

## ANÁLISE DE DINÂMICA DE ÁCIDO ABCSÍCICO E ÁCIDO L-ASCÓRBICO NO DESENVOLVIMENTO DE MORANGOS

PEDRO REISSER<sup>1</sup>; GUSTAVO CAMOZZATO<sup>2</sup>; RAFAEL PIRES<sup>3</sup>; ROSANE CRIZEL<sup>4</sup>; VANESSA GALLI<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – reisser.pedro@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas - gustavocamozatto@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas - zeucleio@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas - rosanecrizel@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – vane.galli@yahoo.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch) é um pseudofruto apreciado pelo seu sabor, aroma e cor característicos. Apresenta um apelo tanto comercial como nutricional, pois é fonte de nutrientes e antioxidantes. Além disso, é um objeto de estudo para frutas não climatéricas - as quais não amadurecem após sua colheita. Nesse tipo de fruta, o ácido abscísico (ABA) aparenta ser uma molécula relevante na regulação do processo de amadurecimento. O ABA é um fitohormônio derivado de carotenóides fotossintéticos, com uma ampla função vegetal, regulando desde o desenvolvimento e senescência, como também a resposta a estresses (Crizel et al., 2020).

No desenvolvimento dos frutos de morango ocorre o acúmulo de ácido L-ascórbico (AsA), uma vitamina importante para a planta e para o consumidor. Apesar de ser bem estudado, o processo de acúmulo no desenvolvimento e a inter-relação com o ABA ainda é uma incógnita. Entretanto, existe uma conexão entre esses dois compostos, o ciclo das xantofilas. As xantofilas são carotenóides fotossintéticos que auxiliam e protegem a clorofila do estresse oxidativo da fotossíntese. Esse ciclo é baseado em dois compostos, a zeaxantina e a violaxantina. Sob baixa incidência luminosa, a zeaxantina é convertida a violaxantina, a qual é convertida em ABA. No entanto, sob alta incidência luminosa, a violaxantina é convertida a zeaxantina através da redução pelo AsA (Wang et al., 2022b).

Em morangos, o ciclo das xantofilas ainda não é bem elucidado, entretanto pode desempenhar um papel na regulação do acúmulo de AsA e ABA nos frutos. Apesar da concentração de ABA e AsA aumentarem ao longo do amadurecimento de frutos de morango, é possível que anteriormente ao seu acúmulo, eles sejam antagônicos através de uma regulação negativa imposta pelo ciclo das xantofilas. Logo, acreditasse que para haver um incremento na síntese do ABA, é necessário primeiramente uma redução na síntese AsA. Assim, o objetivo do trabalho foi testar a hipótese de que o ciclo das xantofilas possa agir como um regulador negativo na síntese de ABA no processo de amadurecimento dos frutos de morango.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Coleta do material vegetal

Os morangos da variedade San Andreas (Califórnia, EUA) foram colhidos próximos a Universidade Federal de Pelotas em um produtor local no Capão do Leão (31°46'59.6"S, 52°24'53.0"W), sob os princípios da agricultura orgânica.

Para o trabalho foram coletados 9 estádios de crescimento e maturação diferentes com 3 repetições biológicas, e cada repetição apresentando 8 morangos. Assim, o experimento foi realizado com um somatório total de 216 morangos (9 estádios X 3 repetições X 8 morangos).

Os estádios (Figura 1) foram classificados em: “estádios iniciais” (I1, I2, I3), “estádios de crescimento” (C1, C2, C3) e “estádios de amadurecimento” (A1, A2, A3). Os estádios iniciais tiveram como foco de distinção seu tamanho e coloração verde; para o crescimento, sua perda de coloração verde e seu tamanho; e para o amadurecimento, a pigmentação avermelhada foi o principal fator de distinção, sendo observado resquícios de coloração verde para o A1, a maturação tecnológica no A2, e a maturação completa no A3. Após colhidos, foram selecionados e logo congelados em nitrogênio líquido e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



Figura 1: Representação visual dos estádios de crescimento e amadurecimento do morango. Apresentados da esquerda para a direita: estádios iniciais (I), estádios de crescimento (C) e estádios de amadurecimento (A).

## 2.2 Determinação da concentração de Ácido Abscísico e derivados

O ABA e seus derivados foram determinados de acordo com Perin et al (2018) através de HPLC-MS/MS. Para a análise de ABA, ABA glicosilado (ABA-GE), ácido faseico (PA) e ácido 4-di-hidrofaseico (DPA) foram usadas três repetições biológicas usando a curva analítica do ABA. Os resultados foram analisados com o software Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemanha), e expressos em  $\mu\text{g g}^{-1}$  de tecido liofilizado.

## 2.4 Determinação da concentração de Ácido L-ascórbico

O ácido L-ascórbico foi analisado com o método descrito por Vinci et al (1995) em HPLC-MS/MS. Foi usado 1 g de amostras, em três repetições biológicas identificadas através de curva de calibração com padrão de AsA. Os resultados estão expressos em  $\mu\text{g g}^{-1}$  de massa fresca.

## 2.5 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância ( $p \leq 0.05$ ) e, caso observada significância estatística, as médias foram comparadas por teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ); os valores então foram expressos em médias  $\pm$  desvio padrão. Para as análises estatísticas foi usado o software JASP e para construção dos gráficos o GraphPad 9.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foi hipotetizado que para haver síntese de ABA é necessário a redução na síntese de AsA, devido sua regulação negativa nos ciclos das xantofilas, precursoras do ABA. Assim foram colhidos morangos em

diferentes estádios de desenvolvimento, a fim de acompanhar a dinâmica desses compostos.

Ao longo dos estádios ocorreu variação das concentrações dos compostos analisados (Figura 2A,  $p < 0,001$ ), à exceção do DPA. A concentração de AsA aumentou abruptamente do I2 até C1, enquanto que a de ABA aumentou somente a partir do estádio A1 (Figura 2A), o que é condizente com a literatura (Jia et al., 2013; Li et al., 2022; Siebeneichler et al., 2022; Symons et al., 2012). A correlação observada ao longo do desenvolvimento entre ABA e AsA foi de 44% (Figura 2B,  $p < 0,05$ ), valor menor do que o observado por Siebeneichler et al (2022) (95%), quando analisou 5 estádios de desenvolvimento do fruto. Desta forma, a análise detalhada de 9 estádios de desenvolvimento, no presente estudo, permitiu verificar que o acúmulo de AsA antecede ao de ABA durante o desenvolvimento do fruto.

Em trabalhos que aplicaram ABA exogenamente em morangos, tanto *in vivo* quanto pós colheita, apesar de constatarem o aumento da concentração de ABA na fruta, não observaram alteração nos níveis de AsA (Coelho, 2022; Crizel et al., 2020; Fonseca, 2015; Siebeneichler et al., 2020), sugerindo assim que o ABA não exerce um papel regulador na síntese de AsA. Já analisando os aquênios - frutos verdadeiros do morango - Aragüez et al (2013) observaram que ocorreu uma redução no teor de AsA do fruto verde para o vermelho, e no trabalho de Li et al (2022) notaram um maior teor de ABA nos aquênios do que no receptáculo, o que pode indicar uma relação negativa entre AsA e ABA.

Assim, considerando estes estudos prévios e o presente estudo, a atuação do AsA no ciclo das xantofilas pode exercer um papel na regulação negativa da concentração de ABA (Figura 2A). Além disso, a aplicação de luz de alto comprimento energético e baixa frequência (vermelha) em morangos na pós-colheita, induz o acúmulo de ABA e de AsA (Wang et al., 2022a). Resultados similares foram observados por Jian et al (2023) utilizando apenas luz vermelha. Por outro lado, Chen et al., (2023) observou uma maior acúmulo de 11 carotenóides em frutos de morango quando utilizada luz no comprimento de onda azul, comparado a outros comprimentos de onda. Assim, talvez sob baixas cargas luminosas nos frutos, o AsA não precisa ser utilizado no ciclo das xantofilas e pode ser acumulado, e as xantofilas podem ser convertidas a ABA.

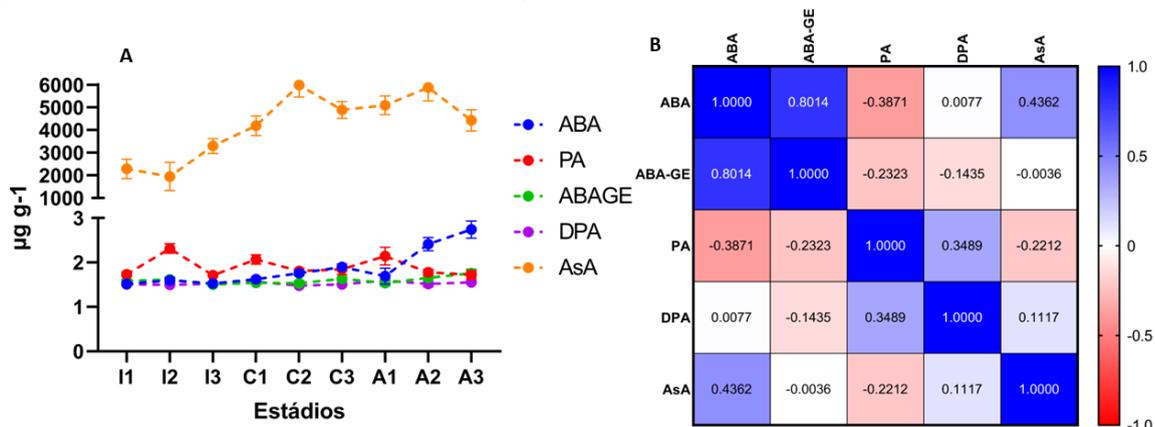


Figura 2. (A) Concentração ao longo do desenvolvimento de frutos de morango, ácido abscísico (ABA), ácido faseico (PA), ABA glicosilado(ABA-GE) ácido 4-di-hidrofaseico (DPA). (B) Correlação entre os compostos analisados.

#### 4. CONCLUSÕES

No presente estudo, não se mostrou correlação entre ABA e AsA e observamos que há um aumento na concentração de AsA nos estádios iniciais e de crescimento do fruto e no final do amadurecimento estas concentrações se mantiveram estáveis. Por outro lado, a concentração de ABA aumentou nos estádios finais, indicando uma possível regulação da concentração de ABA pela ação de AsA no ciclo das xantofilas. Assim, a hipótese não pode ser negada e o processo de acúmulo de AsA ainda precisa ser melhor estudado, visto que é um importante composto para a fruta e para o consumidor.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAGÜEZ, I. et al. Proteomic analysis of strawberry achenes reveals active synthesis and recycling of l-ascorbic acid. **Journal of Proteomics**, v. 83, p. 160–179, 2013.
- COELHO, M. T. **Ácido abscísico (ABA) e radiação UV-C na maturação pós-colheita de frutos de morango (Fragaria x ananassa Duch.)**. [s.l.] Universidade Federal de Pelotas, 2022.
- CRIZEL, R. L. et al. Abscisic acid and stress induced by salt: Effect on the phenylpropanoid, L-ascorbic acid and abscisic acid metabolism of strawberry fruits. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 152, p. 211–220, jul. 2020.
- FONSECA, F. A. **INVESTIGAÇÃO METABOLÔMICA DA MATURAÇÃO DO MORANGO (FRAGARIA X ANANASSA, CULTIVAR CAMIÑO REAL) POR RMN HR-MAS**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2015.
- JIANG, L. et al. Light Quality and Sucrose-Regulated Detached Ripening of Strawberry with Possible Involvement of Abscisic Acid and Auxin Signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, p. 5681, 16 mar. 2023.
- LI, T. et al. Autocatalytic biosynthesis of abscisic acid and its synergistic action with auxin to regulate strawberry fruit ripening. **Horticulture Research**, v. 9, p. uhab076, 5 jan. 2022.
- PERIN, E. C. et al. Extraction and Quantification of Abscisic Acid and Derivatives in Strawberry by LC-MS. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 9, p. 2547–2552, 2018.
- SIEBENEICHLER, T. J. et al. The postharvest ripening of strawberry fruits induced by abscisic acid and sucrose differs from their in vivo ripening. **Food Chemistry**, v. 317, n. February, p. 126407, 2020.
- SIEBENEICHLER, T. J. et al. Changes in the abscisic acid, phenylpropanoids and ascorbic acid metabolism during strawberry fruit growth and ripening. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 108, p. 104398, maio 2022.
- VINCI, G. et al. Ascorbic acid in exotic fruits: a liquid chromatographic investigation. **Food Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 211–214, 1995.
- WANG, L. et al. The action of RED light: Specific elevation of pelargonidin-based anthocyanin through ABA-related pathway in strawberry. **Postharvest Biology and Technology**, v. 186, p. 111835, abr. 2022a.
- WANG, X. et al. OsVDE, a xanthophyll cycle key enzyme, mediates abscisic acid biosynthesis and negatively regulates salinity tolerance in rice. **Planta**, v. 255, n. 1, p. 6, jan. 2022b.