

Frutas e vegetais

N.A. Michael Eskin,[†] Ernst Hoehn[†]

I. INTRODUÇÃO

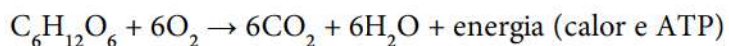
Características das frutas e dos vegetais como sabor, cor, tamanho, formato e a ausência de defeitos externos determinam sua aceitação pelos consumidores. O desenvolvimento dessas características é resultado de muitas alterações químicas e bioquímicas que têm lugar na pós-colheita e na estocagem. Uma vez que a colheita de frutas e vegetais em sua fase de maturidade correta é fundamental para o desenvolvimento de um produto amplamente aceitável para o mercado de alimentos frescos como também para serem processados, é importante dominar com mais profundidade quais mudanças estão ocorrendo neste período. Este capítulo vai ressaltar as alterações que estão acontecendo nas frutas e nos vegetais durante o período pós-colheita. É nesse período que as frutas demonstram uma redução gradual em sua qualidade em paralelo com os metabolismos de transpiração e a respiração, assim como com outras alterações bioquímicas e fisiológicas. Afinal, os alimentos vegetais deterioram pela atividade indesejável de enzimas e por danos causados por micro-organismos.

O crescimento e a maturação de frutas e vegetais antes de colhidos dependem da fotossíntese e da absorção de água e minerais por parte da planta genitora. Depois da sua separação, porém, tornam-se unidades independentes para as quais os processos respiratórios têm papel preponderante. Este capítulo vai enfatizar as mudanças na fase posterior à colheita de frutas e vegetais e que afetam a sua qualidade.

II. RESPIRAÇÃO

A respiração é o processo fundamental pelo qual os organismos vivos fazem a conversão da energia potencial em energia cinética. Em vegetais superiores os produtos principais de estocagem são a sacarose e o amido. Tais substâncias são completamente oxidadas na presença de oxigênio transformando-se em dióxido de carbono e água

com a produção de adenosina trifosfato (ATP):



A molécula de ATP é a forma na qual a energia é armazenada no interior das células. A contribuição das proteínas e lipídeos na respiração das plantas é difícil de ser avaliada, mas pode ocorrer mediante a formação de acetil-coenzima A (Acetil CoA). Na ausência de oxigênio ocorre uma respiração anaeróbica, o que resulta em degradação apenas parcial dos carboidratos e baixa produção de ATP.

As vias metabólicas envolvidas na respiração dos tecidos das plantas resultam na conversão do amido ou sacarose em glicose-6-P. Esta última é então oxidada pela glicólise (via de Embden–Meyerhoff) ou pela via das pentosesfosfato para triose fosfato, que se introduz no ciclo do ácido tricarbóxico através do piruvato (Esquema 2.1) (ap Rees, 1977). Por fim, em uma terceira fase, a fosforilização oxidativa converte NADH e FADH₂ em energia química na forma de ATP (Browse *et al.*, 2006).

A contribuição destas duas vias importantes da oxidação de carboidratos para a respiração das plantas permanece inexplicada. As técnicas experimentais utilizadas na avaliação dos papéis relativos de cada uma dessas vias baseadas na produção de ¹⁴CO₂ ou denominadas de intermediários de hexoses (ap Rees, 1980) não foram bem-sucedidas. Existe comprovação de que as duas vias existem nos tecidos vegetais (ap Rees, 1974) e que elas se transformam de modo considerável durante o desenvolvimento das plantas (ap Rees, 1977). Evidências atuais confirmam que a via glicolítica representa a de maior predominância em operação ao passo que a contribuição máxima da via das pentoses fosfato pode não exceder 30% do total (ap Rees, 1980). A importância relativa dessas vias depende, provavelmente, do tipo de planta, do órgão e do estado de maturidade.

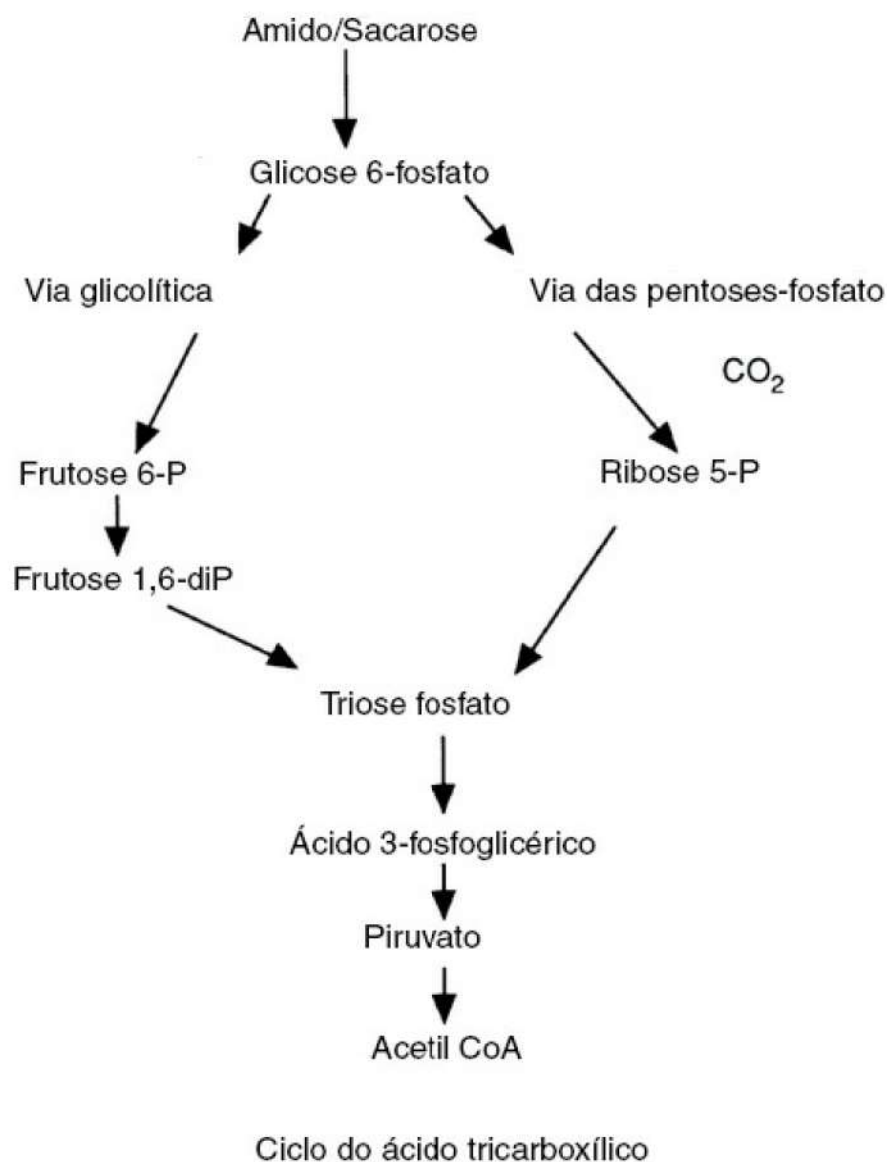
A taxa de respiração de frutas e vegetais é afetada por diversos fatores ambientais. Nos casos em que isto resulta em efeitos negativos nos tecidos vegetais o fenômeno é definido como estresse. Durante o armazenamento de frutas e vegetais (seção VIII) os efeitos de baixas temperaturas, redução dos níveis de oxigênio (O₂) e aumento da concentração de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera de armazenamento são utilizados para aumentar a vida de prateleira do produto estocado. No entanto, é necessário manter um *status* de energia adequado para evitar o escurecimento ou a senescência das frutas e vegetais armazenados (Saquet *et al.*, 2000; 2003a; Xuan *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2007). É conhecido que reduzir o nível de concentração de O₂ durante o controle da atmosfera de estocagem reduz o ritmo da respiração dos vegetais, assim como o suprimento de energia e que grande limitação de O₂ induz a uma respiração fermentativa (anaeróbica) no metabolismo no produto estocado (Esquema 2.1). O rendimento de ATP durante a respiração anaeróbica é de apenas de 2 moles de ATP por mol de açúcar hexose comparada com 36 moles de ATP por mol de hexose na respiração aeróbica. Portanto, o *status* de produção de energia pode ser insuficiente e provocar danos durante a armazenagem (Jiang *et al.*, 2007).

A. Frutas

Grande número de frutas tem um importante aumento na atividade respiratória depois da colheita, fato que é denominado como aumento climatérico da respiração. Este fenômeno foi percebido pela primeira vez por Kidd e West (1922, 1930a) ao observar um grande aumento no gás dióxido de carbono ao final do período de maturação de maçãs. A partir de então surgiram inúmeros relatos sobre a ocorrência deste mesmo fenômeno em vários tipos de frutas. A adequação do termo climatérico foi questionada por Rhodes (1970), que sugeriu que fosse utilizado em todas estas situações descrevendo “toda a fase de controle da vida da fruta desencadeada pelo etileno e as alterações concomitantes que ocorrem”.

McGlasson *et al.* (1978), no entanto, sugeriram que respiração climatérica seria um termo mais apropriado para descrever este fenômeno gasoso. Biale e Young (1981), porém, preferiram que a denominação fosse uma descrição

mais abrangente na qual o termo climatérico descreveria as alterações físicas, químicas, fisiológicas e metabólicas associadas ao aumento da taxa respiratória que ocorre durante a fase de transição do crescimento e maturação ao período final de senescência. Basicamente, o termo climatérico define os últimos estágios da fruta a nível celular, o que determina a qualidade da fruta que será oferecida ao consumidor.



ESQUEMA 2.1 Vias glicolítica e das pentoses-fosfato.

Biale (1960a; 1960b) classificou tentativamente as frutas como climatéricas ou não climatéricas conforme suas taxas respiratórias pós-colheita. Em uma revisão posterior, Biale e Young (1981) sugeriram uma lista mais extensa de frutas que pertencem aos dois grupos, como pode ser visto na Tabela 2.1. Frutas como o melão cantalupo, o melão “honeydew” e os figos foram incluídas e consideradas climatéricas (Lyons *et al.*, 1962; Pratt e Groeschel, 1968; Marei e Crane, 1971). Algumas frutas raras também foram incluídas, como goiabas e abricó-do-pará (Akamine e Goo, 1978; 1979a; 1979b; Saltveit, 2004).

O período imediatamente anterior ao aumento climatérico, quando o nível respiratório está no ponto mínimo é conhecido como pré-climatérico. Após o aumento climatérico ocorre a fase pós-climatérica, na qual há um declínio do ritmo respiratório. Ao contrário do súbito aumento da atividade respiratória que caracteriza as frutas climatéricas, as frutas não climatéricas passam por uma fase de um declínio regular da atividade respiratória. Essa tendência de baixa na atividade respiratória pós-colheita foi verificada pela primeira vez em limões estocados a 15°C observada por Biale e Young (1947) e posteriormente em laranjas (Biale, 1960a; 1960b). A Figura 2.1 ilustra a

diferença na atividade respiratória entre frutas climatéricas e não climatéricas, por exemplo, abacates e limões.

Na primeira classificação feita por Biale (1960a; 1960b), as laranjas foram classificadas como frutas não climatéricas uma vez que tinham baixo nível respiratório. Foi comprovado em seguida que alguns membros da família dos cítricos têm atividade respiratória similar à das frutas climatéricas. Apesar de terem taxas respiratórias mais altas, uma tendência de baixa atividade respiratória foi observada em cultivares de “Valencia” e “Washington Navel”. Esse declínio na respiração foi observado por Bain (1958) em laranjas “Valencia” desde o surgimento das frutas até sua maturidade. No entanto, Trout *et al.* (1960) relataram um típico aumento respiratório em laranjas estocadas a 4,3°C-10°C. Esses resultados foram atribuídos por Biale e Young (1981) a possíveis danos pelo frio em estocagem a baixas temperaturas. Apenas metade das laranjas mantidas a 10°C apresentaram um aumento na respiração após a colheita, o que pode ter ocorrido por causa da imaturidade de algumas destas frutas. Aharoni (1968) também utilizou o termo climatérico para descrever o aumento na taxa respiratória após a colheita de laranjas jovens e imaturas do tipo “Washington Navel”, “Shamouti” e “Valencia”, assim como em grapefruit sem sementes do tipo Marsh estocadas a 16°C e 20°C. Por outro lado, frutas já crescidas e maduras não demonstraram nenhum aumento na atividade respiratória. Eaks (1970) examinou os padrões respiratórios de vários tipos de frutas cítricas através de toda a sua ontogenia. As laranjas pequenas e imaturas e o grapefruit mostraram um aumento na atividade da respiração e do etileno a 20°C por vários dias após a colheita. À medida que o peso da fruta aumenta, o que é característico da fase de maturação, o nível do dióxido de carbono e a produção de etileno diminuem até a maturação ficar próxima ou ser completada; nesta fase, nenhuma alteração da respiração foi observada. Com base nesses estudos ficou evidente que as frutas cítricas foram classificadas corretamente como não climatéricas.

TABELA 2.1 Atividade respiratória de frutas selecionadas

Climatéricas	Não climatéricas
Maçã	Mirtilo
Damasco	Uva
Abacate	Toranja
Banana	Jamelão
Fruta-pão	Limão
Figo	Azeitona
Goiaba	Laranja
Abriçó-do-pará	Abacaxi
Melão-cantalupo	Morango
	Melão honeydew

Adaptado de Biale e Young (1981).

Rhodes (1970) observou que se o período climatérico tivesse sido definido como o período de atividade metabólica intensificada durante a transição da fase de crescimento até a senescência das frutas, a confusão com as frutas cítricas teria sido evitada. Uma situação similar foi observada com as uvas, nas quais um aumento da respiração foi relatado por Peynaud e Riberau-Gayon (1971) durante o crescimento rápido, definido como “climatérico rudimentar”. No entanto, essa situação foi esclarecida quando a alteração respiratória na pós-maturação demonstrou possuir um padrão tipicamente não climatérico, fato consistente com trabalhos anteriores de Geisler e Radler (1963). Uma controvérsia similar surgiu em relação aos abacaxis e embora Dull *et al.* (1967) tenham encontrado uma pequena tendência de aumento respiratório ela não é típica de frutas climatéricas. A identificação de vários tomates mutantes por Herner e Sink (1973) sem nenhum padrão climatérico foi revisada depois por Tigchelaar *et al.* (1978 a, b). Essas frutas mutantes não produzem etileno e têm baixo teor de carotenoides. Um aspecto específico desses casos foram os baixos níveis de poligalacturonase, o que explica a sua firmeza prolongada.

B. Vegetais

Quando os vegetais são separados da planta-mãe, seu metabolismo continua a funcionar apesar de as reações catabólicas tornarem-se rapidamente predominantes. O aumento climatérico característico em algumas frutas como maçãs e abacates não ocorre em vegetais, que não possuem uma divisão clara entre a maturação e a senescência.

A intensidade, assim como o ritmo da respiração, varia conforme a planta, o grau de maturação e se o vegetal estiver em pleno crescimento no momento da colheita ou sendo parte da estocagem. McKenzie (1932), por exemplo, relatou uma intensidade respiratória maior em alfaces imaturas logo após a colheita (*Lactuca sativa*) durante as primeiras 12 horas. Depois desse período a respiração diminuiu e atingiu o mesmo nível encontrado em alfaces maduras. A deterioração de vários vegetais foi examinada por Platenius (1942), que descobriu que a taxa respiratória inicial dos aspargos (*Asparagus officinalis*) a 24°C é quase 50 vezes maior do que a das batatas. A taxa respiratória declinou em todos os vegetais estocados durante 60 dias, independentemente da temperatura. As taxas de respiração iniciais parecem ser um indicador útil com relação ao potencial de tempo de vida útil do vegetal durante o período de pré-resfriamento e início da estocagem. Uma alta taxa de respiração, no entanto, indica uma vida curta durante a estocagem, enquanto o oposto é verdadeiro para variedades com baixa taxa de respiração. Tal fato pode ser comprovado em um grande número de vegetais na Figura 2.2.

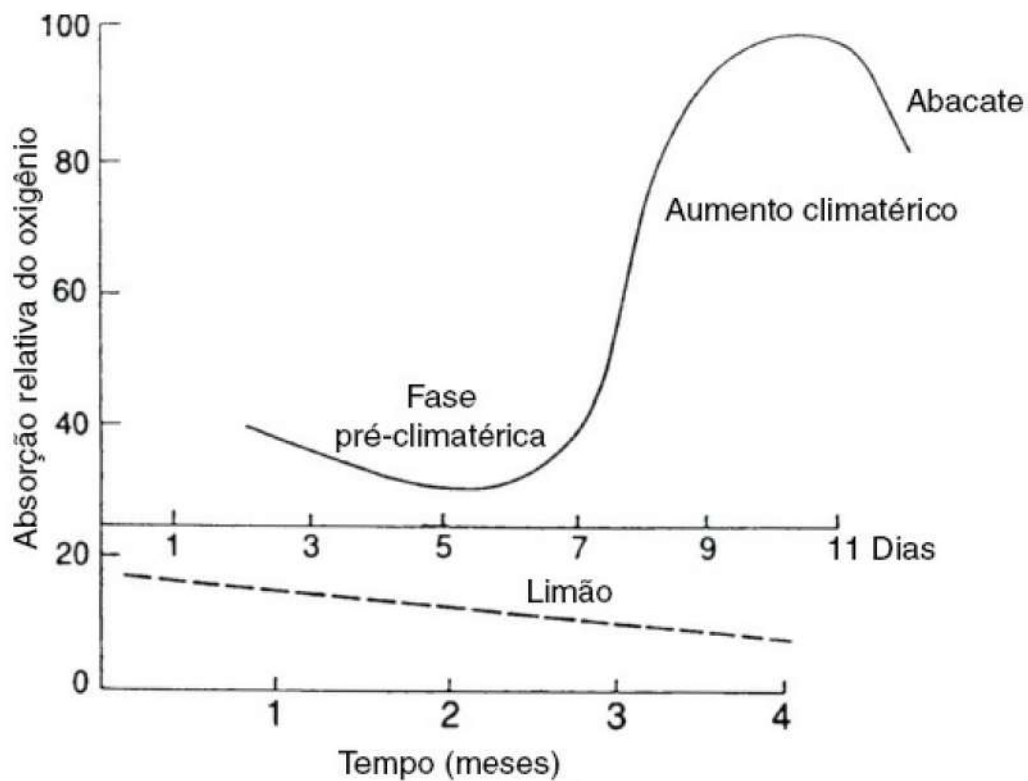


FIGURA 2.1 Atividade respiratória em frutas climatéricas, exemplificadas pelo abacate, comparada com frutas não climatéricas, representadas pelo limão (Biale *et al.*, 1954). Reimpresso com autorização do detentor dos direitos autorais, American Society of Plant Physiology (ASPP).

Vegetais e frutas podem ser classificados quanto à taxa respiratória como: extremamente alta, muito alta, alta, moderada, baixa e muito baixa (Saltveit, 2004). Tecidos jovens, por exemplo, como as partes de aspargos em fase de crescimento ou sementes de ervilhas verdes em desenvolvimento possuem altas taxas respiratórias, enquanto taxas baixas são encontradas em órgãos de estocagem como raízes (batatas) e bulbos (cebolas). Vegetais folhosos apresentam taxa respiratória moderada enquanto alguns vegetais, como o repolho, podem ser estocados em baixas temperaturas por períodos de tempo consideráveis. Outros, por exemplo, pepinos (*Cucumis sativa*), são muito suscetíveis a danos pelo frio se estocados na faixa de temperatura de 0°C-10°C (Eaks e Morris, 1956). Muitos

outros produtos, em particular os que vêm dos trópicos ou subtropicais são suscetíveis a danos pelo frio quando a temperatura atinge valores abaixo de 10°C-12°C (Wang, 1989; Saltveit, 2004). Os danos provocados pelo frio são diagnosticados por um aumento da respiração que atinge um patamar que corresponde ao resfriamento, após o qual ocorre um declínio da respiração.

1. Controle do aumento climatérico

O grande aumento na atividade respiratória associado ao período climatérico tem sido atribuído a vários fatores diferentes. Uma das teorias propõe que a razão é a mudança repentina na “permeabilidade das membranas celulares ou na capacidade de organização” (Solomos e Laties, 1973). Enquanto tais alterações são evidentes durante a maturação, permanece a questão de serem elas causa ou consequência do processo de maturação (Theologis e Laties, 1978). A segunda teoria enfoca o aumento da síntese de proteínas como um pré-requisito necessário para o processo de maturação (Brady *et al.*, 1976; Richmond e Biale, 1966) ou um aumento significativo da produção de ATP via estímulo da respiração (Biale, 1960b). Pesquisas posteriores, porém, revelaram que não há diferenças na capacidade respiratória da mitocôndria obtida de tecidos do abacate no pré-climatérico ou climatérico (Biale, 1969).

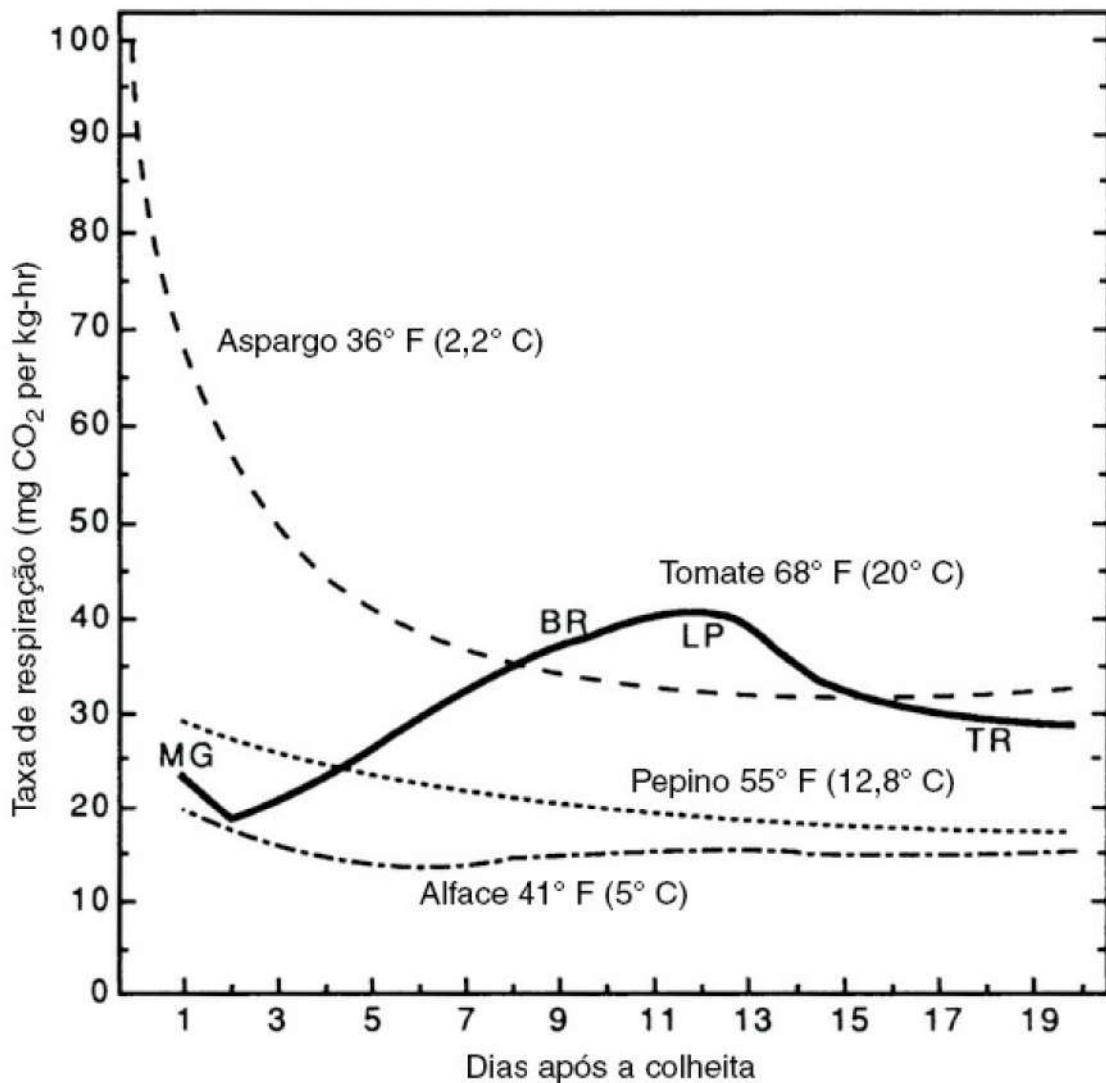


FIGURA 2.2 Taxa de respiração de um broto (aspargo), um vegetal folhoso (alface repolhuda), uma fruta não madura (pepino) e uma madura (tomate) a temperaturas encontradas costumeiramente durante sua comercialização [para tomate: MG = *mature green* (verde desenvolvido); BR = (*breaker*) coloração incipiente; LP = (*light pink*) rosa-claro; TR = (*table red*) vermelho maduro]. Dados obtidos em Lipton (1977); Pratt *et al.* (1954); Workman *et al.* (1957) e Ryall and Lipton (1979).

Além do mais, a taxa de respiração pré-climatérica de fatias de abacate foi suficiente para facilitar o aumento climatérico (Millerd *et al.*, 1953). Esse fato foi confirmado em estudos que utilizaram mitocôndrias isoladas de abacates (Biale *et al.*, 1957). Outras pesquisas realizadas por Lance *et al.* (1965) e Hobson *et al.* (1966), utilizando técnicas mais aprimoradas, com mitocôndrias isoladas de abacates em todos os estágios do climatério, demonstraram que as atividades oxidativas e fosforilativas permaneceram inalteradas enquanto os cofatores estiveram presentes no meio. A estimulação da glicólise em abacate em condições anaeróbicas também demonstrou considerável capacidade glicolítica latente (Solomos e Laties, 1974). Esses estudos indicaram a adequação das enzimas endógenas em frutas pré-climatéricas na manutenção da respiração climatérica. O fato é consistente com os estudos feitos por Frenkel *et al.* (1968) e McGlasson *et al.* (1971), que relataram que à medida que se inibe a síntese proteica, evita-se a maturação de ervilhas intactas e de fatias de bananas, mas não se observa declínio no curso da respiração.

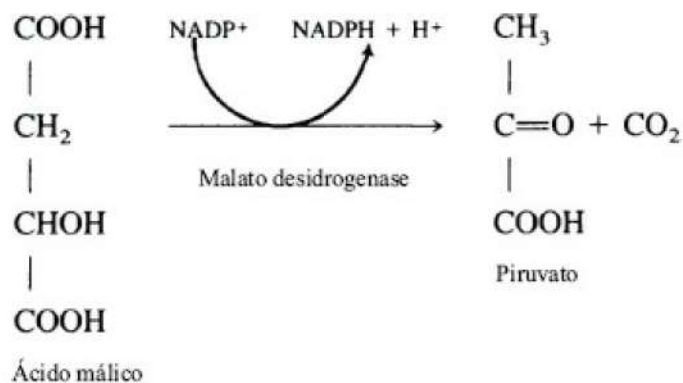
O enorme aumento na atividade respiratória que acompanha a maturação de frutas do tipo climatérico parece estar ligado a alguma alteração na função da respiração mitocondrial *in vivo* (Biale, 1960a; 1960b). Uma explicação possível para esse fato pode ser atribuída a um aumento na respiração cianeto resistente (Solomos e Laties, 1976; Solomos, 1977). Solomos e Laties (1974; 1976) observaram que o cianeto dá início a alterações fisiológicas e bioquímicas idênticas em abacates e tubérculos de batatas. O cianeto é um conhecido inibidor da citocromo oxidase, a oxidase terminal na cadeia de transporte de elétrons. Assim, há uma via cianeto-insensível que permite a oxidação de substratos respiratórios na presença de cianeto (Bendall e Bonner, 1971). A presença dessa via cianeto-resistente ou via alternativa foi comprovada em frutas que respondem ao etileno (Solomon e Laties, 1974; 1976). Posteriormente Theologis e Laties (1978) estudaram essa via na respiração de abacates e bananas em estágio de maturação. Esses pesquisadores descobriram que o aumento da respiração durante o período climatérico em frutas intactas é mediado pelo citocromo. As frutas pré-climatéricas têm a capacidade de manter o transporte de elétrons pela via do citocromo apesar de permanecer não expressa. Durante o aumento do climatérico a via alternativa parece permanecer em baixo nível de atividade e pode estar envolvida na geração de peróxido (Rich *et al.*, 1976). A enzima responsável pela respiração via do cianeto-resistente é denominada de oxidase alternativa (Vanlerbergh e McIntosh, 1997). A função dessa via alternativa não está totalmente elucidada, mas pode diminuir os efeitos deletérios do estresse na respiração (Tucker, 1993; Wagner e Krab, 1995; Møller, 2001). Um debate sobre o possível papel regulatório do cianeto na biosíntese do etileno pode ser encontrado na seção IV.

2. Controle enzimático

A possibilidade de que a atividade enzimática represente o fator de controle do estágio climatérico já foi discutida. Tager e Biale (1957) notaram um aumento da atividade das enzimas carboxilase e aldolase durante a maturação de bananas acompanhada pela troca da via das pentoses fosfato pela via glicolítica. Isso pode ocorrer no período de transição da fase pré-climatérica para pós-climatérica durante a maturação da fruta.

a. Enzima malato desidrogenase

Hulme *et al.* (1963) relataram a ocorrência de um grande aumento na atividade das enzimas malato desidrogenase (desidrogenase málica) e da piruvato carboxilase durante a maturação das maçãs. Este fato explicaria o pequeno aumento na absorção de oxigênio durante a maturação das maçãs quando comparada ao grande aumento na evolução do dióxido de carbono.



Várias pesquisas demonstraram que a enzima malato desidrogenase possui vários graus de resistência ao cianeto dependendo da atividade da enzima (Lance *et al.*, 1967; Macrae, 1971; Coleman and Palmer, 1972; Neuburger e Douce, 1980). Moreau e Romani (1982) examinaram a oxidação do malato durante o aumento climatérico na mitocôndria do abacate com foco especial na via alternativa cianeto-resistente. O aumento da atividade da enzima malato desidrogenase acompanhou o aumento da oxidação do malato à medida que a maturação progredia durante o climatérico. O malato é oxidado pela desidrogenase málica pela via do citocromo. Ele também pode ser oxidado pela via alternativa do NADH desidrogenase rotenona-resistente localizada na camada interna da membrana da mitocôndria (Palmer, 1976; Marx e Brinkmann, 1978; Rustin *et al.*, 1980). Esses pesquisadores concluíram que a enzima desidrogenase málica e a via da alternativa da oxidase provavelmente funcionam em condições de demanda relativamente baixa de ATP e características de alteração para alta energia nos últimos estágios do climatérico. Embora a regulação da via transportadora de elétrons via citocromo e vias alternativas ainda não tenha sido totalmente elucidada na mitocôndria do abacate, o envolvimento da via alternativa não pode ser ignorado.

b. Fosfofrutoquinase e pirofosfato: frutose-6-fosfato fosfotransferase

Salimen and Young (1975) examinaram a possibilidade de o período climatérico ser regulado pela ativação das enzimas envolvendo a fosfofrutoquinase (PFK) (ATP:d-frutose-6-fosfato-1-fosfotransferase, EC 2.7.1.11). Essa questão foi baseada na pesquisa de Barker e Solomos (1962), que observaram um aumento na atividade da frutose 1,6-difosfato durante a maturação de bananas e tomates por Chalmers e Rowan (1971). Este aumento na atividade de frutose 1,6-difosfato foi atribuído à ativação da PFK. Salimen e Young (1975) relataram que a ativação desta enzima é responsável por um aumento de 20 vezes na atividade de frutose 1,6-difosfato durante o processo de maturação. A separação por eletroforese da PFK demonstrou que não houve o surgimento de novas formas de enzimas durante o climatérico e que as enzimas se mantiveram no formato oligomérico. Rhodes (1971) relatou que a PFK estava presente em sua forma oligomérica em tomate até a fase climatérica enquanto as espécies oligoméricas e de baixa massa molecular foram isoladas na fase pós-climatérica. Isaac e Rhodes (1982) descobriram depois que a PFK existe na forma oligomérica na fase em que o tomate adquire uma coloração inicial avermelhada. Utilizando a cromatografia de permeação em gel Isaac and Rhodes (1987) identificaram um único pico que corresponde à forma oligomérica nos estádios de coloração verde e início de coloração avermelhada. Dois picos foram separados, no entanto, nos estádios laranja e vermelho de maturação do tomate, que correspondem aos formatos oligoméricos e monoméricos da enzima (Figura 2.3). Para explicar o comportamento da PFK, os pesquisadores sugeriram que a estimulação da enzima ocorreu pela interação com o fosfato inorgânico (P_i) do vacúolo em consequência de alterações na permeabilidade na membrana durante o início do climatérico. A interação contínua com o P_i e citrato afetam a enzima em nível molecular, o que provoca a dissociação da forma oligomérica da enzima em subunidades monoméricas durante os estádios finais da maturação.

Bennett *et al.* (1987) examinaram o papel da regulação glicolítica do climatérico em abacates. Empregaram

espectroscopia de ressonância nuclear magnética ^{31}P *in vivo* para monitorar os níveis de nucleótídeos fosforilados. Concentraram atenção especial na pirofosfato:frutose-6-fosfato fosfotransferase (PFP), uma enzima alternativa encontrada em abacaxis por Carnal e Black (1979). Essa enzima catalisa reações idênticas à PFK, utilizando PP_i em vez de ATP como doador de fosfato, e é ativada pela frutose 2,6-bifosfato. Um aumento na quantidade de frutose 2,6-fosfato ocorreu em conjunto com um aumento da respiração, o que deu a ideia, aos pesquisadores, de que o PFP também pode estar envolvido na regulação da maturação da fruta do abacate.

III. INÍCIO DA MATURAÇÃO

O etileno é uma das várias substâncias voláteis que emanam das frutas e dos vegetais e que foi identificado mais tarde por Gane (1934) como o componente ativo no estímulo da maturação. A aplicação de quantidades mínimas de etileno, na ordem de 1 ppm, estimula a atividade respiratória, induz a maturação e apressa o aparecimento do estágio climatérico. O etileno, portanto, foi rapidamente reconhecido como o hormônio de plantas que dá início à maturação assim como regula muitos aspectos do crescimento das plantas, de seu desenvolvimento, de suas respostas a patógenos e a danos, senescência e respostas abióticas e bióticas ao estresse (Abeles, 1973; Gazzarrini e McCourt, 2001; Alexander e Grierson, 2002). Com base no tipo de respiração, as frutas podem ser agrupadas como climatéricas e não climatéricas, fato que foi descrito no início do capítulo (Lelievre *et al.*, 1997). A maturação em frutas climatéricas (Tabela 2.1) se manifesta por um aumento na respiração e da concentração de etileno. Em frutas não climatéricas a respiração não sofre nenhuma alteração no pós-colheita e a produção de etileno permanece muito baixa durante a maturação. Além do aumento do metabolismo respiratório, o etileno exógeno estimula sua própria biossíntese em frutas de maturação climatérica (Burg e Burg, 1965). A aplicação de níveis maiores de etileno exógeno em frutas climatéricas antecipa o aumento climatérico, acompanhada por um aumento da absorção de oxigênio (Figura 2.4). O etileno, portanto, é necessário para a maturação uma vez que o processo de maturação pode ser inibido por controle genético (Oeller *et al.*, 1991; Theologis *et al.*, 1993; Picton *et al.*, 1993; Ayub *et al.*, 1996; Brummell, 2005) ou pela ação de inibidores do etileno como 1-metil-ciclopropeno (1-MCP) (Sisler e Serek, 1997). Quanto às frutas não climatéricas, um aumento na absorção de oxigênio acompanha a aplicação de etileno. No caso de frutas climatéricas, quando o etileno já causou o aumento da respiração o processo não pode ser revertido. Esse fato estabelece um grande contraste em frutas não climatéricas, cuja atividade respiratória retorna aos níveis de controle quando o tratamento com etileno é finalizado (Vendrell *et al.*, 2001).

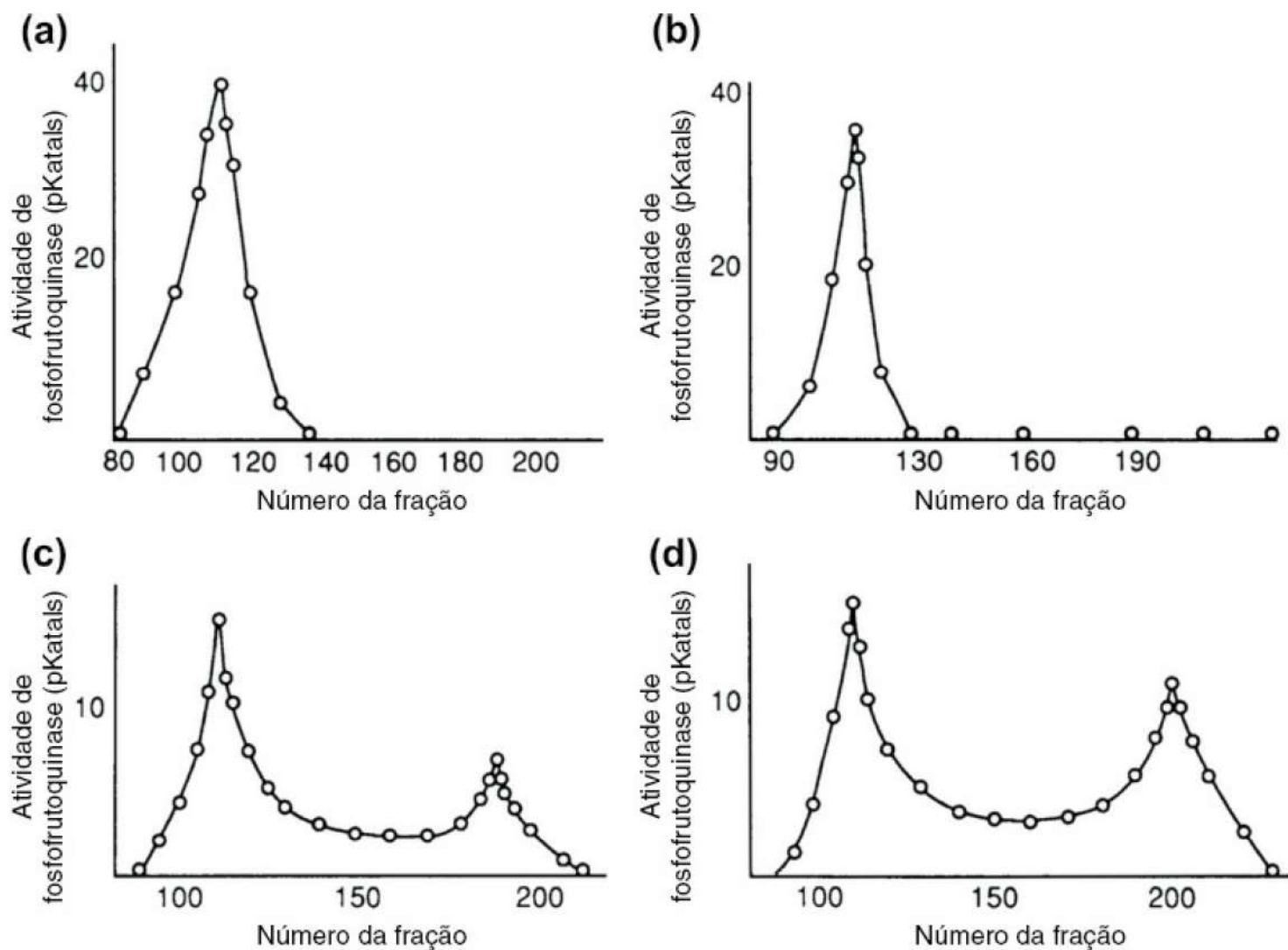


FIGURA 2.3 Eluição da preparação enzimática de fosfofrutoquinase (PFK) de tomates (a) verdes; (b) início do alaranjado, (c) alaranjados e (d) vermelhos em Ultrogel Aca p (Isaac e Rhodes, 1987). Reimpressão autorizada. Copyright © Pergamon Press.

Há algum tempo o etileno era considerado um subproduto e não um hormônio de maturação uma vez que a quantidade presente durante a fase pré-climatérica em muitas frutas seria insuficiente para estimular a maturação (Biale *et al.*, 1954). Tal conclusão baseava-se na quantidade de etileno que emanava da fruta e não nas concentrações intracelulares e era medida utilizando técnicas manométricas, que eram pouco sensíveis. Pesquisas posteriores utilizando cromatografia a gás forneceram ampla comprovação da presença de etileno nos espaços intracelulares (Burg e Burg, 1965). É geralmente aceito que os níveis de etileno necessários para estimular a maturação estão entre 0,1-1,0 ppm, faixa fora do alcance das técnicas manométricas normais. A Tabela 2.2 reune a alteração nos níveis endógenos de etileno durante a maturação de algumas frutas climatéricas e não climatéricas. No caso do abacate, manga e peras o nível de etileno antes do aumento climatérico é mais baixo do que o limite aceito de 0,1 ppm. Biale e Young (1971) notaram que a iniciação rápida da maturação em abacates requer níveis de etileno mais altos do que 1 ppm. Esses pesquisadores afirmaram, 10 anos mais tarde (Biale e Young, 1981) que era difícil fazer generalizações quanto ao nível mínimo de etileno necessário para induzir o aumento do climatério por causa das poucas informações disponíveis. Peacock (1972) sugeriu que a eficiência do etileno é definida pela concentração, tempo de exposição e o momento em que é aplicado após a colheita. À medida que a fruta aproxima-se da maturação fica evidente que há uma diminuição da sensibilidade ao etileno.

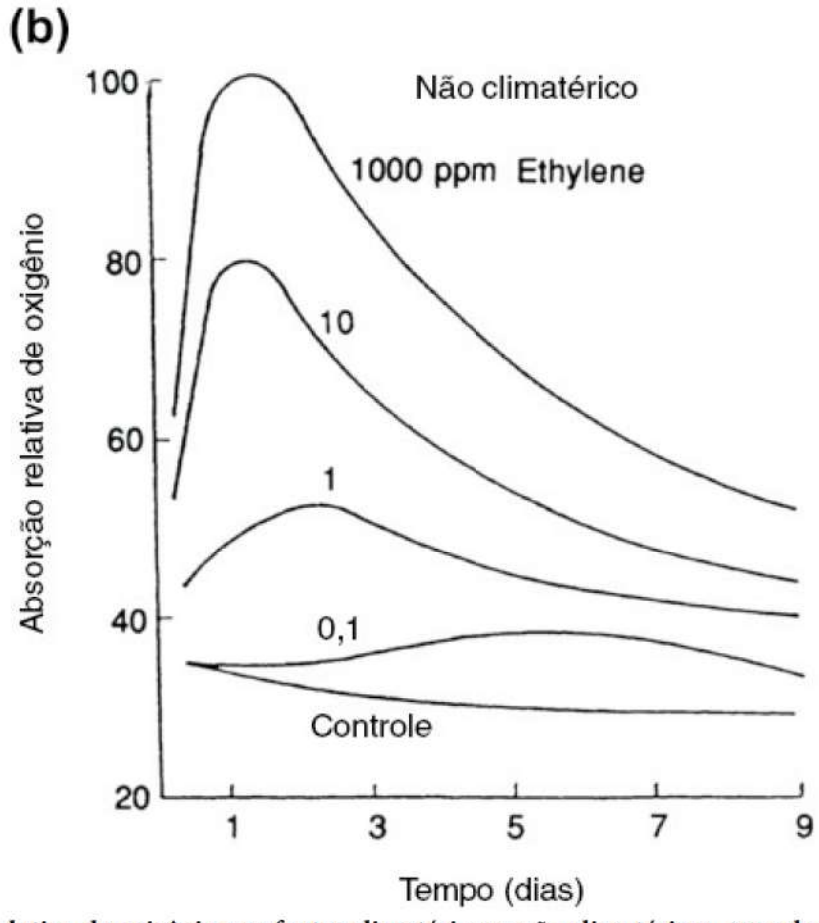
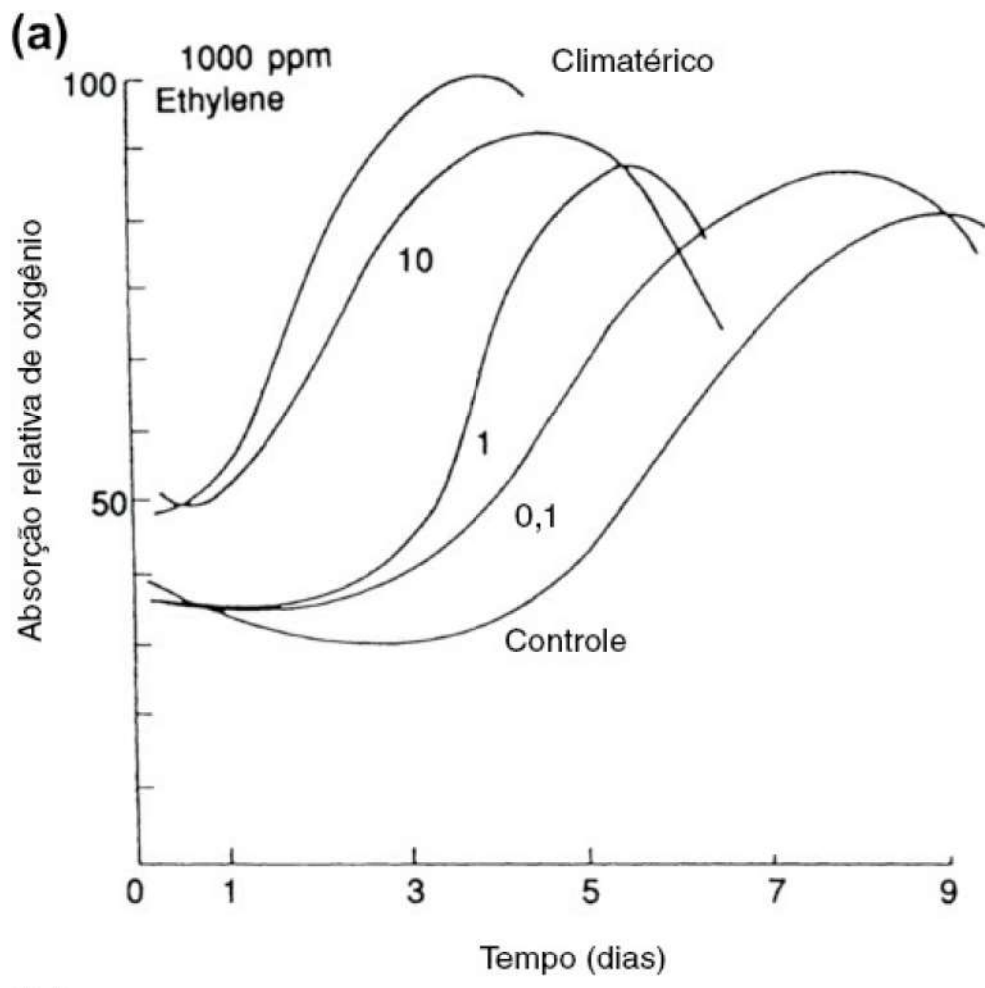


FIGURA 2.4 Absorção relativa de oxigênio por frutas climatericos e não climatericos, em relação a concentração de etileno. Biale (1964).

Estudos realizados por Vendrell e McGlasson (1971) em frutas como banana e figos pré-climatéricos (Zeroni *et al.*, 1976), revelaram no entanto que etileno exógeno exerceu uma regulação tipo inibição pelo produto final na produção de etileno. Essa autoinibição da produção de etileno também foi relatada em frutas não climatéricas, por exemplo, nos tecidos do flavedo danificados de cítricos (Riov e Yang, 1982a). Com base nessas informações, McMurchie *et al.* (1972) propuseram o conceito de sistema 1 e sistema 2 do etileno. O sistema 1 é responsável pela baixa taxa de produção de etileno em frutas pré-climatéricas e pela maioria, se não pelo total, do etileno produzido pelos tecidos de vegetais. O sistema 2 é responsável pela alta taxa de produção do etileno observada durante o climatérico e é induzido por autocatálise do etileno. A transição para o sistema 2 parece ser consequência da ativação transcricional dos genes de diferentes ACC (ACS) sintases e genes de ACC (ACO) oxidases (Esquema 2.2) (Barry *et al.*, 2000; Alexander e Grierson, 2002).

É evidente que o etileno possui um papel crucial e complexo na regulação da maturação de frutas climatéricas. O etileno afeta a expressão de várias enzimas específicas necessárias à maturação enquanto outros compostos, ainda não identificados, podem induzir esse processo em frutas não climatéricas. Parece, portanto, que as vias etileno-dependentes e etileno-independentes da maturação coexistem. O isolamento dos genes associados com o processo de maturação de frutas não climatéricas podem conduzir a uma maior elucidação da regulação da maturação das frutas (Aharoni *et al.*, 2000; Flores *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2011).

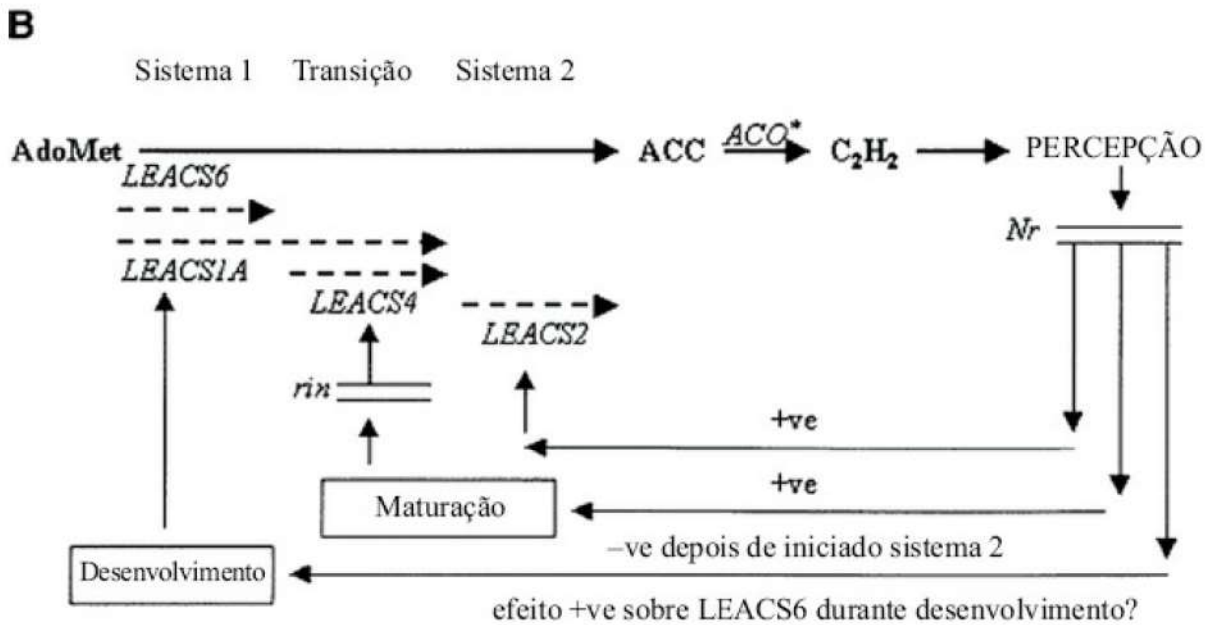
TABELA 2.2 Teor de etileno endógeno (ppm) em algumas frutas climatéricas e não climatéricas

Fruta	Variedade	Pré-climatérica	Início	Pico climatérico
Climatérica				
Abacate ^a	Fuerte	0,03	0,09	25
Banana ^b	Gros Michel	0,1	1,5	40
Manga ^b	Kent Haden	0,01	0,08	3
Pera ^c	Anjou	0,09	0,4	40
Não climatérica			Estado estabilizado	
Limão ^a			0,1–0,2	
Laranja ^a			0,1–0,2	
Lima ^a			0,3–2,0	

^a De Akamina e Goo (1979b)

^b De Burg e Burg (1962)

^c De Kosiyachinda e Young (1975)



* Principalmente *ACO1* durante maturação da fruta.

ESQUEMA 2.2 (A) Representação esquemática do papel do etileno no amadurecimento das frutas. (B) Modelo propondo a regulação diferencial do gene ACS durante a transição do sistema 1 para o sistema 2 da síntese do etileno. Os símbolos -ve (negativo) e +ve (positivo) referem-se à ação do etileno em sinalizar vias resultando em repressão (-ve) ou estimulação (+ve) da expressão do gene. Barry *et al.* (2000) e Alexander e Grierson (2002).

IV. BIOSÍNTESE DO ETILENO

Vários precursores do etileno foram propostos, mas é bem estabelecido que a metionina é o principal precursor em vegetais superiores (Kende, 1993; Alexander e Grierson, 2002).

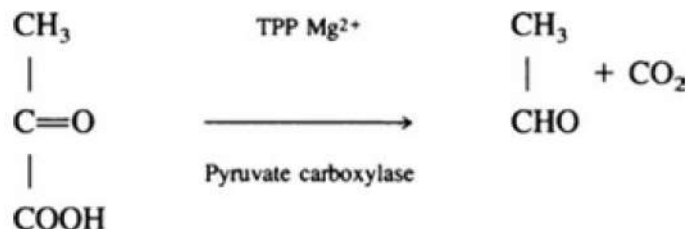
A. Metionina como um precursor do etileno

Lieberman e Mapson (1964) examinaram inicialmente a produção de hidrocarbonetos, incluindo o etano e o etileno, em sistemas-modelo contendo ácido linoleico peroxidado, Cu^{2+} , e ácido ascórbico. Para testar se a produção de etileno a partir do ácido linoleico envolve radicais livres, os pesquisadores adicionaram um sequestrante de radicais livres, a metionina. Em vez de a metionina inibir essa reação, eles descobriram que a produção de etileno foi grandemente aumentada. Pesquisas posteriores demonstraram que o etileno pode ser produzido na ausência de lipídeos peroxidados sempre que o ascorbato e metionina- Cu^{2+} estiverem presentes

(Lieberman *et al.*, 1965). Em pouco tempo, ficou estabelecido que a metionina é, de fato, o precursor biológico do etileno em plantas (Lieberman *et al.*, 1965; Yang, 1974). Empregando ^{14}C -metionina marcada, Lieberman *et al.* (1966), demonstraram sua conversão em etileno em tecidos de maçã. O fato de o C1 da metionina ter liberado dióxido de carbono e de C3 e C4 terem produzido etileno no sistema químico e no tecido da planta sugeriu que existe um mecanismo comum nos dois processos. Os dois sistemas são bem diferentes, mas a metionina foi convertida, em sistemas modelo, via metional com o grupo metil sulfeto liberando dimetil sulfeto volátil. Este processo difere em tecidos de plantas já que a metionina é limitante, de modo que o grupo de enxofre é reciclado para ressíntese da metionina.

1. O ciclo Yang, a reciclagem da metionina

A inibição da produção de etileno a partir da metionina na presença de DNP (um inibidor da fosforilação oxidativa) indica a formação de *S*-adenosil-*l*-metionina (SAM) como um intermediário nesse processo (Burg, 1973; Murr and Yang, 1975). Ao utilizar a metionina marcada com C14, Adams e Yang (1977) relataram que o grupo $\text{CH}_3\text{-S}$ da metionina foi liberado como 5-metiltioadenosina (MTA) durante a síntese do etileno em fatias de maçã. O MTA só é formado como produto da degradação se o etileno foi sintetizado a partir do SAM. Além do MTA, os pesquisadores detectaram a presença de 5-metiltioribose (MTR), produto da degradação do MTA no tecido de maçãs. Tal fato sugere que a unidade $\text{CH}_3\text{-S}$ do MTR combinada com um receptor de quatro-carbonos, como a homoserina, forma a metionina, enquanto se libera o grupo ribose. Mais tarde foi descoberto que a unidade de ribose do MTA/MTR é diretamente incorporada à metionina junto com o grupo $\text{CH}_3\text{-S}$. Yung e Yang (1980) demonstraram que três moléculas de MTR estão envolvidas na formação da metionina, com a fração da ribose modificada para formar o 2,3-aminobutirato da metionina e a unidade $\text{CH}_3\text{-S}$ permanece intacta:



Esta via explica como a metionina é reciclada e mantida nos tecidos das plantas. A via geral envolvida na ressíntese da metionina a partir do MTA é mostrada no Esquema 2.3. O fosfato MTR-1 é convertido em ácido 2-oxo-4-metiltiobutanoico, a partir do qual a metionina é formada novamente. Miyazaki e Yang (1987) examinaram as enzimas do ciclo metionina em várias frutas e demonstraram que a conversão do MTR em metionina em maçãs em maturação não é um fator limitante na formação do etileno. Este ciclo foi denominado ciclo de Yang em livros de bioquímica da fisiologia vegetal (Bradford, 2008).

2. Metionina e biossíntese do etileno

Estudos realizados por Hansen (1942) e Burg e Thimann (1959) demonstraram que a produção de etileno cessava quando maçãs e peras eram estocadas em atmosfera de nitrogênio. Uma nova exposição ao oxigênio, porém, restaurava a produção de etileno. A rápida produção de etileno sugere um acúmulo de um composto intermediário durante a estocagem anaeróbica. Adams e Yang (1979), utilizando metionina l [$U\text{-}^{14}\text{C}$], identificaram o ácido carboxílico 1-aminociclopropano-1 (ACC) como o fator intermediário que se forma na maçã estocada com nitrogênio. Ao que parece, a metionina é primeiro convertida em *S*-adenosilmetionina, que posteriormente, sofre fragmentação para ACC e MTA. Esses pesquisadores também descobriram que o ACC marcado com C14 foi convertido em etileno quando o tecido da maçã foi incubado em ar, o que sugere a seguinte sequência:

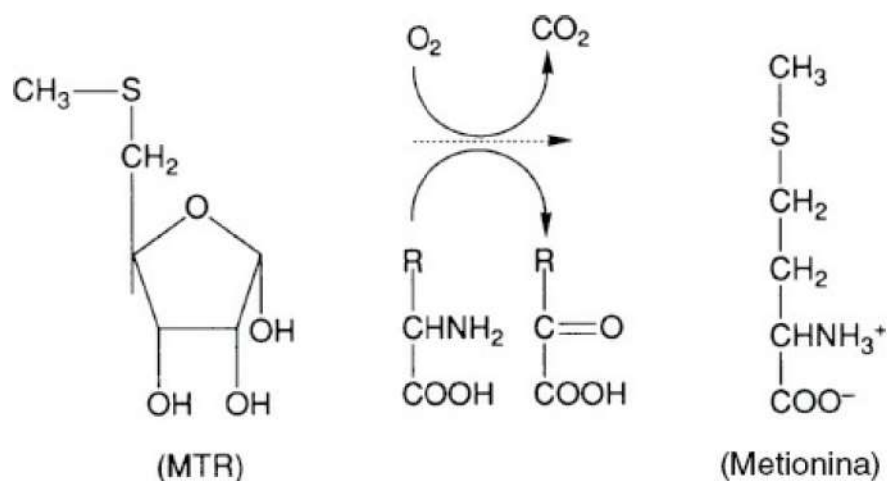
Metionina → SAM → ACC → Etileno

A conversão de metionina em SAM envolve a metionina adenosil transferase (ATP metionina S-adenosiltransferase, EC 2.5.1.6).

ESQUEMA 2.3 O ciclo Yang e a formação do etileno e outros produtos a partir do ACC. Bradford (2008).

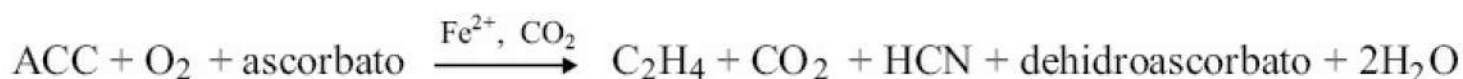
Essa enzima foi encontrada em tecidos de plantas por Konze e Kende (1979) sendo relacionada com a produção de etileno. A adição de aminoetoxilvinilglicina (AVG), um inibidor das reações enzimáticas dependentes de piridoxal fosfato (Rando, 1974), resultou em inibição da produção de etileno a partir da metionina. A parte da sequência de reação afetada foi de SAM para ACC, que envolve a participação do fosfato piridoxal (Adams e Yang, 1979). A enzima envolvida, a ACC sintase, foi encontrada em preparações com tomate e sua ativação através do fosfato piridoxal foi comprovada (Boller *et al.*, 1979; Yu *et al.*, 1979). A ACC sintase foi posteriormente identificada e analisada em maçãs (Bufler e Bangerth, 1983; Bufler, 1984), tomates (Acaster e Kende, 1983), melão cantalupo (Hoffman e Yang, 1980) e cascas de cítricos (Riov e Yang, 1982b).

Lurssen *et al.* (1979) demonstraram que a produção de etileno foi aumentada com a aplicação de ACC em órgãos de plantas. Esses pesquisadores consideraram a hipótese de que o ACC era derivado da metionina via SAM ou ACC. O sistema de enzimas envolvido na formação do etileno a partir do ACC parece estar associado a partículas celulares (Mattoo e Lieberman, 1977; Imaseki e Watanabe, 1978). Um rompimento das membranas das células por tratamento com compostos lipofílicos ou choque osmótico reduziu a produção de etileno nos tecidos vegetais (Odawara *et al.*, 1977; Imaseki e Watanabe, 1978). Este fenômeno particular de inibição foi identificado na formação de ACC para etileno (Apelbaum *et al.*, 1981). Um extrato enzimático capaz de converter ACC em etileno foi reportado em sementes de ervilhas por Konze e Kende (1979). Sistemas similares foram encontrados em sistemas microssomais de cravos (Mayak *et al.*, 1981) e em sistema microssomal de ervilhas (McRae *et al.*, 1982). A pesquisa à procura do sistema de enzimas que fosse responsável pela conversão de ACC em etileno foi totalmente descrita, afinal, por Kende (1993). Durante muito tempo considerou-se que o sistema de formação de etileno fosse associado às membranas e era descrito como dependente das enzimas formadoras de etileno (EFE). Yang e Hoffman (1984) sugeriram que o ACC poderia ser oxidado por uma enzima, a ACC hidroxilase, tornando-se *N*-hidroxi-ACC, que em seguida seria transformado em etileno e ácido cianofórmico. Esta última substância é extremamente lábil e se fragmenta de modo espontâneo em dióxido de carbono e cianeto de hidrogênio (HCN). Esta teoria foi reforçada por estudos de Peiser *et al.* (1983), que relataram a incorporação de [1-¹⁴C] ACC em [4-¹⁴C] asparagina em hipocótilos de feijão-mungo em níveis similares aos da produção de etileno. Estas descobertas, associadas aos estudos de Miller e Conn (1980), que demonstraram a incorporação de Na-CN na asparagina em feijão-mungo, sugerem a seguinte via:



A identificação do complexo EFE foi finalmente realizada com base na clonagem molecular de tomates (Slater *et al.*, 1983). O primeiro gene ACO foi descoberto através da expressão de um clone, pTOM13 (Holdsworth *et al.*, 1987). O papel dessa enzima na síntese do etileno foi em seguida confirmado pela expressão de pTOM13 em levedura e em oócitos de *Xenopus* (Hamilton *et al.*, 1990; Spanu *et al.*, 1991). Outros genes ACO foram identificados em tomates e outras frutas climatéricas como maçãs, abacates, bananas e melões (Holdsworth *et al.*,

1988; Barry *et al.*, 1996; Blume e Grierson, 1997; Nakatsuka *et al.*, 1998; Jiang e Fu, 2000; Llop-Tous *et al.*, 2000). Ververidis e John (1991) extraíram atividade de EFE de melão com gás N₂ e adição de Fe²⁺ e de ascorbato. Estas condições permitiram a recuperação da atividade do EFE e após fracionamento por centrifugação, a enzima foi recuperada na fração solúvel. Ververidis e John (1991) propuseram que EFE fosse conhecido como ACO oxidase (ACO) uma vez que parece estar relacionado com 2-oxoglutarato-dioxigenase que requer Fe²⁺ e ascorbato para atividade *in vitro*. A ACO tem sido extraída da maçã (Dong *et al.*, 1992; Fernandes-Maculet e Yang, 1992; Kuai e Dilley, 1992) e do abacate (McGarvey e Christoffersen, 1992). Dong *et al.* (1992) afirmaram que a atividade de ACO foi aumentada *in vivo* na presença por dióxido de carbono e *in vitro* é totalmente dependente da presença de dióxido de carbono. Além do mais, observaram que o ACO possui uma necessidade absoluta de Fe²⁺ e de ascorbato, mas não de 2-oxoglutarato. Com base nestas observações eles postularam a estequiometria seguinte para a conversão de ACC em etileno:



O papel do íon Fe(II) é o de unir o ACC ao O₂ simultaneamente e assim promover a transferência de elétrons, o que inicia a catálise do ACC em etileno (Pirrung, 1999; Rocklin *et al.*, 1999).

B. Regulação do etileno no amadurecimento das frutas

1. ACC sintase e ACC oxidase

O aumento climatérico nas frutas é associado com o aumento da produção de etileno no início do processo de maturação. Uma regulação pelo produto final positiva da biossíntese do etileno é um aspecto característico das frutas em maturação. A exposição ao etileno exógeno desencadeia um grande aumento na produção de etileno graças à indução de duas enzimas-chave, a ACS e a ACO (Chang e Bleeker, 2004; Génard e Gouble, 2005; Li *et al.*, 2011). As alterações dos teores intracelulares de ACC foram examinadas por Hoffman e Yang (1980) durante a maturação de abacates assim como o efeito do ACC exógeno na síntese do etileno em frutas pré-climatéricas. Os resultados, observados na Figura 2.5 mostram que o ACC estava presente em níveis muito baixos na fruta pré-climatérica (< 0,1 nmol/g), mas aumentaram muito no início da aplicação de etileno, diminuindo de 5 nmol/g em frutas demasiado maduras. O baixo nível de ACC nas frutas pré-climatéricas foi atribuído à inabilidade de conversão de SAM a ACC. A adição de ACC exógeno aos tecidos préclimatéricos aumentou a produção de etileno, porém em teor limitado (Adams e Yang, 1977; 1979). A formação de ACC a partir de SAM, portanto, parece ser o processo controlador da biossíntese do etileno (Yang, 1980). Este fato também foi confirmado por Liu *et al.* (1985), que estudaram o efeito do tratamento do etileno na produção de etileno em frutas climatéricas como o tomate e o melão cantalupo. Seus estudos demonstraram que quando expostas a etileno exógeno a atividade estimulada da enzima formadora do etileno (ACO) é estimulada e precede todos os aumentos na sintase de ACC em frutas pré-climatéricas. Uma análise dos padrões da expressão ACOmRNA em tecidos diferentes em vários estágios de desenvolvimento, confirmaram o papel de controle do ACO na produção de etileno durante a maturação (Holdsworth *et al.*, 1987; Hamilton *et al.*, 1990; Balague *et al.*, 1993; Barry *et al.*, 1996; Alexander e Grierson, 2002).

Muitos tipos de estresses diferentes como ferimentos, hipoxia, resfriamento, congelamento ou seca podem induzir à biossíntese do etileno por causa do aumento da atividade da ACC sintase (Wang *et al.*, 2002). Morin *et al.* (1985) descobriram que a estocagem refrigerada de peras “passe-crassane” é necessária para dar início à maturação por etileno e induzir à síntese do ACC livre ou conjugada. Durante a estocagem refrigerada (0°C) tanto a ACC livre como a conjugada aumentaram, junto com os ribossomos e o mRNA. Quando as peras foram

transferidas a uma atmosfera de 15°C, ocorreu um aumento significativo da concentração de etileno, seguido pela fase do climatérico (Hartmann *et al.*, 1987).

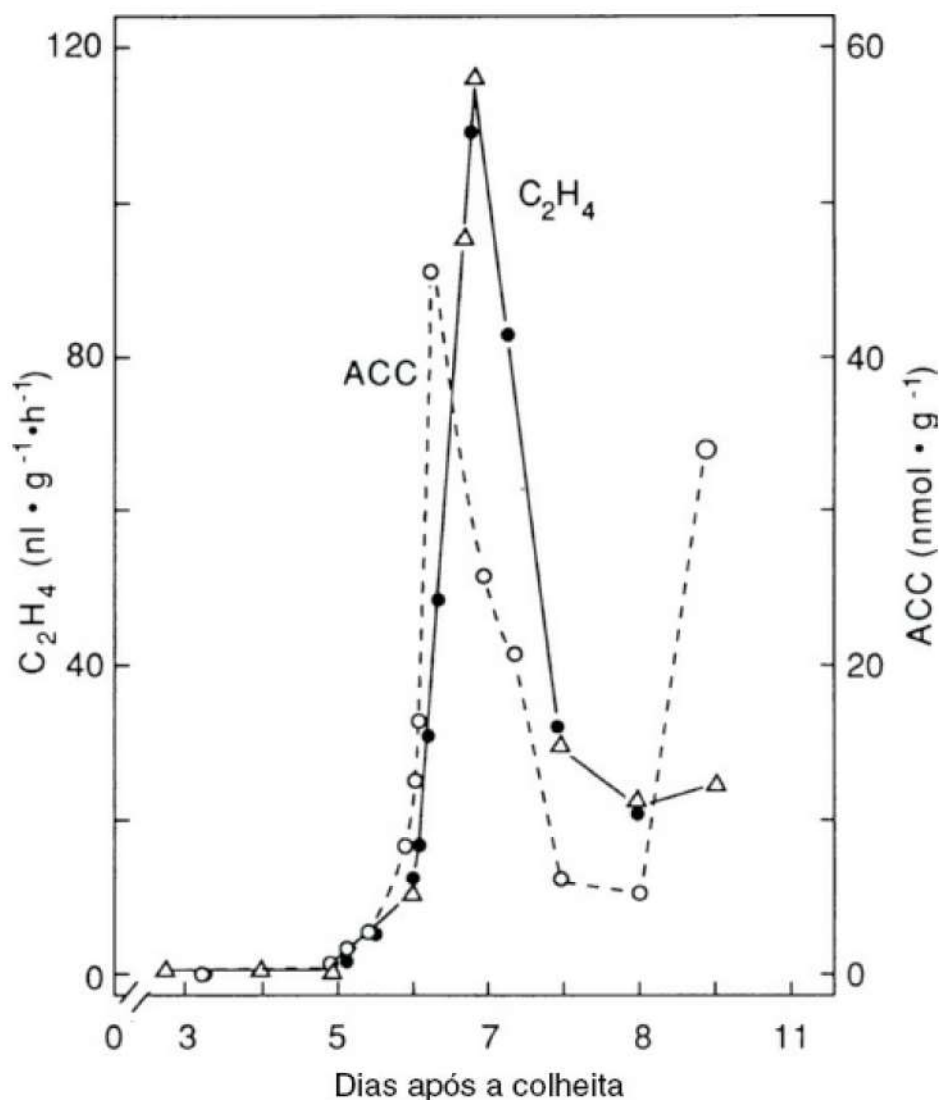


FIGURA 2.5 Alterações no conteúdo de ACC no abacate em vários estados de maturação. Cada valor de ACC vem de uma única fruta cuja produção de etileno foi monitorada e à qual foi atribuído um estágio aleatório de maturação em comparação com os padrões climatéricos estabelecidos de produção de etileno. Hoffman e Yang (1980).

2. Cianeto

A produção de cianeto na biossíntese do etileno a partir de ACC foi demonstrada nos estudos de Peiser *et al.* (1984) e Pirrung (1985). Pirrung e Brauman (1987) sugeriram que o cianeto pode regular a formação de etileno durante o período climatérico. Propuseram que na biossíntese do etileno as vias do citocromo e da cadeia respiratória cianeto-resistentes se conectam via citocromo *c* oxidase. A inibição da citocromo *c* oxidase pelo cianeto durante a biossíntese do etileno favorece a via alternativa, o que, por sua vez, conduz à síntese do ACC. A expressão gênica da ACC sintase como consequência da via respiratória alternativa pode explicar as diferenças entre frutas climatéricas e não climatéricas. Há, no entanto, evidências de que os tecidos vegetais possuem ampla capacidade de detoxificar o HCN que é produzido durante a biossíntese do etileno e que a concentração de HCN é mantida em teor muito baixo nas células (Yip e Yang, 1988). A enzima-chave para a desintoxicação de HCN é a β -cianoalanina sintase (EC 4.4.1.9). A β -cianoalanina é metabolizada em seguida transformando-se em asparagina ou γ -glutamil- β -cianoalanina.

3. Ácidos orgânicos

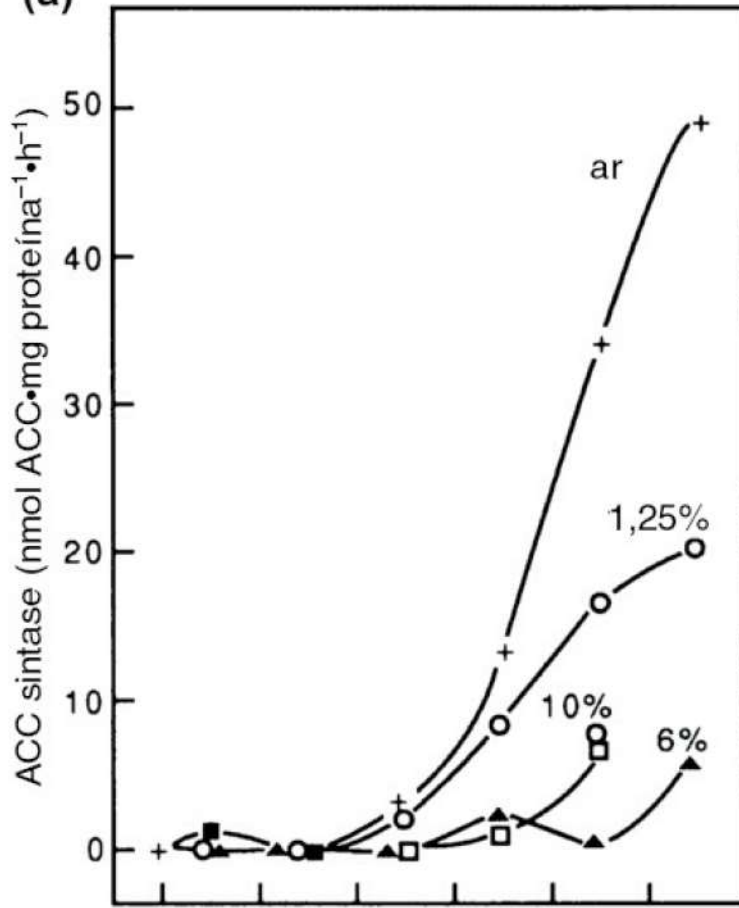
De Pooter *et al.* (1982) observaram um aumento na produção de dióxido de carbono e maturação precoce em maçãs intactas “Golden Delicious” tratadas com ácidos propiônico e butírico. Esta alteração foi idêntica à ocorrida com maçãs tratadas com etileno, o que sugere que estes ácidos possuem uma função na produção de etileno. Parece viável que o etileno possa ser produzido por estes ácidos carboxílicos de acordo com o sistema 1, que posteriormente desencadeia a produção de etileno normal através do sistema 2. Trabalho posterior destes pesquisadores (De Pooter *et al.*, 1984) confirmaram a maturação prematura de maçãs “Golden Delicious” intactas quando tratadas com vapores de ácidos acéticos ou propiônicos. Uma pequena porção do ácido propiônico [$2\text{-}^{14}\text{C}$] marcado foi transformada em [^{14}C]etileno, que atuou como desencadeador da maturação (sistema 2). O grau de maturidade da fruta era considerado um fator importante, o que sugeria que nas maçãs não maturadas a pequena quantidade de etileno produzida era provavelmente derivada dos ácidos orgânicos simples. A concentração na qual o etileno desencadeia a maturação depende da disponibilidade de ácidos orgânicos simples. A capacidade do dióxido de carbono de retardar o início da maturação das frutas foi demonstrada por Bufler (1984) ser decorrente, em parte, da inibição do desenvolvimento da ACC sintase (Figura 2.6).

4. Peroxidação lipídica: lipoxigenase

A produção de etileno tem sido correlacionada com as mudanças nos teores de hidroperóxido, da atividade de peroxidase, assim como dos aumentos na atividade da lipoxigenase na maturação das frutas (Meigh *et al.*, 1967; Frenkel e Eskin, 1977; Frenkel, 1979; Marcelle, 1991; Sheng *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2008). Estudos de Adams e Yang (1979) e de Konze *et al.* (1980) sugerem a peroxidação como um mecanismo para a formação de etileno a partir de ACC; contudo, o envolvimento da peroxidação não foi confirmado por pesquisadores posteriores (Machackova e Zmrhal, 1981; Rohwer e Mader, 1981). A conversão enzimática de ACC em etileno em um sistema de células livres mostrou ser sensível à catalase e pode ser inibida pelo peróxido de hidrogênio (Konze e Kende, 1979; McRae *et al.*, 1982). O efeito dos hidroperóxidos na conversão enzimática de ACC em etileno foi pesquisado por Legge e Thompson (1983) utilizando um sistema modelo composto de membranas microssomais de ervilhas descoloridas por falta de luz. A adição de hidroperóxidos estimulou a produção de etileno em sistemas modelo contendo ACC, como pode ser visto na Figura 2.7. O peróxido de hidrogênio, um inibidor conhecido da lipoxigenase, inibiu a formação de etileno. A lipoxigenase forma hidroperóxidos lipídicos a partir de ácido linoleico (Eskin *et al.*, 1977). Um aumento de 1,5 vez na produção de etileno ocorreu depois da adição de ácido linoleico aos sistemas modelo que continham a enzima. Parece ocorrer uma interação entre a atividade de lipoxigenase, o derivado do hidroperóxido e as enzimas formadoras do etileno (ACO). McRae *et al.* (1982) demonstraram com base em dados fornecidos pela técnica de captura de elétrons (*spin-trapping*) que o oxigênio está envolvido na formação do etileno a partir de ACC pelas membranas microssomais de ervilhas. Uma vez que os hidroperóxidos facilitam a ativação do oxigênio, a promoção de oxigênio por meio desse mecanismo pode conduzir à formação de etileno. Legge *et al.* (1982) detectaram a formação de radicais-livres utilizando a técnica de captura de elétrons 4-MePyBN que requer ACC, oxigênio e hidroperóxidos. Os resultados sugerem que os radicais-livres derivam do ACC do sistema microssomal que produz etileno. A conversão de ACC em etileno por membranas microssomais de ervilhas é mediada por um radical livre intermediário que requer hidroperóxidos e oxigênio. O aumento na formação de radicais livres foi atribuído por Kacperska e Kubacka-Zabalska (1984) à oxidação mediada pela lipoxigenase dos ácidos graxos poli-insaturados. Este fato foi confirmado por estudos feitos por Kacperska e Kubacka-Zabalska (1985) *in vitro* e *in vivo*. Constatou-se um aumento no etileno derivado de ACC em discos de folhas que caíram do caule no inverno resultantes da atividade de lipoxigenase. Observações similares foram relatadas por Bousquet e Thimann (1984) utilizando pedaços de folhas de aveia. Estudos mais recentes que estabelecem relações entre a atividade de lipoxigenase (LOX) e a biossíntese do etileno foram observadas em kiwi

(Xu *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006), tomate (Sheng *et al.*, 2000) e em cultivares de peras orientais (Xu *et al.*, 2008). No entanto, a atividade LOX pode estar presente na biossíntese do etileno assim como em vários aspectos da maturação das frutas que afetam o desenvolvimento do gosto e do aroma e resposta a temperaturas baixas.

(a)



(b)

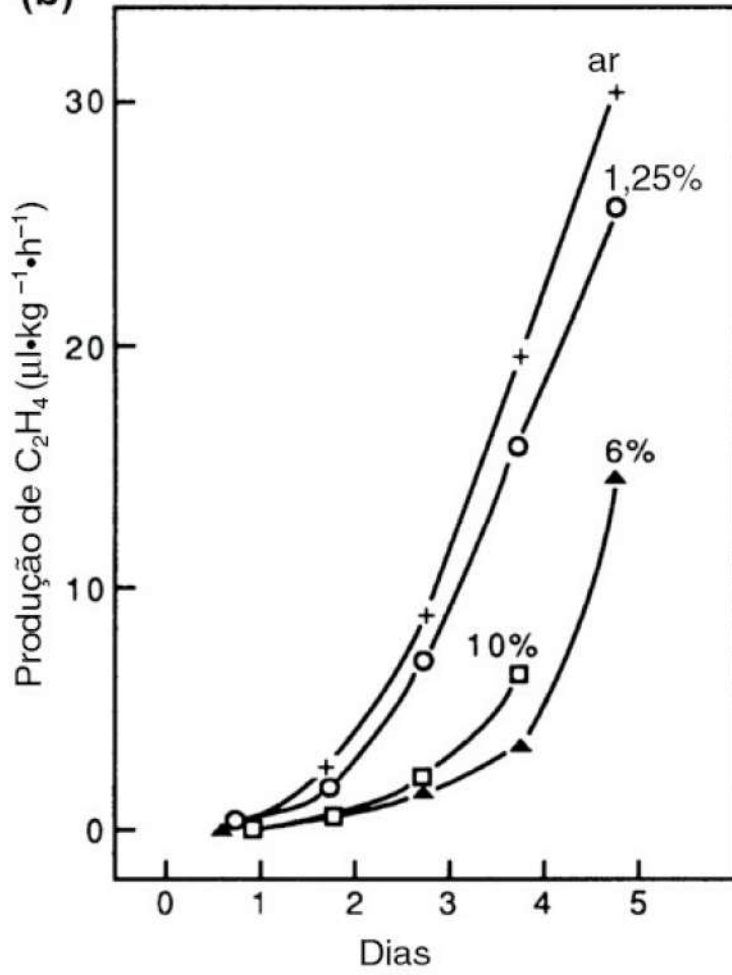


FIGURA 2.6 Efeito de diferentes concentrações de CO₂ na indução e no desenvolvimento da atividade de ACC sintase (a) e produção de etileno (b) em maçãs pré-climatéricas tratadas (Bufler, 1984). As maçãs foram transferidas da estocagem hiperbárica para a pressão normal e 25 °C e imediatamente tratadas com ar (+), 1.25% (o), 6% (

) ou 10% (□) CO₂ (Bufler, 1984). Reimpressão autorizada pelo proprietário dos direitos autorais, American Society of Plant Physiology (ASPP).

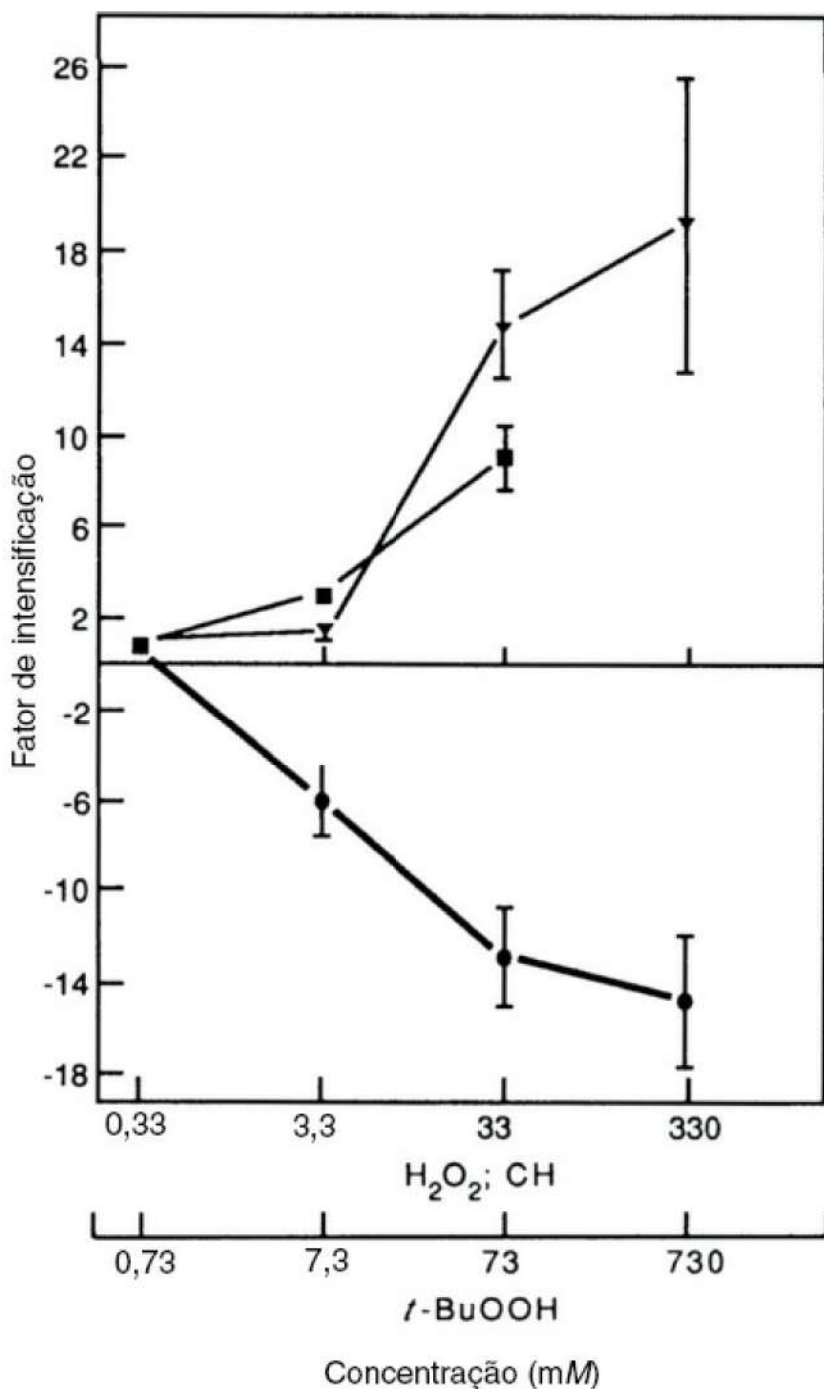


FIGURA 2.7 Efeitos do peróxido de hidrogênio (•), *t*-butil-hidroperóxido (

) e cumeno hidroperóxido (▪) na conversão de ACC para etileno por membranas microsomais de ervilhas. As concentrações finais de hidroperóxido adicionadas à mistura da reação básica estão indicadas ao longo da abscissa. O fator de aumento é a proporção do etileno produzido na presença do hidroperóxido adicionado em relação ao que foi produzido na ausência deste. Valores representam a média ± SE (*n* = 3) (Legge e Thompson, 1983). Reimpressão autorizada. Copyright ©: Pergamon Press.

Pesquisas de Gross (1985) e, mais tarde, de Kim *et al.* (1987) mostraram que a produção de etileno é estimulada pela galactose durante a maturação do tomate. A galactose é um produto da síntese de galactanas da parede celular e da alta atividade da β -galactosidase que libera resíduos galactosil da parede da célula (Lackey *et al.*, 1980; Pressey, 1983). O estímulo da atividade de ACC sintase por galactose exógena ao tecido do pericarpo de tomates verdes sugere que existe uma relação entre a modificação contínua da parede celular e a biossíntese do etileno em frutas do tomate em maturação (Kim *et al.*, 1987, 1991). Outras análises confirmaram que os fragmentos de parede de célula estimulam ou induzem a produção de etileno (Tong *et al.*, 1986; Brecht e Huber, 1988). Estudos posteriores indicaram que há relações entre oligogalacturonídeos de cadeia curta e a indução e expressão de um gene codificador de ACO em plantas de tomate e o modo de regulação dos fatores de transcrição (Simpson *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2011). De modo similar, as relações entre a expressão do gene PG e o amolecimento além da produção de etileno também foram relatadas na fruta de kiwi (Wang *et al.*, 2000).

V. ALTERAÇÕES DA COR

Uma das primeiras alterações observadas durante a maturação de muitas frutas é a perda da cor verde. Essa perda é seguida pelo desenvolvimento de cores avermelhadas em algumas frutas e vegetais em consequência da formação das antocianinas. As mudanças nas cores de algumas frutas podem ser consultadas na Tabela 2.3. Estas mudanças ocorrem imediatamente depois do aumento climatérico da respiração e são acompanhadas por alterações na textura da fruta. No caso de vegetais folhosos como o repolho, alface, couve de Bruxelas, a perda de clorofila também é responsável pelo amarelamento durante a senescência (Lipton, 1987; Lipton e Ryder, 1989).

TABELA 2.3 Alterações na cor de algumas frutas durante a maturação

Fruta	Estágio de maturação	
	Imatura	Madura
Maçã	Verde	Amarela/vermelha*
Banana	Verde	Amarela
Pera	Verde	Amarela
Morango	Verde	Vermelha

*Dependendo da variedade

A. Alterações na clorofila durante a maturação

Tem sido atribuída ao etileno a promoção da degradação da clorofila durante a maturação da fruta (Burg e Burg, 1965). Hardy *et al.* (1971) observaram estímulo da biossíntese da clorofila por etileno e luz em cotilédones extraídos de sementes de pepinos (*Cucumis sativus*). Pesquisa posterior realizada por Alscher e Castelfranco (1972) demonstrou que o estímulo para a síntese da clorofila ocorre somente no escuro uma vez que a exposição à luz inibiu a síntese da clorofila. Poucas referências são encontradas a respeito do estímulo da síntese da clorofila por etileno, apesar de o pepino ter fornecido um excelente sistema para o estudo da produção da clorofila durante a década de 1980 (Pardo *et al.*, 1980; Chereskin *et al.*, 1982; Fuesler *et al.*, 1982; Hanamoto e Castelfranco, 1983). Em contraste ao estímulo da biossíntese da clorofila pelo etileno que ocorre no escuro, a biossíntese de antocianina em repolho roxo só é estimulada pelo etileno quando exposta à luz.

B. Biossíntese da clorofila

As clorofilas, os principais tetrapirróis encontrados em vegetais, são essenciais para a vida humana e animal pelo

seu papel na fotossíntese. A biossíntese da clorofila é um processo altamente coordenado e envolve um grande número de enzimas (Beale, 1999). A aplicação de técnicas genéticas moleculares possibilitou a identificação e caracterização dos genes codificadores destas enzimas (Beale, 2005) (Tabela 2.4). A biossíntese da clorofila parece ocorrer em três fases distintas (Tanaka e Tanaka, 2006). A primeira fase é a biossíntese da clorofila *a* a partir do glutamato (Vavilin e Vermaas, 2002; Willows, 2003; Eckhardt e Grimm, 2004; Grossman *et al.*, 2004). A segunda fase, também conhecida como ciclo da clorofila, envolve a interconversão da clorofila *a* para a clorofila *b* (Ruediger, 2002). A terceira fase final do metabolismo da clorofila diz respeito à degradação da clorofila *a* (Pinta *et al.*, 2000; Eckhardt e Grimm, 2004).

1. Fase 1: Do glutamato à clorofila

Shemin e Russell (1953) demonstraram pela primeira vez o papel do ácido δ -aminolevulínico (ALA) na biossíntese do núcleo tetrapirrólico da clorofila. A biossíntese da ALA envolve duas vias independentes (von Wettstein *et al.*, 1995). Uma das vias, utilizada por animais (para o grupo heme), leveduras e várias bactérias, envolve a condensação do succinil-CoA e da glicina pela enzima ácido 5-aminolevulínica sintase (EC 2.3.1.37) que contém piridoxal-P (Gibson *et al.*, 1958; Kikuchi *et al.*, 1958). A segunda via característica em vegetais superiores e em algas, conhecida como via dos C_5 , é uma via de três passos na qual o glutamato é convertido em seguida em 5-aminolevulinato. Utilizando o glutamato marcado ^{14}C demonstrou-se que o esqueleto de cinco carbonos foi incorporado diretamente ao 5-aminolevulinato (Beale *et al.*, 1975; Meller *et al.*, 1975; Porra, 1986). A conversão para ALA requer a ativação do glutamato no α -carbonil através de ligação a tRNA^{Glu} (Kannangara *et al.*, 1984). A formação de ALA, o primeiro passo na biossíntese da clorofila, foi interpretada como sendo o regulador da quantidade total de tetrapirróis formados (Beale, 1999). Pesquisas subsequentes sugeriram que a síntese do ALA é regulada pelo produto final heme e inibida, no escuro, pela FU, uma proteína reguladora (Meskauskiene *et al.*, 2001; Goslings *et al.*, 2004). As reações iniciais responsáveis pela síntese do ALA em vegetais superiores podem ser observadas no Esquema 2.4.

TABELA 2.4 Genes codificadores das enzimas no processo de biossíntese da clorofila em angiospermas (Beale, 2005)

Fase ^a	Nome da enzima	Nome do gene ^b
1	Glutamil-tRNA redutase	HEMA1
		HEMA2
		HEMA3
2	Glutamato 1-semialdeído aminotransferase (glutamato 1 semialdeído aminomutase)	GSA1 (HEM1)
		GSA2 (HEM2)
3	Porfobilinogênio sintase (5-aminolevulinato desidratase)	HEMB1
		HEMB2
4	Hidroximetilbilano sintase (porfobilinogênio desaminase)	HEMC
5	Uroporfirinogênio III sintase (Uroporfirinogênio III co-sintase)	HEMD
6	(Uroporfirinogênio descarboxilase)	HEME1
		HEME2
7	Descarboxilase oxidativa do coproporfirinogênio	HEMF1
		HEMF2
8	Protoporfirinogênio oxidase	HEMG1
		HEMG2
9	Subunidade D de Mg quelatase	CHLD
	Subunidade H de Mg quelatase	CHLH
	Subunidade I de Mg quelatase	CHLI1
10	Mg-protoporfirinogênio IX metiltransferase	CHLI2
		CHLM

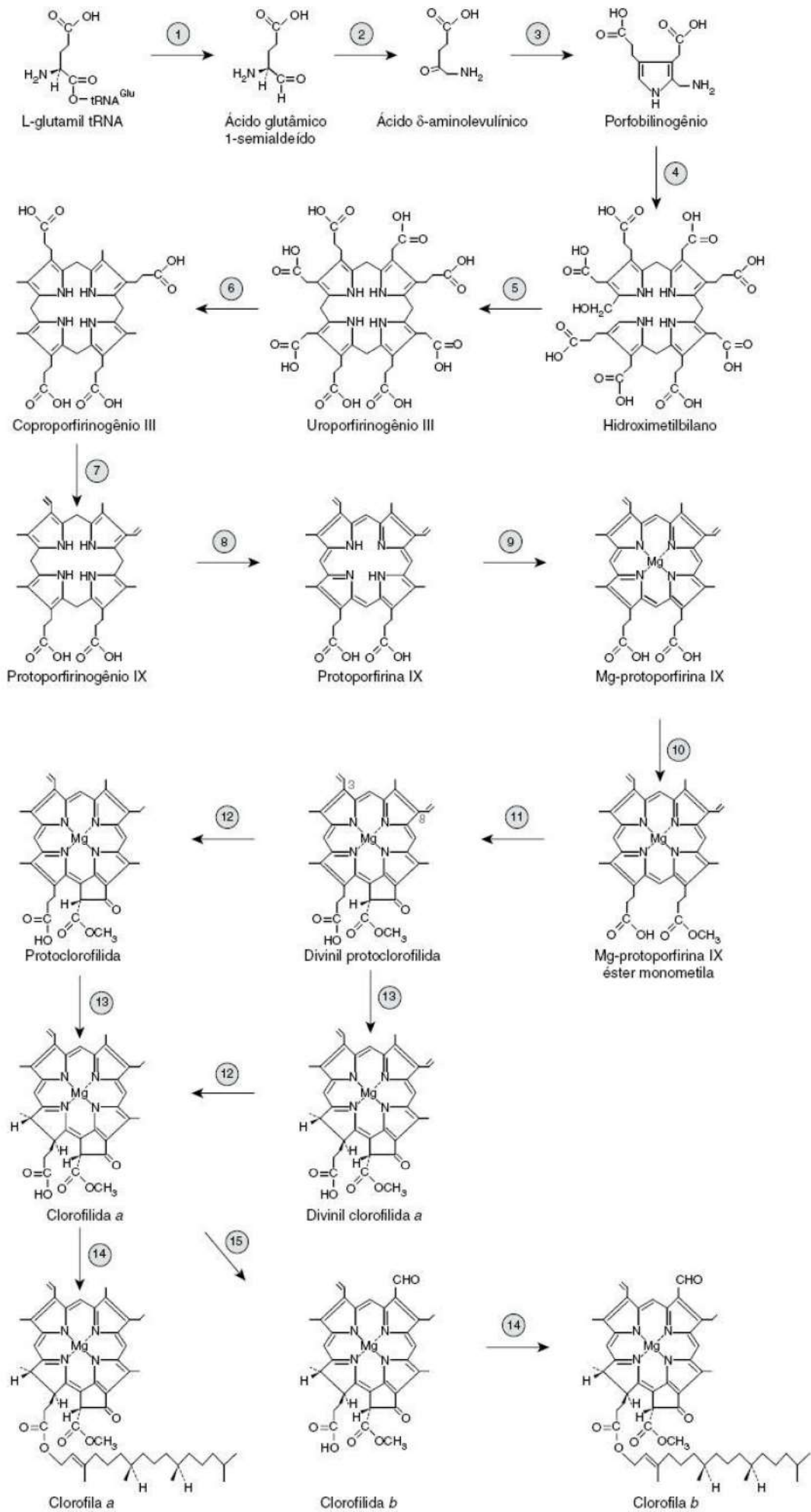
11	Mg-protoporfirinogênio IX monometilester ciclase	<i>CRD1 (ACSF)</i>
12	Divinil redutase	<i>DVR</i> <i>PORA</i>
13	NADPH: protoclorofilida oxidoreductase	<i>PORB</i> <i>PORC</i>
14	Clorofila sintase	<i>CHLG</i>
15	Clorofilida α oxigenase	<i>CAO (CHL)</i>

^a Os números das fases correspondem aos do Esquema 2.4.

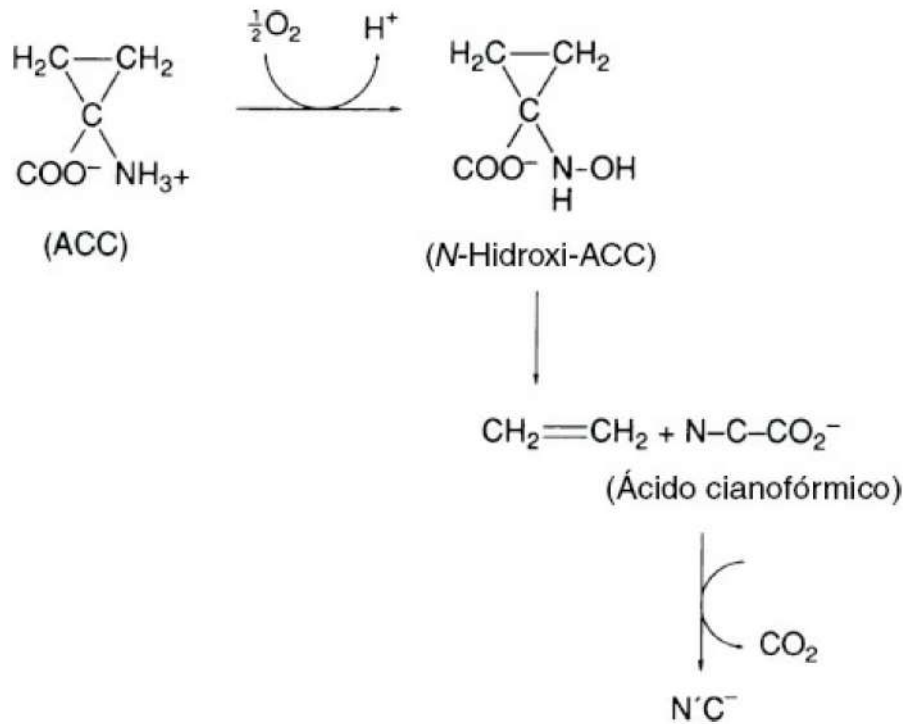
^b Os nomes dos genes são aqueles para *Arabidopsis thaliana*. Nomes alternativos para as enzimas e os genes estão indicados entre parênteses. Múltiplos genes para uma dada enzima estão indicados por sufixos numéricos, menos para genes POR (fase 13), para os quais foram usados sufixos de letras.

A ativação do glutamato para glutamil tRNA pela glutamil-tRNA sintase (EC 6.1.1.17) envolve a ligação do tRNA^{Glu}, um processo normalmente associado com a síntese de plastídios. O grupo carboxil ativado do glutamil tRNA é então reduzido a um grupo formil pela glutamil-tRNA redutase (GluTR), resultando na formação do glutamato-1-semialdeído (GSA). Esse processo é seguido pelas reações de troca intermoleculares de grupos amino nas quais o GSA é convertido em ALA (Tanaka e Tanaka, 2007). O glutamato 1-semialdeído aminotransferase (EC 5.4.3.8) catalisa a reação com o piridoxal-P ou piridoxamina-P como cofator. O mecanismo parece envolver a catálise de duas reações de transformação sucessivas (Mau e Wang, 1988; Mayer *et al.*, 1993). Um intermediário diamínico, o ácido 4,5-diaminovalérico, é transformado primeiro em um grupo amino a partir da piridoxamina-P para GSA, formando o piridoxal-P.

Na segunda reação, o grupo amino é transferido de volta para o piridoxal-P, regenerando a piridoxamina-P e formando a ALA. Isto é comprovado por estudos cinéticos baseados em medidas espectrofotométricas (Smith *et al.*, 1998). Depois de a ALA ser formada, duas moléculas condensam-se para formar porfobilinogênio (PBG), catalisado pela desidratase ALA [5-aminolevulinato hidrolase (ALAD), EC 4.2.1.24] (Dresel e Falk, 1953; Schmid e Shemin, 1955). É durante essa etapa que o composto alifático é convertido em aromático.

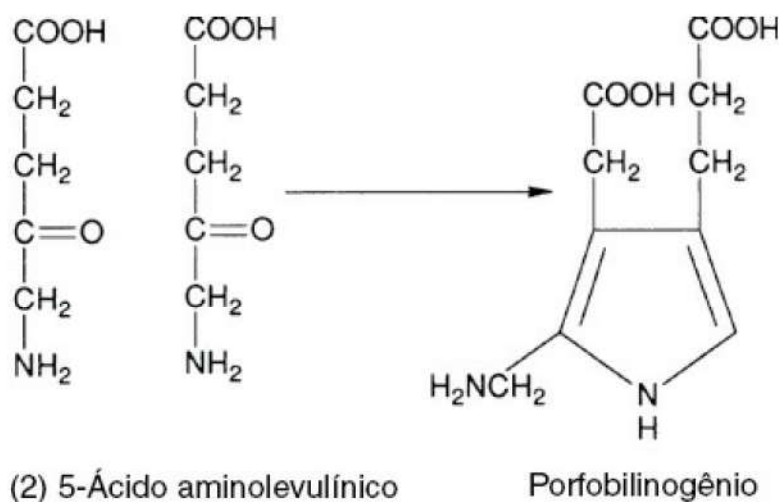


ESQUEMA 2.4 Biossíntese da clorofila em vegetais superiores. As setas numeradas referem-se às enzimas listadas na Tabela 2.4. As reações 12 e 13 podem ocorrer em qualquer uma das ordens, dependendo da viabilidade dos substratos. A reação 14 pode utilizar qualquer dos substratos indicados. Os números de posição dos dois grupos vinil estão indicados por 3.8-divinil protoclorofilida. Beale (2005).



O ALAD foi estudado exaustivamente em tecidos animais e em bactérias fotossintéticas além de algumas plantas que incluem, por exemplo, o trigo (Nandi e Waygood, 1967), cultura de tecidos de soja (Tigier *et al.*, 1968, 1970), feijão (Prasad e Prasad, 1987) e espinafre (Liedgens *et al.*, 1983). Resíduos do ALAD são encontrados nos cloroplastos, onde aparecem na forma solúvel no estroma do plastídio ou unidos fracamente nas lamelas.

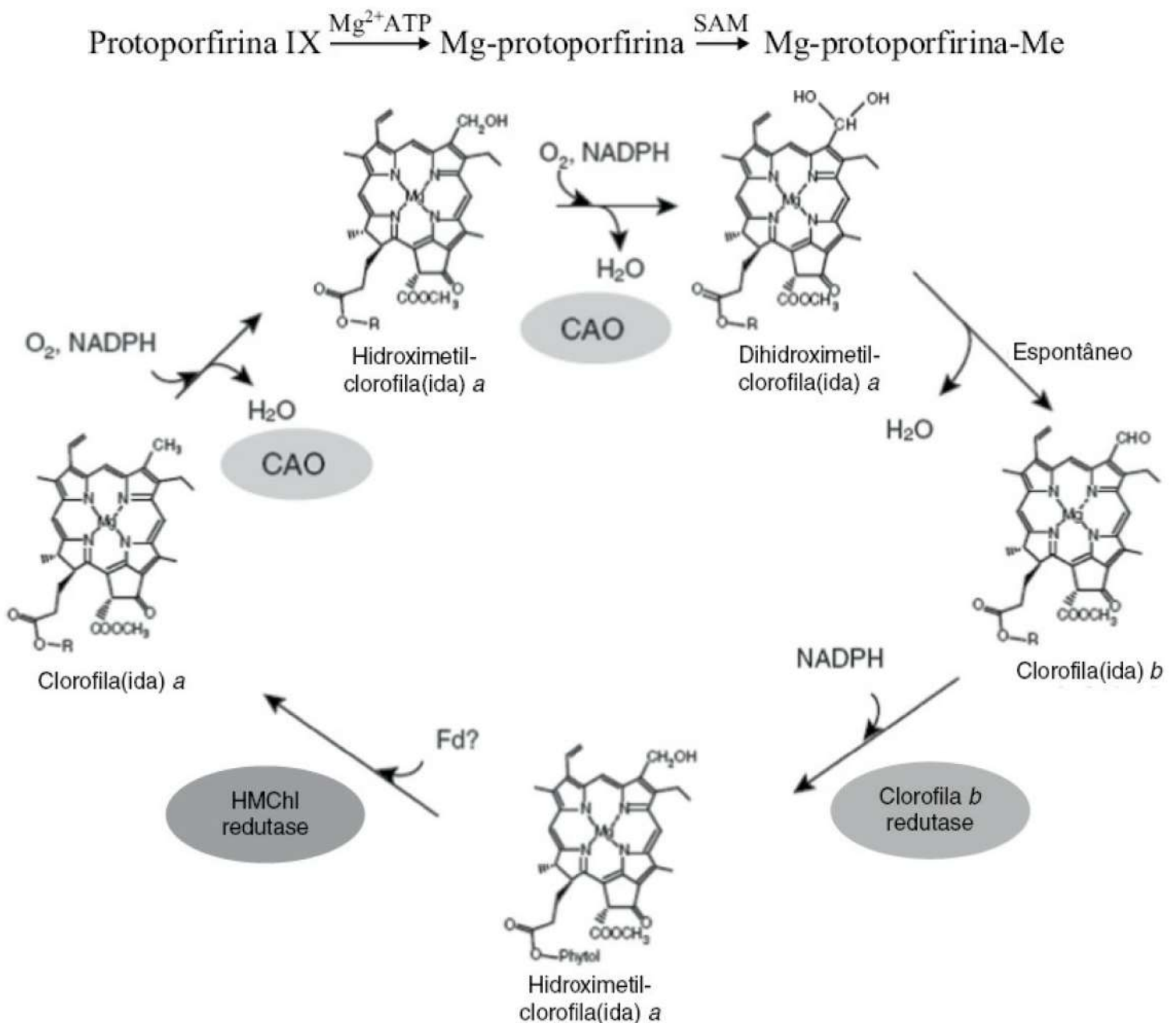
O primeiro tetrapirrólico intermediário, um precursor linear da hidroximetilbilano porfirina foi identificado por Battersby *et al.* (1979) e Jordan e Seehra (1979). Isto resulta da condensação da cabeça e cauda de quatro moléculas de PBG catalisadas por PBG desaminase. Esta molécula linear é ciclizada enzimaticamente pela uroporfirinogênio III sintase para formar o primeiro ciclo de tetrapirrol, o uroporfirinogênio III.



Os passos que conduzem à formação da protoporfirina IX, mostrados no Esquema 2.5, serão discutidos brevemente uma vez que uma exposição detalhada pode ser encontrada em artigos excelentes (Avisar e Moberg, 1995; Jaffe, 2003; 2004; Shoolingin-Jordan, 2003; Beale, 2005). O uroporfirinogênio III é convertido em coproporfirinogênio III por uroporfirinogênio III descarboxilase, que descarboxila os grupos de ácidos acéticos nos anéis de pirrol A, B, C e D (Jackson *et al.*, 1976). Este passo é seguido por descarboxilação oxidativa dos

grupos de ácidos propiônicos em grupos de pirrol A e B e pela oxidase III oxigênio-dependente coproporfinogênio (CPOX) formando protoporfirinogênio IX (Games *et al.*, 1976). O passo final é a formação de protoporfirina, quando seis elétrons são removidos do proporfirinogênio IX, pela enzima que contém FAD, a oxidase protoporfirinogênica IX (Poulson e Polglase, 1975).

A quelação da protoporfirina IX é mediada pela Mg quelatase e requer uma alta concentração de ATP (Pardo *et al.*, 1980). Essa enzima é composta por três subunidades Ch1H, Ch1I e Ch1D, que possuem massas moleculares de cerca de 140 kDa, 40 kDa e 7 kDa, respectivamente. O sítio catalítico situa-se em Ch1H, que é ativado por Ch1I e Ch1D que se unem (Davison *et al.*, 2005). A enzima Mg-protoporfirina IX metiltransferase (MgMT), transfere, em seguida, um grupo metil do S-adenosil-1-metionina ao grupo carboxil sobre 13-propionato para formar o éster Mg-protoporfirina-N-monometil (Fuesler *et al.*, 1982). Fuesler e colaboradores (1982) demonstraram a sequência de reações na qual a quelação do metal precede a metilação. Com um procedimento por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) separaram a Mg-protoporfirina e a Mg-protoporfirina-Me éster, Fuesler *et al.* (1982) demonstrando esta sequência de reações:



ESQUEMA 2.5 Exposição do caminho biossintético do ciclo da clorofila. A reação avançada pode ocorrer com clorofila ou clorofilida. A conversão da clorofila em clorofilida e a reação reversa são catalisadas pela clorofilase e clorofila sintase, respectivamente, nenhuma das quais representada no diagrama. R = próton ou fitol; Fd = ferredoxina. Tanaka *et al.* (2011).

A Mg-protoporfirina-Me éster é convertida, em seguida, pela Mg-protoporfirina IX monometil ciclase (MgCy) a 3,8-divinil protoclorofilida incorporando um átomo de oxigênio. A protoclorofilida oxidoredutase (POR) reduz, em seguida, o anel D de 3,8-divinil protoclorofilida a 3,8-divinil clorofilida. O substituinte 8-vinil na cadeia lateral do anel B de pirrólico é então reduzido pela divinil clorofilida redutase (DVR) a 3-vinil clorofilida *a* (monovinil clorofilida *a*). DVR também pode reduzir 3,8-divinil protoclorofilida, mas a eficiência desse substrato foi descrita por Tanaka e Tanaka (2007) como substancialmente mais baixa do que a 3,8-divinil clorofilida. Com base neste dado, eles revisaram os passos da reação convencional ao colocar a reação DVR após a reação com POR. O último passo foi a biossíntese da clorofila *a* a partir de 3-vinil clorofilida. A clorofila sintase esterifica o substituinte 17-propionato no anel D de monovinil clorofilida *a* com geranyl geraniol, que é reduzido para fitol.

2. Fase 2: Ciclo da clorofila

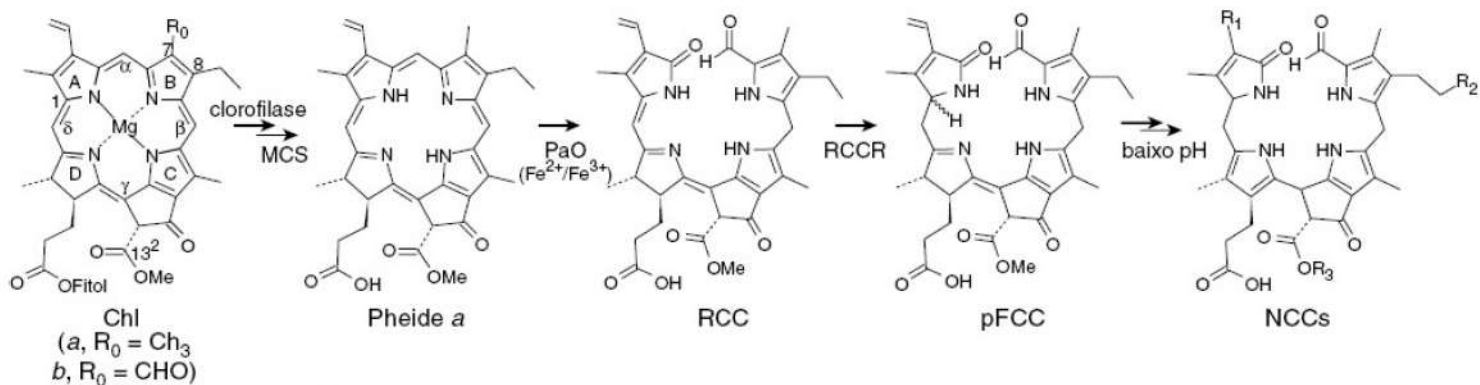
Nesta fase, uma porção da reserva de clorofila *a* é convertida em clorofila *b* (Esquema 2.5). Este é um processo de duas etapas catalisadas por um único polipeptídeo. A enzima envolvida nesta etapa, do tipo Rieske monoxigenase, clorofilida oxigenase *a* (CAO) foi caracterizada pela primeira vez por Tanaka e seus colaboradores (Tanaka *et al.*, 1998; Espineda *et al.*, 1999). Clonagem e expressão funcional do gene CAO demonstraram subsequentemente que o CAO catalisou duas etapas de oxigenação nos quais a clorofilida *a* foi convertida em clorofilida *b* (Oster *et al.*, 2000). A primeira etapa da oxigenação por CAO produziu o intermediário 7-hidroximetilclorofida *a*, que foi em seguida oxigenado para clorofilida *b*. Esta última substância é em seguida fitilada por clorofila sintase para clorofila *b*. Uma revisão recente de Tanaka e Tanaka (2011) inclui um texto sobre como as plantas usam o ciclo da clorofila para regular a síntese e destruição de um subconjunto de complexos coletores de luz.

C. Regulação da biossíntese da clorofila

Entre as três fases envolvidas na síntese de ALA, a redução de glutamyl-tRNA parece ser aquela que limita a biossíntese de clorofila (Tanaka e Tanaka, 2007). Recentes evidências sugerem que a atividade de glutamyl tRNA reductase (GluTR) é regulada por um mecanismo de inibição pelo produto final (Meskauskiene *et al.*, 2001). Um segundo regulador negativo da biossíntese de tetrapirrol foi descoberto mais tarde, a proteína FLU, que parece controlar a biossíntese da clorofila interagindo diretamente com o GluTR (Goslings *et al.*, 2004). Outros reguladores possíveis incluem a conversão do CAO da clorofila *a* em clorofila *b* (Tanaka *et al.*, 2001; Tanaka e Tanaka, 2005; Pattanayak *et al.*, 2005). Para uma discussão mais detalhada sobre estes reguladores recomendamos o trabalho de Tanaka e Tanaka (2007).

D. Degradação da clorofila: processamento e estocagem

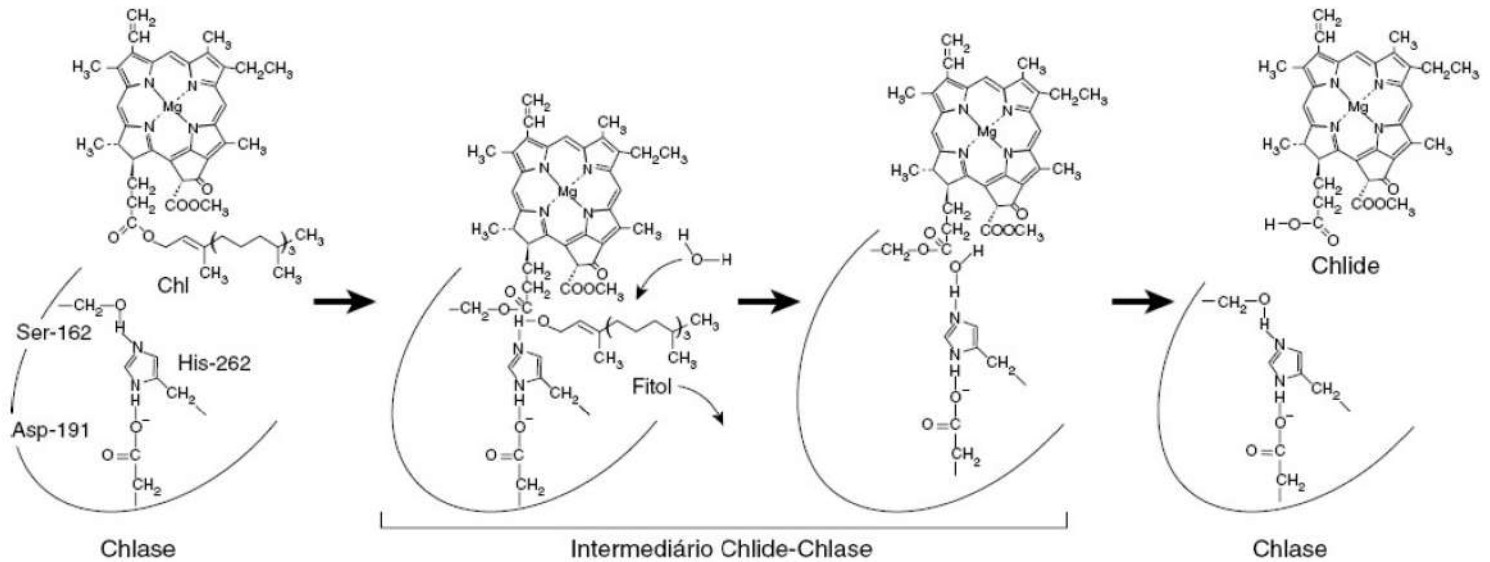
A terceira e última fase do metabolismo da clorofila envolve a degradação da clorofila (Takamiya *et al.*, 2000; Eckhardt e Grimm, 2004). Essa fase é fundamental na senescência e maturação das frutas, com o mecanismo de reação tendo sido bem esclarecido desde a última edição deste livro (Matile *et al.*, 1999; Hortensteiner, 1999; Krautler, 2003; Eckhardt *et al.*, 2004). O mecanismo da degradação da clorofila envolve a sua conversão em catabólitos não fluorescentes e incolores (NCCs) como pode ser visto no Esquema 2.6.



ESQUEMA 2.6 O mecanismo da degradação da clorofila em plantas superiores. As constituições da clorofila e dos catabólitos da clorofila estão apresentadas. Anéis de pirrol (A–D), pontes de metino (α – δ) e átomos relevantes estão rotulados. Locais de modificações periféricas como a presentes em diferentes NCCs são indicadas (R₁–R₃). Chl = clorofila; Pheide a = Feoforbídeo a (*pheophorbide a*); RCC = catabólito de clorofila vermelha (*red chlorophyll catabolite*); pFCC = catabólito de clorofila fluorescente primária (*primary fluorescent chlorophyll catabolite*); NCC = catabólito de clorofila não fluorescente (*non-fluorescent chlorophyll catabolite*). Pruzinska *et al.* (2005).

A hidrólise da clorofila *a* em plantas envolve quatro etapas consecutivas catalisadas pela clorofilase, a Mg-dequelatase, a feoforbídeo oxigenase *a* e a redutase de catabólitos de clorofila vermelha, respectivamente (Harpaz-Saad *et al.*, 2007). A primeira etapa é a da remoção do fitol pela enzima da clorofilase (clorofil clorofilidehidrolase, EC 3.1.1.14), uma glicoproteína intrínseca localizada no invólucro das membranas tilacoides (Bacon e Holden, 1970; Schoch e Vielwerth, 1983). Essa enzima foi descoberta há um século por Willstater e Stoll (1913). A partir de então muitos estudos têm tentado elucidar o mecanismo da reação. A inibição da *Euglena gracilis* clorofilase pelo ácido *p*-cloromercuribenzoico (PCMB) sugere o possível envolvimento de cisteína. O PCMB, no entanto, provou ser ineficiente contra a clorofilase *Phaeodactylum tricornum* (Terpstra, 1977). Posteriormente Khalyfa *et al.* (1995) descobriram que o diisopropil fluorofosfato, um inibidor de serinas hidrolases inibiu a clorofilase do *Paseodactylim*. Esses resultados de inibição sugerem que resíduos de aminoácidos envolvidos na reação da clorofilase variam com a fonte da enzima. Clonando o gene da clorofilase do vegetal superior *Chenopodium album*, Tsuchiya *et al.* (2003) descobriram que ela tem um fragmento de lipase com um resíduo de serina ativo. A identificação de serina, histidina e ácido aspártico no sítio ativo da clorofilase indicou que ela é similar à serina hidrolase. Com base nesses resultados foi sugerido o seguinte mecanismo da clorofilase (Esquema 2.7). Azoulay-Shemer *et al.* (2011) descobriram que o processamento N e C terminal estava envolvido na maturação da clorofilase de citrus.

A enzima envolvida na remoção do Mg do clorofilídeo *a* com a formação de feoforbídeo *a* têm sido denominada Mg-dequelatase (Owens e Falkowski, 1988; Ziegler *et al.*, 1988; Shimokawa *et al.*, 1990; Shioi *et al.*, 1991). Ao utilizar clorofilina, a Mg-dequelatase foi analisada em cotilédones de colza por Vicentini *et al.* (1995). A enzima parece estar na forma latente em tilacoides, mas também está presente em grandes concentrações em cloroplastos pré-senescentes. Apesar de várias pesquisas terem sido feitas na dequelação de Mg, nenhuma delas conseguiu identificar a Mg-dequelatase (Shioi *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2002; Suzuki e Shioi, 2002). Ao utilizar o clorofilídeo *a*, Shioi *et al.* (1996) descobriram que a reação de dequelação de Mg requer uma pequena quantidade de substância termoestável denominada substância quelante de metal (MCS). Suzuki e Shioi (2002) utilizaram um substrato artificial, a clorofilina *a*, e demonstraram que uma proteína purificada que libera Mg de *Chenopodium album* tinha baixa atividade de peroxidase. Esse resultado é consistente com um estudo anterior desenvolvido por Azuma *et al.* (1999), que demonstrou que a peroxidase da raiz-forte inclui atividade Mg-dequelante. Pesquisas posteriores utilizando extratos de *C. album* por Kunieda *et al.* (2005), no entanto, descobriram que a peroxidase e a glutathione S-transferase só liberam magnésio a partir do substrato artificial de clorofilina *a*. Este fato elimina a possibilidade de que exerçam um papel na degradação da clorofila uma vez que somente a proteína purificada de baixa massa molecular exibiu atividade de dequelação de Mg com o substrato nativo clorofilida *a*.



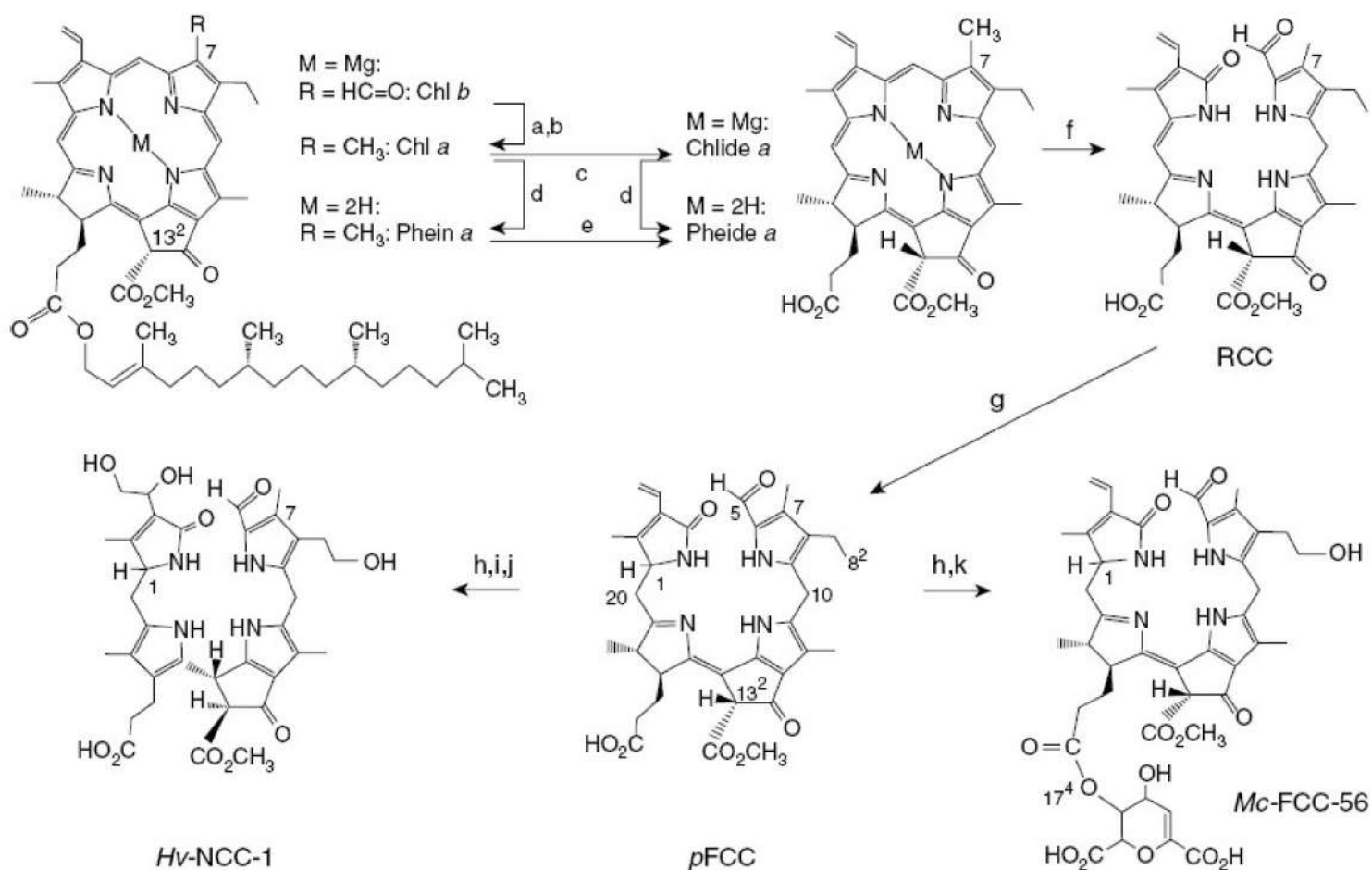
ESQUEMA 2.7 Um modelo sugerido para mecanismo catalítico da clorofilase recombinante *Chenopodium album* (CaCLH). Tschiaj et al. (2003).

A oxigenase feoforbídeo *a* (PAO), identificada na fração proteica solúvel de *C. alba* por Shioi *et al.* (1995), catalisa a conversão de feoforbídeo *a* em pirofeoforbídeo *a*. A PAO, uma oxigenase ferro-enxofre de tipo Rieske (Pruzinska *et al.*, 2003; 2005), é a enzima-chave responsável pela abertura do macrociclo de clorina do feoforbídeo *a* (Hortensteiner e Krautler, 2011). Tentativas sem sucesso de caracterizar a PAO bioquimicamente em membranas isoladas de cloroplasto levaram à identificação de uma segunda enzima, a catabólito redutase de clorofila vermelha (RCCR). Somente após a adição de proteínas estromais que continham RCCR a atividade da PAO pôde ser determinada. Juntas, as duas enzimas catalisam a formação de um catabólito de clorofila fluorescente não polar (FCC) como FCC primário (pFCC). A abertura do macrociclo do feoforbídeo *a* pela oxigenase PAO formou um catabólito de clorofila vermelha (RCC), não definido, que foi reduzido, em seguida, pelo RCCR para FCC. O pFCC foi em seguida modificado novamente por enzimas hidroxilantes não identificadas formando uma variedade de produtos finais incolores (Esquema 2.8).

A retenção da clorofila é usada geralmente como medida de qualidade em vegetais verdes uma vez que a degradação da clorofila ocorre em tecidos danificados durante o branqueamento e o processamento (Sweeney e Martin, 1961; Heaton e Marangoni, 1996; Tijkens *et al.*, 2001). Vários mecanismos foram propostos para a perda de clorofila durante o processo de estocagem de frutas e vegetais. Além das enzimas, ácidos fracos, oxigênio, luz e calor podem levar à degradação da clorofila. A perda da cor verde pode ser indesejável e essas mudanças devem ser minimizadas. Uma das principais reações é a substituição do átomo Mg^{2+} da clorofila pelo hidrogênio em condições ácidas com a formação de feofitina (Minguez-Mosquera *et al.*, 1989). Este pigmento é associado à alteração da cor verde vivo para verde-oliva fosco. A reação foi reconhecida primeiro por Campbell (1937) com a descoloração em ervilhas congeladas estocadas. A influência do pH na conversão da clorofila em feofitina é geralmente considerada o principal fator de descoloração de alimentos durante seu processamento. Os vegetais, assim, tornam-se cor verde-oliva fosco quando são aquecidos ou processados em ambiente ácido (Gold e Weckel, 1959; Gunawan e Barringer, 2000). Como consequência, os esforços no sentido de manter a clorofila durante processos de aquecimento incluíram o controle do pH, processamento rápido em altas temperaturas ou uma combinação dos dois (HTST) (Gupte e Francis, 1964; Buckle e Edwards, 1970; Schwartz e Lorenzo, 1991).

A taxa de conversão da clorofila em feofitina mostrou comportar-se de modo diretamente proporcional à concentração de ácido (Joslyn e Mackinney, 1938). A formação da feofitina foi objeto de um grande número de pesquisas (Gupte *et al.*, 1964; Hermann, 1970; LaJollo *et al.*, 1971; Robertson e Swinburne, 1981). Uma relação linear foi relatada por Walker (1964) entre a aparência e a formação da feofitina em feijões congelados estocados por até um ano. LaJollo *et al.* (1971) observaram que a formação da feofitina é a reação predominante em teores de

atividade de água (a_w) maiores que 0,32 em purê de espinafre branqueado e liofilizado, armazenado a 37°C e 55°C em atmosfera de nitrogênio e ar. A clorofila *a* degradou-se muito mais rapidamente do que a clorofila *b*, em um fator de 2,5-30, consistente com estudos anteriores (Schanderl *et al.*, 1962; Gupte *et al.*, 1964). LaJollo *et al.* (1971) relataram haver uma relação linear entre a_w e o logaritmo do tempo decorrido para perder 20% de clorofila (Figura 2.8). Esses primeiros estudos utilizaram principalmente métodos espectrofotométricos e colorimétricos para estabelecer a cinética da degradação da clorofila. Mais tarde os pesquisadores utilizaram HPLC para quantificar as clorofilas *a* e *b* (Steet e Tong, 1996; Mangos e Berger, 1997; Weemaes *et al.*, 1999). Ao utilizar o HPLC, Koca *et al.* (2006) confirmaram a degradação da clorofila como uma reação de primeira ordem em ervilhas verdes branqueadas em temperaturas variando de 70°C-100°C em soluções tampão de pH de 5,5; 6,5 e 7,5. Com o sistema de medida de cor CIE- $L^*a^*b^*$, foi descoberta uma correlação significativa entre alterações em parâmetros de padrões visuais (valores $-a$, $-b$ e h) e a degradação da clorofila.



ESQUEMA 2.8 Esboço estrutural representativo de importantes catabólitos que delineiam os principais processos de degradação da clorofila em vegetais superiores (Krautler e Hortensteiner, 2006; Moser *et al.*, 2009). Hortensteiner e Krautler (2011).

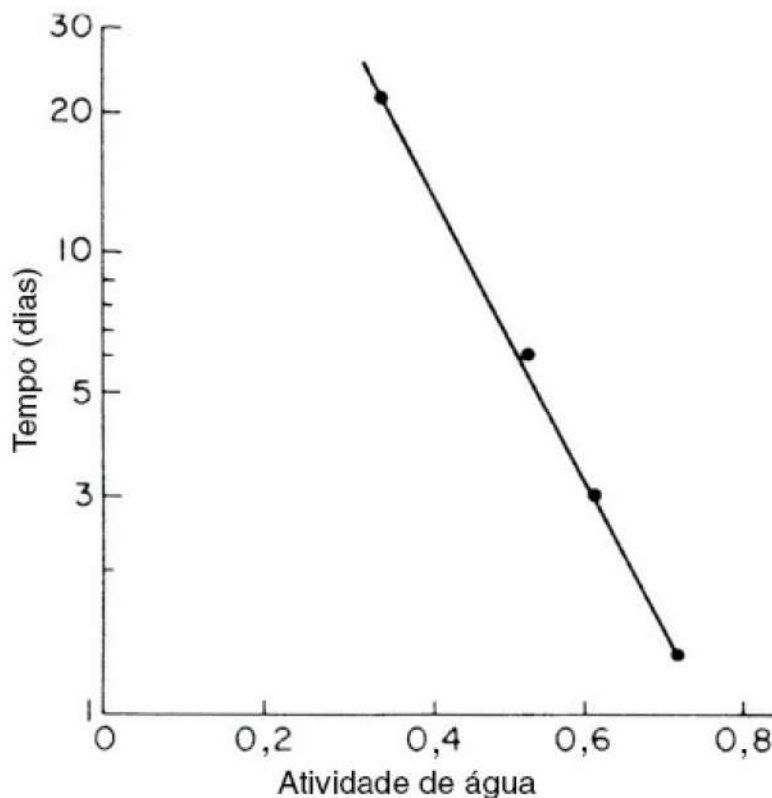
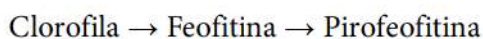


FIGURA 2.8 Tempo necessário para perda de 20% de clorofila no espinafre em diferentes atividades de água (37°C em atmosfera de ar) (La Jollo *et al.*, 1971). Copyright ©: Institute of Food Technologists.

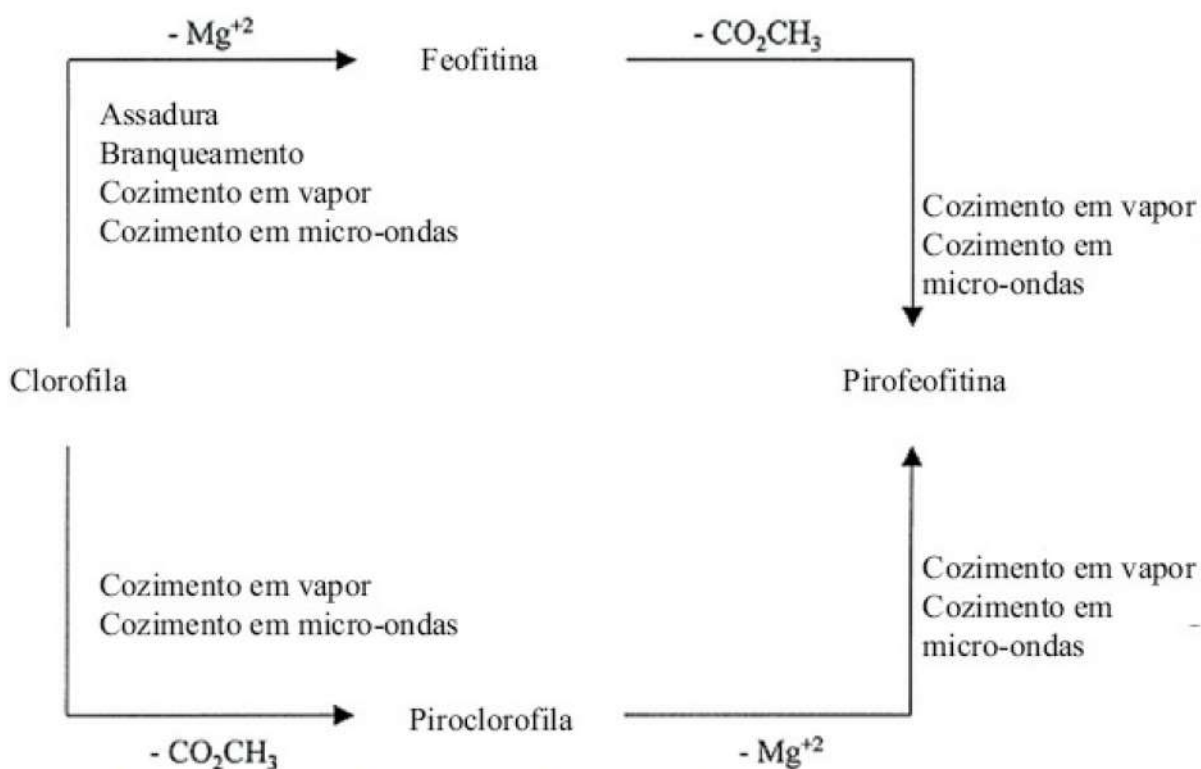
Além da feofitinação, a clorofilase converte a clorofila em clorofilídeos com a perda de grupo de fitol. A ação combinada da clorofilase e ácido resulta em perda de Mg^{2+} e do grupo de fitol com a formação de feoforbídeos (White *et al.*, 1963). O feoforbídeo também é o principal produto de degradação de pepinos em salmoura (Jones *et al.*, 1961; 1963). Muitos novos produtos foram identificados por Schwartz *et al.* (1981) no purê de espinafre aquecido, incluindo as pirofeofitinas *a* e *b*. Estes foram formados a partir das feofitinas correspondentes como resultado da perda do grupo de carbometoxi e separados por HPLC. Schwartz e von Elbe (1983) examinaram a formação das pirofeofitinas em espinafre aquecido. Ambas as feofitinas *a* e *b* foram detectadas após serem aquecidas a 121°C por até 15 minutos; em seguida, porém, ocorreu um declínio desses pigmentos. Aquecimento posterior levou à formação de pirofeofitina *a* depois de 4 minutos enquanto *b* não tinha sido observado antes de 15 minutos. Uma amostra de purê de espinafre branqueado aquecido durante quase 2 horas a 126°C produziu apenas pirofeofitinas *a* e *b*. Nenhuma outra alteração foi notada, indicando que estes foram os produtos finais da degradação da clorofila. A cor verde-oliva associada aos vegetais enlatados foi atribuída às pirofeofitinas. Estes derivados de pigmentos provavelmente incluem os pigmentos não identificados relatados por Buckle e Edwards (1969) e LaJollo *et al.* (1971) representando 20-30% do total de pigmentos na amostra. A incapacidade desses pesquisadores em detectar pirofeofitinas deve ter sido decorrência da ausência de técnicas cromatográficas de alta resolução necessárias para separar estes derivados. Schwartz e von Elbe (1983) propuseram a ordem cinética a seguir para explicar a formação de pirofeofitinas:



Um estudo posterior de Teng e Chen (1999) examinou as alterações nas clorofilas e em seus derivados durante o aquecimento de folhas de espinafre utilizando HPLC-DAD de arranjo fotodiodos ou espectrometria de bombardeamento de íons positivos (FAB-MS). Eles demonstraram degradação de primeira ordem das duas formas de clorofilas *a* e *b* e que a constante de degradação era maior em fornos de micro-ondas e branqueamento do que em cozimento em vapor e em forno. A maioria dos produtos formados pela degradação foram epímeros e feofitinas formadas durante assadura e branqueamento enquanto as piroclorofilas *a* e *b* foram detectadas depois de

fervura por 30 minutos ou cozimento em forno de micro-ondas por um minuto. O cozimento em forno de micro-ondas parece favorecer a formação de piroclorofilas *a* e *b*, enquanto o cozimento a vapor favoreceu a formação de pirofeofitinas *a* e *b*. A formação desses derivados da clorofila durante o aquecimento de folhas de espinafre descrito pelos pesquisadores está ilustrada no Esquema 2.9. Para preservar a cor verde desejável nos vegetais o uso potencial de complexos de metaloclorofila foi examinado. Um fenômeno de reverdecimento foi observado envolvendo a formação de complexos que resultam da introdução de cobre (Cu) e zinco (Zn) no anel de pirrol da clorofila. Isso parece formar uma ligação forte que é mais resistente ao ácido e ao calor do que o magnésio (Mg^{2+}) da clorofila normal (Humphrey, 1980). As formas da feofitina *a*, pirofeofitina *a* e feoforbídeo *a* apresentaram maior reatividade com o zinco do que as formas *b* correspondentes (von Elbe *et al.*, 1986; LaBorde e von Elbe, 1990).

Várias patentes foram publicadas para processos que melhorassem a cor em vegetais verdes por meio de branqueamento ou empacotamento de vegetais verdes em zinco ou soluções de cobre (Leake e Kirk, 1992; LaBorde e von Elbe, 1996). Uma pesquisa feita por Canjura *et al.* (1999) demonstrou uma melhora na cor verde em ervilhas processadas assepticamente frescas e congeladas quando branqueadas em solução de $ZnCl_2$, processo que pode tornar-se viável na preservação da cor verde nos vegetais.



ESQUEMA 2.9 Processo de formação de piroclorofilas e seus derivados em folhas de espinafre durante aquecimento. Teng e Chan (1999).

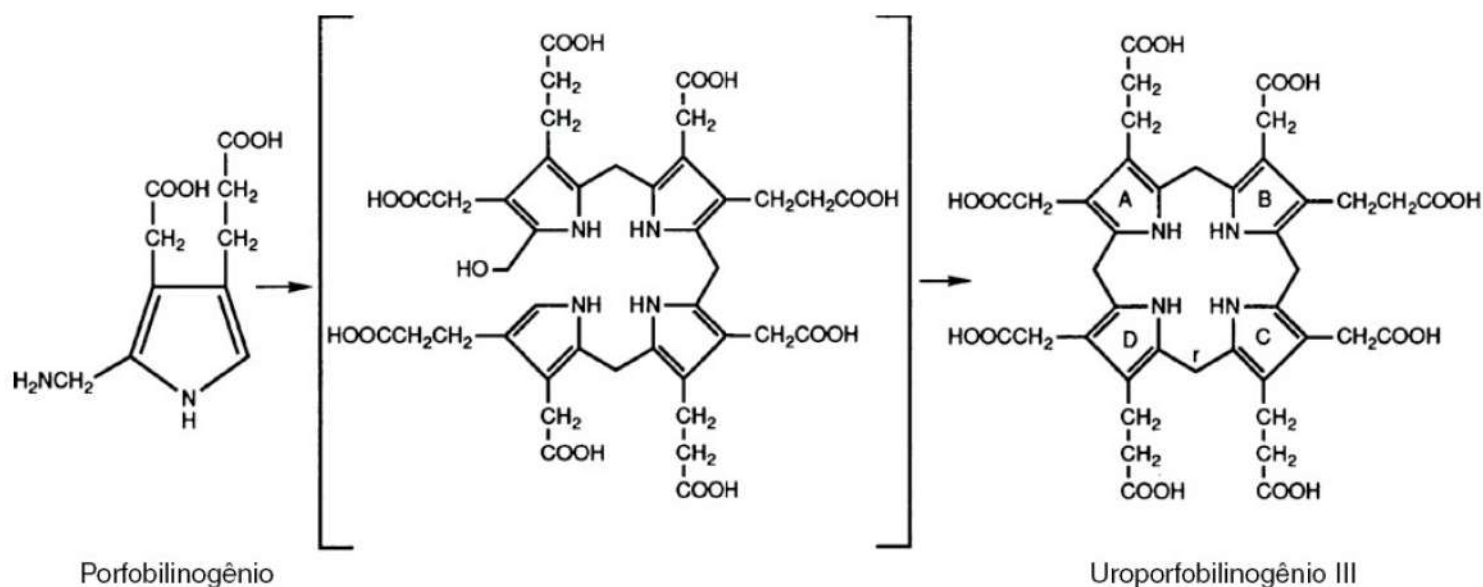
Holden (1965) também atribuiu a descoloração da clorofila em sementes de legumes à oxidação de ácidos graxos por lipoxigenase (LOX) em hidroperóxidos. Essa reação foi acoplada à degradação de ácidos graxos em hidroperóxidos e demandou a presença de fator termolábil no extrato bruto. Pesquisas posteriores realizadas por Zimmerman e Vick (1970) identificaram uma enzima, a linoleato hidroperóxido isomerase como o fator lábil ao aquecimento. O efeito de branqueamento na clorofila foi atribuído a uma reação de oxidorredução na qual o ácido graxo ceto-hidróxi, o produto isomerizado formado pela isomerase de hidroperóxido, e a porção do sistema de duplas ligações conjugadas da clorofila estão envolvidos. Imamura e Shimizu (1974) não comprovaram o envolvimento da hidroperóxido isomerase, mas confirmaram o papel do LOX no branqueamento da clorofila. Pesquisadores confirmaram, posteriormente, que isoenzimas LOX diferentes possuem um papel no branqueamento da clorofila e carotenos (Grosch *et al.*, 1976; Ramadoss *et al.*, 1978). A participação das diferentes

isoenzimas LOX no branqueamento do caroteno e da clorofila foi objeto de diversos estudos (Hilderbrand e Hymovitz, 1982; Reynolds e Klein, 1982; Cohen *et al.*, 1984; King e Klein, 1987). O efeito da LOX-1 de soja em cloroplastos de trigo foi investigado por Kockritz *et al.* (1985) e sugerem que essa enzima, que ataca seletivamente ácidos graxos livres, pode estar envolvida na senescência e na degradação do cloroplasto. A atividade LOX já havia sido relatada anteriormente em cloroplastos de ervilhas (Borisova e Budnitskaya, 1975; Douillard e Bergeron, 1978). Em função de seu papel na deterioração da qualidade dos vegetais, a LOX foi considerada uma enzima que poderia ser o indicador da otimização do branqueamento antes do congelamento. No entanto, Gokmen *et al.* (2005) demonstraram claramente que a peroxidase (POD) é mais estável perante o calor do que o LOX, de modo que a inativação do POD é um indicador melhor da adequação do branqueamento.

E. Carotenoides

Durante a maturação de muitas frutas há alterações em sua cor que passa do verde para o laranja ou vermelho. Isto ocorre em decorrência da perda de clorofila e do desmascaramento e biossíntese de carotenoides (MacKinney, 1961). Tais mudanças na pigmentação são acompanhadas por mudanças estruturais nos cloroplastos. A rede granal-intergranal desorganiza-se resultando na formação de cromoplastos (Thomson, 1966; Spurr e Harris, 1968; Camara e Brangeon, 1981). Os cromoplastos deixam de conter clorofila ou pigmentos fotossintéticos, mas tornam-se o principal local de biossíntese de carotenoides (Camara e Brangeon, 1981).

Carotenoides são compostos isoprenoides C_{40} constituídos por unidades de isoprenos ligados cabeça-cauda, formando um sistema de duplas ligações conjugadas (Eskin, 1979). São classificados em dois grupos, os carotenos e as xantofilas. Os carotenos são estruturalmente relacionados com os hidrocarbonetos enquanto as xantofilas incluem os derivados oxidados correspondentes (compostos de hidroxí, epóxi e oxi) e frequentemente são esterificados. Exemplos de carotenos são os α e β -carotenos de cenouras e o licopeno em tomates, enquanto as xantofilas incluem a capsantina e a capsorrubina encontradas na pimenta vermelha.



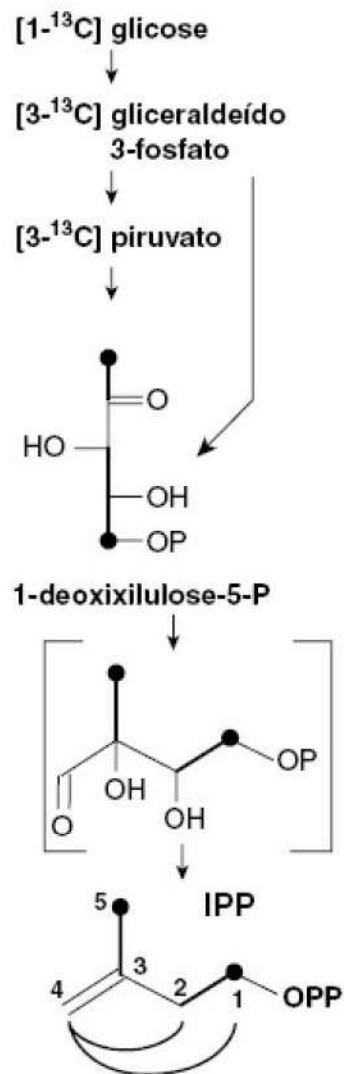
Os carotenoides são sintetizados no interior do cromoplasto a partir do isopentil pirofosfato (IPP). Há algum tempo acreditava-se que a biossíntese dos IPPs ocorria mediante um único mecanismo envolvendo acetato/mevalonato (Britton, 1982). Um segundo mecanismo, no entanto, foi descoberto na eubactéria, em algas verdes e em vegetais superiores nos quais o IPP é formado por gliceraldeído 3-fosfato e piruvato (Lichtenthaler *et al.*, 1997a, b). Ambos os mecanismos estão presentes em vegetais superiores, mas diferem na sua localização. As enzimas do mecanismo do mevalonato encontram-se no citosol enquanto o mecanismo do gliceraldeído-3-fosfato, denominado 1-deoxi-d-xilulose-5-fosfato (DXP), opera no plastídio (Esquema 2.10).

Ainda não está claro se o acetil-CoA é sintetizado no interior do cloroplasto ou se tem uma origem extraplastídica. Grumbach e Forn (1980) demonstraram com clareza que o acetil-CoA forma-se no interior do cloroplasto e pode sintetizar carotenoides autonomamente. Os cromoplastos da pimenta vermelha e dos narcisos vermelhos mostraram poder sintetizar carotenoides a partir de isopentil fosfatos (Beyer *et al.*, 1980; Camara *et al.*, 1982). A presença de enzimas capazes de sintetizar acetil-CoA sugere que uma autonomia similar pode existir nos cromoplastos, capazes de sintetizar carotenoides.

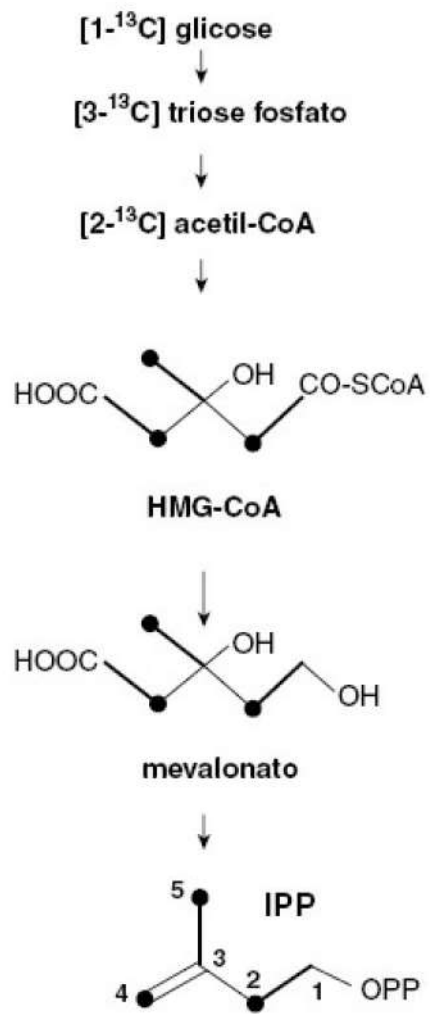
A formação de geranylgeranyl pirofosfato a partir de ácido mevalônico (MVA) envolve a fosforilação pela mevalonato quinase (ATP:mevalonato 5-fosfotransferase, EC 27.1.3.6). Esta enzima foi identificada em várias plantas, incluindo sementes de abóbora (Loomis e Battaille, 1963), folhas verdes e cotilédones etiolados de feijões franceses (*Phaseolus vulgaris*) (Rogers *et al.*, 1966; Gray e Keckwick, 1969; 1973), em gomos de suco de laranja (Potty e Breumer, 1970) e em cotilédones de melão (*Cucumis mello*) (Gray e Keckwick, 1972). A fosforilação de MVA-5P em MVA-5 pirofosfato (MVA-5PP) é em seguida catalisada por 5-fosfomevalonate quinase (ATP:fosfomevalonato fosfotransferase, EC 2.7.4.2). O MVA-5 PP é, em seguida, descarboxilado por pirofosfomevalonato descarboxilase [carboxilase de ATP:5-pirofosfomevalonato (desidratação), EC 4.1.1.33]. Esta enzima catalisa uma reação bimolecular na qual o ATP e o 5-pirofosfomevalonato são convertidos em isopentil pirofosfato, ADP, fosfato e dióxido de dióxido (Esquema 2.11).

A isomerização do pirofosfato de isopentil em pirofosfato de dimetilalil é catalisada pela isopentil pirofosfato isomerase (EC 5.3.3.2). A dupla ligação é então isomerizada da posição 3 do isopentil pirofosfato para a posição 2 em dimetilalil pirofosfato. Esta enzima foi isolada de abóbora por Ogura *et al.* (1968). Uma molécula de dimetilalil pirofosfato é então condensada com uma, duas ou três moléculas de isopentil pirofosfato levando à formação de pirofosfato de geranylgeranyl (Esquema 2.12). As últimas reações são catalisadas por um grupo de enzimas conhecidas como prenil transferases. A enzima responsável pela síntese do farnesil pirofosfato foi parcialmente purificada da semente da abóbora (Eberhardt e Rilling, 1975).

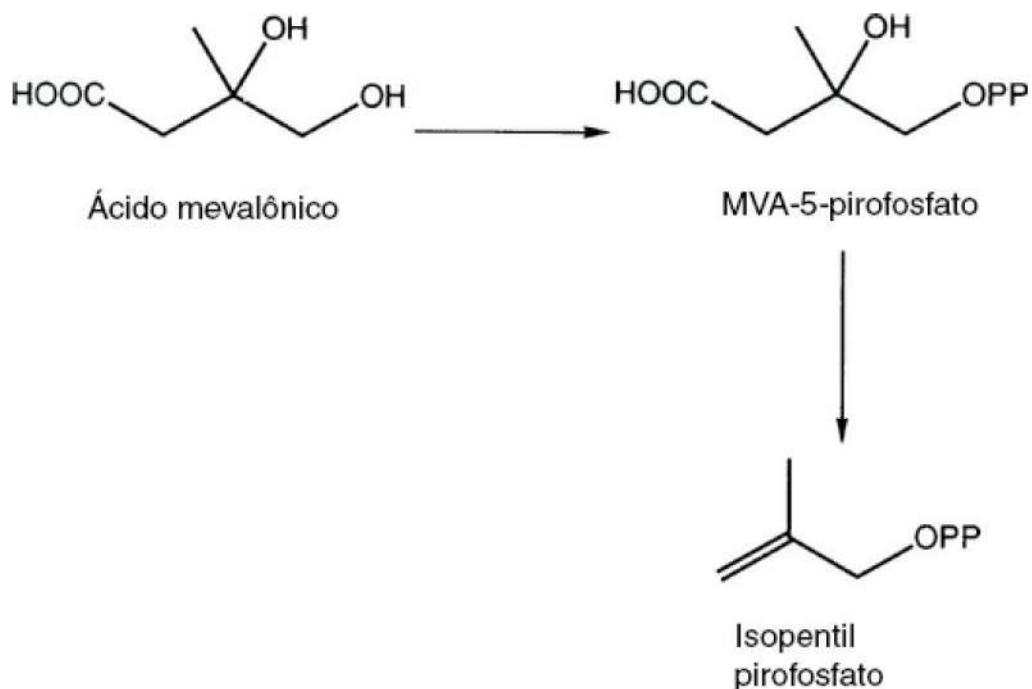
(a) Processo alternativo IPP



(b) Processo clássico acetato/mevalonato

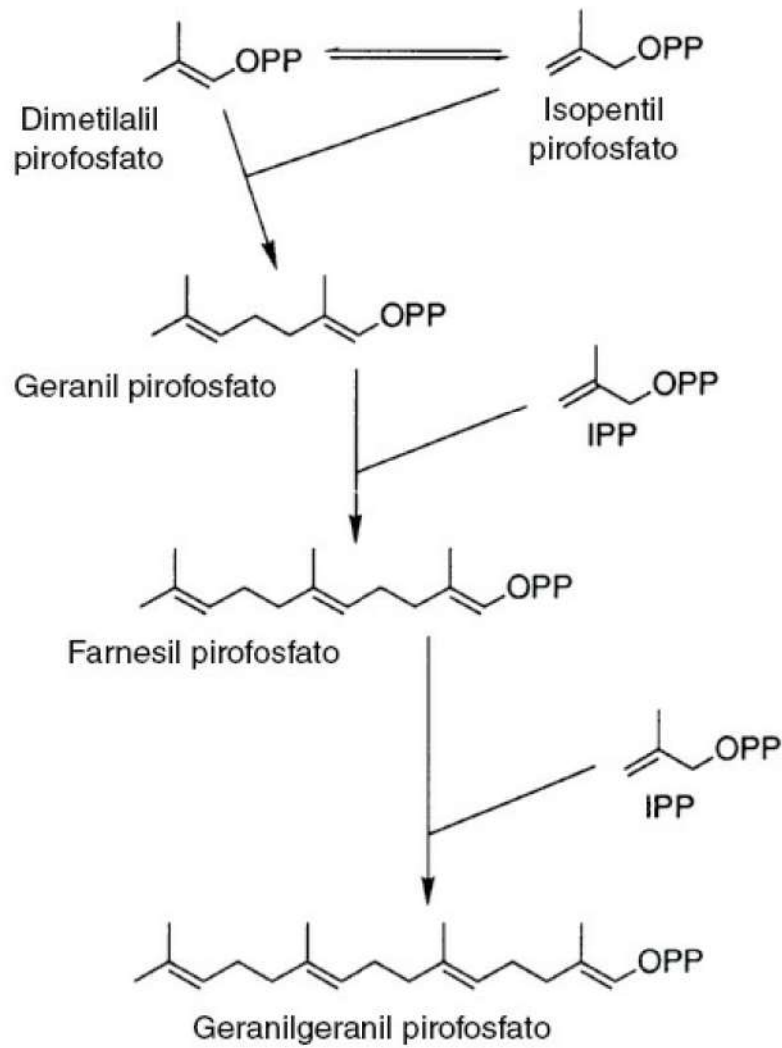


ESQUEMA 2.10 Classificação isopentil difosfato (IPP) a partir de [¹³C]glicose via (a) uma nova alternativa e (b) o processo clássico acetato/mevalonato da biossíntese do IDPP. Lichtenthaler *et al.* (1997b).

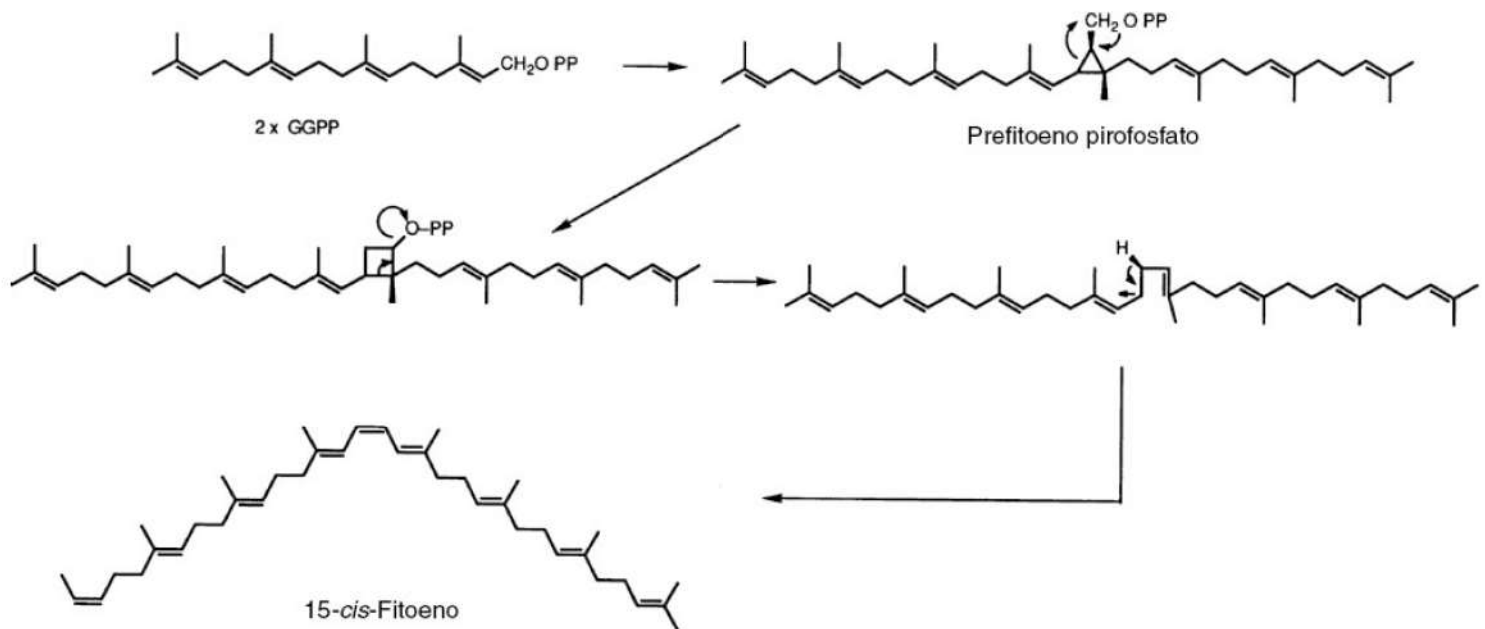


ESQUEMA 2.11 Produção de IPP a partir do ácido mevalônico.

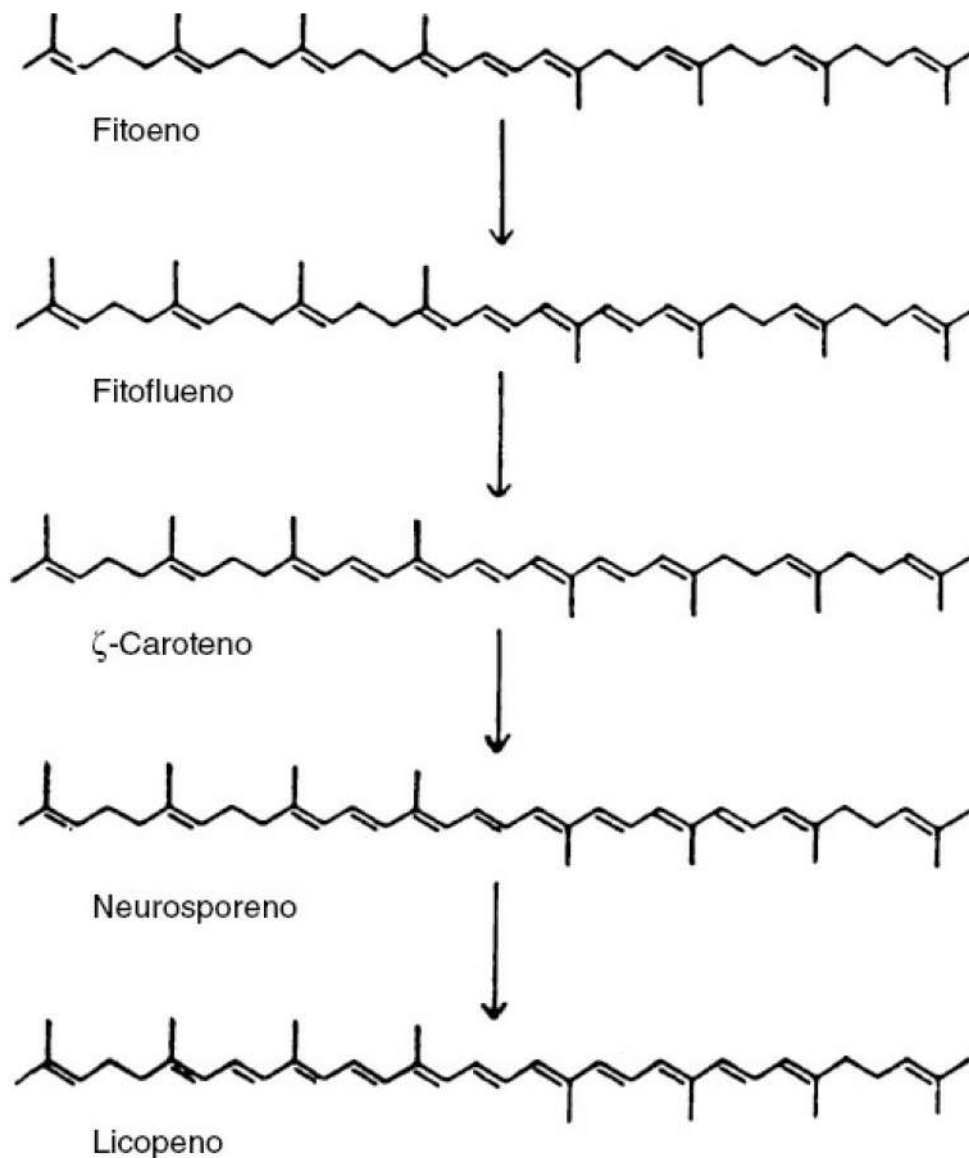
A formação do primeiro hidrocarboneto C_{40} , o 15-*cis*-fitoeno resulta da condensação de duas moléculas de pirofosfato de geranylgeranyl (C_{20}) (Esquema 2.13). O intermediário dessa reação, o prefitoeno pirofosfato, perde um próton, o que resulta em uma dupla ligação na posição C15. Maudinas *et al.* (1975) identificaram um sistema de enzimas solúveis em plastídios de tomates que sintetiza o *cis*-fitoeno a partir de isopentil pirofosfato. O fitoeno é incolor e é convertido em carotenoides coloridos através de uma série de processos de dessaturação que produzem um sistema de duplas ligações conjugadas. Ao contrário do fitoeno, que é um isômero 15-*cis*, os carotenoides coloridos são, todos eles, *trans*, de modo que a isomerização para o formato *trans* precisa ocorrer durante o processo de dessaturação. Este mecanismo envolve a perda de hidrogênio por *trans*-eliminação e pode ser mediado por um complexo de enzimas da membrana, talvez envolvendo íons de metálicos ou citocromos em um sistema simples de transferência de elétrons (Britton, 1979). A dessaturação sequencial do fitoeno em licopeno foi proposta por Porter e Lincoln (1950) e pode ser vista no Esquema 2.14. Um sistema similar de enzimas foi relatado por Qureshi *et al.* (1974) em tomates mutantes capazes de converter todo o *cis*- β -caroteno em *trans* caroteno. A conversão do neurosporeno em licopeno só tem sido encontrada em sistemas fúngicos (Davies, 1973; Bramley *et al.*, 1977).



ESQUEMA 2.12 Biossíntese do geranylgeranyl pirofosfato a partir do IPP.

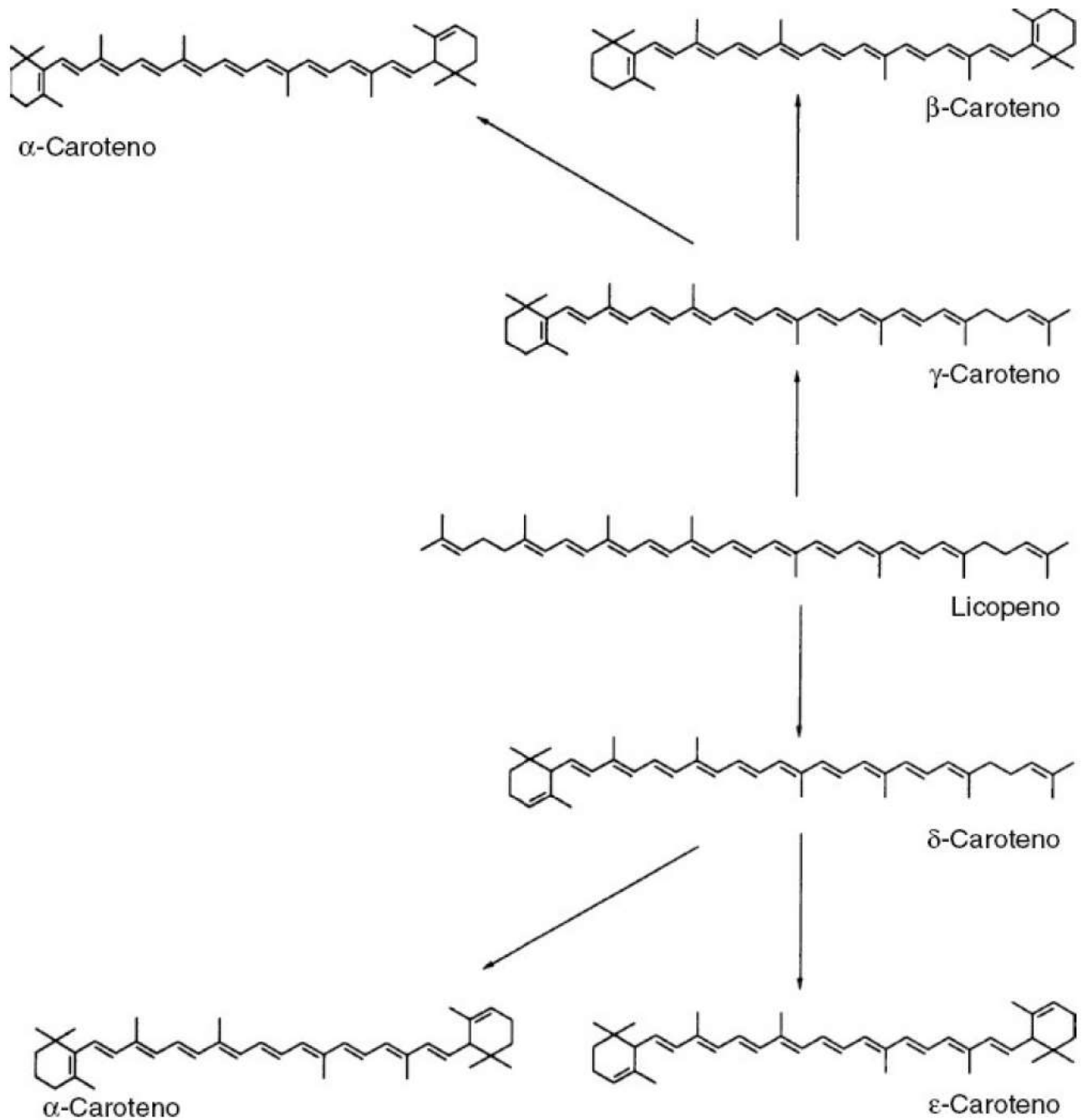


ESQUEMA 2.13 Mecanismo de biossíntese do fitoeno. Britton (1982).



ESQUEMA 2.14 Sequência das reações de dessaturação do fitoeno e formação de licopeno.

O passo final na biossíntese de carotenoides é a ciclização com a formação de pelo menos um ou dois grupos finais cíclicos nos carotenoides (Esquema 2.15). A conversão do licopeno para α -, β e γ -carotenos foram demonstrados na presença de enzimas solúveis de plastídios de tomate e cloroplastos do espinafre por Kuwasha *et al.* (1969). A ciclização demonstrou ser inibida pela nicotina e CPTA [cloreto de 2-(4-clorofeniltrio) trietil amônio] ocasionando o acúmulo de licopeno em frutas cítricas tratadas com esses inibidores (Britton, 1982). Após a ciclização, o oxigênio é incorporado na forma de grupo hidroxil em C3 ou epóxido na posição de 5,6 (Takeguchi e Yamamoto, 1968; Britton, 1976). A última fase envolve uma série de reações conhecidas como o ciclo da xantofila.



ESQUEMA 2.15 Esquema abrangente para a biossíntese de carotenos bicíclicos a partir do neurosporeno. Britton (1982).

Camara *et al.* (1982) examinaram o local da biossíntese de carotenoides em cromoplastos de pimentas semimaduras (*Capsicum annuum* L.). A incubação de difosfato isopentil [$1-^{14}\text{C}$] com diferentes frações de cromoplastos demonstrou que a membrana era incapaz de sintetizar carotenoides ao passo que o estroma sintetizou os primeiros carotenoides sem cor, os fitoenos (Tabela 2.4). Portanto, a fitoeno sintetase, a enzima responsável, pode ser um indicador útil do estroma do cromoplasto. Um aumento na incorporação do substrato marcado na presença de membranas de cromoplasto foi atribuído a seus sistemas de dessaturação e ciclização, que produzem carotenoides. Esse estudo demonstrou que as enzimas envolvidas na biossíntese de carotenoides estão compartimentalizadas nos cromoplastos. O estroma sintetiza o fitoeno que é sujeito à dessaturação e ciclização em carotenoides coloridos da membrana. Esses pesquisadores propuseram que uma proteína portadora transferiu fitoeno à membrana do cromoplasto ou que, alternativamente, a fitoeno sintetase esteja vinculada à membrana, local onde liberou fitoeno para reações posteriores.

1. Alterações dos carotenoides durante o amadurecimento

Ebert e Gross (1985) examinaram os pigmentos carotenoides na casca de caquis em maturação (*Diospyros kaki* cv. "Triumph"). Um declínio regular na clorofila (*a* e *b*) foi observado durante a maturação que, no entanto, desapareceu uma vez que a fruta ficou madura (Tabela 2.5). Os carotenoides de cloroplastos (α - e β -carotenos, luteína, violaxantina e neoxantina) diminuíram, seguidos pela síntese gradual dos carotenoides de cromoplastos (criptoxantina, anteraxantina e zeaxantina). Ikemefuna e Adamson (1985) monitoraram as alterações nos pigmentos de clorofila e carotenoides em frutos da palma em maturação (*Elaeis guineensis* "Palmal") e notaram uma degeneração similar de cloroplastos e formação de cromoplastos. Essas alterações foram acompanhadas por um aumento na carotenogênese com a formação de α - e β -carotenos como os principais pigmentos presentes na fruta madura.

Farin *et al.* (1983) examinaram a mudança nos carotenoides durante a maturação da tangerina híbrida israelense "Michal" (*Citrus reticulata*). Essa fruta, em particular, é a mais colorida entre as frutas cítricas, com cor avermelhada brilhante. A clorofila total diminuiu rapidamente na casca e desapareceu por completo no estágio maduro (Tabela 2.6). O total de carotenoides diminuiu na fase da perda de cor por causa do declínio dos carotenoides dos cloroplastos, δ -carotene, luteína, violaxantina e neoxantina. Um aumento significativo da carotenogênese ocorreu em seguida, com aumento dos carotenoides do cromoplasto, criptoxantina e apocarotenoides C_{30} . Os dois apocarotenoides C_{30} , β -citraurina e β -citraurineno, representaram 26,1% e 9,9%, respectivamente, do total de carotenoides na fruta madura. Sua formação parece necessitar uma degradação assimétrica de um fragmento C_{40} do lado C_1 de um carotenoide, a criptoxantina.

TABELA 2.5 Alterações de carotenoide na pele do caqui (*Diospyros kaki* cv. "Triumph") durante a maturação pós-colheita

	Estágio de maturação		
	Colheita	Intermediário	Totalmente maduro
Carotenoides totais ($\mu\text{g/g}$ fr. wt)	128,0	366,0	491,0
Padrão de carotenoide (% dos carotenoides totais)			
Fitoflueno	–	–	0,4
α -Caroteno	1,6	1,2	1,0
β -Caroteno	9,4	7,6	6,7
Mutato cromo	–	0,7	–
γ -Caroteno	–	0,4	–
Licopeno	1,1	0,5	8,2
β -Criptoxantina	29,2	50,0	48,2
Criptoxantina 5,6 epoxida	0,9	1,2	1,9
Criptoflavina	0,7	2,1	2,9
Luteína	12,4	5,5	4,1
Zeaxantina	9,3	9,7	5,9
Mutato xantina	0,8	4,7	1,8
Isoluteína	0,5	–	0,3
<i>trans</i> -Anteraxantina	5,4	2,0	4,8
<i>cis</i> -Anteraxantina	6,2	2,2	2,3
Luteoxantina	1,7	1,8	1,9
<i>trans</i> -Violaxantina	6,9	3,7	3,8
<i>cis</i> -Violaxantina	6,7	1,5	2,0
Neoxantina	7,2	5,2	3,8

De Ebert e Gross (1985). Reimpressão autorizada. Copyright ©: Pergamon Press.

Gross *et al.* (1983) estudaram as alterações nos pigmentos e na ultraestrutura durante a maturação da toranja (*Citrus grandis* Osbeck). A clorofila diminuiu de 90 $\mu\text{g/g}$ na etapa de imaturidade (verde) para 11 $\mu\text{g/g}$ na fruta madura, amarelo-pálida, até desaparecer totalmente na etapa de completa maturidade. Os carotenoides dos

cloroplastos, o β -caroteno, luteína, violaxantina e neoxantina, decresceram durante a maturação, sendo que o β -caroteno desapareceu totalmente. O acúmulo de fitoflueno ficou evidenciado quando apareceu coloração alaranjada, atingindo 67% do total de carotenoides na fruta madura. Além do fitoflueno, outros carotenoides de cromoplastos foram detectados, incluindo o δ -caroteno, neurosporeno, criptoxantina e criptoflavina.

Essas pesquisas demonstraram que alterações na composição nos carotenoides durante a maturação refletem a transformação de cloroplastos em cromoplastos. Pesquisas anteriores desenvolvidas por Eilati *et al.* (1975) sobre alterações de carotenoides em cascas de laranja Shamouti mostraram que transformações ocorrem antes da colheita ou pós-colheita. A transformação dos cloroplastos em cromoplastos durante o desverdeamento de frutas cítricas foi relatado por Huff (1984) como sendo regulado pelo acúmulo de açúcar no epicarpo. Foi descoberto que a transformação reversa associada ao reverdecimento de certas espécies cítricas foi acompanhada pelo desaparecimento dos açúcares. Este fenômeno de reverdecimento do epicarpo do fruto *Citrus sinensis* foi observado por Thomson *et al.* (1967) e foi atribuído à reversão de cromoplastos a cloroplastos. A sacarose, portanto, é que promove a formação de cromoplastos enquanto o nitrogênio estabiliza os cloroplastos ao retardar o processo de desverdecimento.

TABELA 2.6 Distribuição pigmentar no flavedo de tangerina híbrida (*Citrus reticulata* cv. "Michal") durante a maturação

	Casca		
	Verde	Verde-alaranjada	Madura
Diâmetro da fruta (cm)	4,70	4,85	5,10
Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g/g}$)	240,0	52,6	–
Clorofila <i>b</i> (fr. wt)	86,0	15,8	–
Total de carotenoides	143,4	51,0	174,1
Padrão de carotenoide (% dos carotenoides totais)			
Fitoflueno	–	5,2	3,1
α -Caroteneo	9,7	2,4	0,2
β -Caroteno	6,9	2,5	0,3
ζ -Caroteno	–	–	0,4
δ -Caroteno	–	–	0,1
Mutatocromo	–	–	0,5
Licopeno	–	–	–
β -Apo-8'-carotenal	0,7	0,7	1,3
α -Criptoxantina	1,9	–	–
β -Criptoxantina	–	3,1	6,4
Criptoxantina 5,6-epóxide	–	–	0,4
Criptoxantina 5',6'-epóxide	–	–	0,3
β -Citaurineno	–	9,5	9,9
β -Citaurina	–	12,3	26,1
Luteína	23,5	12,8	2,6
Zeaxantina	3,9	1,6	1,0
Mutato xantina	1,5	0,2	0,2
<i>trans</i> -Anteraxantina	3,6	4,3	1,8
<i>cis</i> -Anteraxantina	–	–	2,5
Luteoxantina	5,8	5,6	9,1
<i>trans</i> -Violaxantina	14,0	11,7	9,8
<i>cis</i> -Violaxantina	11,0	18,2	19,8
<i>trans</i> -Neoxantina	11,7	6,6	4,2
<i>cis</i> -Neoxantina	3,6	3,3	–
Neocromo	–	–	–
<i>trans</i> -Troxantina	–	–	–

Trolicromo	-	-	-
Desconhecido	2,2	-	-

Adaptado de Farin *et al.* (1983). Reimpressão autorizada. Copyright © Pergamon Press.

2. Degradação dos carotenoides: processamento e armazenamento

Os carotenoides são responsáveis pela maior parte da cor amarela e laranja de frutas e vegetais como abacaxis e cenouras. A natureza insaturada torna os carotenoides extremamente suscetíveis à isomerização e oxidação, resultando em uma perda da cor que é mais pronunciada depois da oxidação. Esta última pode ser resultado da ação da lipoxigenase, que pode branquear os carotenoides (Eskin *et al.*, 1977). Pesquisas recentes indicam que as diferenças na capacidade da lipoxigenase em diferentes frutas e vegetais para oxidar carotenoides dependem das isoenzimas presentes. As isoenzimas da lipoxigenase são classificadas em tipos 1 ou 2, dependendo do seu pH ótimo de atividade e especificidade do produto. Dos dois tipos de isoenzimas, a lipoxigenase-2 apresenta maior atividade em pH ácido e está envolvida nas reações de co-oxidação que conduzem à descoloração de pigmentos (Klein e Grossman, 1985). Por exemplo, Arens *et al.* (1973) demonstraram que a lipoxigenase-2 de ervilha é um oxidante eficaz de carotenoides. Chepurenko *et al.* (1978) atribuíram o branqueamento de carotenoides ao efeito combinado das isoenzimas da lipoxigenase de ervilha e não somente à lipoxigenase-2. Yoon e Klein (1979) mostraram haver diferenças bem definidas entre as taxas de oxidação de carotenoides para essas duas isoenzimas de lipoxigenase de ervilhas. Essas enzimas também atuam na biossíntese de ácido traumático, um hormônio que cura ferimentos, assim como o ácido jasmônico, regulador do crescimento das plantas (Zimmerman e Coudron, 1979; Vick e Zimmerman, 1983).

Os carotenoides são extremamente suscetíveis à oxidação não enzimática em frutas e vegetais desidratados. Cenouras desidratadas em pó, por exemplo, perderam 21% de seus carotenoides segundo relato de MacKinney *et al.* (1958) quando armazenadas ao ar livre. O conteúdo de umidade presente nos produtos desidratados é particularmente importante para a estabilidade dos carotenoides. O efeito de a_w na degradação de β -caroteno em sistemas modelo foi estudado por Chou e Breene (1972). Os pesquisadores mostraram que na a_w de 0,44 a descoloração oxidativa do β -caroteno foi reduzida comparada ao sistema seco correspondente com ou sem a presença do antioxidante hidroxitolueno butilado (BHT) (Figura 2.9). Ficou claro, a partir dessa pesquisa, que a água atua como barreira para a difusão do oxigênio.

Quando os carotenoides são aquecidos na ausência de ar, algumas das duplas ligações *trans* sofrem isomerização para os isômeros *cis* correspondentes. Ácidos também catalisam a isomerização do formato da *trans* para o isômero *cis* correspondente. A alteração da forma associada aos isômeros *cis* reduz a ressonância na molécula bem como a intensidade da cor. Essas reações foram responsáveis pela diferença da qualidade entre abacaxis frescos e enlatados (Singleton *et al.*, 1961). Uma mudança no espectro dos pigmentos de carotenoides extraídos foi encontrada em abacaxis enlatados, incluindo a perda do pico a 466 nm, junto com picos de comprimento de ondas menores. Tal mudança no espectro, apesar de ser sutil demais para os olhos humanos, causou uma pequena alteração de cor de laranja-amarelado em abacaxis frescos para um amarelo tendendo para o limão na fruta enlatada.

Essa alteração foi atribuída à isomerização dos carotenoides com grupos com 5,6-epóxido aos correspondentes óxidos 5,6-furanoide. Na fruta intacta os ácidos naturais dos vacúolos das células possuem efeitos catalíticos e entram em contato com plastídios que possuem carotenoides quando as membranas celulares são rompidas durante manipulação ou processamento. Vários estudos examinaram o efeito do cozimento de cenouras na formação de isômeros *cis*. Klaui (1973), no entanto, sugeriu que os efeitos do cozimento na cor e no conteúdo de caroteno são insignificantes.

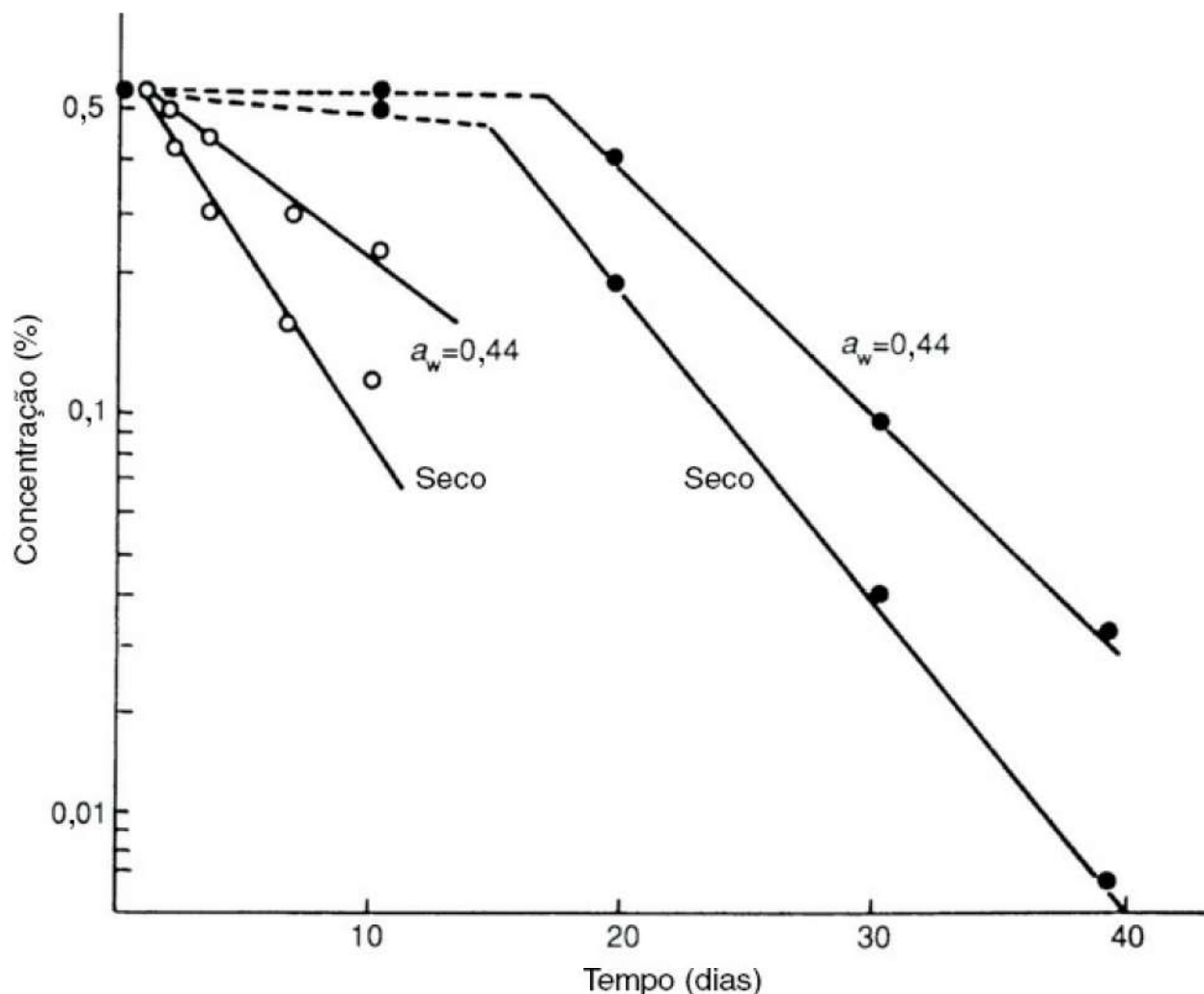


FIGURA 2.9 Descoloração de β -caroteno em sistemas modelo. Seco refere-se a sistemas mantendo CaCl_2 sólido; $a_w = 0,44$ para sistemas contendo K_2CO_3 saturado (o: controle; •: BHT-hidroxitolueno butilado). Chou e Breene (1972). Copyright ©: Institute of Food Technologists.

F. Antocianinas

As antocianinas são responsáveis pelas cores atraentes rosa, vermelha, violeta e azul de flores, folhas, frutas e vegetais (Harborne, 1967). São pigmentos solúveis em água que se acumulam nas células da epiderme de frutas assim como em raízes e folhas (Timberlake e Bridle, 1975, 1982; Harborne, 1976). Esses pigmentos são formados à medida que as frutas amadurecem e ficam maduras, como é evidenciado no caso de morangos (Fuleki, 1969), algumas variedades de cerejas, framboesas, oxococos e maçãs (Zapsalis e Francis, 1965; Proctor e Creasy, 1971; Cansfield e Francis, 1970; Craker e Wetherbee, 1973; Bishop e Klein, 1975), uvas pretas (Liao e Luh, 1970) e mirtilos (Suomalainen e Keranen, 1961), assim como em vegetais como repolho roxo, batata vermelha, rabanetes e cebolas vermelhas (Fuleki, 1971; Small e Pecket, 1982). A função principal das antocianinas é atrair insetos ou pássaros para a polinização de flores e disseminação de sementes de frutas por animais (Brouillard, 1983).

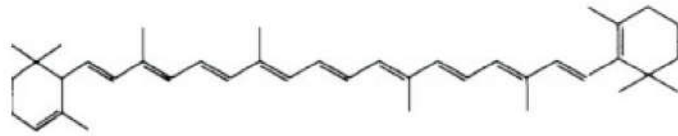
As antocianinas são pigmentos flavonoides cuja estrutura é baseada em núcleos de fenilpropanoides. Elas ocorrem na natureza como glicosídeos nos quais as formas agliconas ou antocianidinas, são substituídas por sais flavilium. A fórmula estrutural do cátion de flavilium é a seguinte:



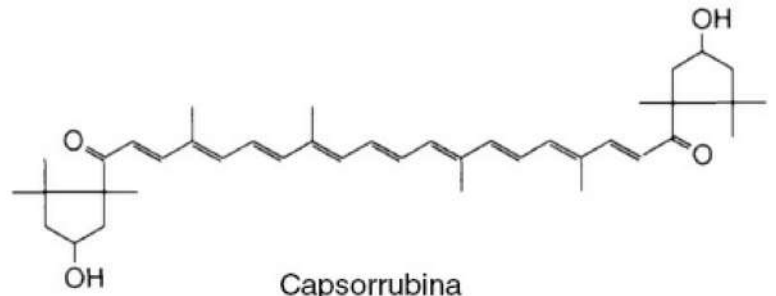
β -Caroteno



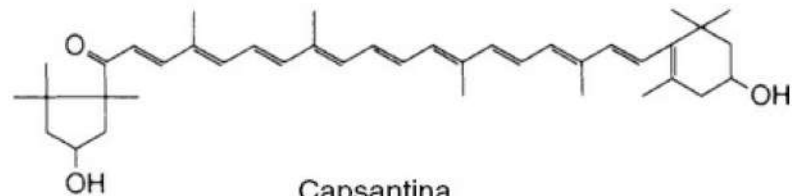
Licopeno



α -Caroteno



Capsorrubina

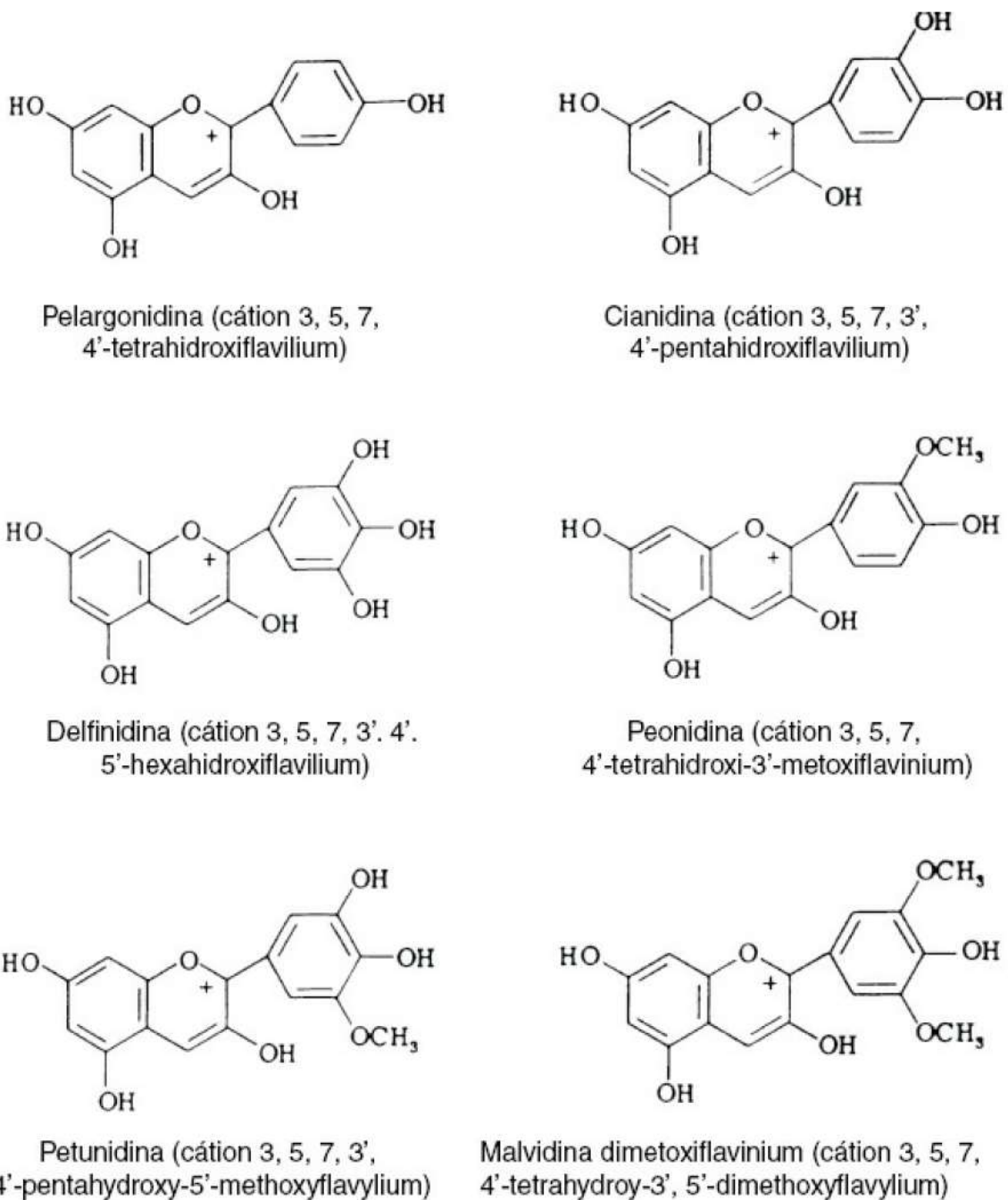


Capsantina

As antocianidinas, ou agliconas, são um pouco menos estáveis do que os glicosídeos correspondentes. Estes últimos são compostos, basicamente, de 3-glicosídeos e 3,5-glicosídeos. As principais antocianidinas ou agliconas nas frutas estão ilustradas no Esquema 2.16. A d-glicose, d-lactose, L-ramnose e d-xilose são os principais açúcares ligados às antocianidinas na posição-3. A intensidade da cor é determinada pela natureza do pigmento, sua concentração e pH, assim como pela presença de misturas de pigmentos, copigmentos e determinados íons metálicos (Brouillard, 1983). As antocianinas estão dissolvidas na seiva vascular aquosa das células da planta, que é levemente ácida. Estes pigmentos tendem a se tornar mais estáveis quando submetidos a estas condições ácidas. Os diferentes tons nas cores das antocianidinas refletem a natureza de seus padrões de hidroxilação e metoxilação. Um aumento da hidroxilação é acompanhado por uma maior intensidade na cor azul enquanto a metoxilação intensifica a cor vermelha (Braverman, 1963). A distribuição das antocianidinas em algumas frutas comestíveis é mostrada na Tabela 2.7.

TABELA 2.7 Distribuição de antocianinas em algumas frutas comestíveis

Antocianidina	Fruta
Cianidina	Amora, ruibarbo
Cianidina, delphinidina	Groselha preta
Cianidina, peonidina	Cereja
Cianidina, pelargonidina	Morango



ESQUEMA 2.16 Principais antocianinas de alimentos.

1. Biossíntese de antocianinas

A biossíntese das antocianinas é bem conhecida (Mol *et al.*, 1989; Forkmann, 1991) e seu perfil geral está ilustrado no Esquema 2.17 (Holton e Cornish, 1995). A síntese dos aminoácidos aromáticos nas plantas é realizada pela via do ácido chiquímico. A síntese de todos os flavonoides, inclusive das antocianinas, envolve três enzimas-chave: a chalcona sintase (CHS), a chalcona isomerase (CHI) e a flavonoide 3-hidroxilase (F_3H) (Gou *et al.*, 2011).

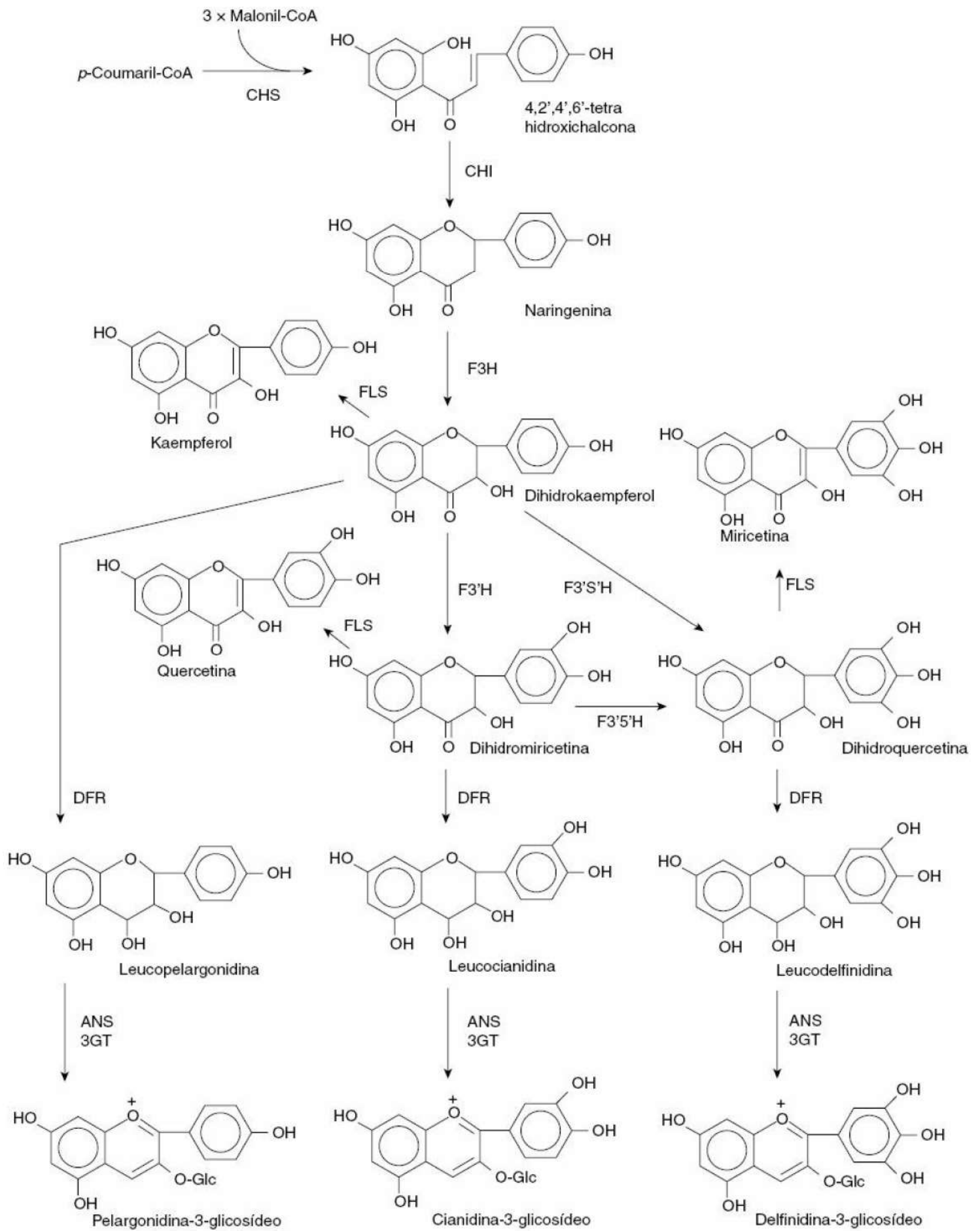
Essas enzimas parecem estar presentes como complexos de enzimas de multiproteínas (conhecidas como metabolonas) canalizando o substrato através de subvias específicas (Winkel, 2004; Jorgensen *et al.*, 2005). Por exemplo, CHS, CHI, F_3H e dihidroflavonoide-4-redutase (DFR) estão, todas elas, localizadas no retículo endoplasmático em *Arabidopsis* (Lepiniec *et al.*, 2006). A CHS é responsável pela condensação, passo a passo, do precursor fenilpropanoide, o *p*-coumaril-CoA, com três moléculas de malonil-CoA para formar a tetrahidroxichalcona. A próxima enzima, CHI, isomeriza a chalcona de cor amarela em naringenina sem cor. O

terceiro passo, a formação de dihidrokaemferol, é catalisado por F₃H. O CHI é responsável pela formação do anel heterocíclico de seis C da flavonona, que foi isolada pela primeira vez por Moustafa e Wong (1967). Em seguida, três outras enzimas catalisam a conversão de dihidroflavonóis em antocianinas. O DFR reduz o dihidroflavol para flavan-3,4-ci-dióis (leucoantocianidinas) que, em seguida, sofrem oxidação, desidratação e glicosilação para formar vários pigmentos de antocianinas, perlogonidinas cor de tijolo vermelho, cianidina vermelha e delphinidina azul (Holton e Cornish, 1995).

O primeiro gene envolvido na biossíntese de flavonoides foi o gene CHS isolado da salsinha (Kreuzaler *et al.*, 1983). Esse fato levou ao isolamento de clones de dois genes CHS diferentes nas petúnias (Reif *et al.*, 1985). Entre os 12 diferentes genes CHS identificados posteriormente nas petúnias apenas 4 parecem ser expressos (Koes *et al.*, 1989). Nas duas últimas décadas o controle da transcrição da biossíntese dos flavonoides tem sido extensivamente estudado (Broun, 2005). Estudos genéticos têm identificado várias classes de reguladores de transcrição (Rubin *et al.*, 2009). Para informações mais detalhadas sobre os reguladores da biossíntese da antocianina é recomendado o texto de Gou *et al.* (2011).

2. Antocianinas: efeito do processamento

As antocianinas são geralmente instáveis durante seu processamento, com uma perda total de cor durante o enlatamento, o engarrafamento e outras operações térmicas de processamento. Frutas e vegetais contêm muitas enzimas capazes de descolorir antocianinas; no entanto, podem ser inativadas pelo branqueamento. Estas enzimas incluem polifenoloxidase, antocianase e peroxidase (Grommeck e Markakis, 1964; Peng e Markakis, 1963; Sakamura *et al.*, 1966). Além das enzimas, estresses térmicos, pH, oxigênio e luz têm sido apontados como aceleradores da degradação da antocianina (Eskin, 1979; Brouillard, 1983; Hubbermann, 2005; Bordignon *et al.*, 2007; Queiroz *et al.*, 2009; Patras *et al.*, 2010). Uma pesquisa recente de Hillman *et al.* (2011) apontou que a degradação das antocianinas no suco e concentrado de uva aumentou com o aumento da temperatura e da concentração do suco. No entanto, destes, o pH é o fator mais importante que afeta a estabilidade da antocianina (Mazza e Brouillard, 1987).



ESQUEMA 2.17 Processo de biossíntese de antocianina e de flavonoide. Holton e Cornish (1995).

As antocianinas são estáveis em condições ácidas apesar de sistemas modelos demonstrarem que, na maioria

dos casos, estão nas formas sem coloração. A capacidade das antocianinas em reter suas cores nas plantas é atribuída à formação de complexos com compostos fenólicos, ácidos nucleicos, açúcares e aminoácidos, assim como íons metálicos como cálcio, magnésio e potássio (Brouillard, 1983). Muitas antocianinas aciladas têm sido identificadas em flores que possuem extraordinária estabilidade em soluções neutras ou fracamente ácidas. Um desses pigmentos isolados em pétalas de campânulas chinesas (*Platycodon grandiflorum*) é a platiconina (Saito *et al.*, 1971). Sua estrutura foi confirmada posteriormente por espectroscopia de ressonância magnética nuclear ^1H (NMR) (Goto *et al.*, 1983). Os dois grupos de acil dessa antocianina, um localizado acima do anel de pirílio e o outro abaixo dele, resultam em estabilidade em soluções neutras. A presença de dois ou mais resíduos de acil ligados a açúcares parece fornecer uma ótima estabilidade de cor em condições neutras (Mazza e Brouillard, 1987). Antocianinas aciladas têm sido, desde então, identificadas em muitas frutas e vegetais incluindo a cebola vermelha, repolho roxo, batatas-roxas, brócolis, cenouras pretas, rabanetes, batatas-doces roxas e uvas (Giusti e Wrolstadt, 2003; Stintzing e Carle, 2004; Pliszka *et al.*, 2009). Sua estabilidade aumentada os torna muito atrativos como colorantes de alimentos. Terahara *et al.* (2004) identificaram quatro antocianinas aciladas nos calos induzidos de batatas-doces roxas (*Ipomoea batatas* L.) estocadas. Todos exibiram alta estabilidade em pH neutro assim como maior capacidade para remoção de radicais, testada com DPPH, quando comparadas com as antocianinas não aciladas correspondentes.

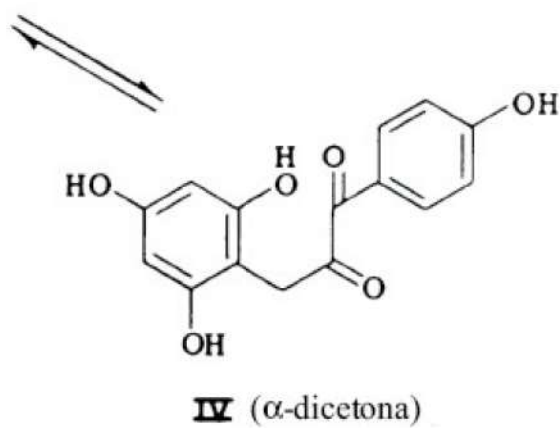
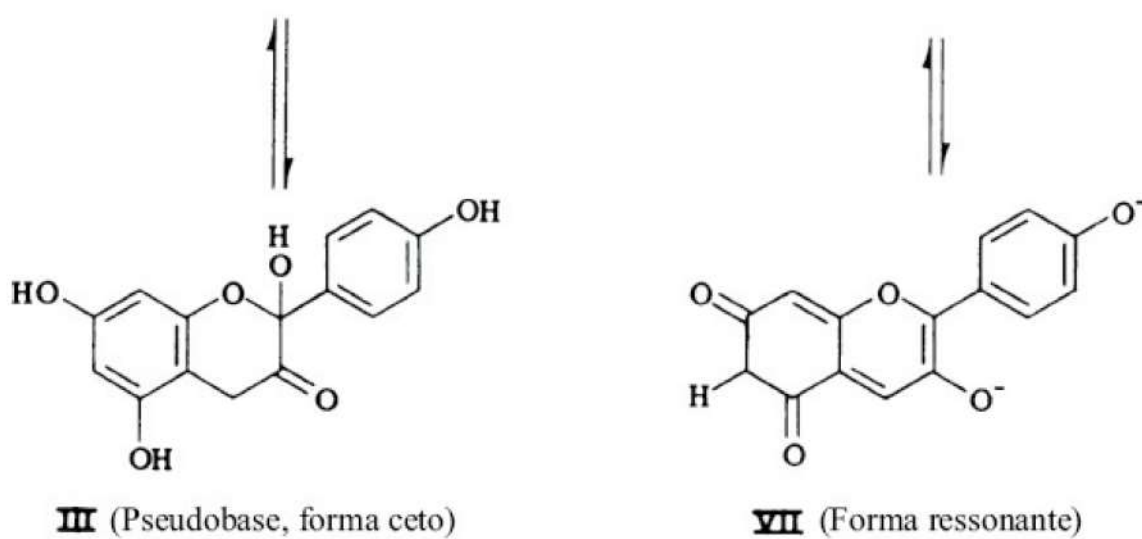
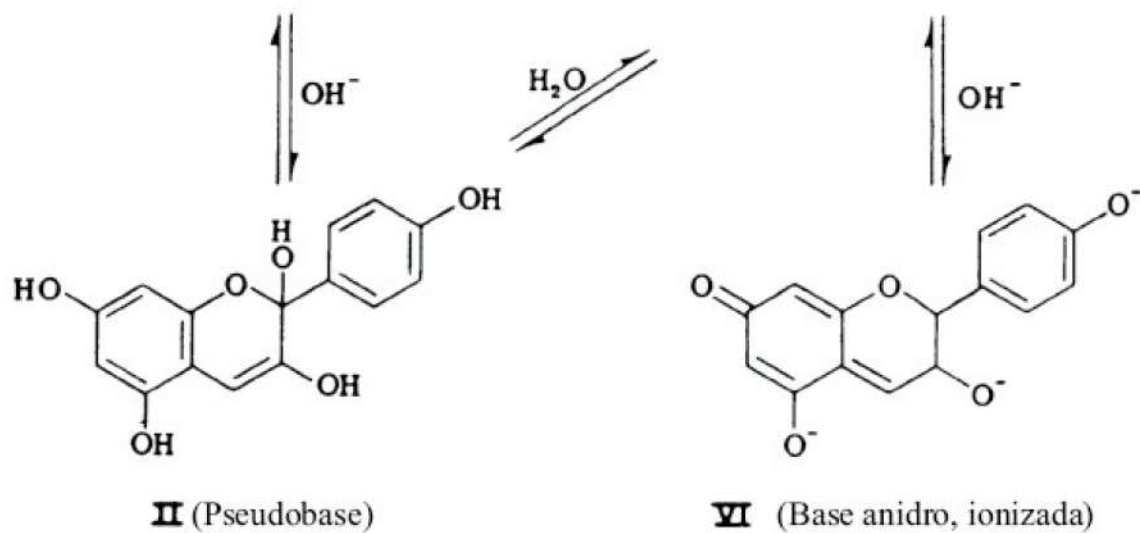
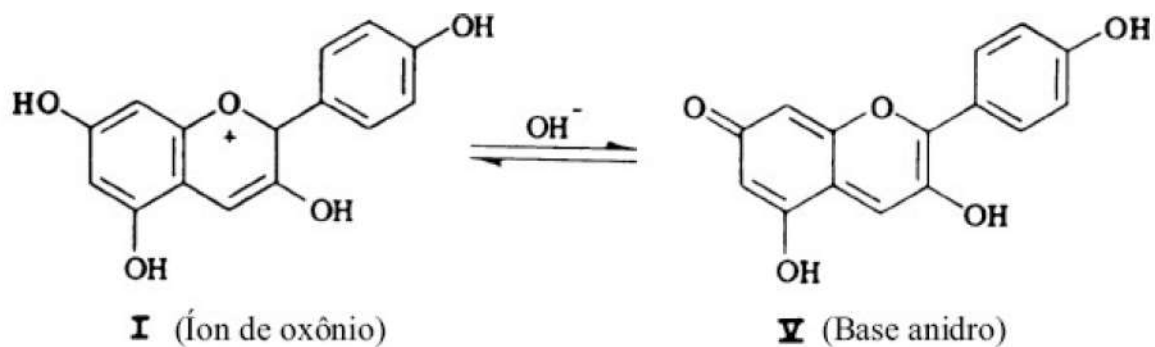
O efeito do pH na coloração das antocianinas é bem conhecido. Harper (1968) demonstrou que o cloreto de perlargonidina é bastante estável na faixa de pH 1-3 e é encontrado como íon de oxônio vermelho-intenso (I). À medida que o pH aumenta em direção à neutralidade, foi observada uma perda da cor vermelha decorrente da formação de uma pseudobase sem cor (II), que fica em equilíbrio com sua forma ceto (III). Esta última, por sua vez, sofre abertura do anel formando α -dicetona (IV), na faixa de pH 3-7. Acima de pH 7, a base de anidro (V) passa a predominar, produzindo uma cor púrpura que rapidamente se descolore abaixo de pH 7 pela formação da pseudobase (II) e α -dicetona. Ao aumentar o pH para condições mais alcalinas a cor púrpura altera-se de malva para azul como consequência da formação de base anidro ionizado (VI). A formação de um precipitado marrom deve-se à degradação da cetona, responsável pela descoloração de frutas que contêm antocianina durante estocagem prolongada (Esquema 2.18).

Gonnet (1998), porém, demonstrou que variações espectrais para descrever as mudanças de coloração em soluções de antocianina, quando afetadas por pH, devem incluir a curva espectral inteira e não somente o seu λ_{max} visível. A descrição da coloração deve incluir também três estímulos de cor que são atributos do tom, saturação e luminosidade. Enquanto a escala CIELAB tem sido descrita com uma ampla escala de cores, sucos, extratos e flores, além de algumas antocianinas puras, Torskangerpoll e Anderson (2005) notaram que nenhum trabalho tinha sido realizado sobre a variação da coloração durante as estocagens prolongadas de antocianinas em toda a escala de pH. Esses pesquisadores estudaram, por exemplo, o efeito da substituição 5-glicosídica e acilação aromática na estrutura da antocianina, na estabilidade da cor depois de 98 dias de estocagem a 10°C, na faixa de pH de 1,1-10,5. Nessas condições, três pigmentos da antocianina foram analisados: a cianidina 3-glicosídeo, a cianidina-3-(2'-glucosilglucosídeo)-5-glicosídeo e cianidina-3-(2'-(2'-sinapoilglucosil)-6'-sinapoilglucosídeo)-5-glicosídeo. Os autores confirmaram a importância da estrutura na determinação das propriedades das antocianinas, uma vez que a antocianina acilada demonstrou ter maior estabilidade em todos os valores de pH exceto em pH 1,1 e em condições mais alcalinas. Com pH 1,1 todos os pigmentos mantiveram a coloração durante o armazenamento, enquanto todos apresentaram grandes alterações na coloração quando sujeitos a condições mais alcalinas.

VI. TEXTURA

A textura de frutas e vegetais depende da estrutura e organização da parede celular das plantas e das substâncias de

cimentação intercelular (Eskin, 1979). A arquitetura da parede da célula foi estudada por muitos pesquisadores e os resultados sugerem que ela é composta por fibrilas de celulose localizadas em uma matriz de substâncias pécicas, hemicelulose, proteínas, ligninas, solutos de baixa massa molecular e água (Van Buren, 1979). Em plantas comestíveis a parede primária da célula é de interesse vital uma vez que a parede celular secundária está virtualmente ausente nas frutas maduras (Nelmes e Preston, 1968). De fato, a parede celular primária fornece a maior parte das fibras de nossa alimentação (Jarvis, 2011). Durante a maturação das frutas, a perda de textura resulta da deterioração dos constituintes da parede celular primária. Tal fato contrasta fortemente com a maturação dos vegetais, que é acompanhada por um endurecimento dos tecidos. Este fenômeno descoberto nos vegetais ocorre por causa do desenvolvimento da parede celular secundária nos vegetais, o que contribui para uma textura mais dura e fibrosa em consequência da deposição de linhina.



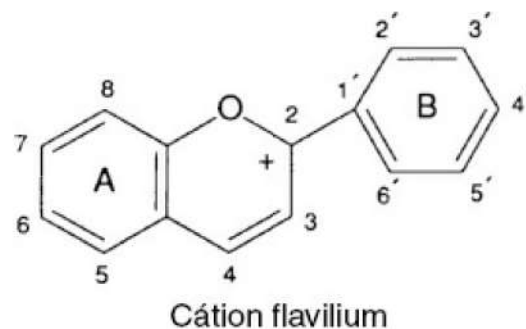
A. Parede celular

As paredes celulares das plantas são compostas, principalmente, por carboidratos complexos (Northcote, 1963; Jarvis, 2011). A presença de uma fração de proteína foi descoberta posteriormente na parede celular primária nas plantas (Lampart, 1965). Pela complexidade da parede celular, vários modelos foram propostos, incluindo o primeiro modelo completo, o de Keegstra *et al.* (1973). Esses modelos tendem a levantar mais questões do que respostas, na medida em que nenhum descreve a estrutura da parede celular adequadamente. A abordagem geral tem sido obter fragmentos hidrolisados, caracterizá-los e reconstruir os fragmentos individuais. Pesquisas anteriores sugeriam que proteínas ricas em hidroxiprolina estão ligadas covalentemente às substâncias pécticas pela fração de hemicelulose xiloglucana (Hayashi, 1989). Desde então, três famílias principais que incluem glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas (HRGPs) foram identificadas (Kieliszewski e Shpak, 2001). Alterações da textura que ocorrem durante a maturação das frutas são consequência, principalmente, de alterações enzimáticas na arquitetura da parede celular. A substância mais afetada é a lamela média, um cimento intercelular existente entre as células adjacentes da parede celular primária e que é particularmente rica em substâncias pécticas.

1. Componentes da parede celular

a. Polissacarídeos

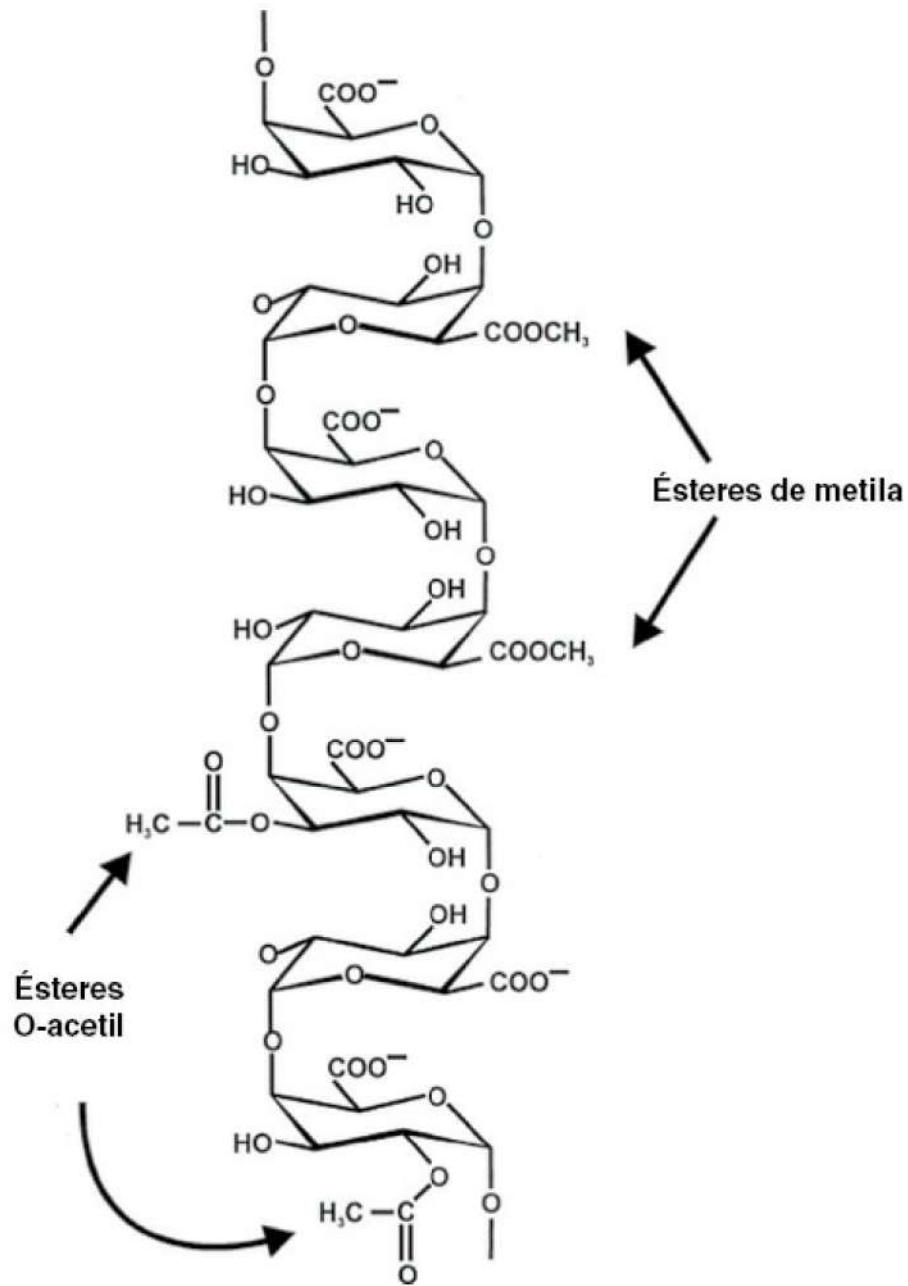
Um constituinte importante da parede celular primária de plantas superiores é a celulose. Está presente como agregado linear ou microfibrilas de aproximadamente 36 cadeias de β -1,4-glucanas de cerca de 3 nm de diâmetro (Somerville, 2006). As cadeias individuais são mantidas juntas por pontes de hidrogênio através de grupos de hidroxil do carbono-6 de uma cadeia de celulose com oxigênios glicosídicos das cadeias adjacentes (Northcote, 1972). No interior das microfibrilas há regiões altamente organizadas ou cristalinas assim como algumas regiões amorfas. A celulose serve como um esqueleto que liga outros componentes da parede celular (Lerouxel *et al.*, 2006). Para o aprofundamento sobre a estrutura da celulose e da biossíntese recomendam-se as seguintes revisões: Doblin *et al.* (2003); Hayashi *et al.* (2005); Saxena e Brown (2005) e Joshi e Mansfield (2007).



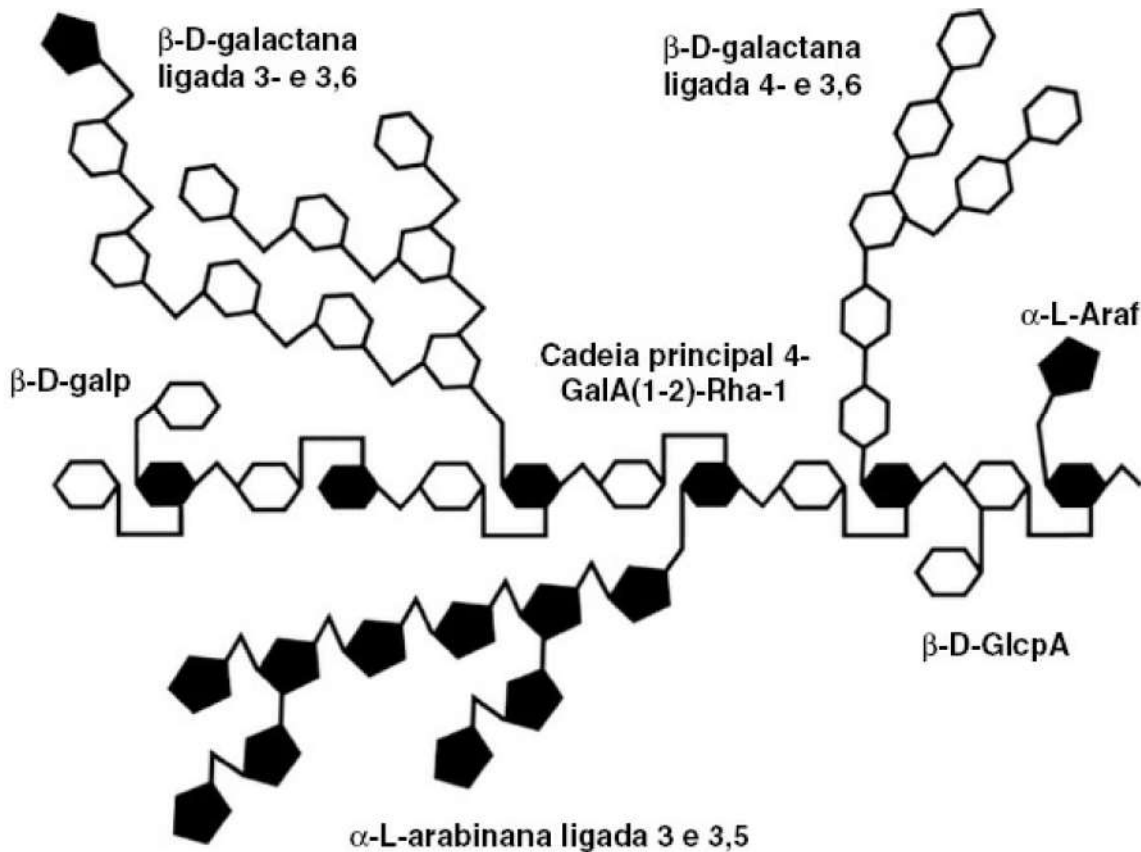
b. Substâncias pécticas

As substâncias pécticas constituem um terço das substâncias secas da parede celular primária de frutas e vegetais (Van Buren, 1979). Trata-se de polissacarídeos complexos que incluem os domínios da homogalacturona (HG) e da ramnogalacturona I (RG-I) contendo também pequena quantidade de ramnogalacturona II (RG-II) (Lerouxel *et al.*, 2006). A estrutura básica da HG, que é responsável por mais de 60% das pectinas das paredes das células, consiste em um polímero de ácido α -1,4-d-galaturônico no qual alguns dos grupos de carboxila são esterificados

por metila (Esquema 2.19) (Ridley *et al.*, 2001). Em algumas plantas a HG pode ser composta parcialmente de O-acetilado no O₂ e O₃ (Ishii, 1995, 1997). A HG é ligada covalentemente a RG-I e RG-II e foi sugerido como hipótese de que é unida por ligações covalentes cruzadas à fração de hemiceluloses, a xiloglucana (XG) (Popper e Fry, 2008).



ESQUEMA 2.19 Estrutura primária da homogalacturona. Ridley *et al.* (2001).



ESQUEMA 2.20 Modelo das características estruturais da ramnogalacturona I. Ridley *et al.* (2001).

A parede celular da batata é rica em HG, que é especialmente densa na lamela média (Bush, 2001). A HG das paredes celulares de tomates e mangas parece conter cerca de 35% e 52% de ácido urônico, respectivamente (Muda *et al.*, 1995). O RG-1 é composto de uma cadeia principal de dissacarídeos repetidos nos quais os resíduos de GalpA podem ser acetilados no C2 e/ou C3 (Komalavilas e Mort, 1989) (Esquema 2.20).

A RG-II é, em termos estruturais, muito diferente, com uma cadeia principal de $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-d-GalpA-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-l-Rhap-(1}\rightarrow]$ (O'Neill *et al.*, 1990) (Esquema 2.21). Para uma descrição mais detalhada das pectinas, recomendam-se as revisões de Ridley *et al.* (2001) e de Caffall e Mohnen (2009).

c. Hemicelulose

Hemiceluloses, o terceiro grupo heterogêneo de polissacarídeos das paredes celulares das plantas, possuem, todas, cadeia principal do $\beta\text{-(1}\rightarrow 4)$ com uma configuração equatorial (Scheller e Ulvskov, 2010). Os grupos principais presentes em todas as plantas terrestres incluem xiloglucana, xilanas, mananas, glucomananase $\beta\text{-(1}\rightarrow 3,1\rightarrow 4)\text{-glucanas}$. Há algum tempo as galactanas, arabinanas e arabinogalactanas eram também consideradas hemiceluloses. Contudo, Scheller e Ulvskov (2010) apontaram para o fato de que parecem ser parte de moléculas de pectinas e não ter ligações $\beta\text{-(1}\rightarrow 4)$ na estrutura da cadeia principal. A xiloglucana, a principal hemicelulose da paredecelular primária, é um polissacarídeo neutro composto por uma cadeia principal de $\beta\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-d-glicose}$ com cadeias laterais ricas de $\alpha\text{-d-xilose}$, $\beta\text{-d-gulactose}$ e, ocasionalmente, alguns resíduos de $\alpha\text{-fucose}$ (Popper e Fry, 2008). Para mais detalhes das hemiceluloses, recomenda-se o artigo de revisão de Scheller e Uvskov (2010).

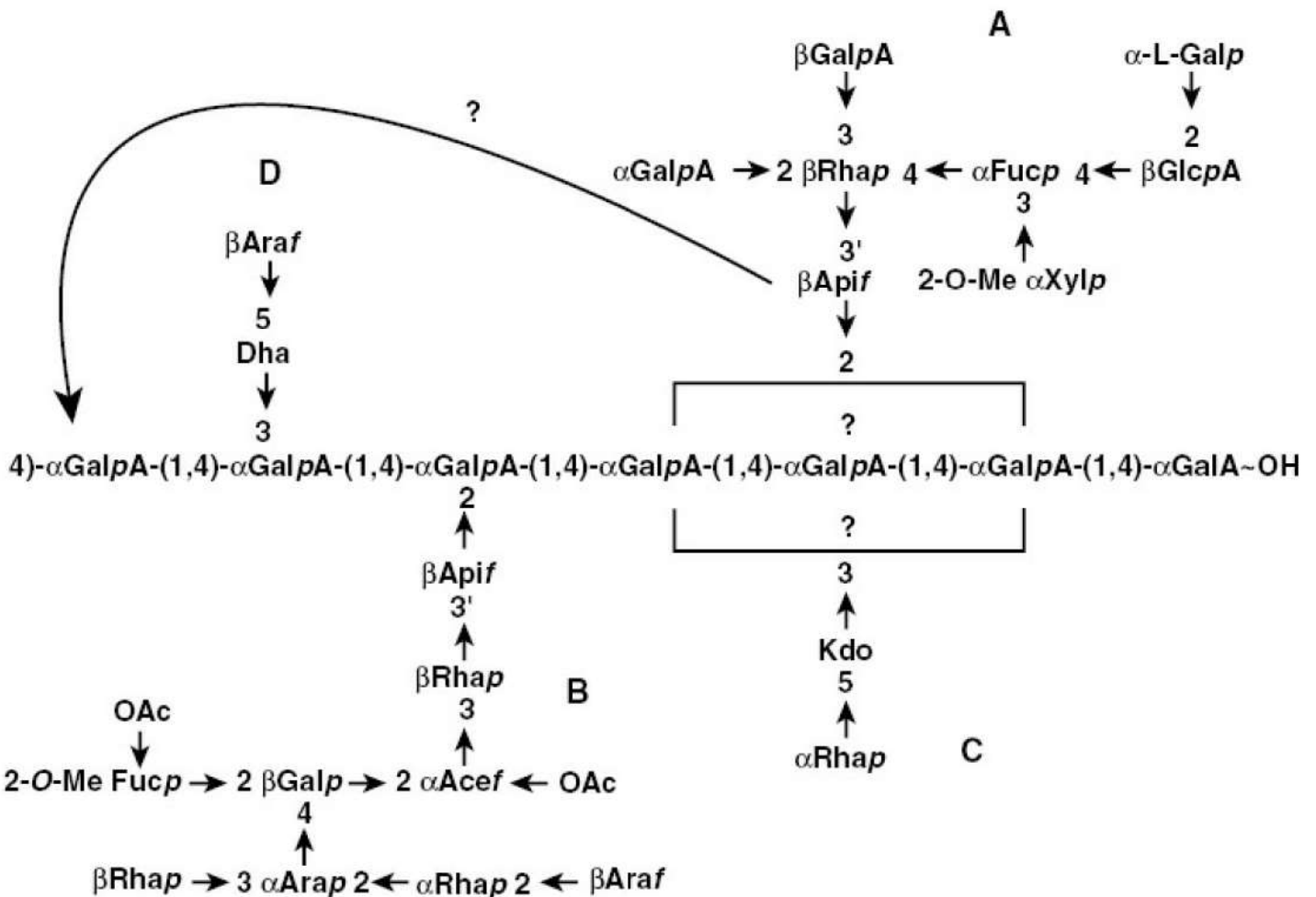
d. Proteínas

As proteínas identificadas na parede celular primária das plantas incluem aquelas ricas em hidroxiprolina. Essa família de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (HRGPs) inclui três grupos principais, as proteínas ricas em

prolina levemente arabinosiladas encontradas com alta frequência e periodicamente (PRPs), as extensinas altamente arabinosiladas encontradas periodicamente e as proteínas arabinogalactana altamente glicosilada, encontradas com menor periodicidade (Kieliszewski e Shpak, 2001). Além de proteínas ricas em hidroxil-prolina e extensina, um terceiro grupo de proteínas foi identificado nas paredes das células das plantas. São as proteínas ricas em glicinas que também fazem parte dos componentes estruturais da parede celular das plantas (Ringli *et al.*, 2001). Uma abordagem proteômica das proteínas da parede celular das plantas foi descrita por Jamet *et al.* (2006).

e. Lignina

A lignina inclui um grande grupo de polímeros aromáticos produzidos por meio do acoplamento oxidativo de 4-hidroxifenilpropanoides (C₆-C₃) (Boerjan *et al.*, 2003; Ralph *et al.*, 2004). Esses polímeros estão principalmente depositados na parede celular secundária e fornecem força mecânica à parede celular da planta. São responsáveis pelo endurecimento de vegetais como o aipo e o aspargo (Segerlind e Herner, 1972; Herner, 1973). Para mais detalhes sobre a lignina recomenda-se uma revisão recente de Vanholme *et al.* (2010).



ESQUEMA 2.21 Estrutura primária da ramnogalacturona II. Ridley *et al.* (2001).

f. Biossíntese da parede da célula

Progressos consideráveis foram feitos nas últimas duas décadas sobre a biossíntese dos polissacarídeos complexos e sua deposição na parede da célula das plantas (Lerouxel *et al.*, 2006; Joshi e Mansfield, 2007; Caffall e Mohnen, 2009). Apesar de ainda haver lacunas no conhecimento, temos uma compreensão muito maior de sua regulação (Zhong e Ye, 2007).

A biossíntese das pectinas ocorre no complexo de Golgi, uma organela composta de diversas vesículas achatadas contendo proteínas. O modelo atual da biossíntese das pectinas sugere que açúcares-nucleotídeos são sintetizados no lado citosólico do complexo de Golgi e transportados para o lúmen do complexo por proteínas transportadoras que se estendem pelas membranas ou alternativamente são sintetizadas no lúmen do complexo de Golgi (Scheller *et al.*, 1999; Scheible e Pauly, 2004; Mohnen, 2008; Mohnen *et al.*, 2008). Atividades múltiplas são necessárias para a biossíntese completa da HG, RG-I e RG-II, com envolvimento de muitas glicosiltransferases (GT) (Scheller *et al.*, 1999; Moyne *et al.*, 1999, 2008). Por exemplo, a síntese completa da HG requer vários catalisadores específicos α -1,4-GalAT (HG:GalAT), para transferir d-GalA a partir de UDP-d-GalA para o aumento do polímero HG (Caffall e Mohnen, 2010). O HG:GalAT foi encontrado em tomates e nabos (Lin *et al.*, 1966; Bolwell e Northcote, 1983), ervilhas (Sterling *et al.*, 2001) e abóboras (Ishii, 2002).

Depois de formado, o GHHG pode ser modificado pela adição de grupo metil ao grupo carboxilado C6 ou acetil no O2 e O3 dos resíduos de GalA (Willats *et al.*, 2001). As pectina metiltransferases (PMTs) em seguida agem especificamente nos polissacarídeos pécticos no complexo de Golgi transferindo um grupo metil a partir do doador S-adenosil-metionina (SAM) (Villemez *et al.*, 1966; Kauss *et al.*, 1967; Bruyant-Vannier *et al.*, 1996) e liberando-o na forma altamente metilesterificada (Li *et al.*, 1997; Lennon e Lord, 2001). Múltiplas enzimas PMT são necessárias para a síntese da pectina, uma vez que diferentes isoformas foram descobertas, cada uma delas com pH ótimo de atividade e especificidade quanto ao substrato (Krupkova *et al.*, 2007). Recomenda-se, para um aprofundamento sobre a biossíntese da RG-I e RG-II, o artigo de Caffall e Mohnen (2009).

A biossíntese da glucana do tipo celulose (1 \rightarrow 4) envolve várias enzimas do citosol e enzimas ligadas a membranas que produzem, principalmente, UDP-glicose. Estas últimas fornecem o principal substrato para a celulose sintase (Carpita e McCann, 2000). Foram encontradas duas vias que produzem diretamente a UDP-glicose (Joshi e Mansfield, 2007). Na primeira via, a sacarose é clivada pela sacarose sintase, liberando UDP-glicose e frutose. A segunda via é muito mais dependente do acúmulo hexose fosfato com UDP-glicose pirofosforilase (UGPase) fosforilando a glicose 1-fosfato. Existe uma alternativa, um caminho indireto para a produção de UDP-glicose por meio da hidrólise da sacarose pela invertase. Independentemente de como a UDP-glicose é produzida, ela é em seguida utilizada pela glicosiltransferase para formar o polímero de celulose. Esta enzima é conhecida pela capacidade de inversão, já que o resíduo de glicosil na UDP-glicose está na configuração α , que deve ser convertida para ligação β , exclusiva da celulose (Guerriero *et al.*, 2010). Um grande progresso no entendimento da biossíntese da parede celular foi a identificação dos genes que codificam a celulose sintase (*Ces*) na fibra de algodão (Pear *et al.*, 1996; Delmer, 1999). A celulase sintase (*Ces*) foi identificada, em seguida, em outras plantas superiores. Recomendam-se, para um aprofundamento da biossíntese da celulose, incluindo a formação das microfibrilas, os seguintes artigos de revisão: Lerouxel *et al.* (2006), Joshi e Mansfield (2007) e Guerriero *et al.* (2010).

2. Degradação da parede celular

O amolecimento das frutas durante a maturação é atribuído a alterações na pectina (Kertesz, 1951; Hobson, 1967; Tavakoli e Wiley, 1968; Pressey *et al.*, 1971). Isto é caracterizado por um declínio do teor da pectina insolúvel (protopectina) com um aumento concomitante das substâncias pécticas solúveis (Ben-Arie *et al.*, 1979). Protopectina é o nome genérico atribuído às substâncias da pectina de alta massa molecular insolúvel à água em frutas imaturas. Pouco se sabe sobre este polímero além do fato de sua hidrólise liberar, durante a maturação, poliuronídeos solúveis, pectinas e ácidos pectínicos (Worth, 1967; Eskin, 1979; John e Dey, 1986). Esses ácidos são polímeros ácidos poligalaturônicos que variam em seu grau de metilação. O material péctico localizado na lamela média é muito diferente daquele encontrado na parede celular primária e consiste em substâncias pécticas em estado livre ou como pectato de cálcio correspondentes (Eskin, 1979). A degradação da pectina solúvel fracamente ligada é responsável pelo amolecimento das frutas durante a maturação (Doreyappa *et al.*, 2001). As enzimas que

degradam pectinas são classificadas de acordo com seu modo de ação na pectina ou nas substâncias pécnicas e incluem poligalacturonases (PG) (EC 3.2.1.15), pectina metilesterases (PM) (EC 3.1.1.11) e pectina liase e pectatoliase (PL) (EC 4.2.2.2) (Sakai *et al.*, 1993; Wong, 1995; Chauhan, 2001).

a. Poligalacturonases

A poligalacturonase (PG), uma importante glicanase pectolítica, foi inicialmente implicada no amolecimento da fruta durante a maturação (Poovaiah e Nukuya, 1979). É considerada a principal enzima responsável pela dissolução da lamela média durante a maturação (Jackman e Stanley, 1995; Voragen *et al.*, 1995). Uma vez que o substrato preferido dessas enzimas é a d-galacturonana, Rexova-Benkova e Markovic (1976) referem-se a elas como d-galacturonases. Essas enzimas foram encontradas em várias frutas, incluindo pêssegos (Pressey e Avants, 1973a), peras (McCready e McComb, 1954; Pressey e Avants, 1976; Bartley e Knee, 1982) e tomates (Foda, 1957; Patel e Phaff, 1960a, b; Hobson, 1964). A atividade dessas enzimas aumenta durante o processo de maturação, quando hidrolisa material pécnico da lamela média e das paredes celulares (Hobson, 1965; Pressey, 1977). A alteração na atividade de poligalacturonase durante a maturação de pêssegos é ilustrada na Figura 2.10. Pressey *et al.* (1971) verificaram que o aumento na atividade enzimática foi acompanhado por um aumento na pectina solúvel em água e no amolecimento da fruta.

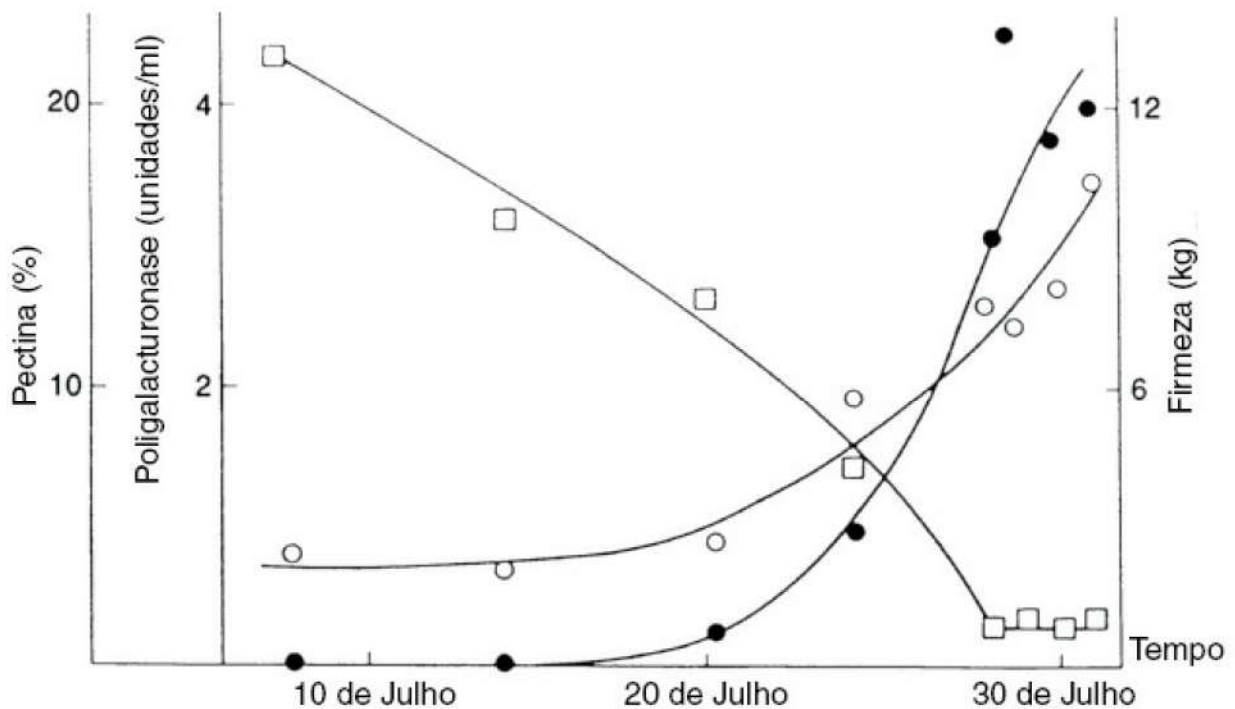
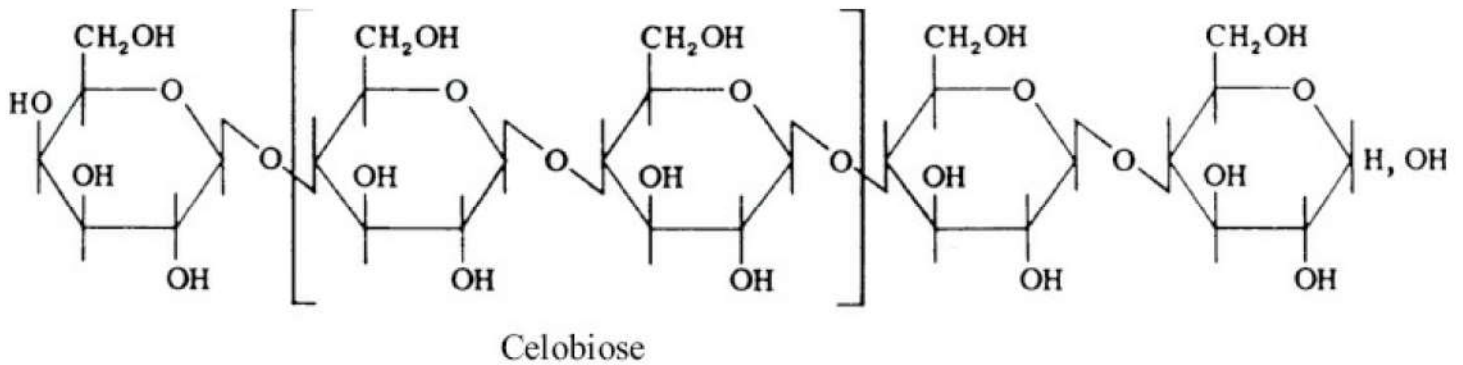
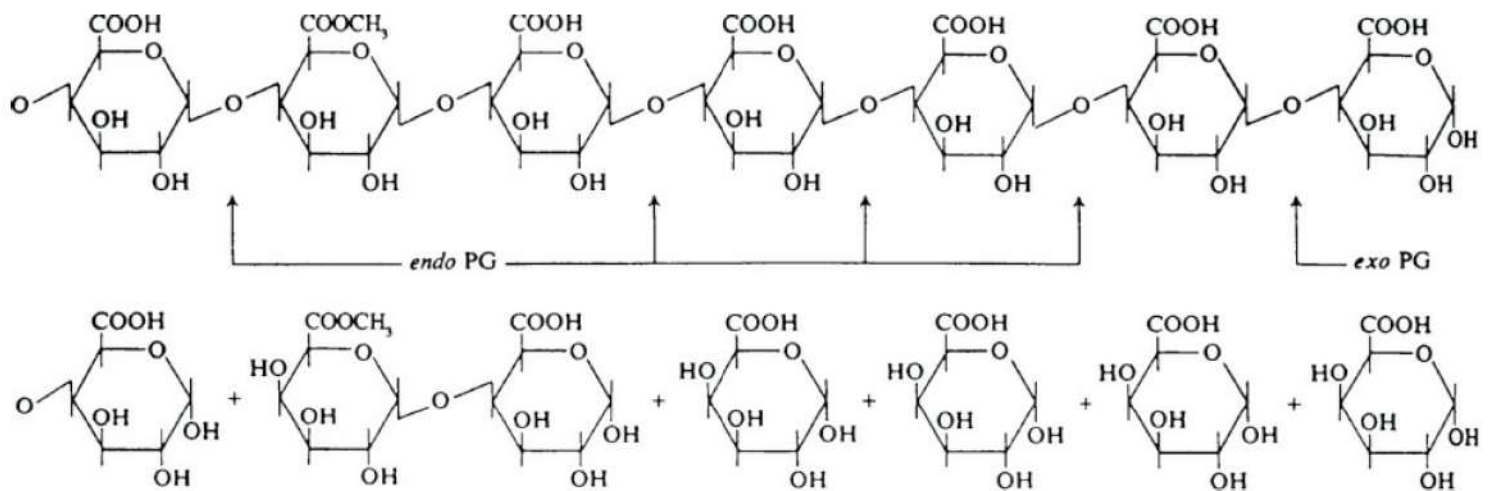


FIGURA 2.10 Alterações na firmeza (□), atividade PGA (●) e pectina solúvel em água (○) em pêssegos Elberta. Pressey *et al.* (1971). Copyright ©: Institute of Food Technologists.

Dois tipos de poligalacturonases ou d-galacturonases foram identificados, o endo e o exo. O primeiro hidrolisa aleatoriamente as ligações glicosídicas na molécula da pectina enquanto a exoenzima atua a partir da extremidade da molécula da pectina (Esquema 2.22). Na presença da endopoligalacturonase, as moléculas de pectina degradam-se rapidamente em unidades menores acompanhadas por uma diminuição significativa de viscosidade. Ambas as formas da enzima são encontradas em peras (Pressey e Avants, 1976; Bartley e Knee, 1982) e pêssegos (Pressey e Avants, 1978). No entanto, algumas espécies de frutas não possuem nenhuma endo-PG detectável, incluindo maçãs (Brackmann *et al.*, 1996; Goulao *et al.*, 2007), morangos (Abeles e Takeda, 1990) e uvas (Nunan *et al.*, 2001). O maior grau de amolecimento reportado por Pressey e Avants (1978) em pêssegos “freestone” se comparados com pêssegos “clingstone” foi atribuído à ausência de endopoligalacturonase na fruta de tipo “clingstone”. A degradação aleatória da pectina pela endopoligalacturonase junto com a exopoligalacturonase solubilizou rapidamente a pectina nos pêssegos “freestone”. A ausência de endopoligalacturonase em pêssegos “clingstone” foi evidenciada pela maior retenção de protopectina durante a maturação.



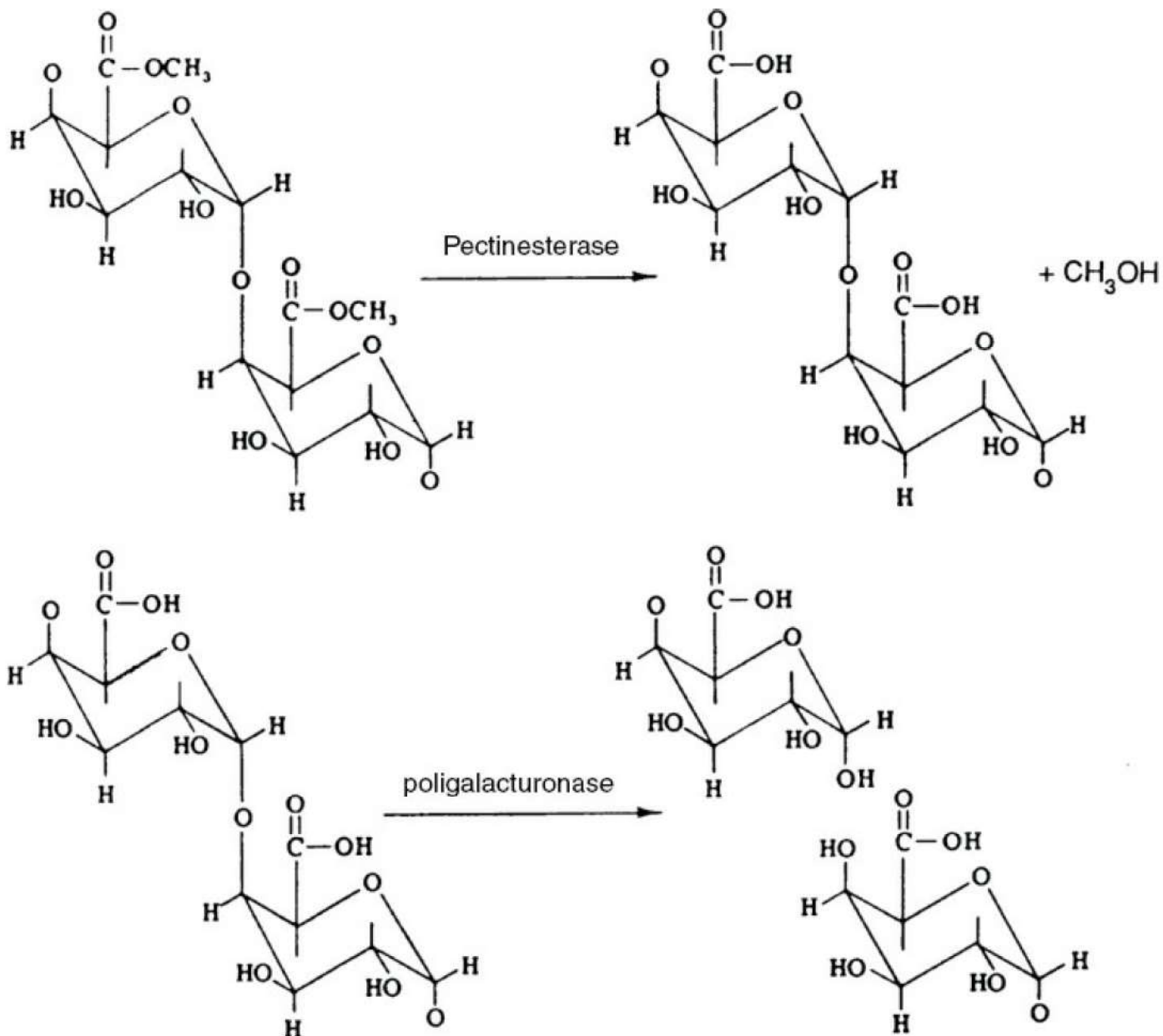
ESQUEMA 2.22 Ação das exo e endogalacturonases.

As exopoligalacturonases (EC 3.2.1.67) foram identificadas em pêssegos (Pressey e Avants, 1973a), peras (Pressey e Avants, 1976), pepinos (Pressey e Avants, 1975; McFeeters *et al.*, 1980) e bananas (Markovic *et al.*, 1975). A exopoligalacturonase é a única d-galacturonase encontrada em maçãs e é responsável pela liberação de ácido galacturônico e poliuronídeos (Bartley, 1978). Estudos usando paredes celulares isoladas de tomates (Wallner e Bloom, 1977; Gross e Wallner, 1979; Themmen *et al.*, 1982) e peras (Ahmed e Labavitch, 1980) demonstraram que as endopoligalacturonases têm papel importante na degradação da pectina durante a maturação. A liberação do polímero solúvel em água (WSP) com massa molecular de 20.000 contendo ácidogalacturônico e ramnose por endopoligalacturonase da parede celular de tomates vermelhos foi relatada por Gross e Wallner (1979) como idêntica ao polímero liberado pela mesma enzima da parede celular de tomates verdes completamente desenvolvidos. Enquanto a atividade de poligalacturonase em tomates vermelhos maduros segue predominantemente a forma endo, é a forma exo que prepondera nas frutas verdes correspondentes (Pressey e Avants, 1973b; Tucker *et al.*, 1980). Apesar de a exopoligalacturonase representar apenas uma pequena fração da atividade de poligalacturonase, foi encontrada durante a maturação de tomates em teores bastante constantes. Pressey (1987) sugeriu, portanto, que é pouco provável que a exopoligalacturonase tenha um papel importante na degradação da pectina, mas pode ter outro papel no crescimento e desenvolvimento do tomate.

As isoenzimas da PG têm sido identificadas em uma vasta gama de frutas incluindo bananas (Pathak e Sanwal, 1998), morangos (Nogota *et al.*, 1993) e pêssegos (Pressey e Avants, 1973a). Duas isoformas de endo-PG, PG₁ e PG₂, foram encontradas em tomates (Pressey e Avants, 1973b). Estudos subsequentes realizados por Tucker *et al.* (1980) sugeriram que a PG₁ é um dímero da PG₂. Trabalhos posteriores de Pressey (1986a; 1986b) propõem que a PG₁ é uma combinação da PG₂ e uma subunidade β.

b. Pectina metil esterase: pectinesterase

Pectina metil esterases (PMs), ou pectinesterases, são amplamente distribuídas em diversas frutas, incluindo bananas (Buescher e Tigchelaar, 1975), pêssegos (Nagel e Patterson, 1967) e morangos (Barnes e Patchett, 1976). Há muita confusão em torno das primeiras pesquisas sobre a PM durante a maturação. Por exemplo, Hultin e Levine (1965) notaram um aumento na atividade da PM durante a maturação de bananas que não foi observada por De Swardt e Maxie (1967) quando estes usaram polivinilpirrolidina (PVP) para remover polifenóis. Brady (1976) também encontrou poucas alterações na atividade da PM em extratos de banana após a adição de 2-mercaptobenzotiazol, potente inibidor da polifenoloxidase da banana. Posteriormente, Awad e Young (1980) verificaram que PVP suprime a atividade da PM, apesar de nenhum efeito inibidor ter sido exercido pelos fenóis endógenos. As PMs não parecem ter papel maior no amolecimento das frutas uma vez que é encontrada em altos teores em frutas não desenvolvidas como tomates e bananas, antes da maturação (Barnes e Patchett, 1976; Brady, 1976; Pressey e Avants, 1982a; Tucker *et al.*, 1982). No caso de abacates, ocorre uma forte queda na atividade de PME imediatamente anterior à maturação, fato que foi relatado como um índice útil da maturidade das frutas (Zauberman e Schiffman-Nadel, 1972). Uma diminuição na atividade da PM da ordem de 50% antes do climatério provou ser um indicador confiável do tempo do amolecimento quando estocado em atmosferas controladas (Barmore e Rouse, 1976). Uma queda de 80% na atividade de PME também foi observada em abacates por Awad e Young (1980).

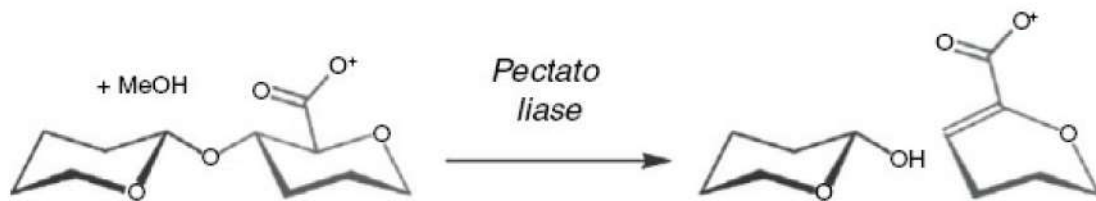


A opinião tradicional sobre a PM é de desesterificação das galacturonas da parede celular seguida pela ação da poligalacturonase. Vários pesquisadores (Dahodwala *et al.*, 1974; Rexova-Benkova e Markovic, 1976) verificaram que a desesterificação das galacturonas aumenta a atividade das endo e exopoligalacturonases. O estímulo das endopoligalacturonases nos tomates pela PM foi relatado por Pressey e Avants (1982b), apesar de tais enzimas serem capazes de hidrolisar substratos de pH 3,5 altamente esterificados. A presença de pectina com altos níveis de metilação durante a maturação de abacates (Dolendo *et al.*, 1966), maçãs (Knee, 1978) e pêssegos (Shewfelt *et al.*, 1971) indica que a PM tem um papel bastante limitado no amolecimento das frutas. Ben-Arie e Sonogo (1980) atribuíram o desenvolvimento da lanosidade em pêssego durante a estocagem refrigerada à inibição da atividade da poligalacturonase e ao aumento da PM. Esse fenômeno foi atribuído à falta de capacidade dos pêssegos de sofrer alterações de textura desejáveis associadas ao desenvolvimento normal. Pesquisas desenvolvidas por von Mollendorff e De Villiers (1988), no entanto, demonstraram que a causa principal da lanosidade nos pêssegos é o súbito aumento no teor de poligalacturonase, enquanto o papel do PME não foi esclarecido. Apesar disso, a causa da lanosidade nos pêssegos continua confusa, já que algumas pesquisas a associaram com o aumento na atividade da PM (Brummell *et al.*, 2004; Girardi *et al.*, 2005), com uma diminuição da atividade da PM (Buescher e Furmanski, 1978; Ben-Arie e Sonogo, 1980) ou ainda com a falta de expressão da PM (Obeland e Carroll, 2000; Zhou *et al.*, 2000).

Esses debates evidenciam que o amolecimento das frutas ocorre por causa de alterações na composição da parede celular das frutas, mediadas pela atividade combinada das poligalacturonases e da PME. Isto resulta na liberação de poliuronídeo solúvel aliada à diminuição da massa molecular do polímero de poliuronídeo (Gross e Wallner, 1979; Huber, 1983; Seymour *et al.*, 1987a). A ação da poligalacturonase, como já discutido previamente, pode ser limitada às regiões demetiladas da poligalacturona, que ocorre pela ação da PM. A produção estimulada de poliuronídeos foi reportada por Pressey e Avants (1982b) em paredes celulares isoladas de tomates verdes completamente desenvolvidos, quando na presença de PME. Seymour *et al.* (1987a), utilizando preparações de parede celular com as enzimas inativadas com o objetivo de eliminar o efeito de quaisquer enzimas endógenas, descobriram que a separação do poliuronídeo foi muito mais baixa *in vivo* do que *in vitro*. O fato de a pectina não ter sido completamente desesterificada, apesar dos altos teores de PM, sugerem que essa enzima pode ficar restrita quando *in vivo*. Estudos posteriores por Seymour *et al.* (1987b) em tomates também evidenciaram baixa solubilização dos poliuronídeos *in vivo*, fato que foi atribuído à restrição da ação da PM. A liberação de oligômeros de dois tamanhos, junto com ácido galacturônico, sugere que a ação pectolítica combinada não foi completamente aleatória. Esses pesquisadores indicaram a importância da identificação de tais oligômeros *in vivo* depois da descoberta recente de elicitadores na parede celular.

c. Liase péctica

A liase péctica (PL), a [poli(1,4- α -Dgalacturonídeo) liase EC 4.2.2.1] rompe as unidades de galacturonato desesterificadas ou esterificadas de pectina pela β -transeliminação do hidrogênio nas posições C4 e C5 do ácido galacturônico (Prasanna *et al.*, 2007). Apesar de haver formas de PL exo e endo, a maior parte das enzimas estudadas é do tipo endo, que age aleatoriamente (Wong, 1995).

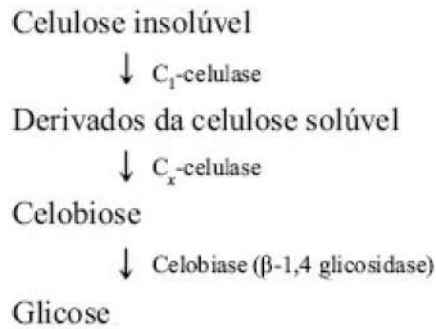


Adaptado de Gilbert *et al.* (2008)

O gene da pectato liase foi isolado de morangos maduros e foi considerado o causador da degradação da pectina e da perda da firmeza das frutas (Medina-Escobar *et al.*, 1997). Utilizando morangos transgênicos, Jimenez-Bermudez *et al.* (2002) manipularam o amolecimento por meio da expressão antisense do gene da pectato liase. Os resultados indicaram que o amolecimento rápido dos morangos pode ser retardado com o gene da pectato liase. Pesquisas recentes feitas por Payasi e Sanwal (2003) demonstraram a atividade da pectato liase na maturação das bananas. Uma purificação posterior da liase pectato por Payasi *et al.* (2008) mostrou que Mg^{2+} , além de Ca^{2+} é requerido para atividade máxima da enzima.

d. Celulase

A degradação da celulose também ocorre durante a maturação de tomates (Babbitt *et al.*, 1973; Pharr e Dickinson, 1973; Sobotka e Stelzig, 1974), morangos (Barnes e Patchett, 1976), abacates (Pesis *et al.*, 1978; Awad e Young, 1980) e pera japonesa (Yamaki e Kakiuchi, 1979). A enzima envolvida, a celulase, é composta por várias enzimas distintas conhecidas como “complexo de celulase” (King e Vessal, 1969). Estas incluem C_1 -celulase, C_x -celulase, celobiase e exocelulase, que, juntas, catalisam a degradação da celulose, detalhada a seguir:



A degradação da celulose insolúvel para derivados solúveis não é bem conhecida, mas parece envolver C₁-celulase. A quebra da celulose solúvel é mediada por C_x-celulase, também conhecida pelo nome de 1,4-glucana-4-glucanohidrolase, que rompe, aleatoriamente, as ligações internas da cadeia de celulose. Relatos conflitantes na literatura sugerem que a atividade da celulase estava ausente ou presente em níveis mínimos em frutas imaturas, enquanto outros pesquisadores encontraram atividade de celulase em frutas do tomate imaturas (Hobson, 1968; Babbitt *et al.*, 1973). Informações sobre o complexo de celulase derivam quase exclusivamente de estudos sobre a celulase microbiana. A primeira pesquisa a identificar um complexo similar em plantas foi a de Sobotka e Stelzig (1974), que purificaram parcialmente quatro frações de celulase de tomates utilizando fracionamento de sulfato de amônio. Esses pesquisadores identificaram C₁-celulase, C₁-celulase, β-glicosidase e celobiase como o primeiro complexo de celulase capaz de degradar completamente a celulose insolúvel em plantas. Pharr e Dickinson (1973) não conseguiram identificar uma enzima na fruta do tomate que possa degradar celulose insolúvel, apesar de terem relatado a presença de C_x-celulase (EC 3.2.1.4) e de celobiase (EC 3.2.1.21). A presença de um complexo de celulase em plantas ainda precisa ser comprovada.

O papel da celulase no amolecimento de frutas ainda é parcialmente especulativo. A única prova direta quanto ao envolvimento da celulase foi reportada por Babbitt *et al.* (1973). Os pesquisadores investigaram o efeito dos reguladores de crescimento etefon e ácido giberélico nas atividades da celulase e poligalacturonase na maturação de tomates. A atividade da celulase, na presença de etefon, inicialmente aumentou e depois de seis dias declinou, enquanto a atividade da poligalacturonase aumentou (Figura 2.11). Este fato contrastou com a quase total inibição da atividade de poligalacturonase pelo ácido giberélico enquanto a atividade da celulase continuou a aumentar. O declínio na firmeza geral da fruta do tomate na presença do ácido giberélico sugere haver um papel definido da celulase no amolecimento das frutas. Os pesquisadores propuseram que a celulase inicia o amolecimento das frutas ao degradar as fibrilas da celulose da parede celular, fato que permite às enzimas pécticas penetrar a lamela intermediária. Isto pode explicar a observação de Awad e Young (1979), que relataram que um aumento na atividade da celulase precede aumentos na produção de poligalacturonase e etileno nos abacates em maturação e seu amolecimento subsequente (Figura 2.12).

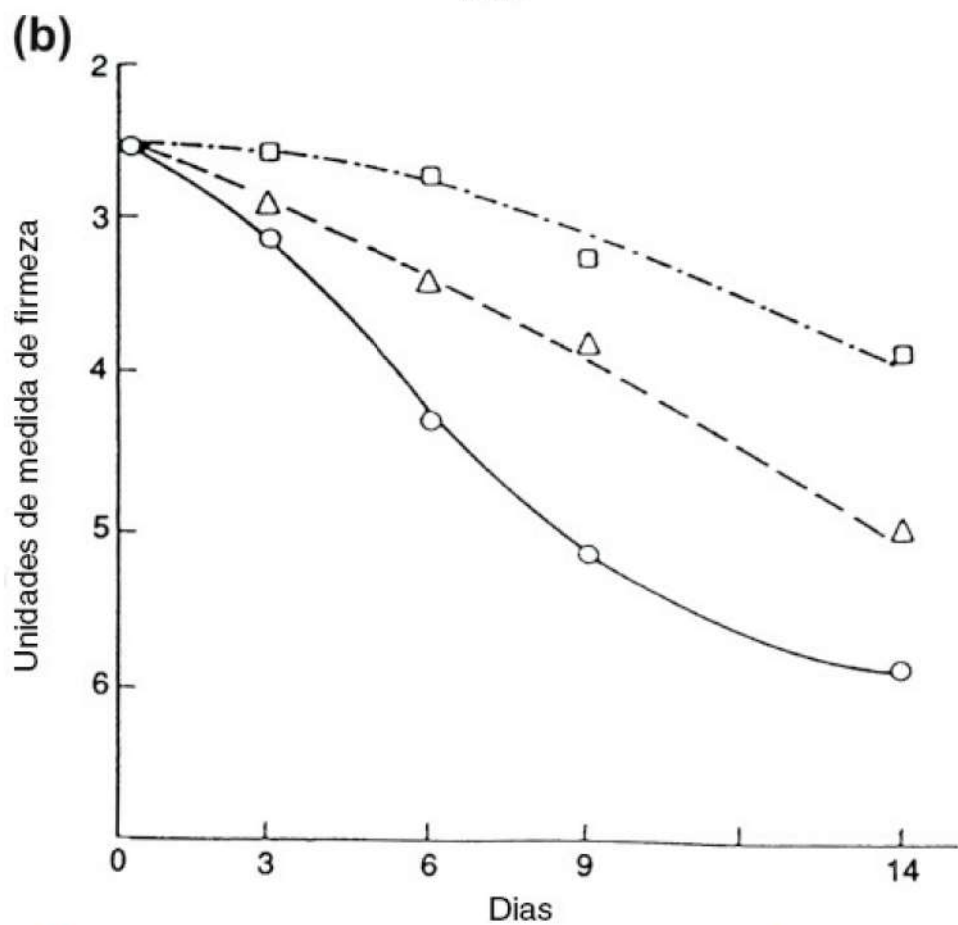
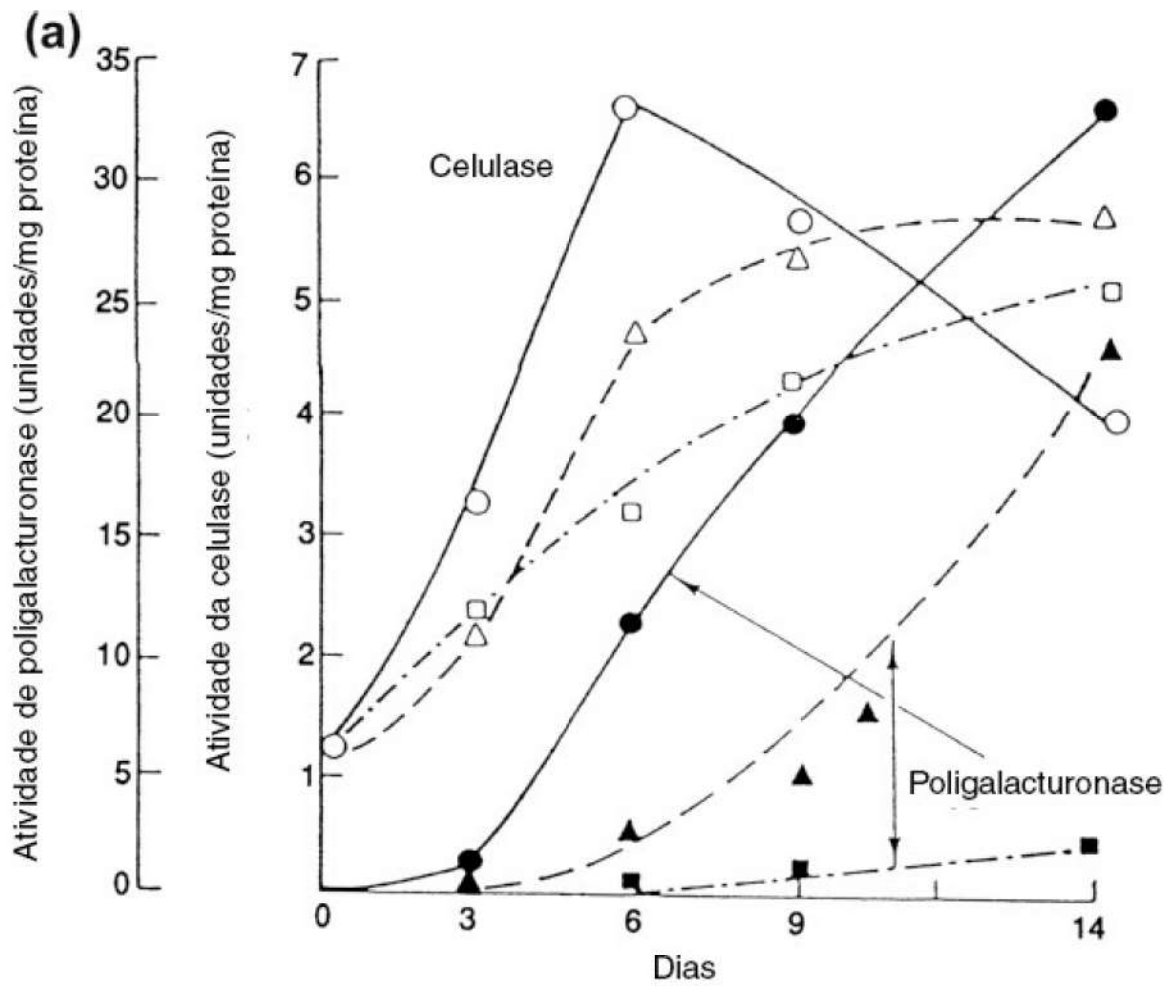


FIGURA 2.11 Efeito de etefon (o) e ácido giberélico (□) nas atividades enzimáticas (a) e firmeza (b) de tomates (Δ, controle). Babbitt *et al.* (1973).

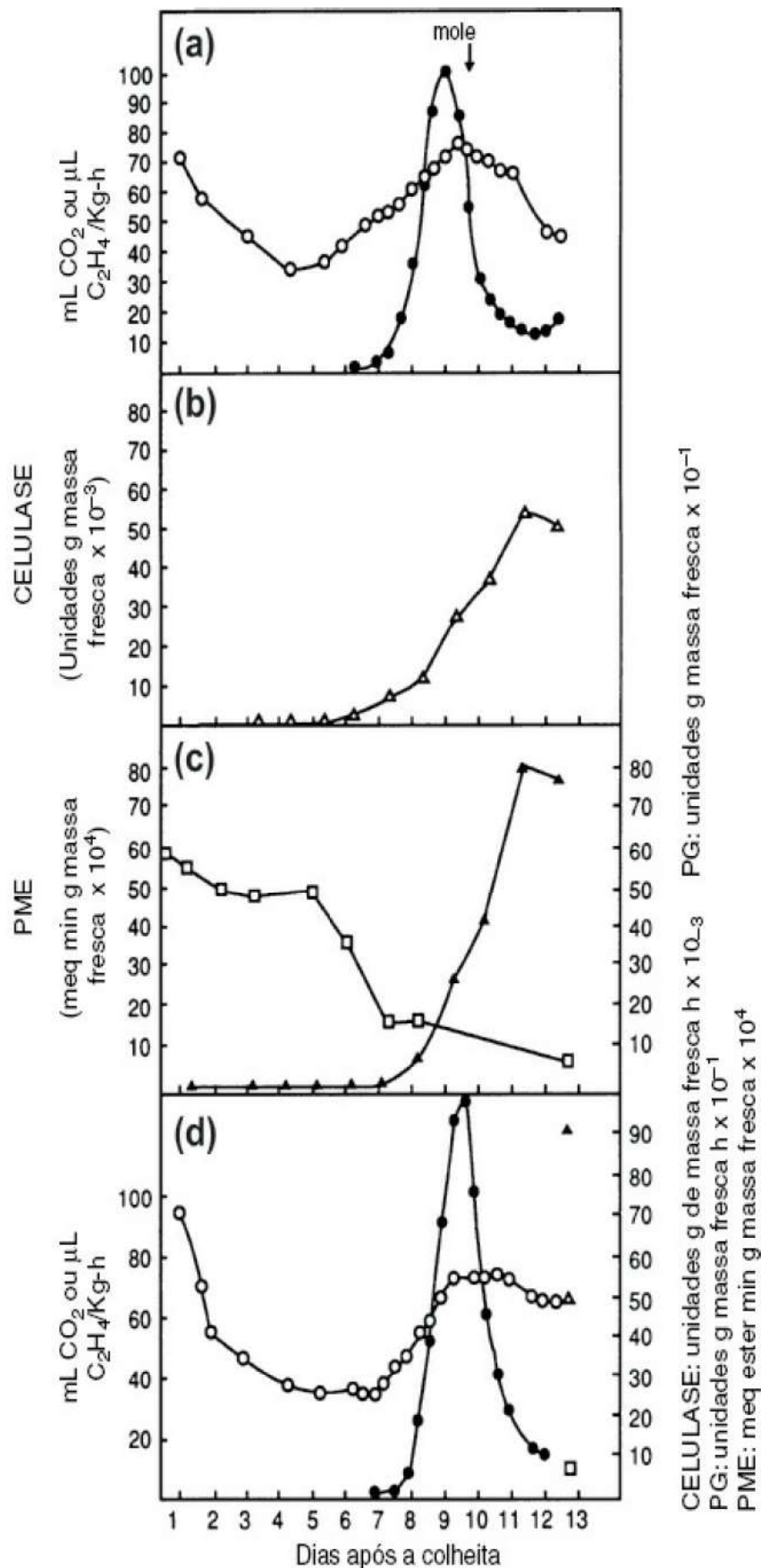


FIGURA 2.12 Tendências na pós-colheita na atividade de celulase (Δ), PG (π) e PME (\square) e na produção de CO_2 (o) e C_2H_4 (•) em um abacate Fuerte. A fruta estava (a) comestível e mole após 9,5 dias e (d) após 10,5 dias. Awad e Young (1979).

Ao utilizar isoeletrofocalização (IEF), Kanellis e Kalaitzis (1992) isolaram múltiplas formas ativas de celulase no mesocarpo de abacates. As celulases foram separadas em 11 formas distintas capazes de degradar carboximetilcelulose (CMC) em géis de CMC-agarose. Sexton *et al.* (1997) localizaram celulases em regiões de

framboesas vermelhas associadas à abscisão, sugerindo que ela possa estar envolvida na separação das frutas assim como no amolecimento.

e. β -Galactosidase

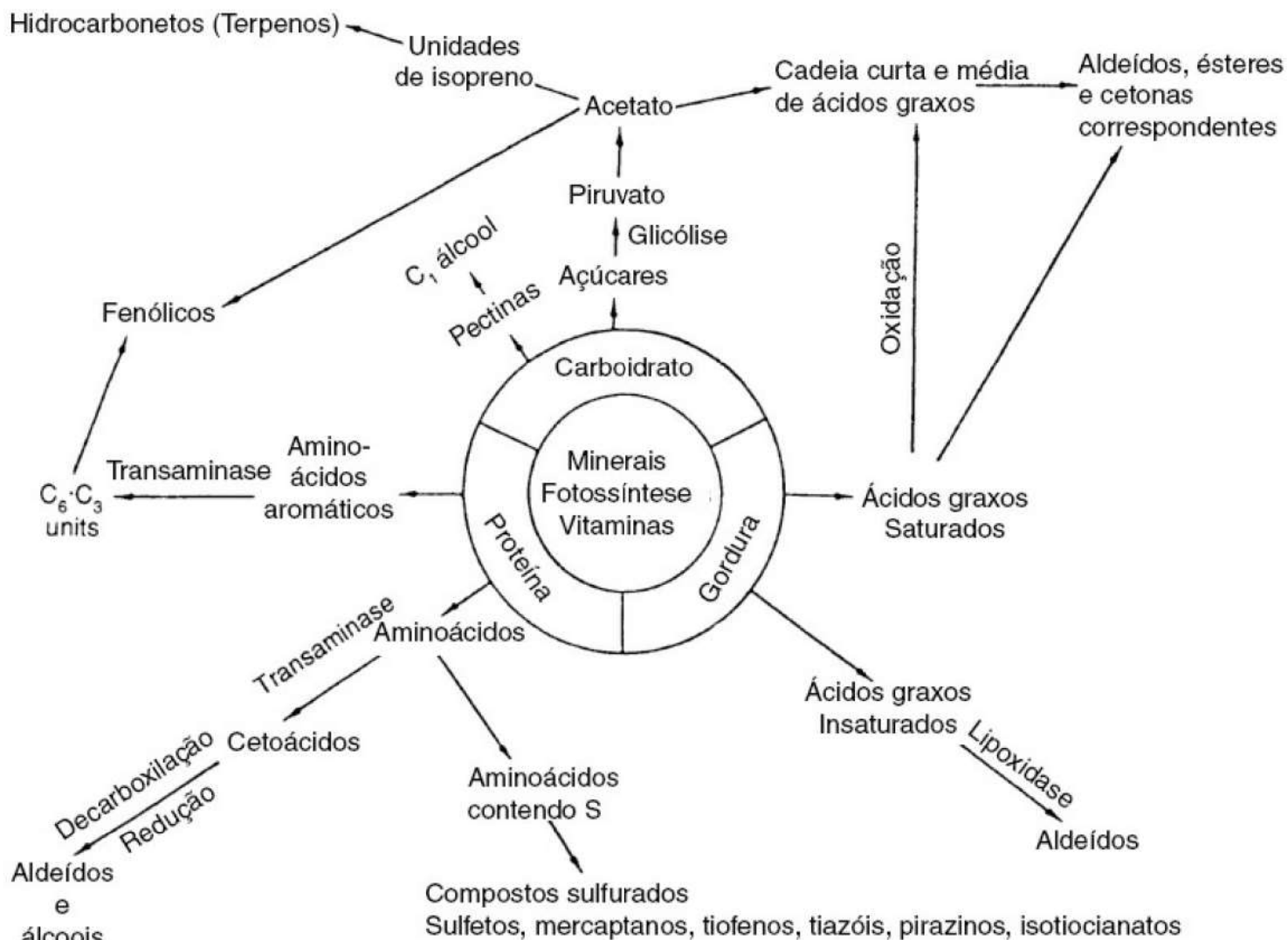
A perda de galactose da parede celular de maçãs, morangos e tomates durante a maturação é resultado da ação da β -galactosidase (EC 3.2.1.23). A atividade aumentada dessa enzima foi correlacionada com a perda da firmeza durante o período de maturação e armazenamento de maçãs (Bartley, 1974; 1978; Wallner, 1978; Berard *et al.*, 1982). Evidência disso foi o declínio no conteúdo de galactose do córtex da parede celular de maçãs (Knee, 1973), o aumento do conteúdo de poliuronídeo solúvel (Knee, 1975), a capacidade da β -galactosidase de hidrolisar β -(1 \rightarrow 4)-galactana (Bartley, 1974) e a liberação de galactose de preparações de parede celular (Bartley, 1978). Dick *et al.* (1984) forneceram evidências preliminares da regulação da atividade de β -galactosidase em maçãs “McIntosh” na presença de inibidor endógeno. Ao contrário da β -galactosidase em maçãs, aquela encontrada em tomates não parece estar envolvida na hidrólise de galactanas da parede celular (Gross e Wallner, 1979). Os pesquisadores, na realidade, não foram capazes de detectar qualquer atividade de β -galactosidase durante a maturação de tomates. O fato contrastou com um estudo posterior de Pressey (1983), que isolou três enzimas responsáveis pela atividade de β -galactosidase em tomates. Uma dessas enzimas hidrolisou galactanas de tomates e teve sua atividade aumentada durante o processo de maturação. Isto sugere que há possibilidade de um papel da β -galactosidase no amolecimento de frutas. Uma vez que o polissacarídeo de galactana em frutas do tomate contém ligações (1 \rightarrow 4), a β -galactosidase envolvida deve ser a β -1,4-galactosidase. A não detecção, por parte de Gross e Wallner (1979), de qualquer atividade de galactanase foi atribuída à preparação de seus extratos a partir de frutas congeladas. Como foi apontado por Pressey (1983), o rendimento na extração de β -galactosidase em frutas congeladas é muito baixo quando comparado àquele correspondente a extratos de tomate frescos. Ranwala *et al.* (1992) monitoraram as alterações nas β -galactosidases solúveis e ligadas à parede durante a maturação da fruta do melão cantalupo. Eles demonstraram o envolvimento das β -galactosidases na modificação dos componentes pécnicos e de hemiceluloses, indicando uma sua possível função no amolecimento do melão cantalupo.

VII. SABOR E AROMA

O sabor das frutas e vegetais é uma interação complexa entre o aroma e o gosto. O aroma é produzido pelo material volátil sintetizado durante a maturação da fruta, que inclui compostos de aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres, lactonas, terpenos e compostos sulfurados (Baldwin, 2004; Pérez e Sanz, 2008). Com poucas exceções, os vegetais tendem a ter um sabor mais suave. Seus aromas são determinados por metabólitos secundários como terpenos, fenólicos, glucosinolatos, cisteína sulfóxidos (Jones, 2008). O gosto é proporcionado pelos vários componentes não voláteis, incluindo basicamente açúcares e ácidos, assim como componentes com gosto amargo ou adstringência presentes na polpa da fruta ou no tecido do vegetal.

A. Aroma

Os compostos voláteis responsáveis pelo aroma originam-se de proteínas, carboidratos, lipídeos e vitaminas como pode ser visto no Esquema 2.23.



ESQUEMA 2.23 Formação de aroma volátil em frutas e vegetais. Reprodução autorizada, Salunkhe *et al.* (1976).

O aroma característico de cada fruta ou vegetal é determinado pela genética assim como pelos fatores de pré-colheita, colheita e pós-colheita e normalmente se desenvolve durante a maturação (Kader, 2008). Muitas substâncias voláteis foram identificadas na literatura e foram revisadas por Salunkhe e Do, em 1976. A partir de então estudos com ampla variedade de frutos têm sido desenvolvidos. Uma fruta muito pesquisada é a maçã, na qual o impacto dos fatores de pré e pós-colheita foram analisados extensivamente. Mais de 300 compostos voláteis são produzidos pela maçã e entre os grupos mais abundantes estão os ésteres (Yahia, 1994; Dixon e Hewett, 2000). Mais de 400 compostos voláteis são produzidos pelos tomates (Hobson e Grierson, 1993) e as diferenças de sabor entre as variedades se devem à variação do aroma na produção de compostos voláteis (Brauss *et al.*, 1998). Diferenças qualitativas e quantitativas nos resultados de compostos voláteis entre os grupos de pesquisas, no entanto, podem ser causadas pelo uso de uma vasta gama de métodos de extração e analíticos (Saevens *et al.*, 2004). Além do mais, a análise instrumental dessas substâncias voláteis deve ser combinada com análises sensoriais que forneçam critérios sobre os impactos dos compostos voláteis na percepção do sabor (Baldwin *et al.*, 2007; Song, 2007). Uma nova abordagem para elucidar respostas sobre os receptores humanos de compostos de aromas inclui a ciência sensorial molecular (Greger e Schieberle, 2007; Schmiech *et al.*, 2008). Para otimizar e aprimorar o sabor das frutas e vegetais e obter um melhor conhecimento da produção e regulação dos sabores voláteis pesquisas recentes têm sido direcionadas visando o isolamento dos genes que codificam as enzimas-chave envolvidas na biossíntese dos aromas voláteis (Song, 2007; Pech *et al.*, 2008), com base nas pesquisas de décadas recentes focalizando a identificação e a biossíntese das substâncias voláteis. O controle da formação de substâncias voláteis depende de muitos fatores, por exemplo, os genes envolvidos e, portanto, de sua expressão e transcrição, da

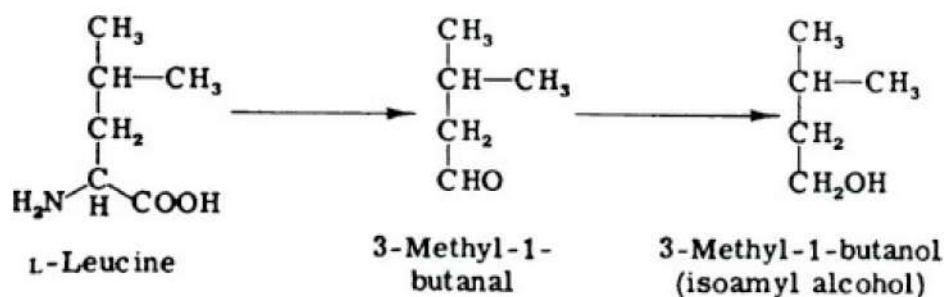
funcionalidade das enzimas catalisadoras que modificam os substratos das substâncias voláteis e da disponibilidade de substratos ou precursores, e de energia das células (Saquet *et al.*, 2003b; Souleyre *et al.*, 2005; Song, 2007; Schwab, 2008; Wyllie, 2008). Esta seção vai focar rapidamente alguns dos mecanismos biogênicos envolvidos na formação de substâncias voláteis durante a maturação.

1. Aldeídos, álcoois e ésteres

Aldeídos e álcoois de cadeias curtas e insaturadas, assim como ésteres de cadeias lineares e ramificadas contribuem de maneira importante para os aromas voláteis das frutas. Eles são formados durante o curto período de maturação, associados ao aumento climatérico da respiração (Paillard, 1968; Romani e Ku, 1968; Tressl *et al.*, 1970; Song e Bangerth, 2003; Lara *et al.*, 2003; Souleyre *et al.*, 2005). Pesquisas com maçãs, bananas, peras e tomates demonstraram que eles são sintetizados a partir de aminoácidos ou ácidos graxos (Eskin *et al.*, 1977; Eskin, 1979; Song e Bangerth, 2003; Rapparini e Predieri, 2003).

a. Aminoácidos como precursores

Um aumento das substâncias voláteis 3-metil-1-butanol, acetato de isopentil, butirato de isopentile isovalerato foi observado por Dalal (1965) durante a maturação do tomate. Ao mesmo tempo, o 3-metil-1-butanal aumentou até que metade da fruta apresentou coloração avermelhada e em seguida diminuiu. A similaridade entre a porção alcóolica destes ésteres e o esqueleto de carbono de 3-metil-1-butanal fez que Yu *et al.* (1968a) sugerissem que eram sintetizados deste aldeído. Uma vez que a leucina possui um esqueleto de carbono idêntico ao do 3-metil-1-butanal, a possível função desse aminoácido na síntese deste aldeído foi investigado por Yu *et al.* (1968c). Com base em seu trabalho com l-leucina [¹⁴C], o seguinte mecanismo foi proposto:

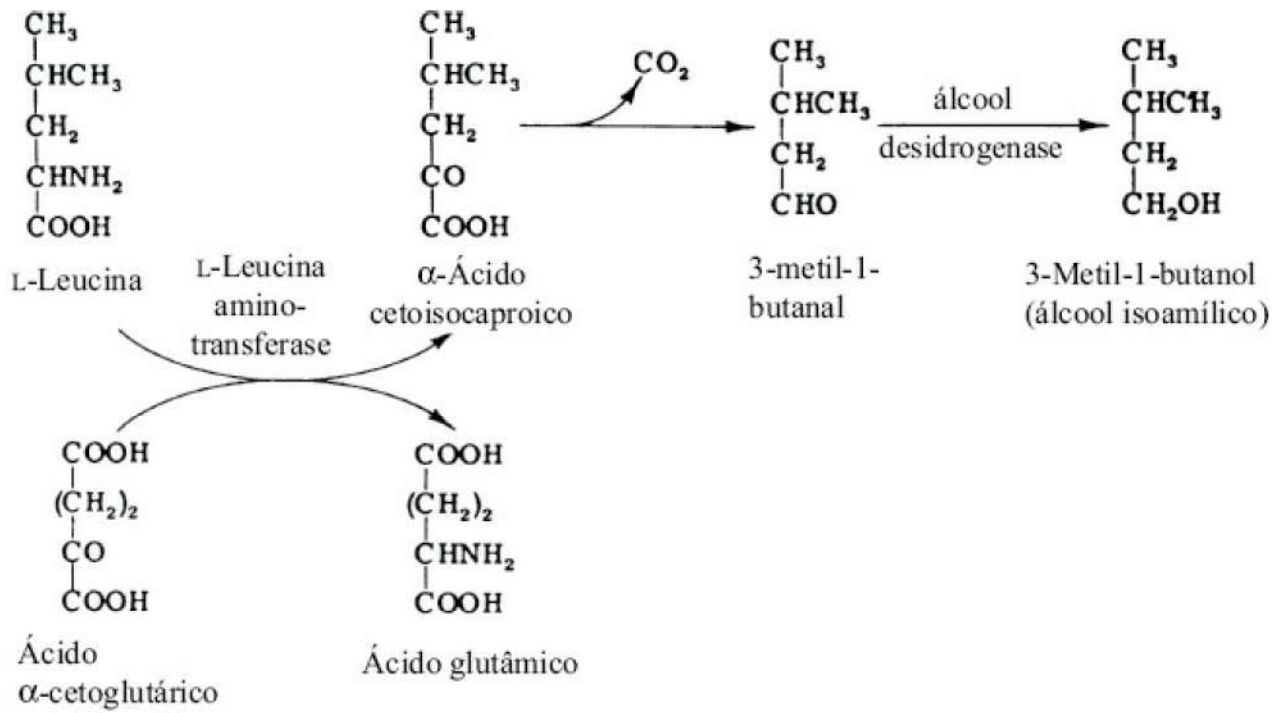


Foi demonstrado que, além da leucina, ácido aspártico, alanina e valina podem originar compostos carbonílicos quando adicionados a extratos de tomate (Yu *et al.*, 1968c; Buttery e Ling, 1993). O declínio dos teores desses aminoácidos durante a maturação aponta para a presença de enzimas capazes de utilizá-los. A fração solúvel obtida pela centrifugação de extratos de tomates mostrou-se bastante ativa sobre a leucina, enquanto o ácido aspártico e a alanina foram metabolizados pela fração mitocondrial. Com base na detecção de grande quantidade de ácido glutâmico nos extratos de tomate, Freeman e Woodbridge (1960) e Yu *et al.* (1967) apontaram para a presença de transaminases ativas. Este fato foi confirmado em uma pesquisa posterior feita por Yu *et al.* (1968b), que encontraram grande quantidade de ácido glutâmico quando extratos de tomates crescidos no campo no estágio verde e maduro foram incubados com esses aminoácidos. Yu e Spencer (1969) incubaram l-leucina em extratos de tomates frescos e isolaram o ácido α -ceto-isocaproico entre os produtos formados. A confirmação com leucina marcada [¹⁴C] comprovou a presença de l-leucina: 2 ceto-glutarato amino transferase em tomates. O Esquema 2.24 resume as reações que conduzem ao 3-metil-1-butanol a partir da l-leucina. Pesquisas com substratos marcados com deutério em maçãs corroboraram tais descobertas (Rowan *et al.*, 1996; 1999). Por fim, aminoácidos aromáticos podem ser convertidos em ésteres pelo mesmo mecanismo em frutas diferentes (Tressl e Albrecht, 1986; Tikunov *et al.*, 2005).

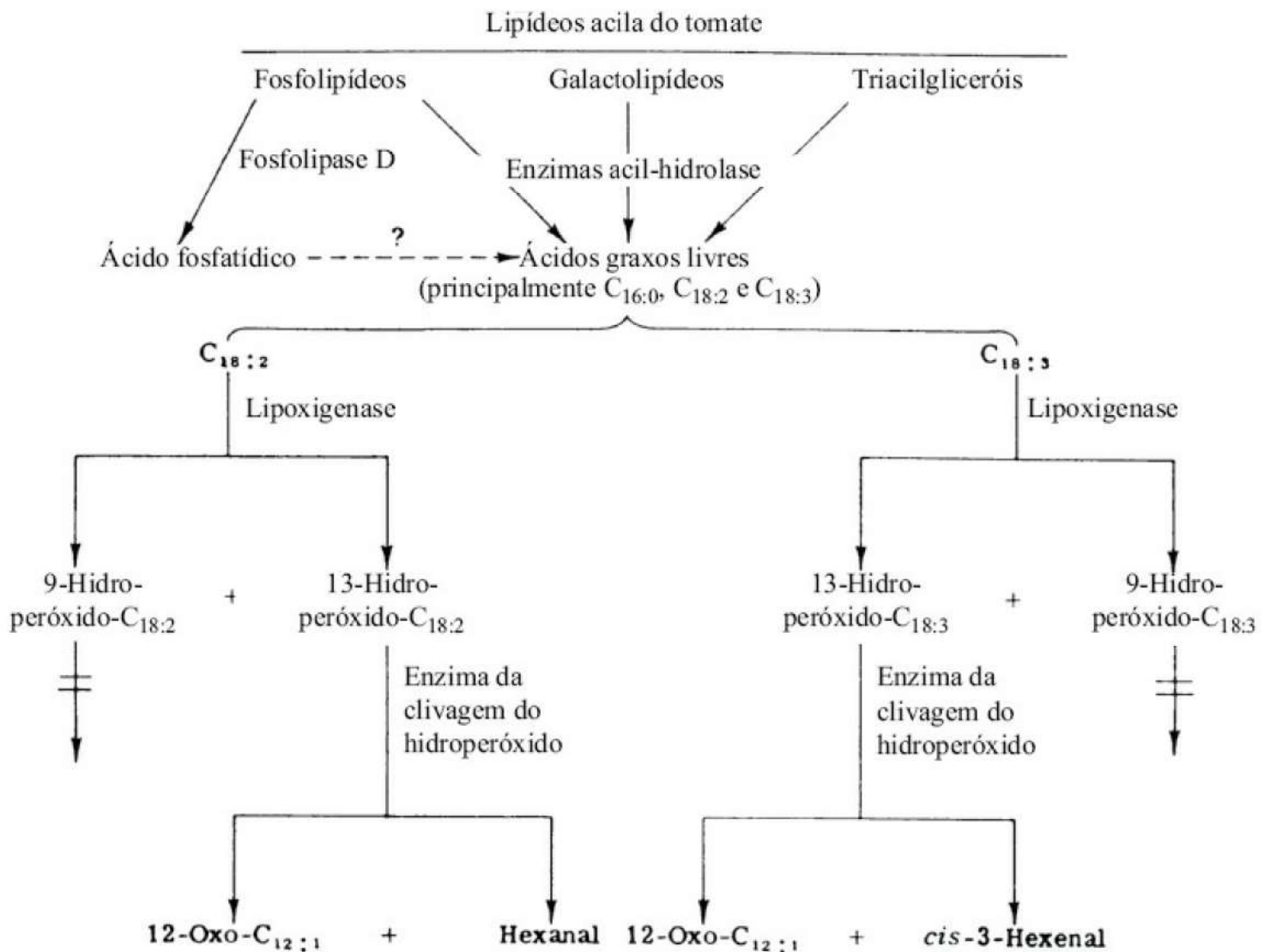
b. Ácidos graxos como precursores

Os compostos carbonílicos voláteis responsáveis pelo aroma dos tomates e das bananas assim como outras frutas são sintetizados a partir de ácidos graxos insaturados (Goldstein e Wick, 1969; Jadhav *et al.*, 1972; Song e Bangerth, 2003). As vias da β -oxidação e da lipoxigenase são os principais mecanismos metabólicos para a produção dos aromas nas frutas (Baker *et al.*, 2006). Os principais ácidos graxos insaturados no pericarpo dos tomates foram comprovados como o oleico, linoleico e o linolênico (Kapp, 1966). Jadhav *et al.* (1972) reportaram um declínio nos teores dos ácidos linoleico e linolênico à medida que os tomates amadureceram. Uma diminuição significativa no ácido linoleico também foi observada por Goldstein e Wick (1969) na polpa das bananas maduras, o que sugere a possibilidade de uma relação entre este ácido graxo e a produção de substâncias voláteis. De maneira semelhante, Song e Bangerth (2003) relataram que os ácidos graxos servem como precursores das substâncias voláteis do aroma de maçãs nas fases pré-climatérica e climatérica.

A incorporação de ácidos linoleicos e linolênicos marcados com ^{14}C em hexanal utilizando fatias ou extratos de tomate livres de células sugeriram a Jadhav *et al.* (1972) haver envolvimento da lipoxigenase. Este fato foi confirmado pela inibição total de carbonilas na presença de peróxido de hidrogênio, um reconhecido inibidor da lipoxigenase. Esta enzima foi, em consequência, monitorada durante a maturação de tomates e verificou-se um aumento da atividade no início do climatério. O fato parece explicar o aumento de substâncias voláteis que ocorre durante a maturação dos tomates (Dalal *et al.*, 1968). Kazeniak e Hall (1970) relataram a presença de teores mais altos de *cis*-3-hexenal, *trans*-2-hexenal e de *n*-hexanol em tomates totalmente maduros. A formação de *trans*-2-hexenal resultou da instabilidade do *cis*-3-hexenal na polpa ácida e suco de tomate com a isomerização do isômero *trans*. Stone *et al.* (1975) demonstraram que o *cis*-3-hexenal é a principal substância volátil de destilados de tomate, enquanto Jadhav *et al.* (1972) descobriram que o *n*-hexanol é a principal substância volátil formada. Essa discrepância deu a ideia a Stone *et al.* (1975) que o *cis*-3-hexenal poderia ser um precursor do *n*-hexanol, mas essa sugestão foi deixada de lado quando apenas 2% do *cis*-3- ^{14}C hexenal foi incorporado na forma de álcool. Jadhav *et al.* (1972) atribuíram a presença do hexanol, propanol, 2,4-decadienal, 2,6-heptadieno e do *cis*-3-hexenal em substâncias voláteis do tomate na formação de 9-, 12- e 16-hidroperóxidos pela ação da lipoxigenase em ácidos linoleicos e linolênicos. Gaillard e Matthew (1977), no entanto, relataram que o principal hidroperóxido de ácidos graxos formados pelos ácidos linoleico e linolênico são os 9- e 13-hidroperóxidos a uma razão de 95:5. Entre eles, somente o 13-hidroperóxido foi clivado formando o composto ácido não volátil 12-oxo-dodec-*cis*-9-enoico, assim como o hexanal e o *cis*-3-hexenal a partir dos ácidos linoleicos e linolênicos, respectivamente (Esquema 2.25).



ESQUEMA 2.24 Biogênese do álcool isoamílico a partir da L-Leucina no tomate.



ESQUEMA 2.25 Processo proposto para a formação de fragmentos de carbonil pela degradação enzimática de lipídeos acila em tomates rompidos. Galliard e Matthew (1977).

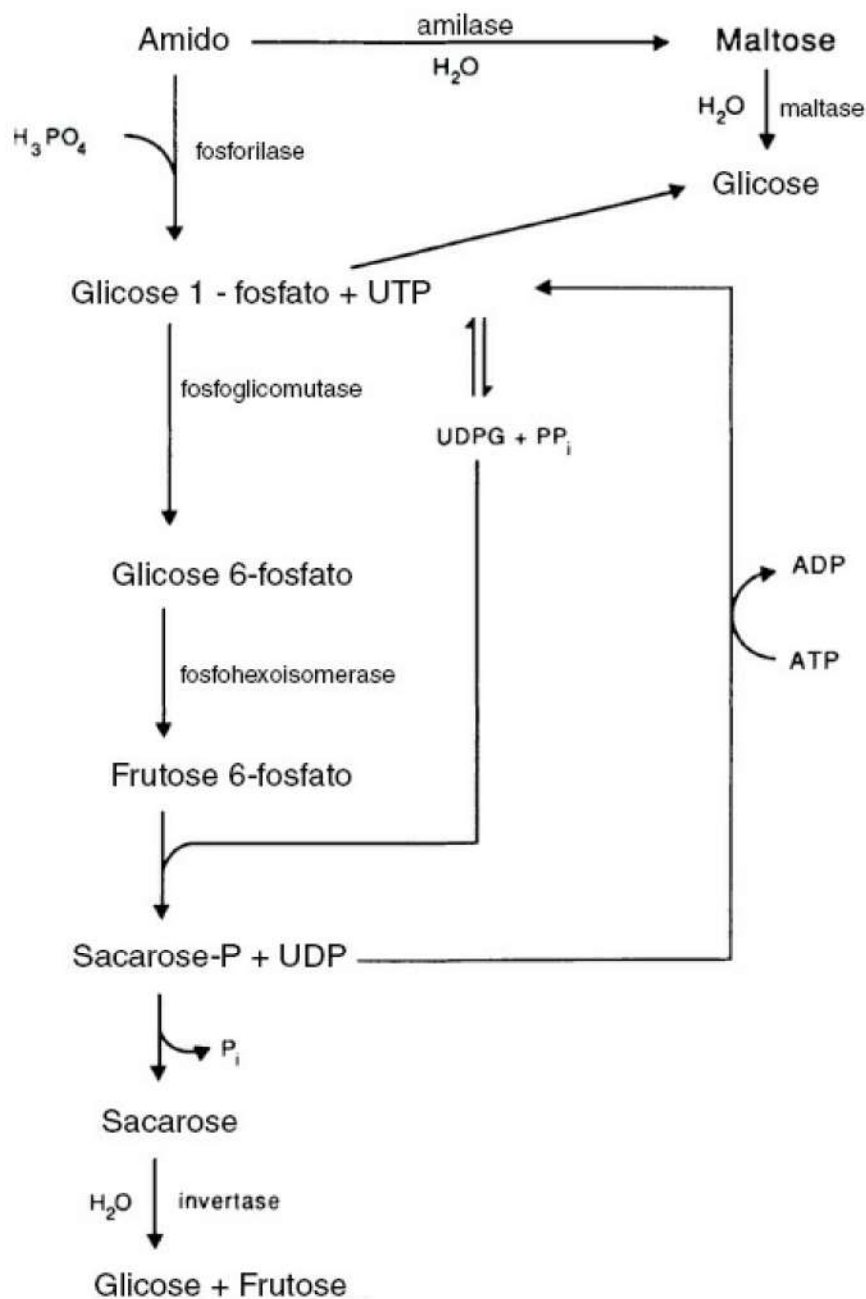
Zamora *et al.* (1987) caracterizaram a lipoxigenase do tomate e confirmaram que o isômero 9-hidroperóxido é o principal deles, formado pelo ácido linoleico. A razão de isômeros de 9- e 13-hidroperóxido produzidos pelo ácido linoleico foi descoberta como equivalente a 24:1, permanecendo assim bem próximo do que tinha sido observado anteriormente por Gaillard e Matthew (1977).

Buttery e colegas (1987) desenvolveram métodos de captura aprimorados para análises quantitativas das principais substâncias voláteis C₄-C₆ em tomates. Além de inativar as enzimas do tomate que afetam as substâncias voláteis durante o isolamento, eles conseguiram superar o problema da isomerização de *cis*-3-hexenal para *trans*-2-hexenal relatado por Kazeniac e Hall (1970). Utilizando seus procedimentos, que envolvem captura em Tenax e a inativação da enzima com CaCl₂, eles identificaram o *cis*-3-hexenal entre os principais produtos voláteis presentes. Esses pesquisadores atribuíram a falta de sabor dos tomates adquiridos nos supermercados aos menores teores de *cis*-3-hexenal presentes quando comparados aos maiores teores presentes em tomates maturados na planta. Além disso, os pesquisadores reportaram que estocar tomates em geladeiras causa maior perda de sabor, em parte por causa dos menores teores de *cis*-3-hexenal. Tal efeito da estocagem refrigerada no aroma do tomate está em concordância com o trabalho anterior de Lammers (1981). Além do *cis*-3-hexenal, outras importantes substâncias voláteis que contribuem para o sabor são a β -ionona, 1-penten-3-ona, hexanal, *cis*-3-hexanol, *trans*-2-hexanal, 2- e 3-metilbutanol, 2-iso-butiltiazol e 6-metil-5-hepten-2-ona.

O *trans*-2-hexenal também foi identificado entre as substâncias voláteis das bananas “Gros Michel” por Issenberg e Wick (1963). Usando uma técnica de enriquecimento de voláteis, Tressl e Jennings (1972) confirmaram a presença de *trans*-2-hexenal na fase gasosa de sistema fechado com bananas em maturação. A separação de frações voláteis das bananas por Palmer (1971) comprovou a presença de *cis*-3-hexenal, *trans*-2-hexenal e de *n*-hexanal entre os aldeídos formados. Tressl e Drawert (1973) descobriram que os homogeneizados das bananas verdes produzem *trans*-2-, *cis*-6-nonadienal, *trans*-2-nonenal e ácido 9-oxanonanoico, similar àqueles encontrados em pepinos (Fleming *et al.*, 1968). Tressl e Drawert (1973) detectaram hexanal, *trans*-2-hexenal e ácido 12-oxo-*trans*-10-dodecenoico quando bananas verdes ficam expostas a etileno e estocadas por 4 dias a 15°C. A incorporação de ácidos linoleico e linolênico marcados com ¹⁴C- nessas substâncias voláteis demonstrou o envolvimento da lipoxigenase. Ácidos 13- e 9-hidroperoxioctadecadienoico marcados incubados com extratos de bananas verdes foram convertidos para C₆-C₉ aldeídos como pode ser visto no Esquema 2.26. A aldeído liase, a enzima responsável pelo rompimento dos derivados hidroperóxidos também foi encontrada em sementes de melancias em germinação por Vick e Zimmerman (1976). Essa enzima catalisa a formação do ácido 12-oxo-*trans*-10-dodecenoico e hexanal a partir do ácido 13-hidroperoxi-*cis*-9,*trans*-11-octadecanoico. Esta última difere da enzima de clivagem de hidroperóxido dos tomates ao produzir *trans*-2-enals como produtos primários.

sacarose e de ácido l-málico, juntos, assim como o perfil de proteínas foi sugerido por Gorin (1973) como parâmetros para avaliar a qualidade das maçãs “Golden Delicious”. Hammett *et al.* (1977) encontraram uma correlação alta entre a razão de sólidos solúveis e o conteúdo de ácidos, com os dias da floração total (DFFB) para maçãs “Golden Delicious”. A razão de açúcares ou de sólidos solúveis e ácidos indica a qualidade de frutas cítricas e de outras frutas (Vangdal, 1985; Fellers, 1991; Mitchell *et al.*, 1991). Açúcares e ácidos não contribuem apenas para o sabor doce ou ácido dos tomates, mas também são responsáveis pela intensidade geral do sabor (Kader *et al.*, 1977; Stevens *et al.*, 1979; Jones e Scott, 1983). O sabor doce e, portanto, os açúcares contribuem para os consumidores gostarem de cenouras. Pesquisas sobre cenouras indicam que os açúcares, além de elicitar doçura, suprimem o gosto amargo do 6-metoximeleina (isocumarina) (Seljasen *et al.*, 2001a; 2001b; Höhn *et al.*, 2003; Varming *et al.*, 2004; Kreutzmann *et al.*, 2007).

Além desses componentes, a presença de compostos de taninos e de fenólicos classificados como hidrolisáveis ou não hidrolisáveis afetam o sabor (Lesschaeve e Noble, 2005). Ao contrário dos taninos hidrolisáveis, que liberam ácido gálico e glicose na hidrólise enzimática, os taninos não hidrolisáveis resistem à hidrólise enzimática. Este último parece ser responsável pela adstringência em várias frutas imaturas. A perda da adstringência em caquis foi atribuída, por Matsuo e Ito (1982), à imobilização do tanino com acetaldeído formado durante a maturação. Nenhuma alteração substancial na composição ou quantidade de polifenóis na fruta *Rubus* sp. foi detectada durante a maturação, por muitos pesquisadores (Haslam *et al.*, 1982; Okuda *et al.*, 1982a; 1982b). Com base nas pesquisas com sistemas modelos, Ozawa *et al.* (1987) propuseram que a perda da adstringência durante a maturação da fruta deve-se, em parte, a uma possível interação entre polifenóis e proteínas das frutas.



ESQUEMA 2.27 Conversão de amido em açúcar.

1. Conversão amido-açúcar

Açúcar e amido temporário são sintetizados na planta em desenvolvimento pela fotossíntese. E são deslocados, principalmente na forma de sacarose, a partir de cloroplastos via floema para as células em desenvolvimento na planta, onde são resintetizadas em amido. A conversão de sacarose para amido parece envolver uma sequência de reações ilustradas no Esquema 2.27.

Durante o período de pós-colheita, o amido é transformado em sacarose, glicose e frutose. Esse processo é afetado pelas condições fisiológicas das frutas e vegetais assim como pelo tempo e temperatura de estocagem. A hidrólise do amido é uma das transformações mais notáveis que ocorrem durante a maturação de muitas frutas climatéricas. Por exemplo, um declínio no conteúdo de amido de 22% para 1% foi relatado por Palmer (1971) em bananas quando passaram da fase pré-climatérica à climatérica. Em outras frutas, como maçãs e peras, a progressão da degradação do amido é utilizada para determinar o estágio de maturação e a data de colheita (Smith *et al.*, 1979; De Jager *et al.*, 1996). No entanto, o conteúdo de amido em maçãs e peras é menor do que o de bananas e,

portanto, o aumento de açúcares pela conversão de amido é, em geral, moderado (Murayama *et al.*, 2002; Travers *et al.*, 2002). A presença das enzimas fosforilase e amilase foi observada em tecidos de estocagem de muitas frutas, apesar de suas respectivas funções nos processos de amadurecimento ainda não estarem claras. Young *et al.* (1974) observaram um aumento da atividade de α -amilase durante a maturação de bananas, mas não conseguiram confirmar seu envolvimento na hidrólise de amido. A β -amilase e fosforilase também foram encontradas durante a maturação, mas a presença de inibidores de enzimas impediu a análise durante a fase climatérica. Yang e Ho (1958) sugeriram que a fosforilase tem uma função na degradação do amido durante o climatério. O fato foi confirmado mais tarde em bananas tipo “Cavendish” irradiadas com raios gama por Surendranathan e Nair (1973). Três fosforilases foram parcialmente purificadas a partir de bananas maduras por Singh e Sanwall (1973; 1975; 1976), cada uma delas demonstrando propriedades bioquímicas diferentes.

A hidrólise do amido foi examinada por Chitarra e LaJollo (1981) durante a maturação de bananas híbridas “Marmello”. Este híbrido demonstrou ter um comportamento fora do normal uma vez que a casca, cor, aroma e textura não sofreram alterações em geral associadas à maturação. Além disso, o conteúdo de amido diminuiu para 5% durante a maturação pela presença potencial de inibidores. O aumento da temperatura da estocagem de 20°C para 25°C acelerou o climatério e reduziu o tempo necessário para estabilizar o teor do amido de 24,5% para 5% em 8 dias. O teor de amido em bananas pode ser reduzido ainda mais, alcançando 3,3% se a estocagem for feita a 30°C. Nesses casos, as frutas ficaram maduras demais e deterioraram rapidamente. Isto contrastou com as bananas “Dwarf Cavendish” nas quais a degradação total do amido (97,7%) ocorreu durante o climatério. O conteúdo mais baixo de açúcar na banana de tipo “Marmello” é responsável pela diferença no gosto quando comparada à variedade “Cavendish”. A atividade de fosforilase nas bananas “Marmello” foi relatada como tendo permanecido constante durante o pré-climatério apesar de ter acompanhado as alterações no conteúdo de amido. Esse fato diferiu da banana “Cavendish”, na qual 50% do aumento na atividade da fosforilase foi verificada antes do climatério e precedeu a degradação de amido. Estes resultados apontam para um possível envolvimento da fosforilase nas transformações de amido-sacarose assim como da sacarose sintetase (Areas e LaJollo, 1981). O envolvimento exclusivo da α -amilase na degradação do amido foi seriamente questionado uma vez que ocorreu antes de qualquer aumento da atividade de α -amilase. A inibição da síntese de α -amilase por cicloheximida durante a maturação das bananas não bloqueou a degradação do amido, fato que confirmou a existência de uma função para a fosforilase.

A atividade da fosforilase tem sido associada com a estocagem refrigerada de tubérculos de batatas a 4 °C (Hyde e Morrison, 1964). Essa enzima é responsável pela reação inicial de adoçamento de batatas induzidas pelo frio (Isherwood, 1976). O resultado final é um aumento significativo do conteúdo de açúcar nas batatas, o que resulta na produção de batatas fritas com coloração escura inaceitável (Talbert e Smith, 1975). Para evitar que isso ocorra, as batatas são estocadas, em geral, em temperaturas iguais ou acima de 10°C, o que é denominado de “condicionamento”. O mecanismo bioquímico envolvido nas transformações amido/açúcar permanece não esclarecido, apesar de o efeito da temperatura da estocagem em várias enzimas ter sido relatado (Kennedy e Isherwood, 1975; Pollock e ap Rees, 1975; Isherwood, 1976; Dixon e ap Rees, 1980). Um aumento nos açúcares fosfatos e na sacarose foi atribuído por Pollock e ap Rees (1975) à instabilidade ao frio de algumas das enzimas glicolíticas. Uma delas, a fosfofrutoquinase, demonstrou ser uma das causas principais do adoçamento dos tubérculos das batatas a baixas temperaturas (Dixon *et al.*, 1981). A instabilidade dessa enzima ao frio parece ser decorrência da denaturação de seu complexo de enzimas oligoméricas e de sua dissociação em subunidades. Em decorrência disso, a enzima não consegue oxidar as hexoses fosfato resultando em seu acúmulo e conversão em sacarose.

2. Ácidos orgânicos

A maturação das frutas é acompanhada por mudanças nos ácidos orgânicos. Eles alcançam um máximo durante o crescimento e desenvolvimento da fruta ainda na árvore, mas diminuem durante a estocagem e também são muito dependentes da temperatura. O ciclo Krebs é ativo nas células das plantas superiores e produz uma variedade de ácidos orgânicos, incluindo o cítrico, málico e succínico. Os ácidos málico e cítrico são componentes importantes da maioria das frutas, e as laranjas, limões e morangos possuem altos teores de ácido cítrico e maçãs, peras e ameixas têm grande quantidade de ácido málico. Durante a maturação, esses ácidos orgânicos diminuem à medida que são usados para a respiração. O esgotamento dos ácidos é acompanhado por um declínio no conteúdo de amido e um aumento dos açúcares responsáveis pela doçura das frutas e diminuição de sua acidez (Schifferstein e Frijters, 1990; Ackermann *et al.*, 1992; Harker *et al.*, 2002). Akhavan e Wrolstadt (1980) relataram que a maturação de peras do tipo “Bartlett” atingiu um conteúdo máximo de açúcar de 13,5% (Figura 2.13) e uma acidez total de 6 miliequivalentes e a firmeza de sua polpa de 6 lbs no quarto dia após a maturação. Ácidos málico e cítrico são responsáveis pelas alterações principais da acidez total tanto antes como depois da maturação (Figura 2.14). Um aumento similar dos açúcares e dos ácidos acompanhado por um aumento do aroma foi observado em peras do tipo “Conference” (Höhn *et al.*, 1996). Esses ácidos orgânicos contribuem com o pH dos tomates, que é de fundamental importância para o processamento (Davies e Hobson, 1981). Picha (1987) reportou que os ácidos cítrico e málico são os principais ácidos orgânicos nos tomates cereja. Durante a maturação, alterações nestes ácidos orgânicos são evidentes com o ácido cítrico aumentando do estágio da fruta imatura verde para o da fruta verde completamente desenvolvida, enquanto o ácido málico diminuiu no estágio verde maduro para o estágio maduro pronto para consumo. Além do mais, os teores de ácido e de açúcar afetam a qualidade do sabor dos tomates e de outras frutas (Malundo *et al.*, 1995).

Além desses ácidos orgânicos, o ácido ascórbico é predominante nas frutas. Ele é encontrado nos tecidos das plantas, principalmente em sua forma reduzida, mas pode ser oxidizado para ácido dehidroascórbico pela ação da enzima ácido ascórbico oxidase (consultar o Capítulo 10). A presença do ácido l-quinico, um ácido orgânico minoritário, também foi encontrada em várias frutas, incluindo peras (Akhavan e Wrolstad, 1980). Outros ácidos orgânicos encontrados incluem os ácidos oxálicos e citramálicos.

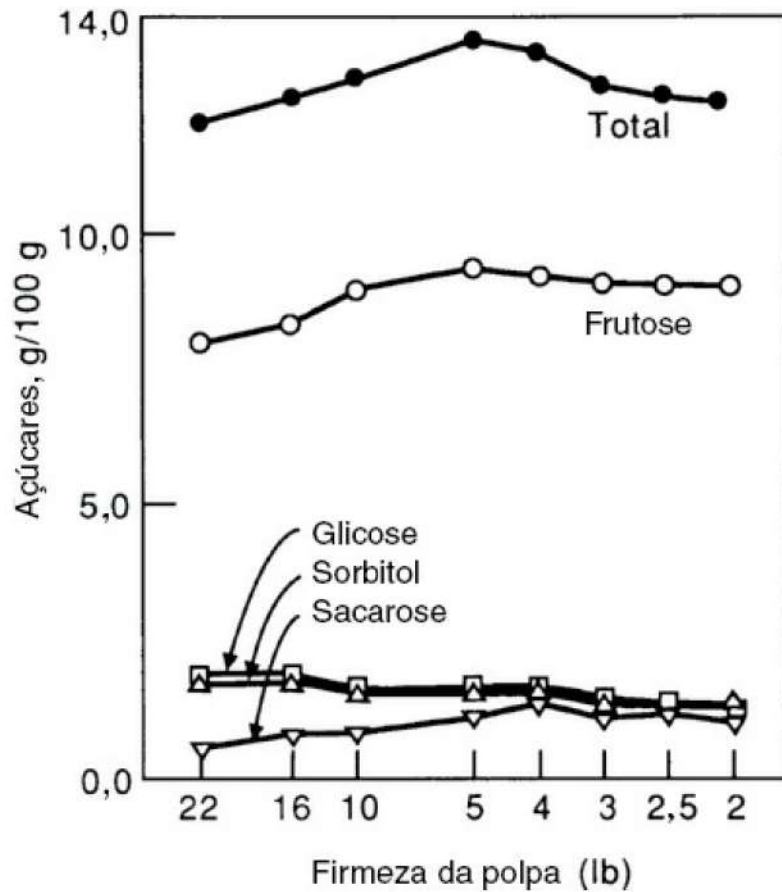


FIGURA 2.13 Alterações nos açúcares durante a maturação de peras Bartlett. Akhavan e Wrolstad (1980). Copyright © Institute of Food Technologists.

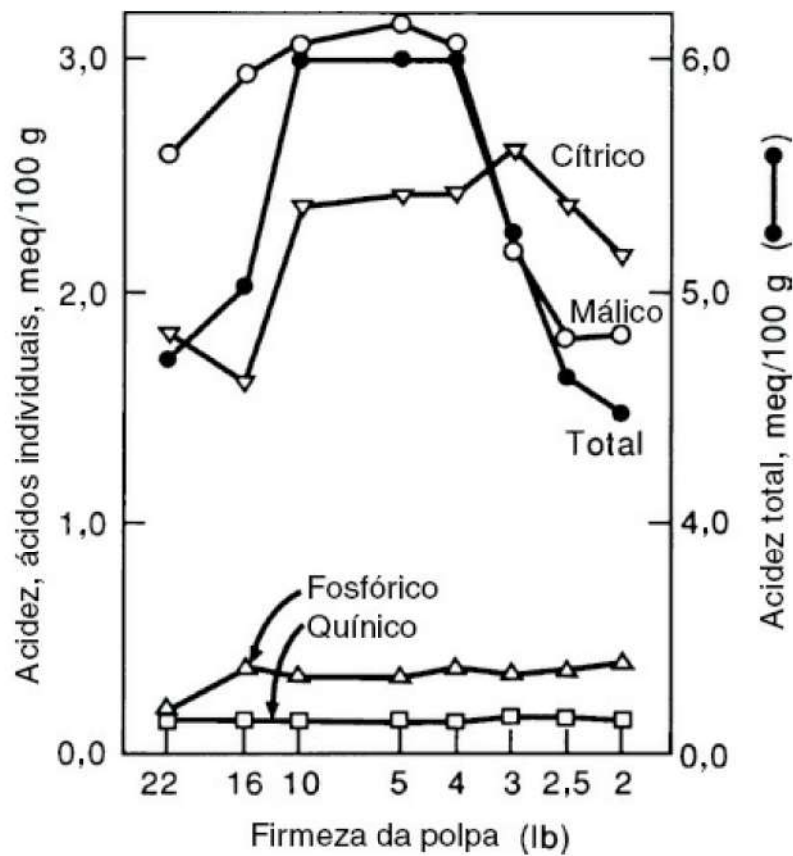


FIGURA 2.14 Alterações nos ácidos durante a maturação de peras Bartlett. Akhavan e Wrolstad (1980). Copyright © Institute of Food Technologists.

VIII. ESTOCAGEM

Para assegurar um adequado suprimento aos consumidores, durante o ano todo, de frutas e vegetais, assim como para a indústria de alimentos, vários métodos de estocagem foram desenvolvidos. O método mais antigo é a estocagem a frio ou refrigerado no caso de produtos perecíveis, ao passo que outros utilizam atmosfera modificada (MA) ou empacotamento com atmosfera modificada (MAP) e atmosfera de estocagem controlada (CA). A tecnologia moderna é cara em termos das instalações, equipamentos e manutenção. Todas estas tecnologias têm em comum o fato de que as frutas e verduras permanecem vivas e continuam a desenvolver os processos de todos os tecidos vivos, fato que contrasta com as outras técnicas de preservação como processamento por calor, desidratação ou congelamento, assim como as que interrompem a respiração e outros processos metabólicos. Interesses comerciais no desenvolvimento e aplicação de MA ou CA para o transporte e estocagem de frutas e vegetais fez com que surgissem novas e elaboradas pesquisas nestas áreas nas últimas décadas e criou uma busca contínua por novos desenvolvimentos e refinamento na aplicação destas tecnologias em todo o mundo.

A. Armazenamento pelo frio

O método mais antigo e popular para prolongar a vida útil de produtos perecíveis é a estocagem a frio. Isso se baseia no fato de que reações biológicas tais como a respiração e outros processos metabólicos, por exemplo, a deterioração, dependem da temperatura. A regra de Van't Hoff indica que a velocidade da reação diminui de duas a três vezes para cada diminuição de 10°C na temperatura. A estocagem de frutas e vegetais, portanto, em temperaturas bem baixas, pouco acima do congelamento, parece ser benéfica em termos de aumento do tempo de estocagem. No entanto, algumas frutas e vegetais apresentam danos quando expostos a baixa temperatura, mas não de congelamento. A maioria dos produtos tropicais e subtropicais, além de algumas culturas de regiões temperadas é sensível a danos pelo frio. Alterações fisiológicas e bioquímicas, portanto, podem ocorrer em espécies sensíveis à exposição a baixas temperaturas e resultam no desenvolvimento de sintomas de dano pelo frio, tais como manchas na superfície, descoloração, rompimento interno, escurecimento da polpa da fruta, falha na maturação, perda de sabor e apodrecimento (Ministério da Agricultura de Ontário, 1998; Perez-Tello *et al.*, 2009; Schotsmans *et al.*, 2009). A temperatura crítica para danos pelo frio varia conforme a fruta ou vegetal, cultivar e é, portanto, geneticamente determinada. Além disso, a sensibilidade das frutas ou vegetais pode ser afetada pelas condições da pré-colheita como fatores climáticos e práticas culturais. As condições de estocagem recomendadas oficialmente para frutas e vegetais levam tais fatos em conta e, portanto, as temperaturas recomendadas para a estocagem não atingem temperaturas críticas (USDA, 2004). Há outros fatores, no entanto, que afetam a vida útil de diversas mercadorias durante a estocagem, incluindo a umidade relativa adequada e a presença de etileno na atmosfera do armazenamento. Para a maioria dos vegetais, é necessário um alto teor de umidade para evitar que murchem ou fiquem enrugados. Por outro lado, uma taxa entre -1°C e +3°C associada a uma umidade relativa de 70-75% e boa ventilação são fatores que têm sido recomendados para aumentar a vida útil de cebolas no período do inverno. Uma boa ventilação em um ambiente frio evita o acúmulo de etileno e de outros componentes voláteis na atmosfera de armazenamento. O etileno aumenta a atividade respiratória da maioria das frutas e vegetais e, portanto, diminui a vida na armazenagem. Além disso, pode apresentar efeitos benéficos tanto como danosos (Saltveit, 2005). Alguns dos efeitos danosos são aceleração da senescência, perda de clorofila e amolecimento excessivo, fatores que podem causar perdas inaceitáveis. O etileno na atmosfera de estocagem pode alterar o sabor de frutas e vegetais. Um caso bem documentado descreve o sabor amargo das cenouras induzido por traços de etileno (Seljasen, 2001a). O potencial de estocagem de frutas e vegetais pode depender da concentração de alguns constituintes do produto colhido; assim, Hanaoka e Ito (1957) relataram que um alto conteúdo de açúcar solúvel em bulbos de cebolas é um bom indicador do potencial de estocagem. Outros pesquisadores, posteriormente,

também descobriram que o metabolismo de carboidratos em cebolas estava relacionado com o tempo de armazenamento (Kato, 1966; Toul e Popsilova, 1966). Uma pesquisa mais detalhada do metabolismo de carboidratos em cebolas armazenadas, desenvolvida por Rutherford e Whittle (1982), demonstrou que um aumento da frutose era resultado da hidrólise dos oligossacarídeos armazenados. Um conteúdo baixo de frutose em bulbos de cebolas recém-colhidas indicava baixo potencial para estocagem, sendo o contrário verdadeiro para bulbos de cebola com alto conteúdo de frutose. A determinação da invertase alcalina em cebolas realizada por Rutherford e Whittle (1984) demonstrou que a sua atividade refletia o teor de frutose presente. O monitoramento do conteúdo de frutose e da atividade da invertase em cebolas colhidas forneceu um bom indicador para avaliar sua estabilidade na estocagem a frio.

B. Armazenamento em atmosfera controlada

A estocagem com atmosfera controlada (CA) refere-se ao armazenamento em atmosferas com ar diferente do normal (20-21% de O₂, cerca de 0,03% de CO₂, 78-79% de N₂ e quantidades mínimas de outros gases) e seu controle restrito durante todo o tempo de estocagem. A MA e a MAP também se baseiam no armazenamento e transporte do produto em atmosferas diferentes do ar normalmente utilizado, mas em contraste com a CA, a atmosfera não é controlada depois de ser estabelecida. Portanto, a manutenção do controle estrito da temperatura é obrigatória para obter um impacto positivo da MA e da MAP na qualidade e vida útil das frutas e vegetais. Condições atmosféricas modificadas ou controladas reduzem ou retardam processos bioquímicos tais como a respiração, amadurecimento e amarelecimento de frutas e vegetais. O ambiente modificado contém, tipicamente, baixos níveis de oxigênio e altos teores de dióxido de carbono, que diminui os processos catabólicos, particularmente a respiração, assim como o envelhecimento, prolongando, portanto, a vida útil de frutas e vegetais estocados. Vale lembrar o efeito do etileno: oxigênio é necessário para a sua síntese e ambos, o oxigênio e o dióxido de carbono afetam a atividade biológica. Atmosferas controladas ou modificadas, portanto, diminuem a síntese e a atividade do etileno durante a estocagem.

Nos anos 1960, ficou evidenciado que manter baixos os níveis de oxigênio de acordo com a tolerância pelos produtos é vantajoso. Este fato foi refletido na terminologia utilizada para métodos de estocagem diferentes como, por exemplo, estocagem com LO (oxigênio baixo) ou ULO (oxigênio ultra-baixo) (Hoehn *et al.*, 2009). Em geral, concentração mais baixa possível de oxigênio corresponde ao ponto de compensação anaeróbico (ACP) (Figura 2.15). A ACP é a concentração de oxigênio na qual a produção de dióxido de carbono é mínima (Boersig *et al.*, 1988).

O benefício geral da estocagem por CA é que os produtos podem reter seu frescor e qualidade para a alimentação por períodos mais longos. Nem todas as frutas e vegetais, no entanto, podem ser armazenadas nessas condições. Várias pesquisas foram desenvolvidas em uma vasta gama de produtos, mas as maçãs continuam sendo as principais frutas estocadas nessas condições e comercializadas em todo o mundo. Outras frutas e vegetais estocadas ou transportadas em atmosferas controladas incluem peras, kiwis, frutas vermelhas, repolhos, cebolas, alfaces, abacates, aspargos e bananas. Um dos maiores problemas associados com a estocagem CA é que condições diferentes são necessárias para a estocagem de cultivares diferentes. Maçãs, por exemplo, têm sido pesquisadas extensivamente e há listas das condições recomendadas para cultivares específicas disponíveis nas diferentes regiões dos EUA, Inglaterra e Europa (Stoll, 1970; 1973; Blanpied, 1977; Fidler *et al.*, 1977; Porritt, 1977; Kader, 2003; Kupferman, 2003; Saltveit, 2003b; Brecht, 2006; Erkan e Wang, 2006). Isso torna a estocagem CA muito cara, uma vez que as condições precisam ser adequadas a cada uma das cultivares assim como para diferentes frutas e vegetais.

C. Novos desenvolvimentos no armazenamento pós-colheita

O estabelecimento de aplicações comerciais da tecnologia de estocagem CA era baseado em pesquisas dos efeitos do oxigênio, dióxido de carbono e etileno (C_2H_2) na respiração e maturação de frutas como e bagas por Kidd e West (1927; 1930b; 1937; 1950). Desde então, essa tecnologia tem sido continuamente aprimorada e refinada (Dilley, 2006). No novo milênio, dois novos desenvolvimentos foram implementados. O primeiro foi a aplicação de 1-metilciclopropeno (1-MCP) como tratamento químico pós-colheita (Sisler e Blankenship, 1996). O 1-MCP é um composto de baixo ponto de ebulição. Para uso comercial ele é complexado com α -ciclodextrina para produzir um pó solúvel em água (Daly e Kourelis, 2000). Para aplicação, o pó solúvel é misturado à água, liberando 1-MCP na forma de gás, que é dispersado ao redor dos produtos. As taxas de aplicação recomendadas são de 0,2–1 ppm (Kostansek e Pereira, 2003). O tratamento dura geralmente de 12 a 24 horas, tempo suficiente para obtenção de uma resposta completa. Desde 2012 o 1-MCP foi aprovado para aplicação, em maçãs pós-colheita, em muitos países (Prange e DeLong, 2003). Em alguns países a aplicação desse composto em bananas foi aprovada, enquanto para outros produtos a aprovação governamental ainda está pendente. O 1-MCP se liga a receptores de etileno e inibe a ação do etileno endógeno e exógeno, o que leva a um retardamento considerável do processo de maturação. No entanto, cada fruta ou vegetal responde de modo diferente ao 1-MCP (Watkins, 2002; Blankenship e Dole, 2003) e mais pesquisas precisam ser realizadas sobre os seus efeitos nas plantas nos processos anteriores e posteriores às colheitas.

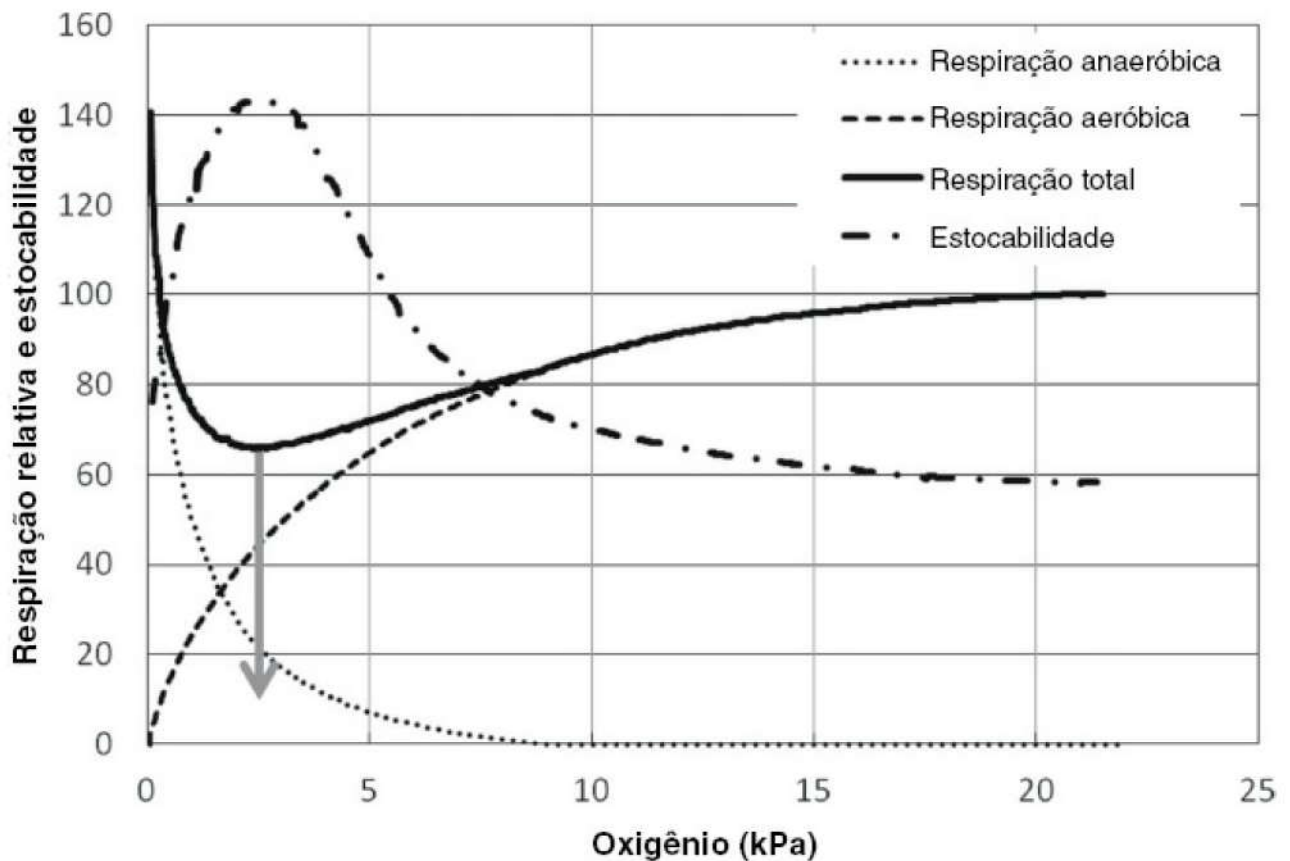


FIGURA 2.15 Efeito da concentração de oxigênio sobre a respiração e ponto de compensação aeróbico (ACP). ACP é a concentração de O_2 na qual a respiração (produção de CO_2) é mínima. De Gasser *et al.* (2008); reproduzido com autorização.

Um segundo novo desenvolvimento nas técnicas de pós-colheita abrange o controle dinâmico e adaptativo da estocagem em atmosfera controlada (DCA). As recomendações para o uso da CA e da DCA em frutas e vegetais são baseadas, em geral, em inúmeros ensaios de armazenamento na tentativa de encontrar as condições ótimas para a CA. As condições em que foram obtidos os melhores resultados são as normalmente recomendadas e mantidas do início até o final do armazenamento (Prange *et al.*, 2005; Gasser *et al.*, 2008). Uma vez que as frutas e vegetais

estocados são tecidos vivos, é razoável esperar que seu metabolismo seja de natureza dinâmica durante o armazenamento. Condições estáticas de CA, portanto, não devem ser provavelmente ótimas e podem até ser incorretas em algum momento da estocagem. Saltveit (2003b) enfatizaram este aspecto e sugeriram haver a necessidade do CA ser dinâmico. Uma técnica promissora para controlar a CA de modo dinâmico parece ser as determinações fluorescentes da clorofila (Prange *et al.*, 2003; 2005; Gasser *et al.*, 2005). A fluorescência da clorofila é afetada pelo baixo teor de oxigênio e alto teor de dióxido de carbono (DeEll *et al.*, 1995; 1998) e pesquisas indicam que esta técnica detecta o mais baixo nível de oxigênio tolerado por frutas e vegetais estocados. Essa concentração de oxigênio corresponde ao ACP (Gasser *et al.*, 2005; 2007). Com base no princípio da fluorescência da clorofila, o sistema Harvest Watch™ foi desenvolvido e depois patentado (Prange *et al.*, 2007). A primeira aplicação comercial do DCA em maçãs foi realizada em 2004 na Itália e nos Estados Unidos e, desde então, sua aplicação na estocagem de maçãs tem aumentado constantemente em todo o mundo. A estocagem de maçãs levemente acima do limite de concentração de oxigênio (ACP) resultou em melhoramento da retenção da qualidade e também foi relatado que essa tecnologia manteve a qualidade da maçã depois da estocagem no mesmo nível, ou melhor, do que com o uso de 1-MCP (Zanella *et al.*, 2005). Um controle adaptativo das condições inclui monitoramento das respostas dos produtos de horticultura a alterações nos parâmetros de estocagem em condições de estresse. Outro indicador envolve o começo da fermentação. Este pode ser monitorado e deduzido através dos aumentos de acetaldeído ou de etanol na atmosfera de estocagem. Dispositivos para monitorar o etanol têm sido desenvolvidos e foram aplicados na estocagem de maçãs de tipo “Elstar” na Holanda (Veltman *et al.*, 2003c). Outras técnicas podem ser incorporadas nos sistemas CA no futuro, como o controle de apodrecimento em armazenamento com compostos antimicrobianos distribuídos em forma de gás durante períodos críticos do armazenamento ou a adição de gases novos (NO, N₂O) para aumentar os benefícios do CA atual (Hoehn *et al.*, 2009).

REFERÊNCIAS

- Abeles, F.B., 1973. Ethylene in Plant Biology. Academic Press, New York.
- Abeles, F.B., Takeda, F., 1990. Cellulase activity and ethylene in ripening strawberry and apple fruit. *Sci. Hortic*47, 77-87.
- Acaster, M.A., Kende, H., 1983. Properties and partial purification of ACC synthetase. *Plant Physiol*.72, 139-145.
- Ackermann, J., Fischer, M., Amado, R., 1992. Changes in sugars, acids, and amino acids during ripening and storage of apples (cv. Glockenapfel). *J. Agric. Food Chem*.40, 1131-1134.
- Adams, D.O., Yang, S.F., 1977. Methionine metabolism in apple tissue: implication of S-adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Plant Physiol*.60, 892-896.
- Adams, D.O., Yang, S.F., 1979. Ethylene biosynthesis. Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*76, 170-174.
- Aharoni, Y., 1968. Respiration of oranges and grapefruits harvested at different stages of development. *Plant Physiol*.43, 99-102.
- Aharoni, A., Keizer, L.C.P., Bouwmeester, H.J., 2000. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell*12, 647-661.
- Ahmed, A.E., Labavitch, J.M., 1980. Cell wall metabolism in ripening fruit. II. Changes in carbohydrate-degrading enzymes in ripening “Bartlett” pears. *Plant Physiol*.65, 1014-1016.
- Akamine, E.K., Goo, T., 1978. Respiration and ethylene production in Mammee apple (*Mammea americana* L.). *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*103, 308-310.
- Akamine, E.K., Goo, T., 1979a. Concentrations of carbon dioxide and ethylene in the cavity of attached papaya fruit. *HortScience*14, 138-139.
- Akamine, E.K., Goo, T., 1979b. Respiration and ethylene production in fruits of species and cultivars of *Pridium* and species of *Eugenia*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*104, 632-635.
- Akhavan, I., Wrolstad, R.E., 1980. Variation of sugars and acids during ripening of pears and in the production and storage of pear concentrate. *J. Food Sci.*45, 499-501.
- Alexander, L., Grierson, D., 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *J. Exp. Bot.*53, 2039-2055.
- Alscher, R.G., Castelfranco, P.A., 1972. Stimulation by ethylene of chlorophyll biosynthesis in dark-grown cucumber cotyledons. *Plant Physiol*.50, 400-403.
- Apelbaum, A., Burgoon, A.C., Anderson, J.D., Solomos, T., Lieberman, M., 1981. Some characteristics of the system converting aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. *Plant Physiol*.67, 80-84.
- Areas, J.A.C., LaJollo, F.M., 1981. Starch transformation during banana ripening: I – The phosphorylase phosphatase behaviour in *Musa acuminata*. *J. Food Biochem*.5, 19-37.
- Arens, D., Seilmeier, W., Weber, E., Kloos, G., Grosch, W., 1973. Purification and properties of a carotene cooxidizing lipoxygenase from peas. *Biochim. Biophys. Acta*327, 295-305.
- Avissar, Y.J., Moberg, P., 1995. The common origin of the pigments of life-early steps in chlorophyll biosynthesis. *Plant Photosynth. Res.*44, 221-242.
- Awad, M., Young, R.E., 1979. Postharvest variation in cellulose, polygalacturonase, and pectinmethylesterase in avocado (*Persea americana* Mill cv. Fuerte) fruits in relation to respiration and ethylene production. *Plant Physiol*.64, 306-308.
- Awad, M., Young, R.E., 1980. Avocado pectinmethylesterase activity in relation to temperature, ethylene and ripening. *J. Am. Hortic. Sci.*105, 638-641.