

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**INDUÇÃO PÓS-COLHEITA DA SÍNTESE DE
RESVERATROL E DE RESISTÊNCIA DE
FRUTOS A PODRIDÕES**

TESE DE DOUTORADO

Cláudia Kaehler Sautter

**Santa Maria, RS, Brasil
2008**

**INDUÇÃO PÓS-COLHEITA DA SÍNTESE DE
RESVERATROL E DE RESISTÊNCIA DE
FRUTOS A PODRIDÕES**

por

Cláudia Kaehler Sautter

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de
Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal,
da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutora em Agronomia

Orientador: Prof. Dr. Auri Brackmann

Santa Maria, RS, Brasil

2008

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Agronomia

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

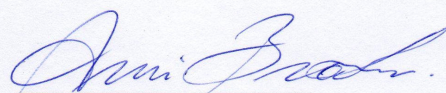
**INDUÇÃO PÓS-COLHEITA DA SÍNTESE DE RESVERATROL E
DE RESISTÊNCIA DE FRUTOS A PODRIDÕES**

elaborada por

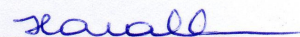
Cláudia Kaehler Sautter

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutora em Agronomia

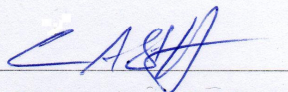
COMISSÃO EXAMINADORA:



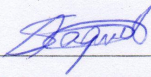
Auri Brackmann
Prof. Dr. – UFSM
(Presidente / Orientador)



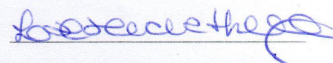
Mara Regina Rizzatti
Prof^ª. Dr^ª. – PUCRS



Cristiano André Steffens
Prof. Dr. – UDESC



Adriano Arriel Saquet
Prof. Dr. – CEFET-SVS



Luisa Helena Hecktheuer
Prof^ª. Dr^ª. – UFSM

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2008.

Sautter, Cláudia Kaehler

S261i

Indução pós-colheita da síntese de resveratrol e de resistência de frutos a podridões ; por Cláudia Kaehler Sautter ; orientador Auri Brackmann. – Santa Maria, 2008.

78 f. ; il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, RS, 2008.

1. Agronomia 2. Fitoalexinas 3. Elicitores 4. Irradiação ultravioleta 5. Ozônio 6. Acibenzolar-S-metil 7. Fosfito 8. Fruticultura I. Brackmann, Auri, orient. II. Título

CDU: 664.85

Ficha catalográfica elaborada por
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

© 2008

Todos os direitos autorais reservados a Cláudia Kaehler Sautter. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor.

Endereço: Caixa Postal 5065 CEP: 97105-970 Santa Maria, RS, Brasil.

Fone (0xx) 55 3226-3231; Endereço eletrônico: kaehler@terra.com.br

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese

*ao meu querido esposo Frank
por todo carinho, apoio e compreensão*

*aos nossos filhos,
Rúbens e Cecília
a alegria de nossas vidas*

e

*aos meus pais, Raul e Arly
pelos princípios, orientação e dedicação,*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Auri Brackmann, pela orientação e incentivo no caminho do conhecimento.

À professora Mara Regina Rizzatti, pelo auxílio na orientação num campo novo do conhecimento.

Aos professores Luisa Helena Hecktheuer, Fernando Texeira Nicoloso, Ricardo Silveiro Balardin, Carlos Augusto Malmann, Lindolfo Storck e Lia Rejane Silveira Reiniger pelo auxílio na orientação e confiança neste trabalho.

Aos meus colegas de doutorado, em especial ao Cristiano, Daniel, Ivan, Ricardo, Sérgio, Viviane e Liege por compartilharem as dúvidas e acertos.

Aos meus companheiros de pesquisa, Anderson Webber, Elizandra e Vanderlei que cresceram junto, nas dúvidas, trabalho e êxito de toda tese.

A todos os amigos do NPP, sempre presentes ao ouvir e auxiliar.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitotecnia, pelos conselhos, orientação e apoio.

À Vinícola Velho Amâncio, que cedeu gentilmente as amostras e suplementos.

Aos funcionários e estagiários do GFR-PUCRS e do LAMIC-UFSM, pelo auxílio e dedicação nas análises.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria

INDUÇÃO PÓS-COLHEITA DA SÍNTESE DE RESVERATROL E DE RESISTÊNCIA DE FRUTOS A PODRIDÕES

AUTORA: CLÁUDIA KAEHLER SAUTTER

ORIENTADOR: AURI BRACKMANN

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 de fevereiro de 2008.

Os objetivos deste trabalho foram alcançados em duas etapas. Na primeira etapa, o objetivo foi avaliar a presença de trans-resveratrol em frutos de clima temperado e a sua variação de concentração nesses frutos durante o período de armazenamento, assim como a evolução dos polifenóis totais e antocianinas totais. Avaliou-se o conteúdo de polifenóis totais, antocianinas totais e trans-resveratrol antes e após o armazenamento refrigerado e em atmosfera controlada, e após cinco dias de exposição a 20°C em kiwi 'Bruno', morangos 'Araza' e 'Yvahe', amora (*Morus nigra*), maçãs 'Galaxi', 'Gala' e 'Fuji', caqui 'Fuyu', mirtilo 'Bleugem', uvas 'Isabel', 'Merlot' e 'Niágara Rosada'. Detectou-se o trans-resveratrol *in natura* em polpa de kiwi 'Bruno', morangos 'Araza' e 'Yvahe' e amora 'Preta'. Nos demais frutos, detectou-se *in natura* trans-resveratrol na casca. O armazenamento refrigerado estimulou a síntese de trans-resveratrol em mirtilo 'Bleugem', uvas 'Isabel' e 'Merlot'. Na segunda etapa, o objetivo foi avaliar a indução da síntese de trans-resveratrol e sua possível ação como fitoalexina em maçãs 'Gala' e 'Fuji', armazenadas em atmosfera controlada. Realizaram-se experimentos com aplicação de elicitores abióticos: irradiação ultravioleta, fosfito e acibenzolar-S-metil, aplicados antes do armazenamento em atmosfera controlada, e ozônio aplicado de forma intermitente durante o armazenamento de maçãs 'Gala' e 'Fuji'. Realizou-se o controle de podridão em outro experimento com os mesmos elicitores. Na casca dos frutos analisaram-se trans-resveratrol, polifenóis totais e antocianinas totais, e o diâmetro de lesão após inoculação por *Penicillium sp.* Os elicitores abióticos induziram a síntese de trans-resveratrol em maçã 'Fuji' na seguinte ordem: Acibenzolar-S-metil > Fosfito ≥ irradiação UV-C ≥ ozônio, mas não apresentaram efeito em maçãs 'Gala', durante o armazenamento em atmosfera controlada. Os elicitores abióticos não apresentaram efeito no controle de podridão, com exceção do fosfito que controlaram a podridão em maçã 'Gala'. Não houve correlação entre a síntese de trans-resveratrol e o controle de podridão.

Palavras chave: Fitoalexinas; elicitores; irradiação ultravioleta (UV); ozônio; acibenzolar-S-metil (ASM); fosfito.

ABSTRACT
Doctoral Thesis
Graduate Program in Agronomy
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

**POST-HARVEST INDUCTION OF RESVERATROL SYNTHESIS
AND ROTTING CONTROL IN FRUITS**

AUTHOR: CLÁUDIA KAEHLER SAUTTER

ADVISER: AURI BRACKMANN

Date and Place of Defense: Santa Maria, February 27th, 2008

The objectives of this work were divided in two experiments phases. In the first phase, it was studied the presence of trans-resveratrol in temperate climate fruits and the variation of their concentration in these fruits during storage period, as well the amount of total phenols and total anthocyanins. It was evaluated total phenols, total anthocyanins and trans-resveratrol, before and after cold storage and under controlled atmosphere; and after five days shelf-life at 20°C in 'Bruno' kiwifruit; 'Araza' and 'Yvahe' strawberries; 'Black' mulberry; 'Galaxi', 'Gala' and 'Fuji' apples; persimmon 'Fuyu'; 'Bleugem' blueberry, 'Isabel', 'Merlot' and 'Niagara Pink' grapes. It was detected trans-resveratrol *in natura* in flesh 'Bruno' kiwifruit; 'Araza' and 'Yvahe' strawberries; 'Black' mulberry. In other fruits, it was detected trans-resveratrol *in natura* in the skin. The cold storage stimulated trans-resveratrol synthesis in 'Bleugem' blueberry, and 'Isabel' and 'Merlot' grapes. In the second phase, it was evaluated the induction of trans-resveratrol synthesis and its possible action as phytoalexin in 'Gala' and 'Fuji' apples stored in controlled atmosphere were evaluated. Experiments were with the application of abiotic elicitors: ultraviolet irradiation, phosphite and acibenzolar-S-methyl, applied before controlled atmosphere storage, and intermittent ozone applied during storage of to 'Gala' and 'Fuji' apples. Rot was controlled in another experiment with the same elicitors. In fruit bark it was analyzed trans-resveratrol; total phenols and total anthocyanins, as well as the diameter of injury after inoculation of *Penicillium sp.* The abiotic elicitors were induced in 'Fuji' apples trans-resveratrol synthesis in the following sequence: Acibenzolar-S-methyl > phosphite ≥ UV-C irradiation ≥ ozone, but it wasn't effective on 'Gala' apple. There was no correlation between the syntheses of trans-resveratrol and rotting control, with exception of phosphite was control of rot in 'Gala'.

Key words: Phytoalexin; elicitors; ultraviolet irradiation (UV); ozone; acibenzolar-S-methyl (ASM); phosphite.

LISTA DE FIGURAS

Figuras contidas no Capítulo 1:

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 - Diagrama de energia dos orbitais atômicos do átomo de oxigênio e a geração de espécies reativas de oxigênio, a partir da redução do oxigênio..... | 17 |
| FIGURA 2 - Esquema bioquímico dos principais processos envolvendo espécies reativas de oxigênio no cloroplasto..... | 18 |
| FIGURA 3 - Modelo cinético da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) na interação entre planta e patógeno em cultura de células..... | 20 |
| FIGURA 4 - Proposta da biossíntese do ácido salicílico em plantas..... | 25 |
| FIGURA 5 - Esquema da biossíntese de Scopoletin e Scopolin..... | 26 |
| FIGURA 6 - Estruturas químicas dos compostos de indutores de resistência sistêmica adquirida biossíntese..... | 26 |
| FIGURA 7 - Esquema bioquímico dos principais processos envolvendo espécies reativas de oxigênio induzidos por elicitores bióticos e abióticos..... | 27 |
| FIGURA 8 - Comparação das estruturas moleculares da celulose e da quitosana..... | 29 |
| FIGURA 9 - Diagrama da sinalização de ERO nos tecidos epidérmicos da folha expostos ao O ₃ | 31 |
| FIGURA 10 - Subestrutura do gene promotor <i>VstI</i> | 31 |
| FIGURA 11 - Interferência do ozônio e UV-B..... | 32 |
| FIGURA 12 - Estrutura de estilbenos: isômeros trans- e cis-resveratrol, glucosídeo, dímero e trímero de resveratrol..... | 35 |

Figuras contidas no Capítulo 2:

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 - Estrutura química dos isômeros trans-resveratrol e cis-resveratrol..... | 49 |
| FIGURA 2 - Biossíntese do trans-resveratrol..... | 57 |
| FIGURA 3 - Conteúdo de polifenóis totais, antocianinas totais e trans-resveratrol em uvas em pós-colheita..... | 59 |

Figura contida nas Considerações Finais

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 - Esquema bioquímico dos principais elicitores abióticos de trans-resveratrol envolvendo diversas vias metabólicas..... | 77 |
|--|----|

LISTA DE TABELAS

Tabelas contidas no Capítulo 1:

TABELA 1 - Produção de espécies reativas de oxigênio em plantas..... 17

TABELA 2 - Enzimas e compostos antioxidantes envolvidos na detoxificação de espécies reativas de oxigênio em plantas..... 19

Tabelas contidas no Capítulo 2:

TABELA 1 - Recuperação do analito trans-resveratrol em diversas matrizes..... 54

TABELA 2 - Conteúdo de polifenóis totais, antocianinas totais e trans-resveratrol em amora, kiwi, mirtilo e morango em pós-colheita..... 55

TABELA 3 - Conteúdo de polifenóis totais, antocianinas totais e trans-resveratrol em maçã e caqui em pós-colheita..... 58

Tabelas contidas no Capítulo 3:

TABELA 1 - Concentrações médias de compostos fenólicos e controle de podridão (*Penicillium* sp.) avaliados na saída da câmara e mais 5 dias a 20°C em função dos tratamentos em maçã 'Gala' armazenada em atmosfera controlada (AC) por oito meses a 0,5°C e maçã 'Fuji' armazenada em AC por sete meses a -0,5°C..... 74

TABELA 2 - Médias dos parâmetros físico-químicos avaliados na saída da câmara e mais 5 dias a 20°C em função dos tratamentos em maçã 'Gala' armazenada em atmosfera controlada (AC) por oito meses a 0,5°C e maçã 'Fuji' armazenada em AC por sete meses a -0,5°C..... 75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------------------|---|
| ABA | Ácido abscísico |
| AC | Atmosfera Controlada |
| ACC | Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico |
| AJ | Ácido jasmônico |
| AOX | Oxidase alternativa |
| APX | Ascorbato peroxidase |
| AR | Armazenamento Refrigerado |
| AS | Ácido salicílico |
| AsA | Ácido ascórbico |
| ASM | Acibenzolar-S-metil |
| AT | Acidez Titulável |
| BTH | Benzotiadiazol |
| C.V. | Coefficiente de Variação |
| CAD | Cinamil álcool desidrogenase |
| CAT | Catalase |
| CHS | Chalcona sintase |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. |
| cm | Centímetro |
| COX | Ciclooxigenase |
| cv. | Cultivar |
| 4-CL | 4-Cumarato CoA ligase. Possui sigla internacional (C ₄ H) |
| DAD | Detector com arranjo de diodos |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| ε | Coefficiente de extinção molar |
| EC | Nomenclatura internacional para identificação de estrutura e função enzimática. |
| ERO | Espécies Reativas de Oxigênio. Possui sigla internacional (ROS) |
| ETS | Estilbeno sintase. Possui sigla internacional (STS). |
| FAL | Fenilalanina amonialiase. Possui sigla internacional (PAL) |
| g | Constante gravitacional |
| g | Grama |
| GPX | Glutathiona peroxidase |
| GR | Glutathiona reductase |
| GSH | Glutathiona |
| IIN | Ácido 2,6-dicloroisonicotínico |
| IRO | Intermediários Reativos de Oxigênio |
| IRS | Indução de Resistência Sistêmica |
| J m⁻² | Joules por metro quadrado (unidade de dose) |
| JIPs | Jasmonato Induzido por Proteínas |
| kg | Quilograma |
| kJ m⁻² | Quilo Joules por metro quadrado (unidade de dose) |
| λ_{máx} | Comprimento de onda máximo |
| L | Litro |
| LDL | Lipoproteína de baixa densidade |
| LOOH | Lipoxigenases |

| | |
|-----------------------------|---|
| m | Metro |
| m.f. | Massa fresca |
| m.f.c. | Massa fresca de casca |
| MeJA | Metil jasmonato |
| MeSA | Metil salicilato |
| 1-MCP | 1-metilciclopropeno |
| µg | Micrograma |
| µl | Microlitro |
| µm | Micrômetro |
| µM | Micromol |
| ml | Mililitro |
| mm | Milimetro |
| mol | Mol |
| N | Newton (unidade de firmeza de polpa) |
| N | Normal (concentração de solução química) |
| <i>n</i> | número de repetições |
| nm | Nanômetro |
| NO* | Óxido Nitroso |
| °Brix | Graus Brix |
| °C | Graus Celsius |
| PET | Tomografia de emissão positrônica |
| POD | Peroxidases |
| PR | Proteínas relacionadas patogênese |
| PSI | Fotossistema I |
| PSII | Fotossistema II |
| RAS | Resistência Sistêmica Adquirida. Possui sigla internacional (SAR). |
| RH | Resposta de Hipersensibilidade |
| RNA_m | Ácido ribonucléico mensageiro |
| ROIs | Reativos Intermediários de Oxigênio |
| rpm | Rotações por minuto |
| s | Segundos |
| SOD | Superóxido dismutase |
| SST | Sólidos Solúveis Totais |
| TMS | Temperatura Mínima de Segurança |
| TMV | Vírus do mosaico do tabaco |
| UGTs | UDP-Glc:fenilpropanoide glucosiltransferases Possui sigla internacional (TOGT). |
| UV | Luz ultravioleta |
| UV-A | Luz ultravioleta do tipo A |
| UV-B | Luz ultravioleta do tipo B |
| UV-C | Luz ultravioleta do tipo C |
| <i>Vst1</i> | Gene <i>Vst1</i> , extraído de <i>Vitis</i> , que codifica a estilbeno sintase |
| W | Watt |
| pmol | Picomol |
| <i>ρ_a</i> | Probabilidade de acerto da correlação de Pearson |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO..... | 14 |
| CAPÍTULO 1 | 15 |
| 1. Revisão da literatura..... | 15 |
| 1.1. Estresse oxidativo..... | 16 |
| 1.2. Elicitores..... | 20 |
| 1.2.1. Tratamento térmico | 21 |
| 1.2.2. Ácido salicílico e correlatos na resistência sistêmica adquirida | 23 |
| 1.2.3. Jasmonato na indução de resistência sistêmica..... | 28 |
| 1.2.4. Quitosana | 29 |
| 1.2.5. Ozônio..... | 30 |
| 1.2.6. Luz ultravioleta | 32 |
| 1.2.7. Fosfito..... | 34 |
| 1.3. Resveratrol..... | 34 |
| 1.3.1. Resveratrol na saúde humana..... | 36 |
| 1.4. Referências..... | 39 |
| CAPÍTULO 2 | 47 |
| Síntese de resveratrol em frutos de clima temperado em sistemas de armazenamento refrigerado e atmosfera controlada | 47 |
| 2.1. Introdução | 49 |
| 2.2. Material e Métodos..... | 51 |
| 2.3. Resultados e discussão | 54 |
| 2.4. Conclusões..... | 60 |
| 2.5. Referências..... | 60 |

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO 3 | 63 |
| Síntese de trans-resveratrol e controle de podridões em maçãs com uso de elicitores em pós-colheita | 63 |
| 3.1. Introdução | 64 |
| 3.2. Material e Métodos..... | 66 |
| 3.3 Resultados e Discussão..... | 70 |
| 3.4 Conclusões | 72 |
| 3.5 Referências..... | 72 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 76 |
| GLOSSÁRIO..... | 78 |

INTRODUÇÃO

Durante o período de colheita de frutos geralmente ocorre uma oferta do produto acima da capacidade de consumo do mercado. Em decorrência disso, no segmento de maçãs, por exemplo, foi instalado um grande e bem equipado parque de armazenamento para manutenção da qualidade através do armazenamento refrigerado (AR) e atmosfera controlada (AC), que permite a programação das vendas para mercado interno e para exportação. Porém, ainda assim ocorrem grandes perdas decorrentes de podridões. A legislação brasileira coloca grande restrição ao uso de fungicidas após a colheita, pois resíduos destes podem oferecer risco de intoxicação ao consumidor. Exige-se então que o setor produtivo adapte suas técnicas de armazenamento para diminuir os resíduos de defensivos, o que dificulta o controle de podridões em pós-colheita, principalmente após o armazenamento.

Uma alternativa para conferir proteção dos frutos às podridões é estimular a produção de substâncias naturais, produzidas pelo próprio fruto para aumentar a resistência ou controlar o patógeno sobre o fruto. Estas substâncias denominam-se fitoalexinas e, entre elas, destacam-se os polifenóis, que não são tóxicos ao consumidor nas concentrações encontradas nos frutos. O resveratrol é uma fitoalexina, presente na uva, que, além de exercer sua função protetora na fruta, pode contribuir na alimentação do consumidor, pois apresenta atividades biológicas para saúde humana (nutracêuticas) como: antiinflamatório, induz a vasorelaxação, regulação do metabolismo lipídico, ação anticarcinogênica e atividade estrogênica (FRÉMONT, 2000).

Existem mecanismos abióticos, denominados elicitores, que podem alterar o metabolismo fenólico dos frutos, induzindo a biossíntese de polifenóis e também do resveratrol, sendo eles a irradiação com luz ultravioleta, a exposição ao ozônio e a injúria por dano mecânico (CANTOS *et al.*, 2000). O etileno também é considerado um elicitore, mas tem ação indireta sobre esta via metabólica dos polifenóis nos frutos. A literatura também sugere que os fosfitos e o acibenzolar-S-metil podem conferir proteção aos frutos contra patógenos. Portanto, há necessidade de se estudar indução de resistência dos frutos às podridões, melhorando assim o controle dos patógenos e acrescentado um valor nutracêutico ao fruto.

Desta forma, os objetivos desta tese foram: averiguar a presença de trans-resveratrol em frutos climatéricos e não climatéricos e sua conservação após o armazenamento; induzir a síntese de resveratrol com elicitores e avaliar a resistência de frutos à podridão em função da síntese de resveratrol, e também, determinar a dose hormética de irradiação ultravioleta mais adequada para indução de trans-resveratrol sem prejudicar a qualidade da fruta.

CAPÍTULO 1

1. Revisão da literatura

Os métodos para conservação de frutos em pós-colheita baseiam-se na determinação do ponto de maturação mais adequado ao fruto no momento da colheita e na redução do metabolismo, durante o armazenamento, para manutenção das características nutricionais, organolépticas e barreiras naturais do fruto, como integridade da casca, ceras e cutina, ao ataque de patógenos. Desta forma, utilizam-se, durante o armazenamento, baixas temperaturas, baixas pressões parciais O₂ e altas de CO₂ para reduzir a respiração do fruto e a produção e ação do etileno. O etileno estimula a maturação e senescência dos frutos, portanto a sua eliminação, através do permanganato de potássio ou queima catalítica, beneficia a conservação dos frutos. Para minimizar os efeitos do etileno sobre o amadurecimento, também é possível intervir no sítio de ligação do etileno com o uso do 1-metilciclopropeno (1-MCP), inibindo a ação de etileno no início do armazenamento (BRACKMANN *et al.*, 2004).

A inibição do crescimento do patógeno, geralmente fúngico, ocorre pela redução da temperatura, altas concentrações de CO₂ e baixas concentrações de O₂. O hipoclorito de sódio reduz a contaminação microbiana sobre o fruto antes do armazenamento e o cálcio auxilia a conservação através da queda do pH na superfície do fruto, suprindo parte do cálcio para manutenção da parede celular. Utilizam-se ceras naturais para evitar a desidratação e conferir brilho ao fruto, mas estas também contribuem como barreira física ao ataque de patógenos.

Todos estes métodos apresentam-se eficazes no controle de podridões durante o armazenamento, mas por vezes há necessidade de uma proteção prolongada após o armazenamento refrigerado. Quando os frutos são expostos a temperaturas mais elevadas, em torno de 20°C ou mais altas, o metabolismo do fruto é acelerado em função da produção de etileno, induzindo o aumento da respiração, com perda de firmeza de polpa, levando a susceptibilidade aos patógenos.

Os métodos acima mencionados utilizam o metabolismo primário do fruto que envolve controle da respiração, evitando a degradação de ácidos, açúcares e pectinas. Porém apenas as plantas possuem um metabolismo secundário, que ainda é pouco explorado na pós-colheita. Este metabolismo envolve a produção de substâncias como terpenóides, alcalóides,

fenóis simples e polifenóis (TAIZ; ZEIGER, 2004). O metabolismo secundário sintetiza fitoalexinas, quando é ativado por elicitores, isto é, fatores físicos (diferença de temperatura, irradiações, injúria mecânica) ou químicos (gases, sais, moléculas complexas ou patógenos). Os elicitores podem ser classificados como bióticos ou abióticos. Os elicitores bióticos podem ser de origem microbiana (elicitador exógeno) ou da própria planta (elicitador endógeno). Quimicamente, os elicitores bióticos são formados, em geral, por moléculas complexas, englobando carboidratos, glicoproteínas, polipeptídeos, enzimas, lipídios ou ácido fenólico (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Os elicitores de origem microbiana podem ser formados por estruturas intactas ou parte de fungos e células bacterianas. No caso dos elicitores endógenos, estes são formados por fragmentos da membrana plasmática como o ácido linoléico (CONCONI *et al.*, 1996) ou de material constituinte da parede celular da planta, que é liberado pela ação de enzimas que degradam a parede celular. Estas enzimas podem ser produzidas por fungos, bactérias ou pelas próprias células danificadas da planta (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Do ponto de vista da conservação do fruto, para o uso eficaz de elicitores bióticos deve-se extrair e purificar moléculas elicitoras que sejam facilmente absorvidas pela epiderme como o ácido salicílico ou jasmonato, ou por moléculas complexas como a quitosana. O etileno também é considerado um elicitador, porém desencadeia a maturação do fruto, que perde qualidade pela degradação de pectinas, o que facilita a contaminação fitopatológica (GRIMMING *et al.*, 2002; PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Os elicitores abióticos geralmente causam danos através do estresse oxidativo como a luz ultravioleta (UV), metais pesados como cloreto de mercúrio (HgCl_2) e cloridrato de alumínio (AlCl_3); acibenzolar-S-metil (ASM) entre outros (PASCHOLATI; LEITE, 1995; PERL-TREVES; PERL, 2002).

Os elicitores geralmente desencadeiam mecanismos de oxidação complexos durante a indução de fitoalexinas. Essas reações são denominadas de estresse oxidativo.

1.1. Estresse oxidativo

O oxigênio molecular, presente na atmosfera e na água, é essencial para o suporte da vida. As plantas, em particular, são capazes de sintetizá-lo como subproduto da fotossíntese, oxidá-lo na respiração e incorporá-lo em moléculas mais complexas através de várias enzimas oxigenases. A molécula O_2 , biologicamente, é pouco ou não-tóxica, mas os subprodutos gerados do metabolismo, denominados Espécies Reativas de Oxigênio (ERO, 'ROS' em

inglês) ou Intermediários Reativos de Oxigênio (IRO, 'ROIs' em inglês), são quimicamente reativos (MITTLER, 2002). As EROs têm alta difusão na célula e são capazes de reagir com moléculas orgânicas a fim de parear os elétrons, podendo levar à morte celular. Geralmente, resultam da excitação do oxigênio molecular (O_2) para formar oxigênio singlete (O_2^{-1}) ou pode ocorrer a transferência de um, dois ou três elétrons de uma molécula de O_2 para outra, formando respectivamente; radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou radical hidroxila (HO^\bullet)(Figura 1).

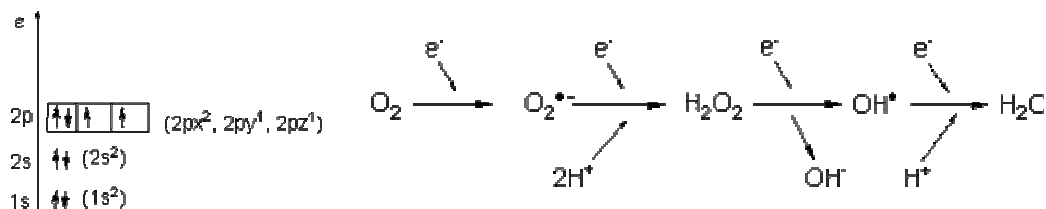


Figura1 - Diagrama de energia dos orbitais atômicos do átomo de oxigênio e a geração de espécies reativas de oxigênio, a partir da redução do oxigênio.

Existem muitas fontes potenciais de ERO em plantas (Tabela 1), sendo que a fonte mais estudada no estresse oxidativo em plantas é o cloroplasto (Figura 2). Entre as diversas fontes geradoras intracelulares de ERO, as mitocôndrias são as maiores fontes em animais e nos vegetais na pós-colheita. A produção de ânion superóxido (O_2^-) ocorre tanto nas mitocôndrias (através da oxidação da semiquinona à ubiquinona) como no retículo endoplasmático (através do citocromo P_{450}) e no citosol (através da xantina oxidase). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é gerado pelas mitocôndrias, retículo endoplasmático e citosol, a partir da dismutação do O_2^- catalisada pela superóxido dismutase (SOD), oxidando e simultaneamente reduzindo o peróxido de hidrogênio formando oxigênio molecular e água. No retículo endoplasmático, o peróxido de hidrogênio é gerado pela auto-oxidação do citocromo P_{450} (MARRONI, 2002).

Tabela 1 - Produção de espécies reativas de oxigênio em plantas (MITTLER, 2002).

| Produção de Espécies Reativas de Oxigênio | Localização | Espécie reativa primária |
|--|---------------------|--------------------------|
| Fotossíntese | Cloroplasto | O_2^- |
| Cadeia transportadora de elétrons e PSI e PSII | | |
| Respiração | Mitocôndria | O_2^- |
| Cadeia transportadora de elétrons | | |
| Glicolato oxidase | Peroxisomo | H_2O_2 |
| Excitação da clorofila | Cloroplasto | O_2^{-1} |
| NADPH oxidase | Membrana Plasmática | O_2^- |
| β -oxidação de ácidos graxos | Peroxisomo | H_2O_2 |
| Oxalato oxidase | Apoplasto | H_2O_2 |
| Xantina oxidase | Peroxisomo | O_2^- |
| Peroxidases (Mn^{2+} e NADH) | Parede celular | H_2O_2 e O_2^- |
| Amina oxidase | Apoplasto | H_2O_2 |

Nos últimos anos, novas fontes de ERO foram identificadas nas plantas, incluindo NADPH oxidases, amina oxidases e peroxidases vinculadas à parede celular (MITTLER, 2002).

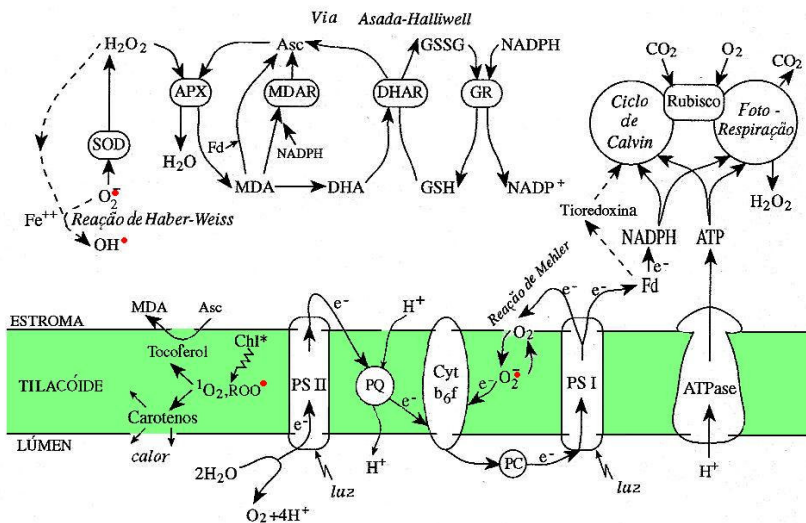


Figura 2 - Esquema bioquímico dos principais processos envolvendo espécies reativas de oxigênio no cloroplasto (PERL-TREVES; PERL, 2002).

Para corrigir estes eventos, a célula vegetal conta com enzimas reparadoras do estresse oxidativo, sendo as principais a catalase (CAT, EC 1.11.1.6), a peroxidase (POD, EC 1.11.1.7), a glutatona redutase (GR, EC 1.6.4.2), a ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) entre outras (Tabela 2). Portanto, para a sobrevivência da célula, o balanço entre a formação de ERO e a detoxificação destas espécies, através das enzimas reparadoras, é crucial. Em condições normais, num estado de equilíbrio, a produção de ERO em células é baixa ($240\mu\text{M s}^{-1}$ O_2^- e de $0,5\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ em cloroplastos), mas, quando a homeostase celular é perturbada, aumenta a produção de ERO de 240 para $720\mu\text{M s}^{-1}$ de O_2^- e 5 para $15\mu\text{M s}^{-1}$ de H_2O_2 (POLLE, 2001).

Tradicionalmente, as espécies reativas de oxigênio foram consideradas como sendo tóxicas. No entanto, nos últimos anos, há evidências de que as plantas produzem ativamente ERO como moléculas sinalizadoras para controlar processos como apoptose (morte celular programada), respostas ao estresse abiótico e defesa sistêmica sinalizadora (MITTLER, 2002). Segundo este autor, as espécies reativas de oxigênio podem ser vistas como indicadores de estresse e como mensageiros secundários envolvidos na transdução de sinal da resposta ao estresse. Estes incluem estresse hídrico e desidratação, estresse salino,

refrigeração, choque térmico, metais pesados, radiação ultravioleta, poluentes do ar, tais como o ozônio e SO₂, estresse mecânico, carências nutricionais e ataque de patógenos.

Tabela 2 - Enzimas e compostos antioxidantes envolvidos na detoxificação de espécies reativas de oxigênio em plantas (MITTLER, 2002).

| Enzimas e compostos envolvidos na limpeza de Espécies Reativas de Oxigênio | | Localização | Espécie reativa primária |
|--|------------------------|---|---|
| SOD | Superóxido dismutase | Cloroplasto, Citosol, Mitocôndria, Peroxissomo, Apoplasto | O ₂ ⁻ |
| APX | Ascorbato peroxidase | Cloroplasto, Citosol Mitocôndria, Peroxissomo, Apoplasto | H ₂ O ₂ |
| CAT | Catalase | Peroxissomo | H ₂ O ₂ |
| GPX | Glutaciona peroxidase | Citosol | H ₂ O ₂ e ROOH |
| GR | Glutaciona redutase | | |
| POD | Peroxidases | Parede Celular, Citosol, Vacúolo | H ₂ O ₂ |
| | Tioredoxina peroxidase | Cloroplasto, Citosol, Mitocôndria | H ₂ O ₂ |
| AsA | Ácido ascórbico | Cloroplasto, Citosol, Mitocôndria, Peroxissomo, Apoplasto | H ₂ O ₂ e O ₂ ⁻ |
| GSH | Glutaciona | Cloroplasto, Citosol, Mitocôndria, Peroxissomo, Apoplasto | H ₂ O ₂ |
| | α- Tocoferol | Membranas | ROOH e O ₂ ⁻ |
| | Carotenóides | Cloroplasto | O ₂ ¹ |
| AOX | Oxidase alternativa | Cloroplasto, Mitocôndria | O ₂ ⁻ |

Um mecanismo de resistência importante é a resposta de hipersensibilidade (RH) que é induzida ao redor do sítio de invasão do patógeno (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Esta resposta envolve um aumento da respiração e rápida produção de ERO que inicia uma série de eventos de reconhecimento entre planta e patógeno (PERL-TREVES; PERL, 2002). Durante esta interação, ocorre um aumento da geração de ERO. Este incremento na concentração pode apresentar-se de dois modos, conforme a patogenicidade. Quando a interação é compatível, microrganismo não patogênico, ocorre apenas um pico de ERO e o sistema antioxidante enzimático efetua a detoxificação, normalizando os níveis de ERO (Figura 3). Porém, quando não há compatibilidade, uma segunda resposta de defesa, em maior intensidade, é desencadeada. Sendo o microorganismo reconhecido como patógeno, o aumento de ERO é principalmente devido ao H₂O₂, que é segregado através da parede celular atuando como antimicrobiano (BRISSEON *et al.*, 1994). O teor de peróxido de hidrogênio mais elevado altera a permeabilidade de membrana, aumentando o fluxo de cálcio que gera a síntese de óxido nítrico desencadeando a RH que leva à morte celular (CASSELLS; DOYLE, 2003). Este mecanismo de defesa isola o patógeno fúngico ou bacteriano evitando seu crescimento e, quando o patógeno é viral, este é impedido de se movimentar na planta (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Na resposta de hipersensibilidade pode ocorrer, antes da morte celular, uma rápida insolubilização de proteínas. Esta precipitação conduz a um reforço da parede celular, e isso funciona como um mecanismo de defesa rápida na fase inicial de hipersensibilidade, antes da transcrição dos genes de defesa (BRISSON *et al.*, 1994).

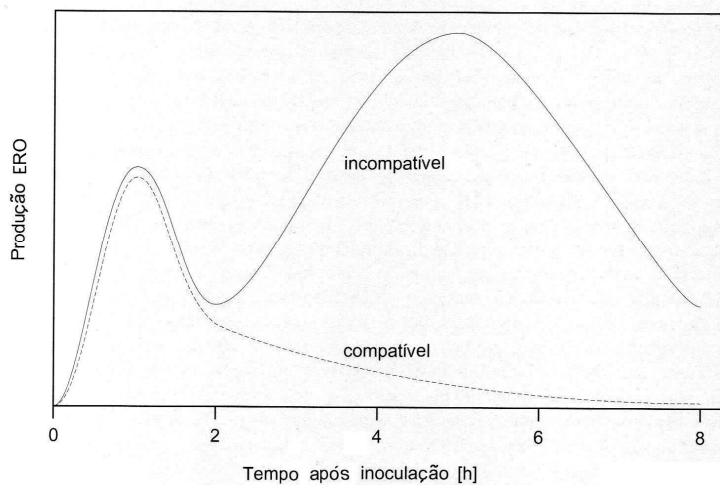


Figura 3 - Modelo cinético da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) na interação entre planta e patógeno em cultura de células (SCHEEL, 2002).

1.2. Elicitores

Os mecanismos que desencadeiam a defesa vegetal são complexos e, por vezes, interagem entre si. Os elicitores geralmente induzem algum tipo de estresse oxidativo que estimula diversas rotas do metabolismo secundário. Assim, a indução por alguns elicitores e suas respostas fisiológicas será descrita, conforme a seguinte seqüência:

- Tratamento térmico
- Ácido salicílico e correlatos na resistência sistêmica adquirida
- Jasmonato e indução de resistência sistêmica
- Quitosana
- Ozônio
- Luz Ultravioleta
- Fosfito

1.2.1. Tratamento térmico

O uso de técnicas empregando variações de temperatura é uma metodologia alternativa para o controle de podridões e distúrbios fisiológicos. Para cada fruto há uma temperatura mínima de segurança (TMS) já determinada, na qual a respiração é reduzida ao mínimo e não ocorre o desenvolvimento dos sintomas de dano pelo frio (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Porém, mesmo em TMS alguns patógenos ainda sobrevivem de forma latente nestas temperaturas (LUNARDI *et al.*, 2002a).

Há duas técnicas distintas em pós-colheita, as quais empregam diferença de temperatura para incrementar ou inibir a ação de enzimas. Um delas é o condicionamento térmico, que emprega temperaturas medianas (15 a 25°C) e altas (37 a 53°C) antes do armazenamento a frio. Outra técnica é o aquecimento intermitente, que consiste no armazenamento dos frutos a baixas temperaturas, próximas da TMS, e que em seguida, são expostos à temperaturas medianas por um ou dois dias, reativando o metabolismo do fruto e, em seguida, resfriados novamente a baixas temperaturas. Este processo pode ser repetido em ciclos. Esse tratamento deve ser realizado antes dos danos tornarem-se irreversíveis, o que varia de acordo com o produto (KLUGE *et al.*, 2006).

Os efeitos benéficos do uso de calor em frutos são: redução da carga microbiológica, indução da biossíntese de fitoalexinas, redução de sintomas de danos pelo frio (*chilling*) e até retardo da perda da firmeza de polpa em maçãs (LUNARDI *et al.*, 2002b). Porém, há relatos de perda de peso, alteração de cor da casca e polpa, aumento da síntese de etileno e, conseqüentemente, aumento da atividade respiratória (KLUGE *et al.*, 2006).

Os sintomas de danos pelo frio estão relacionados com a integridade das membranas que está intimamente ligada à temperatura em que o fruto se encontra. A composição da fase lipídica, relação de ácidos graxos saturados e insaturados, determina a fluidez desta membrana (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Os ácidos graxos saturados possuem uma cadeia lipídica linear que permanece unida à outra cadeia por forças de 'van der Waals'. Os ácidos insaturados não são completamente lineares e, portanto, diminuem as forças de coesão. Portanto, é necessária uma fluidez mínima para que as proteínas de membrana possam manter sua estrutura funcional em atividade. Com o aumento da temperatura as forças de ligação entre as moléculas lipídicas diminuem, aumentando a fluidez e diminuindo as interações eletrostáticas com as proteínas de membrana, podendo ocorrer a perda de íons, e conseqüentemente, a perda dos potenciais de membrana (TAIZ; ZEIGER, 2004). A situação

inversa também pode ocorrer, mas por mecanismos diferentes; sendo que quando a temperatura diminui, a fluidez da membrana também diminui, pois há maior interação na fase lipídica, podendo até ocorrer semi-cristalização e inativação das enzimas de membrana (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Quando a temperatura é inferior à TMS, as membranas permitem o fluxo de compostos químicos, assim como a perda de potenciais elétricos, extravasando eletrólitos. Este desarranjo estrutural acarreta a inviabilidade de processos bioquímicos gerando ERO. Os frutos de clima tropical têm, em suas membranas, um teor maior de lipídios saturados do que frutos de climas mais frios. Isto explica em parte a baixa tolerância ao frio dos frutos tropicais. O controle da fluidez da membrana está relacionado à modulação da síntese de ácidos graxos insaturados ou de ácidos graxos saturados (KLUGE, 2006).

Os tratamentos térmicos podem ser utilizados para induzir a atividade de enzimas antioxidativas ou para evitar a queda na sua atividade durante o armazenamento (WANG, 1995; SALA; LAFUENTE, 1999; 2000). SALA (1998), comparando a tolerância de tangerinas ao frio, observou que a cultivar Clementina era menos sensível à baixa temperatura de armazenamento, pois apresentava um sistema antioxidante mais eficiente, mantendo alta a atividade da CAT, APX e GR, durante o armazenamento sob baixa temperatura (2,5°C).

Quando uma planta sofre estresse térmico por elevação de temperatura, entre 5 a 10°C, desencadeia-se a produção de uma série de proteínas denominadas “proteínas de choque térmico”, em inglês *heat shock proteins* (HSPs). Estas proteínas variam seu tamanho de acordo com a temperatura. Classificam-se de acordo com o peso, 57 a 114kDa, como HSP60, HSP70, HSP90 e HSP100, sendo encontradas no citosol, mitocôndrias e cloroplastos. Apenas as smHSP de 15 a 30kDa estão presentes também no retículo endoplasmático. A função destas proteínas é atuar como chaperonas moleculares, efetuando a manutenção da estrutura espacial de outras proteínas que sofreram com a alteração da temperatura (TAIZ; ZEIGER, 2004). Com as funções protéicas preservadas, a planta pode suportar variações de temperatura sem sofrer danos fisiológicos, portanto a planta adquire a termotolerância ao frio ou calor.

O estresse térmico também desencadeia alteração na composição de compostos fenólicos. Na via fenilpropanóides, a enzima chave é a fenilalanina amonialiase (FAL, EC 4.3.1.5). Esta enzima aumenta sua atividade e sua biossíntese, sob a influência de temperatura. RIVERO *et al.* (2001) mostram uma correlação entre FAL e aumentos de compostos fenólicos em tomate (*Lycopersicon esculentum*) através do estresse térmico. A luz e a temperatura têm um forte efeito sobre os compostos fenólicos, acumulando-se na polpa e casca de maçã ‘Fuji’. BAKHSHI; ARAKAWA (2006) observaram que a temperatura ótima

para a síntese de ácidos fenólicos, antocianinas e flavonóides é de 24°C. A formação de flavonóides e antocianinas são desencadeadas pela chalcona sintase (CHS, EC 2.3.1.74); e os estilbenos, outra família de polifenóis que tem como precursor o resveratrol, são catalisados pela estilbeno sintase (STS, EC 2.3.1.95, EC 2.3.1.146). Ambas as vias são ativadas pela temperatura em uvas, especialmente na cv. Isabel (SAUTTER, 2003). Mas um breve choque térmico a 45°C pode inativar a FAL, em folhas de alface, portanto o choque térmico pode ser utilizado também como branqueamento (SALTVEIT, 2000; KANG; SALTVEIT, 2003).

No Brasil, desde a década de 90, o tratamento hidrotérmico vem sendo utilizado para desinfestação pós-colheita de frutas, objetivando o controle das espécies quarentenárias: *Anastrepha obliqua* (Macquart), *A. fraterculus* (Wied.) e *Ceratitis capitata* (Wied.), atendendo às exigências quarentenárias do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) (MENDONÇA *et al.*, 2000). A aplicação de tratamento térmico para controle de podridões novamente se mostra promissor, mas com menos resultados positivos do que a desinfestação de insetos, pois a temperatura elevada pode aumentar a sensibilidade à recontaminação por patógenos. Porém, a imersão em água quente reduz as podridões em maçãs cv. Fuji (LUNARDI *et al.*, 2002a) e tomate (BARKAI-GOLAN *et al.*, 1993).

1.2.2 Ácido salicílico e correlatos na resistência sistêmica adquirida

Outro mecanismo de defesa é a resistência sistêmica adquirida (RAS) (*Systemic Acquired Resistance - SAR*), que é um fenômeno caracterizado por um aumento do nível de resistência em toda a planta, sem alterações de sua base genética. Esta proteção induzida é dependente do intervalo de tempo entre a indução por elicitores, sinalização entre células ou no sistema através dos vasos, transdução de sinal nas células e síntese de fitoalexinas, impedindo o crescimento do patógeno (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Porém, VERNOOIJ *et al.* (1994), apesar de obterem resultados consistentes com um modelo de indução da RAS em tabaco no local da necrose patógeno-induzida, concluíram que ocorre a produção de um elemento não identificado que é móvel no xilema e floema, o que exige a presença de ácido salicílico em tecidos distantes da lesão para o estabelecimento do estado resistente. A maioria dos estudos para elucidar esta resposta sistêmica trabalham com plantas transgênicas de tabaco e *Arabidopsis*, que exprimem o gene *nahG* que codifica uma salicilato hidroxilase, originalmente de *Pseudomonas*. Esta enzima converte o ácido salicílico em catecol (Figura 4), tem-se então plantas insensíveis à resposta de hipersensibilidade e, portanto, teoricamente sem

transdução de sinal para ácido salicílico (CONRATH *et al.*, 2001). Isto gera controvérsias a respeito da identificação do sinalizador no sistema. De modo geral, é consenso que a resposta sistêmica adquirida envolve principalmente o ácido salicílico como sinalizador e que a indução de resistência sistêmica a patógenos tem como sinalizador o jasmonato em conjunto com o etileno (DURRANT; DONG, 2004; BOSTOCK, 2005).

O ácido salicílico (AS), o metil salicilato (MeSA), o ácido jasmônico (AJ) e o metil jasmonato (MeJA) são moléculas sinalizadoras endógenas de crescimento vegetal. São substâncias que desempenham papéis fundamentais na planta durante o crescimento e desenvolvimento, e também atuam na resposta ao ambiente (TAIZ; ZEIGER, 2004). Essas moléculas estão envolvidas em alguns sistemas de transdução de sinal, o que induz particularmente a biosíntese de enzimas que catalisam reações para formar compostos de defesa como polifenóis, alcalóides ou proteínas relacionadas patogênese (PR). A indução da RAS resulta na restrição do crescimento de fitopatógenos e na inibição ou diminuição dos sintomas da doença devido à ativação dos mecanismos de defesa da planta (TÖFOLI; DOMINGUES, 2005).

O ácido salicílico, que é derivado do ácido benzóico, pode ser sintetizado por duas vias, uma oxidativa e outra não oxidativa. Depois de formado, o ácido salicílico pode ser metilado formando o metil salicilato (MeSA), que é volátil, podendo ser um sinalizador entre plantas, pode ser glicolizado ou ser levado à catecol em plantas transgênicas (Figura 4). Estudos recentes mostram que o AS é sintetizado em resposta a vários elicitores abióticos, como o calor (DAT *et al.*, 1998), sal (BORSANI *et al.*, 2001), metais pesados (METWALLY *et al.*, 2003), ozônio e H₂O₂ (LEÓN *et al.*, 1995; MITTLER *et al.*, 2004). O ácido salicílico pré-formado, isto é, já existente na planta, protege a célula vegetal contra danos oxidativos causados e é, frequentemente, associado a um aumento de enzimas antioxidantes (DAT *et al.* 1998). Estas observações sugerem que as respostas das dicotiledôneas para ambos os estresse, bióticos e abióticos, partilham um caminho comum de sinalização mediada por ERO e formação AS e que está associada a este percurso, regulando o delicado equilíbrio entre a acumulação das ERO e atividade antioxidante.

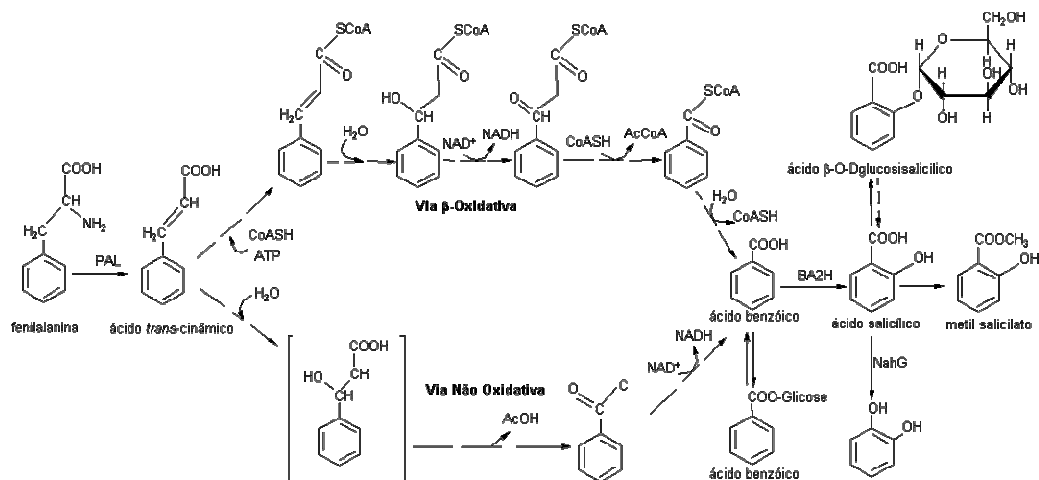


Figura 4 - Proposta da biossíntese do ácido salicílico em plantas (adaptado de RYALS *et al.* 1996 e TAIZ; ZEIGER, 2004).

A planta cataliza, através das UDP-Glc:fenilpropanoide glucosiltransferases (UGTs ou TOGT), a transferência da glicose UDP-Glc para muitos substratos fenólicos e regula a atividade de polifenóis, que desempenham papéis importantes na defesa da planta contra agentes patogênicos. CHONG *et al.* (2002), trabalhando com ácido salicílico em tabaco, demonstraram o envolvimento TOGT na glicosilação de scopoletin na planta e propuseram que a glicosilação, mediada pela TOGT, é necessária para acumulação de scopolin nas células ao redor da lesão causada por vírus do mosaico do tabaco (TMV). O glicosídeo scopolin atua diretamente como antiviral e também exerce um papel importante no tamponamento das espécies reativas de oxigênio (Figura 5). Este fato dá suporte à teoria de que a produção de polifenóis, além de serem fitoalexinas, servem também para remover as ERO nas células adjacentes ao foco da lesão, pois os fenóis são capazes de doar um próton de sua hidroxila para ERO e, ainda assim, manter-se estável através da ressonância do anel benzênico.

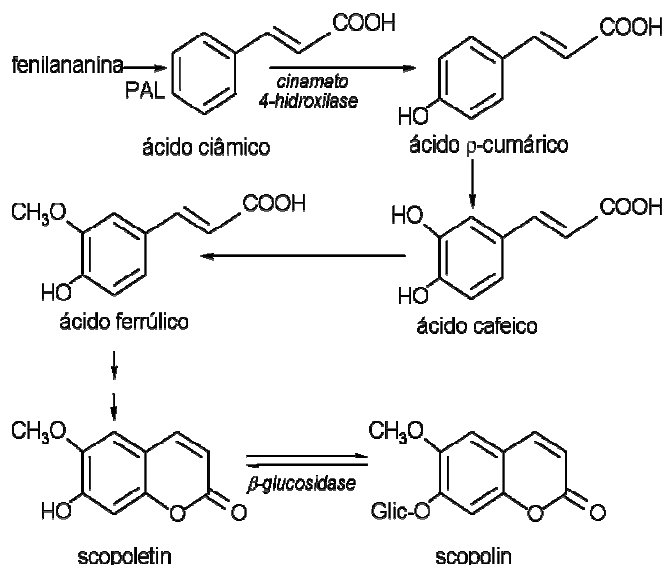


Figura 5 - Esquema da biossíntese de Scopoletin e Scopolin (CHONG *et al.* 2002)

O benzotiadiazol (BTH) ou acibenzolar-S-metil (ASM) (BION[®]) é um composto sintético considerado um ativador químico da resistência de plantas a doenças. Este produto não tem ação direta sobre o patógeno, mas sua estrutura espacial, semelhante ao ácido salicílico (miméticos) (figura 6), parece desenvolver papel importante na transdução de sinal (CONRATH *et al.*, 2001). Após a aplicação, o ASM é prontamente absorvido e translocado pela planta, gerando um sinal sistêmico que desencadeia a expressão de genes de defesa da planta.

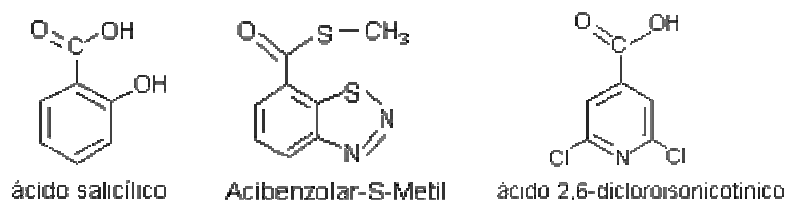


Figura 6 - Estruturas químicas dos compostos de indutores de resistência sistêmica adquirida biossintese.

O efeito do ácido salicílico e ASM sobre a ativação de genes de defesa depende do gene que está sendo monitorado. Em geral, trabalha-se com dois grupos de genes: um grupo são aqueles codificados para peroxidase aniótica e manitol desidrogenase e o segundo grupo são os de defesa representados pela FAL, 4-cumarato:CoA ligase, proteínas PR-10 e hidroxiprolina-glicoproteína. O primeiro grupo de genes apresenta resposta direta ao

tratamento (AS e ASM), já o segundo grupo a expressão é dependente da dose de elicitação, assim como as condições de cultivo celular (CONRATH *et al.*, 2001).

A figura 7 apresenta um esquema bioquímico dos principais processos envolvendo espécies reativas de oxigênio, induzidos por elicitores bióticos e abióticos e desencadeando a RAS. Neste esquema, a concentração de ácido salicílico interfere na regulação das enzimas antioxidantes. A catalase e a ascorbato peroxidase são blindadas pelo ácido salicílico, assim como a anidrase carbônica no cloroplasto, este fato nos leva à hipótese de que o AS poderia modular as ERO(s), de tal modo que permita conexões com outros processos fisiológicos (BOSTOCK, 2005). Este autor afirma que o AS tem a capacidade de blindar, com diferentes afinidades, a transição de metais (heme e não heme) em proteínas, contribuindo assim nos efeitos sobre a atividade enzimática.

A elevação do ácido cinâmico pode formar a cumaril-CoA que, em presença de malonil-CoA, forma um complexo que é disputado por duas enzimas: a chalcona sintase e a estilbeno sintase. Esta última enzima é codificada pelo gene *vst1*, que é sensível ao ozônio e ao etileno, formando o trans-resveratrol (GRIMMING *et al.*, 2002).

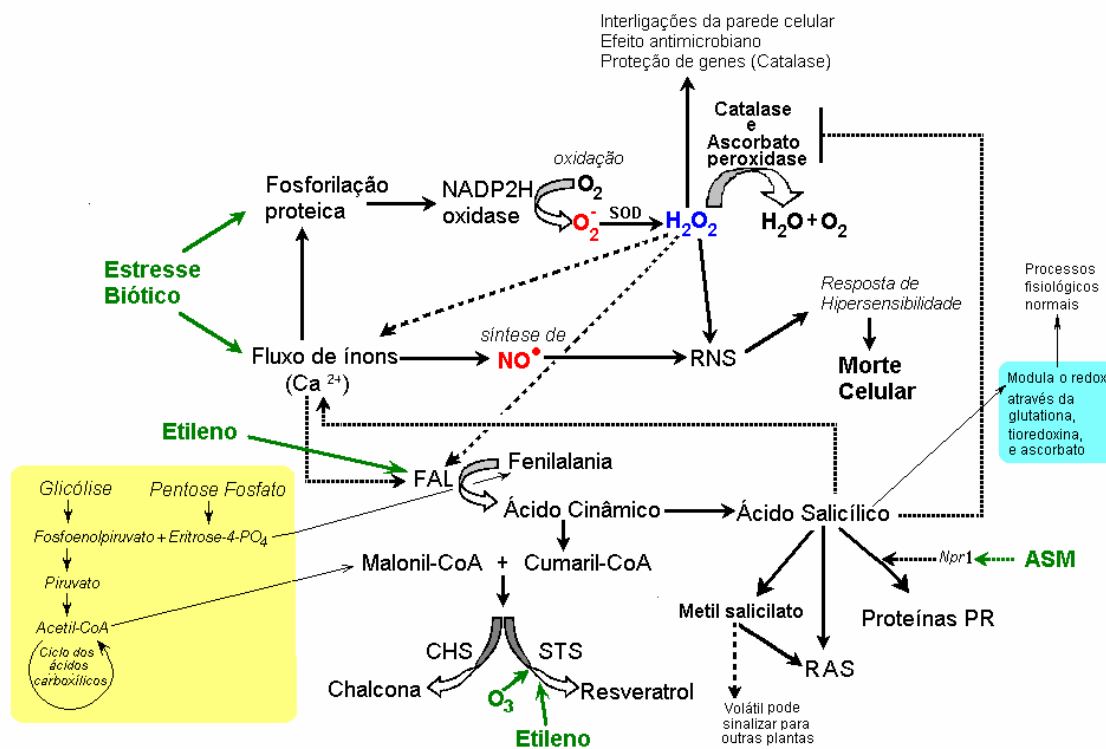


Figura 7 - Esquema bioquímico dos principais processos envolvendo espécies reativas de oxigênio induzidos por elicitores bióticos e abióticos (adaptado de CASSELLS; DOYLE, 2003; GRIMMING *et al.*, 2002; MITTLER, 2002; BOSTOCK, 2005; JOO *et al.*, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2005).

1.2.3 Jasmonato na indução de resistência sistêmica

Outro mecanismo de defesa é a indução de resistência sistêmica (IRS) que é um fenômeno caracterizado por um aumento do nível de resistência mediada pelo jasmonato. Inicialmente, os estudos sobre jasmonato restringiam-se sobre o papel no crescimento e desenvolvimento de plantas. Posteriormente, os estudos demonstraram que o jasmonato aumenta a expressão de genes envolvidos na defesa vegetal. Atualmente as pesquisas buscam esclarecer a função destas substâncias como moléculas sinalizadoras (PÉREZ *et al.*, 1997). Assim, o jasmonato induzido por proteínas (JIPs) foram detectados em todas as espécies testadas até agora, e diferentes hipóteses para o papel do MeJA, no mecanismo de defesa contra ferimentos, foram propostos (PENÁ-CORTÉS *et al.*, 1996).

THORPE *et al.* (2007) demonstraram que o jasmonato move-se rapidamente por toda planta, tanto pelo xilema quanto pelo floema. Esta observação foi possível, pois utilizaram moléculas de ácido jasmônico, marcadas por radio isótopos (^{14}C) no radical metil e detectados por cintilação na tomografia de emissão positrônica (PET). Estes autores acreditam que o metil jasmonato (MeJA), possivelmente, utilize os transportadores de sacarose, distribuindo-se mais rapidamente que os fotoassimilados, além de poder tramitar entre floema e xilema devido a volatilidade do MeJA. Isto aponta evidências de que o jasmonato pode ser um sinalizador na indução de resistência sistêmica. Outra função do metil jasmonato seria mediar resposta ao estresse por refrigeração e que a sua aplicação poderia reduzir os danos em plantas sensíveis ao frio (PÉREZ *et al.*, 1997).

A indução de resistência sistêmica a patógenos tem como sinalizador o jasmonato em conjunto com o etileno e não com o ácido salicílico (PIETERSE *et al.*, 1998). ISR é uma resistência contra os agentes patogênicos que se desenvolve na planta principalmente como resultado da colonização na raiz por certas rizobactérias (HAMMERSCHMIDT, 1999). Assim, como a RAS, ISR é de amplo espectro, na medida em que protege contra várias bactérias, vírus, fungos, nematóides e patógenos. A indução de resistência sistêmica tem sido demonstrada em muitas espécies vegetais. Estudos com mutantes de *Arabidopsis*, até agora, indicam que os precursores de ISR e SAR são distintos, mas convergem ao mesmo ponto de regulação transcricional NPR1 (Não-expressor de Proteínas de Resistência) (BOSTOCK, 2005). A ISR tem como precursor o ácido linoléico, que é liberado da membrana celular, e que ativa a via octadecanóide até a formação do ácido jasmônico (CONCONI *et al.*, 1996). Já a SAR depende da fosforilação protéica de receptores de membrana, ou do extravasamento de

Ca²⁺ no citoplasma. Estas duas vias ativam a FAL até a formação do ácido salicílico (CASSELLS; DOYLE, 2003).

1.2.4 Quitosana

A quitina, denominação usual para o polímero β -(1-4) 2-acetamido-2-deoxi-D-glicose (N-acetilglicosamina), é o precursor direto da quitosana (figura 8). A quitosana é, portanto, um biopolímero do tipo polissacarídeo de alto peso molecular, classificada como uma poliamina. Possui uma estrutura molecular quimicamente similar à celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais. Grupos hidroxila (OH) estão dispostos na estrutura geral do carboidrato para a celulose e grupos amino (NH₂) para a quitosana. É solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação do grupo amino, que confere propriedades especiais diferenciadas em relação às fibras vegetais. Podem ser biodegradadas através do “ciclo da quitina” com as enzimas hidrolíticas: lisoenzima (EC 3.2.1.17), quitinase (EC 3.2.1.14), quitina desacetilase e quitosanase. Estas são largamente distribuídas nos tecidos e fluidos corporais dos animais e plantas, e também no solo.

A quitosana atua diretamente sobre o patógeno como fungistático e fungicida, ou pode exercer o papel de elicitor, ativando várias respostas de defesa no tecido vegetal. A quitosana apresenta ação fungistática em vários estádios de desenvolvimento dos patógenos, afetando o crescimento micelial e a morfologia dos conídios, em diferentes fungos, inclusive de *B. cinerea* (CAMILI *et al.*, 2007).

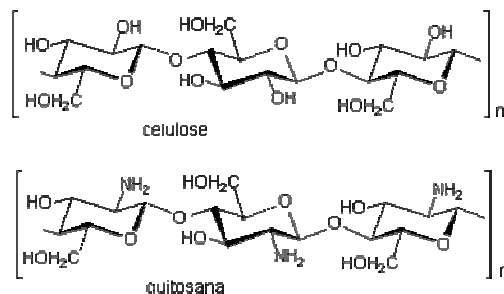


Figura 8 - Comparação das estruturas moleculares da celulose e da quitosana.

A parede celular de fungos, patogênicos ou não, tem em sua composição a quitosana, sendo indicado como elicitor ativo em paredes celulares, levando a percepção e transdução de

sinais externos para defesa (AGRAWAL *et al.*, 2002). Sendo um elicitor, a quitosana estimula diversos mecanismos de ação na planta como: o acúmulo de quitinase, síntese de inibidores de proteinase, lignificação, indução de calose e apoptose (PASCHOLATI; LEITE, 1995; IRITI *et al.*, 2006). Ela induz também a atividade da fenilalanina amonialiase, a produção de fitoalexinas e peróxido de hidrogênio (AGRAWAL *et al.*, 2002). A quitosana pode ligar-se à pectina nos frutos, interferindo na atividade de poligalacturonases secretadas por fungos, além de intensificar e regular a produção de celulose no hospedeiro. Também causa severos danos citológicos no micélio do patógeno (GHAOUTH *et al.*, 1997).

1.2.5. Ozônio

O ozônio é considerado um gás poluente que causa estresse oxidativo nos tecidos das plantas, mas este estresse ainda não está bem elucidado. O ozônio (O_3) é uma molécula altamente energética que libera oxigênio singlete ($\frac{1}{2} O_2^-$). A sensibilidade ao ozônio é diferente entre as diversas espécies e até mesmo cultivares. O ozônio penetra nos tecidos vegetais através dos estômatos e seu primeiro contato é com o fluído do apoplasto. Em meio aquoso, o O_3 produz H_2O_2 e, subseqüentemente, OH^- , através da reação de Haber-Weiss (MANO, 2002). Alternativamente, O_3 pode produzir OH^- por redução. O ácido ascórbico, presente no apoplasto, é a primeira barreira de defesa, reduzindo a concentração de OH^- (ZENG *et al.* 2000), mas a regeneração do ácido ascórbico ainda não é conhecida.

As células-guarda contam com uma série de proteínas que sinalizam o estresse e entre elas encontram-se as proteínas G, que são subdividas em três frações α , β e γ . O papel destas proteínas G e das ERO, está relacionada à sinalização da resposta ao estresse oxidativo. Esta resposta, complexa e pouco conhecida, é mediada pelo ácido abscísico (ABA). A oxidação na superfície da célula (figura 9) ativa, direta ou indiretamente, a proteína G heterotrimérica, que ativa, por sua vez, a produção de ERO em diferentes compartimentos celulares (JOO *et al.*, 2005). As ERO, produzidas na superfície da célula por NADPH oxidases, vinculadas à membrana, atuam sobre os canais cálcio da membrana plasmática da célula-guarda (KWAK *et al.*, 2006) e podem estimular a produção de ERO em células adjacentes. Assim, a ERO, na superfície celular, tanto influencia na retro-alimentação quanto no estado fisiológico da célula-guarda e serve como um sinal intercelular. O cloroplasto influencia a produção de ERO na superfície da célula e também, na produção de sinal intercelular (JOO *et al.*, 2005).

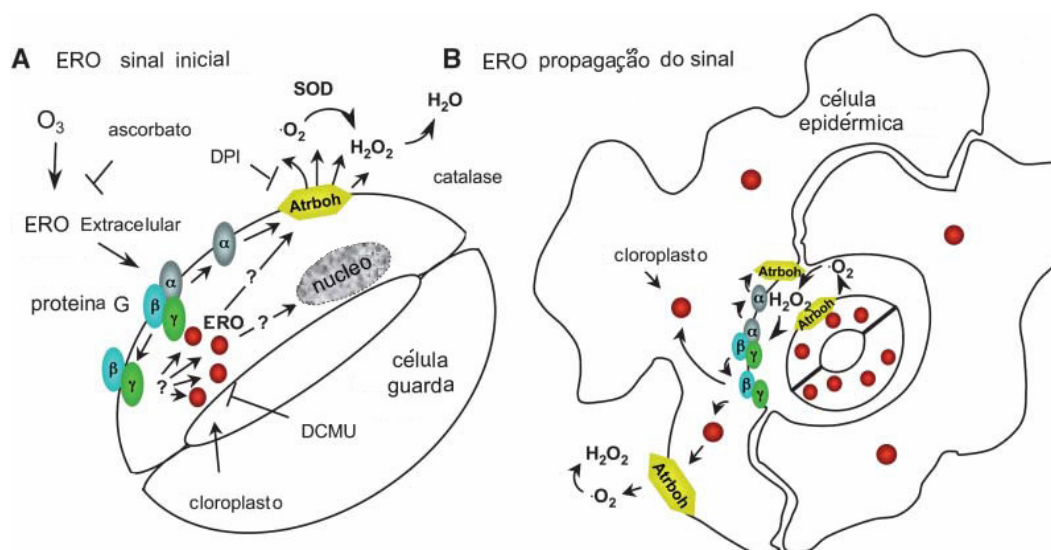


Figura 9 - Diagrama da sinalização de ERO nos tecidos epidérmicos da folha expostos ao O_3 .
 A) Estresse oxidativo ativa a proteína G sinalizando a membrana da célula guardada e cloroplastos. Ascorbato suprime a acumulação das primeiras espécies de O_3 oxidativo, DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilureia) - inibe a cadeia transportadora de elétrons no cloroplasto. (B) O diagrama mostra a propagação de sinal no início do estresse oxidativo. Ativação de NADPH oxidases vinculadas à membrana (AtrbohD e AtrbohF) (JOO *et al.*, 2005).

Sem esta primeira defesa, o ozônio decompõe a parede celular e a plasmalema e ativa espécies reativas de oxigênio que, por sua vez, sinalizam a resposta de defesa geralmente levando a resposta de hipersensibilidade e morte celular (LANGEBARTLES *et al.*, 2002). Esta resposta pode ser mediada pelo etileno, ácido salicílico e jasmonato, que atuam como mensageiros adicionais na expressão do gene ozônio-induzido (RAO *et al.*, 2000). O estresse oxidativo estimula a FAL, desencadeando a formação de polifenóis e posterior oxidação destes, enzimaticamente através da polifenoloxidase ou não, conferindo uma coloração parda (CASSELLS; DOYLE, 2003; SALTVEIT, 2000). O ozônio parece estimular diretamente o gene *Vst1* (figura 10); já o etileno está envolvido indiretamente na indução dos estilbenos (GRIMMING *et al.*, 2002). A expressão do gene ozônio-induzido pode ocorrer tanto por via etileno-dependente como por outra via independente do etileno (GRIMMING *et al.*, 2003).

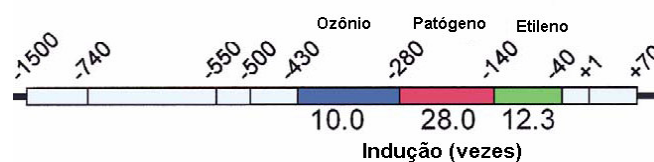


Figura 10 - Subestrutura do gene promotor *Vst1*. As regiões responsáveis pelo ozônio, patógeno e etileno estão indicadas, assim como os valores de indução (GRIMMING *et al.*, 2002).

O ozônio está envolvido em interações com outras respostas fisiológicas ao estresse. Este fenômeno tem sido denominado como indução cruzada (cross-induction) (LANGEBARTLES *et al.*, 2002). Isto explica o fato de que muitos estudos encontram as mesmas vias de sinalização para estresses diferentes. Deste modo, o uso de elicitores abióticos confere resistência contra patógenos. Um exemplo claro desta indução cruzada são as interações ocorridas entre o ozônio e a irradiação UV-B (figura 11). Estes elicitores ativam moléculas sinalizadoras como o etileno, peróxido de hidrogênio, produtos da via de lipogênese, jasmonato e salicilato, que também estão relacionadas à defesa contra patógenos.

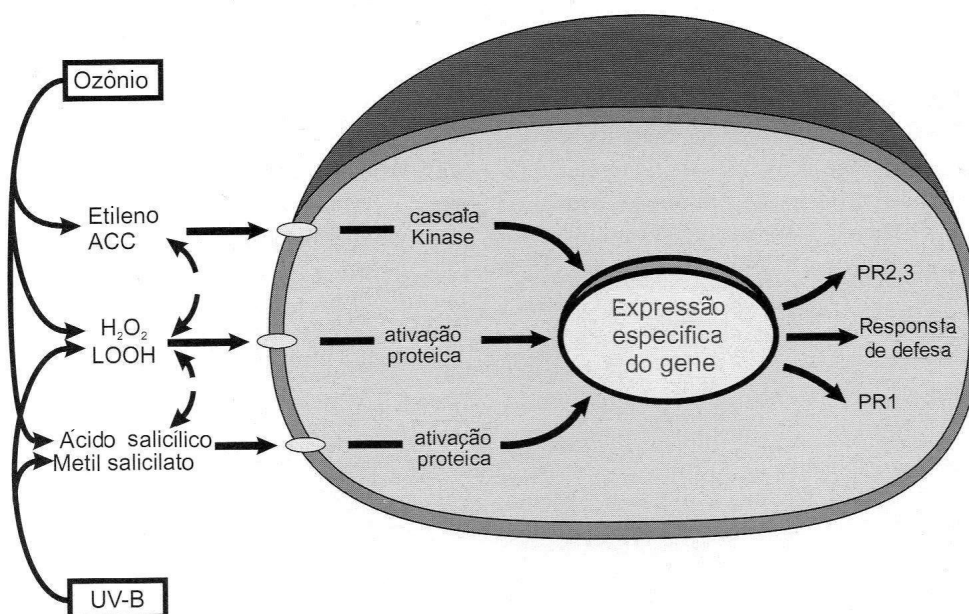


Figura 11 - Interferência do ozônio e UV-B (LANGEBARTLES *et al.*, 2002). Nomenclatura: ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico), LOOH (lipoxigenases) e PR (proteínas relacionadas à patogênese).

1.2.6. Luz ultravioleta

O aumento do fluxo de radiação ultravioleta sobre a superfície terrestre é consequência da depleção do ozônio da estratosfera. As plantas, durante o crescimento e o desenvolvimento, utilizam muitas famílias de fotoreceptores, sendo capazes de captar fótons na região visível do espectro eletromagnético (400 a 780 nm). Os comprimentos de ondas de 100 a 400 nm formam a radiação ultravioleta (UV), que foi subdividida em comprimentos de ondas de acordo com as características dos danos biológicos: UV-A (315–400 nm), UV-B

(280–315 nm) e UV-C (100–280 nm). As plantas utilizam a radiação UV-A e UV-B para regular adaptações à insolação e ao fotoperíodo (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Estudos clássicos de fotobiologia demonstraram que as plantas são mais sensíveis a luz UV-B, UV-A/azul, luz vermelha (650-680 nm) e luz vermelho-distante (710-740 nm) (CHEN *et al.*, 2004). Existem duas famílias de receptores UV-A/ azul, as fototropinas e as criptotropinas bem estudadas. Uma terceira família (FKF1) de receptores da luz azul foi descoberta (IMAIZUMI *et al.*, 2003).

Os efeitos deletérios da irradiação UV-B em plantas tem sido estudada extensivamente. Os danos causados pela UV-B no fotosistema II envolve o desemparelhamento de elétrons na cadeia transportadora de elétrons e dano estrutural nas proteínas do centro de reação, sendo iniciado pela proteína D1 (PERL-TREVES; PERL, 2002). Porém, a luz UV-B está também relacionada à regulações fisiológicas como a inibição da alongação de cotilédones (TAIZ; ZEIGER, 2004). O fotoreceptor para UV-B é desconhecido e também não é ativado por fototropinas, criptocromos ou fitocromos. São necessários dois genes, um deles é o ULI13, que codifica proteínas de função desconhecida. Este gene é requerido apenas para irradiação UV-B. O segundo gene é HY5, que é requerido para todas as irradiações (CHEN *et al.*, 2004).

A radiação UV-B induz acúmulo de enzimas antioxidantes como a SOD. A iluminação com UV-B sobre membranas isoladas do tilacóide produzem radicais livres (OH[•] e ROOR), mas não formam oxigênio singleto (PERL-TREVES; PERL, 2002).

LANGCAKE; PRICE (1977) acreditavam que o DNA era um fotoreceptor para resposta abiótica. Em seu estudo fizeram uma varredura com irradiações UV em uvas e determinaram que o pico máximo de produção de resveratrol se dá em torno de 260-270nm. A alta produção de resveratrol, neste comprimento de onda, é confirmada em vários trabalhos (ADRIAN *et al.*, 2000; CANTOS *et al.*, 2000; SAUTTER, 2003; GONZÁLEZ-BARRIO *et al.*, 2006). Porém, esta teoria de que o DNA seja o fotoreceptor não foi comprovada por outros autores. A teoria mais aceita, baseada na RAS, é de que a irradiação UV-C gere espécies reativas de oxigênio e estas iniciem a resposta de defesa, induzindo a rota dos fenilpropanóides (MITTLER, 2002), além do fluxo de íons de cálcio (CASSELLS; DOYLE, 2003) e, possivelmente, indução dos estilbenos (ainda não comprovada).

CONCONI *et al.* (1996) propuseram outro mecanismo de ação, baseada na IRS, com irradiação UV-C em tomate. Estes autores observaram que, entre as radiações ultravioleta, apenas a radiação UV-C é capaz de causar dano ao DNA e também causar ruptura da membrana celular, liberando o ácido linoléico, que desencadeia a rota do ácido octadecanóide,

sintetizando o jasmonato e, por fim, ativando os genes de defesa. Tanto a radiação UV-C quanto a UV-B são capazes de ativar os genes inibidores de proteinases. Apenas a UV-B estimula a síntese de proteínas PR1a, PR3a e PR3. Estes autores propuseram então que a ativação do sistema de defesa seria acionada pelo dano do DNA ou pela ativação das lipases ou pela perturbação da membrana celular. Esta conclusão aproxima-se da hipótese de LANGCAKE; PRICE (1977), porém ainda não relaciona o fato de que o DNA é o fotoreceptor para os estilbenos.

1.2.7 Fosfito

O fosfito P_2O_5 (pentóxido de fósforo) tem sido relacionado ao aumento da zona bloqueadora da necrose, rápida mudança citológica através da migração nuclear, deposição de papila e aumento da resposta de hipersensibilidade levando à morte celular (GUEST; GARNT, 1991). No hospedeiro, também ocorre a biossíntese de etileno, aumento da respiração, ativação da fenilalanina amonialiase, lignificação e ativação do metabolismo das pentoses-fosfato. Entre as fitoalexinas encontram-se sesquiterpenóides em tabaco e fenóis que não são definidos (GUEST; GARNT, 1991). Já em feijão-fradinho (*Vigna unguiculata*), experimentos com fosfanato demonstram o acúmulo de fitoalexinas como kievitone e faseolidina em plantas infectadas (SAINDRENAN *et al.*, 1990). JACKSON *et al.* (2000), estudando eucalipto, não observaram mudanças significativas em duas enzimas-chave da síntese de diversos fenóis simples (4-coumarato CoA ligase [4-CL], cinamil álcool desidrogenase [CAD]), mas observaram que, quando a concentração de fosfito é alta, o modo de ação é direta sobre o fungo, e que, quando a concentração é baixa, a planta tem um incremento em sua resistência natural. Até o momento, não há relatos do uso de fosfito como elicitador de resveratrol.

1.3. Resveratrol

Os estudos sobre resveratrol iniciaram nos anos 70. O primeiro relato sobre resveratrol foi na União das Repúblicas Socialistas Soviéticas em 1972, em cascas de *Pinus sibirica* (TYUKAVKINA *et al.*, 1972). Em 1976, LANGCAKE e PRYCE avaliaram pela primeira vez a presença do isômero trans-resveratrol em *Vitis vinifera* e outros membros da família

Vitaceae. Em 1977, esses mesmos autores sintetizaram *in vitro* o ϵ -viniferin, que é o primeiro dímero da família dos estilbenos, e ,dois anos, depois identificaram o trans-pterostilbeno (glucosídeo de resveratrol).

Mais tarde, nos anos 80, foram iniciadas algumas pesquisas sobre efeitos biológicos do resveratrol, e só em meados dos anos 90 os estudos sobre resveratrol tornaram-se mais frequentes devido ao “paradoxo francês”, que direcionou o foco das pesquisas para a saúde. Este paradoxo deve-se ao fato dos franceses, mesmo ingerindo uma dieta rica em lipídios, apresentarem uma baixa incidência de doenças cardio-circulatórias, isto sendo explicado pelo consumo regular de vinho (RENAUD; LORGERIL, 1992). Atribui-se aos polifenóis, em especial ao resveratrol, a capacidade de reduzir as lipoproteínas sanguíneas.

O resveratrol é uma fitoalexina da família dos estilbenos presente nas plantas. A uva possui concentrações elevadas de polifenóis e, em especial, de resveratrol (MELZUCH *et al.*, 2001). Também há relatos da presença de resveratrol em eucalipto, amendoim e amora (HILLIS *et al.*, 1974; BURNS *et al.*, 2002). Sua composição química é 3,5,4'-trihidroxiestilbeno e possui dois isômeros ópticos *cis*-resveratrol e *trans*-resveratrol (Figura 12). O *trans*-resveratrol é a forma mais comumente encontrada, mas também pode estar ligada a uma molécula de açúcar formando um glucosídeo ou polimerizado. A forma *trans*-resveratrol é fotossensível, sendo transformada em *cis*-resveratrol (MELZUCH *et al.*, 2001).

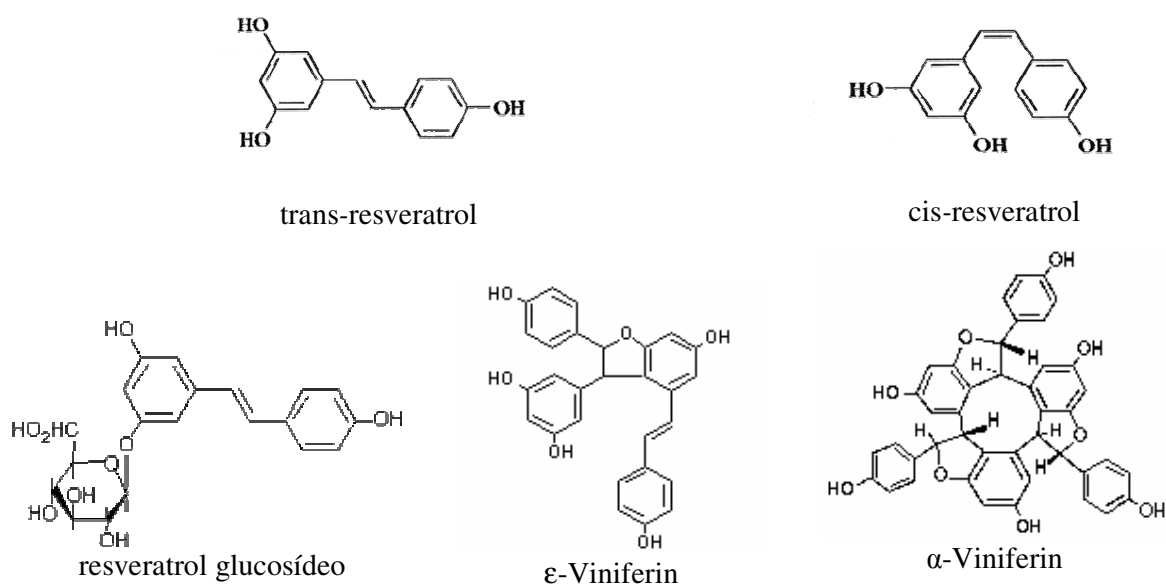


Figura 12 - Estrutura de estilbenos: isômeros *trans*- e *cis*-resveratrol, glucosídeo, dímero e trímero de resveratrol.

A biossíntese do trans-resveratrol parte de uma molécula de *p*-cumaril-CoA e três moléculas de malonil-CoA, formando uma molécula instável que pode formar chalcona ou resveratrol em presença das enzimas chalcona sintetase e estilbeno sintetase, respectivamente (figura7).

A uva sintetiza o resveratrol como resposta à desordem metabólica causada através de agressões à sua casca, como danos mecânicos, irradiação ultravioleta (LANGCAKE; PRICE, 1977; CANTOS *et al.*, 2000), ozônio, etileno (GRIMMIG *et al.*, 2002) cloridrato de alumínio (ADRIAN *et al.*, 1996) e ataque de patógenos fúngicos, em especial *Botrytis cinerea* (JEANDET *et al.*, 1995) e *Plasmopora viticola* (LANGCAKE, 1981; DAÍ *et al.*, 1995).

A característica de fitoalexina foi estabelecida por LANGCAKE (1981), que estudou a resistência de videiras inoculadas com *Botrytis cinerea* (mofo cinza) e *Plasmopora viticola* (míldio), e constatou que, no local infectado, havia aumentado a concentração de ϵ -viniferin, α -viniferin e pterostilbeno, sugerindo que estes estilbenos são responsáveis pela resistência da videira. Porém, a infecção por *Botrytis cinerea* é necessária para aumentar a concentração de resveratrol, mas uma contaminação excessiva por *Botrytis* diminui consideravelmente esta fitoalexina (JEANDET *et al.*, 1995). Particularmente, este patógeno produz enzimas lacase e estilbeno oxidase, que metabolizam o trans-resveratrol, degradando a trans-resveratrol dehidrodímero (BREUIL *et al.*, 1998).

DAÍ *et al.* (1995) constataram que espécies de videiras de resistência intermediária (*Vitis rupestris* cv. *Du lot*), após cinco dias de inoculação com o fungo *Plasmopora viticola*, apresentaram dois compostos em suas folhas, uma fitoalexina (resveratrol) e uma enzima (peroxidase). Estas foram detectadas após oito dias da inoculação. A lignina formou-se no tecido circulante da necrose após quinze dias. Portanto, caracteriza-se uma resposta de hipersensibilidade, desencadeada pela fosforilação protéica e aumento da permeabilidade de membrana ao cálcio. Possivelmente seja uma resposta sistêmica induzida pelo patógeno, pois havia alta concentração de peroxidase e, portanto, esta não teria sido inibida pelo ácido salicílico.

1.3.1. Resveratrol na saúde humana

O interesse pelo estudo do resveratrol na saúde deve-se ao fato de que ele participa de muitas atividades bioquímicas de interesse para a qualidade de vida, assim como para a longevidade. A “Teoria dos Radicais Livres” propõe que estes radicais favorecem o acúmulo

de efeitos prejudiciais a diversos tecidos, conduzindo a alterações associadas à idade (TUNÓN; JIMÉNEZ, 2002). Consideram-se radicais livres quaisquer espécies químicas que contenham um ou mais elétrons desemparelhados, podendo ser produtos de oxidação lipídica, compostos nitrogenados, entre outros, mas principalmente as espécies reativas de oxigênio.

Os polifenóis, assim como o resveratrol, são moléculas estranhas ao metabolismo animal e, portanto, seguem a rota dos xenobióticos. A biodisponibilidade do resveratrol não é clara, mas possivelmente, como os outros polifenóis de baixo peso molecular, o resveratrol pode ser absorvido de forma passiva quando na forma aglicona, permeando pela plasmalema das células do intestino delgado (MANACH *et al.*, 2004). Quando o resveratrol é glicolisado (trans-*p*-teroesstilbeno), ele pode ser metabolizado pela flora intestinal, liberando a aglicona para absorção passiva, ou pode ser absorvido de modo ativo através de transportadores de glicose (KUHNLE *et al.*, 2000) e logo em seguida desglicolisado. A velocidade de absorção é diretamente proporcional ao açúcar ao qual encontra-se ligado; por exemplo: a glicose tem alta absorção, enquanto que a rarnose tem baixa ou nenhuma absorção (MANACH *et al.*, 2004). Logo após a absorção os polifenóis de baixo peso molecular são metilados no intestino para eliminação via urinária ou são conduzidos à corrente circulatória onde são associados à albumina (PIMENTEL *et al.*, 2005). Quando ligados à albumina, seguem pela corrente circulatória até o momento no qual o pH diminui, característica de processos inflamatórios ou carcinogênicos, e são então liberados para ação biológica. Os tecidos alvo são geralmente: cérebro, próstata, ovários, mamas, fígado, rins e sistema cardiovascular (MANACH *et al.* 2004).

Quando os polifenóis (resveratrol) permanecem ligados à albumina seguem então para o fígado, onde podem ser sulfonados ou glucoronizados (também no retículo endoplasmático em vários tecidos) para eliminação via biliar, retornando ao intestino delgado. Nesse processo, ocorre um ciclo de absorção e re-absorção, aumentando o tempo de permanência no organismo (PIMENTEL *et al.*, 2005). Os polifenóis totais, presentes nos frutos, são os únicos antioxidantes que estão presentes no intestino grosso, pois a vitamina C, β -caroteno, entre outros antioxidantes são absorvidos ou oxidados ainda no intestino delgado. Portanto, o câncer de reto é combatido principalmente pelos polifenóis totais, entre eles o resveratrol (MANACH *et al.*, 2004).

O resveratrol é um potente inibidor enzimático seletivo, atuando sobre a lipoxigenase que possui duas atividades independentes: a dioxigenase (induz da oxidação) e a hidroxiperoxidase (detoxificação de xenobióticos). Ele inibe apenas a atividade dioxigenase, mas não a atividade hidroxiperoxidase (PINTO *et al.*, 1999). E também tem efeito sinérgico

quando o resveratrol é associado a outros antioxidantes, como a vitamina C e/ou a vitamina E (CHANVITAYAPONGS *et al.*, 1997) além de proteger o LDL humano *in vitro* (JIANGANG *et al.*, 2000).

O resveratrol possui atividade antiinflamatória, pois inibe a transcrição e atividade da ciclooxigenase, tanto a ciclooxigenase 1 (COX-1) como a ciclooxigenase 2 (COX-2) (SUBBARAMAIAH *et al.*, 1998). Esta enzima catalisa a via oxidativa que parte do ácido linoléico, formando ácido araquidônico e interrompendo a produção de prostaglandinas, que são substâncias pró-inflamatórias. A ciclooxigenase também está envolvida na rota de formação das tromboxinas, portanto, se o resveratrol inibe esta enzima, não ocorre agregação plaquetária e conseqüentemente ele atua como anticoagulante (JANG; PEZZUTO, 1998).

Resveratrol também pode estimular canais de potássio em células do endotélio vascular. O estímulo desses canais de potássio pelo resveratrol, através do Ca^{+2} , pode ser responsável pelo seu efeito sobre as atividades funcionais de células endoteliais, promovendo a vasorelaxação e, conseqüentemente, controlando a pressão arterial (LI *et al.*, 2000).

O resveratrol é um potente antagonista ativo do estrogênio nas concentrações de 10-1000 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ e atua de modo similar ao estrogênio na expressão do fator estabilizante do RNAm regulador de estrogênio (E-RmRNASF) (RATNA; SIMONELLI, 2002). Deste modo, pode ser administrado concomitantemente para reduzir os níveis de estrogênio administrados após a menopausa. Entretanto, MIZUTANI *et al.* (2000) afirmam que o resveratrol poderia conferir efeito cardioprotetor no sistema cardiovascular e, por isto, ser clinicamente útil como um substituto para o estrogênio na prevenção de doenças cardiovasculares. Este estilbeno é um agonista parcial (mimetiza parcialmente os efeitos no sítio de ligação) do receptor do estrogênio (ER), mas atua como antagonista do ER na presença de estrogênio, levando a inibição do crescimento de células de câncer de mama (LU; SERRERO, 1999).

RATNA; SIMONELLI (2002) relatam também que o resveratrol inibe a proliferação de células tumorais, possivelmente por inibir a enzima ribonucleotídeo redutase e a síntese de DNA nas células cancerígenas. Além disso, o resveratrol inibe a proteína C quinase, que é um mediador chave na promoção dos tumores, atuando como quimiopreventivo (STEWART *et al.*, 2000). O crescimento do tumor de cólon é inibido por 25 μM de resveratrol (SCHENEIDER *et al.*, 2000).

O resveratrol é um indutor de apoptose em células de leucemia promielocítica (SURH *et al.*, 1999). Ele interage sinergicamente com outros fenóis como o ácido elágico e a quercetina (MERTENS-TALCOTT; PERCIVAL, 2005). Desta maneira, estes fenóis podem intervir na redução da leucemia, quando instalada.

Os estudos toxicológicos comprovam que o resveratrol é genotóxico *in vitro*, induzindo a toxicidade celular, micronucléica e interferindo na mitose em células de linfoma de camundongos (SCHMITT *et al.*, 2002). Estes autores sugerem, ainda, estudos toxicológicos para investigação em modelos em animais, para determinar o risco potencial para humanos.

A alimentação rica em carboidratos e pouco exercício físico contribuem para a insensibilidade à insulina, ganho de peso e, conseqüentemente, problemas cardíacos e hepáticos. Nos mamíferos, existem 7 genes SIRT que regulam o metabolismo da glicose e a produção de insulina. Um estudo promissor com camundongos (BAUR *et al.*, 2006) revelou que o resveratrol é capaz de reduzir o ganho de peso e aumentar o tempo de vida. O resveratrol estimula, através dos genes SIRT, um aumento da sensibilidade à insulina e diminuição do fator 1 de crescimento por insulina (IGF-1). Incrementa a atividade da proteína AMP kinase (AMPK) e também o proliferador ativador de receptores γ e coativador 1 α (PGC 1 α), ocorrendo um aumento no número de mitocôndrias, e por fim, restabelece a função motora.

Recentemente, ROBB *et al.* (2008), estudando a ação do trans-resveratrol sobre as enzimas antioxidantes em cultura de células humanas (linhagem MRC-5), observaram que o resveratrol não tem ação sobre a glutatona, catalase, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase cúprica. Porém, atua sobre a superóxido dismutase Mn mitocondrial (MnSOD). Em duas semanas de incubação, o resveratrol estimulou a expressão da enzima MnSOD em 6 vezes e aumentou a atividade enzimática em 14 vezes. Este fato é importante, pois a principal fonte geradora de ERO em animais é a mitocôndria, assim como nos frutos em pós-colheita.

1.4. Referências

ADRIAN, M.; *et al.* Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 6103-6105, 2000.

ADRIAN, M.; *et al.* Induction of phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminium chloride (AlCl₃). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1979-1981, 1996.

AGRAWAL, G. K.; *et al.* Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 1061-1069, 2002.

BAKHSHI, D.; ARAKAWA, O. Induction of phenolic compounds biosynthesis with light irradiation in the flesh of red and yellow apples. **Journal of Applied Horticulture**. v.8,

p.101-104, 2006.

BARKAI-GOLAN, R.; *et al.* Combined hot water and radiation treatments to control decay of tomato fruits, **Scientia Horticulturae**. v. 56 p.101-105, 1993.

BAUR, J. A.; *et al.* Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**. V.444, p. 337- 342, 2006.

BORSANI, O.; VALPUESTA, V.; BOTELLA, M. A. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in Arabidopsis seedlings. **Plant Physiology**. v.126, p.1024–1030, 2001.

BOSTOCK, R. M. Signal crosstalk and induced resistance: Straddling the line between cost and benefit. **Annual Review Phytopathology**. v.43, p.545–580, 2005.

BRACKMANN, A.; *et al.* Qualidade da maçã cv. Gala tratada com 1-metilciclopropeno. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.34 n.5 p.1415-1420, set-out, 2004.

BREUIL, A. C.; *et al.* Metabolism of stilbene phytoalexins by *Botrytis cinerea*: I. Characterization of a resveratrol dehydrodimer. **Tetrahedron Letters**, v. 39, n. 7, p. 537-540, 1998.

BRISSON, L. F.; TENHAKEN, R.; LAMB, C. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. **The Plant Cell**. v.6, 1703-1712, 1994.

BURNS, J.; *et al.* Plant foods and herbal sources of resveratrol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3337-3340, 2002.

CAMILI, E. C.; *et al.* Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis cinerea* **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 3, p. 215-221, 2007.

CANTOS, E.; *et al.* Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 4606-4612, 2000.

CASSELLS, A. C.; DOYLE, B. M. Genetic engineering and mutation breeding for tolerance to abiotic and biotic stresses: science, technology and safety. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**. Special issue, p.52-82, 2003.

CHANVITAYAPONGS, S.; DRACZYNSKA-LUSIAK, B.; SUN, A. Y. Amelioration of oxidative stress by antioxidants and resveratrol in PC12 cells. **Neuroreport**, v. 8, n. 6, p. 1499-1502, 1997.

CHEN, M.; CHORY, J.; FANKHAUSER, C. Light signal transduction in higher plants. **Annual Review of Genetics**. v.38, p.87–117, 2004.

CHONG, J.; *et al.* Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc:phenylpropanoid glucosyl-transferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. **The Plant Cell**. v.14, p.1093–1107, 2002.

- CONCONI, A.; *et al.* The octadecanoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. **Nature**. v.383, p.826–829, 1996.
- CONRATH, U.; *et al.* Priming as a mechanism in induced systemic resistance of plants. **European Journal of Plant Pathology**. v. 107, p.113–119, 2001.
- CRITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2 ed. Lavras, UFLA, 2005, 785 p.
- DAÍ, G. H.; *et al.* Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vitifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia* and the downy mildew fungus, *Plasmopara viticola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 46, p.177-188, 1995.
- DAT, J. F.; FOYER, C. H.; SCOTT, I. M. Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. **Plant Physiology**. v.118, p.1455–1461, 1998.
- DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology** v.42, p.185-209, 2004.
- FRÉMONT, L. Minireview: Biological effects of resveratrol. **Life Sciences**, v. 66, n. 8, p.663-673, 2000.
- GHAOUTH, A. E.; ARUL, J.; WILSON, C. BENHAMOU, N. Biochemical and cytochemical aspects of interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. **Postharvest Biology and Technology**. v.12, p.183-194, 1997.
- GONZÁLEZ-BARRIO, R.; *et al.* Comparison of ozone and UV-C treatments on the postharvest stilbenoid monomer, dimer, and trimer induction in var. ‘Superior’ white table grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54 p. 4222-4228, 2006.
- GRIMMIG, B.; *et al.* Ethylene- and ozone-induce regulation of a grapevine resveratrol synthase gene: different responsive promoter regions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 865-870, 2002.
- GRIMMIG, B.; *et al.* Ozone-induced gene expression occurs via ethylene-dependent and -independent signalling. **Plant Molecular Biology**. v. 51, p.599–607, 2003.
- GUEST, D.; GARANT, B. The complex action of phosphanates as antifungal agents. **Biological Review**. v. 66, p.159-187, 1991.
- HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: How do induced plants stop pathogens? **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v.55, p.77–84, 1999.
- HILLIS, W. E.; HART, J. H.; YAZAKI, Y. Polyphenols of *Eucalyptus sideroxylon*. **Phytochemistry** (Oxford), v. 13, n. 8, p. 1591-1595, 1974.
- IMAIZUMI, T.; *et al.* A FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signaling in *Arabidopsis*. **Nature**. v. 426, p.302–306, 2003.
- IRITI, M.; *et al.* Cell death-mediated antiviral effect of chitosan in tobacco. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.44, p.893–900, 2006.

- JACKSON, T. J.; *et al.* Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**. v.49, p.147–154, 2000.
- JANG, M.; PEZZUTO, J. M.. Resveratrol blocks eicosanoid production and chemically-induced cellular transformation: Implications for cancer chemoprevention. **Pharmaceutical Biology**, v. 36 (SUPPL.), p. 28-34, 1998.
- JEANDET, P.; *et al.* Resveratrol content of wines of different ages: relationship with fungal disease pressure in the vineyard. **American Journal of Enology & Viticulture**. v. 46, n. 1, p. 1-4, 1995.
- JIANGANG, Z.; *et al.* Effects of resveratrol on oxidative modification of human low density lipoprotein. **Chinese Medical Journal**, v. 113, n. 2, p. 99-102, 2000. Resumo publicado no Biological Abstract, v. 107, n. 14, p. AB-1328, 2000.
- JOO, J. H.; *et al.* Different Signaling and Cell Death Roles of Heterotrimeric G Protein α and β Subunits in the Arabidopsis Oxidative Stress Response to Ozone. **The Plant Cell**. v.17, p.957–970, 2005.
- KANG, H. M.; SALTVEIT, M. E. Wound-induced PAL activity is suppressed by heat-shock treatments that induce the synthesis of heat-shock proteins. **Physiologia Plantarum**. v.119, p.450–455, 2003.
- KLUGE, R. A.; *et al.* Efeitos de tratamentos térmicos aplicados sobre frutas cítricas armazenadas sob Refrigeração. **Ciência Rural**. v.36, n.5, p.1388-1396, set-out, 2006.
- KUHNLE, G; *et al.* Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 272, n. 1, p. 212-217, 2000.
- KWAK, J. M.; HART, J. H.; YAZAKI, Y. The role of reactive oxygen species in hormonal responses. **Plant Physiology**. v. 141, p.323–329, 2006.
- LANGCAKE, P.; PRYCE, R. J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. **Physiology Plant Pathology**, v. 9, p. 77-86, 1976.
- LANGCAKE, P.; PRICE, R. J. The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. **Phytochemistry**. v.16, p.1193-1196, 1977.
- LANGCAKE, P. Disease resistance of *Vitis spp.* and the production of the stress metabolites resveratrol, ϵ -viniferin, α -viniferin and pterostilbene. **Physiology Plant Pathology**, v. 18 n. 2 p. 213-226, 1981.
- LANGEBAERTLES, C.; *et al.* Oxidative stress: and defense reactions in plant exposed to air pollutants and UV-B radiation. In: INZÉ, D.; MONTAGU, M. V. **Oxidative stress in plants**. Taylor & Francis: London and New York, 2002. cap. 4, p.105-133.
- LEÓN, J.; LAWTON, M. A.; RASKIN, I. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology**. v.108, p.1673–1678, 1995.
- LI, H. F.; CHEN, S. A.; WU, S. N. Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on Ca^{+2} – activated K^{+} current in vascular endothelial cells. **Cardiovascular Research**, v.45 p.1035–

1045, 2000.

LU, R.; SERRERO, G. Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibits antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 179, p. 297-304, 1999.

LUNARDI, R.; SANHUEZA, R. M. V.; BENDER, R. J. Imersão em Água Quente no Controle Pós-Colheita da Podridão Branca em Maçãs cv. Fuji **Fitopatologia Brasileira**. v. 28, n.4, p.431-434, jul-ago, 2002a.

LUNARDI, R.; SEIBERT, E.; BENDER, R. J. Tolerância da maçã 'Fuji' ao tratamento térmico por imersão em água quente. **Ciência Agrotécnica**, Lavras v.26, n.4, p.798-803, jul-ago, 2002b.

MANACH, C.; *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79 p. 727-747, 2004.

MANO, J. Early events in environmental stress in plants: induction mechanisms of oxidative stress. In: INZÉ, D.; MONTAGU, M. V. **Oxidative stress in plants**. Taylor & Francis: London and New York, 2002. cap. 9, p.217-245.

MARRONI, N. P. **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Canoas: Ulbra, 2002 189 p.

MELZUCH, K.; *et al.* Resveratrol in Parts of Vine and Wine Originating from Bohemian and Moravian Vineyard Regions. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 66, n. 1, p.53-57, 2001.

MENDONÇA, M. C.; NASCIMENTO, A. S.; CALDAS, R. C. Efeito do Tratamento Hidrotérmico de Mangas na Mortalidade de Larvas de *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.29 n.1 p.139-145, 2000.

MERTENS-TALCOTT, S. U.; PERCIVAL, S. S. Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. **Cancer Letters**. v. 218, p.141–151, 2005.

METWALLY, A.; *et al.* Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. **Plant Physiology**. v.132 p.272–281, 2003

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science** v.7 p.405-410, 2002.

MITTLER, R.; *et al.* Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science** v.9 p.490–498, 2004.

MIZUTANI, K., IKEDA, K., YAMORI, Y. Resveratrol inhibits AGEs- induced proliferation and collagen synthesis activity in vascular smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 274, p. 61-67, 2000.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. Pompéia: Ceres, 1995. cap. 22, p. 417-453.

- PEÑA-CORTÉS, H.; *et al.* Abscisic acid-deficient plants do not accumulate proteinase inhibitor II following systemin treatment. **Planta** v.198, p.447-451, 1996.
- PÉREZ, A. G.; *et al.* Effect of Methyl Jasmonate on *in Vitro* Strawberry Ripening **Journal Agricultural of Food Chemistry**. v.45, p.3733-3737, 1997.
- PERL-TREVES, R.; PERL, A. Oxidative stress: an introduction. In: INZÉ, D.; MONTAGU, M. V. **Oxidative stress in plants**. Taylor & Francis: London and New York, 2002. cap. 1, p.1-32.
- PIETERSE, C. M. J; *et al.* A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. **The Plant Cell**. v.10, p.1571–1580, 1998.
- PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais: introdução às substâncias bioativas em alimentos**. Varela: São Paulo, 2005. 95 p.
- PINTO, M. C., GARCÍA-BARRADO, J. A.; MACÍAS, P. Resveratrol is a potent inhibitor of the dioxygenase activity of lipoxygenase. **Journal Agricola Food Chemistry**. v. 47, p. 4842-4846, 1999.
- POLLE, A. Dissecting the superoxide dismutase–ascorbate peroxidase–glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. **Plant Physiology**. v.126, p.445–462, 2001.
- RAO, M. V.; KOCH, J. R.; DAVIS, K. R. Ozone: a tool for probing programmed cell death in plants. **Plant Molecular Biology**. v.44, p.345–358, 2000.
- RATNA, W. N.; SIMONELLI J. A. The action of dietary phytochemicals quercetin, catechin, resveratrol and naringenin on estrogen-mediated gene expression. **Life Sciences**. v. 70, p.1577-1589, 2002.
- RENAUD, S., LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and French paradox for coronary heart disease. **Lancet**, v. 339, n. 8808, p. 1523-1526, 1992.
- RIVERO, R. M.; *et al.* Romero, L. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. **Plant Science**. v.160, p.315-321, 2001.
- ROBB, E. L.; *et al.* Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: Specific and progressive induction of MnSOD. **Biochemistry and Biophysics Research Communications**. v. 367, p.406-412, 2008.
- RYALS, J.; *et al.* Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**. v. 8, p.1809-1819, 1996.
- SAINDRENAN, P.; BARCHIETTO, T.; BOMPEIX, G. Effects of phosphonate on the elicitor activity of culture filtrates of *Phytophthora cryptogea* in *Vigna unguiculata*. **Plant Science**.v. 67, p.245-251, 1990.
- SALA, J.M. Involvement of oxidative stress in chilling injury in cold-stored mandarin fruits. **Postharvest Biology and Technology**, v.13, p.255-261, 1998.
- SALA, J.M.; LAFUENTE, M.T. Catalase in the heat-induced chilling tolerance of cold-stored

- hybrid Fortune mandarin fruits. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.47, p.2410-2414, 1999.
- SALA, J.M.; LAFUENTE, M.T. Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruits to chilling. **Postharvest Biology and Technology**, v.20, p.81-89, 2000.
- SALTVEIT, M. E. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. **Postharvest Biology and Technology**, v.21, p.61-69, 2000.
- SAUTTER, C. K. **Avaliação da presença de resveratrol em suco de uva**. 2003 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- SCHEEL, D. Oxidative burst and role of reactive oxygen species. In: INZÉ, D.; MONTAGU, M. V. **Oxidative stress in plants**. Taylor & Francis: London and New York, 2002. cap. 5, p.137-170.
- SCHMITT, E.; *et al.* H. Hormonal and genotoxic activity of resveratrol. **Toxicology Letters**, v. 136, p. 133-142, 2002.
- SCHNEIDER, Y.; *et al.* Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. **Cancer Letters**, v. 158, p. 85-91, 2000.
- STEWART, J. R.; CHRISTMAN, K. L.; O'BRIAN, C. A. Effects of resveratrol on the autophosphorylation of phorbol ester-responsive protein kinases: Inhibition of protein kinase D but not protein kinase C isozyme autophosphorylation. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 1355-1359, 2000.
- SUBBARAMAIAH, K.; *et al.* Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 21875-21882, 1998.
- SURH, Y. J.; *et al.* Resveratrol, an antioxidant present in red wine, induce apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. **Cancer Letters**, v. 140, n. 1-2 June, p. 1-10, 1999.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 719 p.
- THORPE, M. R.; *et al.* ¹¹C-imaging: methyl jasmonate moves in both phloem and xylem, promotes transport of jasmonate, and of photoassimilate even after proton transport is decoupled. **Planta**, v.226, p.541-551, 2007.
- TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J. Controle da pinta preta do tomateiro com o uso de acibenzolar-s-metil isolado, em mistura com fungicidas e em programas de aplicação **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, p.481-487, 2005.
- TUÑÓN, M. J.; JINÉNEZ, R. Envejecimiento y estrés oxidativo. Papel de los antioxidantes In: MARRONI, N. P. **Estresse oxidativo e antioxidantes**. ULBRA: Canoas, 2002. cap. 10, p.131-152.
- TYUKAVKINA, N. A.; *et al.* Oksistil'beny iz kory *Pinus sibirica*. (Hydroxyestilbene from the bark of *Pinus sibirica*). **Khim Prii Soedin (Tashk)**, v. 8, n. 5, p. 600-603, 1972. Resumo publicado no Biological Abstract, p. 3597, em 15 de março de 1974.

VERNOOIJ, B.; *et al.* Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. **The Plant Cell**. v. 6, p.959-965, 1994.

WANG, C. Y. Effect of temperature preconditioning on catalase, peroxidase, and superoxide dismutase in chilled zucchini squash. **Postharvest Biology and Technology**. v. 5, p.67-76, 1995.

ZHENG, Y.; *et al.* Ascorbate in the leaf apoplast is a factor mediating ozone resistance in *Plantago major* **Plant Physiology Biochemistry**. v.38, p.403-411, 2000.

CAPÍTULO 2

Síntese de resveratrol em frutos de clima temperado em sistemas de armazenamento refrigerado e atmosfera controlada

Synthesis of resveratrol in temperate climate fruit in system of cold storage and controlled atmosphere

Cláudia Kaehler Sautter¹, Anderson Weber², Elizandra Pivotto Pavanello³, Vanderlei Both⁴,
Luisa Helena Rychecki Hecktheuer⁵, Carlos Augusto Mallmann⁶, Auri Brackmann⁷

Resumo

Este trabalho objetivou determinar trans-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno), polifenóis totais e antocianinas totais em frutos de clima temperado. Determinou-se no momento da colheita em morangos 'Araza' e 'Yvahe', amora (*Morus nigra*) e maçã 'Galaxi'. Avaliaram-se as concentrações durante o armazenamento em mirtilo 'Bleugem', kiwi 'Bruno'; caqui 'Fuyu'; maçãs 'Gala' e 'Fuji'; uvas 'Isabel', 'Merlot' e 'Niágara Rosada'. O período de armazenamento refrigerado (AR) a 0,5°C foi de sete semanas para mirtilo, dois meses para kiwi e de três meses para caqui. As uvas foram armazenadas em AR a -0,5°C por seis semanas. A maçã 'Gala' foi armazenada em atmosfera controlada (AC) com 1,5kPa de O₂ e 2,5kPa de CO₂ a 0,5°C por oito meses, e a maçã 'Fuji' em AC com 1,0kPa de O₂ e < 0,5 kPa de CO₂ a -0,5°C por sete meses. Após os armazenamentos (AR e AC) os frutos permaneceram cinco dias a 20°C. Detectou-se trans-resveratrol em polpa de kiwi (54,7µg 100g⁻¹), morangos 'Araza'(125,3µg 100g⁻¹) e 'Yvahe'(126,2µg 100g⁻¹), em amora nas folhas (127,3µg 100g⁻¹ de massa fresca) e no fruto (123,0µg 100g⁻¹ de polpa). Em maçãs 'Galaxi', 'Gala' e 'Fuji' ocorre apenas na casca entre 112,4 a 133,0µg 100g⁻¹. O caqui 'Fuyu' apresentou traços de trans-resveratrol na casca apenas na colheita. O armazenamento

¹ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Brasil. Bolsista CAPES. E-mail: kaehler@terra.com.br Caixa Postal 5065 CEP: 97110-970. Autora para correspondência.

² Aluno de Graduação em Agronomia, Bolsista PIBIC/CNPq - UFSM.

³ Aluno de Graduação em Agronomia, Bolsista CNPq - UFSM.

⁴ Aluno de Graduação em Agronomia, Bolsista FAPERGS - UFSM.

⁵ Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos - UFSM, Brasil.

⁶ Laboratório de Análises Micotoxicológicas - LAMIC - UFSM, Brasil.

⁷ Departamento de Fitotecnia - UFSM, Brasil.

refrigerado estimulou a síntese de trans-resveratrol em mirtilo, uvas 'Isabel' e 'Merlot' mas não estimulou em 'Niágara Rosada'. O teor de polifenóis totais não foi alterado em maçãs 'Gala' e 'Fuji', caqui e uva 'Isabel' com AR, porém, elevou-se em mirtilo, uvas 'Niágara Rosada' e 'Merlot'; e decaiu em kiwi 'Bruno' durante o armazenamento. O armazenamento refrigerado também estimulou a biossíntese de antocianinas totais em mirtilo.

Palavras-chave: trans-Resveratrol, Polifenóis, Antocianinas, Pós-Colheita.

Abstract

The objective of this paper was determine trans-resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene), total polyphenols and total anthocyanins in fruits of temperate climate. It was determined at the time of harvest in 'Araza' and 'Yvahe' strawberries, mulberry (*Morus nigra*) in 'Galaxi' apple. At the time of harvest they were determined in 'Bleugem' blueberry; 'Bruno' kiwifruit; 'Fuyu' persimmon; 'Gala' and 'Fuji' apples; 'Isabel', 'Merlot' and 'Niagara Pink' grapes. The period of cold storage (CS) at 0.5°C was seven weeks for blueberry, two months for kiwifruit and three months for persimmon. The grapes were stored in CS at -0.5°C for six weeks. The 'Gala' apple has been stored in controlled atmosphere (CA) with 1.5kPa O₂ and 2.5kPa CO₂ at 0.5°C for eight months, and the 'Fuji' apple in CA with 1.0kPa O₂ and <0.5kPa CO₂ at -0.5°C for seven months. After storage (CS and CA) the fruits remained five days shelf-life at 20°C. It was detected trans-resveratrol in pulp, of kiwifruit (54.7µg 100g⁻¹), 'Araza' (125.3µg 100g⁻¹) and 'Yvahe' (126.2µg 100g⁻¹) strawberries, and in the leaves (127.3µg 100g⁻¹ fresh weight) and fruit (123.0µg 100g⁻¹ in pulp) of blackberry. In 'Galaxi', 'Gala' and 'Fuji' apples it occurs only in the skin between 112.4 to 133.0µg 100g⁻¹. The persimmon 'Fuyu' showed traces of trans-resveratrol in the skin only at harvest. The cold storage stimulated the synthesis of trans-resveratrol in blueberry, 'Isabel' and 'Merlot' grape, but not stimulated in 'Niagara Pink' grape. The content of total polyphenols has not changed in 'Gala' and 'Fuji' apples, and persimmon 'Isabel' grape with CS, however, raised up on blueberry, 'Niagara Pink' and 'Merlot' grapes, and occurred loss in 'Bruno' kiwifruit during storage. The cold storage also stimulated biosynthesis of total anthocyanins in blueberry.

Key words: trans-Resveratrol, Polyphenols, Anthocyanins, Post-Harvest.

2.1. Introdução

Nos últimos anos, tem-se dado grande importância aos alimentos funcionais ou alimentos nutracêuticos. São alimentos que têm a capacidade de nutrir e também trazer um benefício fisiológico não nutricional. A dieta mediterrânea rica em frutas, verduras e vinhos tem sido mencionada como mais saudável. Um fator importante desta dieta é a capacidade antioxidante proporcionada, principalmente, pelos polifenóis. Quimicamente, os fenóis possuem um anel benzênico (fenóis simples) ou dois ou mais anéis benzênicos (polifenóis) com hidroxilas que são capazes de doarem o próton H^+ em presença de radicais livres como $OH\cdot$, e estabilizar o oxigênio através de ressonância no anel benzênico. Desta forma, todos os polifenóis atuam como antioxidantes (ARAÚJO, 2004). Mas a distribuição espacial das hidroxilas de alguns polifenóis ativa ou inibe sítios de ligação em células animais, tornando-se então compostos com ação farmacológica específica (substância nutracêutica). Entre estes compostos encontra-se o resveratrol, metabólito secundário que tem a função de defesa na planta (LANGCAKE, 1981). Portanto, é uma fitoalexina produzida por diversas plantas como Kojo-kon (*Polygonum cuspidatum*), Kashuwu (*Polygonum multiflorum*), eucalipto, amendoim, amora e também está presente em uvas (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*) (HILLIS *et al.*, 1974; LANGCAKE *et al.*, 1979; MELZUCH *et al.*, 2001; BURNS *et al.*, 2002;). Na uva, esta fitoalexina é sintetizada na casca como resposta ao estresse causado por elicitores como ataque fúngico (*Botrytis cinerea*, *Plasmopora viticola*), dano mecânico, agentes químicos ou e irradiação de luz ultravioleta.

O resveratrol é sintetizado na planta sob duas formas isômeras: trans-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e cis-resveratrol (cis-3,5,4'-trihidroxiestilbeno), ver *Figura 1*. Os estudos concentram-se sobre o isômero trans-resveratrol que, por sua conformação espacial, pode ativar portões de cálcio em vasos sanguíneos, desencadeando a vaso-relaxação, diminuindo a pressão arterial (LI *et al.*, 2000).

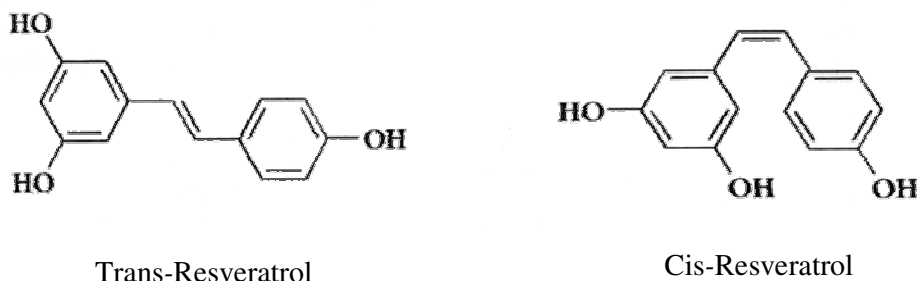


Figura 1 - Estrutura química dos isômeros trans-resveratrol e cis-resveratrol.

A biodisponibilidade não foi ainda bem elucidada, mas os polifenóis de baixo peso molecular, como o resveratrol, podem ser absorvidos de modo passivo, permeando a membrana plasmática das células do intestino delgado. Quando o resveratrol apresenta-se ligado a um açúcar (glicosilado), pode ser absorvido de forma ativa, utilizando transportadores de açúcares no intestino delgado, assim como os glucosídeos de flavonóides. Os polifenóis, quando absorvidos, entram na rota dos xenobióticos para rápida eliminação via urinária ou hepática, ou podem ser ligados a proteínas plasmáticas e assim distribuídos na corrente sanguínea (MANACH *et al.*, 2004). O resveratrol tem atividade antioxidante, como os demais polifenóis, mas, como nutracêutico, inibe especificamente a atividade dioxigenase da lipoxigenase (PINTO *et al.*, 1999). Devido à disposição espacial das hidroxilas, o resveratrol também atua de modo similar ao estrogênio e pode substituir parcialmente este hormônio nos tratamentos pós-menopausa (RATNA; SIMONELLI, 2002). A atividade antiinflamatória do resveratrol é explicada pela inibição da transcrição e da atividade da ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), inibindo também a síntese de tromboxinas, portanto atuando como anticoagulante. O resveratrol atua sobre o câncer de diversas maneiras, uma destas é a inibição da cascata do ácido araquidônico; esta rota metabólica pode induzir a gênese de tumores (SUBBARAMAIAH *et al.*, 1998). Outra via é pela inibição da proteína C-quinase, um mediador chave na promoção dos tumores, ação que poderia explicar o seu efeito quimiopreventivo (Stewart *et al.*, 2000). Estudos indicam que o resveratrol pode induzir a apoptose (ZHOU *et al.*, 2003), atuando como um agente antiproliferativo de alguns tipos de tumores (RATNA; SIMONELLI, 2002; SCHNEIDER, 2000).

O resveratrol foi encontrado em algumas frutas como uva, mirtilo, açai, pistache e morango (LANGCAKE *et al.*, 1979; LYONS *et al.*, 2003; SCHAUSS *et al.*, 2006; GENTILE *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2007). Porém, até o presente momento, não há relatos da presença de resveratrol em outros frutos de grande consumo como a maçã, o caqui, o kiwi e também pequenas frutas como a amora, tampouco sua conservação nos frutos em pós-colheita.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a presença de trans-resveratrol em frutos de clima temperado e o comportamento da concentração durante o período de armazenamento. Assim como a evolução dos polifenóis totais e antocianinas totais nestes frutos.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Amostras e sistemas de armazenamento usados

Os frutos foram colhidos, selecionados quanto à sanidade, homogeneizados, pesados e formadas as unidades experimentais sendo utilizado quatro repetições para cada espécie frutífera. Os frutos foram armazenados em minicâmaras, situadas dentro de uma câmara frigorífica, com temperatura e umidade relativa (> 90%), sob diferentes condições e períodos, de acordo com a exigência fisiológica de cada fruto. Junto às amostras foi colocado um pacote com 500g de hidróxido de cálcio (cal apagado), com a finalidade de absorver o dióxido de carbono formado pela respiração dos frutos e, com isso, manter baixa a concentração de CO₂ no ambiente, exceto para maçã cultivar Gala.

As uvas cultivares Merlot, Niagara Rosada e Isabel foram mantidas em armazenamento refrigerado (AR) a -0,5°C por seis semanas, assim como o mirtilo cultivar Bleugem em AR a 0,5°C por sete semanas. O kiwi cultivar Bruno e caqui cultivar Fuyu foram conservados em AR por dois e três meses, respectivamente, à temperatura de 0,5°C.

A maçã cultivar Gala foi armazenada em atmosfera controlada (AC) com 1,5kPa de O₂ + 2,5kPa CO₂ a 0,5°C por oito meses e a maçã cultivar Fuji em AC com 1,0kPa de O₂ e <0,5kPa de CO₂ a -0,5°C por sete meses.

A maçã cultivar Galaxi, morangos das cultivares ‘Yvahe’ (*Genótipo LBD 15.1*) e ‘Araza’ (*Genótipo LBD 35.2*) e a amora arbórea (*Morus nigra*) foram analisados logo após a colheita.

2.2.2 Extração dos compostos fenólicos

As amostras para a determinação de trans-resveratrol, polifenóis totais e antocianinas totais em uvas, maçãs e caqui, foram preparadas seguindo os passos: pesagem do fruto, retirada da casca, pesagem de 30g de cascas, adição de 90ml da dissolução de etanol/ácido clorídrico/água na proporção de 70/1/30 (V/V/V) e homogeneização em liquidificador a 87000rpm por 1 minuto com, e após centrifugação a 10.000g por 15 minutos.

As amostras para a determinação em amora, mirtilo, morango e kiwi foram preparadas seguindo os passos: pesagem de 30g do fruto, adição de 90ml da dissolução de etanol/ácido

clorídrico/água na proporção de 70/1/30 (V/V/V) mais 200µl de enzima pectiesterase (10U ml⁻¹) e homogeneização em liquidificador a 87000rpm por 1 minuto. Incubação em banho-maria a 30°C por 2 horas, para despectinização da polpa, centrifugação a 10.000g por 15 minutos e filtração do sobrenadante em gaze.

Somente as amostras destinadas para análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram filtradas em membrana com poro de 0,22µm e congeladas a -20°C até o momento de análise. O padrão empregado foi trans-resveratrol (trans-3, 5,4'-trihidroxiestilbeno) adquirido da Sigma Chemical Co.

2.2.3. Métodos analíticos

2.2.3.1. Resveratrol

As análises foram feitas em um sistema híbrido de CLAE, utilizando bomba INTRALAB (Modelo 5050), com detector de diodos DAD HP Series 1100 automatizado por Agilent®, controlado com o programa CHEMSTATION Data System software. A coluna de fase reversa foi Merck® Nucleosil, C18 (250mm . 4mm), tamanho de partícula de 5µm, com pré-coluna (10mm 5mm) de mesma composição. A injeção de 10µl, foi feita através do injetor automatizado Agilent (Modelo Series 1100) e a coluna permaneceu aquecida a 30°C. O método para trans-resveratrol foi com eluição em condições isocráticas com fase móvel água/acetoneitrila (35:65), pH 2,5, ajustado com ácido ortofosfórico, o fluxo foi de 1,0ml min⁻¹ e a eluição foi monitorada a 306nm.

A identificação do trans-resveratrol foi baseada no tempo de retenção, sendo a pureza do pico confirmada através do detector com arranjo de diodos (DAD). A quantificação do trans-resveratrol foi feita por padronização externa. A concentração de trans-resveratrol foi expressa em µg 100g⁻¹.

2.2.3.1.1. Validação do método cromatográfico

Todas as análises cromatográficas, incluindo a validação do método, foram feitas ao abrigo da luz, a fim de evitar que o isômero trans-resveratrol fosse convertido em cis-resveratrol. Portanto, o estudo da estabilidade foi restringido à temperatura de bancada (25°C), e armazenamento a -20°C, nos diversos tempos.

O limite de detecção do trans-resveratrol foi obtido realizando-se diluições gradativas dos padrões. Os testes de recuperação, limite de quantificação e exatidão foram realizados com adição dos padrões sobre a matriz. A repetibilidade foi realizada em triplicata. A reprodutibilidade foi feita através da análise das variações diárias e em dias diferentes, das áreas dos picos dos padrões.

2.2.3.2. Polifenóis totais

A concentração de polifenóis totais foi determinada pelo método colorimétrico (SINGLETON; ROSSI, 1965). Em tubo de ensaio, adicionou-se 200µl de amostra diluída (1:10), em solução etanol/ácido clorídrico/água na proporção de 70/1/30 (V/V/V), 1000µl de reagente de Folin-Ciocalteu diluído (1:10) em água destilada e deionizada. Entre 3 segundos a 8 minutos adicionou-se 800µl de Na₂CO₃ 7,5%. Após duas horas ao abrigo da luz, foi lida a absorbância à 765nm em espectrofotômetro da marca Femto® modelo 600S (mono feixe). A curva de calibração utilizou como padrão uma solução de ácido gálico nas seguintes concentrações: 50, 100, 150, 250 e 500mg L⁻¹. A concentração de polifenóis totais foi expressa em mg 100g⁻¹.

2.2.3.3. Antocianinas totais

A medida experimental de antocianinas totais foi realizada pela leitura da absorbância, sendo que este comprimento de onda é resultante de uma varredura entre os comprimentos de 400 a 600nm. As leituras foram feitas no comprimento de onda que resultou a maior absorbância para cada espécie de fruto, determinando a antocianina predominante. As amostras foram diluídas com uma dissolução de etanol/ácido clorídrico/água na proporção de 70/1/30 (V/V/V). A leitura foi feita em Espectrofotômetro da marca Femto®, modelo 600S (mono feixe), utilizando como branco a água e completando o volume com a dissolução acima descrita. Os resultados foram obtidos para uvas e mirtilo ($\lambda_{\text{máx}} = 535\text{nm}$), utilizando um coeficiente de extinção molar (ϵ) de 19,9L cm⁻¹mol⁻¹, expressos em mg de malvidina L⁻¹. Maçãs ($\lambda_{\text{máx}} = 525\text{nm}$), utilizando ϵ 29,5L cm⁻¹mol⁻¹, expressos em mg de cianidina L⁻¹ e morangos e amora ($\lambda_{\text{máx}} = 527\text{nm}$), utilizando ϵ 13,0L cm⁻¹mol⁻¹, expressos em mg de pelargonidina L⁻¹ (DI STEFANO *et al.*, 1989). Todas as concentrações de antocianinas totais foram convertidas para mg 100g⁻¹, segundo antocianina predominante.

2.2.3.4. Análise estatística

Com o objetivo de verificar as diferenças nas concentrações de polifenóis totais, antocianinas totais e trans-resveratrol, entre os diferentes períodos dos armazenamentos, foi efetuada uma análise da variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro.

2.3 Resultados e discussão

No estudo da estabilidade, o isômero trans-resveratrol permaneceu estável nas condições analíticas, tanto no padrão quanto nas amostras. Porém, quando o padrão do analito trans-resveratrol foi armazenado à temperatura de bancada (25°C), num prazo de 24 horas ao abrigo da luz, converteu-se parcialmente em cis-resveratrol, ocorrendo uma perda de 2,70%. Esta conversão não foi observada nas amostras fortificadas com diferentes concentrações do padrão, tanto no armazenamento a 25°C por 24 horas, quanto no final dos trabalhos. Este resultado possivelmente seja explicado pela ação antioxidante dos demais polifenóis presentes na matriz. Sob as condições de armazenamento a -20°C ocorreu a mesma conversão do padrão, porém em 0,3% num prazo de 1 mês.

A validação do método em cromatografia líquida de alta eficiência do analito trans-resveratrol apresentou linearidade $y=0,0296.x+0,405$, e coeficiente de determinação de 0,9971. O limite de detecção foi de $0,07\mu\text{g L}^{-1}$ e de quantificação $1,58\mu\text{g L}^{-1}$. A recuperação do analito nas diversas matrizes, apresentou resultados satisfatórios (Tabela 1).

Tabela 1 - Recuperação do analito trans-resveratrol em diversas matrizes.

| Matriz | Recuperação | | | |
|----------------------|-------------------|---------|-------------------|---------|
| | Casca | | Polpa | |
| | Media (%) (n = 3) | C.V.(%) | Media (%) (n = 3) | C.V.(%) |
| Amora (fruto) | --- | --- | 75,7 | 1,4 |
| Amora (folha) | --- | --- | 70,6 | 2,3 |
| Kiwi 'Bruno' | --- | --- | 97,7 | 5,9 |
| Morango 'Araza' | --- | --- | 81,9 | 5,5 |
| Morango 'Yvahe' | --- | --- | 77,5 | 6,8 |
| Mirtilo 'Bleugem' | --- | --- | 80,5 | 5,0 |
| Maçã 'Gala' | 98,8 | 5,6 | 68,6 | 10,3 |
| Maçã 'Galaxi' | 98,6 | 5,6 | 95,1 | 6,4 |
| Maçã 'Fuji' | 94,1 | 1,7 | 93,6 | 2,3 |
| Caqui 'Fuyu' | 96,4 | 9,3 | 69,0 | 9,5 |
| Uva 'Isabel' | 96,8 | 4,8 | --- | --- |
| Uva 'Niagara rosada' | 95,9 | 5,0 | --- | --- |
| Uva 'Merlot' | 94,8 | 4,8 | --- | --- |

A amora (*Morus nigra*), quando madura, adquire uma coloração escura tendendo ao preto, nela as antocianinas predominantes são a cianidina ligada a açúcares (-3-soforosídeo, -3-glucosídeo e -3-ruteosídeo) e a perlagonidina (-3-glucosídeo e -3-ruteosídeo), que caracteristicamente conferem a coloração vermelha (DUGO *et al.*, 2001). Este resultado é confirmado pelos resultados obtidos no presente trabalho: alta concentração de antocianinas totais (431,2 mg 100g⁻¹) (Tabela 2). O uso medicinal da amoreira envolve propriedades laxativas, expectorantes, refrescantes e emolientes. Popularmente, o chá das folhas da amoreira é utilizado para diminuir os efeitos climatéricos da menopausa. Este costume pode estar relacionado pela presença de trans-resveratrol, tanto nas folhas (127,3 µg 100g⁻¹) quanto no fruto (123,0 µg 100g⁻¹), observado neste trabalho. O trans-resveratrol é um potente antagonista ativo do estrogênio nas concentrações de 10-1000 µmol kg⁻¹, além de atuar de modo similar ao estrogênio. Deste modo, pode ser administrado concomitantemente com o estrogênio, para reduzir os níveis deste hormônio que é prescrito para menopausa (RATNA; SIMONELLI, 2002).

Tabela 2 - Conteúdo de polifenóis totais, antocianinas totais e trans-resveratrol em amora, kiwi, mirtilo e morango em pós-colheita. Santa Maria, 2007.

| Fruto | Período de análise | Polifenóis totais (mg 100g ⁻¹)* ⁽¹⁾ | Antocianinas totais (mg 100g ⁻¹)* | Resveratrol (µg 100g ⁻¹)* |
|-------------------|--|--|---|---------------------------------------|
| Amora 'Preta' | Fruto após a colheita | 635,1 ±75,3** | 431,2 ±11,3 ⁽²⁾ | 123,0 ±1,2 |
| | Folha após a colheita | 1169,4 ±107,8 | ND*** | 127,3 ±4,2 |
| Kiwi 'Bruno' | Colheita | 1327,4 a***** | ND | 54,7 a |
| | Dois meses a 0,5°C mais, cinco dias a 20°C | 721,3 b | ND | 44,4 b |
| Mirtilo 'Bleugem' | Colheita | 1159,9 b | 403,8 b ⁽³⁾ | nd**** |
| | Sete semanas a 0,5 °C, mais três dias a 20°C | 1450,0 a | 585,0 a ⁽³⁾ | 130,2 ±0,9 |
| Morango 'Araza' | Colheita | 756,8 ±33,0 | 100,4 ±5,5 ⁽⁴⁾ | 125,3 ±1,2 |
| Morango 'Yvahe' | Colheita | 853,0 ±27,1 | 93,6 ±13,3 ⁽⁴⁾ | 126,2 ±1,4 |

*Valores expressos em massa fresca de fruto.

** Média e desvio padrão (n=4)

*** Parâmetro Não Determinado

**** Não detectado.

***** Médias seguidas pela mesma letra na vertical na mesma cultivar não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

⁽¹⁾ Polifenóis totais em mg de ácido gálico.

⁽²⁾ Antocianinas Totais em mg de cianidina.

⁽³⁾ Antocianinas Totais em mg de malvidina.

⁽⁴⁾ Antocianinas Totais em mg de pelargonidina.

O armazenamento refrigerado para kiwi 'Bruno' (*Actinidia deliciosa*) influenciou negativamente a conservação de polifenóis totais e também a concentração de trans-resveratrol, que decaiu do momento da colheita de 54,7 µg 100g⁻¹ para 44,4 µg 100g⁻¹ após o armazenamento refrigerado seguido de cinco dias a 20°C. Apesar de ocorrer a perda do estilbeno durante a conservação, o kiwi pode ser agregado ao consumo na dieta, pois a concentração de trans-resveratrol, correspondente a uma taça de vinho tinto ao dia (100ml),

recomendada como saudável, é de 30 a 700 μg de trans-resveratrol (MANACH *et al.*, 2004). Não há relatos na literatura sobre a presença da aglicona (trans-resveratrol em estado livre) em kiwi, apenas pesquisas sobre a transferência do gene estilbeno sintase proveniente de *Vitis* (*VstI*) para kiwi, com a finalidade de aumentar a resistência da planta ao ataque de patógenos através do aumento de resveratrol induzido. No experimento de KOBAYASHI, *et al* (2000), foi quantificada a super-expressão do gene, que sintetizou o trans-resveratrol-glicosídeo (182,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ em folhas jovens e 20,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ em folhas velhas), e a aglicona não foi detectada. Por isso, os autores acreditam que o resveratrol é rapidamente glicosilado (KOBAYASHI, *et al* 2000). As condições climáticas do Brasil, com alta umidade e calor favorecem a proliferação de patógenos, o que pode ser um fator importante para a presença de resveratrol em kiwi.

O mirtilo 'Bleugem' (*Vaccinium ashei* Reade), apresentou um aumento significativo nos teores de polifenóis totais e de antocianinas (Tabela 2), durante o armazenamento refrigerado e mais exposição a 20°C, sendo estes resultados também observados por CONNOR *et al.* (2002). O choque térmico, após o armazenamento, ativa a via dos fenilpropanóides, tanto polifenóis totais e antocianinas totais, quanto trans-resveratrol em mirtilo (Tabela 2). Apenas algumas cultivares de mirtilos, *Vaccinium angustifolium* Aiton e *Vaccinium corymbosum* L., apresentam trans-resveratrol *in natura*. LYONS *et al.* (2003) detectaram valores entre 49,3 a 140,0 $\mu\text{mol g}^{-1}$ de fruto, o que corresponde 11,2 a 31,9 $\mu\text{g 100g}^{-1}$. Mas não foi detectado trans-resveratrol, no momento da colheita, na espécie *Vaccinium ashei* Reade, confirmando os resultados da Tabela 2. Porém, após o armazenamento a 0,5°C por sete semanas seguido de três dias a 20°C induziram a biossíntese de trans-resveratrol para 130,2 $\mu\text{g 100g}^{-1}$ em massa fresca (m.f.).

O morango tem sido descrito como fonte de vitamina C e com alto poder antioxidante, que reduz o estresse oxidativo (KALT, 1999; MEYERS, 2003; HEO; LEE, 2005). As cultivares 'Araza' e 'Yvahe' apresentaram alto teor de fenóis totais, 756,8 e 853,0 mg 100g^{-1} m.f. na polpa, respectivamente (Tabela 2). A concentração de antocianinas totais foi moderada, pois, segundo MANACH *et al.* (2004), em média, o consumo de antocianinas em morangos é de 30 a 150mg por porção servida. Ambas as cultivares contém pelargonidina nas seguintes concentrações: 'Araza' 100,4 mg 100g^{-1} m.f. e 'Yvahe' contém 93,6 mg 100g^{-1} m.f.. Em relação ao resveratrol, até o momento, apenas um trabalho (WANG *et al.*, 2007) relata a presença do mesmo em morango 'Alstar' com 9,05 $\mu\text{g 100g}^{-1}$ m.f. no receptáculo (polpa) e 1510 $\mu\text{g 100g}^{-1}$ m.f. no aquênio. Na Tabela 2, os resultados são correspondentes a uma porção servida (100g) de fruto (polpa mais aquênios), onde as cultivares 'Araza' e 'Yvahe'

apresentaram significativa concentração de trans-resveratrol, 125,3 e 126,2 $\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}_{\text{m.f.}}$ na polpa, respectivamente.

Os fenóis totais não foram alterados com o armazenamento em AC em maçãs (*Malus domestica*) ‘Gala’ e ‘Fuji’, mas as antocianinas diminuíram em ‘Gala’ e elevaram em ‘Fuji’. Este fato pode ter ocorrido por dois fatores: a carga genética distinta entre as cultivares e pelas condições de armazenamento. A ‘Gala’ foi armazenada em 2,5kPa de CO_2 e a ‘Fuji’ em baixa concentração de CO_2 . Este fator também influencia a biossíntese de trans-resveratrol (Tabela 3), pois, na rota dos fenilpropanóides seguindo para os estilbenos, quatro moléculas de dióxido de carbono (CO_2) devem ser eliminadas para formação de resveratrol a partir de três moléculas de malonil-CoA mais quatro de cumaril-CoA em presença de estilbeno sintase (ETS) (EC.2.3.1.95); e três moléculas de dióxido de carbono (CO_2) devem ser eliminadas para formação da chalcona catalisada pela chalcona sintase (CHS) (EC.2.3.1.74) (Figura 2), sendo que desta derivam os demais polifenóis como chalconas e flavonóides, entre os quais estão as antocianinas. O armazenamento da ‘Gala’ em alta concentração de CO_2 (2,5kPa), possivelmente inibiu a liberação de CO_2 para o meio e, conseqüentemente, reduziu a produção de trans-resveratrol e antocianinas totais (Tabela3).

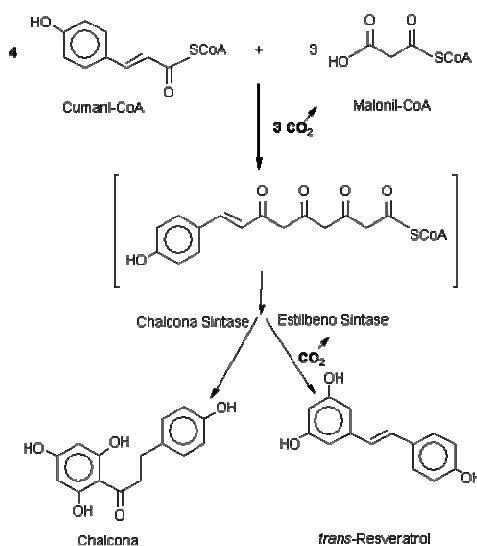


Figura 2 - Biossíntese do trans-resveratrol (CULVER, 1995)

Assim como o kiwi, não foram encontrados relatos na literatura da presença de trans-resveratrol em maçã, apenas pesquisas sobre plantas transgênicas para aumentar a resistência da planta a ataque de patógenos. Estes resultados de SZANKOWSKI *et al.* (2003) restringem-se apenas à folha. Por sua vez, RÜHMANN *et al.* (2006) pesquisaram resveratrol também no fruto, o gene *Vst1* (de *Vitis vinifera*) expressou-se apenas na casca e com maior intensidade mediante o estímulo de irradiação UVC.

Tabela 3 - Conteúdo de polifenóis totais, antocianinas totais e trans-resveratrol em maçã e caqui em pós-colheita. Santa Maria, 2007.

| Fruto | Condição de armazenamento | Polifenóis totais (mg 100g ⁻¹) ^{*(1)} | | Antocianinas totais (mg100g ⁻¹) ^{*(2)} | | Resveratrol | |
|---------------|--|--|-------------------|---|-------|--|---|
| | | | | | | Casca (µg100g ⁻¹) [*] | Polpa (µg100g ⁻¹) ^{**} |
| Maçã ‘Galaxi’ | Colheita | 323,8 | ±49,8 | 74,5 | ±19,2 | 133,0 ±1,2 | nd ^{***} |
| Maçã ‘Gala’ | Colheita | 249,9 | a ^{****} | 83,0 | a | 133,0 a | nd |
| | Oito meses (1,5kPa de O ₂ + 2,5kPa CO ₂ a 0,5°C) | 371,6 | a | 45,1 | b | 127,8 b | nd |
| | Mais cinco dias a 20°C | 309,1 | a | 63,6 | ab | 128,0 b | nd |
| Maçã ‘Fuji’ | Colheita | 264,3 | a | 7,4 | b | 114,4 ab | nd |
| | Sete meses (1,0kPa de O ₂ < CO ₂ a -0,5°C) | 225,5 | a | 13,8 | a | 121,0 a | nd |
| | Mais cinco dias a 20°C | 224,0 | a | 13,2 | a | 112,4 b | nd |
| Caqui ‘Fuyu’ | Colheita | 1180,8 | a | ----- | | traços | nd |
| | Três meses a 0,5°C | 1125,7 | a | ----- | | nd | nd |
| | Mais cinco dias a 20°C | 1048,6 | a | ----- | | nd | nd |

*Valores expressos em massa fresca de casca.

** Valores expressos em massa fresca de polpa.

** Média e desvio padrão (n=4)

****Médias seguidas pela mesma letra na vertical na mesma cultivar não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

*** Não detectado.

⁽¹⁾ Polifenóis totais em mg de ácido gálico.⁽²⁾ Antocianinas Totais em mg de cianidina.

O resveratrol é uma fitoalexina de defesa e, portanto, ocorre e atua principalmente na casca (Tabela 3). As amostras deste trabalho, são provenientes do sul do Brasil e o gene da estilbeno sintase, nativo destas maçãs, pode ter sido estimulado pelas condições de irradiação solar e umidade mais alta do que as do trabalho com maçãs transgênicas, realizados em países de clima seco, frio e com menor irradiação solar. Não foi detectada a presença de trans-resveratrol na polpa nas três cultivares de maçã e do caqui ‘Fuyu’ (*Diospyros kaki*), que apresentou apenas traços de, resveratrol na casca durante a colheita (Tabela 3). Nutricionalmente, é recomendável a ingestão dos frutos com a casca. Porém, a concentração média ingerida por fruto é muito baixa, devido à proporção entre a casca e a polpa, sendo que, nestes frutos, a casca representa apenas 7 a 15% da massa total.

Em uvas, a exposição à temperatura de 20°C influenciou o metabolismo fenólico (Figura 3). A síntese de polifenóis totais foi estimulada logo após o armazenamento, principalmente na ‘Niágara Rosada’ (*Vitis labrusca*) e ‘Merlot’ (*Vitis vinifera*) (Figura 3A). Já na ‘Isabel’ (*Vitis labrusca*) ocorreu alteração nos níveis de compostos antociânicos que foi mais expressiva, ao passo que não ocorre o mesmo na ‘Niágara Rosada’ e ‘Merlot’ (Figura 3B). CANTOS *et al.* (2000) obtiveram resultados semelhantes na ‘Isabel’ e na uva de mesa ‘Napoleon’, armazenados sob refrigeração a 0°C por 10 dias, onde os níveis de antocianinas totais foram incrementados até o 10º dia a 15°C. Em todas as cultivares de uva, a concentração de trans-resveratrol foi alterada (Figura 3C). A síntese de trans-resveratrol na ‘Isabel’ foi estimulada apenas pela diferença de temperatura de 20°C, após o armazenamento refrigerado. A ‘Merlot’ sintetizou o trans-resveratrol no frio (-0,5°C), durante as seis semanas.

Posteriormente, a exposição da ‘Merlot’ a 20°C durante cinco dias elevou a concentração deste estilbeno em 62% (Figura 3C). A indução da síntese do estilbeno pelo frio também foi observada na cultivar ‘Napoleon’, onde a concentração foi elevada em duas vezes (CANTOS *et al.*, 2000; ARTÉS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2003).

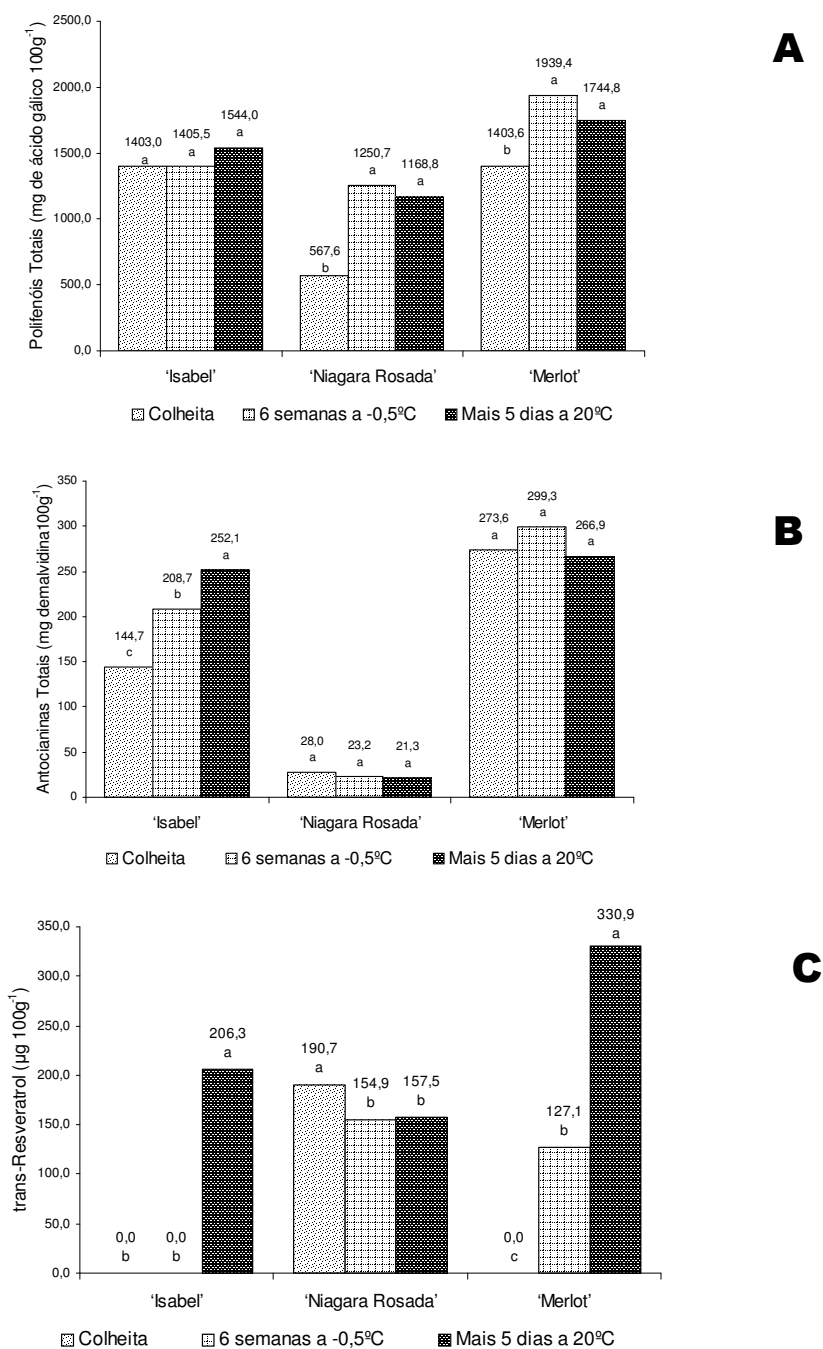


Figura 3 - Conteúdo de polifenóis totais, antocianinas totais e trans-resveratrol em uvas em pós-colheita. Santa Maria, 2007.

2.4. Conclusões

Há presença de trans-resveratrol *in natura* em polpa de kiwi 'Bruno' e morangos 'Araza' e 'Yvahe', em amora *Morus nigra* nas folhas e fruto. Em maçãs 'Galaxi', 'Gala' e 'Fuji' ocorre apenas na casca. O caqui 'Fuyu' apresenta traços de trans-resveratrol na casca apenas na colheita. O armazenamento refrigerado estimula a síntese de trans-resveratrol em mirtilo 'Bleugem', uvas 'Isabel' e 'Merlot' mas não estimula em 'Niagara Rosada'. O teor de polifenóis totais não é alterado em maçãs 'Gala' e 'Fuji', caqui 'Fuyu' e uva 'Isabel' com o frio, mas eleva-se em mirtilo 'Bleugem', uvas 'Niagara Rosada' e 'Merlot'; e decai em kiwi 'Bruno' durante o armazenamento. O armazenamento refrigerado também estimula a biossíntese antocianinas totais em mirtilo.

AGRADECIMENTO

Os autores desejam expressar seu agradecimento á CAPES pelo apoio financeiro. Eles também agradecer ao Grupo de Pesquisa de Nutrição Mineral de Plantas pelo fornecimento das amostras de morango.

2.5. Referências

ARAÚJO, J. M. A. **Química dos Alimentos: teoria e prática**. 3ed. Viçosa: UFV, 2004. 478 p.

ARTÉS-HERNÁNDEZ, F.; ARTÉS, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Quality and enhancement of Bioactive Phenolics in Cv. Napoleon Table Grapes Exposed to Different Postharvest Gaseous Treatments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51 p. 520-5295, 2003.

BURNS, J.; *et al.* Plant foods and herbal sources of resveratrol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3337-3340, 2002.

CANTOS, E.; *et al.* Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 4606-4612, 2000.

CONNOR, A. M.; *et al.* Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. **Journal of Agriculture Food Chemistry**. v.50 p.893-898, 2002.

CULVER, J. N. Molecular strategies to develop virus-resistant plants, em: **Molecular methods in plant pathology**, Singh, R. P. and Singh, U.S., Lewis Publishers, U.S.A., p. 235-270, 1995.

DI STEFANO, R.; CRAVERO, M. C.; GENTILINI, N. Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini. **L'Enotecnico**, v.25 n.5 p. 83-89, 1989.

DUGO, P.; *et al.* Identification of anthocyanins in berries by narrow-bore high-performance liquid chromatography with electrospray ionization detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3987-3992, 2001.

GENTILE, C.; *et al.* Antioxidant activity of Sicilian Pistachio (*Pistacia vera* L. Var. Bronte) nut extract and its bioactive components **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p.643-648, 2007.

HEO, H. J.; LEE, C. Y. Strawberry and its anthocyanins reduce oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53 p.1984-1989, 2005.

HILLIS, W. E.; HART, J. H.; YAZAKI, Y. Polyphenols of *Eucalyptus sideroxylon*. **Phytochemistry** (Oxford), v. 13, n. 8, p. 1591-1595, 1974.

KALT, W.; *et al.* Antioxidant Capacity, Vitamin C, Phenolics, and Anthocyanins after Fresh Storage of Small Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p.4638-4644, 1999.

KOBAYASHI, S.; *et al.* Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) transformed with a *Vitis* stilbene synthase gene produce piceid (resveratrol-glucoside). **Plant Cell Report**, v.19, p.904-940, 2000.

LANGCAKE, P.; CORNFORD, C. A.; PRYCE, R. J. Identification of pterostilbene as a phytoalexin of *Vitis vinifera* leaves. **Phytochemistry**, v. 18, n. 6, p. 1025-1028, 1979.

LANGCAKE, P. Disease resistance of *Vitis spp.* and the production of the stress metabolites resveratrol, ϵ -viniferin, α -viniferin and pterostilbene. **Physiology Plant Pathology**, v. 18 n. 2 p. 213-226, 1981.

LI, H. F.; CHEN, S. A.; WU, S. N. Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on Ca²⁺-activated K⁺ current in vascular endothelial cells. **Cardiovascular Research**, v.45 p.1035-1045, 2000.

LYONS, M. M.; *et al.* Resveratrol in Raw and Baked Blueberries and Bilberries, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51 p. 5867-5870, 2003.

MANACH, C.; *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79 p. 727-747, 2004.

MELZUCH, K.; *et al.* Resveratrol in Parts of Vine and Wine Originating from Bohemian and Moravian Vineyard Regions. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 66, n. 1, p.53-57, 2001.

MEYERS, K. J.; *et al.* Antioxidant and Antiproliferative Activities of Strawberries, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p.6887-6892, 2003.

PINTO, M. C.; GARCÍA-BARRADO, J. A.; MACÍAS, P. Resveratrol is a Potent Inhibitor of the Dioxygenase Activity of Lipoxygenase. . **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p.4842-4846, 1999.

RATNA, W. N.; SIMONELLI J. A. The action of dietary phytochemicals quercetin, catechin, resveratrol and naringenin on estrogen-mediated gene expression. **Life Sciences**. v. 70, p. 1577-1589, 2002.

RÜHMANN. S.; *et al.* Piceid (resveratrol glucoside) synthesis in stilbene synthase transgenic apple fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4633-4640, 2006.

SCHAUSS, A. G.; *et al.* Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian FALm Berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 8598-8603, 2006.

SCHNEIDER, Y.; *et al.* Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. **Cancer Letters**, v. 158, p. 85-91, 2000.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A.. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

STEWART, J. R.; CHRISTMAN, K. L.; O'BRIAN, C. A. Effects of resveratrol on the autophosphorylation of phorbol ester-responsive protein kinases: Inhibition of protein kinase D but not protein kinase C isozyme autophosphorylation. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, n. 9, p. 1355-1359, 2000.

SUBBARAMAIAH, K.; *et al.* Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 34 (Aug. 21), p. 21875-21882, 1998.

SZANKOWSKI, I.; *et al.* Transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.) with the stilbene synthase gene from grapevine (*Vitis vinifera* L.) and a PGIP gene from kiwi (*Actinidia deliciosa*). **Plant Cell Report**, V.22 P.141–149, 2003.

WANG, S. Y.; *et al.* Resveratrol Content in Strawberry Fruit Is Affected by Preharvest Conditions **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55 p.8269–8274 2007.

ZHOU, H. B.; *et al.* Resveratrol induces apoptosis in human esophageal carcinoma cells. **World Journal of Gastroenterology**, v.9 n.3 p.408-411, 2003.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à CAPES, CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro.

CAPÍTULO 3

Síntese de trans-resveratrol e controle de podridões em maçãs com uso de elicitores em pós-colheita

Cláudia Kaehler Sautter⁽¹⁾, Lindolfo Storck⁽¹⁾, Mara Regina Rizzatti⁽²⁾,
Carlos Augusto Mallmann⁽¹⁾ e Auri Brackmann⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Avenida Roraima, nº1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, CEP 97105-900 Santa Maria, RS. E-mail: kaehler@terra.com.br, lindolfo@smail.ufsm.br, mallmann@smail.ufsm.br, brackman@ccr.ufsm.br.

⁽²⁾ Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Centro de P&D / GFR, Avenida Ipiranga, nº6681, Prédio 96^a-104, CEP 90619-900 Porto Alegre, RS. E-mail: marar@pucrs.br.

Resumo – Objetivou-se avaliar o efeito da aplicação de elicitores abióticos para biossíntese de resveratrol e o controle de podridão em maçãs ‘Gala’ e ‘Fuji’. Os tratamentos foram: radiação ultravioleta, fosfito e acibenzolar-S-metil, aplicados antes do armazenamento, e ozônio aplicado intermitente durante o armazenamento. As condições de armazenamento foram: ‘Gala’ (1,5kPa de O₂ e 2,5kPa de CO₂, a 0,5°C por oito meses) e ‘Fuji’ (1,0kPa de O₂ e <0,5kPa de CO₂, a -0,5°C por sete meses). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito repetições de 25 frutos. Na casca dos frutos, determinou-se trans-resveratrol por cromatografia líquida de alta eficiência; polifenóis totais e antocianinas totais por espectrofotometria; e diâmetro de lesão após inoculação por *Penicillium sp.* Analisou-se na polpa: firmeza de polpa, acidez titulável, sólidos solúveis totais, açúcares redutores e não-redutores. Os elicitores não alteraram a concentração de polifenóis totais e antocianinas, com a exceção da perda de antocianinas totais com o Acibenzolar-S-metil em ‘Gala’. Os elicitores induziram, em ‘Fuji’, a síntese de trans-resveratrol na seguinte seqüência: Acibenzolar-S-metil > Fosfito ≥ Irradiação UV-C ≥ Ozônio, mas não foram eficientes para ‘Gala’. Não houve correlação entre síntese de trans-resveratrol e controle de podridão, porém o fosfito controlou a podridão em ‘Gala’.

Termos para indexação: *Malus domestica*, SAR, UV-C, ozônio, fosfito, acibenzolar-S-metil, *Penicillium sp.*

Synthesis of trans-resveratrol and rotting control in apples with use of elicitors in post-harvest

Abstract - The objective of this paper was evaluate the effect of the application of abiotic elicitors of resveratrol in 'Gala' and 'Fuji' apples, and rotting control. The treatment was with ultraviolet irradiation, phosphite and acibenzolar-S-methyl, applied before controlled atmosphere storage and ozone, applied so intermittently during storage. The storage conditions were: 'Gala' (1.5 kPa, O₂ and 2.5 kPa CO₂, at 0.5°C by eight months) and 'Fuji' (1.0 kPa, O₂ and <0.5 kPa CO₂, at -0.5°C for seven months). The experimental design was a completely randomized with eight repetitions of 25 fruits. In the skin of fruit trans-resveratrol were analyzed by high performance liquid chromatography; total polyphenols and anthocyanins by spectrophotometry and diameter of injury after inoculation by *Penicillium sp.* Analyzed in the flesh: firmness, acidity, total soluble solids, reducing and non-reducing sugars. The elicitors not change the concentration of phenols and anthocyanins, with the exception of the loss of total anthocyanins with Acibenzolar-S-methyl in 'Gala' apple. The elicitors induce in 'Fuji' apples the synthesis of trans-resveratrol in the following sequence: Acibenzolar-S-methyl > phosphite ≥ UV-C irradiation ≥ ozone, but don't effective on 'Gala' apple. There isn't correlation between synthesis of trans-resveratrol and rotting control, but the phosphite controlled rot in 'Gala'.

Index terms: *Malus domestica*, SAR, UV-C, ozone, phosphite, Acibenzolar-S-methyl, *Penicillium sp.*

3.1. Introdução

O armazenamento em atmosfera controlada (AC) é mais eficaz para manutenção da qualidade de maçãs, que o armazenamento refrigerado (AR), mas ainda assim ocorrem perdas significativas decorrentes de podridões. A legislação brasileira coloca grande restrição ao uso de fungicidas após a colheita, pois resíduos destes podem oferecer risco de intoxicação para o consumidor. Uma alternativa para conferir proteção ao fruto é estimular a produção de substâncias naturais (fitoalexinas), que desencadeiam mecanismos de defesa, produzidas pelo próprio fruto para aumentar a resistência ou controlar o patógeno sobre o fruto, no armazenamento e durante a vida de prateleira. Os agentes ativadores desta resistência denominam-se elicitores, que podem ser bióticos ou abióticos. Entre os abióticos destacam-se

a irradiação ultravioleta do tipo C (UV-C), o ozônio e o acibenzolar-S-metil (ASM). Também há o fosfito, um fertilizante foliar, ainda pouco explorado na pós-colheita como elicitor.

A irradiação ultravioleta, o etileno e o ozônio estimulam a produção do resveratrol em uvas na pós-colheita (ARTÉS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2003; GRIMMIG *et al.*, 2002). O resveratrol é uma fitoalexina produzida por uvas em resposta ao estresse de elicitores bióticos (*Botrytis cinerea*, *Plasmopora viticola*) e também abióticos como UV-C e ozônio (ADRIAN *et al.*, 2000; GRIMMIG *et al.*, 2003). Esta fitoalexina é um polifenol da classe dos estilbenos, apresentando-se sob dois isômeros (trans-3, 5,4'-trihidroxiestilbeno) e cis-resveratrol (cis-3, 5,4'-trihidroxiestilbeno). O isômero trans-resveratrol tem reconhecidas atividades biológicas e algumas delas são de uso terapêutico, tais como ação antiinflamatória, para redução do risco de aterosclerose, inibição da enzima lipoxigenase e ação anticarcinogênica (PINTO, *et al.* 1999; FRÉMONT, 2000).

O controle da podridão em plantas pode ser eficiente através de resistência sistêmica adquirida (“*Systemic Acquired Resistance*” - SAR) que envolve o ácido salicílico como sinalizador (DURRANT; DONG, 2004). Um ativador químico de resistência de plantas a doenças, aplicado a campo, é o Acibenzolar-S-metil (ASM ou benzotiadiazol). Este produto não tem ação direta sobre o patógeno, mas sua estrutura espacial, semelhante ao ácido salicílico, parece desenvolver papel importante na transdução de sinal (CONRATH *et al.*, 2001). O ASM é rapidamente absorvido pelos tecidos foliares e confere à planta um aumento de seu nível de resistência. Em pós-colheita, tem sido pesquisada a ação do ASM em maçãs ‘Golden Delicious’ no combate ao *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea* (SPADARO *et al.*, 2004) e em melão (HUANG *et al.*, 2000).

O fosfito P_2O_5 (pentóxido de fósforo) é um ânion obtido da neutralização do ácido fosfônico (formalmente chamado de ácido fosforoso H_3PO_3) com álcalis, sendo rapidamente absorvido pela planta e translocado pelo xilema e posteriormente pelo floema. A ação deste composto é controvertida, podendo atuar como adubo foliar, como fungicida tópico, dependendo da concentração e do cátion covalente, e como indutor de resistência na planta (GUEST; GRANT, 1991). Resultados satisfatórios foram obtidos no controle de podridões em maçã ‘Fuji’ com o uso de fosfito antes do armazenamento (BRACKMANN *et al.*, 2004).

Em maçãs, os elicitores abióticos, UV-C, ozônio, ASM e fosfito ainda não foram investigados como indutores da síntese de trans-resveratrol. O objetivo deste trabalho é investigar a possível indução da síntese de trans-resveratrol e sua possível ação como fitoalexina em maçãs ‘Gala’ e ‘Fuji’ armazenadas em atmosfera controlada.

3.2. Material e Métodos

O experimento foi conduzido, em 2005, no Núcleo de Pesquisa em Pós-Colheita da Universidade Federal de Santa Maria. As maçãs ‘Gala’ e ‘Fuji’ foram colhidas em um pomar comercial na região de Vacaria, RS, e selecionadas aquelas sem lesão por dano mecânico ou fitopatológico. A unidade experimental foi constituída por 25 frutos representativos. Para a avaliação dos tratamentos quanto às características físico-químicas dos frutos foram usadas quatro repetições segundo o delineamento inteiramente casualizado. Foram usadas outras quatro repetições no mesmo delineamento, para a avaliação de podridão.

Os cinco tratamentos foram determinados como sendo: a) testemunha, b) irradiação ultravioleta do tipo C (UV-C), d) ozônio, e) fosfito e d) acibenzolar-S-metil (ASM).

a) A testemunha foi exposta somente à atmosfera controlada;

b) A exposição dos frutos à irradiação UV-C foi feita em uma câmara de irradiação dotada de quatro fontes, com acionamento independente. A dose aplicada foi de $2,4\text{kJ m}^{-2}$, sendo aplicada a uma distância de 25cm, da fonte até a superfície com comprimento de onda 254nm em temperatura de 30°C. A irradiância UV-C foi obtida por meio de espectroradiômetro modelo IL 2000 da marca International Light[®]. As doses foram calculadas através da integração do tempo de exposição e a irradiância de cada fonte, com uso do pacote Oringin[™] versão 5,0;

c) O armazenamento em presença de ozônio, com atmosfera controlada descrita no item 3.2.1, com foi feito em minicâmaras de 400L, equipadas com purificador de ar modelo OTB-10W.C, que produziu ozônio no interior destas minicâmaras com a concentração de 0,03ppm. A concentração de ozônio, presente no interior das minicâmaras foi determinada através do método de oxiredução;

d) A exposição dos frutos à solução de fosfito foi feita por imersão, por 3 minutos, em uma solução de fosfito e água destilada e deionizada na concentração de $1,27\text{g L}^{-1}$ de P_2O_5 e $1,18\text{g L}^{-1}$ de K_2O , mais espalhante adesivo Silwet L77[®] (0,05% v/v);

e) A exposição dos frutos à solução de acibenzolar-S-metil (BION[®]) também foi feita por imersão, por 3 minutos, em uma solução na concentração de 50mg L^{-1} , mais espalhante adesivo Silwet L77[®] (0,05% v/v);

Após cada tratamento com oito repetições, quatro destas repetições foram armazenadas em atmosfera controlada e quatro repetições foram inoculadas com *Penicillium sp.* e, posteriormente, armazenadas sob as mesmas condições em câmaras separadas.

O *Penicillium sp.*, coletado dos tecidos de frutos contaminados, foi identificado por sua estrutura morfológica e isolado pelo método de isolamento monospórico. A estirpe isolada foi cultivada em meio batata dextrose agar (BDA) e Mathur. Posteriormente, foi feita diluição dos esporos para $2,4 \cdot 10^5$ esporos ml^{-1} . Cada fruto foi perfurado na região equatorial em dois pontos opostos com auxílio de uma ponteira com 3mm de diâmetro e 5mm de profundidade. Em cada ponto foi inoculado 30 μl da suspensão de esporos. Após a secagem a 20°C da alíquota inoculada, os frutos foram armazenados em câmaras assépticas sob as mesmas condições previamente determinadas para as amostras não inoculadas. Após o armazenamento, os frutos foram expostos a 20°C por cinco dias e as lesões foram medidas com auxílio de paquímetro; os patógenos foram novamente isolados das amostras, comprovando sua patogenicidade pelo postulado de Koch (FERNANDEZ, 1993).

3.2.1 Condições de armazenamento dos frutos

As maçãs foram armazenadas em atmosfera controlada a 0,5°C para ‘Gala’ e -0,5°C para ‘Fuji’, em minicâmaras de 232L. A composição atmosférica para ‘Gala’ foi de 1,5kPa de O₂ e 2,5kPa de CO₂ e para ‘Fuji’ 1,0kPa de O₂ e <0,5kPa de CO₂. As maçãs ‘Gala’ e ‘Fuji’ foram armazenadas por oito meses sete meses, respectivamente. Para reduzir a concentração de CO₂, produzido pela respiração, foi colocado hidróxido de cálcio, durante o armazenamento da ‘Fuji’. As condições de AC foram estabelecidas mediante a instalação da atmosfera, onde as pressões parciais de CO₂ foram obtidas através da injeção deste gás nas minicâmaras. Devido ao processo de respiração dos frutos, houve consumo de O₂ e aumento de CO₂, sendo que, para correção destes gases, foi utilizado um analisador automático de O₂ e CO₂ da marca Kronenberger Systemtechnik[®], que analisou diariamente as concentrações de gases das minicâmaras. O CO₂ em excesso, resultante do processo respiratório, foi eliminado com o auxílio de um absorvedor contendo uma solução de hidróxido de potássio. Depois de finalizados os períodos de armazenamento preestabelecidos para cada cultivar, os frutos foram transferidos para câmara onde permaneceram durante cinco dias à temperatura de 20°C, em ar atmosférico, condição esta ideal para biossíntese das fitoalexinas, para que assim os frutos pudessem desenvolver a resposta fisiológica esperada.

3.2.2 Análises físico-químicas

A firmeza de polpa foi determinada na região equatorial dos frutos, em dois lados opostos, através da remoção de 2mm da epiderme, com auxílio de um penetrômetro equipado com ponteira de 11mm de diâmetro. A epiderme coletada foi reservada para extração dos compostos fenólicos. A acidez titulável foi obtida por titulometria do suco, previamente extraído de fatias transversais retiradas da região equatorial das maçãs, com solução de hidróxido de sódio 0,1N até pH 8,2 e os resultados foram expressos em meq 100ml⁻¹. Os sólidos solúveis totais foram mensurados por refratometria, sendo os valores expressos em °Brix com correção da temperatura ambiente. Os açúcares totais e redutores foram determinados segundo o método de Somogyi & Nelson. A incidência da podridão causada por *Penicillium sp.* foi obtida através da medida do diâmetro das lesões desenvolvidas a partir da inoculação, com auxílio de paquímetro.

3.2.3 Extração dos compostos fenólicos

As amostras para a determinação de trans-resveratrol, polifenóis totais e antocianinas totais, foram preparadas seguindo os passos: pesagem do fruto, retirada de 2mm da casca na região equatorial, pesagem de 30g de cascas, adição de 90ml da dissolução de etanol/ácido clorídrico/água na proporção de 70/1/30 (V/V/V) e homogeneização em liquidificador a 87000rpm por 1 minuto com, e após centrifugação a 10.000g por 15 minutos.

Somente as amostras destinadas para análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram filtradas em membrana com poro de 0,22µm e congeladas a -20°C até o momento de análise. O padrão empregado foi trans-resveratrol (trans-3, 5,4'-trihidroxiestilbeno) adquirido da Sigma Chemical Co.

3.2.4 Método cromatográfico para trans-resveratrol

As análises foram feitas em um sistema híbrido de CLAE, utilizando bomba INTRALAB[®] (Modelo 5050), com detector de diodos DAD HP Series 1100 automatizado por Agilent[®], controlado com o programa CHEMSTATION Data System software. A coluna de fase reversa foi Merck[®] Nucleosil, C18 (250mm . 4mm), tamanho de partícula de 5µm, com pré-coluna (10mm 5mm) de mesma composição. A injeção de 10µl, foi feita através do

injetor automatizado Agilent® (Modelo Series 1100) e a coluna permaneceu aquecida a 30°C. O método para trans-resveratrol foi com eluição em condições isocráticas com fase móvel água/acetonitrila (35:65), pH 2,5, ajustado com ácido ortofosfórico, o fluxo foi de 1,0ml min⁻¹ e a eluição foi monitorada a 306nm.

A identificação do trans-resveratrol foi baseada no tempo de retenção, sendo a pureza do pico confirmada através do detector com arranjo de diodos (DAD). A quantificação do trans-resveratrol foi feita por padronização externa. A concentração de trans-resveratrol foi expressa em µg 100g⁻¹.

Todas as análises cromatográficas, incluindo a validação do método, foram feitas ao abrigo da luz, a fim de evitar que o isômero trans-resveratrol fosse convertido em cis-resveratrol. Portanto, o estudo da estabilidade foi restringido à temperatura de bancada (25°C), e armazenamento a -20°C, nos diversos tempos.

A validação do método em cromatografia líquida de alta eficiência do analito trans-resveratrol apresentou linearidade $y = 0,0296.x + 0,405$, e coeficiente de correlação de 0,9971. Os limites (detecção e quantificação) do trans-resveratrol foram obtido realizando-se diluições gradativas do padrão. O limite de detecção foi de 0,07µg l⁻¹ e de quantificação 1,58µg l⁻¹. Os testes de recuperação, limite de quantificação e exatidão foram realizados com adição do padrão sobre a matriz. A recuperação média para 'Gala' foi de 98,8% (C.V. 5,6%) e para 'Fuji' foi de 94,1% (C.V. 1,7%). A repetibilidade foi realizada em triplicata. A reprodutibilidade foi feita através da análise das variações diárias e em dias diferentes, das áreas dos picos dos padrões.

3.2.5 Método espectrofotométrico para polifenóis totais e antocianinas totais

A concentração de polifenóis totais foi determinada pelo método colorimétrico (SINGLETON; ROSSI, 1965). Em tubo de ensaio, adicionou-se 200µl de amostra diluída (1:10), em solução etanol/ácido clorídrico/água na proporção de 70/1/30 (V/V/V), 1000µl de reagente de Folin-Ciocalteu diluído (1:10) em água destilada e deionizada. Entre 3 segundos a 8 minutos adicionou-se 800µl de Na₂CO₃ 7,5%. Após duas horas ao abrigo da luz, foi lida a absorbância à 765nm em espectrofotômetro da marca Femto® modelo 600S (mono feixe). A curva de calibração utilizou como padrão uma solução de ácido gálico nas seguintes

concentrações: 50, 100, 150, 250 e 500mg L⁻¹. A concentração de polifenóis totais foi expressa em mg 100g⁻¹

A medida experimental de antocianinas totais foi realizada pela leitura na maior absorvância, sendo que o comprimento de onda selecionado é resultante de uma varredura entre os comprimentos de 400 a 600nm, determinando a antocianina predominante. As amostras foram diluídas com uma dissolução de etanol/ácido clorídrico/água na proporção de 70/1/30 (V/V/V). A leitura foi feita em Espectrofotômetro 600 da marca Femto[®], UV_{visível}. Os resultados foram obtidos ($\lambda_{\text{máx}} = 525\text{nm}$) utilizando coeficiente de extinção molar 29,5L cm⁻¹mol⁻¹, expressos em mg de cianidina L⁻¹ e convertidas para mg 100g⁻¹ (Di STEFANO *et al.*, 1989).

3.2.6 Análise estatística

Com o objetivo de verificar as diferenças nas concentrações de polifenóis totais, antocianinas totais e trans-resveratrol, entre os diferentes tratamentos, foi efetuada uma análise da variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro. Foi ainda analisada a correlação de Pearson entre a síntese de trans-resveratrol e o controle da podridão.

3.3 Resultados e Discussão

Após o período de armazenamento, os tratamentos não afetaram os polifenóis totais na casca do fruto (Tabela 1) nem sólidos solúveis totais (Tabela 2), tanto na maçã ‘Gala’ quanto na ‘Fuji’. Com o aumento da temperatura para 20°C, após o armazenamento, as duas cultivares comportaram-se de modo distinto. A ‘Gala’ sintetizou mais antocianinas durante o armazenamento com UV-C, mas não diferiu da testemunha no quinto dia a 20°C. No entanto, na ‘Fuji’, as antocianinas não foram alteradas nas mesmas condições. O tratamento com acibenzolar-S-metil (ASM) inibiu a síntese destas antocianinas em ‘Gala’ (Tabela 1) e também acelerou a perda de firmeza de polpa (Tabela 2).

Nos demais atributos, a ‘Gala’ não sofreu alterações com o uso de elicitores (Tabela 2), porém o controle da podridão foi obtido com a aplicação de fosfito (Tabela 1). Neste caso, não há correlação entre o controle da podridão com a concentração da fitoalexina trans-resveratrol (Correlação de Pearson: -0,01 *pa* 0,966). O mecanismo de defesa do hospedeiro (planta) ainda não é completamente conhecido, mas o ânion fosfito tem sido relacionado ao

aumento da zona bloqueadora da necrose, rápida mudança citológica através da migração nuclear, deposição de papila e aumento da resposta de hipersensibilidade (morte celular). No hospedeiro, também ocorre a biossíntese de etileno, aumento da respiração, ativação da fenilalanina amonialiase (FAL), lignificação, ativação do metabolismo das pentoses-fosfato. Entre as fitoalexinas encontram-se sesquiterpenóides em tabaco e fenóis que não são definidos (GUEST; GARNT, 1991). Em feijão-fradinho (*Vigna unguiculata*), experimentos com fosfanato demonstram o acúmulo de fitoalexinas como kievitone e faseolidina em plantas infectadas (SAINDRENAN *et al.*, 1990). JACKSON *et al.* (2000), estudando eucalipto, não observaram mudanças significativas em duas enzimas chave da síntese de diversos fenóis simples (4-coumarato CoA ligase [4-CL], cinamil álcool desidrogenase [CAD]), mas verificaram que, quando a concentração de fosfito é alta, o modo de ação é direta sobre o fungo, e, quando a concentração é baixa, a planta tem um incremento em sua resistência natural. Já, os resultados obtidos neste trabalho foram semelhantes aos obtidos por BRACKMANN *et al.* (2004). Estes autores verificaram que a aplicação em pós-colheita, em maçãs 'Fuji' tratadas com fosfito de potássio (250mL 100L⁻¹) + CaCl₂ (2%) proporcionou a menor incidência de podridões e o menor diâmetro de lesão.

A cultivar Fuji respondeu a todos os tratamentos com elicitores sintetizando trans-resveratrol, mas sem alterações na concentração de polifenóis totais ou antocianinas totais (Tabela 1). O incremento na concentração de trans-resveratrol foi maior para acibenzolar-S-metil seguido do fosfito, irradiação UV-C e ozônio. Também em 'Fuji' não há correlação (Correlação de Pearson: 0,05 *pa* 0,836) entre a produção de trans-resveratrol e o controle do *Penicillium sp.* Após o período de armazenamento de sete meses em AC, nenhum elicitor apresentou efeito significativo no controle de podridão. Estes resultados são divergentes aos obtidos por BRACKMANN *et al.* (2004), o que se deve, provavelmente ao fato de que o período de armazenamento foi de 14 dias a 0°C em contraste com o atual trabalho, que permaneceu sete meses na câmara a -0,5°C. Da mesma forma, Spadaro *et al.* (2004), com uso de ASM em 'Golden Delicious', obtiveram controle de *B. cinerea* e *P. expansum* com 20 dias de armazenamento a 4°C. No presente trabalho, o ASM não controlou *Penicillium sp.*, em sete meses de armazenamento a -0,5°C, porém foi o melhor tratamento para indução de trans-resveratrol em 'Fuji' e mobilizou, de forma significativa, os açúcares não-redutores a redutores, sinalizando um aumento do metabolismo (Tabela 2).

3.4 Conclusões

(1) Os elicitores abióticos induzem a síntese de trans-resveratrol em maçã ‘Fuji’ na seguinte seqüência: Acibenzolar-S-metil > Fosfito ≥ irradiação UV-C ≥ ozônio, mas não apresentam efeito em maçãs ‘Gala’, durante o armazenamento em atmosfera controlada.

(2) Não há aumento na concentração dos polifenóis totais e das antocianinas totais com o uso de elicitores abióticos.

(3) Os elicitores abióticos não apresentam efeito no controle de podridão com exceção do fosfito, que controla a podridão em maçã ‘Gala’.

(4) Não há correlação entre a síntese de trans-resveratrol e o controle de podridão.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, FAPERGS e CNPq pelo apoio financeiro. Agradecem também a Interzone do Brasil pelo apoio técnico.

3.5 Referências

ADRIAN, M.; *et al.* Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 6103-6105, 2000.

ARTÉS-HERNÁNDEZ, F.; ARTÉS, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Quality and enhancement of Bioactive Phenolics in Cv. Napoleon Table Grapes Exposed to Different Postharvest Gaseous Treatments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5290-5295, 2003.

BRACKMANN, A.; *et al.* Fosfitos para o controle de podridões pós-colheita em maçãs ‘Fuji’ durante o armazenamento refrigerado. **Ciência Rural**. v.34, n.4, p.1039-1042, 2004.

CONRATH U, *et al.* Priming as a mechanism in induced systemic resistance of plants. **European Journal of Plant Pathology**. v.107, p.113–119, 2001.

DI STEFANO, CRAVERO, M. C.; GENTILINI, N. Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini. **L’Enotecnico**, v.25, n.5 p. 83-89, 1989.

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology** v.42, p.185-209, 2004

FERNANDEZ, M. R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo: Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, 1993 128 p.

FRÉMONT, L. Minireview: Biological effects of resveratrol. **Life Sciences**, v. 66, n. 8, p.663-673, 2000.

- GRIMMIG, B.; *et al.* Ethylene- and ozone-induced regulation of a grapevine resveratrol synthase gene: different responsive promoter regions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 865-870, 2002.
- GRIMMIG, B.; *et al.* Ozone-induced gene expression occurs via ethylene-dependent and -independent signalling. **Plant Molecular Biology**. v. 51, p.599–607, 2003.
- GUEST, D.; GARANT, B. The complex action of phosphonates as antifungal agents. **Biological Review**. v. 66, p.159-187, 1991.
- HUANG, Y., *et al.* Foliar application of acibenzolar-*S*-methyl and protection of postharvest rock melons and Hami melons from disease. **European Journal of Plant Pathology**. v.106, p.651–656, 2000.
- JACKSON, T. J.; *et al.* Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**. v.49, p.147–154, 2000.
- PINTO, M. C., GARCÍA-BARRADO, J. A.; MACÍAS, P. Resveratrol is a potent inhibitor of the dioxygenase activity of lipoxygenase. **Journal Agricola Food Chemistry**. v. 47, p. 4842-4846, 1999.
- SAINDRENAN, P.; BARCHIETTO, T.; BOMPEIX, G. Effects of phosphonate on the elicitor activity of culture filtrates of *Phytophthora cryptogea* in *Vigna unguiculata*. **Plant Science**.v. 67, p.245-251, 1990.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A.. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.
- SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple combining a biocontrol agent with hot water dipping and acibenzolar-*S*-methyl, baking soda, or ethanol application. **Postharvest Biology and Technology**. v. 33, p.141–151, 2004.

Tabela 1 – Concentrações médias de compostos fenólicos e controle de podridão (*Penicillium sp.*) avaliados na saída da câmara e mais 5 dias a 20°C em função dos Tratamentos em maçã 'Gala' armazenada em atmosfera controlada (AC) por oito meses a 0,5°C e maçã 'Fuji' armazenada em AC por sete meses a -0,5°C. Santa Maria, 2005.

| Cultivar e Tratamentos | Polifenóis totais ⁽¹⁾ (mg 100g ⁻¹ _{m.f.c}) | | Antocianinas totais ⁽²⁾ (mg 100g ⁻¹ _{m.f.c}) | | Resveratrol ⁽³⁾ (µg 100g ⁻¹ _{m.f.c}) | | Podridão Lesão (cm) |
|------------------------|---|---------------|---|---------------|---|---------------|------------------------|
| | Saída | 5 dias a 20°C | Saída | 5 dias a 20°C | Saída | 5 dias a 20°C | 5 dias a 20°C |
| 'Gala' | | | | | | | |
| <i>Análise Inicial</i> | 249,9 | | 83,0 | | 133,0 | | |
| Testemunha | 371,6 a* | 309,1 a | 45,1 b | 63,6 a | 127,7 a | 127,9 a | 9,1 a |
| Irradiação (UV-C) | 317,0 a | 355,5 a | 57,8 a | 60,2 a | 126,9 a | 127,2 a | 8,0 a |
| Ozônio | 307,3 a | 326,3 a | 47,6 b | 64,0 a | 127,9 a | 128,9 a | 8,4 a |
| Fosfíto | 366,4 a | 280,9 a | 51,5 b | 52,6 a | 128,5 a | 127,7 a | 5,3 b |
| Acibenzolar-S-metil | 296,6 a | 270,8 a | 35,4 b | 37,8 b | 128,9 a | 128,5 a | 7,7 a |
| CV (%) | 12,8 | 10,0 | 28,5 | 17,7 | 1,5 | 0,5 | 16,6 |
| 'Fuji' | | | | | | | |
| <i>Análise Inicial</i> | 264,3 | | 7,4 | | 114,4 | | |
| Testemunha | 225,5 a | 224,0 a | 13,8 a | 13,2 a | 112,5 bc | 121,5 d | 7,5 ab |
| Irradiação (UV-C) | 246,5 a | 188,9 a | 15,7 a | 13,7 a | 116,6 b | 137,6 bc | 7,6 ab |
| Ozônio | 265,0 a | 253,5 a | 17,6 a | 16,0 a | 106,9 c | 124,6 c | 7,9 a |
| Fosfíto | 296,8 a | 227,7 a | 18,4 a | 11,0 a | 106,6 c | 150,2 b | 7,0 b |
| Acibenzolar-S-metil | 254,3 a | 241,1 a | 16,5 a | 10,9 a | 146,3 a | 165,9 a | 7,6 ab |
| CV (%) | 8,3 | 6,9 | 24,3 | 14,5 | 11,5 | 11,8 | 4,0 |

⁽¹⁾ Polifenóis totais em mg de ácido gálico 100g⁻¹ de massa fresca de casca

⁽²⁾ Antocianinas totais em mg de cianidina 100g⁻¹ de massa fresca de casca

⁽³⁾ trans-Resveratrol em µg 100g⁻¹ de massa fresca de casca

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical, na mesma cultivar, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Tabela 2 – Médias dos parâmetros físico-químicos avaliados na saída da câmara e mais 5 dias a 20°C em função dos tratamentos em maçã 'Gala' armazenada em atmosfera controlada (AC) por oito meses a 0,5°C e maçã 'Fuji' armazenada em AC por sete meses a -0,5°C. Santa Maria, 2005.

| Cultivar e Tratamentos | Firmeza (N) | | Sólidos solúveis totais (°Brix) | | Acidez (meg 100ml ⁻¹) | | Açúcares Redutores (g 100ml ⁻¹) | | Açúcares Não-Redutores (g 100ml ⁻¹) | | | | | | | | | | | |
|------------------------|-------------|------------------|---------------------------------|---------------|-----------------------------------|---------------|---|---------------|---|---------------|------------|----|-------------|----|-------------|----|--------------|----|------------|---|
| | Saída | 5 dias a 20°C | Saída | 5 dias a 20°C | Saída | 5 dias a 20°C | Saída | 5 dias a 20°C | Saída | 5 dias a 20°C | | | | | | | | | | |
| <i>'Gala'</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Análise Inicial</i> | 79,3 | | 14,3 | | 3,5 | | 8,3 | | 4,7 | | | | | | | | | | | |
| Testemunha | 51,0 | b ⁽¹⁾ | 60,1 | a | 14,3 | a | 14,5 | a | 4,1 | a | 4,0 | a | 11,5 | a | 11,5 | a | 4,7 | a | 1,3 | a |
| Irradiação (UV-C) | 58,3 | a | 58,6 | ab | 14,3 | a | 14,3 | a | 4,0 | a | 4,0 | a | 12,0 | a | 11,9 | a | 3,6 | a | 1,5 | a |
| Ozônio | 49,4 | b | 53,0 | bc | 13,9 | a | 14,2 | a | 3,6 | a | 3,9 | a | 10,8 | a | 11,6 | a | 3,4 | a | 1,7 | a |
| Fosfito | 61,0 | a | 54,7 | abc | 13,8 | a | 14,0 | a | 3,8 | a | 3,7 | a | 11,3 | a | 11,5 | a | 4,8 | a | 0,4 | a |
| Acibenzolar-S-metil | 58,3 | a | 50,7 | c | 14,1 | a | 14,0 | a | 3,9 | a | 3,7 | a | 11,5 | a | 11,5 | a | 3,8 | a | 0,4 | a |
| CV (%) | 16,1 | | 6,2 | | 1,5 | | 1,2 | | 5,6 | | 3,5 | | 11,0 | | 1,2 | | 13,6 | | 0,0 | |
| <i>'Fuji'</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Análise Inicial</i> | 76,9 | | | | 5,5 | | 9,9 | | 2,5 | | | | | | | | | | | |
| Testemunha | 74,7 | ab | 71,5 | a | 16,6 | a | 17,0 | a | 3,6 | a | 3,7 | ab | 12,6 | ab | 12,0 | ab | 0,0 | b | 4,3 | a |
| Irradiação (UV-C) | 78,7 | a | 68,4 | a | 16,8 | a | 17,0 | a | 3,9 | a | 3,7 | a | 12,9 | ab | 9,5 | b | 2,0 | ab | 4,6 | a |
| Ozônio | 71,7 | b | 70,0 | a | 16,8 | a | 17,1 | a | 3,9 | a | 3,6 | ab | 14,5 | a | 10,1 | b | 0,0 | b | 3,8 | a |
| Fosfito | 75,4 | ab | 69,7 | a | 16,6 | a | 16,8 | a | 3,7 | a | 3,3 | c | 12,4 | ab | 8,7 | b | 0,6 | b | 4,4 | a |
| Acibenzolar-S-metil | 74,1 | ab | 70,7 | a | 16,7 | a | 17,3 | a | 3,7 | a | 3,5 | bc | 9,8 | b | 14,9 | a | 4,6 | a | 0,1 | b |
| CV (%) | 28,8 | | 14,2 | | 0,9 | | 1,0 | | 16,2 | | 3,9 | | 13,9 | | 20,3 | | 100,3 | | 0,0 | |

(1) Médias seguidas pela mesma letra na vertical, na mesma cultivar, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há presença de trans-resveratrol em diversos frutos *in natura* como na polpa de kiwi ‘Bruno’, morangos ‘Araza’ e ‘Yvahe’ e em folhas e frutos de amora (*Morus nigra*). Em maçãs ‘Galaxi’, ‘Gala’ e ‘Fuji’ ocorre apenas na casca e no caqui ‘Fuyu’ apresentou traços de trans-resveratrol na casca apenas na colheita.

O armazenamento refrigerado estimula a síntese de trans-resveratrol em mirtilo ‘Bleugem’, uvas ‘Isabel’ e ‘Merlot’, mas não estimula em ‘Niagara Rosada’. O teor de polifenóis totais não foi alterado em maçãs ‘Gala’ e ‘Fuji’, caqui ‘Fuyu’ e uva ‘Isabel’ com o armazenamento refrigerado, mas o teor elevou-se em mirtilo ‘Bleugem’, uvas ‘Niagara Rosada’ e ‘Merlot’; e decaiu em kiwi ‘Bruno’. O armazenamento refrigerado também estimulou a biossíntese de antocianinas totais em mirtilo.

Os elicitores abióticos induzem a síntese de trans-resveratrol em maçã ‘Fuji’ na seguinte seqüência: Acibenzolar-S-metil > Fosfito \geq irradiação UV-C \geq ozônio, mas não apresentam efeito em maçãs ‘Gala’, durante o armazenamento em atmosfera controlada. Não há aumento na concentração dos polifenóis totais e das antocianinas totais com o uso de elicitores abióticos. Os elicitores abióticos não apresentam efeito no controle de podridão, com exceção do fosfito, que controla a podridão em maçã ‘Gala’. Não há correlação entre a síntese de trans-resveratrol e o controle de podridão.

Os mecanismos que desencadeiam as respostas de defesa são complexos e por vezes sobrepõem-se nas chamadas “induções cruzadas”. Porém é evidente que as espécies reativas de oxigênio atuam na transdução de sinal. Há duas respostas distintas que compartilham os mesmos mensageiros: a resistência sistêmica adquirida que envolve o ácido salicílico ou o metil-salicilato e a indução de resistência sistêmica que envolve os fitohormônios jasmonato em conjunto com o etileno. A resistência sistêmica adquirida está geralmente envolvida com a resposta de hipersensibilidade e morte celular.

Os elicitores de trans-resveratrol desencadeiam respostas que se sobrepõem nas induções cruzadas. Uma proposta para as induções de trans-resveratrol é demonstrada na Figura 1 localizada na próxima página. Neste esquema são apresentados os elicitores utilizados na presente tese. Estas rotas são baseadas na revisão da literatura e confirmadas nos resultados obtidos dos tratamentos com elicitores abióticos que induziram a síntese de trans-resveratrol.

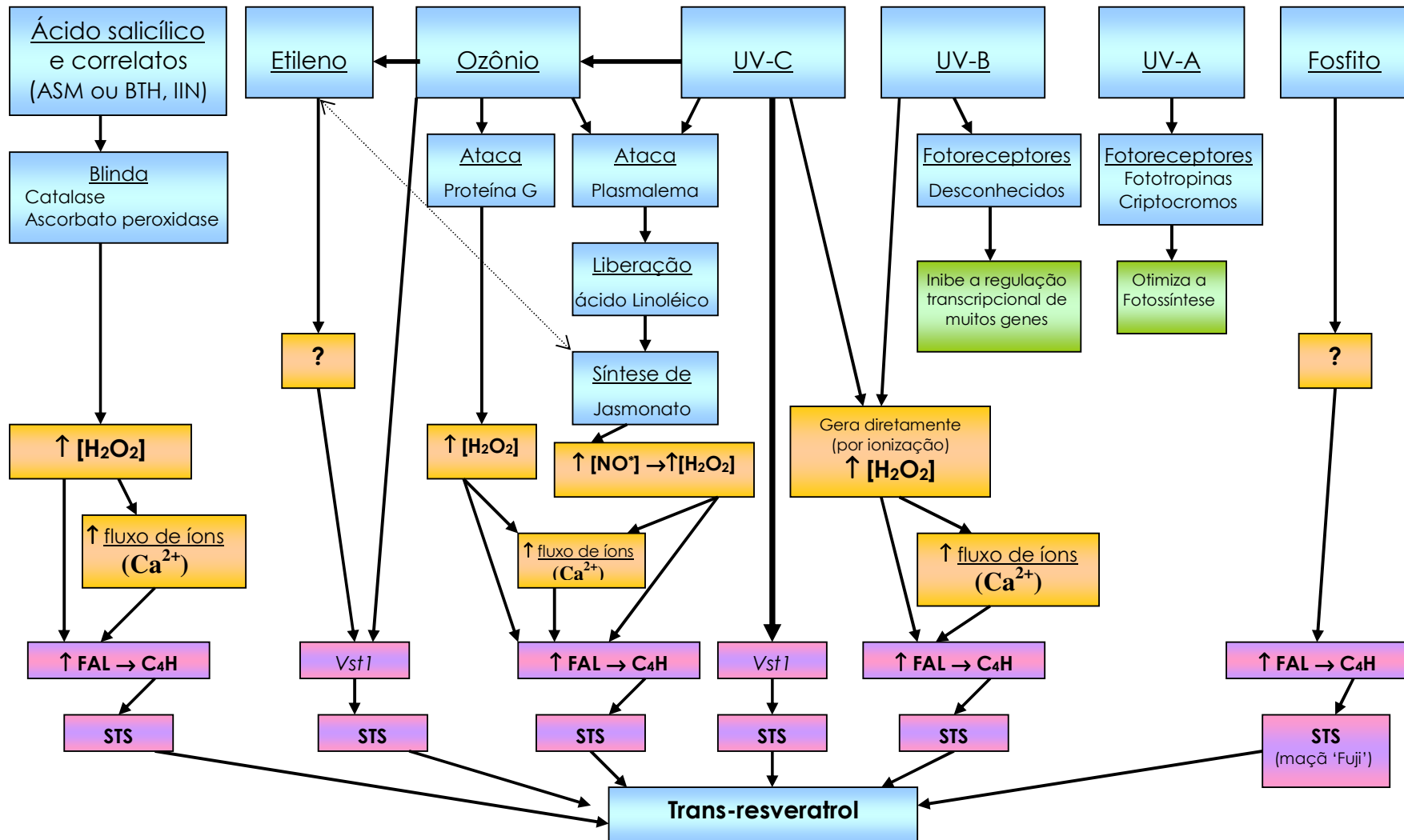


Figura 1 - Esquema bioquímico dos principais elicitores abióticos de trans-resveratrol envolvendo diversas vias metabólicas. Legenda: acibenzolar-S-metil (ASM), benzotiadiazol (BTH), ácido 2,6-dicloroisonicotínico (IIN) ultravioleta (UV), elemento(s) desconhecido(s) (?), aumento (\uparrow), concentração de peróxido de hidrogênio ($[H_2O_2]$), concentração de óxido nítrico ($[NO^*]$), fenilalaninamonoliase (FAL), 4-cumarato:CoA ligase (C₄H), gene que codifica a estilbeno sintase (*Vst1*), estilbeno sintase (STS).

GLOSSÁRIO

Agonista – Substância que mimetiza os efeitos de outro composto no sítio de ligação.

Antagonista – Substância que se opõe aos efeitos, de outro composto, por meio fisiológico ou químico. Também se refere ao mecanismo competitivo sobre um sítio de ligação, inibindo o efeito fisiológico.

Apoptose – Processo fisiológico que ocorre de forma ordenada e demanda energia para a sua execução (diferentemente da necrose). Está relacionada com a manutenção da homeostase e com a regulação fisiológica. Também conhecida como morte celular programada. O termo é derivado do grego, que referia-se à queda das folhas das árvores no outono.

Detoxificação – Processo no qual se retira o caráter tóxico de um composto. Neste trabalho, tem caráter de processo bioquímico fisiológico para eliminação ou conversão de substâncias tóxicas no organismo.

Elicitor – Fator de origem biótica ou abiótica capaz de estimular a síntese de fitoalexina.

Fitoalexina – Composto antimicrobiano produzido pelo fruto para aumentar a resistência contra patógeno.

Fotoperíodo – Intervalo de tempo luminoso e de ausência de luz, que regula certas respostas fisiológicas de sazonalidade.

Fotossistema – Unidade composta por clorofilas α e β e outros pigmentos circundando complexo protéico, inclusa na membrana dos tilacóides no cloroplasto. Esse sistema está envolvido nas reações dependentes de luz da fotossíntese.

Fotossistema I – Fotossistema, presente na segunda parte do esquema Z, é um centro de reação que tem a capacidade de oxidar fracamente e reduzir fortemente o NADP⁺. O complexo protéico P700 torna-se excitado pela luz do comprimento de ondas da região do vermelho longo (700nm).

Fotossistema II – Fotossistema, presente na primeira parte do esquema Z, é um centro de reação que tem a capacidade de reduzir fracamente e oxidar fortemente a água. O complexo protéico P680 torna-se excitado pela luz do comprimento de ondas da região do vermelho (680nm).

Fruto climatérico – fruto que tem a capacidade de amadurecer fora da planta, após ter alcançado a maturidade fisiológica, assim ele amadurece fora da planta. Caracterizam-se por apresentar um pico climatérico, ou seja, aumento da taxa respiratória e de produção de etileno.

Radical livre – Considera-se radical livre qualquer espécie química que contenham um ou mais elétrons desemparelhados, podendo ser produtos de oxidação lipídica, compostos nitrogenados, entre outros, mas principalmente as espécies reativas de oxigênio.

Temperatura mínima de segurança – Para cada fruto há uma temperatura mínima de segurança (TMS) já determinada, na qual a respiração é reduzida ao mínimo pela diminuição da temperatura e não ocorre o desenvolvimento dos sintomas de dano pelo frio.

Xenobiótico – Estranho ao organismo. Neste trabalho tem a conotação de substância estranha ao metabolismo animal.

Rota xenobiótica – Rota metabólica desenvolvida por um organismo para eliminação de um xenobiótico do sistema.