 8.	Esquema demonstrando a hidrólise da molécula de ácido ascórbico produzindo ácidos tartárico e oxálico.....	15
Figura 9.	Conteúdos de AA e ADHA e atividades das enzimas de síntese (GLDHase), degradação (AO e APX) e regeneração (MDHAR e DHAR) durante o desenvolvimento e amadurecimento da manga e amadurecimento da goiaba branca.....	47
Figura 10.	Ilustração da influência das atividades das enzimas que compõem os sistemas de síntese, regeneração e degradação do ácido ascórbico.....	57
Figura 11.	Perfis de respiração e produção de etileno durante o armazenamento de goiabas brancas sob diferentes temperaturas.....	59
Figura 12.	Variação da firmeza da goiaba branca durante o armazenamento sob diferentes temperaturas.....	60
Figura 13.	Variação dos conteúdos de AA e ADHA e atividades das enzimas de síntese (GLDHase), degradação (AO e APX) e regeneração (MDHAR e DHAR) durante o armazenamento da goiaba branca sob diferentes temperaturas.....	62
Figura 14.	Variação do conteúdo de ácido oxálico durante o amadurecimento da goiaba branca submetida a diferentes temperaturas de armazenamento.....	65
Figura 15.	Variação nos conteúdos de ácido ascórbico (AA), ácido desidroascórbico (ADHA) e ácido oxálico (AOx) em fatias de goiaba branca nos estádios verde e madura do amadurecimento, após infiltração com água ou L-[1- ¹⁴ C]-galactose no ponto inicial (controle), após total infiltração (tempo zero) e após 2 horas de período metabólico.....	72

- Figura 16.** Conteúdo de AA, ADHA e AOx em fatias de goiaba de polpa branca nos estádios verde e maduro do amadurecimento, após 2 horas de incubação à temperatura ambiente..... 73
- Figura 17.** Variação no conteúdo de ácido ascórbico, ácido desidroascórbico e ácido oxálico em fatias de manga Keitt infiltradas com água ou L-[1-¹⁴C]-galactose, no ponto inicial (controle), após total infiltração (tempo zero) e após 2 horas de período metabólico..... 76
- Figura 18.** Northern blot do RNA total da manga Keitt em diferentes estádios do amadurecimento e de um dos pontos do amadurecimento da goiaba branca, submetidos à hibridização com sonda de L-galactono-1,4-lactona desidrogenase marcadas com α -[³²P]-dCTP. 78

LISTA DAS TABELAS

Tabela 1. Conteúdo de vitamina C (ácido ascórbico, desidroascórbico e total) em diferentes espécies e cultivares de frutas e vegetais, durante diferentes tempos de armazenamento e/ou amadurecimento.....	19
Tabela 2. Porcentagem de conversão da L-[1- ¹⁴ C]-galactose em ácido ascórbico, ácido desidroascórbico e ácido oxálico nas amostras de goiaba branca nos estádios verde e maduro do amadurecimento.....	75
Tabela 3. Contagem por minuto das frações correspondentes aos ácidos ascórbico e desidroascórbico das amostras de manga Keitt infiltradas com galactose marcada.....	77

LISTA DAS ABREVIATURAS

$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	Citosina-trifosfato marcada com ^{32}P
AA	Ácido Ascórbico
ADHA	Ácido Desidroascórbico
ADKG	Ácido 2,3-dicetogulônico
AO	Ascorbato Oxidase
AOx	Ácido Oxálico
APX	Ascorbato Peroxidase
α - ^{32}P -dCTP	Citosina trifosfato marcada com ^{32}P
kDa	quilodaltons
cDNA	Ácido nucléico complementar
DHAR	Desidroascorbato Redutase
DPA	Dias após a antese
DPAr	Dias após o armazenamento
DPC	Dias após a colheita
DTT	ditiotreitól
EAM	Embalagens com atmosfera modificada
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GSSG	Glutathiona oxidada
GSH	Glutathiona reduzida
GLDHase	L-galactono-1,4-lactona desidrogenase
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietyl)-piperazina-N'-(2-etanosulfúrico)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
MDHA	Ácido monodesidroascórbico
MDHAR	Monodesidroascorbato Redutase
NADH	Diidroxinicotinamida-adenina-1,4-dinucleotídeo
PVP	Polivinilpirrolidona
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
TRIS	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o interesse em pesquisas nutricionais apresentou um aumento considerável. A constatação da presença de diversos compostos antioxidantes e nutrientes essenciais em vegetais levou a recomendações no sentido de maior consumo de frutas e verduras, visando uma melhoria na saúde pública. Um exemplo é o ácido ascórbico (AA, vitamina C), que é fornecido em mais de 90% da quantidade diária recomendada para a dieta humana, através destes alimentos, uma vez que não é sintetizada no organismo humano devido à ausência da enzima L-gulono-lactona oxidase (SMIRNOFF *et al.*, 2001; YAHIA *et al.* 2001; LEE & KADER, 2000; PALLANKA & SMIRNOFF, 2000; GIOVANELLI *et al.*, 1999; FAVELL, 1998; WHEELER *et al.*, 1998; WRIGHT & KADER, 1997; SMIRNOFF, 1996; WATADA, 1987; BAUERNFEIND, 1978).

A importância que vem sendo dada ao estudo do ácido ascórbico relaciona-se à sua participação em diversas reações dos organismos humano e vegetal. As principais funções no organismo humano são devidas, preferencialmente, à sua capacidade de oxi-redução, e incluem prevenção ao escorbuto, biossíntese de aminoácidos, participação na formação do tecido conjuntivo e de hormônios, função estimulante dos mecanismos de defesa do organismo e formação dos anticorpos, transporte de íons ferro pelas proteínas plasmáticas, e prevenção na formação de radicais livres (YAHIA *et al.*, 2001, BAUERNFEIND, 1978). Nos vegetais, a vitamina C é o antioxidante hidrossolúvel mais abundante, e suas funções fisiológicas são baseadas em três propriedades principais: antioxidante, cofator enzimático e precursor da síntese de oxalato e tartarato. O ácido ascórbico exerce papéis fundamentais nos processos de fotossíntese, fotoproteção, crescimento da parede celular, resistência a estresses ambientais, e na síntese de etileno, giberelinas, antocianinas, hidroxiprolina e hidroxilisina (SMIRNOFF, 2000, SMIRNOFF & WHEELER, 2000, FRY, 1997, AWAD, 1993).

Na síntese do AA, seus precursores imediatos são, geralmente, outros ácidos orgânicos ou açúcares, e o metabolismo destes compostos está

ligado à oxidação e descarboxilação respiratórias, oferecendo energia para a síntese de outros compostos necessários, como nucleotídeos e pigmentos, entre outros (SEYMOUR, TUCKER & TAYLOR, 1996).

O estudo dos mecanismos de biossíntese e degradação da vitamina C em vegetais, entretanto, é uma preocupação recente, e somente no final da década de '90 pôde-se propor, com fundamento experimental, uma via de biossíntese efetiva. Tais estudos foram amplamente auxiliados pelas técnicas de biologia molecular, que permitem a seleção de modelos vegetais mutantes para verificar um comportamento metabólico originado por falta ou excesso de um composto específico. Este foi o caso do estudo da via de biossíntese do ácido ascórbico utilizando como modelo uma variedade mutante da planta *Arabidopsis (vtc-1)*, que apresenta alta sensibilidade ao ozônio, e possui apenas 30% da quantidade de ácido ascórbico presente na variedade selvagem (CONKLIN *et al.*, 1998). A descoberta deste mutante e das alterações em relação à variedade selvagem permitiu a proposição das vias de biossíntese atualmente mais aceitas e a elucidação parcial de alguns mecanismos de controle da quantidade de AA nos vegetais (SMIRNOFF *et al.*, 2001). O mecanismo de controle durante o crescimento, desenvolvimento, amadurecimento e senescência de vegetais, é em grande parte uma incógnita, mas sabe-se que há diferenças em relação à sua maior ou menor utilização em reações específicas, como detoxificação, ou utilização como cofator enzimático, por exemplo.

Durante o crescimento, a quantidade de AA é geralmente pequena, uma vez que a relação entre as formas reduzida e oxidada participa na regulação do ciclo celular, estimulando ou inibindo os processos de divisão e crescimento (KATO & ESAKA, 1999). Após esta fase, o conteúdo de AA deve ser suficiente para garantir a proteção dos tecidos contra os radicais livres formados durante a fotossíntese ou pela ação do meio ambiente. Em frutos, até pouco tempo considerava-se que o conteúdo de AA diminuía durante o amadurecimento pós-colheita, devido à ação da enzima de degradação ascorbato oxidase (EC 1.10.3.3 - AO) ou devido à sua utilização como substrato respiratório (TUCKER, 1996). Estudos envolvendo diferentes

espécies de frutos demonstraram, entretanto, que a quantidade de vitamina C pode permanecer estável ou mesmo aumentar durante o período do amadurecimento, dependendo de fatores intrínsecos e extrínsecos dos vegetais, dentre os quais a espécie, que parece ser fator preponderante. As atividades enzimáticas que participam deste metabolismo também sofrem grande influência destes fatores, modificando suas relações e ocasionando as mudanças nos conteúdos de AA. São fortes os indícios, entretanto, de que a atividade da AO esteja mais relacionada ao processo de crescimento celular do que ao controle da quantidade de AA durante o amadurecimento pós-colheita de frutos.

Desta forma, é importante o conhecimento dos mecanismos de controle (síntese e degradação) do ácido ascórbico, visando tanto a manipulação genética para a obtenção de produtos transgênicos, quanto a capacidade de proteção oferecida a outros compostos antioxidantes, tais como antocianinas ou compostos fenólicos. É importante também na idealização de métodos de armazenamento e processamento de frutos e vegetais, que possam garantir maiores níveis de AA, seja por uma síntese estimulada, ou por uma degradação diminuída.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO ASCÓRBICO E SEUS DERIVADOS

O ácido ascórbico (ácido L-ascórbico, vitamina C, ácido hexaurônico, ácido L-xiloascórbico) é, quimicamente, uma lactona (treo-hexa-2-enono-1,4-lactona, ou lactona do ácido 1-treo-3-cetoexurônico), aparecendo geralmente na conformação L- (KANNELIS, 1998; BAUERNFEIND, 1978). Nos vegetais, é encontrado na forma reduzida (ácido ascórbico- AA, figura 1) ou na forma oxidada reversível (ácido desidroascórbico- ADHA), ambos apresentando atividade vitamínica C em todos os tecidos vivos (BAUERNFEIND, 1978). O produto imediato da oxidação do ácido ascórbico é o ADHA, formado pela ação das enzimas ascorbato oxidase (AO) e ascorbato peroxidase (APX), ou pela presença de metais, radicais livres ou oxigênio. O ADHA é um composto altamente instável em pH alcalino, podendo ser rapidamente hidrolisado a ácido 2,3-dicetogulônico (ADKG), com a perda do anel lactônico e da atividade antiescorbútica (DEUTSCH, 2000; 1998). Um esquema da provável reação de hidrólise do AA a ADKG pode ser vista na figura 2. Atualmente, estudos da reação de hidrólise do ADHA a ADKG revelaram que esta reação não é completamente irreversível, como proposto, tendo sido demonstrada *in vitro* a capacidade de o ácido iodídrico e alguns compostos tióis reduzirem o ADKG a ADHA. Entretanto, em condições fisiológicas, não foram detectadas reduções deste tipo (DEUTSCH, 2000). Sob condições altamente oxidativas, o ADKG é rapidamente degradado a compostos com 4 e 5 carbonos, seguindo uma seqüência de descarboxilações até a formação de treonatos, xilonatos, lixose e xilose. O AA apresenta grande suscetibilidade de oxidação frente à umidade, calor e presença de álcalis, cobre ou ferro em solução (DEUTSCH, 2000).

As propriedades redutoras do ascorbato são resultado do grupamento enediol reativo nos carbonos 2 e 3; as propriedades ácidas são devidas à

ionização do grupamento hidroxila no carbono 3. Durante a oxidação, há a formação de um radical monodesidroascorbato (MDHA), que se desproporciona em ascorbato e ADHA, caso não seja rapidamente reduzido (Fig. 2). A formação deste radical é essencial para a atividade antioxidante do ascorbato (SMIRNOFF *et al.*, 2001).

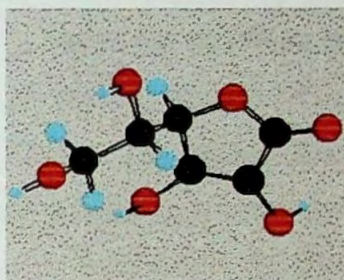


Figura 1. Estrutura tridimensional do ácido ascórbico, mostrando o anel lactônico.

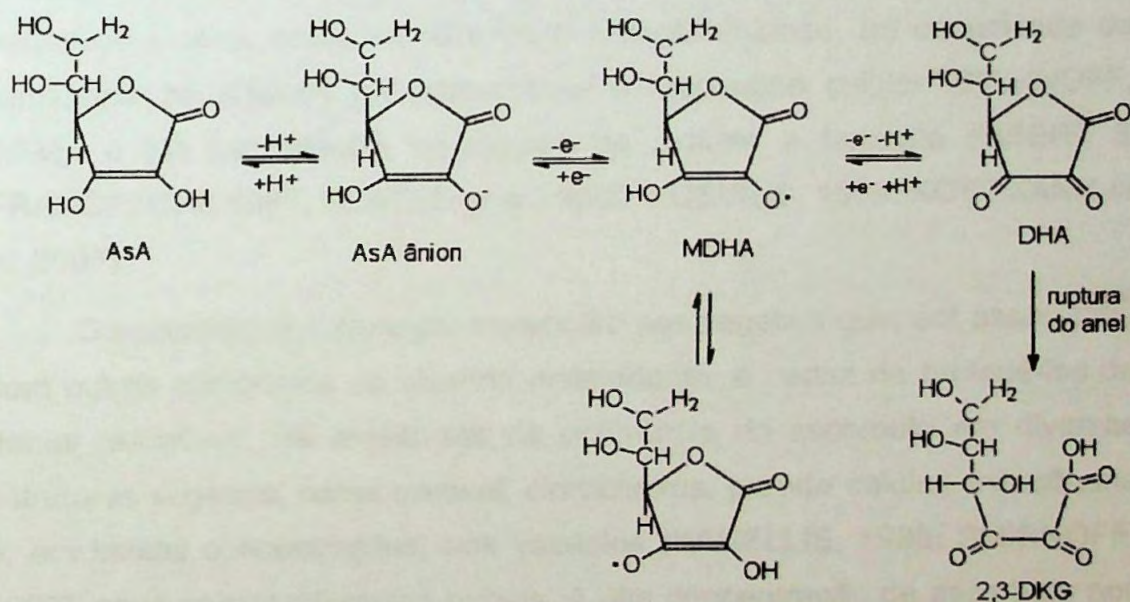


Figura 2. Esquema da reação de degradação do ácido ascórbico a ácido dicetogulônico, com formação do monoânion intermediário monodesidroascorbato, demonstrando a perda do anel no último produto. Fonte: WASHKO *et al.*, 1992.

2.2. FUNÇÕES NOS VEGETAIS

As principais funções bioquímicas do ascorbato nas plantas são (a) sua função antioxidante, devida à rápida reação com íons superóxido, oxigênio singlete, ozônio e peróxido de hidrogênio, participando da remoção de formas ativas que são geradas durante o metabolismo aeróbio e exposição a certos poluentes, herbicidas e condições ambientais (SMIRNOFF, 1996; MOSER & BENDICH, 1991), além de também atuar como antioxidante na redução do α -tocoferol (SUARNA & SOUTHWELL-KEELLY, 1991, citados por BARATA-SOARES, 2001); (b) ação como cofator enzimático de diversas enzimas, como prolil e lisil hidrolases, que catalisam a formação de proteínas importantes para a extensão da parede celular (SMIRNOFF, 1996), além de ser requisitado, pelo menos *in vitro*, pelas enzimas formadoras de etileno (ARRIGONI & De TULLIO, 2000), de ser cofator para a violoxantina de-epoxidase, que liga o ascorbato ao ciclo fotoprotetor das xantofilas e atuar como co-fator para a tioglucosidase; (c) capacidade de transporte de elétrons na fotossíntese e respiração celular (SMIRNOFF, 1996); e (d) participação na síntese de oxalato e tartarato (LIBERT & FRANCESCHI, 1987; KEATES *et al.*, 2000; LOEWUS, 1999; KOSTMANN *et al.*, 2001).

O ascorbato é o principal metabólito nos vegetais que, em associação com outros compostos do sistema antioxidante, é capaz de protegê-los de danos oxidativos. Há evidências da ocorrência do ascorbato em diversas estruturas vegetais, como citossol, cloroplastos, parede celular, mitocôndria e, em baixas concentrações, nos vacúolos (KANELLIS, 1998; SMIRNOFF, 1996), onde possui diferentes papéis. A alta concentração de ascorbato nos cloroplastos é indicativa da importância central deste composto na fotossíntese. Na parede celular, o ascorbato e desidroascorbato possuem alta afinidade pela membrana plasmática ($K_m = 90\mu\text{M}$ e $20\mu\text{M}$, respectivamente); neste caso, o ascorbato perfaz a primeira linha de defesa da planta contra a ação do ozônio na parede celular (SMIRNOFF, 1996). Na parede celular, o ascorbato e a AO parecem estar envolvidos no controle do

crescimento dos vegetais, em um modelo ligado ao processo de expansão celular, e na regulação da divisão celular, influenciando no progresso das fases G1 até S do ciclo celular (KATO & ESAKA, 2000; KATO & ESAKA, 1999; SMIRNOFF, 1996; KERK & FELDMAN, 1995). A fase G1 é o período de crescimento, que transcorre entre o final da mitose e o início da duplicação do DNA, e a fase S é o período de duplicação do material genético (Figura 3). O alongamento celular ocorre após o término da divisão celular, e existem genes específicos que controlam estes eventos, como a ciclina (divisão) e a expansina (alongamento).

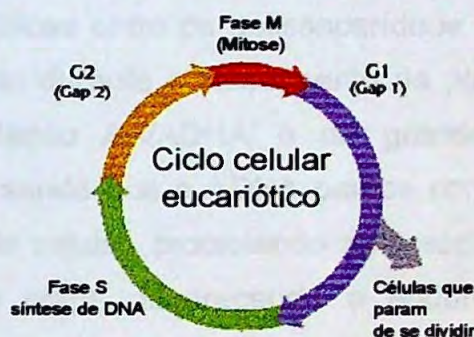


Figura 3. Esquema do ciclo celular demonstrando as fases G1 (crescimento) e S (síntese de DNA).

Células do centro quiescente de milho, que é a parte mais distal da raiz, são mantidas na fase G1 devido à alta expressão da ascorbato oxidase (AO) mediada pela auxina. Isto indica a grande importância da manutenção de baixos níveis de AA, mediada pela AO, para que as células permaneçam na fase G1, já que o aumento deste acarreta a mudança para a fase S (KERK & FELDMAN, 1995). Também fica comprovada a atuação de auxinas no mecanismo de crescimento e divisão celulares, associada à atividade da AO.

Estudos recentes sugerem que o ascorbato e desidroascorbato participam da hidrólise não enzimática de polissacarídeos de parede celular. LIN & VARNER (1991) também verificaram que a presença de ADHA leva a uma prevenção da ligação cruzada covalente entre as proteínas da parede celular devido a modificações das cadeias laterais da lisina, que parecem estar envolvidas na formação da Base de Schiff com os terminais redutores

dos polissacarídeos. Além disto, o ADHA parece prevenir a interação eletrovalente entre as proteínas da parede e a pectina, por modificação da carga positiva da lisina e arginina, que por sua vez, podem interagir com as pectinas negativamente carregadas (poligalacturonato), e ocasionar remoção do cálcio a partir de complexos cálcio-pectina da parede, aumentando a formação de oxalato de cálcio. A remoção do cálcio da parede pode resultar em uma estrutura menos rígida, que se torna adequada ao crescimento. O AA parece também evitar a oxidação do ácido ferúlico por peroxidases apoplásticas ou ligadas à parede celular, impedindo a formação de pontes desidroferúlicas entre os polissacarídeos da parede celular, que leva ao endurecimento durante o crescimento da planta (SANCHEZ *et al.*, 1997). Assim, a relação AA/ADHA é de grande importância para o crescimento vegetal, sendo que o ADHA parece contribuir para uma maior flexibilidade da parede celular, propiciando ao crescimento, enquanto o AA parece finalizar esta etapa, favorecendo o endurecimento da estrutura vegetal.

2.3. METABOLISMO DO ÁCIDO ASCÓRBICO EM VEGETAIS

Apesar de o ácido ascórbico ser um dos principais metabólitos em vegetais, sua via de biossíntese não está completamente elucidada. Essa biossíntese difere grandemente entre plantas e animais, nos quais é sabido que o AA é formado a partir de L-gulono-1,4-lactona, composto não comumente observado em vegetais. Estudos de prováveis vias, envolvendo precursores marcados (^{14}C) demonstraram que, nos vegetais, o esqueleto de glicose permanece intacto. A síntese do AA a partir da glicose e de outras aldoses exige uma oxidação do C_1 com formação de 1,4-lactona, oxidações do C_2 e C_3 formando grupamento enediol e uma epimerização no C_5 para conversão da forma D- para a forma L- (SMIRNOFF *et al.*, 2001) (Fig. 4).

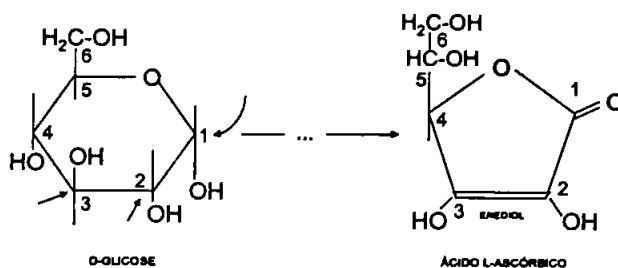


Figura 4. Esquema simplificado das reações necessárias para a conversão da D-glicose em ácido L-ascórbico; as setas demonstram o local da oxidação, e o grupamento enediol formado.

Duas vias de biossíntese haviam sido propostas para o AA, sendo que em uma delas, proposta por LOEWUS (1960), a síntese dar-se-ia através de um mecanismo sem inversão da cadeia carbônica, ou seja, o carbono 1 (C₁) da glicose precursora originaria o carbono 1 (C₁) do ácido ascórbico formado; na outra via, a inversão da cadeia carbônica, sendo que o C₁ da glicose precursora origina o C₆ do ácido ascórbico produzido (KANELLIS, 1998; SMIRNOFF, 1996).

O mecanismo de não-inversão foi proposto após estudos utilizando radioisótopos (LOEWUS, 1956), e foi suportado pela detecção da atividade de uma sorbosona desidrogenase NADP-dependente (LOEWUS, 1999), que produziria o AA a partir de uma sorbosona (Figura 5). Segundo este mecanismo, ocorre uma oxidação da glicose para produzir uma ozona instável, a D-glucosona, que é convertida prontamente a L-sorbosona. Uma outra reação de oxidação e uma lactonização levam à produção do ascorbato.

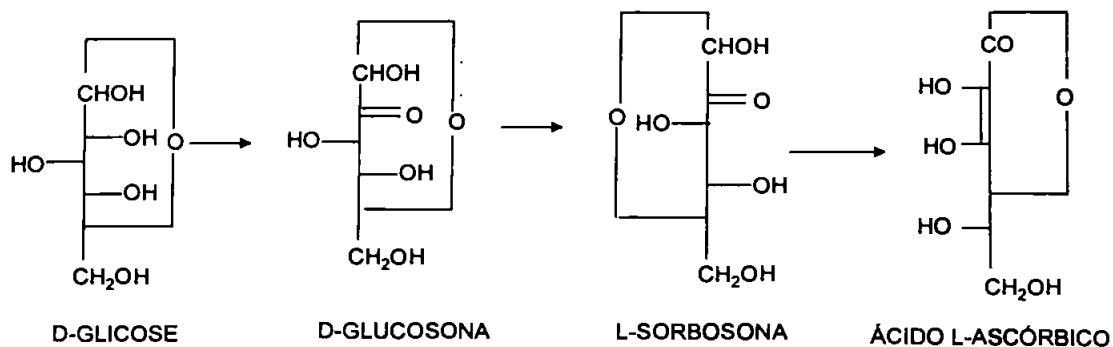


Figura 5. Via de síntese do ascorbato proposta por Loewus (1956), utilizando as ozonas como precursores do ácido ascórbico.

A teoria do mecanismo de inversão (Figura 6), onde o AA seria formado a partir de uma lactona, foi reforçado pela detecção da atividade de uma enzima mitocondrial, a L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (GLDHase), que catalisa a oxidação da L-galactono-1,4-lactona a ácido ascórbico (KANELLIS, 1998; ØSTERGAARDT *et al.*, 1997; SMIRNOFF, 1996; OBA *et al.*, 1995). Apesar de esta via ser conhecida como “mecanismo de inversão”, após exaustivos estudos com marcadores radioativos concluiu-se que o C₁ e o C₆ da glicose precursora originam, predominante e respectivamente, o C₁ e o C₆ do ascorbato produzido, não ocorrendo, portanto, inversão da cadeia carbônica da glicose (BAIG *et al.*, 1970, citado por BARATA-SOARES, 2001). A conversão da D-glicose em L-galactono-1,4-lactona tem sido objeto de vários estudos, onde se concluiu que esta conversão ocorre com a formação de UDP-glicose, entre outros intermediários. Entretanto, ainda não foi comprovada a síntese de L-galactono-1,4-lactona a partir do UDP-D-galacturonato, além de não ocorrer inversão do esqueleto de carbono em vegetais (CONKLIN *et al.*, 1998). Assim, as duas vertentes de estudos da síntese do AA encontram-se interligadas, sendo que o precursor imediato do AA é uma lactona (L-galactono-1,4-lactona), mas não há inversão da cadeia carbônica da glicose.

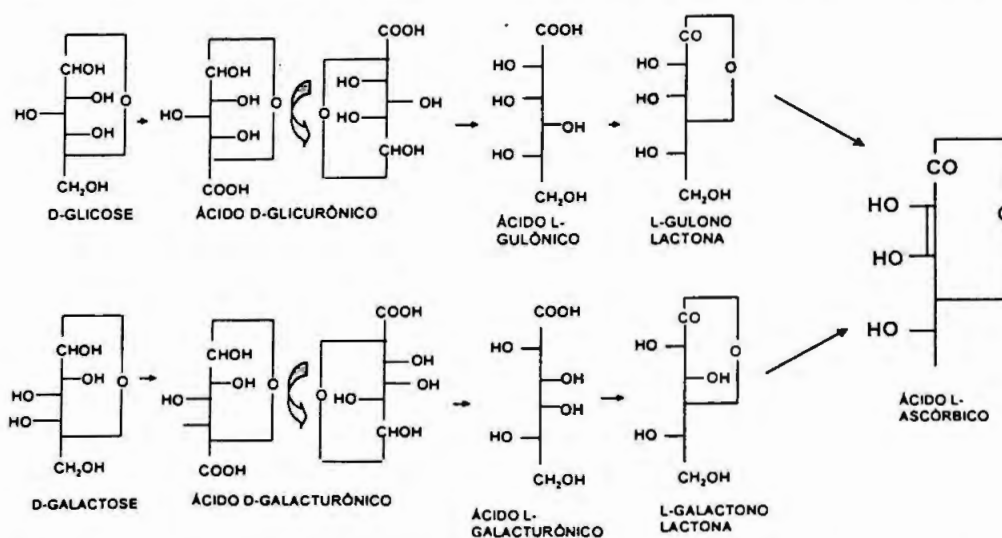


Figura 6. Via de síntese do ascorbato pelo mecanismo de inversão das cadeias carbônicas. Fonte: LOEWUS, 1999.

Pouca atenção havia sido dirigida, até 1998, aos açúcares fosforilados, derivados da UDP, açúcares, ácidos e lactonas. WHEELER e colaboradores (1998), entretanto, verificaram a importância destes compostos na síntese de AA em vegetais. Atualmente, a via proposta por estes autores, denominada via SMIRNOFF-WHEELER (Fig. 7), onde a L-galactono-1,4-lactona é formada a partir da oxidação da L-galactose derivada da GDP-D-manose, parece ser a via principal de biossíntese do AA. Houve comprovação desta hipótese em cultura de células de batatas (VIOLA *et al.*, 1998), e em folhas de salsa (BAIG *et al.*, 1970, citados por BARATA-SOARES, 2001), e através da utilização de galactose marcada na planta aquática *Pistia stratiotes* (KEATES *et al.*, 2001) e em frutas e verduras (BARATA-SOARES, 2001). No morango e na goiaba vermelha, por exemplo, ambos no estágio verde do amadurecimento, a galactose marcada converteu-se em 40% em AA marcado; no mamão verde, esta taxa foi de 58% e no brócoli chegou a 67%. As taxas de conversão de outros compostos marcados, tais como glicose-1-P e manose, em AA permaneceram sempre abaixo de 12%, indicando distribuição para outros metabólitos celulares (BARATA-SOARES, 2001). Entretanto, não foi descartada a existência de outras vias secundárias utilizando outros precursores que não a galactose (BARATA-SOARES, 2001). Em mamões, observa-se desgalactosilação da parede celular, mas não são encontradas grandes quantidades de galactose livre na célula (GOMEZ *et al.*, 1999). Este resultado indica que esta pode estar sendo desviada também para a síntese de AA, como sugere o estudo realizado por BARATA-SOARES (2001).

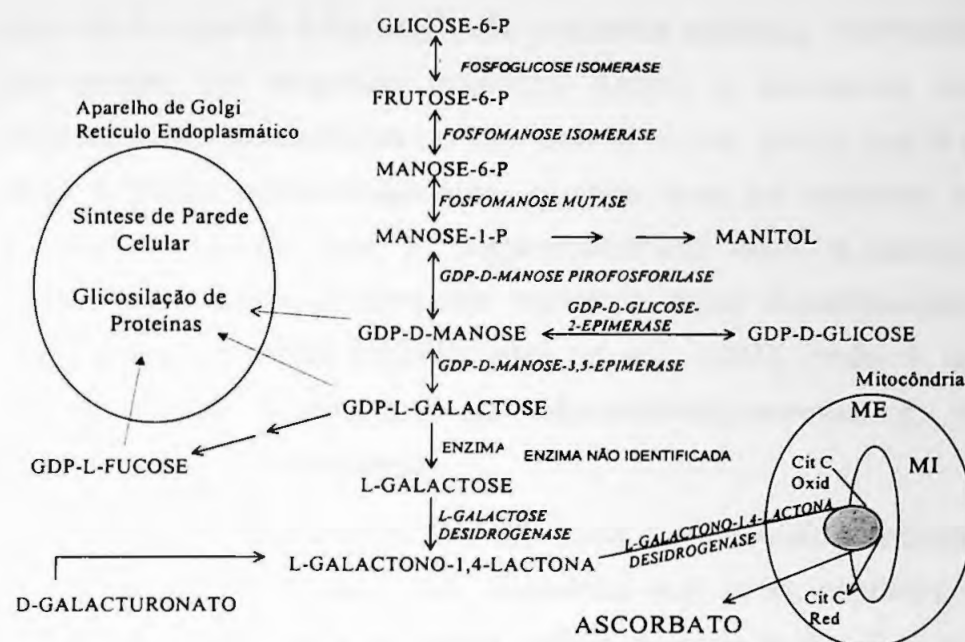


Figura 7. Via Smirnov-Wheeler de biossíntese do ácido ascórbico. (WHEELER *et al.*, 1998).

Além da L-galactono-1,4-lactona desidrogenase, outras enzimas, menos conhecidas, envolvidas na biossíntese do AA são (a) fosfomanose isomerase, que apresenta baixa atividade em vegetais, (b) fosfomanose mutase, que requer um açúcar bisfosfatado para sua ativação, (c) GDP-D-manose pirofosforilase, mais conhecida, já foi parcialmente caracterizada a partir de várias fontes vegetais, (d) GDP-D-manose-3,5-epimerase, e (e) L-galactose desidrogenase, que anteriormente foi chamada de L-sorbose desidrogenase (LOEWUS *et al.*, 1990). A comprovação da presença destas enzimas nos tecidos vegetais suporta uma via baseada na síntese de AA a partir da glicose-1-P (SMIRNOFF, 2000).

O transporte do ácido ascórbico pela planta, e sua distribuição pelos compartimentos tem sido objeto de estudo por parte de vários autores. HOREMANS *et al.* (1996), trabalhando com vesículas da membrana plasmática de broto de feijão, concluíram que a captura do ácido ascórbico é feita por mecanismo de difusão facilitada, uma vez que não houve participação de açúcares ou aminoácidos carregadores envolvidos no transporte do ácido ascórbico. Também não foi demonstrado efeito na

absorção do AA devido à formação de gradiente catiônico intermembranas, ou pela adição de reagentes sulfidríla. Assim, o transporte do ácido ascórbico depende diretamente do seu estado redox, sendo que a entrada na célula é dada, preferencialmente, quando este se encontra em seu estado oxidado, sendo que o desidroascorbato inibe a absorção do ascorbato. Desta forma, o carreador transloca ácido desidroascórbico do apoplasto para o citossol (HOREMANS *et al.*, 1997), onde é reduzido novamente a AA, enzimática ou não-enzimaticamente, e mantido preferencialmente sob esta forma.

Tanto o ADHA quanto o ADKG são mais susceptíveis a hidrólises em condições oxidativas do que o AA, sugerindo que estas espécies podem apresentar maior efetividade no poder antioxidante do tecido. Em soluções aquosas e sistemas de células animais, o ADKG parece ser oxidado pelo H_2O_2 preferencialmente ao AA (DEUTSCH, 2000), mas nenhuma informação sobre esta hipótese foi encontrada em sistemas vegetais. O estudo do ADKG em vegetais limita-se à sua determinação em pimentão verde (MATTHEWS & HALL, 1978), em melão cantaloupe, abacaxi, morango e grapefruit (CHEN & SCHUCK, 1951). Em todos os casos, os conteúdos de AA, ADHA e ADKG foram determinados apenas em um único estágio e não durante o período de desenvolvimento ou amadurecimento destes frutos. Em 1960, TEWARI & KRISHNAN propuseram a existência de um sistema enzimático que catalisaria a hidrólise do ADHA a ADKG em couve-flor e em *Momordica charantia*; esta hipótese, entretanto, não foi posteriormente comprovada em nenhum outro sistema vegetal.

A degradação do AA também pode originar os ácidos oxálico (AOx) e tartárico, quando a molécula é clivada entre o C_2 e o C_3 . Esta é, sem dúvida, a principal via de formação do AOx em vegetais (LOEWUS, 1999, FRANCESCHI & LOEWUS, 1995, WAGNER & LOEWUS, 1973). O AOx é um composto amplamente distribuído na natureza, em diferentes formas vegetais, em sua forma solúvel (sais solúveis de sódio ou potássio) ou insolúvel (sais insolúveis de cálcio ou magnésio) (RINALLO & MODI, 2002; LOEWUS, 1988). Por muitos anos, o AOx foi considerado um produto final

do metabolismo celular, e tinha sua concentração controlada por íons cálcio, formando cristais de oxalato de cálcio (CaOx_2), apesar de OSMOND (1967, citado por RINALLO & MODI, 2002) ter concluído que a formação de AOx é um processo independente da concentração de cálcio no meio. O cálcio é um mineral essencial para o crescimento vegetal, mas em altas concentrações pode ser tóxico para a célula (BUSH, 1995; WEBB *et al.*, 1995, ambos citados por RINALLO & MODI, 2002). A via de formação do AOx também permanece pouco esclarecida. Os precursores prováveis para a síntese do AOx pareciam ser o glicolato, o glioxalato, o oxaloacetato e o citrato. Entretanto, estudos com material radioativo demonstraram que o principal precursor de AOx é o AA (Fig. 8), e a infiltração dos compostos citados anteriormente marcados não levaram à formação de cristais de CaOx_2 em idioblastos de *Pistia stratiotes* (KOSTMAN *et al.*, 2001, KEATES *et al.*, 2000). Os idioblastos são células diferenciadas com função de captar o excesso de cálcio das células circundantes, e são capazes de sintetizar AA e convertê-lo em AOx (KEATES *et al.*, 2000). Também foi demonstrado que a síntese de AA e conversão em AOx é estimulada na presença de grandes quantidades de íons cálcio, e que infiltração de oxalato exógeno inibiu a incorporação do $^{14}\text{C}_1$ do AA nos cristais de oxalato de cálcio (KOSTMAN *et al.*, 2001). RINALLO & MORI (2000) e RINALLO & MODI (2002), entretanto, não consideram o AA como precursor de AOx, uma vez que em seus estudos verificaram que os conteúdos de ambos decrescem durante o amadurecimento e armazenamento de kiwi.

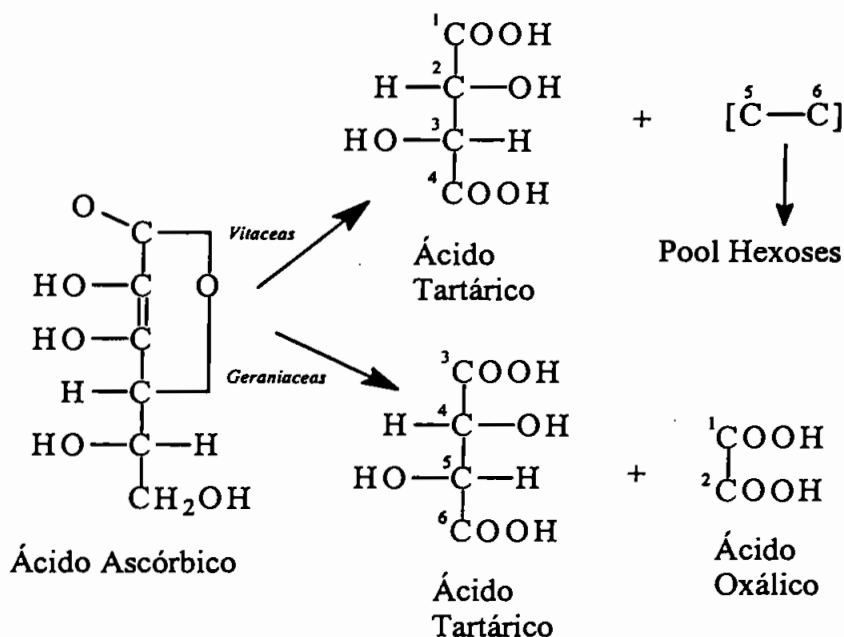


Figura 8. Hidrólise da molécula de ácido ascórbico produzindo ácidos tartárico e oxálico. Em plantas da família das Vitáceas, ocorre um acúmulo de ácido tartárico, enquanto que na família das Geraneáceas ocorre acúmulo dos dois ácidos formados, sendo que o ácido oxálico é invariavelmente formado a partir do C₂ e C₃ do ácido ascórbico.

Fonte: LOEWUS, 1988.

2.4. VARIAÇÃO DO CONTEÚDO DE ÁCIDO ASCÓRBICO NOS VEGETAIS

Durante o amadurecimento dos frutos e armazenamento de outros vegetais, a quantidade de ácido ascórbico pode variar dependendo de vários fatores, intrínsecos e extrínsecos (LEE & KADER, 2000, FAVELL, 1998, WILLS *et al.*, 1984). Em alguns frutos, como o mamão e a goiaba, a quantidade de ácido ascórbico tende a aumentar durante o período do amadurecimento; em outros, entretanto, como a manga e o kiwi, o conteúdo de ácido ascórbico diminui (CARRILLO-LOPES *et al.*, 2000, MANOLOPOULOU & PAPADOPOULOU, 1998). O primeiro fator desta variação é a espécie, mas também foi verificada uma grande diferença nos conteúdos de AA entre cultivares, como por exemplo em mostarda, morango, pimenta, kiwi, tomate, entre outros (CORDENUNSI *et al.*, 2002; LEE & KADER, 2000; GIOVANELLI *et al.*, 1999; MANOLOPOULOU & PAPADOPOULOU, 1998; ABUSHITA *et al.*, 1997; GRAHAM &

STEVENSON, 1997, DAOOD *et al.*, 1996). Durante o desenvolvimento, a maior incidência de luz eleva os níveis de AA, possivelmente pela maior quantidade de açúcares precursores fornecidos pela fotossíntese (LEE & KADER, 2000). A extensão de períodos aos quais as plantas são submetidas a altas ou baixas temperaturas, também é determinante para as taxas de crescimento e composição química dos produtos vegetais. No morango, por exemplo, WANG & CAMP (2000) verificaram que plantas expostas a temperaturas mais baixas produzem frutos com maior conteúdo de AA. Da mesma forma, as práticas de cultura como: uso de fertilizantes, aplicação de defensivos agrícolas, poda, irrigação, ou aplicação de hormônios, também são capazes de alterar o conteúdo de vitamina C presente nos vegetais (LEE & KADER, 2000).

O momento da colheita, bem como os métodos empregados para realizá-la são de grande importância para a qualidade final do produto vegetal (LEE & KADER, 2000; GIOVANELLI *et al.*, 1999; AWAD, 1993; WATADA, 1987). O grau de maturação no momento da colheita é fator de influência na quantidade de AA; entretanto, se por um lado a colheita tardia favorece um maior conteúdo de vitamina C, por outro lado afeta, de maneira negativa, o potencial de armazenamento. Por razões econômicas, os estádios mais verdes são mais indicados, por apresentarem firmeza suficiente para melhor tolerarem os métodos de transporte, manuseio e armazenamento mais comumente utilizados, diminuindo a ocorrência de injúrias que, por sua vez, levam a uma diminuição do conteúdo de AA (WATADA, 1987).

Após a colheita, o conteúdo vitamínico fica extremamente susceptível a modificações, uma vez que os tecidos continuam seus processos fisiológicos mesmo depois de desligados da planta (WATADA, 1987). Estes eventos não podem ser cessados, mas sim controlados por diversos processos, de forma a aumentar o tempo de vida dos vegetais (LEE & KADER, 2000). Em frutos climatéricos, o controle do amadurecimento pós-colheita é uma das formas mais utilizadas para garantir uma maior vida útil. Durante este período, várias modificações teciduais acontecem, como síntese e degradação de

pigmentos (com diferenciação de cloroplasto a cromoplasto), modificações na textura que levam ao amolecimento, acúmulo de lipídeos e peróxidos de lipídeos, síntese de açúcares, e degradação de ácidos orgânicos. As células vegetais se encontram sob estresse na ocorrência destes eventos, produzindo diversos intermediários reativos de oxigênio, como íons superóxido, ou o peróxido de hidrogênio (KIM & CHUNG, 1998). A presença de compostos antioxidantes é essencial para a proteção e manutenção do metabolismo dos tecidos. Na goiaba, por exemplo, a maior parte do AA se encontra na casca (TAYLOR, 1996), possivelmente por ser a primeira barreira contra agentes estressantes externos, como poluentes e raios ultravioletas. Antocianinas, flavonóides, carotenos e ácido ascórbico são os antioxidantes mais comuns nos vegetais. A interação entre estes, como no caso da complexação entre o AA e antocianinas quelantes, protege fortemente a molécula de AA e, conseqüentemente, a célula (SARMA *et al.*, 1997). Algumas enzimas também apresentam atividade antioxidante, como é o caso da superóxido dismutase, catalase e as peroxidases (KIM & CHUNG, 1998), que atuam em conjunto para detoxificar e proteger as estruturas celulares dos danos oxidativos.

2.5. RELAÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO COM MECANISMOS DE AMADURECIMENTO E SENESCÊNCIA

O ácido ascórbico é o principal composto antioxidante hidrossolúvel presente nos vegetais, e durante algum tempo, sugeriu-se que o seu conteúdo era diminuído durante o amadurecimento pós-colheita, possivelmente por estar associado a respostas aos danos oxidativos gerados pela senescência dos frutos (TUCKER, 1996). Entretanto, esta afirmação não pode ser aplicada de forma generalizada, visto que em uma série de frutos o conteúdo de AA se mantém inalterado, ou mesmo aumentado. Isto foi verificado em goiaba (MERCADO-SILVA *et al.*, 1998; EL BULK *et al.*, 1997) e em banana (MUSTAFA *et al.*, 1997), onde o aumento de AA foi sutil no desenvolvimento e início do amadurecimento, e brusco nos

estádios mais avançados. Em pepino e pimenta verificou-se um aumento no conteúdo de AA entre os frutos verde e maduro (GONZALES *et al.*, 2000; OSUNA-GARCIA *et al.*, 1998). O conteúdo de vitamina C parece aumentar entre estádios ou permanecer praticamente inalterado durante 11 dias de armazenamento do morango (CORDENUNSI *et al.*, 2002, PICON *et al.*, 1993), dependendo do cultivar. O conteúdo permanece inalterado também em tomates (WATADA, 1987), e diminui durante o amadurecimento de maçã, kiwi e cereja (LEE & KADER, 2000; MANOLOPOULOU & PAPADOPOULOU, 1998; KADIOGLU & YAVRU, 1998). Outro fator de influência são as condições do amadurecimento, como temperatura, umidade, entre outros. Assim, informações sobre as variações de AA durante o amadurecimento/armazenamento de vegetais devem levar em consideração os fatores de influência já citados, bem como as condições às quais o vegetal esteja sendo submetido. Características intrínsecas dos frutos, como variações genéticas determinando quantidade e atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo do AA, devem ser amplamente avaliadas, por serem de grande importância na manutenção do pool de AA nos tecidos, o que varia grandemente entre as espécies vegetais.

A tabela 1 apresenta uma compilação de dados da literatura, que demonstram claramente a variação nos conteúdos de AA, ADHA e vitamina C total de diferentes espécies e cultivares de frutas e verduras:

Tabela 1: Conteúdo de vitamina C (ácido ascórbico, desidroascórbico e total) em diferentes espécies e cultivares de frutas e vegetais, durante diferentes tempos de armazenamento e/ou amadurecimento. Os resultados estão expressos em mg/100g peso fresco.

Fruto	Tempo	AA	ADHA	Vitamina C Total	Observações	Ref.
AMORA cv. Thornfree	0 dias	19,02	1,97	20,99	Armazenamento: 1° C Apresentou pequena diminuição no conteúdo de AA com concomitante aumento de ADHA, baixa variação na vitamina C	Agar <i>et al.</i> , 1997
	3	17,34	1,97	19,31		
	6	17,05	4,10	21,15		
	9	18,85	2,79	21,64		
ACEROLA	Verde	n.a.	n.a.	21,64	Apresenta 2% do peso fresco em vitamina C. O conteúdo decai cerca de 50% no início do amadurecimento, mantendo-se estável a seguir.	Vendramini & Trugo, 2000
	Interm.	n.a.	n.a.	10,65		
	Madura	n.a.	n.a.	10,74		
BANANA	0 dias	8,0	0	8,0	Apresentou queda do AA até chegar em 50% ao final do armazenamento. Não houve ADHA detectável	Wills <i>et al.</i> , 1984
	2	8,0	0	8,0		
	4	5,4	0	5,4		
	6	4,0	0	4,0		
BRÓCOLIS	0 dias	n.a.	n.a.	75,0	Apresentou queda de cerca de 10% durante o armazenamento	Hussain <i>et al.</i> , 2000.
	10	n.a.	n.a.	69,0		
BRÓCOLIS	0 dias	75,7	4,3	80,0	Apresentou queda de 45% do conteúdo de AA durante o armazenamento. A quantidade de ADHA aumentou proporcionalmente.	Wills <i>et al.</i> , 1984
	2	52,5	6,5	59,0		
	4	32,3	11,3	43,6		
COUVE DE BRUXELAS	0 dias	57,6	4,6	62,2	Apresentou queda de aproximadamente 40% no conteúdo de AA O ADHA apresentou conteúdo variável, não linear, durante o período analisado	Wills <i>et al.</i> , 1984
	1	57,2	0	57,2		
	2	52,6	1,3	53,9		
	3	50,3	1,6	51,9		
GOIABA cv. Pakistani	15 dpa	6,20	n.a.	n.a.	Colheita no momento da análise: amadurecimento ligado à planta. Apresentou significativo aumento no conteúdo de AA.	El Bulk <i>et al.</i> , 1997
	70	26,30	n.a.	n.a.		
	106	65,50	n.a.	n.a.		
	126	106,4	n.a.	n.a.		

GOIABA	0	262	n.a.	n.a.	Colhidos na estação primavera-verão, apresentam semelhante conteúdo de AA	Mercado-Silva <i>et al.</i> , 1998
	7 dias	271	n.a.	n.a.		
cv. Media China	0	248	n.a.	n.a.	Colhidos na estação outono-inverno, apresentam aumento considerável nos níveis de AA	
	7 dias	341	n.a.	n.a.		
LARANJA	0 semana	47,5	0	47,5	Houve uma diminuição rápida do conteúdo na primeira semana de armazenamento, e lenta nas semanas seguintes	Wills <i>et al.</i> , 1984
	1	39,9	0	39,9		
	3	34,2	0	34,2		
	5	27,3	3,0	30,3		
LIMÃO	0 semana	42,4	0	42,4	Apresentou queda lenta (10%) nas quatro primeiras semanas e brusca (20%) nas duas últimas semanas	Wills <i>et al.</i> , 1984
	2	40,6	0	40,6		
	4	36,3	2,3	38,6		
	6	30,4	1,0	31,4		
GROSELHA PRETA cv. Rosenthals	0 dias	86,49	5,76	92,3	Armazenamento a 1°C Houve um aumento do conteúdo de AA e ADHA até 14 dias, diminuindo em seguida	Agar <i>et al.</i> , 1997
	7	92,25	7,21	99,5		
	14	95,13	5,76	100,9		
	21	74,96	4,32	78,96		
KIWI cv. Bruno	0 semana	159	n.a.	n.a.	Colhidos no ponto de colheita e armazenados a 0°C / 90% UR. Apresentou pequeno aumento nas 9 primeiras semanas, voltando a seguir as níveis anteriores	Manolopoulos & Papadopoulos 1998
	6	174	n.a.	n.a.		
	9	170	n.a.	n.a.		
	14	153	n.a.	n.a.		
	17	152	n.a.	n.a.		
KIWI cv. Hayward	0 dias	93,56	n.a.	n.a.	Apresentou queda do conteúdo de AA durante o período de armazenamento, atingindo cerca de 88% do conteúdo inicial	Rinallo & Mori, 2000
	30	90,97	n.a.	n.a.		
	90	85,76	n.a.	n.a.		
	120	82,75	n.a.	n.a.		
KIWI cv. Monty	0 semana	76	n.a.	n.a.	Armazenados a 0°C. Apresentou queda do conteúdo de AA durante o armazenamento, atingindo 70% do conteúdo inicial	Manolopoulos & Papadopoulos 1998
	6	77	n.a.	n.a.		
	14	72	n.a.	n.a.		
	17	54	n.a.	n.a.		

MANGA	0 dias	17,3	n.a.	n.a.	Armazenamento a 13°C Houve uma diminuição do conteúdo até o 16º dia, estabilizando-se em seguida.	Carrillo-Lopes <i>et al.</i> , 2000
cv. Haden	8	15,5	n.a.	n.a.		
	16	10,8	n.a.	n.a.		
	24	10,5	n.a.	n.a.		
MANGA	90 dpa	n.a.	n.a.	25	AA permanece inalterado até o ponto de colheita (205 dpa). Após isto, ocorre uma perda de mais 50% no teor de vitamina C.	Bernardes-Silva, 2000
cv. Keitt	120	n.a.	n.a.	25		
	167	n.a.	n.a.	10		
MANGA	90 dpa	n.a.	n.a.	40	AA decai 50% do período de crescimento (90dpa) até o ponto de colheita (184 dpa).	Bernardes-Silva, 2000
cv. Palmer	180	n.a.	n.a.	19		
	184	n.a.	n.a.	21		
MAMÃO	Verde	28,1	27,9	0,11	Aumento de 3,5 vezes no teor de vitamina C, aumento mais acentuado no conteúdo de ADHA.	Barata-Soares, 2001
cv. Solo	Maduro	99,5	94,3	5,3		
MORANGO	0 dias	60,53	4,74	65,3	Armazenamento a 1° C Houve aumento na quantidade de AA e ADHA durante o período	Agar <i>et al.</i> , 1997
cv. Elvira	5	63,68	4,74	68,4		
	10	67,37	9,47	76,8		
MORANGO	Verde	36,7	3,0	39,7	Houve queda nos conteúdos de AA e ADHA, indicando degradação total.	Barata-Soares, 2001.
	Médio	33,5	1,4	34,9		
PÁPRIKA	Verde	26,67	n.a.	n.a.	Colheita no momento da análise: amadurecimento ligado à planta	Daood <i>et al.</i> , 1996
	Quebra-1	180,0	n.a.	n.a.		
	Quebra-2	203,3	n.a.	n.a.	Houve aumento até a obtenção da coloração vermelha do fruto, decaindo nos momentos de amadurecimento final	
	Vermelho	206,7	n.a.	n.a.		
	Muito vermelho	166,7	n.a.	n.a.		
	Senescente	60,0	n.a.	n.a.		
PIMENTA CHILE	Verde	146,5	7,96	154,5	Aumento significativo de AA e ADHA do estágio verde para o maduro	
cv. Mildchile	Maduro	222,0	11,30	233,3		
PIMENTÃO	Verde	150	3,3	153,3	O AA aumentou nos diferentes estádios do amadurecimento enquanto que o ADHA apresentou uma queda no estágio V/A, tendo um nível final levemente menor que o inicial	Imahori <i>et al.</i> , 1998 (a)
	V/A	170	1,5	171,5		
cv. Golden Bell	A/V	195	3,0	198,0		
	Amarelo	225	3,0	228,0		

PIMENTÃO	0 horas	140	4,8	144,8	O AA apresentou um aumento em 12h de armazenamento a frio, decaindo após 24h.	Imahori <i>et al.</i> , 1998 (b)
Cv. Golden Bell	12	160	5,0	165,0		
	24	160	5,0	165,0		
	48	155	5,0	160,0		
PIMENTA SERRANO	Verde	81,80	< 1	81,80	Apresentou um pequeno aumento (<10%) durante o período	Wills <i>et al.</i> , 1984
Cv. Hidalgo	Maduro	87,70	<1	87,70		
TOMATE Cv Floriset	Estágio 1	12,5	n.a.	n.a.	Aumento no início do amadurecimento, e queda até o estágio maduro	Abushita <i>et al.</i> , 1997
	2	23,0	n.a.	n.a.		
	3	18,0	n.a.	n.a.		
	4	11,0	n.a.	n.a.		
TOMATE	0 dias	18,7	1,5	20,2	Apresentou uma leve queda na quantidade de AA durante o armazenamento;	Wills <i>et al.</i> , 1984
	2	14,3	3,6	17,9		
	4	12,3	1,1	13,4		
	6	10,6	1,4	12,0	O conteúdo de ADHA mostrou uma tendência não linear de queda	
	8	10,0	2,3	12,3		

OBS. na: não apresentado

2.6. EFEITOS DO ARMAZENAMENTO NO CONTEÚDO DE ÁCIDO ASCÓRBICO

2.6.1. EFEITOS DO ARMAZENAMENTO SOB REFRIGERAÇÃO

O controle da temperatura é uma das ferramentas mais importantes usadas para a conservação de frutas e vegetais (LEE & KADER, 2000, CHITARRA & CHITARRA, 1990). A refrigeração atua diferentemente em cada espécie, não havendo uma faixa de temperatura ideal de conservação para todos os vegetais. Em frutas tropicais, por exemplo, temperaturas muito baixas acarretam injúrias que levam à deterioração dos tecidos, tornando o fruto impróprio para o consumo (AWAD, 1993).

O efeito da baixa temperatura nas organelas celulares varia de acordo com a espécie e, principalmente, com a capacidade de aclimação ao frio. Durante o amadurecimento de frutos, naturalmente ocorre uma perda progressiva da função das membranas, que está ligada à sua composição lipídica, além de modificações na sua viscosidade ou fluidez. As temperaturas mais baixas (10°C) apresentam um drástico efeito nas

estruturas celulares, sendo que as mitocôndrias “murcham” e as membranas são desorganizadas (KOVACS, 1997, citado por LEE & LEE, 2000).

Geralmente, frutas e vegetais mostram perdas de AA relacionadas ao aumento de temperatura ou tempo de armazenamento (LEE & KADER, 2000). A ocorrência de injúrias também é determinante para a manutenção do conteúdo de AA nos vegetais. Em abobrinha, por exemplo, a perda de AA iniciou-se apenas quando as injúrias causadas pelas baixas temperaturas se tornaram aparentes; já em batata doce, houve perda de AA apenas nas partes onde foram notadas injúrias (IZUMI *et al.*, 1984, citados por LEE & KADER, 2000). As menores perdas ocorrem em vegetais da família das crucíferas, provavelmente pelo alto conteúdo de compostos sulfurados e glutatona, que acarretam proteção do AA (LEE & KADER, 2000). Também os frutos que apresentam taxas respiratórias mais baixas são mais tolerantes às baixas temperaturas de armazenamento (AWAD, 1993).

Os frutos podem, desta forma, ser agrupados em determinadas faixas de temperatura, de acordo com a resistência: temperaturas de 0 a 4°C, englobam frutos tolerantes, como ameixa, morango, nectarina, pêssigo, uva, entre outros. Temperaturas de 4 a 8°C envolvem frutos com sensibilidade moderada ao frio, como por exemplo goiaba, laranja, melão e mamão. Por fim, temperaturas acima de 8°C são indicadas para frutos com alta sensibilidade a baixas temperaturas, como é o caso da melancia, banana, carambola e manga (CHITARRA & CHITARRA, 1990). Estes exemplos dão uma noção das temperaturas mais indicadas para cada fruto, mas a temperatura ideal de armazenamento deve ser amplamente estudada para cada espécie, a fim de evitar o aparecimento de injúrias e conseqüente perda de vitamina C.

2.6.2. EFEITO DO USO DE ATMOSFERAS CONTROLADAS

A modificação da atmosfera é utilizada pois reduz mudanças químicas e fisiológicas de frutos e vegetais e permite uma maior manutenção da firmeza, do conteúdo de sólidos solúveis e acidez, além de prevenir o ataque por fungos, o que mantém a qualidade dos frutos por mais tempo (LEE & KADER, 2000). O efeito destas modificações sobre o conteúdo de vitamina

C tem sido objeto de estudo por parte de diversos autores, e parece variar de forma bastante acentuada, dependendo da espécie e da composição da atmosfera utilizada.

Para cada espécie vegetal, existe uma condição atmosférica determinante para a manutenção do conteúdo de AA. O uso de embalagens com atmosferas modificadas (EAM) também são uma boa forma de retardar as perdas de vitamina C (LEE & KADER, 2000, AGAR *et al.*, 1997). Em brócolis, por exemplo, foi verificada uma maior retenção dos conteúdos de vitamina C, de clorofila e da umidade em floretes mantidos em EAM, do que naqueles mantidos sob a atmosfera convencional (BARTH *et al.*, 1993). O mesmo foi verificado em folhas de espinafre minimamente processadas mantidas em EAM, onde houve um maior acúmulo de ADHA, resultando em maior conteúdo de vitamina C, do que as mantidas no ar, onde notou-se degradação deste composto e perda da vitamina C.

No geral, baixas pressões de oxigênio previnem a perda de ácido ascórbico, mas este efeito é anulado pela presença de altas concentrações de CO₂ (LEE & KADER, 2000, AGAR *et al.*, 1997, WATADA, 1987). Aparentemente, o equilíbrio na reação da oxidação do AA no tecido é diminuído quando a pressão de O₂ é diminuída (WATADA, 1987). Tal comportamento foi encontrado em maçãs, amoras, morangos e pêra, sendo que as altas concentrações de CO₂ afetaram preferencialmente o AA (LEE & KADER, 2000, AGAR *et al.*, 1997). Em morangos, AGAR *et al.* (1997) verificaram uma pequena perda de vitamina C total, indicando uma possível oxidação do ADHA a ácido 2,3-dicetogulônico. A vitamina C no morango apresentou maior suscetibilidade quando o fruto foi submetido a concentrações entre 15 e 20% CO₂, que pareceu levar a uma descompartimentalização dos tecidos devido à formação de bicarbonatos, principalmente o de cálcio, desestruturando a membrana e permitindo o contato entre AA e a APX (AGAR *et al.*, 1997). A influência do etileno sobre o conteúdo de ácido ascórbico é ainda contraditória. A atividade da APX é aumentada em resposta ao etileno, e a produção deste em resposta às injúrias provocadas pela alta concentração de CO₂ pode ativar a enzima, o

que acabaria por diminuir o conteúdo de AA no vegetal (MELHORN, 1990, citado por LEE & KADER, 2000). Embora a aplicação externa do gás tenha aumentado o conteúdo de AA em tomates e salsa, o mesmo tratamento não apresentou efeito sobre a groselha vermelha (BANGERTH, 1997, citado por LEE & KADER, 2000). Fatias de caqui e morango apresentaram menores perdas de vitamina C quando armazenados a 0°C e atmosfera controlada com pressão de O₂ 6 vezes menor do que a pressão de CO₂ (WRIGHT & KADER, 1997). O mesmo foi verificado em brócolis (PARADIS *et al.*, 1996, citados por LEE & KADER, 2000), quando a pressão de O₂ foi três vezes menor do que a pressão de CO₂. Embora estes autores tenham apresentado tais resultados, a menor perda da vitamina C em baixas temperaturas associadas à atmosfera modificada pode também ser devida ao menor metabolismo vegetal, uma vez que WATADA (1987) descreveu que o aumento da pressão de oxigênio não seja capaz de reverter o efeito deletério do CO₂ sobre o ácido ascórbico. De uma forma geral, a maior concentração de CO₂ na atmosfera leva a uma maior degradação da vitamina C, possivelmente pela oxidação direta do AA, pela inibição dos mecanismos de redução do ADHA a AA, ou pelo estímulo na produção de etileno, que leva a um aumento na atividade da enzima ascorbato peroxidase.

2.7. Reações Enzimáticas Envolvidas no Metabolismo do Ácido Ascórbico

2.7.1. REAÇÃO DE SÍNTESE: PAPEL DA L-GALACTONO-1,4-LACTONA DESIDROGENASE

Em vegetais, o passo imediatamente anterior à produção do AA é a sua conversão a partir da L-galactono-1,4-lactona (ISHERWOOD *et al.*, 1954). Desta forma, tem sido verificada a importância da L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (GLDHase) (WHEELER *et al.*, 1998; ØSTERGAARDT *et al.*, 1997; SMIRNOFF, 1996; CONKLIN, 1998, OBA *et al.*, 1995) (veja figura 7). A atividade desta enzima já foi comprovada em diversas fontes vegetais, tais como ervilhas, repolho, couve-flor, batata doce e batata (OBA *et al.*, 1995). Uma vez que a enzima catalisa a reação direta

da produção do AA, a partir da L-galactono-1,4-lactona, o estudo do seu comportamento durante o amadurecimento pode auxiliar na elucidação do mecanismo de controle dos níveis de AA neste período.

A GLDHase é uma enzima mitocondrial, com peso molecular de aproximadamente 56 kDa, e ponto isoelétrico de 5,8 (OBA *et al.*, 1995). A atividade da GLDHase sofre inibição por p-cloromercuriobenzoato (PCMB), e por acriflavina, o que indica que a enzima requer grupamentos sulfidríla para sua atividade, e que possui um grupamento flavina em sua molécula. O pH ótimo de atividade da GLDHase é 7,8-7,9, sendo que a atividade é levemente inibida pela adição de tampão Tris-HCl. A enzima também apresenta alta especificidade, com Km de 0,12 mM para a L-galactono-1,4-lactona, sendo que ocorre inibição pelo substrato a partir de 4,2 mM. Alguns autores levantaram a hipótese de que a licorina, um alcalóide capaz de induzir o escorbuto por reduzir o pool de ascorbato em animais, teria ação inibitória sobre a GLDHase; entretanto, não há estudos que comprovem a atividade da licorina diretamente sobre a enzima, devendo esta especificidade ser melhor estudada (KANELLIS, 1998; SMIRNOFF, 1996).

Esta enzima já foi purificada a partir de batata doce (ÔBA *et al.*, 1995) e couve-flor (ØSTERGAARD *et al.*, 1997). O cDNA também já foi isolado a partir da couve-flor (ØSTERGAARD *et al.*, 1997), da batata doce (IMAI *et al.*, 1998) e do tabaco (YABUTA *et al.*, 2000). Foi demonstrado que a seqüência de aminoácidos da GLDHase é bastante similar à da enzima L-gulono-1,4-lactona oxidase, que é a responsável pela formação do AA em animais (KOSHIZAWA *et al.*, 1988, citado por TABATA *et al.*, 2001). Recentemente, foi descoberto que a GLDHase se localiza na parte de fora da membrana mitocondrial interna, estimulando as taxas de transporte de elétrons, por meio da utilização do citocromo C (BARTOLI *et al.*, 2000, TABATA *et al.*, 2001).

Em pimentão, a enzima GLDHase parece ser a responsável pelo controle do conteúdo de AA em diferentes estádios do amadurecimento, e

desta forma, o estudo da atividade desta enzima em outros frutos é de grande interesse para efeito de comparação (IMAHORI *et al.*, 1998).

2.7.2. DEGRADAÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO: ATIVIDADE DAS ENZIMAS ASCORBATO OXIDASE E ASCORBATO PEROXIDASE

Muita atenção tem sido dirigida para a atividade da ascorbato oxidase, enzima que oxida o ácido ascórbico a ácido desidroascórbico em alimentos, principalmente em vegetais. Sua principal função biológica no vegetal, no entanto, permanece uma incógnita. A ascorbato oxidase (AO - E.C. 1.10.3.3) é uma enzima da família das oxidases cúpricas azuis, encontrada ligada à parede celular de diversos vegetais superiores (KATO & ESAKA, 1999; BIN SAARI *et al.*, 1998; DIALLINAS *et al.*, 1997; KISU *et al.*, 1997). Possui 8 átomos de cobre em sua molécula, e peso molecular de cerca de 140 kDa (MARITANO *et al.*, 1996; SMIRNOFF, 1996; GERWIN *et al.*, 1974). A AO catalisa a reação reversível do ascorbato a 2-desidroascorbato, com concomitante redução de O₂ a água:



A AO apresenta uma estrutura complexa, que garante efetiva participação no metabolismo celular (GERWIN *et al.*, 1974; LIN & VARNER, 1991; MACCARRONE *et al.*, 1993; BIN SAARI *et al.*, 1995). O pH ótimo se encontra entre 5,5 e 7,0 e apresenta Km entre 0.181 a 0.98 μM, dependendo da fonte enzimática (BRENDA, The enzyme database). O substrato redutor da enzima encontra-se na forma de monoânion, sendo que a reação limitante necessita de uma protonação de um grupamento com carga negativa, cujo pK é aproximadamente 8,0. A velocidade máxima pode ser aumentada várias vezes em presença de excesso de ascorbato e ausência de oxigênio, o que sugere a criação de sítios catalíticos adicionais (GERWIN *et al.*, 1974). A atividade da AO já foi detectada em diversos vegetais, como laranja, uva, repolho, caju, abobrinha, pepino, tangerina,

entre outros. Em mangas, foi verificado que há uma relação linear entre degradação do ácido ascórbico e aumento de atividade da AO durante o amadurecimento (CARDELLO *et al.*, 1998).

Em estudo de acompanhamento da expressão da AO em abobrinha (*Cucurbita pepo* L.), LIN & VARNER (1991) detectaram uma maior atividade da enzima na epiderme, e menor na região central placentária do fruto. Nas folhas, a atividade foi maior em folhas jovens e na região do rápido crescimento foliar (próximo à lâmina foliar). Esta localização da AO na epiderme do fruto, onde as células estão sob tensão durante a rápida expansão, sugere que a enzima esteja envolvida na reorganização da parede celular.

Através de sua localização na parede celular, atualmente sua atividade vem sendo associada ao crescimento celular e modificações na estrutura da parede celular, regulando a quantidade disponível de ácido ascórbico para que a célula passe da fase G₁ para a fase S da divisão celular (veja figura 3) (SMIRNOFF, 2000; KATO & ESAKA, 1999; KANELIS, 1998; DIALLINAS *et al.*, 1997; KISU *et al.*, 1997). A AO parece também facilitar a absorção do ácido ascórbico pela célula, sob forma de ADHA (KATO & ESAKA, 1999). A atividade oxidante da AO sobre o AA durante o período de amadurecimento dos frutos poderia diminuir seu valor nutricional, já que o ADHA, apesar de apresentar atividade vitamínica C, é altamente instável em pH maiores que 7,0, sendo rapidamente degradado não enzimaticamente a ácido 2,3-dicetogulônico (SMIRNOFF, 1996; PALLANKA & SMIRNOFF, 2000). Para que a capacidade antioxidante do tecido seja mantida, o pool do ascorbato deve ser mantido em sua forma reduzida. Este fator parece exercer influência sobre a atividade da AO, uma vez que esta é diminuída pelo aumento de AA no meio, sugerindo um tipo de inibição pelo substrato (PALLANKA & SMIRNOFF, 2000).

O comportamento da AO difere grandemente durante o amadurecimento ou desenvolvimento de frutos. As maiores atividades da AO são encontradas na família *Cucurbitacea*, onde podem variar entre 35 a

565.000 unidades por miligrama de proteína, sendo maior na abobrinha e menor no melão da variedade Kinsho. Também foi verificado neste estudo que a atividade da AO se localiza preferencialmente na casca do fruto, em relação à sua polpa (BIN SAARI *et al.*, 1995). Entretanto LIN & VARNER (1991) descreveram que, mesmo na abobrinha, a atividade da AO é maior no período de crescimento do fruto (entre 3 a 6 dias após a antese), decaindo em seguida. Em carambola (BIN SAARI *et al.*, 1999) a atividade da AO é cerca de 2 vezes maior nos frutos em crescimento do que nos frutos verdes, e cerca de 65 vezes maior que nos frutos maduros. No melão, entretanto, a atividade decaiu drasticamente logo após a antese, mas apresentou um leve aumento durante o período de amadurecimento do fruto, decaindo novamente durante o período de senescência (DIALLINAS *et al.*, 1997). Desta forma, a atividade não teria importância fisiológica significativa durante o amadurecimento, estando preferencialmente vinculada ao crescimento e desenvolvimento do fruto. KISU *et al.* (1997, 1998) verificaram a expressão de uma proteína ligante a um "zinc-finger" associado à AO, com atividade silenciadora do gene de expressão da enzima em abóbora. Esta proteína silenciadora raramente é expressa durante o crescimento do fruto, tendo expressão aumentada durante o período do amadurecimento, o que comprova que após o término do desenvolvimento, a atividade de AO não é mais imprescindível, e é silenciada. O cDNA da enzima foi elaborado a partir da abóbora, tabaco, melão e pepino, apresentando de 75-82% de resíduos idênticos (DIALLINAS *et al.*, 1997) entre estas fontes. O gene da AO parece ser altamente induzido por auxina, o que reforça sua possível relação com o crescimento e a reorganização da parede celular (KATO & ESAKA, 1999, KISU *et al.*, 1997). Esta afirmação pode ser confirmada pelo fato de o ADHA interagir com a parede celular, prevenindo ligações entre aminoácidos e pectinas, e retirando átomos de cálcio dos complexos cálcio-pectina, o que enfraquece a estrutura da parede celular, e permite a sua reestruturação (LIN & VARNER, 1991).

Assim, apesar de a AO parecer ter um papel mais importante durante o crescimento e desenvolvimento de frutos, ainda existem controvérsias

sobre a ação desta enzima durante o período do amadurecimento pós-colheita, o que torna o estudo desta atividade importante para o estabelecimento dos mecanismos de controle do conteúdo de AA em frutos.

A ascorbato peroxidase (APX – E.C. 1.11.1.11) é uma peroxidase com boa especificidade para o ascorbato, e participa da eliminação do peróxido de hidrogênio formado em processos de fotossíntese ou respiração, ou como forma de reação a agentes estressantes.



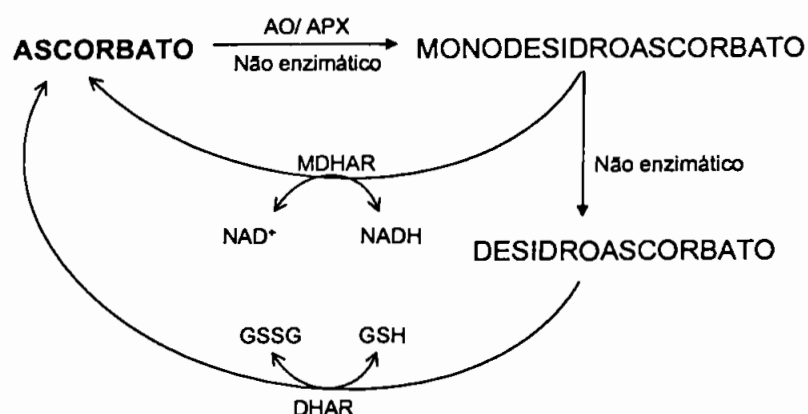
A enzima localiza-se no cloroplasto, citossol, mitocôndria, peroxissomos e glioxissomos e apresenta seqüência gênica diferenciada de outras peroxidases. O cDNA já foi isolado de *Arabidopsis*, ervilha, pimenta, espinafre, e morango (KIM & CHUNG, 1998, ISHIKAWA *et al.*, 1996, SCHANTZ *et al.*, 1995). A enzima já foi purificada a partir de *Brassica rapa*, onde foi demonstrado que a APX se apresenta unicamente sob forma citossólica (ISHIKAWA *et al.*, 1996). Neste caso, a enzima apresentou peso molecular de 28 kDa, pH ótimo de 6,5 e temperatura ótima de 38°C. O Km da enzima para o ácido ascórbico é de 220-480 μM, e para o H₂O₂ é de 20-80 μM. A APX utiliza o AA como agente redutor, apresentando alta afinidade e especificidade (ISHIKAWA *et al.*, 1996, ASADA, 1992), mas parece reduzir apenas hidroperóxidos orgânicos (KIM & CHUNG, 1998). A APX apresenta peso molecular de 34 kDa, contendo um grupo prostético protoheme e um átomo de ferro não-heme. A seqüência da APX apresenta alto grau de homologia com a da citocromo C peroxidase (ASADA, 1992). Ao contrário da AO, sua atividade foi diretamente relacionada ao período do amadurecimento em frutos de pimenta vermelha, pimentão e morango, onde houve correlação direta entre a síntese de APX e o amadurecimento (IMAHORI *et al.*, 1998a, KIM & CHUNG, 1998). A expressão do RNA da APX parece ser diferentemente conduzida em diferentes frutos. No caso do morango, a maior expressão e acúmulo deram-se no estágio da quebra de coloração, enquanto que em pimenta, este se deu no estágio máximo de

amadurecimento (KIM & CHUNG, 1998). A APX parece atuar mais significativamente sobre o pool de ácido ascórbico presente nos tecidos durante o amadurecimento do que a AO. O H_2O_2 presente nos tecidos, ainda que em baixas concentrações, exerce efeito inibitório sobre diversas enzimas, dentre elas a frutose-1,6-bisfosfatase (ISHIKAWA *et al.*, 1996) e desta forma, a atividade das enzimas que degradam o H_2O_2 , dentre elas a APX, é essencial para a manutenção das funções celulares. A APX também responde às injúrias ocasionadas por baixas temperaturas (LEE & LEE, 2000; KUBO *et al.*, 1999; MIZUNO *et al.*, 1998; SALA, 1998). Em batata, a atividade da APX foi aumentada em baixas temperaturas ($1^\circ C$) relativamente a temperaturas de $5^\circ C$ e $20^\circ C$ (MIZUNO *et al.*, 1998). Em folhas de *Arabidopsis thaliana*, a atividade da APX não foi aumentada por outros fatores estressantes a não ser baixas temperaturas e radiação UVB (KUBO *et al.*, 1999). A atividade na tangerina armazenada a $2,5^\circ C$ apresentou alterações em cultivares não tolerantes ao frio (SALA, 1998). Em folhas de plantas do pepino, a atividade da APX foi aumentada significativamente durante o período de estresse, e também no período pós-estresse (LEE & LEE, 2000). Entretanto, em pimentão (IMAHORI *et al.*, 1998b), a atividade da APX não sofreu alterações com a indução de injúrias, mantendo-se praticamente estável durante um período de 48h de armazenamento após a lesão. No caso de injúrias por patógenos, entretanto, a atividade da AO foi suprimida (MITTLER *et al.*, 1999). Os autores sugerem que o tecido possivelmente utiliza o H_2O_2 formado para a defesa contra o agente infectante. A exemplo da AO, há muita variação entre as atividades da APX dos diferentes vegetais.

Assim, a APX parece exercer um papel mais significativo sobre o pool do ascorbato durante o amadurecimento de frutos, possivelmente por possuir atividade detoxificante do tecido vegetal. O estudo da atividade da APX é importante para se tentar obter uma resposta sobre mecanismos da variação no conteúdo de AA durante este período.

2.7.3. REGENERAÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO: AÇÃO DAS ENZIMAS MONODESIDROASCORBATO REDUTASE (MDHAR) E DESIDROASCORBATO REDUTASE (DHAR)

É sabido que, devido à sua importância no sistema antioxidante da célula, o pool de AA deve ser mantido na sua forma reduzida, apesar de o produto de oxidação, ácido desidroascórbico, também apresentar capacidade antioxidante em relação ao hidroperóxido de hidrogênio (URANO *et al.*, 2000, DEUTSCH, 2000, FOYER & MULLINEAUX, 1998, HOU & LIN, 1997). ASADA *et al.* (1984) calcularam que, sem a regeneração do ascorbato presente na célula, a presença de compostos radiculares depletaria totalmente o pool de ascorbato em questão de poucas horas. Na primeira fase da oxidação do AA a ADHA libera um radical livre monoânion, o monodesidroascorbato (MDHA), que pode, dependendo das condições do tecido, ser desproporcionado em AA ou ADHA. A manutenção dos níveis necessários sob a forma reduzida pode ser feita pela glutathiona reduzida ou ferredoxina (FOYER *et al.*, 1998, MORELL *et al.*, 1997). Esta redução pode também ser realizada enzimaticamente, por ação de duas enzimas que possuem atividade regeneradora do AA: a monodesidroascorbato redutase (MDHAR) e a desidroascorbato redutase (DHAR). Um esquema de reações da DHAR e MDHAR está apresentado abaixo:



A MDHAR é uma enzima flavina-adenina dinucleotídeo, dependente de NADH, e parece ser necessária tanto para a manutenção dos níveis de ascorbato quanto para o fornecimento de NAD^+ durante reações de β -

oxidação. A enzima já foi localizada na membrana celular, mitocôndria, citossol e microsossomos. Apresenta pH ótimo entre 7,0 e 8,5, temperatura ótima entre 39 e 41°C, e peso molecular entre 42 e 66 kDa, dependendo da fonte enzimática (BOWDITCH & DONALDSON, 1990, ARRIGONI *et al.*, 1981, citados no website BRENDA). Em tomate, foi verificado que os níveis de mRNA para MDHAR são induzidos por ferimentos no fruto (GRANTZ *et al.*, 1995), sugerindo que a atividade desta enzima é de grande importância para a manutenção dos níveis de AA durante situações de estresse. A MDHAR já foi purificada a partir de pepino, batata, nódulos da raiz da soja e de fungos, e o cDNA já foi clonado a partir de pepino, ervilha, tomate, arroz, *Arabidopsis* e folhas de mostarda (SAKIHAMA *et al.*, 2000). A MDHAR parece exercer atividade redutora de radicais fenoxila formados a partir da oxidação de compostos fenólicos, que ao lado do ascorbato, apresentam grande atividade antioxidante, especialmente os compostos flavonóides. Para que esta atividade antioxidante seja efetiva, os radicais fenoxila devem ser prontamente reduzidos aos seus respectivos fenólicos, e esta redução pode ser dada, entre outras formas, pela atividade MDHAR (SAKIHAMA *et al.*, 2000).

A DHAR é uma enzima citoplasmática, necessária à regeneração do ascorbato a partir do desidroascorbato produzido pela ação da APX. Apresenta pH ótimo entre 7 e 8, e boa especificidade para o desidroascorbato, com Km de 260µM; para a glutationa, o Km é 4,35mM. A temperatura ótima de reação é 38°C e peso molecular aproximado de 25 kDa. A DHAR já foi purificada a partir de folhas de espinafre (HOSSAIN & ASADA, 1984), tubérculo de batata (DIPIERRO & BORRANCCINO, 1991), de plântulas de arroz (URANO *et al.*, 2000; KATO *et al.*, 1997) e da batata doce. A enzima purificada a partir de plântulas de arroz apresenta conformação monomérica contendo um grupamento tiol, é altamente resistente ao calor, mas não apresentou ligação cruzada ao anticorpo do espinafre.

Ainda há muita controvérsia sobre a presença real do ADHA e da DHAR em tecidos vegetais *in vivo*. Alguns autores sugerem que o ADHA

extraído de vegetais seja formado durante o processo de extração, não existindo enzimas específicas para a redução do ADHA (MORELL *et al.*, 1998), enquanto outros acreditam na presença de níveis significativos de ADHA e enzimas específicas para este composto (FOYER & MULLINEAUX, 1998). A questão existente envolve a real especificidade das enzimas purificadas e sequenciadas para o ADHA, ou se estas seriam apenas proteínas inespecíficas com capacidade redutora deste composto.

MORELL *et al.* (1997) afirmaram que uma proteína purificada dos cloroplastos de espinafre apresentou dupla atividade: como DHAR quando se encontrava em seu estado reduzido, e como inibidor de tripsina quando em seu estado oxidado. Este comportamento se repetiu quando os autores realizaram ensaios com inibidores de tripsina da soja comercializados. A análise da seqüência N-terminal das proteínas demonstrou alta similaridade entre a DHAR e os inibidores de tripsina tipo Kunitz. Em contrapartida, KATO *et al.* (1997) purificaram uma proteína DHAR com seqüência N-terminal bastante distinta das até então conhecidas. Este fato pode demonstrar que algumas proteínas podem apresentar atividade DHAR, mas a DHAR não possui atividade de outras enzimas, embora MORELL *et al.* (1997) afirmem que esta enzima não é senão um artifício encontrado em vegetais. A metodologia utilizada para a determinação da atividade da DHAR é bastante questionada por MORELL *et al.* (1998), que afirmam não haver precisão sobre a presença de interferentes com capacidade redutora no meio protéico estudado. FOYER *et al.* (1998), entretanto, afirmam haver resultados bastante enfáticos que comprovam a existência da DHAR em diversas espécies vegetais.

Esta questão permanece em aberto, embora haja muitos estudos sobre comportamento das enzimas em tecidos submetidos a fatores estressantes (URANO *et al.*, 2000;), e sobre inibidores de tripsina que possuem capacidade de reduzir o ADHA (HOU & LIN, 1997).

A variação no conteúdo de ácido ascórbico durante o amadurecimento de frutos é resultado da interação entre as atividades de todas as enzimas

mencionadas, e também da contribuição de agentes não enzimáticos como glutatona e presença de metais, entre outros. Desta forma, o estudo de alguns destes fatores poderá auxiliar a compreensão do mecanismo de controle dos níveis de AA, e conseqüentemente, auxiliar no fornecimento de novas ferramentas para sua manutenção nos alimentos. A manipulação genética possibilitaria a produção de frutos com maiores níveis de AA, e conseqüentemente, maior resistência a estresses, diminuindo perdas na produção originadas por condições adversas durante o plantio e desenvolvimento das plantas, por injúrias durante a colheita e transporte, ou ainda por más condições de armazenamento. Além disto, também permitiria a produção de alimentos com maior aporte vitamínico.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência de algumas enzimas sobre a variação do conteúdo de ácido ascórbico e ácido desidroascórbico, determinando as atividades de 5 enzimas envolvidas nas reações de síntese, degradação e regeneração destes durante o desenvolvimento e amadurecimento pós-colheita de manga var. Keitt e amadurecimento da goiaba de polpa branca var. Paloma.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS.

As mangas, da variedade Keitt, foram colhidas em diferentes estádios durante o desenvolvimento (90, 120 e 180 dias após a antese) e no ponto de colheita comercial (207 dias após a antese), tendo sido fornecidas por produtor comercial localizado na cidade de Joanópolis, SP. As frutas colhidas antes do ponto de colheita comercial foram fatiadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, no mesmo dia em que foram recebidas (um dia após a colheita). As frutas colhidas no ponto de colheita comercial foram armazenadas em câmaras com temperatura controlada em 25°C, e amostradas diariamente, até o total amadurecimento. As mangas foram amostradas aleatoriamente, descascadas, fatiadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, e mantidas em ultrafreezer a -80°C até o momento de análise.

As goiabas brancas, da variedade Paloma, foram adquiridas na CEASA de São Paulo. As frutas encontravam-se no estágio verde do amadurecimento, em ponto de colheita comercial, com cerca de 3 dias após a colheita. As frutas foram armazenadas em câmaras com temperatura controlada, a 6°C, 16°C e 25°C, considerada esta última como temperatura ambiente, e foram amostradas 1, 2 e 3 dias após o armazenamento, quando se apresentaram totalmente amadurecidas, e 7 dias após o armazenamento, quando se apresentaram muito maduras. Para a amostragem, composta por quatro frutos, foi retirada a polpa central que contém as sementes, das goiabas. Metade da polpa periférica de cada fruto foi fatiada e imediatamente congelada em nitrogênio líquido, e mantida a -80°C até o momento da análise; a outra metade foi utilizada para a análise de textura.

Os frutos utilizados para os testes de infiltração foram adquiridos no mercado local, em dois estádios do amadurecimento: verde, caracterizado pela cor verde escura da casca e textura rígida, ou madura, caracterizada

pela cor amarelada da casca e textura macia. O procedimento de infiltração será descrito adiante.

4.2. ANÁLISE DE TEXTURA.

A análise de textura foi realizada apenas para as goiabas submetidas a resfriamento. Metade da polpa periférica de cada fruto foi cortada em dois pedaços iguais de cerca de 3x3cm, e cada uma destas partes foi submetida ao texturômetro TA-XT2 (SMS Godalming, Surrey, England) utilizando como instrumento cortante uma guilhotina, onde foi medida a força máxima de cisalhamento aplicada pelo aparelho. Os resultados foram fornecidos em KgF, e foram obtidos pela média de duplicata de análise para cada 4 frutos analisados, para cada tratamento.

4.3. ANÁLISE DA RESPIRAÇÃO E PRODUÇÃO DE ETILENO.

Para a análise de respiração e produção de etileno nas goiabas submetidas ao resfriamento, foram colocados 3 frutos em cada frasco, fechando-os hermeticamente. Foram usados 3 frascos para cada análise. Os frutos utilizados para a determinação da respiração e produção de etileno foram mantidos os mesmos durante toda a amostragem.

Após 1 hora, uma amostra de 1mL do ar do interior do frasco foi retirada e aplicada em cromatógrafo a gás (HP 6890 series, Analytical Development Co., HP Instruments, Little Falls, Delaware, USA), utilizando coluna Porapack Q com detetor de condutividade térmica (TCD) para o caso do CO₂, e detetor de ionização de chama (FID) para o caso do etileno. As análises foram realizadas em triplicata para cada frasco.

4.4. INFILTRAÇÃO COM L-[1-¹⁴C]-GALACTOSE NA GOIABA BRANCA E MANGA KEITT.

Para a infiltração da galactose marcada, foram utilizados dois estádios do amadurecimento: verde e maduro. Para cada estágio foram utilizados dois frutos. As amostras foram cortadas em pedaços quadrados de tamanho

aproximadamente igual, pesadas e infiltradas, totalizando 18 fatias para cada estágio. Duas fatias foram congeladas imediatamente, compondo as amostras controle. Em 8 fatias foram aplicados 50 μ L de água pura; nas 8 fatias restantes, foram aplicados 50 μ L de uma solução contendo 3,7kBq de L-[1-¹⁴C]-galactose. Para cada tratamento (água ou galactose), quatro fatias foram congeladas após a total infiltração (cerca de 1h após a aplicação para a goiaba e 30 minutos após a infiltração para a manga), e quatro fatias foram congeladas 2 horas após a total infiltração. As amostras foram pulverizadas em gral de porcelana com nitrogênio líquido, e armazenadas em ultrafreezer -80°C até o momento das análises.

4.5. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.

4.5.1. EXTRAÇÃO DA AO, APX, MDHAR E DHAR

Para a extração das enzimas de regeneração e degradação, que são citossólicas, foi feita homogeneização do tecido com tampão fosfato de potássio 0,2M pH 6,5 contendo 5mM EDTA e 1% polivinilpirrolidona (PVP), em proporção 1:2 no caso da manga e 1:5 no caso da goiaba. Após centrifugação de 20 minutos a 12.000 x g, o extrato bruto protéico foi fracionado com sulfato de amônio sólido de modo a atingir a faixa de saturação 20-80%. As proteínas precipitadas nesta faixa foram retomadas em tampão fosfato de potássio pH 6,5, dialisadas "overnight" contra o mesmo tampão, e utilizadas como extrato enzimático. A concentração de proteínas extraídas foi quantificada pelo método de Bradford (BRADFORD *et al.*, 1976).

4.5.2. EXTRAÇÃO DA GLDHASE

Para a extração da GLDHase, que é mitocondrial, foi realizada homogeneização do tecido com tampão HEPES 100mM pH 7,4 contendo sacarose 0,4M, PVP 2%, e β -mercaptoetanol (OBA *et al.*, 1995). Após filtração em 4 camadas de gaze, o extrato foi centrifugado por 10 minutos a

12.000 x g, e o precipitado foi lavado duas vezes com tampão fosfato de potássio 0,1M contendo 0,4M de sacarose. A seguir, o precipitado foi incubado por 1h com solução de Triton X-100 0,05% em banho de gelo, e novamente centrifugado por 10 minutos a 12.000 x g. O sobrenadante, compondo a fração mitocondrial solúvel, foi utilizado como extrato enzimático. A quantidade de proteínas extraídas foi quantificada pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), através de kit Bio-Rad®, seguindo as instruções do protocolo do fabricante. A curva padrão foi realizada com concentrações entre 10 a 100 µg de albumina de soro bovino.

4.6. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.

A atividade da AO foi realizada segundo BERGMEYER *et al.* (1983), utilizando como meio reacional 500µL de ácido ascórbico 0,5mM em tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7,0 e 50µL de extrato enzimático. Após 5 minutos de incubação a 30°C, a reação foi cessada com a adição de 1,5 mL de HCl 0,2M, e a absorvância determinada em UV a 245nm ($\epsilon_{245}=10$). A atividade foi calculada pela seguinte equação:

$$\mu\text{M}.\text{min}^{-1}.\text{mL}^{-1} = \frac{(\text{Abs B} - \text{Abs T}) \times V_{\text{final}}}{\epsilon_{245} \times t \times V_{\text{amostra}}} \quad (I)$$

onde Abs.B é a absorvância fornecida pelo branco de reação, composto por meio reacional contendo tampão no lugar do extrato enzimático, Abs.T é a absorvância fornecida pela amostra, V_{final} é o volume total de reação, ϵ_{245} é a absorvância molar para o ácido ascórbico em meio ácido, t é o tempo de incubação e V_{amostra} é o volume adicionado de amostra ao meio reacional.

A atividade da APX foi realizada de forma semelhante. Após os 5 minutos de reação para determinação da AO, nas mesmas condições descritas acima, foi adicionado à mistura reacional 100µL de peróxido de hidrogênio 10mM, deixando-se reagir por mais 5 minutos. A reação foi então cessada pela adição de 1,5mL de HCl 0,2M. O branco de reação foi obtido cessando-se a reação após os 5 minutos iniciais, e em seguida,

adicionando-se 100 μL de H_2O_2 10mM. Desta forma, procurou-se evitar uma possível superestimação da atividade peroxidásica, causada pela atividade de AO. O cálculo de atividade foi através da equação (I), levando-se em consideração as alterações no volume final de reação, e sendo Abs.B a absorbância dada após a atividade da AO.

As atividades de MDHAR e DHAR foram determinadas segundo HOU & LIN (1997). A atividade MDHAR foi realizada incubando-se 100 μL de extrato enzimático com 900 μL do meio de atividade composto por tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7,0 contendo NADH 0,33M, AA 0,5mM e AO 9U/mL. A absorbância foi monitorada a 340nm, pela oxidação do NADH a NAD^+ , e a atividade foi calculada pela diferença de absorbância entre tempos, utilizando-se a equação (I) modificada:

$$\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} = \frac{(\Delta\text{Abs}_{340}) \times V_{\text{final}}}{\epsilon_{340} \times \Delta t \times V_{\text{amostra}}} \quad (\text{II})$$

onde ΔAbs_{340} é a diferença entre as absorbâncias num determinado intervalo de tempo Δt). A 340nm, a absorvidade molar do NADH é 6,27.

A atividade DHAR foi realizada incubando-se 100 μL de extrato enzimático com 900 μL do meio de atividade composto por tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7,0 contendo uma solução de ácido ascórbico 0,5M oxidado com carvão ativado por HCl, originando ácido desidroascórbico. A oxidação foi considerada total, visto que a absorbância a 265nm caiu de 3 para 0,1 unidades. O aumento da absorbância causado pela atividade enzimática foi monitorado a 265nm, pela redução do ADHA a AA, e a atividade foi calculada utilizando-se a equação (II). A 265nm, a absorvidade molar do ácido ascórbico é 7.

A atividade da GLDHase foi realizada segundo OBA et al (1998). O meio reacional foi composto por 370 μL de tampão HEPES 0,01M pH8,0 contendo citocromo C 1,2M e 50 μL de fração mitocondrial solubilizada. Após estabilização da absorbância a 550nm, foi adicionado 17 μL de L-galactono-1,4-lactona 2,5 mM, e o aumento na absorbância, devido à oxidação do citocromo C, foi acompanhado por 40 minutos. O cálculo de atividade foi realizado através da equação (II) multiplicada por um fator $\frac{1}{2}$, para obtenção

da atividade relacionada ao ácido ascórbico, visto que para a formação de uma molécula de AA, utiliza-se 2 moléculas de citocromo C.

4.7. ANÁLISE DE ÁCIDOS ASCÓRBICO E DESIDROASCÓRBICO.

As análises do AA e do ADHA foram realizadas segundo RIZZOLO *et al.*, 1984. As amostras previamente pulverizadas com nitrogênio líquido foram homogeneizadas com solução de ácido metafosfórico a 0,1%, em proporção 1:5 no caso da manga e 1:10 no caso da goiaba. Após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore® de 0,45µm, e diluído 1 vez com ácido metafosfórico para a análise do AA e com ditioneitol (DTT) 0,5M para a análise da vitamina C total. O conteúdo de ADHA foi obtido pela diferença entre o conteúdo de vitamina C total e de AA. As amostras foram analisadas em HPLC utilizando coluna µBondapak C₁₈ 300mm de comprimento e porosidade 10µm (Waters), fase móvel composta por tampão acetato de sódio 0,2M pH 4,5, fluxo de 1,5mL/min. A curva padrão foi feita com padrões de AA de concentrações entre 10 e 100µg/mL. A detecção foi feita por UV a 254nm.

Para a análise do AA e do ADHA nas amostras infiltradas com galactose marcada, foi utilizada extração foi feita da mesma forma descrita acima, porém as condições usadas no HPLC foram distintas: Coluna LiChrospher RP-8 (HP), fase móvel tampão fosfato de potássio 0,5% pH 3,5, contendo 5 mM de cloreto de tributilamônio (TBA); fluxo 1,0 mL/min, detecção UV 254nm para o AA e 220nm para o ADHA.

Para a quantificação da conversão de L-[1-¹⁴C]-galactose em AA e ADHA, foram recolhidos os picos referentes a estes compostos, após a separação pelo HPLC. Uma alíquota foi misturada à solução cintiladora, e analisada em cintilador líquido (Tri-Carb 1900, Canberra Packard).

4.8. ANÁLISE DE ÁCIDO OXÁLICO.

A análise do ácido oxálico foi realizada segundo ZHANGUO & JIURU (2002). As amostras previamente pulverizadas com nitrogênio líquido foram

homogeneizadas com ácido clorídrico 0,5M em proporção 1:1, durante 1 minuto em Ultraturrax Polytron. Em seguida, as amostras foram levadas a 100°C durante 15 minutos em banho-maria, e centrifugadas por 20 minutos a 12.000 x g. O sobrenadante foi filtrado em membranas com diâmetro de 0,22µm, e analisadas em HPLC. As condições de corrida foram: coluna Luna 250 x 4,6mm (Phenomenex), fase móvel tampão fosfato de amônio 0,5% pH 2,8, fluxo 1,0 mL/min, detecção UV a 214nm, tempo de retenção 2,28 minutos. A curva padrão foi realizada com padrões de AOx em HCl 0,5M, com concentrações variando entre 10 a 1500 µg/mL.

Para a análise do oxalato marcado, a extração foi realizada segundo KEATES *et al.* (2000), que consiste em homogeneização do tecido com uma solução de H₂SO₄ 8mM, contendo 2% PVP e 10mM DTT, durante 1 minuto em Polytron. Após centrifugação a 12.000 x g por 20 minutos, o sobrenadante foi precipitado com acetato de cálcio sólido até atingir a concentração de 1M, sob agitação constante. A solução foi centrifugada novamente a 12.000 x g por 20 minutos, e o precipitado foi lavado com água pura e centrifugado novamente a 12.000 x g por 20 minutos. O precipitado foi então retomado em 500µL de HCL 0,5M, fervido por 15 minutos para facilitar a solubilização, resfriado e adicionado da solução cintiladora, e analisado em cintilador líquido (Tri-Carb 1900, Canberra Packard).

4.9. EXTRAÇÃO DO RNA E NORTHERN BLOTTING.

A extração de RNA total foi realizada segundo LÓPEZ-GÓMEZ & GÓMEZ-LIM (1992), com modificações. As amostras (2g) foram trituradas em gral de porcelana com nitrogênio líquido. Em seguida, adicionou-se 10 mL de solução extratora composta por tampão Tris-HCl 150 mM pH 7,5, 2% SDS, 1% 2-β-mercaptoetanol e EDTA 50 mM, homogeneizando-se o material com auxílio do pistilo, e centrifugando-se a 12.000 x g por 10 min. Adicionou-se ao sobrenadante 0,25 volumes de etanol absoluto e 0,11 volumes de acetato de potássio 5M, com agitação por 1 minuto. A essa mistura foi adicionado 1 volume de clorofórmio, centrifugando-se a 12.000 x

g por 10 min. A fase aquosa (superior) foi recolhida, adicionada de 1 volume de fenol/clorofórmio e centrifugada por 10 min a 12.000 x g, e novamente extraída com 1 volume de clorofórmio e centrifugada a 12.000 x g por 10 min. A fração aquosa foi cuidadosamente transferida para tubo de vidro e o RNA contido foi precipitado por adição de 0,43 volume de cloreto de lítio 10 M, a -20°C por 12h. Após centrifugação a 12.000 x g por 1 h, o RNA precipitado foi recuperado e solubilizado em 2 mL de tampão TE. Em seguida, o RNA foi re-precipitado pela adição de 3 volumes de etanol e 0,1 volumes de acetato de potássio 5 M, mantido a -20°C por 2 h, centrifugado por 1 h a 12.000 x g e retomado em 200 µL de tampão TE. A concentração do RNA foi determinada a 260 nm, sendo que 40 µg de RNA por mL correspondem a 1,0 unidade de densidade ótica (D.O.). O material foi dividido em alíquotas, precipitado com 3 volumes de etanol e 0,1 volume de acetato de potássio 5M e armazenado em freezer -80°C.

Para o Northern blotting, amostras com 15 µg de RNA foram separadas em gel desnaturante de agarose, contendo 2,2 M de formaldeído (SAMBROOK *et al.*, 1989) e transferidas a vácuo para membrana de Nylon (Hybond N+, Amersham Biosciences). Foi utilizada uma sonda completa de cDNA específica para a GLDHase de morango, com cerca de 1,6 kb (Genebank, AY102631). A marcação da sonda foi feita com $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP, conforme o protocolo do kit Ready-To-Go DNA Labelling Beads (Amersham Biosciences) e a reação de hibridização foi conduzida durante 12 horas, a 65°C. As lavagens da membrana obedeceram a seguinte ordem: SSC(2x)/0,1%SDS, por 10 minutos (2 vezes) e SSC(1x)/0,1%SDS, por 15 minutos, em temperatura ambiente. A revelação foi feita por auto-radiografia, após 4 dias de exposição da membrana.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PARTE I: ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE MANGA var. KEITT E GOIABA BRANCA var. PALOMA

Como visto anteriormente, o conteúdo de AA difere grandemente entre espécies ou cultivares de frutas e outros vegetais. Os fatores que exercem alguma influência neste comportamento estão ainda pouco esclarecidos, e realizamos neste estudo uma tentativa de comparar atividades de enzimas relacionadas ao metabolismo do AA em dois frutos, sendo que em um deles, a manga, o teor de AA diminuiu durante o período estudado, enquanto que no outro, a goiaba, o conteúdo de AA aumentou.

5.1.1. EVOLUÇÃO NOS TEORES DE ÁCIDOS ASCÓRBICO E DESIDROASCÓRBICO E CORRELAÇÃO COM A ATIVIDADE DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NA SUA SÍNTESE, DEGRADAÇÃO E REGENERAÇÃO.

Os resultados obtidos na análise da variação dos conteúdos de AA e ADHA na manga e na goiaba, assim como as atividades das enzimas envolvidas no seu metabolismo, estão apresentados na Figura 9.

5.1.1.1. VARIAÇÃO NOS CONTEÚDOS DE ÁCIDO ASCÓRBICO E ÁCIDO DESIDROASCÓRBICO

A análise de AA e ADHA na manga Keitt demonstrou que ocorre uma diminuição considerável em seus teores durante o término do desenvolvimento do fruto, pouco antes do ponto de colheita. Após este ponto, o conteúdo de AA permaneceu praticamente inalterado até o total amadurecimento, a não ser por um pequeno aumento ocorrido no 4º dia após a colheita (DPC), que torna a decair em seguida. O conteúdo de ácido desidroascórbico apresenta uma queda de aproximadamente 70% na fase

de crescimento do fruto. Estes níveis permanecem inalterados até o ponto de colheita, quando há um pequeno aumento (2ºdpc), voltando a decair em seguida, até o final do amadurecimento.

A goiaba branca, por outro lado, apresenta, na fase pós-colheita, um aumento no conteúdo de AA durante o período de armazenamento e amadurecimento (Fig. 9 B). Pode-se observar um aumento do 2º dpc até o final do amadurecimento. O conteúdo de ADHA apresenta uma queda inicial, do 2º ao 3º dpc, seguido de um brusco aumento no 4º dpc. Após este período, os níveis de ADHA tornam a decair de forma linear mais lenta.

Como vemos, a manga, ao contrário da goiaba, não é um fruto com grandes quantidades de AA, variando entre 25 a 30 mg/100g no fruto maduro (BERNARDES-SILVA, 2000). Pode-se perceber que a perda de AA durante o amadurecimento da manga está de acordo com o descrito por BERNARDES-SILVA (2000) para a variedade Keitt, e parcialmente de acordo com os apresentados por CARRILLO-LOPEZ *et al.* (2000), e LEE & KADER (2000), também para variedade Keitt. O aumento nos teores de AA, ocorrido na goiaba também encontra-se de acordo com RODRIGUEZ *et al.* (1971), TAYLOR (1996), EL BULK *et al.* (1997) e MERCADO-SILVA *et al.* (1998), o que sugere que, tanto no caso da manga quanto no caso da goiaba, a espécie parece ser mais determinante do que a variedade, em termos do perfil de comportamento dos níveis do AA durante o amadurecimento. As variedades de manga Haden, Palmer e Van Dyke, também apresentam uma queda nos níveis de AA durante o período de desenvolvimento, mantendo-se estáveis após a colheita (BERNARDES-SILVA, 2000). Apenas a variedade Tommy Atkins, apresenta um significativo aumento do conteúdo de AA durante o desenvolvimento do fruto, mantendo-se inalterado após o período da colheita. Outros estudos realizados durante o amadurecimento da manga, indicam que há degradação do AA neste período (LAKSHIMINARAYANA *et al.*, 1970; PANDEY *et al.*, 1974; MEDLICOTT & THOMPSON, 1985; CARDELLO *et al.*, 1998). A indução no amadurecimento da manga, entretanto, leva a frutos com conteúdo total 40% menor de AA (VINCI *et al.*, 1995). Isto poderia ser explicado pela utilização

do AA na síntese de etileno (AWAD, 1993), que, neste caso, estaria aumentada.

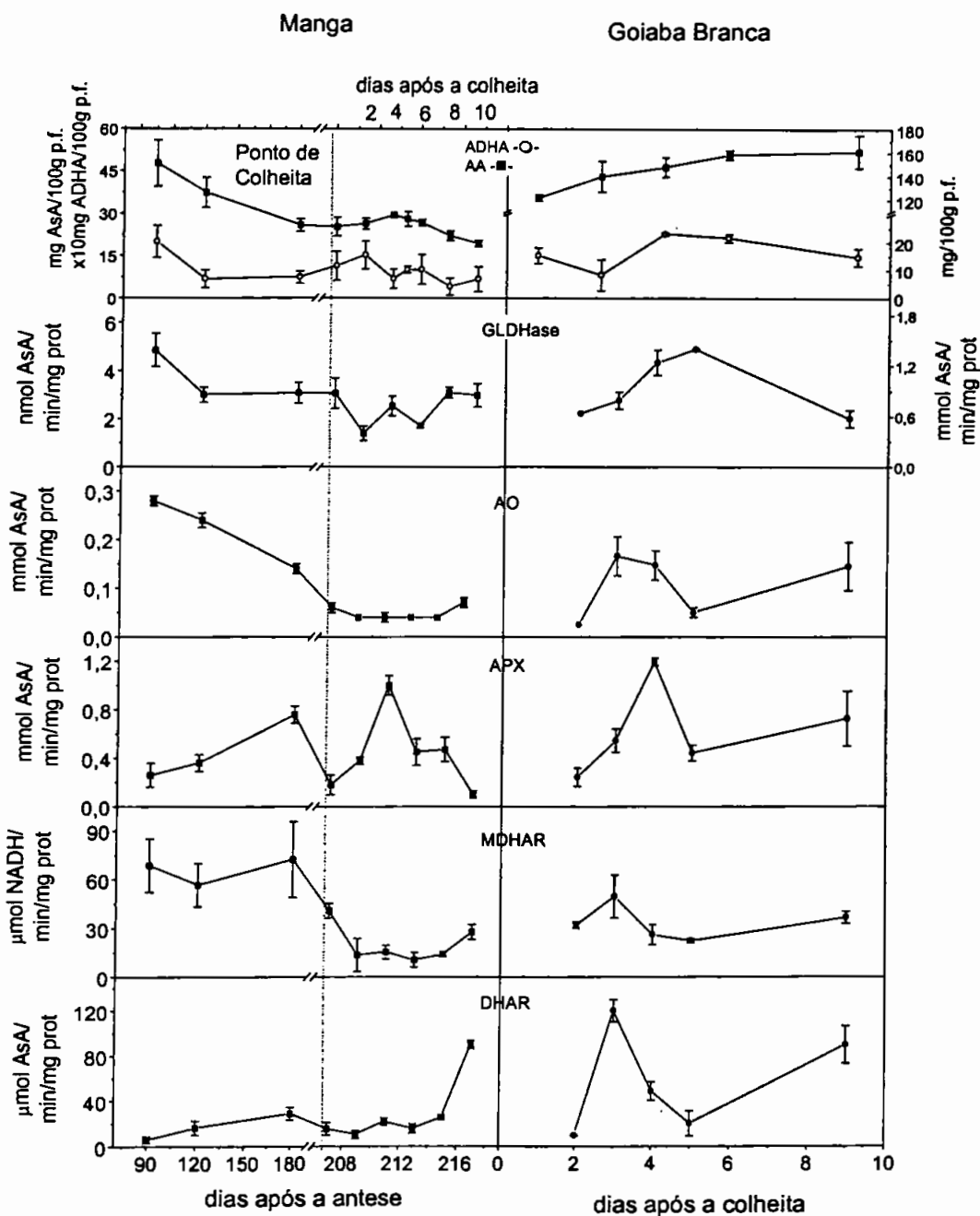


Figura 9. Conteúdos de AA e ADHA, e atividades das enzimas de síntese (GLDHase), degradação (AO e APX) e regeneração (MDHAR e DHAR) do ácido ascórbico durante o amadurecimento da manga var. Keitt e amadurecimento da goiaba branca var. Paloma.

Na goiaba, o aumento do AA se deu de forma sigmoideal, conforme o descrito por EL BULK *et al.* (1997) e SALMAH & MOHAMED (1987, citados por LIZADA, 1996), em quatro diferentes variedades estudadas. LIZADA (1996) descreve conteúdos variando entre 275mg/100g e 372mg/100g, que se mostram similares para frutos maduros de goiabas branca e vermelha. Após o amadurecimento, e durante a senescência, o conteúdo de vitamina C na goiaba tende a diminuir (LIZADA, 1996), possivelmente por ocorrer, nesta fase, uma desorganização das estruturas celulares, originando diversos fatores estressantes para a célula. HULME (1971) e GIOVANELLI *et al.* (1999), em estudos utilizando tomate, também verificaram um aumento no conteúdo de AA do fruto verde ao maduro, com uma pequena queda no período final do amadurecimento, coincidentemente com o início do amolecimento do fruto, podendo indicar uma possível ação do AA sobre polissacarídeos da parede celular, como determinado *in vitro* por FRY (1999).

Pode-se notar, entretanto, que nos dois frutos a variação nos níveis de ADHA não se apresentaram proporcionais ao comportamento do AA. A variação nos teores de ADHA durante o amadurecimento da goiaba não se deu de forma a acompanhar a variação do AA. Na manga, não houve aumento de ADHA concordante com o decréscimo do AA, o que indica a possibilidade de haver degradação do mesmo, com possível produção de ácido 2,3-dicetogulônico (ADKG), que é produto da reação irreversível de oxidação do ADHA. Após a oxidação do ADKG, há a formação de diversos compostos de baixo peso molecular, como treonato e lixionato (DEUTSCH, 2000). Outra possibilidade é a formação de oxalato, produto da degradação do AA, que está presente em baixas quantidades na manga (LIZADA, 1996). Ainda não é sabido, entretanto, se o AOx é formado a partir da quebra da cadeia do AA, diretamente, ou do ADKG, nem o tipo de modulação desta reação. Outros autores afirmam que o AOx é formado diretamente da molécula de ADHA (LOEWUS, 1988), uma vez que o ADKG é muito instável, mas também não existem estudos disponíveis na literatura que confirmem esta hipótese. Em folhas de *Pistia stratiotes* (KEATES *et al.*, 2000) ocorre

formação direta de AOx a partir de AA marcado infiltrado, mas não de outros supostos precursores, como os glicuronatos, por exemplo. Esta especificidade leva à suposição de uma via enzimática de síntese de AOx a partir do AA. Em um estudo com *Myrothecium verrucaria*, WHITE & KRUPKA (1965) levantaram a hipótese da ocorrência de uma enzima que hidrolisa o ascorbato, liberando como produto o oxalato e treonato, mas também esta hipótese não foi devidamente comprovada.

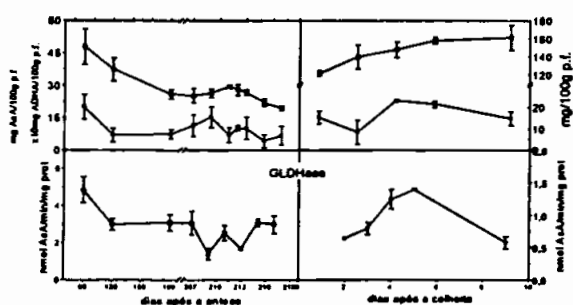
Outros frutos também apresentam aumento nas quantidades de AA. Morangos de diferentes variedades apresentaram um aumento no conteúdo de AA, durante o período de desenvolvimento e amadurecimento (CORDENUNSI *et al.*, 2002), apesar de seguirem diferentes perfis durante este período. As variedades Toyonoca e Oso Grande apresentaram aumento contínuo nos níveis de AA, enquanto que as variedades Dover e Pajaro pareceram não apresentar modificações durante o período estudado. As variedades Mazi e Campineiro apresentaram um aumento nos primeiros estádios, permanecendo então praticamente inalterados nos estádios seguintes. Estes resultados comprovam que a espécie do fruto é determinante no conteúdo e comportamento do AA durante o amadurecimento, mas que este também pode sofrer interferência do cultivar.

Na manga, podemos supor que o sistema de degradação do AA está predominando sobre o sistema de geração (síntese e regeneração). Já na goiaba, por outro lado, o aumento no conteúdo de AA pode indicar que o sistema de síntese está ativado, sobrepujando a degradação do mesmo. Na goiaba, o sistema de regeneração parece não estar ativo suficientemente no 4ºdpc para evitar um aumento no conteúdo de ADHA neste período. Já na manga, não ocorre variação no conteúdo de ADHA, o que pode indicar sistema de regeneração ativo, mesmo que não o suficiente para elevar os níveis de AA, ou degradação para compostos menores.

5.1.1.2. VARIAÇÃO DAS ATIVIDADES DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DO AA

A. *L-Galactono-1,4-Lactona Desidrogenase*

A atividade da enzima GLDHase pode ser associada ao comportamento do AA tanto para a manga quanto para a goiaba. Percebe-se uma queda na atividade durante o desenvolvimento da manga, que coincide com a queda



de AA observada neste fruto. Logo após a colheita, a atividade sofreu uma queda ainda maior, mas iniciou um aumento progressivo até o final do amadurecimento. Pode-se notar, ainda, que um pequeno pico de

atividade no 4 dia após a colheita é refletido no conteúdo de AA, que também apresenta um pequeno aumento neste mesmo período.

Na goiaba branca, também pode-se observar concordância entre a atividade da GLDHase e a variação no conteúdo de AA durante o período do amadurecimento. Nota-se um aumento do 2^o ao 5^o dpc, e uma queda significativa até o final do amadurecimento.

Estes resultados encontram-se de acordo com o apresentado por IMAHORI *et al.* (1998), que também verificaram alta correlação entre a atividade da GLDHase e a variação dos níveis de AA durante o amadurecimento do pimentão amarelo. Por estes dados pode-se supor que esta enzima está fortemente associada ao comportamento global do AA, ou seja, ao perfil de variação apresentado pelo fruto durante o seu desenvolvimento e amadurecimento. Apesar desta verificação, CONKLIN *et al.* (1997), estudando uma variedade mutante de *Arabidopsis* (*vtc-1*) que apresenta apenas 30% do conteúdo de AA da variedade selvagem, não verificaram correlação entre esta deficiência e a atividade da GLDHase, indicando, assim, a associação direta com o tamanho do pool de ascorbato, e que diferença na atividade da desidrogenase não é fator causador do menor conteúdo de AA observado. Na realidade, posteriormente foi

verificado que o fator de deficiência no conteúdo de AA neste mutante é a deficiência de uma outra enzima, a GDP-manose-3",5"-epimerase, que catalisa a produção de GDP- β -L-galactose a partir da GDP- α -D-manose, confirmando que a falta de substrato para a GLDHase é, sim, o verdadeiro fator de deficiência encontrado (WOLUCKA *et al.*, 2001).

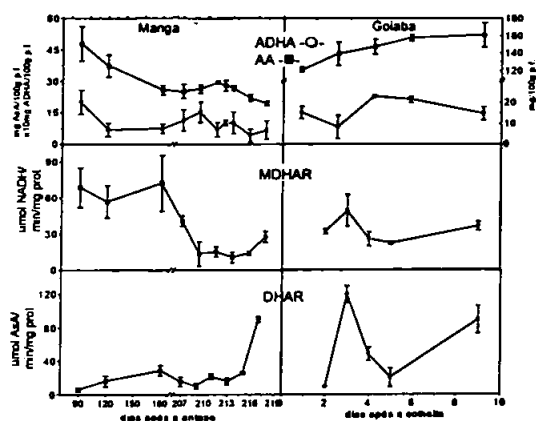
O aumento no conteúdo de AA durante o amadurecimento da goiaba, relacionado à atividade da GLDHase, indica que está ocorrendo síntese neste período. Este resultado, se encontra em desacordo com o observado por BARATA-SOARES (2001), que verificou em estudo com infiltração de galactose, uma leve diminuição no conteúdo de AA em goiaba branca indicando que, no fruto maduro, o sistema de síntese não estaria ativado o suficiente para aumentar o seu conteúdo. Esta controvérsia poderia ser explicada pelo sistema utilizado para a realização deste estudo, onde o autor utilizou fatias do fruto para a infiltração dos compostos marcados. É possível que, para a goiaba branca, no estágio do amadurecimento analisado, este sistema tivesse gerado um estresse onde as atividades das enzimas de degradação estariam mais ativas do que as enzimas de síntese/regeneração, e desta forma, mesmo que a síntese estivesse ocorrendo, a degradação, naquele momento, estaria predominante. Neste mesmo estudo, BARATA-SOARES encontrou aumento do conteúdo de AA na goiaba vermelha. Em pimentão amarelo, IMAHORI *et al.* (1998) verificaram um aumento da atividade da GLDHase durante o amadurecimento do fruto, associando-o ao aumento no teor de AA no mesmo período. Estes autores, entretanto, demonstraram que a atividade da GLDHase mostrou-se inalterada nos estádios iniciais, e apresentou um aumento brusco no último estágio do amadurecimento, enquanto que o AA sofre um aumento gradual em todo o período. Assim, não é possível associar diretamente, neste caso, a atividade da GLDHase ao conteúdo de AA. A atividade da enzima GLDHase ainda permanece pouco estudada em frutos, talvez devido à incerteza da sua função. Entretanto, após estudos que confirmam a catálise do último passo da biossíntese do AA, descritos por TABATA *et al.* (2001) em folhas, a tendência é de aumentarem os estudos

sobre esta enzima também em frutos, como forma de comparação entre sistemas vegetais, e elucidação da via bioquímica de síntese do AA.

B. Monodesidroascorbato Redutase e Desidroascorbato Redutase

A oxidação do AA gera inicialmente o monoânion monodesidroascorbato (MDHA), que se não for reduzido imediatamente, gera como produto final o desidroascorbato (DHA). A célula vegetal necessita, entretanto, manter o pool de ascorbato em sua forma reduzida, para que o sistema antioxidante permaneça ativo e eficiente. Para isto, duas enzimas são capazes de regenerar o ascorbato oxidado, que são a monodesidroascorbato redutase (MDHAR) e a desidroascorbato redutase (DHAR). Este sistema procura manter os níveis mínimos necessários que ofereçam proteção ao tecido vegetal, contando ainda com a ação da glutathiona reduzida e da enzima glutathiona redutase.

A atividade da MDHAR na manga Keitt sofreu uma queda brusca após a colheita, mantendo-se constante durante o amadurecimento, e apresentando um leve aumento no final deste período. A atividade da DHAR mostrou-se



praticamente inalterada durante o desenvolvimento e amadurecimento, apresentando um aumento no final do amadurecimento, que pode estar relacionado à desorganização celular que leva a uma diminuição nos teores de AA, e estaria ativando o sistema de regeneração.

Na goiaba branca, as atividades da MDHAR e da DHAR apresentaram o mesmo perfil, embora na DHAR as mudanças tenham sido mais acentuadas. Ocorreu um aumento do 2º para o 3º DPC, retornando aos níveis iniciais e mantendo-se praticamente inalteradas até o 9º DPC.

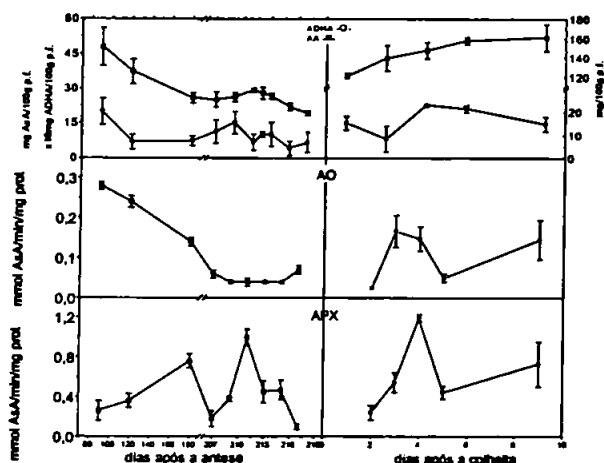
Na manga, as atividades das enzimas de regeneração apresentaram-se suficientes para manter o AA durante o amadurecimento da manga, mas

não para ocasionar um aumento deste conteúdo. Isto pode explicar o não aumento do conteúdo de ADHA apesar de estar havendo degradação contínua do AA. Também pode-se notar que um pequeno aumento na atividade da DHAR, concomitante com a GLDHase, ocasionou um aumento no conteúdo de AA e diminuição no teor de ADHA no 211º dpa (4º dia após a colheita). Na goiaba, as atividades da MDHAR e da DHAR apresentaram o mesmo perfil de comportamento. Entretanto, a atividade da DHAR se mostrou muito mais acentuada, indicando uma possível falha na redução do MDHA. Em diferentes variedades de amoras, foi detectado que as enzimas de regeneração do AA mantêm-se praticamente inalteradas durante o amadurecimento, sofrendo uma queda brusca apenas no estágio de senescência (WANG & JIAO, 2001). Do mesmo modo que na manga, as atividades da MDAHR e DHAR na amora pareceram apenas não permitir o aumento dos níveis de DHA nos tecidos, visto que em ambas, não há grandes variações nos períodos estudados. Em pimentão amarelo, IMAHORI *et al.* (1997) verificaram que a atividade da DHAR permaneceu constante durante o amadurecimento, mantendo a quantidade de ADHA praticamente inalterada neste período. Apesar da importância na manutenção dos níveis de AA nos tecidos, não são encontrados muitos estudos envolvendo as enzimas de regeneração do AA durante o amadurecimento de frutos. Em plântulas de ervilha, as atividades das enzimas de regeneração foram altas durante o período de germinação, permitindo um acúmulo de AA neste período, o que parece necessário para o crescimento do tecido (PALLANCA *et al.*, 1999). No pimentão amarelo, ao contrário, foi verificado que a atividade da MDHAR aumentou durante o amadurecimento, enquanto que a DHAR praticamente não se modificou (IMAHORI *et al.*, 1998). O conteúdo de ADHA, neste caso, não apresentou mudanças significativas, de onde se pode concluir que a atividade da DHAR se relaciona ao conteúdo de ADHA, e não diretamente ao AA, que pode sofrer outras interações. O mesmo poderia se aplicar à goiaba branca, uma vez que os perfis de atividade encontram-se inversamente proporcionais ao conteúdo de ADHA. Mais uma vez, pode estar ocorrendo uma modulação da

quantidade de ADHA presente no tecido, não somente em relação ao AA, mas também a alguma outra via que utilize o ADHA. Este comportamento das enzimas de regeneração provavelmente está associado à atividade das enzimas de degradação.

C. Ascorbato Oxidase e Ascorbato Peroxidase

A ascorbato oxidase da manga Keitt apresentou uma diminuição linear na atividade desde o desenvolvimento até o ponto de colheita.



Após este ponto, manteve-se inalterada, apresentando apenas um pequeno aumento no final do amadurecimento. A ascorbato peroxidase, entretanto, apresentou um aumento progressivo até o 180ºdpa, decaindo no ponto de colheita. No período pós-colheita,

a atividade apresentou um pico bastante definido no 4º dpc, decaindo em seguida até o fim do experimento. A AO na goiaba branca, por outro lado, demonstrou um aumento entre os dias 3 e 4, decaindo em seguida, e tornando a aumentar no final do amadurecimento. A APX também apresentou um pico significativo de atividade no 4º dpc, decaindo em seguida e mantendo-se inalterada até o 9º dpc.

As enzimas de degradação apresentaram comportamentos bastante distintos entre a manga e a goiaba. Queda na atividade da AO também foi observada em melões (DIALLINAS *et al.*, 1997), em carambola (BIN SAARI *et al.*, 1999), e em abóbora (ESAKA *et al.*, 1992), onde a atividade da AO foi maior nos frutos em desenvolvimento, decaindo após a total maturação. CARDELLO *et al.* (1998), por outro lado, verificaram um aumento significativo na atividade da AO, correlacionado à diminuição do AA, durante o amadurecimento da manga Haden. Este comportamento foi verificado na

goiaba, onde ocorreu um aumento na atividade da AO entre os dias 3 e 4 após a colheita, que pode estar associado ao maior conteúdo de ADHA neste período. MOSER & KANELIS (1994) e YAHIA *et al.* (2001) também observaram aumento da atividade da AO durante o amadurecimento do melão e do tomate, respectivamente, que possivelmente estaria associado à senescência do fruto. Em estudos preliminares, entretanto, pouca correlação pode ser estabelecida entre o conteúdo de AA e a atividade da AO no tomate, sendo que esta decai continuamente durante o amadurecimento. Nestes mesmos estudos, não foi possível correlacionar a atividade da AO com uma diminuição no conteúdo de AA durante o amadurecimento do mamão, uma vez que a enzima permanece inalterada no mesmo período (dados não apresentados). Em pimenta, apesar de ter sido descrito um aumento de atividade da AO no período de senescência, não houve correlação definitiva com a quantidade de AA, que sofreu uma diminuição antes do aumento da atividade oxidásica (YAHIA *et al.*, 2000). De acordo com dados apresentados na literatura, a atividade AO é necessária preferencialmente durante o início do desenvolvimento do fruto, quando estão ocorrendo divisão e crescimento celulares, que parecem ser modulados pela relação AA/ADHA. Isto foi verificado em melões (DIALLINAS *et al.*, 1997), onde os níveis de mRNA e atividade da AO foram maiores nos frutos jovens que nos maduros.

A atividade da ascorbato peroxidase mostra-se semelhante na manga e na goiaba, durante o período de amadurecimento. O pico de atividade encontrado em ambos os frutos pode indicar a formação de compostos radicais livres, onde se necessita a ação da peroxidase para a proteção do tecido contra injúrias, bem como das atividades das enzimas de síntese e regeneração para manter o conteúdo de AA em constante aumento. Nos dois frutos, o comportamento foi semelhante ao encontrado em pimentão amarelo (IMAHORI *et al.*, 1999), onde houve um pico de atividade entre os estádios intermediários do amadurecimento. Em morangos, a atividade da APX aumentou continuamente durante o processo de

desenvolvimento/amadurecimento do fruto (KIM & CHUNG, 1998). Em pimenta vermelha, também foi demonstrado um aumento da atividade e do mRNA transcrito para a APX (SCHANTZ *et al.*, 1995), fortemente relacionado à transição cloroplasto/cromoplasto. Nestes dois casos, no entanto, o conteúdo de AA aumentou durante o período de amadurecimento, não tendo sido estabelecida correlação entre a variação no conteúdo de AA e a atividade da APX. Em amora, a atividade peroxidásica decaiu constantemente durante o período de amadurecimento (WANG & JIAO, 2001), apesar de haver também uma diminuição no conteúdo de AA durante este período. Assim, a relação entre a atividade da APX e o conteúdo de AA deve ser atentamente verificado, dependendo da espécie estudada e das condições aplicadas. Em pimentão e em morangos, o aumento na atividade da enzima é diretamente proporcional ao estágio do amadurecimento (SCHANTZ *et al.*, 1995; KIM & CHUNG, 1998), e embora em nenhum destes estudos os autores tenham se referido ao conteúdo de AA nos frutos estudados, pela literatura é recorrente encontrar-se um aumento no teor de AA nestas duas espécies (AGAR *et al.*, 1997; IMAHORI *et al.*, 1998), assim como na goiaba branca. Neste caso, a atividade da APX poderia ser associada ao conteúdo de ADHA, mas há que se levar em consideração a atividade das enzimas de regeneração sobre este composto.

Desta forma, o conteúdo de AA na manga e na goiaba parece depender de uma interação entre os sistemas de síntese, regeneração e degradação. Na figura 10, procuramos ilustrar, de uma forma global, como estes sistemas influem na variação do AA durante os períodos em que os frutos foram analisados. Fica claro que na manga há uma predominância da atividade de degradação no período do amadurecimento, enquanto que na goiaba, os sistemas de síntese e regeneração se sobrepõem ao sistema de degradação. Não houve a tentativa de quantificar esta influência, apenas visualizar cada um dos fatores.

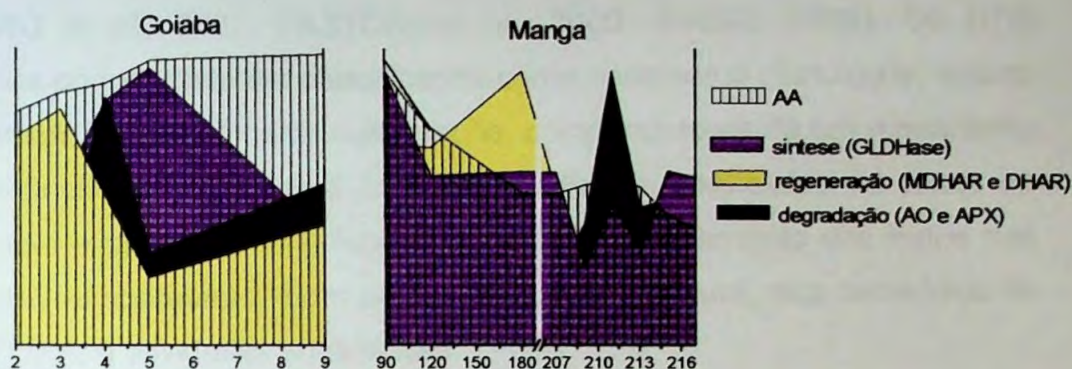


Figura 10. Ilustração da influência das atividades das enzimas que compõem os sistemas de síntese, degradação e regeneração do ácido ascórbico durante os estudos realizados. As escalas das atividades foram mantidas quais as apresentadas anteriormente.

5.2. PARTE II: COMPORTAMENTO DO SISTEMA METABÓLICO DO ÁCIDO ASCÓRBICO NA GOIABA BRANCA, SUBMETIDA À REFRIGERAÇÃO.

Uma vez que foi comprovada a síntese de AA durante o amadurecimento da goiaba branca, procurou-se analisar os efeitos do estresse causado pelo frio neste sistema. O abaixamento da temperatura é uma maneira prática e eficiente de aumentar a vida útil e a qualidade de frutas e vegetais (LEE & KADER, 2000). Entretanto, à medida que a temperatura diminui, ocorre na célula uma modificação na condição física dos lipídeos, que passam da estrutura líquido-cristalina para uma estrutura sólida, levando às injúrias pelo frio (LEE & LEE, 2000). A temperatura onde são iniciados estes processos pode ser determinada pela proporção entre os ácidos graxos saturados e insaturados, entretanto, este não seria o único mecanismo de injúria pelo frio, visto que frutos com a mesma composição lipídica podem apresentar sensibilidades diferentes às baixas temperaturas. O estresse oxidativo também contribui para que as injúrias ocorram, e, neste caso, o sistema antioxidante da célula deve estar ativado para a proteção às espécies reativas de oxigênio (ROS), que são formadas nestes casos

(RIVERO *et al.*, 2002, PASTORI *et al.*, 2000; WANG, 1998). Os ROS formados podem tanto ser classificados como compostos citotóxicos, quanto servirem de instrumentos de aclimação, como indutores de um mecanismo de tolerância ao frio (LEE & LEE, 2000). Foram verificadas as taxas de respiração e produção de etileno durante o armazenamento dos frutos nas diferentes temperaturas, além da modificação da textura, dos conteúdos de AA e ADHA, e atividades enzimáticas.

5.2.1. PARÂMETROS FISIOLÓGICOS: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA RESPIRAÇÃO E PRODUÇÃO DE ETILENO, E NAS MODIFICAÇÕES DE TEXTURA DA GOIABA

Na figura 11 são demonstrados os perfis de respiração e produção de etileno das goiabas brancas submetidas ou não à refrigeração. Pode-se perceber que no início da amostragem os níveis de CO₂ são muito mais altos, e decaem durante o período estudado, para todas as amostras. Para as amostras armazenadas sob temperatura ambiente e a 16°C, houve uma tendência de aumento no final do armazenamento, que poderia estar relacionado ao avançado amadurecimento, enquanto que nas amostras armazenadas a 6° este aumento foi bem mais sutil. Pode ser observada uma queda de cerca de 50% na produção inicial de CO₂ nas amostras armazenadas à temperatura ambiente; nas amostras armazenadas a 16°C e a 6°C, esta queda foi mais acentuada, cerca de 70% e 80%, respectivamente. Pode-se ver, ainda, que o abaixamento da temperatura levou a uma menor taxa respiratória nos frutos. A atividade respiratória é freqüentemente abaixada pelo uso da refrigeração, como ocorreu com as goiabas. BIALE & YOUNG (1954) demonstraram o efeito do abaixamento da temperatura em abacates, onde verificaram que a resposta é proporcional ao tratamento. Este tipo de comportamento também foi verificado em pêssegos (FERNANDEZ-TRUJILLO *et al.*, 1998), em sapote (DIAZ-PEREZ *et al.*, 2000), em tomates fatiados (ARTÉS *et al.*, 1999), em folhas de pepino (LEE & LEE, 2000) e em kiwi (MANOLOPOULOU & PAPADOPOULOU, 1998), mas não em tomates inteiros. O abaixamento de temperatura possivelmente diminui a velocidade de metabolismo dos frutos, e desta maneira, espera-se

que ocorra uma diminuição nos níveis de CO_2 e etileno apresentados. Não houve, entretanto, formação de picos definidos de respiração nas amostras, mas pode-se perceber que, uma vez que os níveis iniciais são mais altos, decaindo em seguida sem aumentar posteriormente, é possível que o pico respiratório tenha ocorrido antes da amostragem, uma vez que não se pode controlar estritamente o dia da colheita dos frutos. O aumento ocorrido no 9º dia, em todas as amostras, é devido possivelmente ao estágio avançado do amadurecimento em que se encontravam as goiabas.

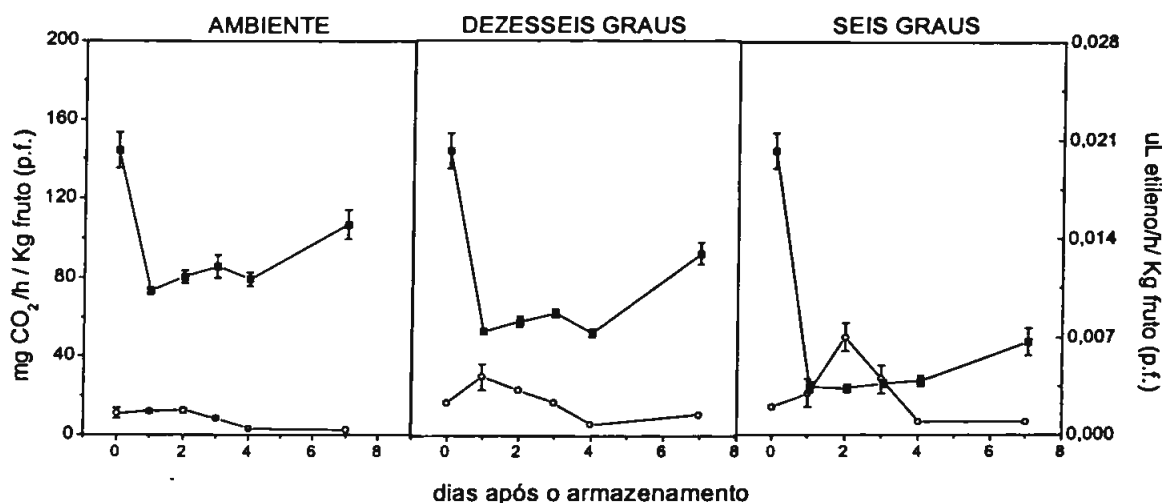


Figura 11. Perfis de respiração (quadrado) e produção de etileno (círculo) durante o armazenamento de goiabas brancas sob diferentes temperaturas.

A produção de etileno apresentou modificações entre os tratamentos. Para as amostras armazenadas à temperatura ambiente, não se pode saber se houve um pico de etileno antes do início da amostragem, uma vez que os níveis iniciais foram mantidos praticamente inalterados nos três primeiros dias de análise, decaindo em seguida. Para as amostras armazenadas a 16°C , houve um pequeno aumento no início do armazenamento, decaindo a seguir. Para as amostras armazenadas a 6°C , este aumento (pico) foi prorrogado para o segundo dia após o armazenamento, e apresentou maior intensidade. A produção de etileno pareceu ser estimulada com o abaixamento da temperatura, uma vez que os níveis atingidos nos frutos a 6°C são maiores que nas amostras armazenadas a 16°C , que por sua vez

são maiores que nos frutos armazenados à temperatura ambiente. Possivelmente, a refrigeração ocasionou um estresse adicional ao tecido, gerando este aumento na produção de etileno, que foi maior na temperatura de 6°C. Assim, tanto a respiração quanto a produção de etileno foram afetadas pelo abaixamento da temperatura, apesar de não ter havido a resposta habitual com formação de picos definidos, que poderiam ter oferecido resultados mais definitivos ao nosso estudo.

A modificação na textura das goiabas também sofreu influência da temperatura, e pode ser vista na figura 12. Com o resfriamento, pode-se perceber que, surpreendentemente, as amostras apresentaram um aumento da firmeza relacionado ao abaixamento da temperatura de armazenamento. Nas amostras armazenadas à temperatura ambiente, não houve modificações significativas de textura durante o amadurecimento. Já nas amostras submetidas a baixas temperaturas, percebe-se um pico de endurecimento no primeiro dia de armazenamento, que decai posteriormente até atingir os níveis iniciais. Quanto menor a temperatura, maior o pico de força necessária para cisalhar as amostras.

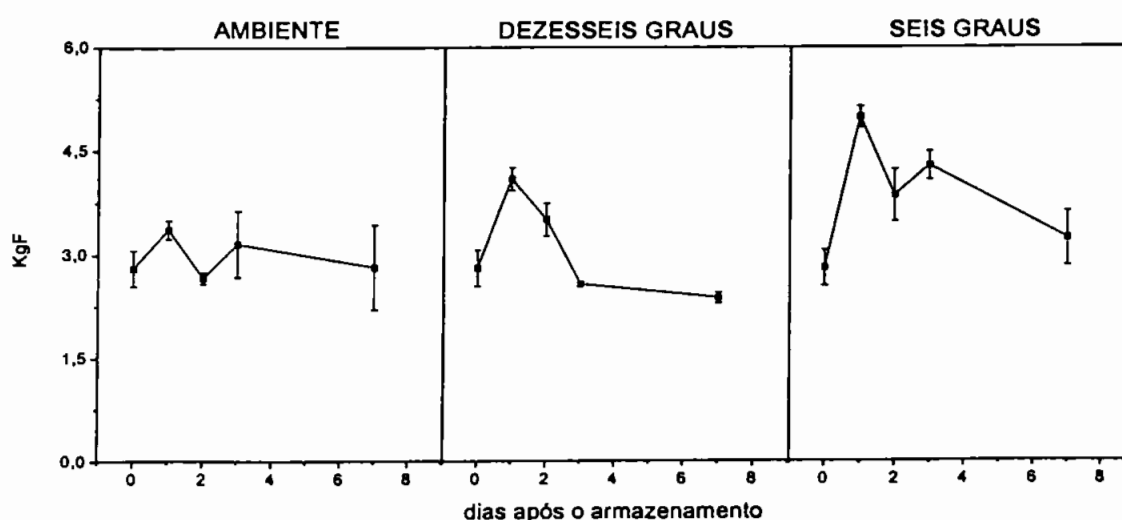


Figura 12. Variação da firmeza da goiaba branca durante o armazenamento sob diferentes temperaturas.

Em condições normais, a goiaba apresenta um rápido amolecimento devido à atividade de enzimas pécnicas; desta forma, é verificada uma maior

quantidade de pectinas nos frutos verdes que nos maduros (EL BULK *et al.*, 1997). A refrigeração pode ser utilizada para prevenir perda de umidade e murchamento em frutas, e desta forma, diminuir o amolecimento das mesmas (CHITARRA & CHITARRA, 1990). Em tomates, por exemplo, o abaixamento da temperatura levou a um amolecimento mais lento durante o armazenamento (ARTÉS *et al.*, 1999), assim como em caqui (WRIGHT & KADER, 1997) e em pêssegos (FERNANDEZ-TRUJILLO *et al.*, 2000). No presente estudo, porém, a aplicação de baixas temperaturas, não somente suprimiu o amolecimento, como também levou a um “endurecimento” dos frutos, que apresentaram maior dureza. Este comportamento também foi verificado em morangos (WRIGHT & KADER, 1997), e poderia ser explicado pelo endurecimento das estruturas celulares como resposta ao estresse originado pela refrigeração, ou pela perda de água, que pode levar a uma estrutura mais elástica na casca da goiaba.

5.2.2. EVOLUÇÃO DOS TEORES DE ÁCIDOS ASCÓRBICO E DESIDROASCÓRBICO E CORRELAÇÃO COM AS ATIVIDADES DAS ENZIMAS RELACIONADAS AO SEU METABOLISMO

Os resultados obtidos para a variação nos conteúdos de AA e ADHA, bem como as atividades das enzimas relacionadas ao seu metabolismo, são apresentados na figura 13.

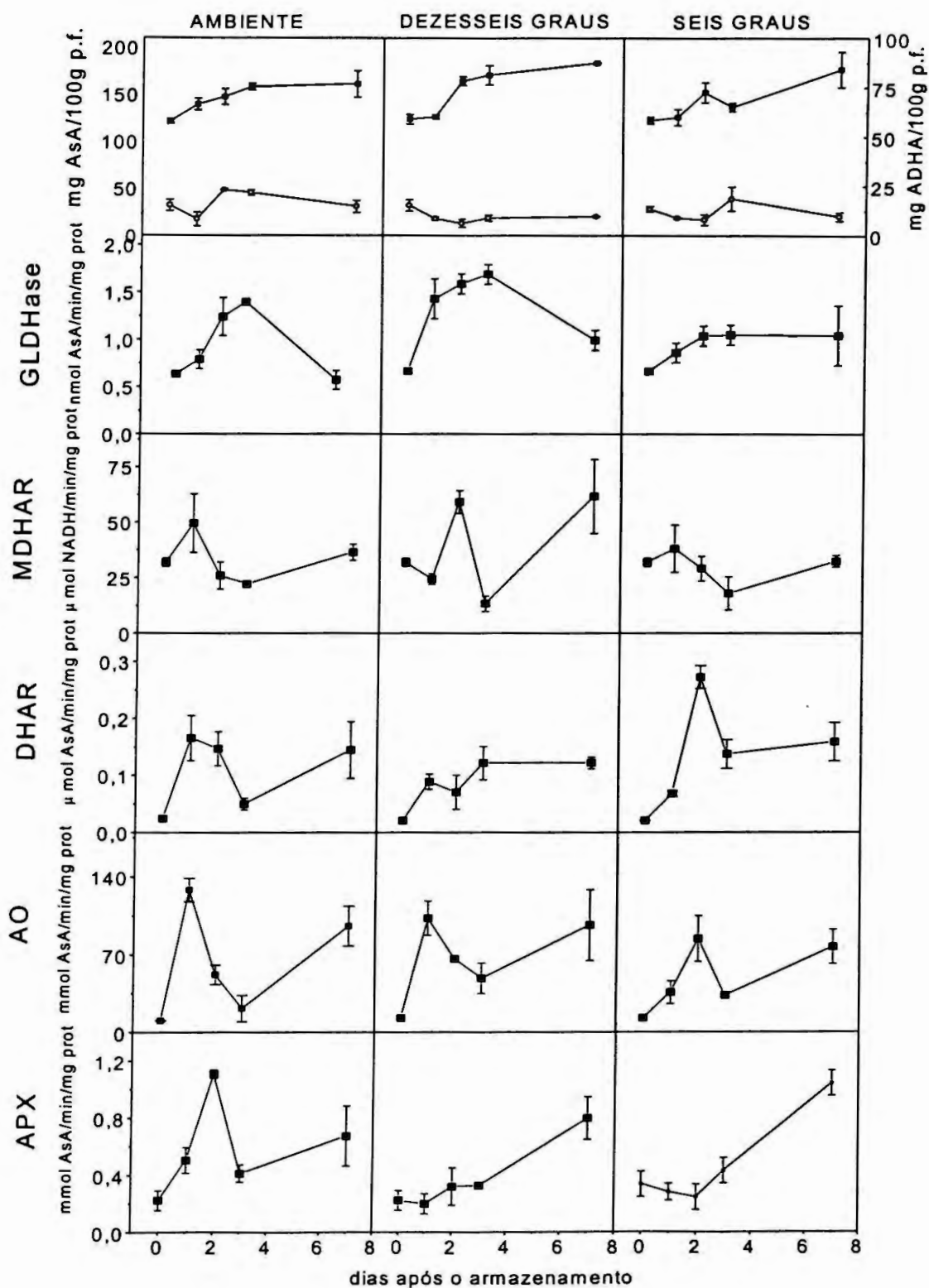
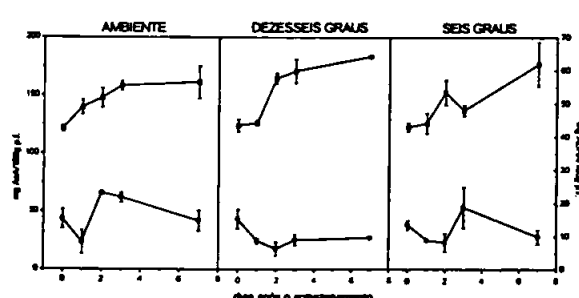


Figura 13. Variação dos conteúdos de AA e ADHA, e atividade das enzimas de síntese (GLDHase), de regeneração (MDHAR e DHAR) e de degradação (AO e APX) durante o armazenamento de goiabas brancas sob diferentes temperaturas.

5.2.2.1. VARIAÇÃO DOS CONTEÚDOS DE AA E ADHA

Pelos resultados, podemos observar que houve um aumento nos conteúdos de AA nas três temperaturas de armazenamento, o que indica que o frio não ocasionou uma falha no sistema de síntese e/ou regeneração do AA. Entretanto, observa-se que os perfis de aumento são diferentes; nas goiabas armazenadas à temperatura ambiente, pode-se notar um aumento contínuo até o total amadurecimento.



Nos frutos armazenados a 16°C, podemos verificar um aumento após o armazenamento. Nos frutos armazenados a 6°C, o aumento é contínuo e praticamente linear até o total amadurecimento.

O conteúdo de ADHA, entretanto, sofreu maiores modificações ocasionadas pelo abaixamento da temperatura de armazenamento. Nas amostras armazenadas à temperatura ambiente, houve um decréscimo no 1º dia após o armazenamento, com um aumento posterior bastante acentuado nos dias 2 e 3, decaindo aos níveis iniciais a seguir. Nas amostras armazenadas a 16°C, houve um decréscimo praticamente contínuo, desde o dia inicial até o dia final do armazenamento. Nas amostras armazenadas a 6°C, ocorre um decréscimo nos níveis iniciais, até o 2º dia, aumentando bruscamente no terceiro dia, e decaindo novamente até o final do período de estudo.

O armazenamento sob refrigeração também é um fator de influência no conteúdo de vitamina C, e o comportamento difere muito entre as espécies vegetais. Os perfis de aumento do AA foram um pouco distintos entre as amostras, mas mantiveram o padrão de aumento durante o período estudado. Em diferentes cultivares de tomates, também foi verificado que o abaixamento da temperatura não ocasionou diferenças significativas no conteúdo de AA, principalmente em cultivares de altas altitudes (BRÜGGEMANN *et al.*, 1999). Os autores supõem que não ocorrem

modificações relativas ao sistema de síntese de AA, assim como parece ter ocorrido na goiaba branca. Em morangos, o conteúdo de AA apresentou um aumento de 20 a 30% após 8 dias, sob armazenamento a 5°C, enquanto no caqui, o mesmo procedimento manteve o AA praticamente inalterado (WRIGHT & KADER, 1997). Em kiwi, o armazenamento a 0°C levou a uma manutenção dos níveis de AA por mais de 15 semanas (MANOLOPOULOU & PAPADOPOULOU, 1998). Alguns vegetais folhosos, assim como frutos cítricos, perdem AA se não forem armazenados a baixas temperaturas (LEE & KADER, 2000). Por outro lado, baixas temperaturas são passíveis de ocasionarem injúrias em produtos tropicais, levando ao estresse e à perda de AA. Em alguns vegetais, o armazenamento a frio origina uma perda de AA, como é o caso de aspargos (ESTEVE *et al.*, 1995), pepino, abobrinha e batata (LEE & KADER, 2000), e acerola (CRUZ *et al.*, 1995). Em morangos, foi verificado que o abaixamento da temperatura levou a uma diminuição nos níveis de ADHA, enquanto que no caqui, o perfil de variação de ADHA é semelhante ao obtido na goiaba branca (WRIGHT & KADER, 1997).

5.2.2.2. VARIAÇÃO NO CONTEÚDO DE ÁCIDO OXÁLICO

O ácido oxálico está amplamente distribuído na natureza (LOEWUS, 1988). Os fatores que levam ao acúmulo de AOx em determinadas espécies vegetais são ainda pouco conhecidos, mas parece que a produção de ácido glicólico na fotorrespiração, que seria posteriormente oxidado, levaria à produção do oxalato; a redução do nitrato, que gera íons hidroxila e o acúmulo de cálcio são também possíveis fatores que levariam ao acúmulo de AOx em vegetais (RINALLO & MORI, 2000). A variação nas quantidades de ácido oxálico na goiaba branca está apresentada na figura 14. Nas amostras de manga Keitt, não foi encontrado ácido oxálico, em nenhum dos estádios analisados. Estes resultados encontram-se em desacordo com a literatura, que apresenta valores de oxalato relativamente elevados na manga e não mencionam a presença de oxalato na goiaba (SOUCI *et al.*, 1988), embora as folhas de goiabeira apresentem grandes quantidades de

cristais de oxalato de cálcio (www.ufsm.br/farmacopeia/_1_monog_4th_novas/goiabeira.pdf). É possível que a ausência de oxalato na manga Keitt seja devido à espécie ou às formas de cultivo. Em outros vegetais, como por exemplo na soja, o conteúdo de AOx pode variar de 0,67 a 3,5 g/100g peso fresco entre diferentes cultivares (MASSEY *et al.*, 2001). A carambola, um fruto que apresenta grandes quantidades de AOx, chegando a ser nocivo a pessoas com doenças renais, pode apresentar uma diferença de até 10 vezes no conteúdo de AOx entre diferentes variedades (WILSON *et al.*, 1982).

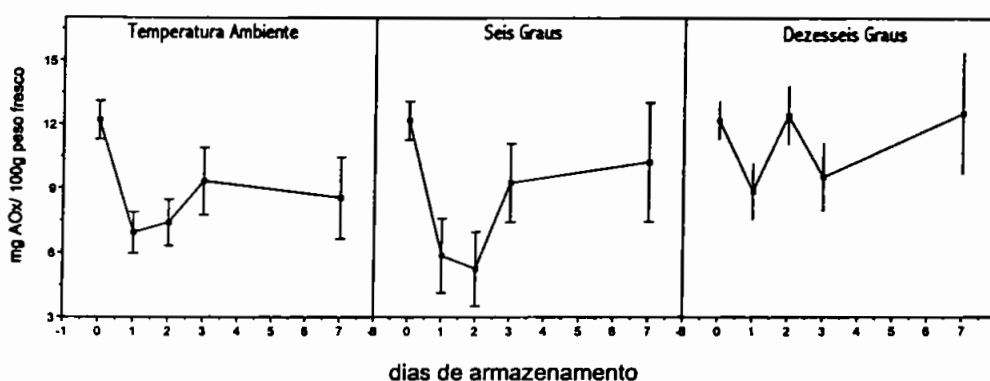


Figura 14. Variação do conteúdo de ácido oxálico durante o amadurecimento da goiaba branca submetida a diferentes temperaturas de armazenamento.

Em todas as amostras, pode-se notar uma queda significativa no conteúdo de AOx no primeiro dia após o armazenamento. Após este ponto, entretanto, parece não ter havido modificações significativas no conteúdo de oxalato na goiaba branca durante o amadurecimento entre as amostras armazenadas à temperatura ambiente e aquelas armazenadas a 6°C; estatisticamente, as amostras armazenadas a 16°C apresentam conteúdos diferentes das amostras submetidas aos outros dois tratamentos, exceto no 3º dia de armazenamento. Um aumento ocorrido no conteúdo de oxalato nas amostras armazenadas a 16°C corresponde a um aumento ocorrido no conteúdo de AA, neste mesmo ponto (Fig. 13).

O perfil de variação no conteúdo de AOx nas amostras parece seguir o perfil de variação do ADHA. Entretanto, enquanto nas amostras armazenada à temperatura ambiente a variação do AOx parece um dia

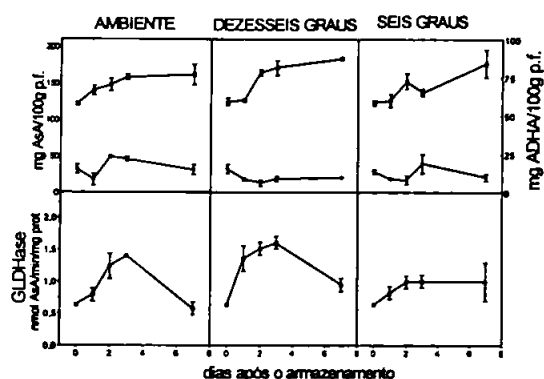
atrasada em relação ao ADHA, nas amostras armazenadas a 6°C a variação parece concomitante. Em kiwi, RINALLO & MORI (2000) verificaram uma diminuição no conteúdo de AA e de AOx solúvel, concluindo desta forma, que o AA não poderia ser precursor de AOx, justamente por ambos aumentarem ou diminuírem paralelamente. Ao contrário do que acreditam estes autores, seria possível este fato, verificando-se que a síntese de AA parece ser contínua, o que ocasionaria a manutenção dos níveis de AA crescentes mesmo sendo este degradado a ADHA ou a AOx. Também acredita-se que o AOx deve ser originado a partir do ADHA, devendo-se desta forma, relacionar estes últimos em termos comparativos. Em cultura de células de *Pistia striotes*, que é um vegetal aquático rico em oxalatos, KEATES *et al.* (2000) verificaram, através de infiltração de compostos marcados, que ocorreu síntese de AOx marcado radiativamente após infiltração com L-[1-¹⁴C]-AA. Os autores verificaram também que a infiltração com L-[6-¹⁴C]-AA, não originou AOx marcado, o que indica que o este seria originado a partir dos carbonos 1 e 2 do AA; os demais carbonos dariam origem a outros compostos, tais como treonatos, xilonatos, entre outros. Estes resultados foram confirmados por KOSTMAN *et al.* (2001), que também observaram que a síntese de AA e formação de AOx têm todo o suporte para ocorrer dentro dos idioblastos, que são células especializadas para o armazenamento de cristais de oxalato de cálcio. A infiltração com glicolato, um suposto precursor do AOx, originou pouca formação de AOx. Estes resultados indicam que, apesar de parecer existir uma via de formação de AOx a partir de glicolatos através da ação de uma enzima lactato desidrogenase (SUGIYAMA & TANIGUCHI, 1997), este não parece ser o principal mecanismo de formação do AOx.

5.2.2.3. EVOLUÇÃO DAS ATIVIDADES DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DO AA

As atividades apresentaram pequenas diferenças com a aplicação de baixas temperaturas. Percebe-se, de uma forma global, que parece ter havido um retardo nas modificações ocorridas entre as amostras armazenadas à temperatura ambiente e as amostras submetidas ao frio.

A. L-Galactono-1,4-Lactona Desidrogenase

Podemos perceber que a atividade da GLDHase não foi muito modificada entre as temperaturas ambiente e de 16°C, em termos de valores, apesar de apresentarem perfis levemente diferentes.

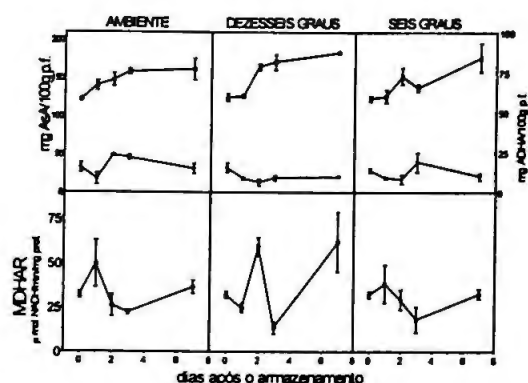


Nas amostras à temperatura ambiente, a atividade aumenta continuamente até o dia 3, enquanto que nas amostras a 16°C a atividade praticamente dobra de valor no 1º dia após o armazenamento. Este comportamento pode ser associado ao conteúdo de AA, onde os valores

aumentam cerca de 50% do 1º para o 2º dias após o armazenamento. Em fatias de pimenta armazenadas a 5°C, a atividade da GLDHase aumentou nas primeiras 12h de armazenamento, decaindo em seguida. Entretanto, não houve aumento no conteúdo de AA nem de ADHA (IMAHORI *et al.*, 1997). Nas amostras armazenadas a 6°C, entretanto, apresenta um aumento 50% menor do que as demais amostras, apesar de não ter havido modificações no conteúdo final de AA. Isto pode indicar que, apesar da atividade ter sido menor, foi ainda suficiente para elevar os níveis de AA.

B. Monodesidroascorbato Redutase e Desidroascorbato Redutase

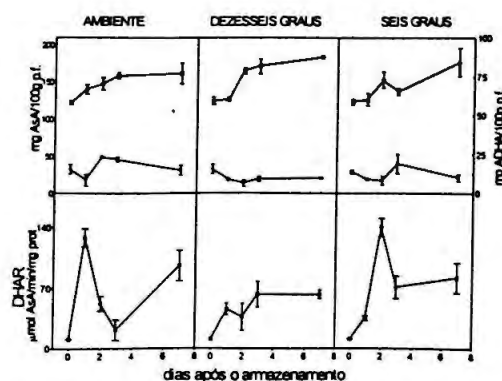
A atividade das enzimas de regeneração também foram um pouco alteradas pela refrigeração. As amostras armazenadas à temperatura ambiente e a 16°C apresentaram, novamente, mesmo padrão de comportamento, mostrando um pico de atividade retardado em 1 dia nas amostras a 16°C. Já nas amostras armazenadas a 6°C, a atividade da MDHAR parece ter se mantido constante, sem apresentar os picos que ocorreram nas demais amostras.



A maior atividade da MDHAR nas amostras armazenadas a 16°C quando comparadas às armazenadas a 6°C encontram-se de acordo com WANG (1996), em estudo envolvendo abobrinhas submetidas a resfriamento, onde a atividade da MDHAR foi maior nas amostras

a 15°C do que nas amostras armazenadas a 5°C. Também em folhas de milho (PASTORI *et al.*, 2000; HODGES *et al.*, 1997), a atividade da MDHAR sofreu uma queda de 50%, comportamento também verificado em plântulas submetidas a baixas temperaturas de desenvolvimento em campo (FRYER *et al.*, 1998, citado por PASTORI *et al.*, 2000). Em relação às amostras armazenadas à temperatura ambiente, pode-se afirmar que as amostras armazenadas a 16°C apresentaram maior atividade MDHAR, enquanto que as amostras armazenadas a 6°C mostraram atividades semelhantes.

A atividade da DHAR se mostrou inversa à atividade da MDHAR, apresentando um forte pico no 1º dia de armazenamento nas amostras à temperatura ambiente e nas amostras armazenadas a 6°C, sendo que este pico foi retardado em 1 dia nas amostras resfriadas. Já nas amostras armazenadas a 16°C, não houve a formação do pico, somente um aumento gradativo até o 3º dia, permanecendo inalterado até o final do estudo.

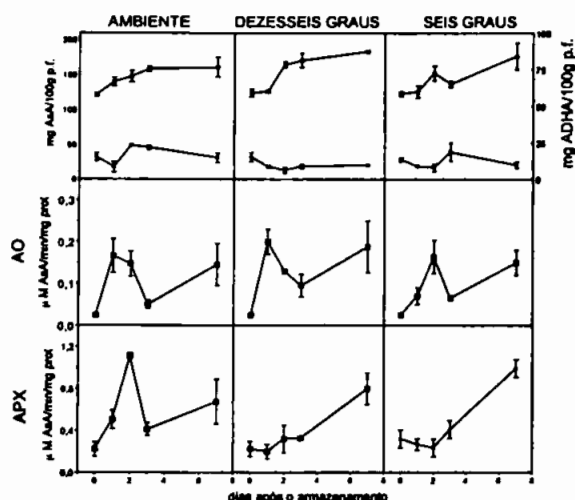


Este resultado concorda com o apresentado por RIVERO (2002), em estudo com plantas de melancia, que também verificou um pequeno decréscimo na atividade da DHAR quando sob resfriamento. Na abobrinha, o pico de atividade da DHAR também foi menor nas

amostras submetidas a baixas temperaturas (WANG, 1996). Resultados contrários foram obtidos em folhas de milho, onde a atividade da DHAR apresentou um aumento com a diminuição da temperatura (PASTORI *et al.*, 2000; HODGES *et al.*, 1997). No caso da temperatura mais baixa, possivelmente ocorreu uma resposta da DHAR ao frio, aumentando a atividade da DHAR que pode ter contribuído para a manutenção dos níveis de AA. Nas amostras armazenadas a 6°C, o pico de atividade da DHAR pode ser relacionado ao conteúdo de AA (Fig. 14), que também apresenta um forte aumento no 2º dia de armazenamento, e continua a aumentar até o final do período estudado, além de também parecer ter sido gerado como resposta à atividade da AO neste período.

C. Ascorbato Oxidase e Ascorbato Peroxidase

A atividade das enzimas de degradação, especialmente a APX, apresentou maior influência pelo abaixamento da temperatura. A atividade da AO parece acompanhar a atividade da DHAR durante o armazenamento da goiaba branca. Já as amostras armazenadas à temperatura ambiente e a 16°C apresentaram o mesmo perfil de atividade, com um pico único que foi atrasado em 1 dia nas amostras armazenadas a 6°C. Parece ter havido uma atenuação da atividade da AO com o resfriamento a partir do 3º dia, em relação às amostras armazenadas à temperatura ambiente, embora as atividades tenham apresentado intensidades semelhantes no início do armazenamento. Em brócolis armazenados a 18°C (BARTH *et al.*, 1992) também não houve modificações significativas na atividade da AO em relação aos brócolis não resfriados durante o armazenamento. Apesar de ser considerada como causadora do decréscimo do conteúdo de AA durante o armazenamento de frutas e vegetais, não existem muito estudos que analisem estes parâmetros.



A atividade da APX, por outro lado, apresentou significativas diferenças das amostras armazenadas à temperatura ambiente e das submetidas à refrigeração. Houve importante diminuição da atividade peroxidásica, o que também pode ter contribuído para a manutenção dos níveis de AA, que não se

modificaram entre as amostras. Este resultado se encontra de acordo com o obtido por RIVERO *et al.* (2002), que também verificou uma inibição da atividade da APX em plantas de melancia submetidas à baixa temperatura. Entretanto, a grande maioria dos trabalhos publicados em respeito à aplicação de baixas temperaturas no armazenamento de frutas e outros vegetais descreve um aumento da atividade da APX relacionada a uma acentuação do sistema antioxidante, seqüestrador dos radicais livres formados pelo estresse causado pelo frio. Este perfil de resultado foi verificado em abobrinha (WANG, 1996), em folhas de milho (PASTORI *et al.*, 2000; HODGES *et al.*, 1997) e de pepino (LEE & LEE, 2000), em tangerina (SALA, 1998), em tomates (BRUGGEMANN *et al.*, 1997), entre outros. Nas amostras armazenadas à temperatura ambiente, pode-se verificar que aumento na atividade peroxidásica relacionou-se com o aumento no teor de ADHA encontrado. O mesmo não ocorreu, entretanto, para as amostras armazenadas sob refrigeração, onde verificou-se que as baixas temperaturas causaram perda intensa da atividade peroxidásica. RIVERO *et al.* (2002) supõem que a inativação do sistema enzimático ocorrido em plantas de melancia pode ser devido a uma inabilidade da planta em uma possível aclimatação ao frio, uma vez que a temperatura ótima de crescimento destas plantas é de 35°C. Esta aclimatação ocasiona o aumento no sistema enzimático de seqüestro de espécies reativas de oxigênio, como a APX, que em diversos outros vegetais pareceu ser

umentada com o abaixamento da temperatura (PASTORI *et al.*, 2000; LEE & LEE, 2000; SALA, 1998; BRUGGEMANN *et al.*, 1997; HODGES *et al.*, 1997; WANG, 1996). Também pode estar ocorrendo regeneração não enzimática do AA, através da presença de NADPH, como verificado em tangerinas (SALA, 1998).

5.3. PARTE III: INFILTRAÇÃO DAS FATIAS DE GOIABA BRANCA E MANGA KEITT COM L-[1-¹⁴C]-GALACTOSE: QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS ASCÓRBICO, DESIDROASCÓRBICO E OXÁLICO FORMADOS.

Para verificar a procedência do oxalato a partir do ascorbato, foi realizada a infiltração de L-[1-¹⁴C]-galactose, que é precursora do AA em vegetais, em fatias de goiaba branca e de manga Keitt. As frações da separação por HPLC relativas aos ácidos ascórbico, desidroascórbico e oxálico, foram recolhidas e analisadas em cintilador líquido para a contagem do material marcado formado a partir do precursor infiltrado. Da mesma forma, também foi verificada a existência de síntese de AA, ADHA e AOx com a infiltração de galactose marcada, segundo a hipótese da via Smimoff-Wheeler (WHEELER *et al.*, 1998). BARATA-SOARES (2001), verificou, em mamões, que o tempo metabólico mais indicado para a formação do ácido ascórbico foi de duas horas, onde foi atingido um patamar que permanece sem diferenças significativas por mais de 24 horas. Por este motivo, utilizamos neste experimento o período metabólico de 2 horas.

5.3.1. GOIABA BRANCA

A variação nos conteúdos de AA, ADHA e AOx nas amostras de goiaba infiltradas são apresentadas na figura 15. No ponto inicial, pode-se perceber que nas amostras maduras apresentam cerca de 30% mais AA do que nas amostras verdes. O conteúdo de ADHA é estatisticamente igual, e o conteúdo de AOx, 30% menor.

Apesar de a quantidade de galactose marcada ter sido insignificante do ponto de vista de atuar como modificador na velocidade de reação da síntese do AA (1,8 pmol), o conteúdo de AA aumentou significativamente, tanto nas amostras no estágio verde do amadurecimento, quanto nas de goiaba madura. No caso das amostras de goiaba verde, percebe-se que a infiltração com água também ocasionou um aumento na quantidade de AA após 2h, possivelmente pelo estresse causado pelo procedimento, que estaria ativando mecanismos de proteção ao tecido. BARATA-SOARES (2001) não detectou, no conteúdo de AA de fatias de goiaba verde, diferença significativa entre as amostras controle e as amostras infiltradas com galactose. Possivelmente, o período metabólico utilizado (24h) tenha sido excessivo, possibilitando a degradação do AA e formação do ADHA. Nas amostras maduras, verifica-se que o tecido responde ao estresse do procedimento, mas tende a degradar o AA formado durante o período de incubação, até retornar aos níveis iniciais. Os conteúdos de AA nas amostras controle e nas amostras infiltradas com água após 2 horas não apresentaram diferença significativa entre si.

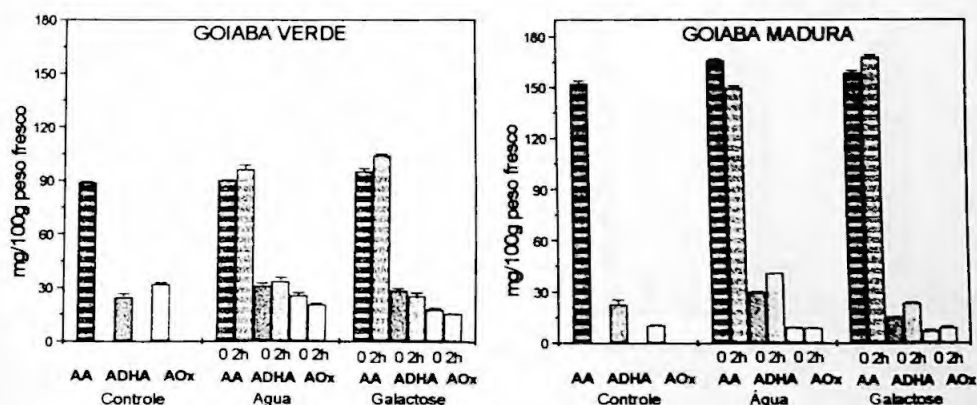


Figura 15. Variação nos conteúdos de ácido ascórbico (AA), ácido desidroascórbico (ADHA) e ácido oxálico (AOx) em fatias de goiaba branca nos estádios verde e madura do amadurecimento infiltradas com água ou L-[1-¹⁴C]-galactose, no ponto inicial (controle), após infiltração total (tempo zero) e após 2 horas de período metabólico.

Após 2 horas de período metabólico, o conteúdo de ácido desidroascórbico não se modificou estatisticamente nas amostras verdes,

Apesar de a quantidade de galactose marcada ter sido insignificante do ponto de vista de atuar como modificador na velocidade de reação da síntese do AA (1,8 pmol), o conteúdo de AA aumentou significativamente, tanto nas amostras no estágio verde do amadurecimento, quanto nas de goiaba madura. No caso das amostras de goiaba verde, percebe-se que a infiltração com água também ocasionou um aumento na quantidade de AA após 2h, possivelmente pelo estresse causado pelo procedimento, que estaria ativando mecanismos de proteção ao tecido. BARATA-SOARES (2001) não detectou, no conteúdo de AA de fatias de goiaba verde, diferença significativa entre as amostras controle e as amostras infiltradas com galactose. Possivelmente, o período metabólico utilizado (24h) tenha sido excessivo, possibilitando a degradação do AA e formação do ADHA. Nas amostras maduras, verifica-se que o tecido responde ao estresse do procedimento, mas tende a degradar o AA formado durante o período de incubação, até retornar aos níveis iniciais. Os conteúdos de AA nas amostras controle e nas amostras infiltradas com água após 2 horas não apresentaram diferença significativa entre si.

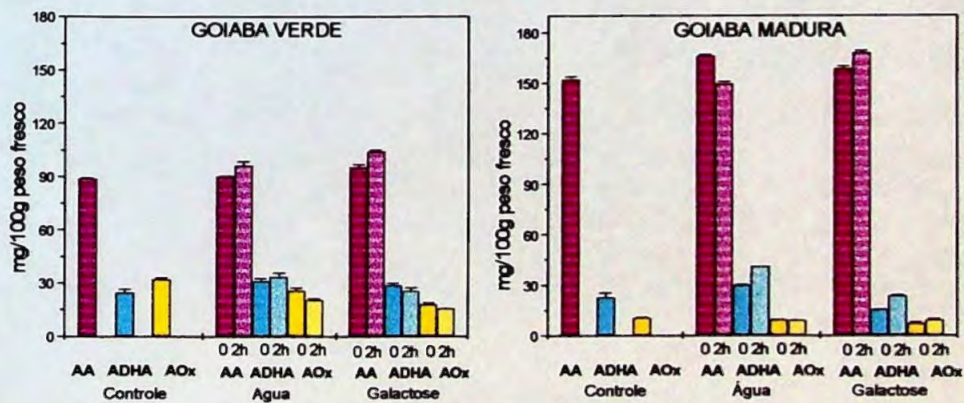


Figura 15. Variação nos conteúdos de ácido ascórbico (AA), ácido desidroascórbico (ADHA) e ácido oxálico (AOx) em fatias de goiaba branca nos estádios verde e madura do amadurecimento infiltradas com água ou L-[1-¹⁴C]-galactose, no ponto inicial (controle), após infiltração total (tempo zero) e após 2 horas de período metabólico.

Após 2 horas de período metabólico, o conteúdo de ácido desidroascórbico não se modificou estatisticamente nas amostras verdes,

enquanto que nas maduras, houve um aumento significativo. De uma forma geral, a goiaba verde apresentou uma diminuição no conteúdo de AOx, enquanto as amostras maduras não apresentaram diferenças significativas nas amostras infiltradas com água ou galactose. Não existem disponíveis, até o momento, relatos da formação, em frutos, de AOx a partir de L-galactose via AA, o que dificulta a comparação dos resultados. Em folhas, entretanto, este mecanismo já foi comprovado (KEATES *et al.*, 2000).

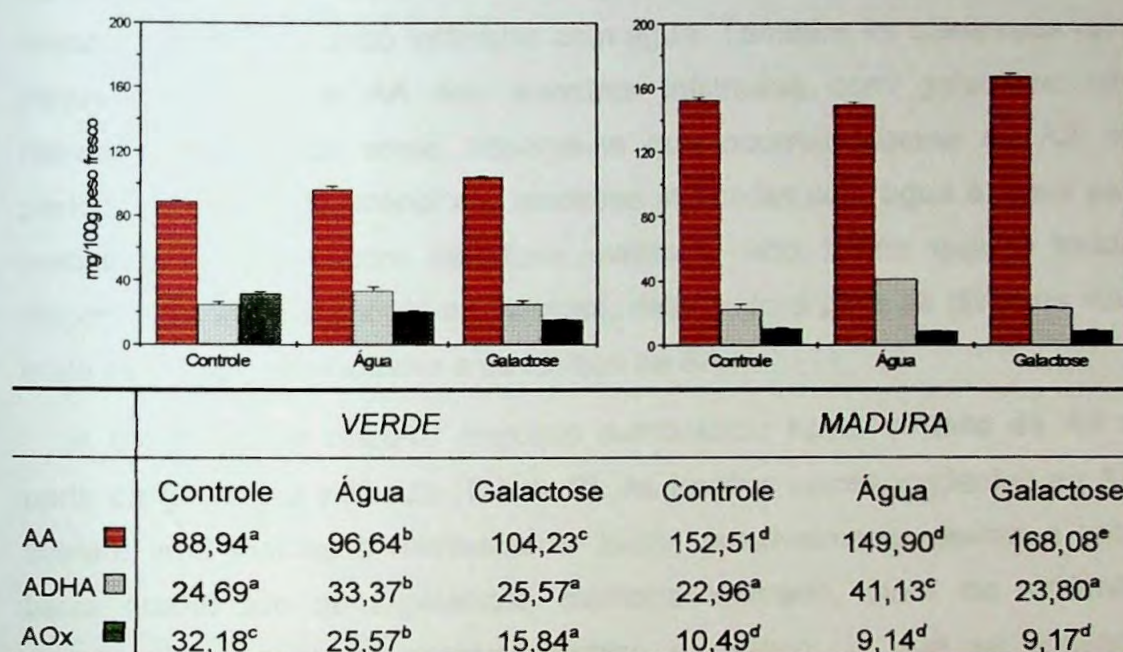


Figura 16: Conteúdo de AA, ADHA e AOx em fatias de goiaba de polpa branca nos estádios verde e maduro do amadurecimento, após 2 horas de incubação com água ou L-[-1-C¹⁴]-galactose, à temperatura ambiente. As variações representam o desvio padrão de três repetições. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si significativamente (Teste Tuckey, $p < 0,05$).

Percebemos que, após 2 horas de infiltração, o aumento na quantidade de AA nas amostras verdes foi de cerca de 17%, enquanto que nas amostras maduras, este aumento foi de cerca de 10%. Possivelmente, estas últimas correspondiam ao estágio mais maduro (sete dias após o armazenamento à temperatura ambiente), onde a atividade da GLDHase foi menor do que nas amostras verdes.

As quantidades de AOx nas amostras verdes decresceram significativamente durante o período estudado, sendo mais acentuado nas amostras infiltradas com galactose marcada. Nas amostras de goiaba madura, não houve variação nas quantidades de AOx. A figura 16 apresenta a avaliação estatística dos valores de AA, ADHA e AOx nas amostras.

BARATA-SOARES (2001), em estudo semelhante, observou uma queda no conteúdo de AA em amostras de goiaba branca no estágio verde do amadurecimento, quando infiltradas com água. Também foi observada uma pequena síntese de AA nas amostras infiltradas com galactose não marcada. Na goiaba verde, observa-se que ocorreu síntese de AA no período de infiltração, menor nas amostras infiltradas com água e maior nas amostras infiltradas com galactose marcada. Isto indica que o tecido disponibiliza imediatamente a galactose, desviando-a para as diversas vias onde esta participa, inclusive a de síntese de AA.

A contagem do material marcado demonstrou haver síntese de AA a partir da galactose infiltrada (Tabela 2). As frações correspondentes ao AA tiveram uma marcação relativamente baixa, possivelmente devido a uma baixa quantidade de L-galactose marcada infiltrada, além da evidente degradação em ácidos desidroascórbico e oxálico, já que se observa marcação muito mais acentuada nestes. Verifica-se também que houve marcação durante o tempo de infiltração, caracterizado pelo nível das contagens obtidas no ponto inicial. Na goiaba madura, houve aumento das contagens do AA marcado enquanto que a contagem do ADHA permanece constante, sugerindo que os sistemas de síntese e regeneração se sobrepõem ao da degradação. Estes resultados confirmam os testes comparativos realizados. As contagens do AOx seguem o perfil dos níveis observados, diminuindo nas amostras verdes e mantendo-se nas amostras maduras. As contagens nas frações de ADHA pareceram um pouco maiores, sugerindo uma rápida degradação do AA formado. Nas amostras verdes, não há diferenças significativas entre os conteúdos de AA e ADHA, apesar de terem sido verificados aumentos do conteúdo destes dois compostos, por meio da quantificação em HPLC. Este resultado sugere a existência de

outras vias de síntese de AA, que não utilizam galactose como precursor, como o sugerido por AGIUS *et al.*(2003), que verificaram a existência de uma via de síntese do AA a partir do ácido L-galacturônico.

As baixas contagens obtidas tomaram a análise dos resultados por vezes controversa, originando altos desvios padrão. Uma vez que a galactose participa de outras vias de síntese de compostos, é possível que a pequena quantidade infiltrada tenha sido insuficiente para garantir resultados mais aparentes, já que o período metabólico utilizado parece ter sido adequado, segundo BARATA-SOARES (2001).

Tabela 2. Porcentagem de conversão de L-[1-¹⁴C]-galactose em ácido ascórbico, ácido desidroascórbico e ácido oxálico nas amostras de goiaba branca nos estádios verde e maduro do amadurecimento.

	Verde		Madura	
	Inicial	Após 2h	Inicial	Após 2h
AA	(11,21 ± 7,54) ^{a,b}	(6,24 ± 2,13) ^{a,b}	(3,19 ± 3,13) ^a	(17,65 ± 11,50) ^b
ADHA	(39,80 ± 26,24) ^a	(27,99 ± 19,98) ^a	(39,63 ± 32,34) ^a	(50,51 ± 28,91) ^a
AOx	(16,83 ± 1,27) ^b	(8,66 ± 0,91) ^a	(19,65 ± 1,28) ^b	(13,96 ± 3,18) ^b

Obs. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tuckey ($p < 0,05$) em uma mesma linha.

5.3.2. MANGA KEITT

Nas amostras de manga Keitt, não foi verificada a presença de ácido oxálico. A infiltração com galactose, entretanto, não levou a um aumento no conteúdo de AA após 2h (Figura 17). Percebe-se que houve degradação do AA durante o período de infiltração, para ambas as amostras, sugerindo uma ativação do sistema de degradação, sem possibilidades de compensação para o sistema de regeneração. Nas amostras de manga verde infiltradas com água, ocorreu aumento significativo do conteúdo de AA, possivelmente

ligado ao estresse. Isto demonstra a formação de AA não somente a partir da galactose infiltrada, mas de outros substratos já presentes na fruta. Como visto anteriormente (Figura. 9), a atividade da enzima de síntese, a GLDHase neste ponto do amadurecimento (cerca de 4dpc), está moderadamente alta, permitindo este tipo de comportamento. Nas amostras de manga madura, houve degradação do AA durante o período metabólico analisado, concomitante a um aumento do ADHA. Os conteúdos de AA são cerca de 50% menores nas amostras maduras, o que está de acordo com os resultados iniciais deste trabalho (Figura 9).

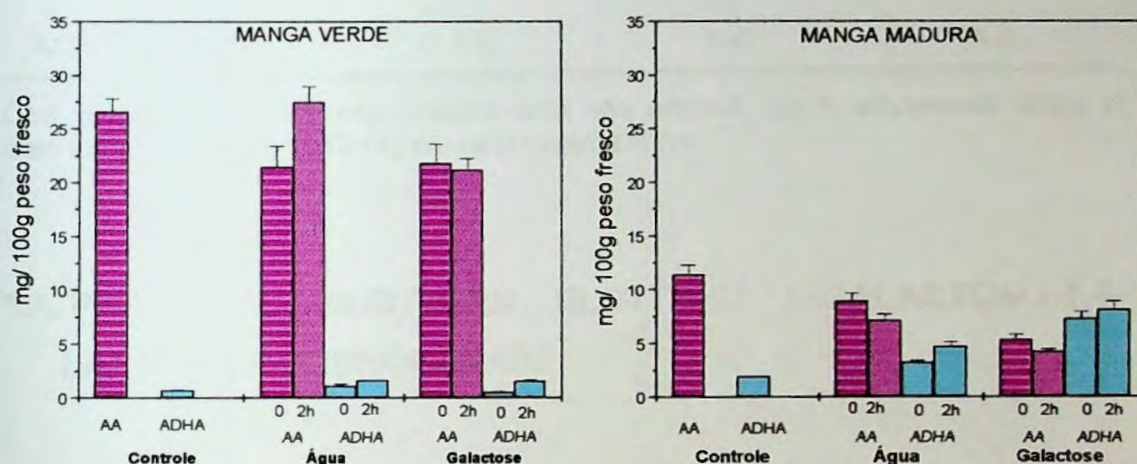


Figura 17. Variação no conteúdo de ácido ascórbico, ácido desidroascórbico e ácido oxálico em fatias de manga Keitt infiltradas com água ou L-[1-¹⁴C]-galactose, no ponto inicial (controle), após total infiltração (tempo zero) e após 2 horas de período metabólico.

A infiltração com L-galactose marcada originou AA e ADHA marcados, sugerindo a presença da via Smirnoff-Wheeler (Tabela 3). Os resultados, entretanto, não seguem os perfis obtidos pela análise em HPLC. Apesar de haver decréscimo significativo na quantidade de AA detectado pelo HPLC entre as amostras verde e madura, houve um aumento na marcação do AA, mas não na marcação do ADHA. Este é um fato de difícil explicação, e há a necessidade de novos testes que o comprovem. Qualquer conclusão seria especulativa e merece ser cuidadosamente analisada.

Tabela 3. Porcentagem de conversão das frações correspondentes aos ácidos ascórbico e desidroascórbico das amostras de manga Keitt infiltradas com galactose marcada. Não foi observado ácido oxálico na separação por HPLC nestas amostras.

	Verde		Madura	
	Inicial	Após 2h	Inicial	Após 2h
AA	(20,35 + 1,10) ^a	(24,85 + 2,68) ^{a,b}	(27,46 + 8,96) ^{a,b}	(37,80 + 10,61) ^b
ADHA	(12,28 + 1,84) ^a	(25,31 + 14,12) ^a	(20,18 + 11,77) ^a	(18,30 + 3,23) ^a
AOx	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Obs. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tuckey ($p < 0,05$) em uma mesma linha.

5.4. PARTE IV: NORTHERN BLOTTING: L-GALACTONO-1,4-LACTONA DESIDROGENASE

Para verificar a expressão da enzima de síntese, a L-galactono-1,4-lactona desidrogenase, foi realizado um Northern blotting da sonda correspondente ao cDNA desta enzima obtida a partir do morango com o RNA total extraído da manga, em diversos estádios do amadurecimento. Este experimento só pôde ser realizado, entretanto, em um dos pontos do amadurecimento da goiaba branca, uma vez que os demais pontos não tiveram uma extração satisfatória. É comum, durante a extração de RNA de frutos, haver a extração simultânea de compostos contaminantes, tais como compostos fenólicos, que se ligam ao RNA, ou polissacarídeos, que co-precipitam com o RNA (GEHRIG *et al.*, 2000). É possível que este comportamento tenha ocorrido durante a extração do RNA da goiaba. Apesar das várias tentativas, modificando-se a composição e proporção da solução de extração, as quantidades de lavagens com clorofórmio ou os períodos de precipitação, não foram obtidas preparações com relação entre as absorbâncias a 260nm e 280nm maior do que 1,5, sendo que a relação

satisfatória é entre 1,8 a 2,1 (GEHRIG *et al.*, 2000, SAMBROOK *et al.*, 1995). O ponto onde a extração foi razoavelmente mais apropriada foi no 7º após a colheita, que apresentou uma relação $Abs_{260/280nm}$ de 1,74. Uma tentativa de Northern blotting com os RNA insatisfatórios da goiaba não obteve sucesso na ligação com a sonda da enzima GLDHase (dados não apresentados).

A figura 18 apresenta o resultado do Northern blotting nos diversos pontos do amadurecimento da manga Keitt e em um ponto do amadurecimento da goiaba branca. Pode-se notar que houve hibridização, o que indica que há homologia entre as seqüências das enzimas de morango, manga e goiaba, bem como há expressão suficiente para que possa haver hibridização e detecção. Segundo TABATA *et al.* (2001), a seqüência genética da GLDHase é altamente conservada entre espécies



Figura 18. Northern blot a partir do RNA total da manga Keitt em diferentes estádios do amadurecimento e de um dos pontos do amadurecimento da goiaba branca, submetidos à hibridização com sonda de cDNA de L-galactono-1,4-lactona desidrogenase marcadas com α - ^{32}P -dCTP. As bandas dos rRNA aparecem coradas por azul de metileno. (A) manga Keitt estágio 120dpa; (B) manga Keitt ponto de colheita; (C) manga Keitt, estágio 2dpc; (D) manga Keitt, estágio 4dpc; (E) manga Keitt, estágio 6dpc; (F) manga Keitt, estágio 8dpc; (G) manga Keitt, estágio 10dpc; (H) goiaba branca, var. Paloma, 7dpc.

Parece haver uma tendência à diminuição na expressão da GLDHase durante o desenvolvimento e amadurecimento da manga. Entretanto, não foi possível realizar a quantificação da expressão da enzima durante o amadurecimento da manga, pois não obteve-se a nitidez necessária pela marcação com o fósforo radioativo. É possível que a radioatividade emitida pelo [³²P]-dCTP tenha sido fraca devido ao teste ter sido realizado com um decaimento de meia-vida. O tempo de meia-vida do ³²P é de 15 dias. Podemos perceber, também que a membrana revela, entre estádios, quantidades diferentes de RNA total aplicados. Este problema possivelmente foi devido a um erro de quantificação dos RNA totais, prejudicando a análise da expressão da enzima. Não foram descritos na literatura, até o presente momento, estudos da expressão da GLDHase durante o amadurecimento de frutos. Em tabaco, entretanto, a expressão da GLDHase acompanha o perfil de AA (TABATA *et al.*, 2001). Na base de dados Genebank, estão descrita as sequências genéticas da GLDHase de melão (2097 bases, PATERAKI & KANELLIS, 2000, código de acesso AF252339), morango (1997 bases, NASCIMENTO & LAJOLO, 2002, código de acesso AY102631), tomate (2017 bases, WADANO, 2002, código de acesso AB080690) e *Arabidopsis thaliana* (2076 bases, SEIKI *et al.*, 2002, código de acesso AK117924).

5.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tanto na manga como na goiaba branca, nossos experimentos sugerem que a atividade da enzima de síntese, GLDHase, é responsável pelas modificações nos conteúdos de AA durante o amadurecimento. Na manga, a atividade desta enzima diminui durante o desenvolvimento, levando a uma diminuição no conteúdo de AA antes do ponto de colheita. Após a colheita, a atividade da GLDHase permanece inalterada, enquanto que os níveis de AA decaem, possivelmente pela ação da APX. As enzimas de regeneração participam fracamente deste processo, modulando a quantidade de ADHA, mas não de AA diretamente. Na goiaba branca, uma atividade aumentada ocasiona um aumento proporcional no conteúdo de AA. As atividades das enzimas de regeneração parecem participar mais ativamente deste processo, modulando o conteúdo de ADHA em função do aumento das atividades das enzimas de degradação. A diminuição das atividades das enzimas de regeneração e aumento das atividades das enzimas de degradação não ocasiona mudanças drásticas nos teores de AA, mas parece ser levemente refletida no conteúdo de ADHA. Assim, para que o conteúdo de AA nos fruto possa ser mantido, ou aumente, parece ser necessário que haja alta atividade da GLDHase, o que poderia ser conquistado, entre outros fatores, com superexpressão da mesma.

Não foi encontrado AOX na manga Keitt, o que descarta a possibilidade de o AA estar sendo degradado para a formação de oxalatos. Já na goiaba, o conteúdo de oxalato decai no início do amadurecimento, e permanece constante no decorrer do processo. Até hoje, não foi descrita na literatura a presença de ácido oxálico em goiabas, mas é sabido que nas folhas da goiabeira encontram-se grandes quantidades de cristais de oxalato de cálcio.

Em relação ao efeito da refrigeração, o que se pode verificar é que, entre as diferentes temperaturas de armazenamento, tanto o conteúdo de

AA quanto as atividades enzimáticas sofrem pequenas variações. Parece ocorrer uma atenuação dos fenômenos ocorridos à temperatura ambiente, como o período de aumento nos níveis de AA e os picos de atividades enzimáticas. As amostras armazenadas em temperaturas intermediárias, como foi o caso das amostras armazenadas a 16°C, parecem estar passando por uma fase de transição, comportando-se ora como as amostras armazenadas à temperatura ambiente, ora como as amostras submetidas ao frio intenso. Em temperaturas mais baixas (6°C), tanto o sistema de síntese (GLDHase) quanto o de degradação (APX), tendem a ser diminuídos pela baixa temperatura, e os efeitos da atividade da AO parecem ser suprimidos pela atividade da DHAR, fato que pode explicar a manutenção dos níveis de AA. O frio pareceu influenciar a atividade da APX, retardando o aumento desta atividade em pelo menos 5 dias de armazenamento. Este sistema parece ser ativado para manter o sistema antioxidante atuante, com capacidade de prevenir os danos oxidativos ocasionados pelo frio. De uma forma geral, parece que as baixas temperaturas não modificaram a capacidade que os tecidos da goiaba branca apresentam em manter os níveis de AA altos, embora os meios utilizados para que este fato ocorra se apresentem levemente diferentes.

A síntese de AA em amostras de goiaba branca e manga Keitt infiltradas com L-[1-¹⁴C]-galactose confirma a existência da via proposta por Smirnoff-Wheeler nestes frutos. A degradação do AA marcado originou, na goiaba, ADHA e AOx marcados, e na manga somente o ADHA marcado.

O Northern blotting a partir dos RNAs totais de manga Keitt e goiaba branca indica a presença de enzima L-galactono-1,4-lactona desidrogenase durante o desenvolvimento e amadurecimento da manga, e em um ponto do amadurecimento da goiaba. Este resultado comprova que há nestes frutos conservação da seqüência genética da enzima, além de expressão suficiente para ser detectada. Apesar da tendência aparente de diminuição da expressão da enzima, são necessários, testes que utilizem radioatividade mais intensa, para que possa ser realizada a quantificação da expressão desta enzima em manga Keitt e goiaba branca.

6. CONCLUSÕES

- A modificação conteúdo de AA nos frutos ocorre por uma inter-relação entre as enzimas de síntese, regeneração e degradação mas, dentro do estudado, concluiu-se que está relacionado preferencialmente à atividade da enzima GLDHase.
 - Em manga var. Keitt, ocorre uma diminuição do conteúdo de ácido ascórbico (AA) após o término do desenvolvimento e início do amadurecimento do fruto, que parece ser explicada pela diminuição da atividade da enzima de síntese, a L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (GLDHase) e aumento da atividade da enzima de degradação, ascorbato peroxidase (APX).
 - Na goiaba branca var. Paloma, ocorre um aumento do conteúdo de AA durante o amadurecimento, que está correlacionado a um aumento das atividades da GLDHase e da desidroascorbato redutase (DHAR), que é maior que o aumento nas atividades das enzimas de degradação.
 - Nos dois frutos, parece ocorrer a via Smirnof-Wheeler de biossíntese de AA, uma vez que detectou-se AA marcado a partir de infiltração de L-galactose marcada.
 - O abaixamento da temperatura não modifica fortemente o conteúdo de AA durante o armazenamento da goiaba branca durante 7 dias. Este conteúdo parece ser mantido pela atividade em conjunto das enzimas de síntese e regeneração, e por uma inativação parcial do sistema de degradação.
-

7. BIBLIOGRAFIA

- ABUSHITA, AA, HEBISHI, EA, DAOOD, HG, BIACS, PA. Determination of antioxidant vitamins in tomatoes. **Food Chem.**, Essex, v. 60, n.2, p.207-212, 1997.
- AGAR, IT, STREIF, J, BANGERTH, F. Effect of high CO₂ and controlled atmosphere (CA) on the ascorbic and dehydroascorbic acid content of some berry fruits. **Post. Biol. Technol.**, Amsterdam, v.11, p.47-55,1997.
- AGIUS, F., GONZÁLEZ-LAMOTHE, R., CABALLERO, J.L., MUÑOZ-BLANCO, J., BOTELLA, M.A., VALPUESTA, V. Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. **Nature**, London, v. 21, p. 177-181, 2003.
- ARRIGONI, O. , DeTULLIO, M. The role of ascorbic acid in cell metabolism: between gene-directed functions and unpredictable chemical reactions. **J. Plant Physiol.**, Rockville, v. 157, p. 481-488, 2000.
- ARTÉS, F., CONESA, M.A., HERNÁNDEZ, S., GIL, M.I. Keeping quality of fresh cut tomato. **Post. Biol. Tecnol.**, Amsterdam, v.17, p.153-162, 1999.
- ASADA, K. Ascorbate peroxidase- a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v. 85, p. 235-341, 1992.
- AWAD, M. **Fisiologia pós-colheita de frutos**. Nobel: São Paulo, 1993. 111p.
- BARATA-SOARES, A.D. **Biossíntese de ácido ascórbico em plantas: estudo com supostos precursores**. São Paulo, 2001, 63p. (Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP).
-

- BAUERNFEIND, J.C. Vitamins. In: PETERSON, M.S., JOHNSON, A.H. eds. **Encyclopedia of Food Science**. Westport: Avi Publishing Co., 1978. p.788-794, 838-841.
- BERGMEYER, H.U., GRASSL, M., WALTER, H.E. **Methods of enzymatic analysis**. Verlag Chemie:Deerfield Beach, 3 ed., v.2, p. 157-158, 1983.
- BERNARDES-SILVA, A.P.F. **Perfil de carboidratos de diferentes cultivares de manga durante o desenvolvimento e amadurecimento**. São Paulo, 2000, 52p. (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP).
- BIALE J.B., YOUNG R.E., OLMSTEAD A.J. Fruit respiration and ethylene production **Plant Physiol.**, Rockville, v. 29, n. 2, p.168-174, 1954.
- BIN SAARI, N, OSMAN, A, SELAMAT, J, FUJITA, S. Ascorbate oxidase from starfruit (*Averrhoa carambola*): preparation and its application in the determination of ascorbic acid from fruit juices. **Food Chem.**, Essex, v.66, p. 57-61,1999.
- BIN SAARI, N, FUJITA, S, MIYAZOE, R, OKUGAWA, M. Distribution of ascorbate oxidase activities in the fruits of family cucurbitaceae and some of their properties. **J. Food Biochem.**, Trumbull, v.19, p.321-327, 1995.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, San Diego, v. 72, p.248-254, 1976.
- BRENDA. The enzyme database. E-adress: <http://srs.ebi.ac.uk>.
- BRUGGEMANN, W., BEYEL, V., BRODKA, M., POTH, H., WEIL, M., STOCKHAUS, J. Antioxidants and antioxidative enzymes in wild-type and transgenic *Lycopersicon* genotypes of different chilling tolerance. **Plant Sci.**, Clare, v. 140, p.145-154, 1999.

- CARDELLO, H.A.B., CARDELLO, L. Teor de vitamina c, atividade de ascorbato oxidase e perfil sensorial de manga (mangífera índica l.) var. haden, durante o amadurecimento. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.18, n.2, p.211-217, 1998.
- CARRILLO-LOPES, A, RAMIREZ-BUSTAMANTE, F, VALDEZ-TORRES, JB, ROJAS-VILLEGAS, R. Ripening and quality changes in mango fruit as affected by coating with na edible film. **J. Food Qual.**, Trumbull, v. 23, n. 5, p. 479-486, 2000.
- CHEN, SD, SCHUCK, C. Diketogulonic acid, dehydroascorbic acid and ascorbic acid content of four fruits. **Food Res.**, Chicago, v16, n. 6, p.507-509, 1951.
- CHITARRA, M.I.F., CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças.** Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão: Lavras, 1990. 320p.
- CORDENUNSI, B.R., NASCIMENTO, J.R.O., GENOVESE, M.I., LAJOLO, F.M. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown on Brazil. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 50, n. 9, p. 2581-2586, 2002
- DAOOD, HG, VINKLER, M, MÁRKUS, F, HEBSHI, EA, BIACS, PA. Antioxidant vitamin content of spice red pepper (paprika) as affected by technological and varietal factors. **Food Chem.**, Essex, v. 55, n. 4, p. 365-372, 1996.
- DEUTSCH, JC. Ascorbic acid oxidation by hydrogen peroxide. **Anal. Biochem.**, San Diego, v. 255, p.1-7, 1998.
- DEUTSCH, JC. Dehydroascorbic acid. **J. Chromat. A**, Chicago, v. 881, p. 299-307, 2000.

- DIALLINAS, G, PATERAKI, I, SANMARTIN, M, SCOSSA, A, STILIANOU, E, PANOPOULOS, NJ, KANELIS, A.K. Melon ascorbate oxidase: cloning of a multigene family, induction during fruit development and repression by wounding. **Plant Mol. Biol.**, Dordrecht, v. 34, p. 759-770, 1997.
- DIAZ-PEREZ, J.C., BAUTISTA, S., VILLANUEVA, R. Quality changes in sapote mamey fruit during ripening and storage. **Post. Biol. Technol.**, Amsterdam, v.18, p.67-73, 2000.
- DIPIERRO, S., BORRACCINO, G. Dehydroascorbate reductase from potato-tubers. **Phytochem.**, Oxford, v.30, n.2, p. 427-429, 1991.
- EL BULK, RE, BABIKER, EFE, EL TINAY, AH. Changes in chemical composition of guava fruits during development and ripening. **Food Chem.**, Essex, v. 59, n. 3, p. 395-399, 1997.
- ESAKA, M., FUJISAWA, K., GOTO, M. Regulation of ascorbate oxidase expression in pumpkin by auxin and copper. **Plant Physiol.**, Rockville, v.100, n.1, p.231-237, 1992.
- ESTEVE, M.J., FARRÉ, R., FRÍGOLA, A. Changes in ascorbic acid content of green asparagus during harvesting period and storage. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.43, p.2058-2061, 1995.
- FAVELL, DJ. A comparison of the vitamin C content of fresh and frozen vegetables. **Food Chem.**, Essex, v. 62, n. 1, p. 59-64, 1998.
- FERNANDEZ-TRUJILLO, J.P., CANO, A., ARTÉS, F. Interactions among cooling, fungicide and postharvest ripening temperatures on peaches. **Int. J. Refrig.**, Paris, v.23, p.457-465, 2000.
- FOYER, C.H., MULLINEAUX, P.M. The presence of dehydroascorbate and dehydroascobate reductase in plant tissues. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 425, p. 528-529, 1998.

- FRY, S.C. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. **Biochem. J.**, London, v.332, p.507-515, 1998.
- GEHRIG, H.H., WINTER, K., CUSHMAN, J., BORLAND, A., TAYBI, T. An improved RNA isolation method for succulent plant species rich in polyphenols and polysaccharides. **Plant Molec. Biol. Rep.**, Toronto, v.18, 369-376, 2000.
- GERWIN, B., BURSTEIN, S.R., WESTLEY, J. Ascorbate oxidase: inhibition, activation and pH effects. **J Biol. Chem.**, Baltimore, v. 249, n.7, p. 2005-2008, 1974.
- GIOVANELLI, G, LAVELLI, V, PERI, C, NOBILI, S. Variation in antioxidant components of tomato during vine and post-harvest ripening. **J. Sci. Food Agric.**, Sussex, v. 79, p.1583-1588, 1999.
- GOMEZ, M.L.P.A. CORDENUNSI, B.R., LAJOLO, F.M. Metabolismo de carboidratos durante o amadurecimento do mamão (*Carica papaya* L. cv. Solo): influência da radiação gama. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.19, n.2, p.246-252, 1999.
- GONZALEZ M; CAMARA M; PROHENS J; RUIZ JJ; TORIJA E; NUEZ F. Colour and composition of improved pepino cultivars at three ripening stages **Gartenbauwissenschaft** , v.65, n. 2, p. 83-87 , 2000.
- GRAHAM, WD, STEVENSON, MH. Effects of irradiation on vitamin C content of strawberry and potatoes in combination with storage and with further cooking in potatoes. **J. Sci. Food Agric.**, Sussex, v. 75, p. 371-377, 1997.
- GRANTZ, A.A., BRUMELL, D.A., BENNETT, A.B. Ascorbate free radical reductase mRNA levels are induced by wounding. **Plant Physiol.**, Rockville, v. 108, p. 411-418, 1995.

- HODGES, D.M., ANDREWS, C.J., JOHNSON, D.A., HAMILTON, R.I. Antioxidant enzyme responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. **J. Exp. Bot.**, v.48, n.310, p.1105-1113,1997.
- HOREMANS, N., ASARD, H., CAUBERGS, R.J. Transport of ascorbate into plasma membrane vesicles of *Phaseolus vulgaris* L. **Protoplasma**, New York, v.194, n.3-4, p.177-185, 1996.
- HOREMANS, N., ASARD, H., CAUBERGS, R.J. The ascorbate carrier of high plant plasma membranes preferentially translocates the fully oxidized (dehydroascorbate) molecule. **Plant Physiol**, Rockville, v.114, n.4, p.1247-1253, 1997.
- HOSSAIN, M.A., ASADA, K. Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach-chloroplasts on dark and addition of hydrogen-peroxide - its protection by ascorbate **Plant Cell Physiol.**, Kioto, v.25, n.7, p.1285-1295, 1984.
- HOU, WC, LIN, YH. Dehydroascorbate reductase and monodehydroascorbate reductase activities of trypsin inhibitors, the major sweet potato (*Ipomoea batata* [L] Lam) root storage proteins. **Plant Sci.**, Clare, v. 128, p.151-158, 1997.
- IMAHORI, Y., ZHOU, Y F, UEDA, Y, ABE, K, CHACHIN K. Effects of wound stress by slicing sweet pepper fruits on ascorbic acid metabolism. **J. Japan Soc. Hort. Sci.**, Tokio, v. 66, n.1, p. 175-183, 1998(b)
- IMAHORI, Y., ZHOU, Y F, UEDA, Y, CHACHIN K. Ascorbate metabolism during maturation of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) fruit. **J. Japan Soc. Hort. Sci.**, Tokio, v. 67, n.5, p. 798-804. 1998(a).
- ISHERWOOD, F.A., CHEN, Y.T., MAPSON, L.W. Synthesis of L-ascorbic acid in plants and animals. **Biochem. J.**, London, v. 56, p. 1-15, 1954.
- ISHIKAWA, T, TAKEDA, T, SHIGEOKA, S. Purification and characterization of cytosolic ascorbate peroxidase from komatsuna (*Brassica rapa*). **Plant Sci.**, Clare, v.120, p.11-18, 1996.

- KADIOGLU, A, YAVRU, I. Changes in the chemical content and polyphenol oxidase activity during development and ripening of cherry laurel fruits. **Phyton-Ann Rei Bot A**, v. 37, v.2, p. 241-251, 1998.
- KANELLIS, A.K. **Ascorbic acid biosynthesis and oxidation**, 1998.
- KATO, N., ESAKA, M. Changes in ascorbate oxidase gene expression and ascorbate levels in cell division and cell elongation in tobacco cells. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.105, p.321-329, 1999.
- KATO, N., ESAKA, M. Expansion of transgenic tobacco protoplasts expressing pumpkin ascorbate oxidase is more rapid than that of wild-type protoplasts. **Planta**, New York, v. 210, p. 1018-1022, 2000.
- KEATES, S.E., TARLYN, N., LOEWUS, F.A, FRANCESCHI, V.R. L-ascorbic acid and L-galactose are sources for oxalic acid and calcium oxalate in *Pistia stratiotes*. **Phytochem.**, Oxford, v. 53, p. 433-440, 2000.
- KERK, N.M., FELDMAN, L.J. A biochemical model for the initiation and maintenance of the quiescent center- implications for organization of roots meristems. **Development**, Berlin, v.121, n.9, p. 2825-2833, 1995.
- KIM, IJ, CHUNG, WI. Molecular characterization of a cytosolic ascorbate peroxidase in strawberry fruit. **Plant Sci.**, Clare, v.133, p. 699-77, 1998.
- KISU, Y, HARADA, Y, GOTO, M, ESAKA, M. Cloning of the pumpkin ascorbate oxidase gene and analysis of a *cis*-acting region involved in induction by auxin. **Plant Cell Physiol.**, Kioto, v. 38, n.5 p. 631-637, 1997.
- KISU, Y., ONO, T., SHIMOFURUTANI, N, SUZUKI, M, ESAKA, M. Characterization and expression of a new class of zinc finger protein that binds to silencer region of ascorbate oxidase gene. **Plant Cell Physiol.**, Kioto, v. 39, n.10, p. 1054-1064, 1998.

- KOSTMAN, T., TARLYN, N., LOEWUS, F.A, FRANCESCHI, V.R. Biosynthesis of L-ascorbic acid and conversion of carbons 1 and 2 of L-ascorbic acid to oxalic acid occurs within individual calcium oxalate crystal idioblasts. **Plant Physiol.**, Rockville, v. 125, p. 634-640, 2001.
- KUBO, A, AONO, M, NAKAJIMA, N, SAJI, H, TANAKA, K, KONDO, N. Differential responses in activity of antioxidant enzymes to different environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*. **J. Plant Res.**, Toquio, v. 112, n. 1107, p. 279-290, 1999.
- LAKSHMINARAYANA, S., SUBHADRA, M.V., SUBRAMANYAN, H. Some aspects of developmental physiology of mango fruit. **J. Hortic. Sci.**, v. 45, p. 133-142, 1970.
- LEE, DH, LEE, CB. 2000. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzymes activity assays. **Plant Sci.**, Clare, v. 159, p. 75-85.
- LEE, SK, KADER, AA. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Post. Biol. Technol.**, Amsterdam, v.20, p.207-220, 2000.
- LIBERT, B., FRANCESCHI, V.R. Oxalate in plant crops. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 35, p. 926-938, 1987.
- LIN LS, VARNER JE. Expression of ascorbic-acid oxidase in zucchini squash (*Cucurbita-pepo* L.). **Plant Physiol.**, Rockville, v. 96, n.1, p. 159-165, 1991.
- LIZADA, C. Mango. In: SEYMOUR, G.B., TAYLOR, J.E., TUCKER, G.A. **Biochemistry and fruit ripening**. London: Chapman & Hall, 1996. p. 255-267.
-

- LOEWUS, M.W., BEDGAR, D.L., SAITO, K., LOEWUS, F.A. Conversion of l-sorbose to l-ascorbic-acid by a NADP-dependent dehydrogenase in bean and spinach leaf. **Plant Physiol.**, Rockville, v.94, n.3, p.1492-1495,1990.
- LOEWUS, F.A., JANG, R., SEEGMILLER, C.G. The conversion of ¹⁴C-labeled sugars to L-ascorbic acid in ripening strawberries. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 222, p. 649-664, 1956.
- LOEWUS, F.A., KELLY, S., HIATT, H.H. Ascorbic acid synthesis from D-glucose-2-C¹⁴ in the liver of intact rat. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 235, p. 937-939, 1960.
- LOEWUS, F.A. Ascorbic acid and its metabolic products. In: PREISS, j. Ed. **The Biochemistry of Plants**, v. 14, p. 85, Academic Press: Boca Raton, 1988.
- LOEWUS, FA. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. **Phytochem.**, Oxford, v. 52, p.193-210, 1999.
- LÓPEZ-GÓMEZ, R., GÓMEZ-LIM, M.A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. **Hortiscience**, Alexandria, v.27, n.5, p.440-442, 1992.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., RANDHALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.193, p.265-275, 1951.
- MACCARRONE M, D'ANDREA G, SALUCCI ML, AVIGLIANO L, FINAZZIAGRO A Temperature, ph and uv irradiation effects on ascorbate oxidase. **Phytochem.**, Oxford, v 32, n. 4, p. 795-798, 1993.
- MANOLOPOULOU, H, PAPADOPOULOU, P. A study of respiratory and physico-chemical changes of four kiwi fruit cultivars during cool-storage. **Food Chem.**, Essex, v. 63, n.4, p.529-534, 1998.

- MARITANO, S, KOHZUMA, T, SUZUKI, S, MARCHESINI, A. Stability of ascorbate oxidase extracted from *Cucurbita pepo*. **Phytochem.**, Oxford, v. 41, n.2, p. 349-351, 1996.
- MATTHEWS, RF, HALL, JW. Ascorbic acid, dehydroascorbic acid and diketogulonic acid in frozen green peppers. **J. Food Sci.**, Chicago, v.43, p.532-534, 1978.
- MEDLICOTT, A. P., THOMPSON, A.K. Analysis of sugar and organic acids in ripening mango fruits (*Mangifera indica* L. var. Keitt) by high performance liquid chromatography. **J. Sci. Food Agric.**, W Sussex, v. 36, p. 561-566, 1985.
- MERCADO-SILVA E, BENITO-BAUTISTA P, GARCIA-VELASCO MD. Fruit development, harvest index and ripening changes of guavas produced in central Mexico. **Post. Biol. Tec.**, Amsterdam, v.13, n.2, p. 143-150, 1998.
- MITTLER, R, HERR, EH, ORVAR, BL, VAN CAMP, W, WILLWKENS, H, INZE, D, ELLIS, BE. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, Washington, v.96, n.24, p.14165-14170, 1999.
- MIZUNO, M, KAMEI, M, TSUCHIDA, H. Ascorbate peroxidase and catalase cooperate for protection against hydrogen peroxide generated in potato tubers during low-temperature storage. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, Filadélfia, v.44, n.4, p.717-726, 1998.
- MORELL, S., FOLLMANN, H., DeTULLIO, M., HABERLEIN, I. Dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase are phantom indicators of oxidative stress in plants. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 414, p.567-570, 1997.

- MORELL, S., FOLLMANN, H., DeTULLIO M., HABERLEIN, I. Dehydroascorbate reductase: the phantom remaining. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.425, p.430-431, 1998.
- MOSER, U., BENDICH, A. Vitamin C. In: MACHLIN, L.J., **Handbook of vitamins**. 2ed., p.195, New York,: Marcel Dekker, 1991.
- MUSTAFFA R, OSMAN A, YUSOF S, MOHAMED S. Physico-chemical changes in Cavendish banana (*Musa cavendishii* L var Montel) at different positions within a bunch during development and maturation. **J. Sci. Food Agr.**, W Sussex, v.78, n.2, p. 201-207, 1998.
- OBA, K., ISHIKAWA, S., NISHIKAWA, M., MIZUNO, H., YAMAMOTO, T. Purification and properties of L-galactono- γ -lactona dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots, **J. Biochem.**, Toquio, v.117, p.120-124, 1995.
- OSTERGAARDT, J., PERSIAU, G., DAVEY, M.W., BAUW, G., MONTAGU, M.V. Isolation of a cDNA coding for L-galactono-1,4-lactona dehydrogenase, na enzyme involved in the biosynthesis of ascorbic acid in plants. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 272, p. 30009-30016, 1997.
- OSUNA-GARCIA J.A., WALL MM; WADDELL C.A. Endogenous levels of tocopherols and ascorbic acid during fruit ripening of new Mexican-type chile (*Capsicum annum* L) cultivars. **J. Agric. Food Chem**, Washington, v.46, n.12, p.5093-5096, 1998.
- PALLANKA, J.E., SMIRNOFF, N. The control of ascorbic acid synthesis and turnover in pea seedlings. **J. Exp. Bot.**, Oxford, v.51, n.345, p.669-674, 2000.
- PANDEY, R.M., RAO, M.M., SINGH, R.N. Biochemical changes in the developing mango fruit (*Mangifera indica* L.) cv. Dashehari. **Prog. Hortic.**, Chaubattia, v. 5, p.47-59, 1974.

- PASTORI, G., FOYER, C.H., MULLINEAUX, P. Low temperature-induced changes in the distribution of H₂O₂ and antioxidants between the bundle sheath and mesophyll cells of maize leaves. **J. Exp. Bot.**, Oxford, v. 51, n. 342, p. 107-113, 2000.
- PICON, A., MARTINEZ-JAVEGA, J.M., CUQUERELLA, J., DELRIO, M.A., NAVARRO, P. Effects of precooling, packaging film, modified atmosphere and ethylene absorber on the quality of refrigerated Chandler and Douglas strawberries. **Food Chem.**, Essex, v.48, n.2, p. 189-193, 1993.
- RINALLO,C, MORI, B. Oxalate and ascorbic acid in kiwifruit during growth and storage. **Ital. J. Food Sci**, Pinerolo, v.4, n.12, p. 435-442, 2000.
- RINALLO,C, MODI, G. Content of oxalate in *Actinidea deliciosa* plants grown in nutrient solutions with different nitrogen forms. **Biol. Plant.**, v. 45, n.1, p. 137-139, 2002.
- RIVERO, R.M., RUIZ, J.M., GARCIA, P.C., LOPEZ-LEFEBRE, L.R., SANCHÉZ, E., ROMERO, L. Response of oxidative metabolism in watermelon plants subjected to cold stress. **Funct. Plant Biol.**, Collingwood, v. 29, p. 643-648, 2002.
- RIZZOLO, A., FORNI, E., POLESELLO, A. HPLC assay of ascorbic acid in fresh and processed fruit and vegetables. **Food Chem.**, Essex, v. 14, p. 189-199, 1984.
- SAKIHAMA, Y., MANIO, J., SANO., S., ASADA, K., YAMASAKI, H. Reduction of phenoxyl radicals mediates by monodehydroascorbate reductase. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, Londres, v. 279, p. 949-954, 2000.
- SALA, J.M. Involvement of oxidative stress in chilling injury in cold-stored mandarin fruits. **Post. Biol. and Technol.**, Amsterdam, v.13, p.255-261,1998.

- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. Cold Spring Harbor Laboratory: New York, 1989, v.3. 1989.
- SANCHEZ, M., QUEIJEIRO, E., REVILLA, G., ZARRA, I. Changes in ascorbic acid levels in apoplastic fluid during growth of pine hypocotils. Effect on peroxidase activities associated with cell walls. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.101, n.4, p.815-820, 1997.
- SARMA AD, SREELAKSHMI Y, SHARMA R. Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation. **Phytochem.**, Oxford, v.45, n.4, p.671-674, 1997.
- SCHANTZ, M.L., SCHREIBER, H., GUILLEMAUT, P., SCHANTZ, R. Changes in ascorbate peroxidase activities during fruit ripening in *Capsicum annuum*. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 358, p. 149-152, 1995.
- SEYMOUR, G.B., TAYLOR, J.E., TUCKER, G.A. **Biochemistry and fruit ripening**. Chapman & Hall: London, 1996. 454p.
- SMIRNOFF, N, WHEELER, GL. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. **Crit. Rev. Plant Sci.**, Boca Raton, v.19, n.4, p.267-290, 2000.
- SMIRNOFF, N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-facetted molecule. **Curr. Opin. Plant Biol.**, London, v. 3, p.229-235, 2000.
- SMIRNOFF, N. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. **Ann. Bot.**, Londres, v.78, p.661-669, 1996.
- SMIRNOFF, N., CONKLIN, P.L., LOEWUS, F.A. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.**, Palo Alto, v. 52, p. 437-467, 2001.
- SUGIYAMA, N., TANIGUCHI, N. Evaluation of the role of lactate dehydrogenase in oxalate synthesis. **Phytochem.**, Oxford, v. 44, n. 4, p. 571-574, 1997.

- TABATA, K., OBA, K., SUZUKI, K., ESAKA, M. Generation and properties of ascorbic acid-deficient transgenic tobacco cells expressing antisense RNA for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. **Plant J.**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 139-148, 2001.
- TAYLOR, J.E. Exotics. In: SEYMOUR, G.B., TAYLOR, J.E., TUCKER, G.A. **Biochemistry and fruit ripening**. Chapman & Hall: London, 1996. p. 151-178.
- TEWARI, CP, KRISHNAN, PS. Enzymatic transformation of dehydroascorbic acid to diketogulonic acid. **Nature**, Londres, v. 188, p.144, 1960.
- TUCKER, G.A. Introduction. In: SEYMOUR, G.B., TAYLOR, J.E., TUCKER, G.A. **Biochemistry and fruit ripening**, Chapman & Hall: London, 1996. p. 3-31.
- URANO J, NAKAGAWA T , MAKI Y, MASUMURA T, TANAKA K, MURATA N, USHIMARU T. Molecular cloning and characterization of a rice dehydroascorbate reductase. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 466, p.107-111, 2000.
- VENDRAMINI,A.L., TRUGO, L.C. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.) at three stages of maturity. **Food Chem.**, Essex, v.70, p.195-198, 2000.
- VINCI, G., BOTRÉ, F., GIUSTINO, M. Ascorbic acid in exotic fruits: a liquid chromatographic investigation. **Food Chem.**, Essex, v. 53, p. 211-214, 1995.
- VIOLA, R., VREUGDENHIL, D., DAVIES, H.V., SOMMERVILLE, L. Accumulation of L-ascorbic acid in tuberizing stolon tips of potato (*Solanum tuberosum* L.). **J. Plant Phys.**, Stuttgart, v.152, n.2, p.58-63, 1998.

- WAGNER, G. LOEWUS, F.A. L-ascorbic acid metabolism in vitaceae- conversion to (+)-tartaric acid and hexoses. **Plant Physiol.**, Rockville, v. 54, n. 5, p. 784-787, 1974.
- WANG, C.Y. Temperature preconditioning affects ascorbate antioxidant system in chilled zucchini squash. **Post. Biol. Technol.**, Amsterdam v. 8, p. 29-36, 1996.
- WANG, S.Y., CAMP, M.J. Temperatures after bloom affect plant growth and fruit quality of strawberry. **Scientia Horticult.**, Amsterdam, v.85, p.183-199, 2000.
- WANG, S.Y., JIAO, H. Changes in oxygen-scavenging systems and membrane lipid peroxidation during maturation and ripening in blackberry. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 49, p. 1612-1619, 2001.
- WASHKO, P.W., WELCH, R.W., DHARIWAL, K.R., WHANG, Y., LEVINE, M. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid analysis in biological samples. **Anal. Biochem.**, Baltimore, v. 204, p.1-14, 1992.
- WATADA, A.E. Vitamins. In: WEICHMANN, J. ed. **Postharvest physiology of vegetables**. Marcel Dekker: New York, p. 455-468, 1987.
- WHEELER, G.L., JONES, M.A., SMIRNOFF, N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. **Nature**, Londres, v.393, n.28 , p.365-369, 1998.
- WHITE, G.A., KRUPKA, R.M. Ascorbic acid oxidase and ascorbic acid oxigenase of *Myrothecium verrucaria*. **Arch. Biochem. Biophys.**, San Diego, v.110, p.448-461, 1965.
- WHRIGHT, K.P., KADER, A.A. Effect of slicing and controlled-atmosphere storage on the ascorbate content and quality of strawberries and persimmons. **Post. Biol. Tecnol.**, Amsterdam, v.10, p.39-48, 1997.
-

- WILLS, R.B.H., WIMALASIRI, P., GREENFIELD, H. Dehydroascorbic acid levels in fresh fruit and vegetables in relation to total vitamin C activity. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.32, p.836-838, 1984.
- WILSON, CHARLES W., III, PHILIP E. SHAW, AND ROBERT J. KNIGHT, Jr. Analysis of Oxalic Acid in Carambola (*Averrhoa carambola* L.) and Spinach by High-Performance Liquid Chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.30, n.6, p.1106-1108, 1982.
- WOLUCKA, B.A., PERSIAU, G., DOORSSELAERE, J.V., DAVEY, M.W., DEMOL. H., VANDERKERCKHOVE, J., MONTAGU, M.V., ZABEAU, M., BOERJAN, W. Partial purification and identification of GDP-mannose-3",5"-epimerase of *Arabidopsis thaliana*, a key enzyme of the plant vitamin C pathway. **Plant Nat. Acad. Sci.**, v.98, n.26, p. 14843-14848, 2001.
- YABUTA, Y., YOSHIMURA, K., TAKEDA, T., SHIGEOKA, S. Molecular characterization of tobacco mitochondrial L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase and its expression in *Escherichia coli*. **Plant Cell Physiol.**, Kyoto, v.41, n.6, p.666-675, 2000.
- YAHIA, E.M., CONTRERAS-PADILLA, M., GONZALES-AGUIAR, G. Ascorbic acid content in relation to ascorbic acid oxidase activity and polyamine content in tomato and bell pepper fruits during development, maturation and senescence. **Lebensm.-Wiss. Technol.**, Londres, v.34, p.452-457, 2001.
- ZHAGUO, C., JIURU, L. Simultaneous and direct determination of oxalic acid, tartaric acid, malic acid, vitamin C, citric acid and succinic acid in *Fructus mume* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chrom. Sci.**, Niles, v.40, p.35-39, 2002.
-

8. RESUMO

Devido à importância da vitamina C para os organismos humano e vegetal, torna-se útil o estudo dos mecanismos de síntese e degradação do ácido ascórbico (AA) nos vegetais, que fornecem cerca de 90% da recomendação da ingestão diária de vitamina C. Os teores de AA podem variar, especialmente em frutas, durante o amadurecimento, mas pouco se sabe sobre os mecanismos utilizados pelas plantas para a regulação dos níveis deste composto. No presente estudo, procuramos correlacionar as atividades das enzimas de síntese (L-galactono-1,4-lactona desidrogenase - GLDHase), de degradação (ascorbato oxidase - AO e ascorbato peroxidase - APX) e de regeneração (monodesidroascorbato redutase - MDHAR e desidroascorbato redutase - DHAR) com o conteúdo do AA durante o amadurecimento da manga Keitt e da goiaba branca, por apresentarem comportamentos distintos. Também foi estudada a formação do ácido oxálico (AOx) a partir do ácido ascórbico, através de infiltração com um precursor radioativo deste último, a L-[1¹⁴C]-galactose. Na manga, tanto o conteúdo de AA quanto as atividades de GLDHase, DHAR e AO diminuíram durante o desenvolvimento e permaneceram constantes durante o amadurecimento. A APX e a MDHAR apresentaram picos de atividade no 180º dia após a antese (dpa). Não foi detectado ácido oxálico na manga variedade Keitt. Na goiaba, o conteúdo de AA aumentou durante o amadurecimento, assim como a atividade da GLDHase. A APX e a DHAR apresentaram picos de atividade no segundo dia; já as atividades de MDHAR e AO permaneceram constantes durante o período estudado. O conteúdo de AOx permaneceu praticamente constante, e houve detecção de oxalato marcado radioativamente, o que indica síntese de AOx a partir da L-galactose infiltrada, via síntese e degradação do AA. O Northern blotting do RNA total nos vários estádios do amadurecimento da manga e de um dos estádios do amadurecimento da goiaba demonstrou haver conservação da seqüência genética da GLDHase entre estas frutas e o morango. Em estudo da temperatura de armazenamento da goiaba, o abaixamento da temperatura não modifica fortemente o conteúdo de AA durante o

armazenamento da goiaba branca durante sete dias. Este conteúdo parece ser mantido pela atividade em conjunto das enzimas de síntese e regeneração, e por uma inativação parcial do sistema de degradação. Desta forma, conclui-se que as atividades das enzimas relacionadas ao metabolismo do AA diferem entre espécies de frutos, originando conteúdos diversos de AA durante o desenvolvimento e amadurecimento, e que, apesar da importância de todo o sistema enzimático, a enzima GLDHase parece estar mais relacionada à variação do AA nestes frutos do que as demais enzimas estudadas.

9. ABSTRACT

Ascorbic acid is an important compound for human and plant organisms. The AA levels may vary strongly during the fruit ripening and/or vegetable storage. The knowledge of the pathways that control this variation is very important to avoid loss and to maintain AA's levels high. In our work, we attempted to correlate the AA variation with the enzymes involved in its metabolism, which are: L-galactone-1,4-lactone dehydrogenase (GLDHase, synthesis), ascorbate oxidase and ascorbate peroxidase (AO and APX, degradation), and monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase (MDHAR and DHAR, regeneration), in mango (*Mangifera indica* L. var. Keitt) and in guava (*Psidium guajava* L. var. Paloma). We also followed the oxalic acid (AOx) formation from AA, using an radioactive precursor, the L-[1-¹⁴C]-galactose. In mango, it was verified that both the AA level and the GLDHase, MDHAR and AO activities decreased during development and remained constant during ripening. APX and DHAR showed activity peaks at the 180th day after anthesis. AOx was not detected in the mangos. In guavas, the AA level increased during the ripening, and so did the GLDHase activity. APX and DHAR showed activity peaks at the 5th day after harvest. MDHAR and AO remained practically constant during the studied period. The AOx levels remained unchanged during guava ripening. Radioactive detection confirmed AOx formation from L-galactose, via AA synthesis and degradation. Northern blotting of the total mango and guava RNA's showed hybridization with a GLDHase cDNA probe obtained from strawberry. The cold storage of guava indicated that AA levels were not significantly changed by the low temperature, in a 7 days study. The AA level seems to be controlled by both synthesis and regeneration enzyme activities, and by a partial inactivation of the degradation system. In this way, we conclude that the AA metabolic enzyme activities are different among fruit species, resulting in different AA levels during development and the ripening. It was

also concluded that, despite the complexity of the enzymatic system of AA metabolism, the GLDHase activity seems to be closely related to the AA variation.