

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA 'ELISEU MACIEL'
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



TESE

Estratégias químicas e moleculares para caracterização de produtos de origem vegetal

Rosane Lopes Crizel

Pelotas, 2021

Rosane Lopes Crizel

Estratégias químicas e moleculares para caracterização de produtos de origem vegetal

Documento apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do Título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Comitê de orientação: Prof. Fabio Clasen Chaves

Profa. Vanessa Galli

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C928e Crizel, Rosane Lopes

Estratégias químicas e moleculares para caracterização de produtos de origem vegetal / Rosane Lopes Crizel ; Fabio Clasen Chaves, orientador ; Vanessa Galli, coorientadora. — Pelotas, 2021.

130 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Estresses abióticos. 2. *Olea europaea* L.. 3. Denominação de origem. 4. *Fragaria ananassa*. 5. Cálcio. I. Chaves, Fabio Clasen, orient. II. Galli, Vanessa, coorient. III. Título.

CDD : 664

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Rosane Lopes Crizel

Estratégias químicas e moleculares para caracterização de produtos de origem vegetal

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 23 de agosto de 2021

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Fabio Clasen Chaves. Doutor em Biologia Vegetal pela Rutgers, The State University of New Jersey.

Profa. Dra. Vanessa Galli. Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof. Dr. César Valmor Rombaldi. Doutor em Biologie Moléculaire e Végétale pela Universidade Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse.

Profa. Dra. Jéssica Fernanda Hoffmann. Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

Dr. Amilton Seixas Neto, Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, por guiar meus passos na direção correta.

Aos meus pais, Reginaldo e Celeida e irmãos Renato e Carina pelo apoio, compreensão e por acreditarem fielmente na minha capacidade.

Ao meu namorado Lázaro, pela paciência, cuidado, preocupação e por me incentivar a ser sempre melhor.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao Prof. Dr. Fabio Chaves, pela orientação, paciência, ensinamentos, que desde a graduação vem contribuindo grandemente com meu crescimento profissional e pessoal. Deixo aqui minha gratidão e admiração.

À Profa. Dra Vanessa Galli, pela orientação e por compartilhar sua experiência e conhecimento com tamanha dedicação. Agradeço de coração por todo apoio durante essa caminhada.

Ao Prof. Dr. César Rombaldi por ter me auxiliado sempre que precisei, transmitindo ensinamentos preciosos.

Ao Prof. Dr. Luciano Pinto, pela disponibilidade do laboratório e orientações. À Isabel Vigh e ao Amiltom Seixas, pelo auxílio nas análises, amizade e momentos de descontração.

À Embrapa Clima Temperado, em especial ao pesquisador Dr. Rogério Jorge e à Paula Shild pela cedência das amostras e oportunidade de realização das análises.

Às minhas amigas e colegas Giovana Zandoná, Jessica Hoffmann, Tatiane Siebeneichker, Paula Filoda e Bianca Camargo. Obrigada pela ajuda, amizade, momentos de descontração e principalmente por dividir comigo as alegrias e angustias durante este período. Vocês foram essenciais nessa caminhada. Aos demais colegas de laboratório, pelo convívio, auxílio e troca de ideias.

À Giseli Crizel, pela força e incentivo em todas as horas que necessitei. À Joyce Borowski (incluindo Vicente) que mesmo distante se fez presente, acreditando em mim e me incentivando a ser uma pessoa melhor. À Ellen Perin, que iniciou o trabalho das CDPKs e mesmo distante esteve presente sempre que precisei.

E, finalmente, a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada.

Resumo

Crizel, Rosane Lopes. **Estratégias químicas e moleculares para caracterização de produtos de origem vegetal**. 2021. 130f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Características genéticas e condições ambientais influenciam a composição química de frutas e hortaliças de modo que é possível distinguir produtos de diferentes cultivares produzidos sob condições ambientais distintas. As plantas estão constantemente expostas a estresses bióticos e abióticos e, para se adaptar a essas condições adversas ocorrem alterações moleculares, bioquímicas e fisiológicas. Dentre os mecanismos de respostas a estresses abióticos, há evidências que ocorre uma cascata de sinalização envolvendo cálcio (Ca^{2+}) e proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs). Desta forma, este trabalho de doutorado abrangeu dois enfoques distintos com duas culturas frutícolas relevantes, a oliveira e o morangueiro. Para cultura da oliveira (*Olea europaea* L.) foi avaliado o efeito do genótipo, ou seja, de diferentes cultivares na composição química de azeites de oliva produzidos em Pinheiro Machado e processados sob as mesmas condições em duas safras subsequentes. A composição dos azeites de oliva das cultivares Arbequina, Arbosana, Coratina, Frantoio, Koroneike e Picual das safras de 2017 e 2018 estava de acordo com os parâmetros de identidade e qualidade estabelecidos para azeite de oliva extra virgem (EVOO) e foi influenciada pelo cultivar e pela safra. EVOO produzidos em 2018 apresentaram maiores teores de clorofila, ácido cafeico, ligstrosídeo aglicona, hidroxí oleuropeína aglicona, ácido siríngico e acetato de hidroxitirosol comparado aos EVOOs da safra 2017. Ácido linoléico, ácido ferúlico, ligstrosídeo aglicona e acetato de hidroxitirosol foram as variáveis cujos conteúdos mais contribuíram para a diferenciação dos azeites em função da cultivar nas duas safras. A caracterização química permitiu diferenciar azeites monovarietais com base na safra e na cultivar. No caso do morangueiro (*Fragaria x ananassa*) foram identificadas sequências gênicas codificadoras de CDPKs e o perfil transcricional desses genes foi avaliado durante o processo de maturação e sob condições de estresses abióticos. A identificação da família *FaCDPK* foi realizada a partir de informações do Genome Database for Rosaceae (GDR) e de um bancos de RNA seq *in house*, informações sobre a estrutura gênica, filogenia, interatoma e perfis de expressão foram geradas. Nove novos genes de CDPK foram identificados e classificados em quatro grupos principais, com base na análise filogenética e características estruturais. Os genes *FaCDPK* se apresentaram diferencialmente expressos durante o desenvolvimento e amadurecimento dos frutos, bem como em resposta a estresses abiótico salino e hídrico e tratamento com hormônio ácido abscísico. Por fim, a análise da rede de interação revelou proteínas envolvidas nas respostas a estresses, especialmente RBOHs.

Palavras-chave: estresses abióticos, *Olea europaea* L., denominação de origem, *Fragaria ananassa*, cálcio, ácido abscísico, RNA seq., filogenia.

Abstract

Crizel, Rosane Lopes. **Chemical and molecular strategies for characterization of plant-derived products**. 2021. 130f. Thesis (Doctor Degree in Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Genetic characteristics and environmental conditions influence the chemical composition of fruits and vegetables so that it is possible to distinguish products from different cultivars produced under different environmental conditions. Plants are constantly exposed to biotic and abiotic stresses and, in order to adapt to these adverse conditions, molecular, biochemical and physiological changes occur. Among the mechanisms of abiotic stress responses, there is evidence that there is a signaling cascade involving calcium (Ca^{2+}) and calcium-dependent protein kinases (CDPKs). Thus, this doctoral work covered two distinct approaches with two relevant fruit crops, the olive tree and the strawberry tree. For the cultivation of olive (*Olea europaea* L.) the effect of the genotype, that is, of different cultivars on the chemical composition of olive oil produced in Pinheiro Machado and processed under the same conditions and two subsequent crops, was evaluated. The composition of olive oils from the Arbequina, Arbosana, Coratina, Frantoio, Koroneike and Picual cultivars from the 2017 and 2018 crops was in accordance with the identity and quality parameters established for extra virgin olive oil (EVOO) and was influenced by the cultivar and by the harvest. EVOO produced in 2018 had higher levels of chlorophyll, caffeic acid, ligstroside aglycone, hydroxy oleuropein aglycone, syringic acid and hydroxytyrosol acetate compared to EVOOs from the 2017 harvest. Linoleic acid, ferulic acid, ligstroside aglycone and hydroxytyrosol acetate were the variables whose contents most contributed to the differentiation of oils depending on the cultivar in the two crops. The chemical characterization allowed to differentiate between monovarietal oils based on the crop and cultivar. The chemical characterization allowed differentiating between monovarietal oils based on the crop and cultivar. In the case of strawberry (*Fragaria x ananassa*) gene sequences encoding CDPKs were identified and the transitional profile of these genes was evaluated during the maturation process and under conditions of abiotic stresses. The identification of the FaCDPK family was performed from information from the GenomeDatabase for Rosaceae (GDR) and from an in house *RNA seq* database, information on the gene structure, phylogeny, interatoma and expression profiles were generated. Nine new CDPK genes were identified and classified into four main groups, based on phylogenetic analysis and structural characteristics. FaCDPK genes were differentially expressed during fruit development and ripening, as well as in response to abiotic saline and water stress and treatment with abscisic acid hormone. Finally, the analysis of the interaction network revealed proteins involved in stress responses, especially RBOHs.

Keywords: abiotic stresses, *Olea europaea* L., designations of origin, *Fragaria ananassa*, calcium, abscisic acid, *RNA seq.*, phylogeny.

Lista de Figuras

2. Capítulo I - Influência da cultivar e dasafr sobre a composição de azeites produzidos no Sul do Brasil

Figura 1	Scores plot (A) e loadingsplot (B) derivados da análise de componentes principais (PCA) de azeites de seis cultivares produzidas no sul do Brasil nas safras de 2017 e 2018.....	54
Figura 2	Análise discriminante por quadrados mínimos parciais e projeção de importância das variáveis (VIP scores derivados do PLS-DA) para azeites de seis cultivares produzidos no Sul do Brasil produzidos nas safras de 2017 (A e B) e 2018 (C e D).....	56

3 Capítulo II: Identificação e caracterização de proteínas quinases dependentes de cálcio em morango (*Fragaria* × *ananassa*)

Figura 1	Síntese simplificada do ABA, conjugação e vias de catabolismo...	81
Figura 2	Modelo de ativação das CDPKs.....	84
Figura 3	Via metabólicados fenilpropanóides.....	87
Figura 4	Organização dos diferentes padrões (porções/regiões) em 11 genes da família de proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPK) presentes em <i>F. ananassa</i>	96
Figura 5	Estrutura dos éxons e íntrons dos 11 genes da família de proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPK) presentes em <i>F. ananassa</i>	96
Figura 6	Relação filogenética entre as proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPK) de morango (<i>F. ananassa</i>) e <i>Arabidopsisthaliana</i> ...	97
Figura 7	Distribuição cromossômica das proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPK) de <i>F. ananass</i> nos cromossomos de <i>F. vesca</i> ..	98
Figura 8	Análise de sintonia dos genes de proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPK) entre morango (<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>) e <i>Arabidopsis thaliana</i>	99
Figura 9	Mapa de cor (Heat map) mostrando a expressão das proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPK) durante os estádios de desenvolvimento dos frutos de morango.....	101
Figura 10	Acúmulo relativo de transcritos de genes que codificam para proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs) identificadas em morangos submetidos à déficit hídrico ou estresse salino.....	102

Figura 11	Acúmulo relativo de transcritos de genes que codificam para proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs) identificadas em morangos submetidos a aplicação de ácido abscísico (ABA) e ácido nordihidroguaiarético (NDGA).....	104
Figura 12	Análise da rede de interação das proteínas FaCDPK4 e FaCDPK11 identificadas em <i>Fragaria x ananassa</i>	106
Figura 13	Esquema simplificado de possíveis atuações de CDPK sob condições de estresse osmótico.....	115

Lista de Tabelas

2. Capítulo I - Influência da cultivar e da safra sobre a composição de azeites produzidos no Sul do Brasil

Tabela 1	Temperatura média e precipitação no município de Pinheiro Machado-RS, considerando o ciclo da cultura da oliveira.....	33
Tabela 2	Análise de variância para efeitos de cultivar e ano de colheita para as diferentes variáveis avaliadas.....	40
Tabela 3	Acidez (% ácido oleico), índice de peróxidos (meq O ₂ Kg ⁻¹ amostra) e coeficiente de extinção (K ₂₃₂ , K ₂₇₀ e ΔK) de azeites produzidos no sul do Brasil.....	43
Tabela 4	Perfil de ácidos graxos de azeites de seis cultivares produzidas no sul do Brasil durante duas safras.....	45
Tabela 5	Teor de tocoferol dos azeites de seis cultivares produzidas no sul do Brasil durante duas safras	46
Tabela 6	Teores de carotenoides e clorofilas e variáveis de cor (L e ° Hue) de azeites de seis cultivares produzidas no sul do Brasil em 2017 e 2018.....	48
Tabela 7	Compostos fenólicos presentes em azeites produzidos no sul do Brasil em 2017 e 2018 identificados por LC-MS/MS.....	51
Tabela 8	Teor de compostos fenólicos (mg kg ⁻¹) de azeite de seis cultivares produzidas no sul do Brasil nas safras de 2017 e 2018.....	52

3 Capítulo II: Identificação de sequências codificadoras de proteínas quinases dependentes de cálcio em morango (*Fragaria × ananassa*) e caracterização de sua expressão gênica

Tabela 1	Sequências de <i>primers</i> gerados a partir das sequências selecionadas de CDPK de morango.....	92
Tabela 2	Informações sobre as sequências de <i>CDPKs</i> identificadas em <i>F. ananassa</i>	94
Tabela 3	Localização subcelular das quinases dependentes de cálcio (CDPKs) identificadas em <i>F. ananassa</i>	95

Tabela 4	Blocos sintênicos de genes CDPK entre <i>Fragaria x ananassa</i> e <i>Arabidopsis thaliana</i>	100
----------	--	-----

Lista de abreviações

EVOO	Azeite de oliva extra virgem
COI	Conselho Oleícola Internacional
PRO-OLIVA	Programa Estadual de Desenvolvimento da Olivicultura
IBRAOLIVA	Instituto Brasileiro de Olivicultura
TAGs	Triacilgliceróis
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
ANOVA	Análise de variância
PCA	Análise de componentes principais
PC	Componentes principais
PLS-DA	Análises discriminantes por mínimos quadrados parciais
VIP score	Projeção de importância das variáveis
ABA	Ácido abscísico
CDPK	Proteínas quinases dependentes de cálcio
Ca ²⁺	Cálcio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
GDR	Database for Rosaceae
NDGA	Ácido nordihidroguaiarético
ZEP/AtABA1	Zeaxantina epoxidase
NCED	Cis-epoxycarotenoid dioxigenase
AAO/AO	Enzima aldeído-oxidase
PA	Ácidofaseico
DPA	Ácido dihidrofaseico
ABA-GE	ABA-glucosil ester
ABA-GS	ABA-glucosil éter
ZEP	Zeaxantina epoxidase
NCED	9-cis-epoxycarotenoide dioxigenase
GT	β-glicosiltransferase
BG	β-glucosidase

CYP707A	ABA-8-hidroxilase
PAL	Fenilalanina ammonia liase
C4H	Cinamato 4-hidroxilase
4CL	β -cumaratoligase
COMT	Ácido cafeico independente de cátion
F3H	Flavanona 3-hidroxilase
FLS	Flavonol sintase
DFR	Diidroflavonol 4 -redutase
LAR	Leucoantocianidina redutase
UGT	Flavonóide glicosil transferase UDP
ANR	Antocianidina redutase
RBOH	<i>Respiratory burst oxydase homolog</i>
RSA	Resistência sistêmica adquirida
TPK	Tiamina pirofosfoquinase
CBL	Calcineurina B
CIPKs	Proteínasquinasas
SLAC	Canal aniônico tipo S da célula de guarda
SDC	Serina descarboxilase
POSF	Provável fator de transcrição
bZIP	Zíper de leucinabásico
GSO	Serina/treonina-proteína quinase semelhante ao receptor
	LRR
TFCA	Cofator de dobramento de tubulina

Sumário

1 Introdução geral	17
2. Capítulo I - Influência da cultivar e da safra sobre a composição de azeites produzidos no Sul do Brasil	19
2.1 Introdução	19
2. 2. Objetivos	21
2.3 Revisão da literatura.....	22
2.3.1 Olivicultura.....	22
2.3.2 Azeite de oliva	23
2.3.3 Processamento do azeite de oliva.....	23
2.3.4 Composição do azeite de oliva.....	25
2.3.5 Denominação de Origem.....	31
2.4 Material e métodos.....	33
2.4.1 Material.....	33
2.4.2 Métodos.....	34
2.4.2.1 Índices de degradação lipídica	34
2.4.2.2 Composição de ácidos graxos.....	34
2.4.2.3 Tocoferóis.....	35
2.4.2.4 Pigmentos e coloração	35
2.4.2.5 Compostos fenólicos individuais.....	36
2.4.2.6 Análise estatística.....	37
2.5 Resultados	39
2.5.1. Índices de degradação lipídica	42
2.4.2 Composição de ácidos graxos	44
2.5.3 Tocoferóis.....	46
2.5.4 Pigmentos e coloração	47

2.5.5 Compostos fenólicos	49
2.5.6 Análise de dados multivariada.....	54
2.7. Considerações finais	64
2.8 Referências Bibliográficas	65
3. Capítulo II: Identificação e caracterização de proteínas quinases dependentes de cálcio em morango (<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>).....	72
3.1 Introdução	72
3.2. Objetivos	74
3.3 Revisão da literatura.....	75
3.3.1 Morango	75
3.3.2. Estresses abióticos.....	77
3.3.3 Ácido abscísico.....	79
3.3.4 Cálcio	81
3.3.5 Proteínas quinases dependentes de cálcio	83
3.3.6 Fenilpropanoides	85
3.4 Materiais e métodos	89
3.4.1 Identificação de genes de CDPK em morango.....	89
3.4.2 Predição da localização celular	89
3.4.3 Predição de exons e introns	89
3.4.4 Análise filogenética.....	90
3.4.5 Análise de sintenia e localização cromossômica.....	90
3.4.6 Obtenção das amostras para avaliação da expressão gênica dos genes candidatos a CDPKs	90
3.4.7 Avaliação da expressão das CDPKs putativas por PCR em tempo real	91
3.4.8 Análise de interatoma.....	92
3.5 Resultados	93
3.6 Discussão.....	107
3.7 Considerações finais	119

8. Referências Bibliográficas	120
-------------------------------------	-----

1 Introdução geral

Os vegetais estão constantemente expostos a estresses bióticos e abióticos no seu ecossistema natural ou de cultivo. Para se adaptar a essas situações contínuas de estresses em seu ambiente, as plantas desenvolveram e continuam desenvolvendo complexos mecanismos para captar sinais externos e modular respostas frente a estresses. Esses mecanismos iniciam com a percepção do estímulo, seguido da transdução do sinal e regulação da expressão gênica, que acarretam em alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas. As alterações das taxas parciais de O₂ (oxigênio) e CO₂ (dióxido de carbônico), alterações de incidência de UV, restrições hídricas e salinidade do solo são problemáticas atuais da agricultura. Esses estresses ambientais afetam o crescimento e desenvolvimento e, por consequência, a produtividade de plantas cultivadas.

A qualidade e composição de frutas e hortaliças também são afetadas por condições ambientais estressoras. Com isso, produtos agrícolas e alimentares com qualidades ou características que se devam exclusiva ou essencialmente a uma única região são diferenciados dos demais através da denominação de origem. Essa estratégia vem sendo bastante utilizada em vinhos, azeites de oliva, café e sucos de frutas. Na área da olivicultura, azeites produzidos em regiões tradicionais de cultivo como Itália, Espanha e Grécia já possuem essa indicação geográfica. Entretanto, para atingir essa certificação é necessário conhecer a composição e a qualidade do produto e que esse apresente características que os diferencie de azeites produzidos em outros locais. No Brasil, devido à produção de azeite ser recente, ainda não se tem um perfil de qualidade estabelecido e, portanto, ainda não é possível estabelecer uma indicação geográfica para esses produtos.

Estresses abióticos induzem uma série de modificações moleculares, bioquímicas e fisiológicas que precedem as alterações na composição final dos alimentos. Dentre essas alterações, se tem a produção de moléculas primárias de sinalização como as ROS (espécies reativas de oxigênio), as quais são capazes de modificar a atividade enzimática e a regulação gênica. Hormônios também são reguladores importantes na resposta a estresses abióticos, sendo o ácido abscísico (ABA) o principal sinalizador em resposta a estresse osmótico por seca e/ou salinidade. Estresses abióticos também induzem um aumento de cálcio citosólico que é percebido por proteínas quinases dependentes de cálcio (do inglês *Calcium dependent protein kinases*, CDPKs), as quais atuam fosforilando diferentes alvos e

parecem estar envolvidas no processo de maturação e na tolerância a estresses abióticos regulando positivamente ou negativamente a sinalização de ABA.

A utilização do morango como modelo para estudos dos mecanismos envolvidos na maturação, bem como entender as relações de estresse e produção de compostos antioxidantes se justifica, tendo em vista que o morangueiro se destaca por produzir frutos rapidamente (ciclo curto), pelo seu sistema de cultivo estar bem estabelecido e por existirem informações genéticas disponíveis em abundância.

Com isso, este trabalho foi dividido em dois capítulos, sendo que o primeiro capítulo descreve a influência da cultivar e da safra sobre a composição de azeites de oliva monovariais produzidos no sul do Brasil, com o intuito de caracterizar perfis metabólicos marcadores para as cultivares e região de produção. No segundo capítulo, são descritas a identificação de sequências codificadoras de CDPKs e a caracterização das suas funções durante o processo de maturação e sob condições de estresses abióticos.

2. Capítulo I - Influência da cultivar e da safra sobre a composição de azeites produzidos no Sul do Brasil

2.1 Introdução

O azeite de oliva extravirgem é o produto da extração mecânica de frutos da oliveira (*Olea europaea* L.) seguida por lavagem, filtração e decantação ou centrifugação. Suas propriedades nutricionais e funcionais são altamente valorizadas por seus efeitos benéficos à saúde humana, sendo considerado uma das melhores fontes de ácidos graxos e antioxidantes naturais (COI, 2018).

Há algumas décadas o cultivo de oliveiras limitava-se somente à bacia do Mediterrâneo. Porém, atualmente a produção de azeite se estendeu e a olivicultura já vem sendo introduzida gradualmente no Brasil que conta com cerca de 7.000 hectares cultivados, divididos em áreas localizadas nas regiões Sul e Sudeste (ROMERO et al., 2016). No Rio Grande do Sul, a área cultivada é de aproximadamente 4.500 hectares, especialmente em municípios da metade Sul. Desse cultivo, 90% é destinado para produção de azeites. No entanto, essa produção ainda representa pequena parcela quando comparada à demanda existente no mercado brasileiro, visto que o Brasil é o segundo maior importador de azeites com aproximadamente 66 mil toneladas por ano (COI, 2021).

Um dos fatores que limita a expansão da produção de azeitonas e azeite no país é a exigência da adaptação das cultivares às condições climáticas da região (chuva, temperatura, umidade), que diferem da Bacia do Mediterrâneo. Como consequência, azeitonas e azeites produzidos fora das regiões tradicionais de cultivo podem diferir em qualidade e composição química (GARCÍA-GONZÁLEZ; ROMERO; APARICIO, 2010; RONDANINI et al., 2014). Além das condições agroclimáticas, outros fatores tais como cultivar, estágio de maturação do fruto e práticas agrícolas também podem influenciar nas características dos azeites (ROMERO et al., 2016).

A composição dos azeites se divide em duas frações: a fração saponificável (98-99%) e a fração não-saponificável (1-2%). A primeira consiste em triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos e ácidos graxos livres, enquanto que a fração não saponificável é formada por pigmentos, compostos voláteis, polifenóis, tocoferóis e esteróis (BALLUS et al., 2014; DAIS; HATZAKIS, 2013). Organizações internacionais como o Conselho Oleícola Internacional – COI e o Codex Alimentarius Commission da União Europeia estabelecem alguns parâmetros para avaliação da qualidade de

azeite de oliva, dentre eles: acidez, índice de peróxidos, absorção de luz ultravioleta (K_{270} e K_{232}), análise sensorial, conteúdo de tocoferóis e fenóis, pigmentos, composição de ácidos graxos, esteróis, ceras, trilinoleína, triglicerídeos e estigmastadienos (QUIRANTES-PINÉ et al., 2009).

Atualmente uma das estratégias mais importantes para certificação de qualidade de azeites é a discriminação por origem geográfica (também conhecida como denominação de origem), que refere-se a produtos agrícolas e alimentares produzidos, processados e preparados em um determinado local e que apresenta, características que os diferencia dos demais em função do local e das condições de cultivo e processamento (BAJOUB et al., 2014). A indicação geográfica já é utilizada para azeites produzidos em regiões tradicionais de cultivo como: Itália, Espanha, Grécia, França, Portugal, Turquia e Marrocos (COI, 2021). Para alcançar essa indicação é preciso conhecer a composição e a qualidade dos azeites produzidos no local e a variação desta composição em diferentes anos de cultivo. Além disso, é necessário que existam características que os diferencie de azeites produzidos em outros locais (BAJOUB et al., 2014).

No Brasil, devido à produção de azeite ser recente, ainda não se tem um perfil de qualidade estabelecido. Com isso, objetivou-se, com esse trabalho avaliar a influência da cultivar e do ano de cultivo sobre a composição de azeites de oliva monovarietais produzidos no Sul do Brasil, com o intuito de caracterizar perfis metabólicos marcadores para as cultivares e a região de produção.

2. 2. Objetivos

2.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da cultivar e do ano de cultivo sobre a composição de azeites de oliva produzidos no Sul do Brasil, a fim de caracterizar perfis metabólicos marcadores para as cultivares e a região de produção.

2.2.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar acidez, índice de peróxido, produtos primários e secundários da oxidação lipídica (K_{270} e K_{232}) e perfil de ácidos graxos de azeites de oliva monovarietais produzidos no Sul do Brasil;
- b) Analisar compostos fenólicos, tocoferóis, carotenoides, clorofila e coordenadas de cor de azeites de oliva monovarietais produzidos no Sul do Brasil;
- c) Avaliar a influência das cultivares Arbequina, Arbosana, Coratina, Koroneike e Picual sobre a composição química dos azeites de oliva.
- d) Avaliar a influência da safra sobre a composição química dos azeites de oliva.

2.3 Revisão da literatura

2.3.1 Olivicultura

A oliveira (*Olea europaea* L.), pertence à família Oleacea e é nativa de regiões tropicais. O cultivo de oliveira iniciou há cerca de 6.000 anos na região que hoje corresponde à antiga Pérsia e Mesopotâmia. Posteriormente, a oliveira se espalhou para os territórios que hoje correspondem à Síria e à Palestina (HARWOOD & APARICIO, 2000). Embora, atualmente a oliveira seja cultivada em várias partes do mundo, na região do Mediterrâneo ainda se concentra a principal área de produção, responsável por cerca de 98% da olivicultura mundial (GHANBARI et al., 2012).

Os cultivos de oliveira se concentram entre as latitudes 30° e 45°, tanto no Hemisfério Norte como no Sul em locais onde, de modo geral, o clima é caracterizado por verão seco e quente e baixas temperaturas durante o inverno, que é indispensável para que a oliveira saia da dormência e tenha seu florescimento uniforme. A necessidade de água, em média, é de 650-800 mm por ano. Durante o florescimento, as chuvas não devem ser muito frequentes, para que o grão de pólen não seja lavado do estigma. Nas fases de maturação dos frutos, chuvas intensas também são prejudiciais, pois aumentam a quantidade de água nos frutos, favorecendo a ocorrência de antracnose (*Gloeosporium olivae*) e dificultando a extração do azeite, além de reduzir a estabilidade do óleo (WREGGE et al., 2015).

O cultivo de oliveiras no Brasil é recente, em 2005 os primeiros pomares comerciais foram implementados e a partir dessa data a área cultivada registra uma curva ascendente. Atualmente são cultivadas no país cerca de 7000 hectares, divididas em áreas localizadas nas regiões sul e sudeste do país. No Rio Grande do Sul, é cultivada uma área de 4500 hectares aproximadamente, especialmente em municípios da metade Sul (Agrolink, 2019).

Por se tratar de cultura sem histórico comercial no país, em 2008, a Secretaria da Agricultura do RS criou o Grupo Técnico da Olivicultura e linhas de crédito passaram a ser disponibilizadas para incentivo da cultura no estado. Em 2015, foi lançado o Programa Estadual de Desenvolvimento da Olivicultura (PRO-OLIVA), o qual intensificou a cooperação e as ações envolvendo instituições estaduais, federais, municipais e a iniciativa privada. Em 2017, a partir da elaboração de documentos e estatuto foi criado e estruturado o IBRAOLIVA – Instituto Brasileiro de Olivicultura.

2.3.2 Azeite de oliva

O azeite de oliva é o produto da extração de frutos de azeitona exclusivamente por processos mecânicos, em condições térmicas que não produzam alteração do azeite e que não tenha sido submetido a outros tratamentos além de lavagem, decantação, centrifugação e filtração (BRASIL, 2012). Este tipo de processamento retém os compostos minoritários (compostos fenólicos, tocoferóis, esteróis, carotenoides) originalmente presentes no fruto da oliveira. Diferentemente, a maioria dos óleos vegetais comestíveis são extraídos com solventes e passam por etapas de refino nas quais os compostos antioxidantes geralmente são removidos (SEGURA-CARRETERO et al., 2010).

O azeite de oliva extra virgem considerado o de melhor qualidade, deve conter segundo a legislação Brasileira no máximo 0,8 g/100g de ácido oleico (AO). À medida que a acidez do azeite aumenta, o produto passa a ser classificado em categorias que vão decrescendo quanto ao aspecto de qualidade, passando pelo azeite de oliva virgem com no máximo 2 g/100g AO até o azeite virgem lampante com acidez maior que 2 g/100g AO (BRASIL, 2012).

Dentre as variedades de azeites, encontram-se os “gourmets” varietais e os “blends”. Os “gourmets” varietais são produzidos com o intuito de manter as características próprias da cultivar utilizada, enquanto que os “blends” são constituídos por uma mistura de duas ou mais cultivares com a finalidade de melhorar as características físico-químicas e sensoriais do produto (APARICIO, 2003).

A quantidade e a qualidade dos azeites são altamente dependentes da cultivar. As cultivares de oliveiras mais utilizadas para produção de azeites são: Arbequina, Manzanilla e Picual (Espanha), Barnea (Israel), Koroneiki (Grécia) e Grappolo, Frantoio e Leccino (Itália). Dentre essas, a cultivar Arbequina se destaca pela sua alta produtividade e rusticidade, sendo a variedade mais plantada em todos os países olivicultores (GARCÍA-GONZÁLEZ & APARICIO, 2010).

2.3.3 Processamento do azeite de oliva

As azeitonas destinadas à produção de azeite devem ser colhidas antes de estarem completamente maduras, pois assim proporcionam azeites com melhores características sensoriais e de qualidade, com maior vida de prateleira. No entanto, azeitonas nos estádios iniciais de maturação apresentam menor rendimento de óleo

(PERES et al., 2016). A produção do azeite de oliva começa com a seleção das azeitonas, que devem ser firmes e não apresentar nenhum dano físico (FERNÁNDEZ-BOLAÑOS et al., 2006). As principais etapas de processamento necessárias para obtenção do azeite de oliva incluem: recepção dos frutos, limpeza e lavagem; moagem e batimento; prensagem e centrifugação; decantação natural e centrifugação; e armazenamento.

Após a recepção das azeitonas, a lavagem e a limpeza são necessárias para remoção de folhas e materiais estranhos, que podem prejudicar as máquinas ou causar contaminação no produto. A presença das folhas confere um gosto amargo ao azeite (KAPELLAKIS; TSAGARAKIS; CROWTHER, 2008).

A moagem é o primeiro passo para obtenção do azeite. O propósito dessa etapa é o rompimento das células, para facilitar a liberação do óleo. A moagem é realizada principalmente em moinhos mecânicos de martelos. Após os frutos serem moídos a pasta resultante é homogeneizada (KAPELLAKIS; TSAGARAKIS; CROWTHER, 2008).

A moagem é seguida do batimento ou malaxação, operação que consiste na agitação da massa de azeitona lentamente e constantemente por cerca de 45 min. Nessa etapa, o objetivo é aumentar a extração do óleo. Esta etapa contribui para a coalescência de pequenas gotas de óleo para formar gotas maiores, facilitando a posterior separação das fases e quebra da emulsão de óleo/água. Para maior eficiência, são utilizados malaxadores que possuem parede dupla, para circulação de água quente. Um aumento na temperatura resulta em menor viscosidade do óleo e maior rendimento de óleo. No entanto, a temperatura da água não deve ser superior a 30°C para evitar degradação de compostos voláteis, mudança na coloração e aumento da acidez (KAPELLAKIS; TSAGARAKIS; CROWTHER, 2008).

Atualmente os três sistemas de extração de azeite utilizados são o sistema tradicional de prensas, o sistema de extração contínuo de três fases e o sistema de extração contínuo de duas fases. O sistema de prensas é o mais antigo, porém ainda continua sendo usado em muitos lagares. Neste sistema, a massa de azeitona já batida é submetida a uma pressão hidráulica que aumenta gradualmente. Separa-se, assim, a fração sólida (bagaço) e a fração líquida (mosto oleoso: azeite e água). A fração líquida é recolhida e posteriormente o óleo é separado da água. Este sistema tem grandes custos em termos de mão de obra e de materiais de filtro e produz elevada quantidade de água ruça. O sistema de três fases possui essa

designação devido ao número de frações resultantes, que são: o azeite, o bagaço e a água ruça. Nesse sistema, a massa de azeitona, após a batedura, é submetida a uma centrifugação com alta velocidade. Para facilitar a separação das fases, nesta etapa ocorre adição de água. Já no sistema contínuo de duas fases, após a moagem a massa de azeitonas passa por um processo de centrifugação que separa a parte sólida (bagaços úmidos) do mosto oleoso; porém nesse sistema, não há adição de água. Além disso, esse processo permite se obter um azeite de melhor qualidade (menor acidez e teor mais elevado de compostos antioxidantes, como compostos fenólicos e tocoferóis). Estima-se que atualmente quase 90% do azeite seja extraído com sistemas contínuos (de duas ou três fases) (PINTO, 2004).

Após a extração, a fase oleosa é separada dos sólidos em suspensão e da água residual. Nessa etapa podem ser utilizados tanques de decantação, onde as partículas e a fase aquosa ficam na parte inferior e o óleo na parte superior. Entretanto, a falta de controle do tempo necessário para a separação torna esse sistema desvantajoso para os processos industriais modernos. Com isso, centrifugas de pilhas de disco conhecidas como clarificadores são utilizadas nessa etapa, na qual os sólidos mais densos são pressionados contra a parede do cubo rotativo, enquanto que as fases líquidas (óleo + água) são coletadas. A separação das fases líquido-líquido (óleo e água) pode ser realizada por decantação, centrifugação, ou por um sistema misto em que primeiro se realiza a decantação e depois a centrifugação (PETRAKIS, 2006). Após a extração, o azeite de oliva é armazenado em tanques de aço inoxidável até o momento do envase.

2.3.4 Composição do azeite de oliva

O azeite de oliva é composto por uma fração lipídica saponificável, que constitui mais de 98% do conteúdo total, onde se encontram majoritariamente triacilgliceróis e uma pequena fração de ácidos graxos livres.

A outra fração denominada de insaponificável é formada por esteróis, hidrocarbonetos, polifenóis, compostos voláteis, estigmastadienos, carotenoides e clorofilas. Esses compostos são essenciais no sabor e na estabilidade oxidativa do azeite (DAIS; HATZAKIS, 2013; GHANBARI et al., 2012).

Fração saponificável

Triglicerídeos

Os triacilgliceróis (TAGs) são ésteres de ácidos graxos e glicerol e são os principais componentes do azeite de oliva. A distribuição dos ácidos graxos nas diferentes posições do glicerol influencia as propriedades físicas dos óleos e gorduras, bem como seu ponto de fusão. Além disso, possuem importantes efeitos fisiológicos como componentes da dieta humana, sendo fonte de ácidos graxos essenciais (LERMA-GARCÍA et al., 2011).

Os triacilgliceróis são caracterizados quimicamente pelo seu número total de carbonos, grau de insaturação e posição de cada ácido graxo. A posição central da molécula de glicerol normalmente é formada por ácidos graxos insaturados. Os triacilgliceróis encontrados em maior quantidade no azeite de oliva são: OOO (40-59%), POO (12-20%), OOL (12,5-20%), POL (5,5-7%) e SOO (3-7%). O O se refere ao ácido oleico; P ao ácido palmítico; L ao ácido linoleico; S ao ácido esteárico (ALARCÓN DE LA LASTRA; MOTILVA; HERRERÍAS, 2001).

Ácidos graxos

A composição de ácidos graxos do azeite é o que o diferencia dos demais óleos. O azeite apresenta um elevado conteúdo de ácido oleico, representando de 55 a 83% de sua composição total. Além disso, o azeite contém ácidos graxos poli-insaturados, como os ácidos linoleico e linolênico, que representam cerca de 3,5% a 21,0% e menos 1%, respectivamente, da composição total do azeite de oliva (GHANBARI et al., 2012). O elevado teor de ácido oleico contribui para a estabilidade do azeite, visto que ele é menos susceptível à oxidação do que os ácidos graxos poli-insaturados que predominam em outros óleos (OWEN et al., 2000). Além disso, o ácido oleico contribui para aumentar os níveis de colesterol HDL (*“high-density lipoprotein”*) e reduzir os níveis de colesterol LDL (*“low-density lipoprotein”*) no sangue. Com isso, este ácido graxo pode prevenir doenças cardiovasculares que são as principais causa de mortalidade nos países industrializados (COVAS, 2008).

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), como linoleico (18:2 ω -6), e α -linolênico (18:3 ω -3), são ácidos graxos essenciais. Esses ácidos graxos, embora considerados componentes indispensáveis para a estrutura, desenvolvimento e função das células, não podem ser sintetizados pelo corpo humano, e, portanto,

devem ser ingeridos na dieta. Já com relação aos ácidos graxos saturados, o consumo deve ser moderado (aproximadamente a mesma quantidade que os poli-insaturados), visto que estes se depositam na parede arterial, diminuindo a pressão sanguínea. Com isso, aumentam o nível de colesterol no plasma e contribuem para desenvolvimento de alguns tipos de câncer (por exemplo, cólon, mama e próstata) (GHANBARI et al., 2012).

A composição de ácidos graxos é influenciada por diversos fatores como local de produção, latitude, clima, cultivar e estágio de maturação, podendo ser utilizado para diferenciar azeites de oliva de diferentes variedades e origem geográfica (MONTEALEGRE; ALEGRE; GARCÍA-RUIZ, 2010; KRITIOTI; MENEXES; DROUZA, 2018). Além disso, o perfil de ácidos graxos é considerado um dos principais parâmetros para avaliar a autenticidade dos azeites (CUNHA; OLIVEIRA, 2006; PIRAVI-VANAK et al., 2009).

Fração insaponificável

Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabolitos especializados, sintetizados naturalmente pelas plantas durante seu desenvolvimento natural e em respostas a condições de estresse, como infecção, ferimento, radiação UV, entre outros. Os compostos fenólicos também agem nas plantas como antimicrobianos, fotorreceptores, atrativos visuais e como defesa contra herbívoros e patógenos (NACZK; SHAHIDI, 2004).

No azeite de oliva, os compostos fenólicos desempenham importante papel, visto que contribuem para estabilidade oxidativa, além de contribuir para o sabor amargo, adstringência e pungência. Existem pelo menos 30 compostos fenólicos detectados no azeite e a sua concentração depende de vários fatores como estágio de maturação, variedade, estação, condições climáticas, embalagem, armazenamento e tecnologia utilizada no processamento (GHANBARI et al., 2012).

A fração fenólica do azeite é composta principalmente por álcoois fenólicos (hidroxitirosol e tirosol) e secoiridóides (derivados oleuropeína, por exemplo ácido elenólico) (BECERRA-HERRERA et al., 2014). Também são encontrados ácidos fenólicos, tais como ácido gálico, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, ácido *p*-cumárico e ácido *p*-hidroxibenzóico, lignanas (pinoresinol e

acetoxi-lamoresinol) e flavanóides (como luteolina e apigenina) (PERES et al., 2016).

Vários benefícios à saúde são atribuídos ao azeite de oliva devido à presença dos compostos fenólicos. Esses compostos apresentam ação antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, além de induzir apoptose em células cancerígenas e inibir a oxidação lipídica (FRANCO et al., 2014; MEZA-MIRANDA et al., 2016). Dentre os compostos fenólicos encontrados no azeite, o hidroxitirosol é considerado o antioxidante mais potente, cuja atividade biológica tem estimulado pesquisas sobre o seu provável papel na proteção cardiovascular (WANI et al., 2018).

Estratégias vêm sendo desenvolvidas com intuito de aumentar a concentração de compostos fenólicos no azeite. De acordo com estudo realizado por Bervillé e Breton (2014), condições de déficit hídrico nas oliveiras mostrou-se uma estratégia eficaz para acúmulo de compostos fenólicos nas azeitonas e consequentemente no azeite. A utilização de selênio (Se) na adubação também se mostra uma alternativa promissora para incremento de fenólicos. A fertilização com Se antes do florescimento em oliveiras cultivada em anos com diferentes condições climáticas influenciou positivamente (aumento de 50%) a composição fenólica do azeite (D'AMATO et al., 2017).

O perfil de compostos fenólicos vem sendo utilizado para diferenciar azeites de diferentes cultivares (TAAMALLI et al., 2010) e como características discriminantes entre azeites de diferentes origens geográficas (BAJOUB et al., 2016; BEN MANSOUR et al., 2017). Esses compostos também são empregados como marcadores para comprovação da autenticidade dos azeites (KALOGIOURI et al., 2016).

Tocoferóis

O termo vitamina E é o nome genérico usado para um grupo de compostos que inclui quatro tocoferóis (α -, β -, γ - e δ -) e quatro tocotrienóis (α -, β -, γ - e δ -). Dentre esses, o α -tocoferol possui a maior atividade biológica, sendo considerado nutriente essencial para os seres humanos, visto que é necessário para a prevenção de sintomas de deficiência de vitamina E, incluindo neuropatia periférica e anemia hemolítica (TRABER; STEVENS, 2011).

O azeite é uma importante fonte de vitamina E, uma vez que fornece entre 10 a 150 mg de α -tocoferol a cada 100g (CAYUELA; GARCÍA, 2017). Com isso, um

consumo diário de 25 g de azeite extra virgem fornece quase 30% do consumo recomendado desta vitamina (EFSA, 2015). Os óleos vegetais são considerados as fontes mais ricas de vitamina E (SOUCI et al., 2000).

No azeite, os tocoferóis eliminam radicais livres e lipoproteínas, prevenindo a peroxidação lipídica. Também contribuem para proteção termo-oxidativa e previnem a foto-oxidação, aumentando a estabilidade durante o armazenamento (GHANBARI et al., 2012). No azeite foram reportados quatro diferentes tipos de tocoferóis, α -, β -, γ - e δ -tocoferol, sendo o α -tocoferol o mais abundante, constituindo cerca de 95% do total de tocoferóis. A concentração de tocoferóis no azeite varia em função da cultivar, grau de maturação e condições climáticas (BELTRÁN et al., 2010).

A determinação de tocoferóis, juntamente com a avaliação dos outros parâmetros é utilizada para detecção de adulterações do azeite (VILLEGAS et al., 2018). Além disso, o teor de tocoferóis também vem sendo empregado como marcador para diferenciação de azeites de diferentes cultivares (CAYUELA; GARCÍA, 2017).

Carotenoides

Carotenoides são compostos isoprenoides sintetizados e armazenados nos plastídios das células. Esse grupo de compostos desempenha papéis essenciais na fotossíntese e fotoproteção. De acordo com sua estrutura podem ser divididos em carotenos, formados somente de carbono e hidrogênio e xantofilas que apresentam, além de carbono e hidrogênio, oxigênio em sua estrutura (SUN et al., 2018)

Os carotenoides são importantes também para nutrição e saúde humana, principalmente devido sua atividade provitamina A, visto que a deficiência de vitamina A é problema de saúde pública mundial. Além disso, devido sua ação antioxidante, os carotenoides auxiliam na prevenção de doenças cardiovasculares e doenças crônicas degenerativas, como diabetes tipo 2, obesidade, alguns tipos de câncer, patologias degenerativas do olho, entre outras (CONCEPCION et al., 2018).

No azeite os carotenoides são responsáveis pela coloração amarela, sendo que os compostos majoritários são a luteína e o β -caroteno (RALLO et al., 2018). Em menor concentração encontram-se diversas xantofilas (violaxantina, neoxantina, luteoxantina, anteraxantina, mutatoxantina e β -criptoxantina) (CERRETANI et al., 2008). Os carotenoides, juntamente com os compostos fenólicos e os tocoferóis são responsáveis pela elevada estabilidade do azeite (TEKAYA et al., 2016). O teor de

carotenoides no azeite varia em função da cultivar, estágio de maturação, condições climáticas do ano de cultivo, processamento e armazenamento (CRIADO et al., 2008).

O teor de carotenoides aliado a sua composição isotópica pode ser utilizado para discriminação de origem, como mostra trabalho realizado por Portarena et al., (2017). Além disso, a determinação de carotenoides também pode ser empregada para avaliar a qualidade de azeites e identificar adulterações (FERREIRO-GONZÁLEZ et al., 2017).

Clorofilas

As clorofilas são compostos formados por anéis porfirina ligados a um átomo de Mg^{2+} no centro da estrutura e uma cadeia lateral altamente hidrofóbica (fitol). Clorofilas são sensíveis à temperatura e extremos de pH e podem ser convertidas em derivados sem o íon Mg^{2+} , denominados de feofitinas (KANG et al., 2018).

As clorofilas (clorofilas *a* e *b*) são os pigmentos responsáveis pela coloração verde característica da azeitona. No entanto, durante o processo de extração do azeite ocorre grande perda de clorofilas, permanecendo no azeite apenas 20% do teor presente no fruto. Do ponto de vista qualitativo, o perfil de clorofilas do azeite é determinado pelos pigmentos que estavam presentes inicialmente nos frutos e pelos derivados formados durante a extração do óleo, principalmente as feofitinas (YILMAZ, 2016).

No azeite, as clorofilas desempenham funções importantes, pois além de serem decisivas na coloração do azeite, também conferem ao mesmo, maior poder antioxidante, podendo atuar como anti-inflamatório, antimutagênico e anticarcinogênico (YILMAZ, 2016). Não tendo somente características positivas, as clorofilas podem atuar negativamente sobre a qualidade dos azeites, pois a clorofila e a feofitina possuem ação pró-oxidante em presença de luz. Estes pigmentos agem como catalisadores na formação do oxigênio singlete, o qual pode reagir diretamente com as ligações duplas dos ácidos graxos oleico, linoleico e α -linolênico, produzindo espécies reativas de oxigênio (LANFER-MARQUEZ; BARROS; SINNECKER, 2005).

O conteúdo de clorofila no azeite também é influenciado pela cultivar, pelo estágio de maturação e pelas condições edafoclimáticas e de processamento. Com isso, a determinação do conteúdo de clorofila é utilizada para classificar azeites de diferentes origens geográficas (ALVES et al., 2018; KARABAGIAS et al., 2017).

Além disso, a análise de clorofila e seus derivados é utilizada para identificar adulterações nos azeites (FERREIRO-GONZÁLEZ et al., 2017).

2.3.5 Denominação de Origem

A globalização vem tornando o mercado cada vez mais competitivo, com isso a produção e o processamento de alimentos devem ir além dos aspectos tecnológicos e de conservação. São necessários também, que se insiram valores adicionais como a origem da matéria-prima e o sistema de produção para atender a demanda dos consumidores por produtos de alta qualidade e que apresentem rastreabilidade e autenticidade.

É nesse cenário que surgiu a discriminação por origem geográfica (também conhecida como denominação de origem), que refere-se ao produto de determinado local que apresenta características que o diferencia dos demais, refletindo os efeitos exclusivos dos fatores ambientais, práticas agrônômicas e tecnológicas que caracterizam a região (LUYKX; VAN RUTH, 2008). Essas diferenciações têm a vantagem de estimular e proteger o setor produtivo local, aumentando a competitividade no mercado nacional e internacional, limitando a concorrência, garantindo preços e mercado para comercialização.

No Brasil a legislação define os termos relacionados à indicação geográfica na Lei da propriedade intelectual número 9.279/96. Nela está descrito que o tipo de indicação geográfica está relacionado à reputação da região, e é aplicada a casos em que a localidade tenha se tornado conhecida e tenha um histórico com relação à produção de determinado produto ou serviço. No caso da denominação de origem, é preciso que a região específica tenha influência direta na qualidade ou característica do produto ou serviço.

Na Europa a denominação de origem é regulamentada pelo conselho parlamentar europeu (EU 1151/2012) e sua utilização está em crescente expansão no setor da olivicultura. Segundo o Conselho Oleícola Internacional existem 91 denominações de origem para azeites: 35 na Itália, 22 na Espanha, 16 na Grécia, 7 na França, 6 em Portugal, 3 na Turquia, 1 em Marrocos e 1 na Eslovênia (COI, 2018).

Para estabelecer uma indicação de procedência de azeite deve-se levar em consideração principalmente dois pontos: o primeiro é que o perfil dos azeites produzidos no local deve ser bem definido com uma caracterização profunda e

abrangente da sua qualidade e composição. Além disso, também é necessário assegurar a homogeneidade entre os azeites produzidos em toda a região avaliada e sua variação em diferentes anos de cultivo. O segundo é fornecer marcadores que diferenciem o azeite de óleos produzidos em outros locais (BAJOUB et al., 2014).

Nesse contexto, nas últimas décadas, vários trabalhos buscaram o desenvolvimento de métodos adequados para classificar e discriminar azeites de diferentes origens geográficas. Dentre esses métodos varias técnicas são empregadas como: cromatografia líquida (BAJOUB et al., 2015, 2016; GIL-SOLSONA et al., 2016), cromatográfica gasosa, espectrofotometria (KARABAGIAS et al., 2017), ressonância magnética nuclear (LONGOBARDI et al., 2012), eletroforese capilar (LERMA-GARCÍA et al., 2009) e espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)(SINELLI et al., 2010). Geralmente essas técnicas são associadas a métodos quimiométricos (MELUCCI et al., 2016; BEN MANSOUR et al., 2017).

No Brasil, devido à produção de azeite ser recente, pouco se conhece sobre sua composição. O primeiro estudo sobre a composição de azeites brasileiros foi realizado por Ballus et al., (2014), que avaliaram o perfil de compostos fenólicos, tocoferóis e o conteúdo de ácidos graxos de 17 azeites monovarietais produzidos na estação experimental de Maria da Fé (MG). Ballus et al., (2015) também avaliaram o perfil de compostos fenólicos das cultivares Manzanilla, Grappolo, Arbequina e Koroneiki cultivadas em Dom Pedrito e das cultivares Arbequina, Koroneiki, Coratina e Frantoiocultivadas em Pelotas. A composição de azeites brasileiros também foi avaliada por Bruscatto et al., (2017), que determinaram os teores de tocoferóis, pigmentos, compostos fenólicos e ácidos graxos de azeites produzidos na unidade experimental da Embrapa Clima Temperado (RS). Já Borges et al., (2017a, 2017b, 2017c) avaliaram a composição de azeites da cultivar Arbequina, produzidos em duas regiões do Brasil (Pelotas-RS e Maria da Fé-MG) com objetivo de comparar aos azeites da mesma cultivar produzidos na Espanha. Entretanto, os estudos realizados até o momento sobre a composição dos azeites brasileiros utilizaram amostras de estações experimentais, sendo necessários mais estudos com produções comerciais para avançarmos na compreensão dos fatores que influenciam a composição dos azeites.

2.4 Material e métodos

2.4.1 Material

Azeitonas das cultivares Arbequina, Arbosana, Coratina, Koroneiki, Frantoio e Picual produzidas no município de Pinheiro Machado, RS (coordenadas geográficas: 31° 34' 42" S e 53° 22' 52" W: 439 m de altitude), na safra de 2017 e 2018, foram colhidas em ponto de maturação comercial. Foram obtidas informações mensais sobre precipitação e temperaturas médias ao longo dos dois anos do estudo, considerando o ciclo da cultura (Tabela 1).

Tabela 1: Temperatura média e precipitação no município de Pinheiro Machado-RS, considerando ciclo da cultura da oliveira.

Meses	2016	2017	2016	2017
	T° Média		Precipitação	
Abril	20,6	16,2	365,6	154,0
Maio	15,6	13,9	111,8	301,8
Junho	12,0	11,9	63,6	110,4
Julho	13,4	13,3	138,4	43,8
Agosto	14,8	14,1	105,8	213,0
Setembro	14,9	16,3	50,1	223,8
Outubro	18,4	15,9	300,8	257,9
Novembro	21,4	17,4	409,1	31,2
Dezembro	20,0	21,3	71,0	76,6
Meses	2017	2018	2017	2018
	T° Média		Precipitação	
Janeiro	20,2	21,8	125,6	70,0
Fevereiro	21,6	20,5	115,6	30,1
Março	18,1	18,9	152,2	89,8
Total de precipitação			2009,6	1602,4

Fonte: Estação meteorológica de Pinheiro Machado

A extração dos azeites foi realizada no Laboratório de Análises de Azeites, situado na Embrapa Clima Temperado. Para a extração utilizou-se um sistema em batelada, que consiste de três etapas: na primeira, a trituração dos frutos, utilizando um moinho de martelo, seguida pela maceração da pasta de azeitona em um termobatedor por um período de 45 min a temperatura ambiente, e na última, foi efetuada a centrifugação da pasta, a 1300 xg. Posteriormente, os azeites foram filtrados, envasados e transportados até o Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LaCEM) da UFPel, onde permaneceram sob congelamento em frascos de vidro âmbar até o momento das análises.

2.4.2 Métodos

2.4.2.1 Índices de degradação lipídica

Teor de acidez

Para avaliar o teor de acidez, dissolveu-se o azeite em solução de éter etílico:álcool etílico (2:1, v/v) na proporção de azeite:solvente de 1:10 (p/v), adicionou-se fenolftaleína e titulou-se com solução de KOH (0,1 N), segundo metodologia da AOCS (1992). Os resultados foram expressos em % de ácido oleico.

Índice de peróxidos

Para determinação do índice de peróxidos, cinco gramas de amostra foram dissolvidas em 30 mL de solução de ácido acético:clorofórmio (3:2, v/v), agitou-se a mistura e adicionou-se 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio e o frasco foi mantido no escuro por um minuto. Em seguida adicionou-se 30 mL de água destilada e 0,5 mL de solução de amido (1%), e titulou-se com tiossulfato de sódio (0,1 N) até a perda da coloração azulada, segundo metodologia da AOCS (1992). Os resultados foram expressos em $\text{meqO}_2 \text{ kg}^{-1}$ amostra.

Determinação de absorção específica a 232 e 270 nm

Para a determinação do coeficiente de extinção foram medidas em espectrofotômetro a absorção específica a 232 nm e a 270 nm de uma amostra de 25 mg de azeite, dissolvida em 25 mL de hexano. A extinção específica $K^{1\%}_{1\text{cm}}$, refere-se à absorção de uma solução a 1% do óleo no solvente, numa espessura de 1 cm e é convencionalmente indicada por K, de acordo com método COI/T.20/Doc. N°19 (COI, 2010a).

2.4.2.2 Composição de ácidos graxos

A composição de ácidos graxos das amostras de azeites de oliva virgem foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), seguindo o método descrito pelo COI (2015). Para a reação de transesterificação, 0,1 gramas de amostra, 2 mL de hexano e 0,2 mL de hidróxido de potássio metanólico (2M) foram misturados sob agitação vigorosa por 30 s. A camada superior contendo ésteres metílicos foi coletada e injetada no cromatógrafo a gás. Utilizou-se um GC-MS Shimadzu QP2010 Ultra com autoinjeter AOC-20i e biblioteca de espectro de massas NIST 2011. Injetou-se 1 μL de amostra com temperatura do injetor a 200°C, no modo splitless. Utilizou-se hélio como gás

carreador com fluxo de 1.78 mL min^{-1} e velocidade linear como modo de controle de fluxo. A coluna capilar utilizada foi Rxi-1MS (30m x 0,25mm x 0,25 μm). O gradiente de temperatura foi mantido a 78°C durante 6,5 min, aumentado a uma taxa de $60^\circ \text{C min}^{-1}$ até 180°C durante 13,44 min, depois aumentou a uma taxa de $35^\circ \text{C min}^{-1}$ até 280°C e permaneceu assim por 5,5 min. As temperaturas da fonte de íons e da interface foram ajustadas em 200°C , e a faixa de varredura de massas foi de m/z 35 a 500 e 0,3 escaneamentos por segundo. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões de referência, e os resultados foram expressos como percentagem relativa de ácidos graxos.

2.4.2.3 Tocoferóis

Pesou-se 150 mg de azeite em balão volumétrico de 5mL e completou-se o volume com isopropanol. O extrato foi levemente agitado e transferido para microtubos, de centrifuga. Em seguida, o extrato foi centrifugado a $8600 \times g$ por 6 minutos. O sobrenadante foi coletado e filtrado através de membrana de nylon 0,22 μm (AllCrom, St. Louis, Mo, EUA) e injetadas em cromatógrafo a líquido.

O teor de tocoferóis foi determinado em cromatógrafo a líquido Shimadzu equipado com sistema detector de fluorescência e coluna de fase reversa CLC-ODS (3.9cm x 150 mm x 4 μm). As análises foram realizadas nas seguintes condições cromatográficas: volume de injeção de 10 μL , fluxo 1 mL min^{-1} e comprimento de ondas de excitação de 290nm e emissão 330 nm. A fase móvel inicial foi constituída por acetonitrila:metanol:isopropanol 50:40:10 (v/v/v) por 10 minutos; alterando-se linearmente para acetonitrila:metanol:isopropanol (30:65:5, v/v/v) até atingir 12 minutos; e retornando linearmente para a fase móvel inicial até 15 minutos de análise. A identificação e quantificação de tocoferóis foram realizadas usando curvas de calibração externas ($\beta + \gamma$) e δ -tocoferol e os resultados foram expressos como mg Kg^{-1} .

2.4.2.4 Pigmentos e coloração

Carotenoides totais

Para determinação do teor de carotenoides totais pesou-se 2,5 gramas de azeite de oliva e dissolveu-se em 10 mL de solução isooctano:etanol (3:1, v/v). Em seguida, foi realizada a leitura em 450 nm, usando como referência o solvente puro,

segundo metodologia descrita por Rodrigues-Amaya (2001). O conteúdo total de carotenoides foi determinado pela seguinte equação:

$$\text{Carotenoides Totais (mg.kg}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Abs} \times V \text{ (mL)} \times 10^6}{\% \times 100 \times P \text{ (g)}}$$

Em que: Abs = absorbância; V = volume da solução (10 mL); $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ = coeficiente de absorção (2500, equivalente ao carotenóide majoritário β -caroteno); P = peso da amostra. Os resultados foram expressos em mg kg^{-1} de β -caroteno.

Clorofila totais

Para determinação do teor de clorofilas totais pesou-se 2,5 gramas de azeite de oliva e dissolveu-se em 10 mL de ciclohexano. A absorção da solução foi determinada a 670 nm, usando como referência o solvente puro, segundo metodologia descrita pela AOCS (1992). Os resultados foram expressos em mg kg^{-1} .

Coloração

A coloração dos azeites foi determinada utilizando colorímetro (Minolta Chromometer Modelo CR 300) no padrão CIE- $L^*a^*b^*$. O equipamento fornece os valores a, b e L. Valores L^* representam luminosidade ($L^*=0$ é preto e $L^*=100$ é claridade total) e a^* e b^* foram utilizados no cálculo do ângulo Hue [$^\circ\text{Hue} = \tan^{-1}(b^*/a^*)$].

2.4.2.5 Compostos fenólicos individuais

Para extração dos compostos fenólicos individuais pesou-se 2,50 g de azeite e adicionou-se 2,0 mL de uma mistura metanol:água (70:30) e 2,0 mL de hexano. Agitou-se vigorosamente por um minuto e manteve-se sob agitação lenta por mais 20 minutos. Após este período realizou-se a centrifugação da amostra a $7000 \times g$ a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e filtrado através de membrana de nylon $0,22 \mu\text{m}$ (AllCrom, St. Louis, Mo, EUA).

Dez microlitros do extrato foram injetados em cromatógrafo a líquido de ultra-alta eficiência (Shimadzu, Prominence) acoplado à espectrômetro de massas de alta resolução (tipo quadrupolo-tempo de vóo) (Impact HD). Os compostos foram separados em uma coluna Luna C18 (Phenomenex), utilizando solução de ácido fórmico em água (0,1% v/v, eluente A) e de acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico (eluente B) como fase móvel. O fluxo utilizado foi de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ e a temperatura da coluna foi de 40°C . Para separação foi utilizado um gradiente: 0,00

min – 10% B, 0,01 – 10,00 min, 75% B, 15,00 – 18,00 min, 90% B, 18,00 – 21,00, 90% B, 21,01- 23,00 min, 10% B, permanecendo por 7 minutos nessa condição.

O espectrômetro de massas foi operado no modo negativo, com espectros adquiridos ao longo de uma faixa de massas de m/z 50 a 1200. Os parâmetros de aquisição foram: voltagem do capilar 4 kV, pressão do gás de nebulização (N_2) de 2 bar, gás de secagem em 8 L min^{-1} , temperatura da fonte de 180°C , colisão de RF de 150 Vpp; transfer 70 mS e armazenamento pré-pulso de 5 mS. O equipamento foi calibrado com formiato de sódio 10mM, cobrindo toda a faixa de aquisição de m/z 50 até 1200. Além disso, experimentos automáticos de MS/MS foram realizados ajustando os valores de energia de colisão como se segue: m/z 100, 15 eV; m/z 500, 35 eV; m/z 1000, 50 eV, e usando nitrogênio como gás de colisão.

Os dados do MS foram processados usando o software DataAnalysis 4.0 (BrukerDaltonics, Bremen, Alemanha), que fornece uma lista das possíveis fórmulas moleculares usando a ferramenta Smart Formula (BrukerCompassDataAnalysis). As fórmulas moleculares candidatas foram escolhidas com base no erro (ppm) e nos valores de similaridade da distribuição isotópica (mSigma). Quanto menor o valor de mSigma e o erro, melhor o ajuste.

A quantificação foi realizada com base nas curvas de calibração dos seguintes padrões: ácido vanílico, ácido sirínico, ácido cafeico, ácido *p*-cumarico, ácido ferúlico, apigenina, luteolina, hidroxitirosol e tirosol. Para os compostos fenólicos identificados para os quais um padrão comercial não estava disponível, seu conteúdo foi estimado usando as curvas analíticas de compostos com estruturas químicas semelhantes. O teor de acetato de hidroxitirosol foi estimado usando a curva de calibração para o hidroxitirosol, enquanto a curva de calibração da oleuropeína foi usada para a estimativa do conteúdo de todos os secoiridoides e acetoxipinoresinol. Os resultados foram expressos em mg kg^{-1} .

2.4.2.6 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata ($n=3$) e os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Foram observadas interações significativas ($p \leq 0,05$) da cultivar em cada ano de colheita para a maioria das variáveis medidas. Com isso, os dados de cada ano de colheita foram analisados separadamente. Para tratamentos com efeito significativos ($p \leq 0,05$), as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de diferença mínima significativa (LSD) de

Fisher. As análises estatísticas foram realizadas no software SAS versão 8.0. Para melhor visualização das diferenças entre as cultivares e o comportamentos em diferentes anos foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) utilizando as seguintes variáveis dependentes: tocoferóis, clorofilas, carotenoides, coordenadas de cor, ácidos graxos e compostos fenólicos. Uma transformação de log foi aplicada antes da análise para evitar o efeito de diferentes escalas das variáveis. A análise multivariada dos dados foi realizada no Metabo Analyst 4.0.

2.5 Resultados

A tabela 2 apresenta o efeito da interação cultivar x safra para todas as variáveis utilizadas no estudo. Houve interação significativa entre os fatores cultivar x safra para todas as variáveis analisadas.

Tabela 2: Análise de variância para efeitos de cultivar e safra para as diferentes variáveis avaliadas

Componentes	Cultivar (quadrados médios)	Ano de colheita (quadrados médios)	Cultivar x ano de colheita (quadrados médios)	CV (%)	resíduo
C14:0	0,00005272*	0,00047669*	0,00002716 ^{ns}	18,89	0,00000375
C16:0	15,59530027*	20,958084*	2,60428693*	3,47	0,3030890
C16:1	4,12304791*	1,590121*	0,3082808*	8,83	0,02049821
C18:0	0,96920938*	52,88683211*	0,41256938*	5,66	0,03659647
C18:1	107,6091302*	958,893156*	3,3631031 ^{ns}	1,04	0,544413
C18:2	44,7592732*	228,8412562*	1,7529814*	5,75	0,1631241
C18:3	0,04329587 ^{ns}	3,92568178*	0,04123898 ^{ns}	17,87	0,01783308
C20:0	0,04269413*	0,029584*	0,03513813*	8,03	0,00111957
C20:1	0,00490136*	0,05251736*	0,00443603*	5,72	0,00038320
C22:0	0,01149476*	0,03940225*	0,00384165*	10,41	0,00023580
C24:0	0,00216407*	0,01529344*	0,00106851 ^{ns}	19,7	0,00021164
Total saturados	12,3291741*	152,9262001*	2,9743132*	2,44	0,2355898
Total insaturados	12,3306392*	152,942689*	2,9741348*	0,60	0,2356027
α-Tocoferol	15665,39936*	2133,67007*	3205,99582*	3,14	39,03762
β+γ-Tocoferol	22,1176428*	0,2288028 ^{ns}	0,4466561*	2,40	0,0329354
Carotenoides	173,049676*	1220,221336*	54,130023*	2,77	0,164975
Clorofilas	17,05026*	99,33444444*	5,49013111*	2,7	0,1853977
Luminosidade	4,3447694*	118,701025*	1,2790317*	0,61	0,0471346
°Hue	222,6648*	341920,8676*	251,0811*	0,38	0,7507
Ácido cafeico	0,74773956*	6,83909669*	0,75062476*	2,05	0,00008199
Ácido ferulico	0,00124903*	0,00035469*	0,00020996*	4,08	0,00000135
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,11495513*	0,0064*	0,00649507*	7,55	0,00010420
Ácido siríngico	0,16114376*	0,77352025*	0,08141572*	6,45	0,00030435
Ácido vanílico	0,01025527*	0,028224*	0,01488247*	4,02	0,00006260
Apigenina	26,950806*	0,1844702 ^{ns}	0,9804654*	7,85	0,0346494
Hidroxitirosol	0,55316289*	1,30988025*	1,10669925*	2,2	0,00035386
Tirosol	19121,45196*	49318,19393*	16570,42416*	2,18	2,6733

ns -não significativo; * - significativo (P < 0.05).

Tabela 2 (continuação): Análise de variância para efeitos de cultivar e safra para as diferentes variáveis avaliadas

Componentes	Cultivar (quadrados médios)	Ano de colheita (quadrados médios)	Cultivar x ano de colheita (quadrados médios)	CV (%)	resíduo
Hidroxitirosol acetato	162,2610985*	207,2304202*	74,4299081*	5,62	0,044008
Acetoxipinoresinol	1,06334956*	4,52483803*	0,98589516*	7,99	0,00132989
Ácido hidroxi elenolico	0,00212143*	0,02305336*	0,00445289*	5,29	0,00004171
Hidroxi D-oleuropeína aglicona	5,55551596*	13,35293403*	3,87683903*	5,95	0,00388648
Ácido elenolico	63,6881354*	246,2231722*	5,7588669*	4,72	0,1453737
Oleaceína	4698,84125*	1809,65160*	716,18165*	3,11	1,63200
Oleocantal	34,5438430*	2,0415647*	6,6628093*	5,25	0,0223216
Oleuropeína aglicona	2010,54062*	93,69595*	684,90179*	5,20	4,80283
Metil oleuropeína aglicona	0,05606729*	0,00143136 ^{ns}	0,00584116*	4,42	0,00016897
Ligstrosídeo aglicona	534,773990*	386,764667*	38,315762*	4,23	0,261227

ns -não significativo; * - significativo ($P < 0.05$).

2.5.1. Índices de degradação lipídica

Acidez, índice de peróxidos e coeficiente de extinção são preconizados pela legislação e utilizados para classificação dos azeites. Todas as amostras apresentaram acidez livre $\leq 0,8\%$ de ácido oleico, índice de peróxido ≤ 20 meq O_2 kg^{-1} , $K_{232} \leq 2,50$, $K_{270} \leq 0,22$ e $\Delta K < 0,01$, e foram, portanto, classificados como azeites extra virgem de acordo com o Conselho Oleícola Internacional (COI, 2017) (Tabela 3).

Tabela 3: Acidez (% ácido oleico), índice de peróxidos (meq O₂ kg⁻¹ amostra) e coeficiente de extinção (K₂₃₂, K₂₇₀ e ΔK) de azeites produzidos no sul do Brasil.

Cultivares	Acidez		Índice de peróxido		Extinção					
					K ₂₃₂		K ₂₇₀		ΔK	
	2017	2018	2017	2018	2017	2018	2017	2018	2017	2018
Arbequina	0,22±0,00Aa	0,07±0,01Bc	3,22±0,03Bd	7,06±0,12Ab	1,49±0,01Bd	2,16±0,01Ab	0,08±0,00Bd	0,13±0,00Ad	0,001±0,00Ad	-0,004±0,00Bb
Arbosana	0,09±0,01Bc	0,20±0,03Aa	3,23±0,03Bd	7,62±0,15Ab	1,68±0,01Bb	1,97±0,02Ad	0,17±0,00Ba	0,14±0,00Ac	0,006±0,00Aa	-0,003±0,00Bb
Coratina	0,10±0,01Ac	0,07±0,01Bc	4,95±0,84Bbc	9,78±0,25Aa	1,72±0,01Ba	2,44±0,03Aa	0,16±0,00Ba	0,26±0,00Aa	0,004±0,00Ac	-0,007±0,00Bc
Frantoio	0,14±0,01Ab	0,08±0,02Bc	7,86±0,04Aa	6,82±0,30Ab	1,47±0,02Bd	2,04±0,02Ac	0,08±0,00Bd	0,14±0,00Ac	0,001±0,00Ad	-0,006±0,00Bc
Koroneike	0,10±0,00Bc	0,23±0,01Aa	5,23±0,01Bb	9,15±0,52Aa	1,54±0,01Bc	2,07±0,03Ac	0,13±0,00Bb	0,16±0,00Ab	0,004±0,00Ac	0,004±0,00Aa
Picual	0,07±0,01Bd	0,14±0,01Ab	4,21±0,02Ac	5,25±0,32Ac	1,29±0,01Be	1,60±0,02Ae	0,11±0,00Bc	0,14±0,00Ac	0,005±0,00Ab	-0,005±0,00Bc

Resultados expressos em média ± desvio padrão. Diferenças significativas (p≤0,05) na mesma linha são indicadas por letras maiúsculas diferentes. Diferenças significativas (p≤0,05) na mesma coluna são indicadas por letras minúsculas diferentes.

2.4.2 Composição de ácidos graxos

Na tabela 4 estão descritos o perfil de ácidos graxos (% relativo), a soma dos ácidos graxos saturados e a soma dos ácidos graxos insaturados. O conteúdo dos ácidos graxos também se encontra dentro dos parâmetros de identidade e qualidade dos azeites estabelecidos pelo Conselho Oleícola Internacional (COI, 2017).

Ácido mirístico (C14:0), ácido oleico (C18:1), ácido linolênico (C18:3) e ácido lignocérico (C24:0) foram as únicas variáveis medidas para as quais a interação cultivar por ano de colheita não foi significativa. O ácido oleico (C18:1) foi o principal ácido graxo encontrado, variando de 68% (Arbequina) a 80,1% (Coratina) na safra de 2017 e de 59,1% (Arbequina) a 69,8% (Picual) na safra de 2018. O segundo ácido graxo predominante foi ácido palmítico (C16:0) (12,2–18,2%), seguido por ácido linoleico (C18:2) (1,1–13,2%), ácido esteárico (C18:0) (1,8–5,3%) e ácido palmitoléico (C16:1) (0,4–2,9%). Todos os outros ácidos graxos foram encontrados em proporções relativas inferiores a 1% do conteúdo total de ácidos graxos.

As cultivares Arbequina e Arbosana nas duas safras avaliadas apresentaram o maior teor de ácidos graxos saturados e menor teor de ácidos graxos insaturados. O maior conteúdo de ácido linoleico (C18:2) e ácido linolênico (C18:3) nas safras de 2017 e 2018 foram observadas na cultivar Arbequina. No entanto, esta cultivar apresentou o menor teor de ácido oleico (C18:1).

O perfil de ácidos graxos dos azeites avaliados neste estudo também foi influenciado pelo ano de colheita. O ácido oleico (C18:1) encontra-se presente em maior percentagem nos azeites cultivados no ano de 2017 quando comparado a 2018. Por outro lado, os azeites da safra de 2018 apresentaram maiores teores de ácido linoleico (C18:2) e ácido linolênico (C18:3).

Tabela 4: Perfil de ácidos graxos de azeites de seis cultivares produzidas no sul do Brasil durante duas safras

	2017	2018	2017	2018	2017	2018	2017	2018	2017	2018
Cultivares	C14:0		C16:0		C16:1		C18:0		C18:1	
Arbequina	0,009±0,00 Ba	0,020±0,00Aa	18,23±0,08Aa	17,58±0,30Aa	2,84±0,02Aa	2,97±0,05Aa	1,76±0,02Bd	4,04±0,02Ac	68,03±0,22Ac	59,11±0,57Bd
Arbosana	0,008±0,00Aab	0,013±0,00Ab	16,30±1,51Bb	17,39±0,34Aa	1,58±0,22Bb	2,82±0,18Aa	2,55±0,07Ba	4,49±0,29Ac	72,94±1,69Ab	62,67±0,71Bc
Coratina	0,004±0,00Bb	0,010±0,00Ab	15,62±0,33Abc	14,61±0,14Bb	0,43±0,02Ad	0,63±0,04Ac	2,14±0,02Bc	5,15±0,11Aab	80,10±0,40Aa	67,81±0,51Bb
Frantoio	0,007±0,00Bab	0,010±0,00Ab	13,81±0,29Bcd	16,71±0,36Aa	1,43±0,03Ab	1,44±0,10Ab	1,75±0,03Bd	3,94±0,19Ac	73,79±0,34Ab	64,41±1,26Bc
Koroneiki	0,006±0,00Bab	0,020±0,00Aa	12,28±0,44Bd	15,35±0,15Ab	1,14±0,04Bc	1,48±0,04Ab	2,27±0,04Bb	5,38±0,03Aa	78,59±0,36Aa	66,37±0,28Bb
Picual	0,006±0,00Bab	0,010±0,00Ab	14,12±0,18Bcd	17,22±0,15Aab	1,01±0,02Bc	1,58±0,04Ab	2,51±0,00Ba	4,61±0,15Abc	80,05±0,14Aa	69,89±0,30Ba
Cultivares	C18:2		C18:3		C20:0		C20:1		C22:0	
Arbequina	8,06±0,23Ba	13,27±0,41Aa	0,62±0,12Ba	1,26±0,11Aa	0,31±0,01Bd	0,57±0,04Aa	0,23±0,00Bc	0,38±0,01Aa	0,07±0,00Bc	0,14±0,01Ab
Arbosana	4,80±0,09Bc	9,43±0,59Ac	0,36±0,05Bbc	1,09±0,08Aa	0,52±0,03Aa	0,49±0,04Aa	0,34±0,00Ba	0,38±0,01Aa	0,21±0,01Aa	0,18±0,01Ab
Coratina	3,87±0,05Bd	9,70±0,50Ac	0,31±0,03Bbc	0,98±0,14Aa	0,37±0,01Ac	0,36±0,03Ab	0,36±0,01Aa	0,38±0,1Aa	0,09±0,00Bc	0,13±0,01Ab
Frantoio	6,41±0,06Bb	11,35±1,02Ab	0,27±0,06Bc	1,05±0,22Aa	0,32±0,00Ad	0,24±0,01Bc	0,30±0,02Bb	0,36±0,03Aa	0,08±0,01Bc	0,16±0,02Ab
Koroneiki	2,72±0,10Be	9,02±0,31Ac	0,45±0,08Babc	1,08±0,24Aa	0,45±0,01Ab	0,38±0,04Bb	0,33±0,03Bab	0,37±0,03Aa	0,15±0,01Ab	0,26±0,03Aa
Picual	1,08±0,04Bf	4,25±0,19Ad	0,48±0,01Bab	0,84±0,05Aa	0,36±0,01Bcd	0,58±0,03Aa	0,25±0,01Bc	0,37±0,02Aa	0,09±0,00Bc	0,17±0,02Ab
Cultivares	C24:0		Total saturados		Total insaturados					
Arbequina	0,03±0,00Bd	0,08±0,01Aa	20,44±0,08Ba	22,58±0,28Aa	79,58±0,07Ac	77,42±0,28Bc				
Arbosana	0,11±0,01Aa	0,10±0,01Aa	19,69±1,41Ba	22,90±0,14Aa	80,31±1,42Ac	77,10±0,14Bc				
Coratina	0,04±0,00Bcd	0,07±0,01Aa	14,93±0,40Bc	20,38±0,19Ac	85,08±0,40Aa	79,62±0,19Ba				
Frantoio	0,03±0,00Bcd	0,10±0,01Aa	17,79±0,29Bb	21,21±0,37Ab	82,21±0,29Ab	78,79±0,37Bb				
Koroneiki	0,06±0,01Bb	0,11±0,03Aa	16,75±0,28Bb	21,55±0,21Ab	83,23±0,28Ab	78,45±0,21Bb				
Picual	0,04±0,00Bc	0,09±0,02Aa	17,12±0,17Bb	22,82±0,15Aa	82,86±0,17Ab	77,18±0,15Bc				

Resultados expressos em média (% de abundância relativa de ácidos graxos totais) ± desvio padrão. As médias seguidas na mesma linha por letras maiúsculas diferentes e na mesma coluna por letras minúsculas diferentes são significativamente diferentes pelo teste de LSD de Fisher ($p \leq 0,05$).

2.5.3 Tocoferóis

Os tocoferóis foram avaliados por cromatografia líquida e identificados por comparação dos tempos de retenção com os seus respectivos padrões, observou-se a presença de α -, β - e γ -tocoferóis. No entanto, nas condições aplicadas neste estudo o β -tocoferol não se separou de seu isômero, o γ -tocoferol, e portanto, a quantificação foi realizada somando o conteúdo do β - e γ - tocoferol.

O principal isômero quantificado foi o α -tocoferol, representando mais de 90% do total de tocoferóis, variando de 117 (Frantoio) para 325 mg kg⁻¹ (Arbosana), seguidos por quantidades menores de $\beta + \gamma$ (4,8 a 10,7 mg kg⁻¹ em Arbequina e Coratina, respectivamente). O conteúdo de tocoferol diferiu entre as cultivares avaliadas, o maior teor de α -tocoferol foi observado em Arbosana, independentemente do ano de colheita (Tabela 5). Já para o $\beta + \gamma$ -tocoferol a cultivar Coratina foi a que apresentou o maior conteúdo.

Tabela 5: Teor de tocoferol dos azeites de seis cultivares produzidas no sul do Brasil durante duas safras

Cultivar	α -tocoferol (mg kg ⁻¹)		$\beta + \gamma$ -tocoferol (mg kg ⁻¹)	
	2017	2018	2017	2018
Arbequina	156,55±0,76 Ad	166,99±3,35 Ac	4,87±0,02 Af	4,79±0,05 Ad
Arbosana	325,00±14,12 Aa	253,83±12,18 Ba	7,08±0,06 Ad	6,62±0,37 Ac
Coratina	192,30±4,60 Ac	210,95±12,43 Ab	10,16±0,06 Aa	10,75±0,55 Aa
Frantoio	117,47±0,67 Be	162,59±3,31 Ac	6,05±0,06 Be	6,99±0,09Ac
Koroneiki	225,39±2,07 Ab	177,64±18,62 Bc	8,52±0,08 Ab	8,16±0,47 Ab
Picual	223,23±1,58 Ab	175,53±3,33 Bc	7,96±0,04 Ac	8,23±0,08 Ab

Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão. As médias seguidas na mesma linha por letras maiúsculas diferentes e na mesma coluna por letras minúsculas diferentes são significativamente diferentes pelo teste de LSD de Fisher ($p \leq 0,05$).

Semelhante aos ácidos graxos, o ano de colheita influenciou o teor de tocoferol. As cultivares Arbosana, Koroneiki e Picual apresentaram maiores teores de α -tocoferol na safra de 2017 comparado a safra 2018 (Tabela 4). Entretanto, a cultivar Frantoio apresentou o menor conteúdo de α -tocoferol na safra de 2017. Em geral, o teor de $\beta + \gamma$ -tocoferol não foi influenciado pelo ano de colheita, com exceção da cultivar Frantoio, na qual o maior teor foi observado em 2018.

2.5.4 Pigmentos e coloração

Os resultados do conteúdo de pigmentos (carotenoides e clorofila) e as coordenadas de cor (Luminosidade e °Hue) estão apresentados na tabela 6. A cultivar influenciou no teor de carotenoides e clorofilas. Na safra de 2017, os maiores conteúdos desses compostos foram observados para cultivar Coratina, enquanto que na safra de 2018 as maiores concentrações se encontram na cultivar Frantoio.

Os teores de carotenoides e clorofilas foram fortemente influenciados pelo ano de cultivo. Os azeites produzidos na safra de 2018, independente da cultivar, apresentaram maiores teores de carotenóide e clorofila do que os azeites produzidos na safra de 2017.

A cor do óleo é diretamente influenciada pelo conteúdo do pigmento (carotenóides e clorofilas). Em geral, os azeites de 2018 tinham uma tonalidade verde escura (°Hue de 312 a 320), enquanto que para os azeites da safra de 2017, observou-se tonalidade amarelada (°Hue de 108 a 140).

Tabela 6: Teores de carotenoides e clorofilas e variáveis de cor (L e ° Hue) de azeites de seis cultivares produzidas no sul do Brasil em 2017 e 2018.

Cultivares	Carotenoides (mg kg ⁻¹)		Clorofila (mg kg ⁻¹)		Luminosidade (L)		°Hue	
	2017	2018	2017	2018	2017	2018	2017	2018
Arbequina	3,8±0,1Be	12,8±0,9Ad	0,1±0,1Ac	0,9±0,1Ac	38,9±0,1Aa	34,2±0,0Ba	113,0±0,5Bd	320,6±0,8Aa
Arbosana	6,8±0,1Bd	19,3±0,8Ac	0,4±0,06Bbc	3,3±0,4Ab	38,6±0,1Ab	34,2±0,0Ba	108,0±0,6Be	312,9±0,7Ac
Coratina	15,7±0,4Ba	27,6±0,0Ab	3,1±0,2Ba	7,2±0,2Aa	35,6±0,1Ae	33,2±0,1Bb	140,3±1,3Ba	313,9±0,5Ac
Frantoio	8,0±0,2Bc	31,0±0,7Aa	1,0±0,2Bbc	7,2±0,3Aa	37,8±0,1Ac	33,8±0,1Bab	122,4±0,4Bc	317,6±0,0Ab
Koroneiki	6,3±0,1Bd	12,7±0,7Ad	0,5±0,04Bbc	2,6±0,2Ab	36,7±0,1Ad	33,3±0,0Bb	110,9±1,1Bd	312,9±0,9Ac
Picual	12,1±0,3Bb	19,6±0,3Ac	1,9±0,07Bb	6,1±0,1Aa	36,6±0,1Ad	33,6±0,7Bab	126,6±0,4Bb	313,0±1,6Ac

Resultados expressos em média ± desvio padrão. As médias seguidas na mesma linha por letras maiúsculas diferentes e na mesma coluna por letras minúsculas diferentes são significativamente diferentes pelo teste de LSD de Fisher ($p \leq 0,05$).

2.5.5 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram identificados por espectrometria de massa no modo de ionização negativa e, quando disponíveis, padrões comerciais foram utilizados para confirmação da identidade dos mesmos. Os compostos para os quais não havia padrões disponíveis foram identificados pela comparação de seus dados espectrais de massa de alta resolução e fragmentação (MS/MS) com informações previamente relatadas na literatura (AMMAR et al., 2017; BAKHOUCHE et al., 2013; BALLUS et al., 2015). Na tabela 7 estão apresentados os 19 compostos fenólicos identificados, incluindo tempo de retenção, fórmula molecular, m/z experimental e teórico, erro e mSigma (índice de similaridade do perfil isotópico).

Dentre os ácidos fenólicos, foi possível identificar dois derivados do ácido hidroxibenzóico (ácido vanílico e ácido siríngico) e três derivados do ácido hidroxicinâmico (ácido cafeico, ácido *p*-cumarico e ácido ferúlico). No grupo dos flavonóides, duas flavonas foram identificadas (apigenina e luteolina). Em relação aos álcoois fenólicos, foram identificados o hidroxitirosol, o tirosol, bem como um derivado do hidroxitirosol conhecido como acetato de hidroxitirosol. Uma lignana acetoxipinoresinol também foi identificada nas amostras de azeite. No grupo dos secoiridóides foram identificados os seguintes compostos: oleuropeína aglicona e três derivados, hidroxileuropeína aglicona, oleaceína e metil oleuropeína aglicona, ligstrosídeo aglicona e seu derivado oleocantal, e ácido elenólico e seu derivado hidroxilado, ácido hidroxielenólico.

O conteúdo de compostos fenólicos das amostras de EVOO é apresentado na Tabela 8. Os secoiridóides foram os mais abundantes em todas as cultivares, seguidos pelos álcoois fenólicos e flavonoides, respectivamente. No grupo secoiridóides em ambos os anos de colheita, a cv. Koroneiki apresentou o maior conteúdo de oleuropeína aglicona, oleoceína e oleocantal, enquanto que a cv. Coratina apresentou o maior conteúdo de ligstrosídeo aglicona e a cv. Frantoio apresentou a maior concentração de ácido elenólico.

Em relação às quantidades de álcoois fenólicos, a cv. Arbequina apresentou o maior teor de acetato de hidroxitirosol nas duas safras avaliadas. A maior concentração de hidroxitirosol foi observada no azeite da cultivar Frantoio (1,27 mg kg⁻¹), enquanto o maior teor de tirosol foi observado no óleo de Arbequina 2017 (330,58 mg kg⁻¹). Na safra de 2018, as maiores concentrações de hidroxitirosol e

tirosol foram observadas nos óleos das cultivares Koroneiki ($1,89 \text{ mg kg}^{-1}$) e Frantoio ($49,63 \text{ mg kg}^{-1}$), respectivamente.

Em relação aos flavonoides, a cultivar Arbosana apresentou o maior teor de apigenina nos dois anos de colheita. Enquanto, Arbequina teve o maior teor de luteolina em ambas safras. O acetoxipinoresinol também foi encontrado em quantidades consideráveis e sua maior concentração foi observada na cv. Arbosana nos dois anos de colheita.

A cultivar Arbequina apresentou maior teor de ácidos fenólicos em relação as outras cultivares avaliadas na safra de 2017, com exceção do ácido vanílico, onde o maior conteúdo foi observado na cultivar Arbosana. Na safra de 2018, a cultivar Arbequina também apresentou maior conteúdo de ácido ferulico, ácido *p*-coumarico e ácido vanílico. Porém, para os ácidos cafeico e sirínico o maior teor foi observado na cultivar Koroneike.

Com relação à influência do ano de cultivo, observou-se que praticamente todos os compostos fenólicos foram significativamente afetados pelo ano-safra. Azeites da safra de 2018, independente da cultivar, apresentaram o maior conteúdo de ácido cafeico, ácido sirínico e ligstrosídeo aglicona. A influência do ano da colheita nos outros compostos fenólicos foi dependente da cultivar (Tabela 1). Por outro lado, azeites da safra de 2017, independentemente da cultivar, apresentaram os maiores conteúdos de tirosol e acetato de hidroxitirosol. Azeites da cultivar Arbequina apresentaram maior teor de luteolina nos dois anos de colheita, enquanto que azeites Arbosana teve o maior teor de apigenina nos dois anos de colheita.

Tabela 7: Compostos fenólicos presentes em azeites produzidos no sul do Brasil em 2017 e 2018 identificados por LC-MS

Identificação	TR [min]	Formula Molecular [M-H] ⁻	m/z Mensurada	m/z Teórica	Error (ppm)	mSigma
Ácidos fenólicos						
Ácido cafeico	8,5	C ₉ H ₇ O ₄	179,0352	179,0350	-1,2	24,9
Ácido vanílico	8,6	C ₈ H ₇ O ₄	167,0357	167,0350	-4,1	14,2
Ácido <i>p</i> -coumárico	9,3	C ₉ H ₇ O ₃	163,0411	163,0401	-1,2	7,2
Ácido ferúlico	9,7	C ₁₀ H ₉ O ₄	193,0515	193,0506	-4,3	23,2
Ácido sirínico	10,0	C ₉ H ₉ O ₅	197,0450	197,0455	-2,0	19,9
Álcoois Fenólicos						
Tirosol	8,1	C ₈ H ₁₀ O ₂	137,062	137,061	3,8	19,7
Hidroxitirosol acetato	9,9	C ₁₀ H ₁₁ O ₄	195,0663	195,065	5,3	17,1
Hidroxitirosol	11,2	C ₈ H ₉ O ₃	153,056	153,056	-1,9	13,5
Flavonoides						
Luteolina	10,7	C ₁₅ H ₉ O ₆	285,0426	285,0405	-3,3	37,0
Apigenina	11,3	C ₁₅ H ₉ O ₅	269,0468	269,0455	-4,7	23,1
Liginanas						
Acetoxipinoresinol	11,1	C ₂₂ H ₂₃ O ₈	415,1398	415,1379	4,6	46,6
Secoiridoides						
Ácido hidroxí elenólico	8,1	C ₁₁ H ₁₃ O ₇	257,0680	257,0653	5,3	9,5
Hidroxí D-oleuropeína aglicona	10,1	C ₁₇ H ₁₉ O ₇	335,1136	335,1115	1,0	23,1
Ácido elenólico	10,2	C ₁₁ H ₁₃ O ₆	241,0718	241,0705	5,2	24,8
Decarboxi metil oleuropeína aglicona (oleaceína)	10,6	C ₁₇ H ₁₉ O ₆	319,1187	319,1173	4,4	4,8
Decarboxi metil ligstrosídeo aglicona (oleocantal)	11,4	C ₁₇ H ₁₉ O ₅	303,1238	303,1218	1,4	18,8
Oleuropeína aglicona	11,8	C ₁₉ H ₂₁ O ₈	377,1242	377,1223	0,8	16,0
Metil oleuropeína aglicona	11,9	C ₂₀ H ₂₃ O ₈	391,1398	391,1393	2,2	22,0
Ligstrosídeo aglicona	12,5	C ₁₉ H ₂₁ O ₇	361,1293	361,1264	2,3	9,2

TR - tempo de retenção

mSigma - semelhança de perfil isotópico – quanto menor o valor maior a similaridade

Tabela 8: Teor de compostos fenólicos (mg kg⁻¹) de azeite de seis cultivares produzidas no sul do Brasil nas safras de 2017 e 2018

Ácidos fenólicos						
Cultivares	Ácido cafeico*		Ácido ferulico*		Ácido <i>p</i> -cumárico*	
	2017	2018	2017	2018	2017	2018
Arbequina	0,008 ± 0,00 Ba	0,95 ± 0,01 Ab	0,06 ± 0,00 Aa	0,05 ± 0,00 Ba	0,24 ± 0,02 Bb	0,38 ± 0,00 Aa
Arbosana	0,003 ± 0,00 Bc	0,55 ± 0,01 Ad	0,03 ± 0,00 Ab	0,02 ± 0,00 Bc	0,05 ± 0,00 Acd	0,03 ± 0,00 Be
Coratina	0,003 ± 0,00 Bc	0,42 ± 0,00 Af	0,03 ± 0,00 Ab	0,01 ± 0,00 Bd	0,08 ± 0,00 Ac	0,05 ± 0,00 Bd
Frantoio	0,001 ± 0,00 Bd	0,46 ± 0,00 Ae	0,02 ± 0,00 Ac	0,02 ± 0,00 Bc	0,02 ± 0,00 Ad	0,01 ± 0,00 Af
Koroneiki	0,001 ± 0,00 Bd	2,27 ± 0,00 Aa	0,02 ± 0,00 Bc	0,04 ± 0,00 Ab	0,04 ± 0,00 Bd	0,09 ± 0,01 Ac
Picual	0,006 ± 0,00 Bb	0,62 ± 0,02 Ac	0,02 ± 0,00 Ac	0,01 ± 0,00 Bd	0,30± 0,03 Aa	0,32 ± 0,00 Ab
Cultivares	Ácido siríngico*		Ácido vanílico*			
	2017	2018	2017	2018		
Arbequina	0,43 ± 0,03 Ba	0,61 ± 0,04 Ab	0,20 ± 0,02 Bc	0,24 ± 0,00 Aa		
Arbosana	0,06 ± 0,00 Bbc	0,17 ± 0,00 Ae	0,25 ± 0,02 Ab	0,19 ± 0,00 Bc		
Coratina	0,04 ±0,01 Bc	0,37 ±0,04 Ad	0,20 ± 0,01 Ac	0,06 ± 0,00 Be		
Frantoio	0,09 ± 0,00 Bbc	0,14 ±0,00 Ae	0,26 ± 0,02 Ab	0,12 ± 0,00 Bd		
Koroneiki	0,06 ± 0,00 Bbc	0,74 ±0,01 Aa	0,13 ± 0,01 Bd	0,22 ± 0,00 Ab		
Picual	0,10± 0,00 Bb	0,48 ±0,00 Ac	0,31 ± 0,05 Aa	0,19 ± 0,00 Bc		
Álcoois Fenólicos						
Cultivares	Hydroxitirosol*		Tirosol*		Acetato de hidroxitirosol**	
	2017	2018	2017	2018		
Arbequina	0,45 ± 0,02 Bd	1,21 ± 0,03 Ac	330,58 ± 1,15 Aa	44,98 ± 0,61 Bb	23,76 ± 0,60 Aa	4,75 ± 0,31 Ba
Arbosana	0,59 ± 0,01 Ac	0,37 ± 0,00 Be	65,57 ± 0,64 Ad	27,71± 0,01 Be	2,38± 0,02 Ac	0,29 ± 0,02 Bd
Coratina	0,73 ± 0,02 Bb	1,74 ± 0,01 Ab	48,25 ± 1,10 Ae	33,51 ± 0,25 Bd	0,74 ± 0,04 Ad	0,42 ± 0,01 Acd
Frantoio	1,27 ± 0,02 Aa	0,38 ± 0,00 Be	74,62 ± 4,79 Ac	49,63± 1,45 Ba	3,99 ± 0,14 Ab	0,26 ± 0,00 Bd
Koroneiki	0,45 ±0,01 Bd	1,89 ±0,04 Aa	101,28 ± 1,00 Ab	38,50 ± 0,12 Bc	3,53 ± 0,27 Ab	1,62 ± 0,04 Bb
Picual	0,49 ± 0,00 Bd	0,67 ± 0,01 Ad	51,61 ± 0,91 Ae	33,43 ± 0,06 Bd	2,38 ± 0,05 Ac	0,65 ± 0,06 Bc
Flavonoides						
Cultivares	Luteolina*		Apigenina*		Acetoxipinoresinol**	
	2017	2017	2017	2018	2017	2018
Arbequina	2,14 ± 0,05 Ba	2,14 ± 0,05 Ba	1,89 ± 0,09 Bc	2,98 ± 0,03 Ab	0,086 ± 0,00 Bc	0,75 ± 0,03 Ac
Arbosana	1,56 ± 0,15 Ab	1,56 ± 0,15 Ab	6,61 ± 0,54 Aa	5,83 ± 0,04 Ba	0,148 ± 0,01 Ba	1,99 ± 0,02 Aa
Coratina	0,49 ± 0,02 Ae	0,49 ± 0,02 Ae	0,56 ± 0,02 Ad	0,31 ± 0,00 Ae	0,091 ± 0,00 Ac	0,10 ± 0,01 Ae
Frantoio	0,85 ± 0,04 Ad	0,85 ± 0,04 Ad	0,88 ± 0,08 Ad	1,12 ± 0,05 Ad	0,094 ± 0,00 Bbc	1,66 ± 0,12 Ab
Koroneiki	1,39 ± 0,04 Abc	1,39 ± 0,04 Abc	3,64 ± 0,37 Ab	2,41 ± 0,05 Bc	0,105 ± 0,01 Bb	0,27 ± 0,02 Ad
Picual	1,32 ± 0,06 Ac	1,32 ± 0,06 Ac	1,08 ± 0,08 Ad	1,14 ± 0,06 Ad	0,087 ± 0,00 Ac	0,10 ± 0,01 Ae

Resultados expressos em média ± desvio padrão. As médias seguidas na mesma linha por letras maiúsculas diferentes e na mesma coluna por letras minúsculas diferentes são significativamente diferentes pelo teste de LSD de Fisher ($p \leq 0,05$).

Tabela 8 (continuação): Teor de compostos fenólicos (mg kg⁻¹) de azeite de seis cultivares produzidas no sul do Brasil nas safras de 2017 e 2018

Secoiridoides						
Cultivares	Ácido hidroxi elenólico**		Hidroxi D-oleuropeína aglicona**		Ácido elenólico**	
	2017	2018	2017	2018	2017	2018
Arbequina	0,138 ± 0,00 Aa	0,11 ± 0,00 Bd	0,83 ± 0,01 Ba	2,85 ± 0,11 Ab	5,90 ± 0,02 Bc	11,64 ± 0,64 Ab
Arbosana	0,098 ± 0,00 Bb	0,15 ± 0,00 Abc	0,63 ± 0,01 Ab	0,31 ± 0,01 Bde	7,31 ± 0,10 Bb	12,29 ± 0,53 Ab
Coratina	0,089 ± 0,00 Bc	0,21 ± 0,02 Aa	0,26 ± 0,01 Bd	1,51 ± 0,16 Ac	2,11 ± 0,19 Be	4,94 ± 0,02 Ad
Frantoio	0,085 ± 0,00 Bd	0,17 ± 0,01 Ab	0,12 ± 0,00 Af	0,15 ± 0,00 Ae	8,83 ± 0,56 Ba	16,33 ± 0,04 Aa
Koroneiki	0,085 ± 0,00 Bd	0,11 ± 0,00 Ad	0,58 ± 0,01 Bc	4,58 ± 0,06 Aa	6,29 ± 0,19 Bc	12,33 ± 0,01 Ab
Picual	0,085 ± 0,00 Bd	0,13 ± 0,01 Ac	0,21 ± 0,00 Be	0,54 ± 0,06 Ad	3,08 ± 0,03 Bd	6,58 ± 0,80 Ac
Cultivares	Decarboxi metil oleuropeína aglicona**		Decarboxi metil ligstrosídeo aglicona**		Oleuropeína aglicona**	
	2017	2018	2017	2018		
Arbequina	62,51 ± 0,41 B b	68,18 ± 1,63 Ab	1,26 ± 0,02 Bd	3,29 ± 0,13 Ab	17,77 ± 0,12 Be	23,26 ± 0,59 Ac
Arbosana	60,71 ± 0,36 Ab	6,36 ± 0,10 Be	1,71 ± 0,02 Ac	1,55 ± 0,06 Acd	52,32 ± 1,20 Ab	7,65 ± 0,02 Bd
Coratina	29,27 ± 0,53 Ac	17,46 ± 0,79 Bd	3,79 ± 0,22 Ab	1,30 ± 0,04 Bde	54,94 ± 0,91 Bb	65,87 ± 1,01 Aa
Frantoio	17,36 ± 0,70 Ae	4,49 ± 0,10 Be	1,64 ± 0,04 Acd	1,16 ± 0,06 Be	30,56 ± 4,16 Ad	25,99 ± 0,36 Bc
Koroneiki	92,84 ± 1,59 Aa	76,18 ± 0,47 Ba	5,86 ± 0,27 Ba	9,44 ± 0,13 Aa	64,14 ± 0,94 Aa	64,19 ± 0,46 Aa
Picual	25,94 ± 0,54 Bd	30,88 ± 3,32 Ac	1,36 ± 0,04 Bcd	1,72 ± 0,28 Ac	42,15 ± 1,16 Bc	55,85 ± 5,61 Ab
Cultivares	Metil oleuropeína aglicona**		Ligstrosídeo aglicona**			
	2017	2018	2017	2018		
Arbequina	0,36 ± 0,02 Bab	0,44 ± 0,01 Aa	0,75 ± 0,02 Be	1,40 ± 0,17 Af		
Arbosana	0,38 ± 0,01 Aa	0,38 ± 0,01 Ab	5,45 ± 0,32 Bd	7,97 ± 0,10 Ae		
Coratina	0,22 ± 0,01 Ac	0,13 ± 0,00 Be	22,52 ± 0,65 Ba	35,86 ± 0,85 Aa		
Frantoio	0,32 ± 0,03 Bb	0,39 ± 0,01 Ab	7,02 ± 0,12 Bc	15,55 ± 0,12 Ac		
Koroneiki	0,23 ± 0,01 Bc	0,26 ± 0,01 Ac	7,79 ± 0,22 Bc	18,52 ± 0,10 Ab		
Picual	0,22 ± 0,01 Ac	0,20 ± 0,00 Ad	9,18 ± 0,39 Bb	12,72 ± 1,30 Ad		

Resultados expressos em média ± desvio padrão. As médias seguidas na mesma linha por letras maiúsculas diferentes e na mesma coluna por letras minúsculas diferentes são significativamente diferentes pelo teste de LSD de Fisher ($p \leq 0,05$).

* Quantificado com próprio padrão externo

** Quantificado com padrão externo similar

2.5.6 Análise de dados multivariada

Para visualização da influência global da cultivar e do ano de cultivo foi realizada a análise de componentes principais (PCA) levando em consideração todas variáveis dependentes medidas (perfil de ácidos graxos, tocoferóis, clorofilas e carotenoides, Luminosidade, °Hue e compostos fenólicos).

A PCA mostrou claramente a distinção dos azeites cultivados em diferentes anos (Figura 1A). Os dois primeiros componentes principais (PC) explicaram 74% da variação total, onde o PC1 e PC2 explicaram 52,4% e 21,8%, respectivamente. A partir da análise *biplot* (derivada do PCA) foram obtidas as variáveis que mais contribuíram para dispersão dos azeites em função do ano de cultivo (Figura 1 B). Essas variáveis foram identificadas como ácido cafeico, clorofilas, ligstrosídeo aglicona, hidroxi-D-oleuropeína aglicona, ácido siríngico e hidroxitirosol acetato.

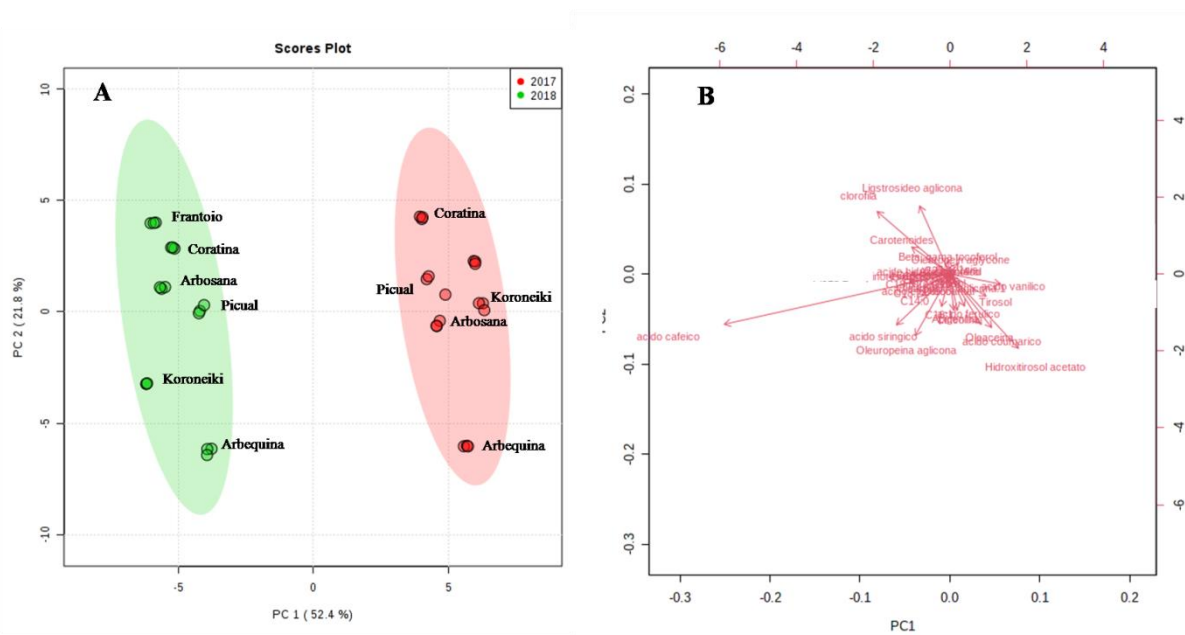


Figura 1: Scores plot (A) e loadings plot (B) derivados da análise de componentes principais (PCA) de azeites de seis cultivares produzidas no sul do Brasil nas safras de 2017 e 2018

Para verificar a influência da cultivar na composição do azeite em cada ano de safra e para determinar quais compostos contribuíram para essa distinção, foram realizadas análises discriminantes por mínimos quadrados

parciais (PLS-DA). O PLS-DA mostrou a separação das cultivares nas duas safras (Figura 2A e 2C). A partir da análise de PLS-DA, baseado na projeção de importância das variáveis (VIP score), foi possível identificar os compostos que influenciaram para separação das cultivares, considerando que quanto maior os valores de VIP score, maior a contribuição na discriminação dos grupos. Pontuações VIP ($> 1,0$) foram usadas para determinar quais compostos mais contribuíram para a separação entre as cultivares (Figura 2B e 2D).

Na safra de 2017, foi observada discriminação entre cultivares. A qualidade do modelo e a validação de desempenho foram avaliadas pelos parâmetros R^2 e Q^2 . O modelo apresentou boa predição e regressão, com $R^2 = 0,99$ e $Q^2 = 0,97$. Clorofilas e ligstrosídeo aglicona contribuíram para a distinção da cultivar Coratina das demais, enquanto o ácido linoléico, ácido siríngico, acetato de hidroxitirosol, hidroxí D-oleuropeína aglicona, tirosol, ácido ferúlico e ácido caféico foram os compostos que mais contribuíram para a distinção da Arbequina. A baixa porcentagem relativa de ácido linoléico e o baixo teor de ácido ferúlico contribuíram para diferenciar azeites da cultivar Picual (Figura 2B). Os azeites da cultivar Arbequina produzidos em 2017 apresentaram os maiores conteúdos de ácido síngico, acetato de hidroxitirosol, hidroxí D-oleuropeína aglicona, tirosol, ácido ferúlico e ácido caféico em comparação com as outras cultivares (Tabela 8).

Semelhante ao observado na safra de 2017, a discriminação entre cultivares também foi confirmada pelo PLS-DA na safra de 2018 (Figura 2C). Os parâmetros de validação do modelo foram R^2 de 0,96 e Q^2 foi de 0,90, sugerindo boa previsibilidade e qualidade de ajuste. Os metabolitos e sua influência (valores $VIP > 1,0$) na separação das cultivares na safra de 2018 são apresentados na Figura 2D.

Ligstrosídeo aglicona e oleuropeína aglicona contribuíram para a discriminação do azeite da cv. Coratina das demais, enquanto a apigenina e o acetoxipinoresinol contribuíram para diferenciar o azeite da cv. Arbosana das demais. A alta porcentagem relativa de ácido linoléico e o alto teor de acetato de hidroxitirosol e ácido ferúlico influenciaram a diferenciação do azeite da cv. Arbequina.

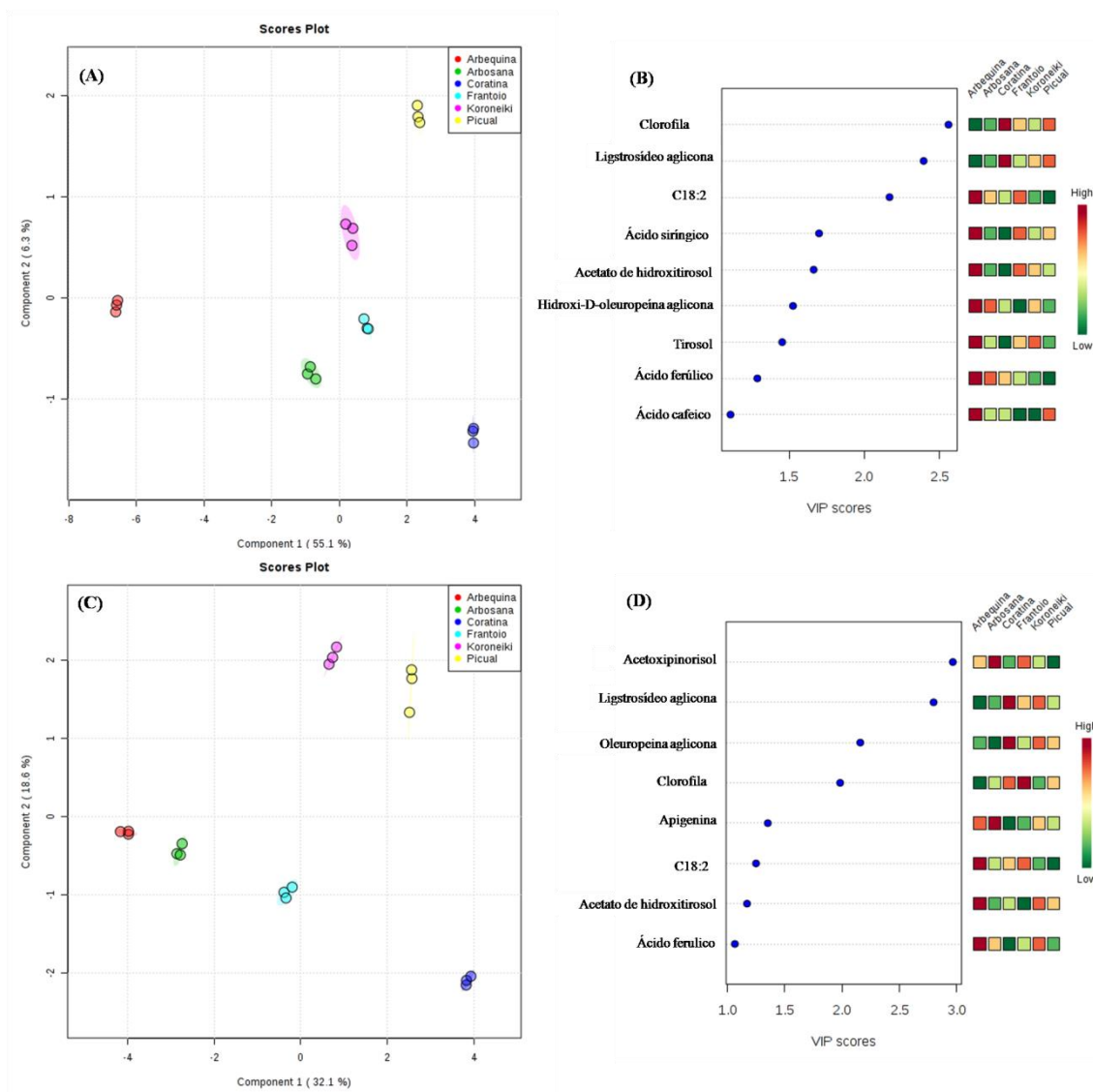


Figura 2: Análise discriminante por quadrados mínimos parciais e projeção de importância das variáveis (VIP scores derivados do PLS-DA) para azeites de seis cultivares produzidos no Sul do Brasil produzidos nas safras de 2017 (A e B) e 2018 (C e D).

2.6. Discussão

O perfil de ácidos graxos é um parâmetro amplamente avaliado em azeites e fornece informações sobre sua qualidade, além de estar relacionados a benefícios à saúde do consumidor. O ácido oleico foi o ácido graxo mais abundante nas amostras de azeites avaliadas, variando de 59% (Arbequina, safra 2018) a 80% (Picual, safra 2017) do teor total de ácidos graxos. Intervalos similares desse ácido graxo em azeites brasileiro foram relatados por Zago et al.(2019). Azeites produzidos na Espanha apresentaram percentuais de ácido oleico de 67,7 a 80,2% para as cultivar Frantoio e Picual, respectivamente (REBOREDO-RODRÍGUES et al., 2014). Já em estudo realizado por Rondanini et al. (2014) foi observado que o percentual de ácido oleico de azeites da cultivar Frantoio produzidos na Argentina, variou de 67 a 70%. Assim, este estudo corrobora com os anteriores e ressalta que a porcentagem relativa dos ácidos graxos varia em função da cultivar e do local de produção.

O ano de colheita também influenciou o perfil de ácidos graxos dos azeites avaliados neste estudo. Entre os fatores ambientais, a temperatura desempenha um papel essencial na composição dos ácidos graxos dos óleos, regulando as dessaturases de ácidos graxos, enzimas responsáveis pela formação das duplas ligações. Com isso, baixas temperaturas aumentam o teor de ácidos graxos poli-insaturados nas plantas, mantendo assim a fluidez das membranas biológicas (HERNÁNDEZ et al., 2011). As temperaturas mais baixas que ocorreram nos meses de outubro, novembro e dezembro de 2017 (Tabela 1) que coincidem com o crescimento das azeitonas acarretaram em azeites com maior teor de ácidos linoleico e linolênico. Essa correlação também foi observada para azeites produzidos na Espanha e Argentina (BORGES et al., 2017a; RONDANINI et al., 2014). Outros fatores que também podem afetar o perfil de ácidos graxos incluem índice de maturação, condições de armazenamento e processamento (ROMERO et al., 2016; RONDANINI et al., 2014).

Neste estudo, as cultivares Arbequina e Frantoio apresentaram o maior teor de ácidos graxos insaturados. A quantidade de ácidos graxos insaturados está diretamente relacionada à estabilidade do óleo e à oxidação lipídica. Óleos com alto teor de ácidos graxos insaturados, particularmente ácidos graxos poli-insaturados, são mais suscetíveis à oxidação (BORGES et al., 2017a). No

entanto, os ácidos graxos insaturados oleico, linoleico e linolênico contribuem para a redução da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e estão associados à prevenção de doenças cardiovasculares (GHANBARI et al., 2012).

Dentre os compostos antioxidantes, tocoferóis são compostos antioxidantes essenciais para a nutrição humana. O teor de tocoferóis (117-325 mg kg⁻¹) encontrado neste estudo foi semelhante ao relatado para azeites produzidos na Espanha e Grécia, nos quais o conteúdo de α -tocoferol variou de 92 a 268 mg kg⁻¹ (BORGES et al., 2017b; DABBOU et al., 2010; LÓPEZ-CORTÉS et al., 2013). Neste estudo, foi observada a influência da cultivar no conteúdo de tocoferóis. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores, que sugerem que o conteúdo de tocoferóis é altamente dependente da cultivar (DABBOU et al., 2010; PARDO; CUESTA; ALVARRUIZ, 2007). Além do fator genético, o teor de tocoferol é influenciado pelas condições climáticas, principalmente temperatura, precipitação e altitude (BORGES et al., 2017b). Ilyasoglu et al. (2010) observaram maiores níveis de tocoferóis em safras com déficit hídrico, entretanto nesse trabalho não observou-se essa relação, pois os maiores teores de tocoferóis foram observados na safra de 2017, a qual apresentou maior precipitação. Da mesma forma, a precipitação não influenciou o teor de tocoferóis em azeites produzidos na Espanha, sugerindo que os efeitos das condições climáticas sobre os tocoferóis parecem ser principalmente dependentes da cultivar (BELTRÁN et al., 2010).

Embora a coloração não seja incluída entre os padrões de qualidade do azeite, ela desempenha um importante papel na percepção e preferências dos consumidores, sendo a cor verde escura associada a azeites com alta qualidade e amarelo pálido a azeites refinados de qualidade inferior (TORRECILLA et al., 2015). Os parâmetros de coloração dos azeites são diretamente influenciados pelo conteúdo de pigmentos (carotenoides e clorofilas).

O teor de clorofila da cultivar Arbequina neste estudo foi menor que o observado para a mesma cultivar produzida em diferentes regiões da Espanha (1,81 a 3,89 mg kg⁻¹)(BORGES et al., 2017a). Azeites produzidos na Tunísia apresentaram teores de carotenoides de 3,02 mg kg⁻¹ e 6,32 mg kg⁻¹ para as cultivares Arbequina e Koroneiki, respectivamente. Valores semelhantes foram observados nesse estudo para os azeites das mesmas cultivares durante a

safrade 2017. No entanto, os azeites dessas cultivares apresentaram valores de 12,8 e 12,7 mg kg⁻¹ na safra de 2018. Assim, foi possível observar que o ano de cultivo influenciou fortemente a concentração desses compostos. A maior concentração na safra de 2018 pode ser devido à menor precipitação durante o desenvolvimento dos frutos de azeitona (dezembro de 2017, janeiro e fevereiro de 2018). Esses resultados estão de acordo com Tekaya et al. (2016), os quais observaram que a irrigação de oliveiras durante o desenvolvimento dos frutos acarreta em uma diminuição de 50% do teor de clorofilas e 30% de carotenoides.

Os compostos fenólicos desempenham importantes funções no azeite de oliva, influenciando principalmente na estabilidade e sabor. Além disso, os compostos fenólicos são frequentemente usados para avaliar sua autenticidade e contribuem para os efeitos benéficos à saúde (MORA-RUIZ et al., 2017; REBOREDO-RODRÍGUEZ et al., 2016, 2018). Dentre os compostos fenólicos, o grupo dos secoiridoides se destacou nas amostras de azeites avaliadas no presente estudo. Em geral, o azeite brasileiro apresentou maior teor de secoiridoide quando comparado ao azeite produzido em diferentes países, como Espanha e Itália. Por exemplo, azeite da cultivar Arbequina do sul da Catalunha apresentou 9,3 mg kg⁻¹, 3,1 mg kg⁻¹, 0,39 mg kg⁻¹, 1,3 mg kg⁻¹ de ácido elenólico, oleuropeína aglicona, ligstrosídeo aglicona e oleocantal, respectivamente (BAKHOUCHE et al., 2013). No presente estudo, na safra de 2018 azeite da cv. Arbequina apresentou 11,6 mg kg⁻¹, 23,2 mg kg⁻¹, 1,4 mg kg⁻¹, 11,6 mg kg⁻¹ de ácido elenólico, oleuropeína aglicona, ligstrosídeo aglicona e oleocantal, respectivamente. Da mesma forma, azeites da cultivar Frantoio apresentaram maior teor de ligstrosídeo aglicona que a mesma cultivar produzida na Itália, onde foi observado 4,9 mg kg⁻¹ para azeites extraídos por campo elétrico pulsado, considerado uma inovação tecnológica na extração de azeite de oliva (VENEZIANI et al., 2018).

Hidroxitirosol e tirosol, bem como um derivado de hidroxitirosol conhecido como acetato de hidroxitirosol são considerados os antioxidantes mais potentes presente no azeite (WANI et al., 2018). Esses compostos foram observados em altas concentrações em todas as cultivares avaliadas neste estudo em comparação aos azeites produzidos em outras regiões. Por exemplo, na Tunísia, azeite da cv. Koroneiki teve 0,62 mg kg⁻¹ e 14,61 mg kg⁻¹

de acetato de hidroxitirosol e tirosol, respectivamente (ALLALOUT et al., 2009). Já azeites da cv. Arbequina da Espanha e Chile apresentaram 1,46 mg kg⁻¹ e 2,34 mg kg⁻¹ de tirosol, respectivamente (GARCÍA-VILLALBA et al., 2010). As altas concentrações de hidroxitirosol e tirosol presentes nos azeites brasileiros têm potencial para serem usadas como marcadores regionais.

Em relação aos flavonóides, a cultivar Arbosana apresentou maior conteúdo de apigenina enquanto que Arbequina de luteolina. Os teores de apigenina e luteolina encontrados nesse trabalho são superiores aos observados para cultivar Arbosana produzida no Chile, os quais os valores foram de 1,76 e 1,94 mg kg⁻¹ para os compostos apigenina e luteolina, respectivamente (ROMERO et al., 2016). Azeites da cultivar Arbequina produzidos na Espanha apresentam teores de apigenina de 0,36 mg kg⁻¹ e de luteolina de 1,38 mg kg⁻¹, valores inferiores aos reportados nesse estudo. Dessa forma, azeites produzidos no Brasil se destacam pela elevada concentração de flavonóides.

O conteúdo de ácidos fenólicos observados nesse estudo é superior ao reportado por Borges et al. (2017b), que observaram uma variação de 0,01 a 0,05 mg kg⁻¹ para o ácido *p*-cumárico e 0,07 a 0,1 mg kg⁻¹ para ácido vanílico em azeites da cultivar Arbequina produzidas em diferentes regiões da Espanha. Valores de ácido *p*-coumarico e ácido vanílico semelhantes aos relatados nesse estudo foram previamente relatados para o azeite brasileiro (ZAGO et al., 2019). Portanto, com base no que se sabe até hoje sobre azeites brasileiros, pode-se inferir que eles se destacam por sua composição fenólica. Os ácidos fenólicos, principalmente os derivados do ácido hidroxibenzóico foram utilizados como marcadores de azeites produzidos na Tunízia (MOHAMED et al., 2018).

Os compostos fenólicos são influenciados principalmente pela cultivar, condições climáticas, estágio de maturação dos frutos e tecnologia utilizada no processamento (GHANBARI et al., 2012). Romero et al. (2016) ao avaliarem a influência da cultivar, estágio de maturação e origem geográfica sobre o teor de compostos fenólicos de azeites chilenos, observaram que a origem geográfica (clima) influenciou fortemente na concentração dos compostos. Em contrapartida, a grande variabilidade dos compostos fenólicos em azeites

produzidos na bacia do Mediterrâneo é explicada principalmente pela cultivar e não pela procedência geográfica (SERVILI et al., 2013).

Diversos estudos demonstram que o ano de cultivo tem influência sobre a composição fenólica de azeites, sendo que o conteúdo de fenóis diminui progressivamente à medida que aumenta a quantidade de água durante o período de produção das azeitonas (BAJOUB et al., 2014; FUENTES et al., 2018; TEKAYA et al., 2016). De fato, neste estudo, foram observados maiores teores de ácido cafeico, ácidos siríngico e ligstrosídeo aglicona nos azeites da safra de 2018, que apresentaram menor precipitação em comparação com a safra anterior. Esse fato pode ser explicado por dois fatores: o primeiro é que o maior conteúdo de água nas azeitonas diminui a concentração de compostos fenólicos no azeite, pois esses compostos apresentam maior afinidade com a água em relação ao óleo. O segundo fator é que o déficit hídrico influencia significativamente a atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL), que é uma enzima chave na via biossintética dos compostos fenólicos e está diretamente envolvida no acúmulo de polifenóis. Portanto, o déficit hídrico induz a atividade da enzima PAL nos frutos de azeitona e, conseqüentemente, ocasiona um aumento no teor de fenóis no azeite (BAJOUB et al., 2014).

A análise multivariada atualmente, é considerada uma das ferramentas mais utilizadas no setor de azeite de oliva, podendo ser implementada ao longo das diferentes etapas de produção, com intuito de avaliar a qualidade da matéria-prima e do produto final, monitorando o processo (GÓMEZ-CARAVACA; MAGGIO; CERRETANI, 2016). Além disso, é amplamente aplicada para identificação de adulterações (KALOGIOURI et al., 2016) e discriminação de origem geográfica (KARABAGIAS et al., 2017). Nesse estudo, a análise de componentes principais (PCA) mostrou claramente a distinção dos azeites cultivados em diferentes anos. Sendo o ácido cafeico, clorofilas, ligstrosídeo aglicona, hidroxí-D-oleuropeína aglicona, ácido siríngico e acetato de hidroxitirosol, as variáveis que mais contribuíram para essa separação. A análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) permitiu a diferenciação entre cultivares. Em ambas as safras, os teores de clorofila e ligstrosídeo aglicona contribuíram para a separação dos azeites Coratina dos demais. O ácido linolênico, o acetato de hidroxitirosol e o ácido ferúlico foram

os compostos que mais contribuíram para a separação da cultivar Arbequina das demais.

O elevado conteúdo de ácido cafeico na safra de 2018 foi o principal fator para separação dos azeites em função da safra. O ácido cafeico é considerado o antioxidante mais potente dentre os derivados do ácido hidroxicinâmico e contribui significativamente para estabilidade do azeite. O ácido cafeico nos tecidos vegetais atua inibindo a oxidação lipídica, através da remoção dos radicais livres (SUN-WATERHOUSE et al., 2011). Além disso, é relevante para a saúde humana, contribui para aumento da produção de colágeno, previne o envelhecimento precoce e possui ações anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral (MAGNANI et al., 2014).

Clorofilas também contribuíram para a separação dos azeites de acordo com o ano de colheita. As clorofilas apresentam ação anticarcinogênica, devido ao seu potencial antioxidante. Entretanto, em presença de luz as clorofilas atuam como pró-oxidantes, assim, seu elevado conteúdo no azeite, juntamente com condições inadequadas de armazenamento, podem afetar sua vida de prateleira (BENGANA et al., 2013).

Da mesma forma, o elevado teor de ácido siríngico nos azeites da safra de 2018 contribuiu para a separação dos azeites em função da safra. Além disso, o ácido siríngico também contribuiu para dispersão das cultivares na safra de 2017. O ácido siríngico tem sido associado com a qualidade sensorial e cor dos azeites. Esse metabólito é reconhecido como um agente terapêutico contra várias doenças devido às suas propriedades antioxidantes, antimicrobiana, anti-inflamatória, anticâncer e antidiabética, (diabetes, câncer e isquemia cerebral)(SRINIVASULU et al., 2018).

Hidroxi-D-oleuropeína aglicona e ligstrosídeo aglicona contribuíram para a separação dos azeites de acordo com o ano da colheita devido a sua maior concentração nos azeites de 2018. No entanto, oligstrosídeo aglicona também contribuiu para a separação de azeites da cv. Coratina dos demais nos dois anos de colheita. Hidroxi-D-oleuropeína aglicona e ligstrosídeo aglicona pertencem à classe dos secoiridoides e são formadas pela hidrólise endógena da β -glucosidas e durante as fases de esmagamento e malaxação da extração do azeite. Esses compostos influenciam fortemente o sabor do azeite, sendo responsáveis pelas notas sensoriais amargas e pungentes, características

desejáveis para o azeite de alta qualidade. Além disso, eles possuem uma ampla gama de propriedades farmacológicas, incluindo atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticâncer (ALAGNA et al., 2016).

O acetato de hidroxitirosol contribuiu para a separação dos azeites em função da safra, bem como contribuiu para a separação de cv. Arbequina nos dois anos de colheita. O acetato de hidroxitirosol é um derivado do hidroxitirosol, e estudos recentes demonstraram efeitos protetores contra danos oxidativos no DNA e estresse oxidativo em humanos. Além disso, esse composto possui efeitos anti-inflamatórios, cardioprotetores e neuroprotetores (SÁNCHEZ-FIDALGO et al., 2015).

O ácido linoléico (C18:2) contribuiu para a separação da cultivar Arbequina das demais em ambas safras. A composição de ácidos graxos pode ser afetada pelas condições edafoclimáticas e variedade. De acordo com Rondanini et al. (2014), com base em uma avaliação do banco mundial de germoplasma de azeitona, o genótipo é o principal fator responsável pela variabilidade dos ácidos graxos.

O ácido ferúlico contribuiu para dispersão das cultivares nas duas safras avaliadas. Esse composto desempenha importantes funções na rigidez da parede celular, além de ser precursor de outros compostos orgânicos, como ácido sinápico, o ácido diferúlico e a curcumina. O ácido ferúlico exibe ampla variedade de atividades biológicas, dentre elas: ação antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antialérgica, anticarcinogênica e antitrombótica. Atuando ainda na quelação de metais, modulação da atividade enzimática, ativação de fatores transcricionais e transdução de sinal (KUMAR; PRUTHI, 2014).

2.7. Considerações finais

Com base nos resultados de acidez, índice de peróxido, coeficiente de extinção e perfil de ácidos graxos pode-se classificar os azeites avaliados em extra virgem. Além disso, os azeites extra virgem monovarietais produzidos no Sul do Brasil apresentaram elevada concentração de secoiridóides, álcoois fenólicos, flavonoides e ácidos fenólicos.

A composição química foi influenciada tanto pelo ano de colheita bem como pela cultivar e sua interação. Ácido cafeico, clorofilas, ligstrosídeo aglicona, hidrox-D-oleuropeína aglicona, ácido siríngico e acetato de hidroxitirosol foram os compostos com maior variação devido ao ano de colheita. Os teores de clorofila e ligstrosídeo aglicona também foram as principais variáveis para a diferenciação dos azeites Coratina das demais cultivares, independentemente do ano de colheita. Da mesma forma, o alto teor de acetato de hidroxitirosol e ácido ferulico na cultivar Arbequina foram os responsáveis pela distinção dessa cultivar das demais. Assim, esses resultados contribuem para que os produtores possam fortalecer a identidade dos azeites produzidos no Sul do Brasil e posicioná-los no mercado com atributos diferenciados.

2.8 Referências Bibliográficas

AOCS. American OilChemists Society. Official and tentative methods of the American Oils Chemists Society, **Champaign**, Illinois, 1992.

ALAGNA, F. et al. Identification and characterization of the iridoid synthase involved in oleuropein biosynthesis in olive (*Olea europaea*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 11, p. 5542–5554, 2016.

ALARCÓN DE LA LASTRA, C.; MOTILVA, V.; HERRERÍAS, J. Mediterranean diet and health: biological importance of olive oil. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, p. 933–950, 2001.

ALLALOUT, A. et al. Characterization of virgin olive oil from Super Intensive Spanish and Greek varieties grown in northern Tunisia. **Scientia Horticulturae**, v. 120, n. 1, p. 77–83, 2009.

ALVES, F. C. G. B. S. et al. Evaluation of olive oils from the mediterranean region by UV– Vis spectroscopy and independent component analysis. **Food Chemistry**, v. 273, p. 124–129, 2018.

AMMAR, S. et al. LC-DAD/ESI-MS/MS characterization of phenolic constituents in Tunisian extra-virgin olive oils: Effect of olive leaves addition on chemical composition. **Food Research International**, v. 100, p. 477–485, 2017.

BAJOUB, A. et al. Contribution to the establishment of a protected designation of origin for Meknès virgin olive oil : A 4-years study of its typicality. **Food Research International**, v. 66, p. 332–343, 2014.

BAJOUB, A. et al. First comprehensive characterization of volatile profile of north Moroccan olive oils: A geographic discriminant approach. **Food Research International**, v. 76, p. 410–417, 2015a.

BAJOUB, A. et al. Potential of LC-MS phenolic profiling combined with multivariate analysis as an approach for the determination of the geographical origin of north Moroccan virgin olive oils. **Food Chemistry**, v. 166, p. 292–300, 2015b.

BAJOUB, A. et al. Evaluating the potential of phenolic profiles as discriminant features among extra virgin olive oils from Moroccan controlled designations of origin. **Food Research International**, v. 84, p. 41–51, 2016.

BAKHOUCHE, A. et al. Phenolic characterization and geographical classification of commercial Arbequina extra-virgin olive oils produced in southern Catalonia. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 401–408, 2013.

BALLUS, C. A. et al. A quantitative study on the phenolic compound, tocopherol and fatty acid contents of monovarietal virgin olive oils produced in the southeast region of Brazil. **Food Research International**, v. 62, p. 74–83, 2014.

BALLUS, C. A. et al. Profile of phenolic compounds of Brazilian virgin olive oils by rapid resolution liquid chromatography coupled to electrospray ionisation time-of-flight mass spectrometry (RRLC-ESI-TOF-MS). **Food Chemistry**, v. 170, p. 366–377, 2015.

BECERRA-HERRERA, M. et al. Determination of phenolic compounds in olive oil: New method based on liquid-liquid micro extraction and ultra high performance liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 49–57, 2014.

BELTRÁN, G. et al. Variability of vitamin E in virgin olive oil by agronomical and genetic factors. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 6, p. 633–639, 2010.

BEN MANSOUR, A. et al. Phenolic and volatile compounds of Neb Jmel olive oil cultivar according to their geographical origin using chemometrics. **European Food Research and Technology**, v. 243, n. 3, p. 403–418, 2017.

BENGANA, M. et al. Influence of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of Chemlal extra-virgin olive oil. **Food Research International**, v. 54, n. 2, p. 1868–1875, 2013.

BERVILLÉ, A. J.; BRETON, C. M. Genetic and environmental features for oil composition in olive varieties. **Oil Seed and Fats Crops and Lipids**, v. 21, n. 5, p. D504, 2014.

BORGES, T. H. et al. Characterization of Arbequina virgin olive oils produced in different regions of Brazil and Spain: Physicochemical properties, oxidative stability and fatty acid profile. **Food Chemistry**, v. 215, p. 454–462, 2017a.

BORGES, T. H. et al. Comparative analysis of minor bioactive constituents (CoQ10, tocopherols and phenolic compounds) in Arbequina extra virgin olive oils from Brazil and Spain. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 63, p. 47–54, 2017b.

BRUSCATTO, M. H. et al. Chemical characterization and oxidative stability of olive oils extracted from olive trees of Southern Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 12, p. 1231–1240, 2017.

C. YILMAZ, V. G. Chlorophyll. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 1–5, 2016.

CAYUELA, J. A.; GARCÍA, J. F. Sorting olive oil based on alpha-tocopherol and total tocopherol content using near-infra-red spectroscopy (NIRS) analysis. **Journal of Food Engineering**, v. 202, p. 79–88, 2017.

CERRETANI, L. et al. Pigment profile and chromatic parameters of monovarietal virgin olive oils from different Italian cultivars. **European Food Research and Technology**, v. 226, n. 6, p. 1251–1258, 2008.

CONCEPCION, M. R. et al. A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. **Progress in Lipid**

Research, v. 70, n. April, p. 62–93, 2018.

COVAS, M. I. Bioactive effects of olive oil phenolic compounds in humans: Reduction of heart disease factors and oxidative damage.

Inflammopharmacology, v. 16, n. 5, p. 216–218, 2008.

CRIADO, M. N. et al. Pigment profile and colour of monovarietal virgin olive oils from Arbequina cultivar obtained during two consecutive crop seasons. **Food Chemistry**, v. 110, n. 4, p. 873–880, 2008.

CUNHA, S. C.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Discrimination of vegetable oils by triacylglycerols evaluation of profile using HPLC/ELSD. **Food Chemistry**, v. 95, n. 3, p. 518–524, 2006.

D'AMATO, R. et al. Biofortification (Se): Does it increase the content of phenolic compounds in virgin olive oil (VOO)? **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–13, 2017.

DABBOU, S. et al. Extra virgin olive oil components and oxidative stability from olives grown in Tunisia. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 10, p. 1199–1209, 2010.

DAIS, P.; HATZAKIS, E. Quality assessment and authentication of virgin olive oil by NMR spectroscopy: A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 765, p. 1–27, 2013.

FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J. et al. Extraction of interesting organic compounds from olive oil waste. **Grasas y Aceites**, v. 57, n. 1, p. 95–106, 2006.

FERREIRO-GONZÁLEZ, M. et al. Authentication of virgin olive oil by a novel curve resolution approach combined with visible spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 220, p. 331–336, 2017.

FRANCO, M. N. et al. Phenolic compounds and antioxidant capacity of virgin olive oil. **Food Chemistry**, v. 163, p. 289–298, 2014.

FUENTES, E. et al. Effect of the composition of extra virgin olive oils on the differentiation and antioxidant capacities of twelve monovarietals. **Food Chemistry**, v. 243, p. 285–294, 2018.

GARCÍA-GONZÁLEZ, D. L.; ROMERO, N.; APARICIO, R. Comparative study of virgin olive oil quality from single varieties cultivated in Chile and Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 24, p. 12899–12905, 2010.

GARCÍA-VILLALBA, R. et al. Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 2, p. 416–429, 2010.

GHANBARI, R. et al. Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.)-a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 3, p. 3291–3340, 2012.

GIL-SOLSONA, R. et al. Metabolomic approach for Extra virgin olive oil origin discrimination making use of ultra-high performance liquid chromatography – Quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Food Control**, v. 70, p. 350–359, 2016.

GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; MAGGIO, R. M.; CERRETANI, L. Chemometric applications to assess quality and critical parameters of virgin and extra-virgin olive oil. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 913, p. 1–21, 2016.

HERNÁNDEZ, M. L. et al. Effect of different environmental stresses on the expression of oleate desaturase genes and fatty acid composition in olive fruit. **Phytochemistry**, v. 72, n. 2–3, p. 178–187, 2011.

ILYASOGLU, H.; , BERAAT OZCELIK, V. V. H.; VERHE, R. Characterization of Aegean Olive Oils by Their Minor Compounds. **J Am Oil Chem Soc (2010)**, v. 87, p. 627–636, 2010.

KALOGIOURI, N. P. et al. Olive oil authenticity studies by target and nontarget LC–QTOF-MS combined with advanced chemometric techniques. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 28, p. 7955–7970, 2016.

KANG, Y. et al. Synthesis , characterization , and functional properties of chlorophylls ,. **Food Chemistry**, v. 245, n. October 2017, p. 943–950, 2018.

KAPELLAKIS, I. E.; TSAGARAKIS, K. P.; CROWTHER, J. C. Olive oil history, production and by-product management. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 1–26, 2008.

KARABAGIAS, I. et al. Classification of Western Greek virgin olive oils according to geographical origin based on chromatographic, spectroscopic, conventional and chemometric analyses. **Food Research International**, v. 54, n. 2, p. 1950–1958, 2017.

LANFER-MARQUEZ, U. M.; BARROS, R. M. C.; SINNECKER, P. Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. **Food Research International**, v. 38, n. 8-9, p. 885–891, 2005.

LERMA-GARCÍA, M. J. et al. Classification of extra virgin olive oils according to their geographical origin using phenolic compound profiles obtained by capillary electrochromatography. **Food Research International**, v. 42, n. 10, p. 1446–1452, 2009.

LERMA-GARCÍA, M. J. et al. Use of triacylglycerol profiles established by high performance liquid chromatography with ultraviolet-visible detection to predict the botanical origin of vegetable oils. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 42, p. 7521–7527, 2011.

LONGOBARDI, F. et al. Classification of olive oils according to geographical origin by using ¹H NMR fingerprinting combined with multivariate analysis. **Food Chemistry**, v. 130, n. 1, p. 177–183, 2012.

LÓPEZ-CORTÉS, I. et al. Chemical characterization of traditional varietal olive

oils in East of Spain. **Food Research International**, v. 54, n. 2, p. 1934–1940, 2013.

LUYKX, D. M. A. M.; VAN RUTH, S. M. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 897–911, 2008.

MAGNANI, C. et al. Caffeic acid: a review of its potential use in medications and cosmetics. **Analytical Methods**, v. 6, n. 10, p. 3203–3210, 2014.

MELUCCI, D. et al. Rapid direct analysis to discriminate geographic origin of extra virgin olive oils by flash gas chromatography electronic nose and chemometrics. **Food Chemistry**, v. 204, p. 263–273, 2016.

MEZA-MIRANDA, E. R. et al. Virgin olive oil rich in phenolic compounds modulates the expression of atherosclerosis-related genes in vascular endothelium. **European Journal of Nutrition**, v. 55, n. 2, p. 519–527, 2016.

MOHAMED, M. BEN et al. Discrimination of Tunisian and Italian extra-virgin olive oils according to their phenolic and sterolic fingerprints. **Food Research International**, v. 106, p. 920–927, 2018.

MONTEALEGRE, C.; ALEGRE, M. L. M.; GARCÍA-RUIZ, C. Traceability markers to the botanical origin in olive oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 28–38, 2010.

MORA-RUIZ, M. E. et al. Assessment of polar phenolic compounds of virgin olive oil by NIR and mid-IR spectroscopy and their impact on quality. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 119, n. 1, p. 1–7, 2017.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1–2, p. 95–111, 2004.

OPINION, S. Scientific opinion on dietary reference values for vitamin E as α -tocopherol. **European Food Safety Authority Journal**, v. 13, n. 7, p. 4149, 2015.

OWEN, R. W. et al. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. **The Lancet. Oncology**, v. 1, p. 107–12, 2000.

PARDO, J. E.; CUESTA, M. A.; ALVARRUIZ, A. Evaluation of potential and real quality of virgin olive oil from the designation of origin “Aceite Campo de Montiel” (Ciudad Real, Spain). **Food Chemistry**, v. 100, p. 977–984, 2007.

PERES, F. et al. Phenolic compounds of ‘Galega Vulgar’ and ‘Cobrançosa’ olive oils along early ripening stages. **Food Chemistry**, v. 211, p. 51–58, 2016.

PETRAKIS, C. Processing and Application. In *Olive Oil* (pp. 191–223). AOCS Press. 2006.

PINTO, P. L. **O Olival em Portugal Dinâmicas, tecnologias e relação com o desenvolvimento rural**; Animar—Associação Portuguesa para o

Desenvolvimento Local: Lisboa, Portugal, 2014.

PIRAVI-VANAK, Z. et al. Evaluation of authenticity of Iranian Olive oil by fatty acid and triacylglycerol profiles. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, n. 9, p. 827–833, 2009.

PORTARENA, S.; BALDACCHINI, C.; BRUGNOLI, E. Geographical discrimination of extra-virgin olive oils from the Italian coasts by combining stable isotope and carotenoid contents within a multivariate analysis. **Food Chemistry**, v. 215, p. 1–6, 2017.

QUIRANTES-PINÉ, R. et al. Técnicas de análisis del aceite de oliva. **El aceite de oliva virgen: tesoro de Andalucía**, Servicio de Publicaciones de la Fundación Unicaja. Málaga, España, p. 247-286, 2009.

RALLO, L. et al. Quality of olives: A focus on agricultural preharvest factors. **Scientia Horticulturae**, v. 233, p. 491–509, 2018.

REBOREDO-RODRÍGUEZ, P. et al. Quality of extra virgin olive oils produced in an emerging olive growing area in north-western Spain. **Food Chemistry**, v. 164, p. 418–426, 2014.

REBOREDO-RODRÍGUEZ, P. et al. Characterization of virgin olive oils produced with autochthonous Galician varieties. **Food Chemistry**, v. 212, p. 162–171, 2016.

REBOREDO-RODRÍGUEZ, P. et al. Genotypic and phenotypic identification of olive cultivars from north-western Spain and characterization of their extra virgin olive oils in terms of fatty acid composition and minor compounds. **Scientia Horticulturae**, v. 232, p. 269–279, 2018.

ROMERO, N. et al. Influence of agroclimatic parameters on phenolic and volatile compounds of Chilean virgin olive oils and characterization based on geographical origin, cultivar and ripening stage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 2, p. 583–592, 2016.

RONDANINI, D. P. et al. Contrasting patterns of fatty acid composition and oil accumulation during fruit growth in several olive varieties and locations in a non-Mediterranean region. **European Journal of Agronomy**, v. 52, p. 237–246, 2014.

SÁNCHEZ-FIDALGO, S. et al. Effects of dietary virgin olive oil polyphenols : hydroxytyrosyl acetate and 3 , 4-dihydroxyphenylglycol on DSS-induced acute colitis in mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 5, p. 513–520, 2015.

SEGURA-CARRETERO, A. et al. Analytical determination of polyphenols in olive oil. **Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention**, p. 509–523, 2010.

SERVILI, M. et al. Biological activities of phenolic compounds of extra virgin olive oil. **Antioxidants**, v. 3, n. 1, p. 1–23, 2013.

SINELLI, N. et al. Application of near (NIR) infrared and mid (MIR) infrared spectroscopy as a rapid tool to classify extra virgin olive oil on the basis of fruity attribute intensity. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 369–375, 2010.

SRINIVASULU, C. et al. Syringic acid (SA) – A review of its occurrence, biosynthesis, pharmacological and industrial importance. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 108, p. 547–557, 2018.

SUN-WATERHOUSE, D. et al. Stability of encapsulated olive oil in the presence of caffeic acid. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1049–1056, 2011.

SUN, T. et al. Carotenoid metabolism in plants: the role of plastids. **Molecular Plant**, v. 11, n. 1, p. 58–74, 2018.

TAAMALLI, A. et al. Determination of apolar and minor polar compounds and other chemical parameters for the discrimination of six different varieties of Tunisian extra-virgin olive oil cultivated in their traditional growing area. **European Food Research and Technology**, v. 231, n. 6, p. 965–975, 2010.

TEKAYA, M. et al. Changes in key photosynthetic parameters of olive trees following soil tillage and wastewater irrigation, modified olive oil quality. **Agricultural Water Management**, v. 178, n. 89, p. 180–188, 2016.

TORRECILLA, J. S. et al. Talanta Spectroscopic determination of the photodegradation of monovarietal extra virgin olive oils and their binary mixtures through intelligent systems. **Talanta**, v. 144, p. 363–368, 2015.

TRABER, M. G.; STEVENS, J. F. Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 5, p. 1000–1013, 2011.

VENEZIANI, G. et al. Characterization of phenolic and volatile composition of extra virgin olive oil extracted from six Italian cultivars using a cooling treatment of olive paste. **LWT - Food Science and Technology**, v. 87, p. 523–528, 2018.

VILLEGAS, L. et al. A rapid and simple method for the analysis of bioactive compounds in olive oil refining by-products by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometry detection. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 69, p. 107–114, 2018.

WANI, T. A. et al. Olive oil and its principal bioactive compound: Hydroxytyrosol – A review of the recent literature. **Trends in Food Science & Technology**, v. 5, p. 1–13, 2018.

WREGE, M. S. et al. Distribuição potencial de oliveiras no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 3, p. 656–666, 2015.

ZAGO, L. et al. Chemical and sensory characterization of Brazilian virgin olive oils. **Food Research International**, v. 126, n. July, p. 108588, 2019.

3. Capítulo II: Identificação e caracterização de proteínas quinases dependentes de cálcio em morango (*Fragaria × ananassa*)

3.1 Introdução

As plantas adquiriram ao longo da evolução complexos mecanismos para se adaptar as condições adversas do ambiente em que se desenvolvem. Estes mecanismos iniciam com a percepção do estímulo, seguindo pela transdução do sinal até a regulação da expressão gênica, bem como a regulação bioquímico-fisiológica do processo (ZHU, J., 2017). Um dos responsáveis pela sinalização frente estresses abióticos é o hormônio ácido abscísico (ABA), atuando no fechamento estomático, bem como na indução da via metabólica de fenilpropanóides e no acúmulo de compostos antioxidantes (CHEN, J. *et al.*, 2016). O ABA também está envolvido na regulação do amadurecimento de frutos não-climatéricos (CHEN, J. *et al.*, 2014).

Apesar dos avanços obtidos até o momento, a relação entre níveis elevados de ABA na planta e o acúmulo de compostos antioxidantes, durante o amadurecimento e em resposta a estresses, ainda é pouco conhecida. Sabe-se que o cálcio (Ca^{2+}), é um importante mensageiro secundário, o qual desempenha funções centrais na regulação de diferentes mecanismos fisiológicos nas plantas. Para conferir especificidade para o estímulo de sinalização de Ca^{2+} , existem proteínas específicas que atuam como sensores, permitindo que os sinais de Ca^{2+} sejam decodificados e as respostas transmitidas. As proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs) e as calmodulinas (CAMs) são as principais proteínas com essa atuação (ASANO *et al.*, 2012b).

As CDPKs são formadas por cinco domínios: um domínio N-terminal variável que tem sido sugerido como determinante da localização celular da proteína; um domínio quinase serina/treonina, responsável pela fosforilação de proteínas alvo; um pequeno domínio C-terminal; um domínio autoregulatório/autoinibitório; e um domínio regulatório do tipo *calmodulin-like* (CaM-LD) (GAO; COX; HE, 2014).

As CDPKs vêm sendo relatadas como fatores essenciais na tolerância a estresses bióticos e abióticos regulando positivamente ou negativamente a sinalização de ABA e reduzindo o acúmulo de espécies reativas de oxigênio

(ASANO *et al.*, 2012b). As CDPKs são codificadas por famílias multigênicas e até o momento, 31 genes de CDPKs foram identificados em arroz (*Oryza sativa*) (ASANO *et al.*, 2005; HRABAK *et al.*, 2003), 34 genes em *Arabidopsis thaliana* (CHENG, S. *et al.*, 2002), 30 genes em *Populus trichocarpa* (ZUO *et al.*, 2013), 29 genes em tomate (*Solanumly copersicum*) (WANG, J. P. *et al.*, 2016) e 25 genes em canola (*Brassica napus*) (ZHANG, H. *et al.*, 2014), entre outras.

Em *Fragaria* × *ananassa* até o momento, apenas duas sequências gênicas que codificam para CDPKs foram identificadas, permanecendo incerto nesta espécie o papel dessas enzimas na sinalização de estresses, bem como no amadurecimento de frutos. Algumas técnicas podem contribuir para identificação e caracterização da funcionalidade de diferentes CDPKs, como sequenciamento e expressão de mRNA, além de diversas ferramentas de bioinformática disponíveis atualmente (LUDWIG *et al.*, 2018). Assim, este estudo teve como objetivo identificar sequências gênicas codificadoras de CDPKs em morango (*Fragaria* × *ananassa*) e caracterizar sua expressão transcricional durante o processo de maturação e em condições de estresses abióticos.

3.2. Objetivos

3.2.1 Objetivo Geral

Identificar sequências codificadoras de CDPKs em morango (*Fragaria × ananassa*) e caracterizar sua expressão transcricional durante o processo de maturação e frente a estresses abióticos.

3.2.2 Objetivos Específicos

- Identificar as *FaCDPKs* por pesquisas em banco de dados e pela busca em bancos de mRNAseq *in house*.
- Produzir informações detalhadas sobre os genes como árvores filogenéticas, estruturas genômicas e relações evolutivas.
- Avaliar a expressão das *FaCDPKs* em diferentes tecidos e estádios de desenvolvimento dos frutos.
- Avaliar a expressão das *FaCDPKs* em morangos submetidos a estresse hídrico e salino.
- Avaliar a expressão das *FaCDPKs* em morangos tratados com ABA e ácido nordihidroguaiarético (inibidor da síntese de ABA).

3.3 Revisão da literatura

3.3.1 Morango

O morango (*Fragaria x ananassa*) é um pseudofruto de clima temperado altamente apreciado e consumido principalmente em função das suas características sensoriais, como: coloração, sabor e aroma. Embora se trate de um pseudofruto, doravante é denominado de fruto, pela popularização desta expressão (SCHAART *et al.*, 2013).

Pertencendo à família das Rosaceae e gênero *Fragaria*, o morango é considerado fonte de compostos derivados de fenilpropanoides, com destaque para flavonoides, taninos hidrolisáveis e ácidos fenólicos. Na classe dos flavonóides, as antocianinas representam o grupo de pigmentos mais importante nesta cultura, cuja presença auxilia na avaliação da maturidade do fruto. Todos esses compostos variam conforme fatores edafoclimáticos e genotípicos (PINELI *et al.*, 2011). Também estão presentes na composição deste fruto minerais (potássio, cálcio, magnésio, ferro, cobre, manganês, zinco e cobre) e vitamina C (GIAMPIERI *et al.*, 2012).

No Brasil, o morango é a espécie do grupo das pequenas frutas com maior expressão econômica e tradição de cultivo. A produção no país é superior a 165 mil toneladas, com destaques para os estados de Minas Gerais, Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul (IBGE - www.ibge.gov.br). Apesar da grande produção e dos avanços tecnológicos da cultura do morangueiro, alguns fatores ainda limitam a sua produtividade. Dentre esses fatores, destaca-se alta sensibilidade aos déficits hídricos e nutricionais, uma vez que por possuírem sistema radicular de pouca profundidade, área foliar extensa e frutos com elevado conteúdo de água demandam quantidades consideráveis de água para seu cultivo (KLAMKOWSKI; TREDER, 2014).

O aumento populacional tem resultado no uso de terras não utilizadas anteriormente para a agricultura, por apresentar alto teor de salinidade e na redução do uso de irrigação em vista da escassez de recursos hídricos que assola diversas regiões no mundo. Além disso, o estresse salino representa um problema considerável no cultivo do morangueiro, devido ao crescente uso de água de irrigação de baixa qualidade, apresentando altos índices de sais suspensos (GRANT *et al.*, 2010). A salinidade é um dos principais estresses ambientais que afetam o desenvolvimento das plantas, pois tende a inibir o

crescimento vegetal por efeito osmótico e restringir a disponibilidade de água (LIU, F. *et al.*, 2007).

Apesar dos estresses abióticos, como o déficit hídrico e o estresse salino causarem prejuízos para o crescimento das plantas, condições de estresse moderadas podem ser empregadas de forma controlada, para melhorar o acúmulo de compostos antioxidantes (GALLI *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2008). Isto ocorre porque estresses moderados induzem a produção de compostos relacionados ao metabolismo de defesa acarretando em um aumento da tolerância destas plantas a estresses subsequentes, uma vez que seu metabolismo já estaria direcionado à produção de metabólitos secundários, e ao mesmo tempo proporcionando a biofortificação do alimento gerado através do aumento no seu potencial antioxidante (MESSIAS *et al.*, 2015).

Com relação à maturação, os frutos podem ser classificados em climatéricos e não-climatéricos de acordo com o seu padrão respiratório e a produção de etileno. Os frutos do morangueiro são classificados como não-climatérico, por não apresentarem um pico de respiração e produção de etileno durante o processo de maturação (JIA *et al.*, 2011). Entretanto, os mecanismos moleculares que regulam seu amadurecimento, ainda não estão completamente elucidados. Estudos mostraram que em frutos não-climatéricos o conteúdo de ABA aumenta durante a maturação (LI *et al.*, 2011), sugerindo que este hormônio pode ser um possível candidato para o controle da maturação em frutos não-climatéricos.

A maturação faz parte do ciclo de crescimento e desenvolvimento dos frutos, que se divide basicamente em três fases: crescimento; maturação; e senescência. O crescimento consiste no aumento do número de células, ocorrendo armazenamento de água, carboidratos e ácidos orgânicos (CHITARRA e CHITARRA, 2005). Já no processo de maturação ocorrem mudanças de cor, acúmulo de açúcares, alteração de textura, hidrólise do amido, incremento de aromas, redução de ácidos orgânicos e síntese compostos fenólicos, o que tornam os frutos mais atraentes para o consumo (TAIZ *et al.*, 2017). Na última fase, de senescência, os processos anabólicos (de síntese) diminuem e aumentam os processos catabólicos (de degradação), sendo marcado por progressiva perda de integridade das membranas celulares (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

No morango, em particular, nos estágios iniciais do desenvolvimento, a auxina é sintetizada nos aquênios, promovendo o crescimento do fruto. Os níveis de auxina livre atingem o pico nos aquênios antes do estágio branco e diminuem subsequentemente conforme a fruta amadurece. As mudanças no desenvolvimento durante a maturação do morango são acompanhadas por alterações no metabolismo primário e especializado (FAIT et al., 2008). No caso do metabolismo primário, ocorre síntese de açúcares (glicose, frutose e sacarose) e ácidos orgânicos (ácido cítrico e ácido málico) e a relação entre esses compostos desempenha um papel significativo no sabor da fruta. Em relação ao metabolismo especializado, os compostos fenólicos fornecem à fruta cor, sabor e proteção contra ataques patogênicos e condições ambientais adversas. Durante os estágios iniciais, os flavonóides, principalmente taninos condensados, acumulam-se em níveis elevados e fornecem aos frutos imaturos um sabor adstringente. À medida que a maturação progride, ocorre a síntese de outros flavonóides, como antocianinas e derivados do ácido cinâmico e cumárico (LANDMANN et al., 2007). Para melhor compreensão das mudanças fisiológicas e metabólicas que ocorrem durante o crescimento e maturação dos frutos de morango, estes são classificados em seis diferentes estágios: verde pequeno, verde médio, verde grande, branco, iniciando a cor vermelha e vermelho, o que corresponde respectivamente a 7, 14, 18, 21, 24 e 28 dias pós-antese (FAIT et al., 2008; JIA et al., 2011).

O morango apresenta-se como um bom modelo biológico para compreender os mecanismos envolvidos na maturação de frutos não-climatéricos, bem como entender as relações de estresse e produção de compostos de interesse por ter um ciclo curto, ou seja, produzir frutos rapidamente, ter um sistema de cultivo bem estabelecido e por existirem abundantes informações genéticas disponíveis. Além disso, é uma cultura que se beneficiaria diretamente do desenvolvimento de plantas mais tolerantes a estresses abióticos.

3.3.2. Estresses abióticos

As plantas estão constantemente expostas a estresses bióticos e abióticos. Situações de estresse como calor, frio, seca, alagamentos, salinidade, deficiência de nutrientes ou presença de metais tóxicos no solo

alteram as condições de homeostase destes organismos (PANDEY, P. *et al.*, 2017). Para se adaptar e sobreviver sob estas condições, as plantas desenvolveram complexos mecanismos para perceber os sinais externos e emitir respostas frente a estes estresses. Estes mecanismos iniciam com a percepção do estímulo, seguido da transdução do sinal e regulação da expressão gênica, que acarretam em alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas (ZHU, J., 2017).

A salinidade, radiação UV, alterações de temperatura e aporte hídrico são considerados os principais estresses ambientais que causam danos às culturas. Entretanto, o tempo de exposição e a intensidade do estresse definem as alterações que irão ocorrer nas plantas, que vão desde modificações no metabolismo, crescimento e desenvolvimento até a senescência (ATKINSON; URWIN, 2012; JOGAIAH; GOVIND; TRAN, 2013).

Cada fator abiótico é capaz de gerar uma resposta diferente na planta, dependendo do tecido ou órgão afetado. As plantas podem resistir a estas perturbações através de mecanismos que evitem seus efeitos. As espécies reativas de oxigênio (ROS) e as espécies reativas de nitrogênio (RNS) são moléculas primárias de resposta a estresse, as quais podem causar danos oxidativos a proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (SEYBOLD *et al.*, 2014). Para neutralizar o efeito destrutivo das ROS e das RNS, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa incluindo antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos sejam eles compostos do metabolismo geral ou especializado (GILROY *et al.*, 2016).

Hormônios também são reguladores importantes na resposta a estresses abióticos, sendo o ácido abscísico (ABA) e o etileno os principais hormônios envolvidos em resposta a estresses abióticos (YE; JIA; ZHANG, 2012). O ABA atua como sinalizador em resposta a estresse osmótico (seca, salinidade), atuando principalmente no fechamento estomático (VISHWAKARMA *et al.*, 2017).

Para evitar perdas ocasionadas por estresses ambientais, é importante compreender as respostas das plantas frente a estresses que perturbam o equilíbrio homeostático celular e molecular, a fim de se identificar mecanismos de tolerância ao estresse.

3.3.3 Ácido abscísico

O ácido abscísico (ABA) é conhecido como um hormônio do estresse vegetal e desempenha importantes papéis frente a estresses bióticos e abióticos. Como uma das principais moléculas sinalizadoras em plantas, realiza um conjunto versátil de funções na regulação de diversos processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento. O ABA participa do amadurecimento de frutos (CHEN, J. *et al.*, 2014), abscisão foliar (VISHWAKARMA *et al.*, 2017), dormência e desenvolvimento de sementes (SEILER *et al.*, 2011), resposta ao estresse (CUTLER *et al.*, 2010; YE; JIA; ZHANG, 2012), bem como na regulação da resposta sistêmica a estresses abióticos (SUZUKI *et al.*, 2013).

Embora a importância do ABA na resposta a estresses em plantas esteja bem consolidada, poucos são os estudos relatando o papel do ABA na indução da síntese de compostos fenilpropanóides durante estes estresses. Alguns estudos sugerem que os mesmos sinais que desencadeiam a síntese de fenilpropanóides também provocam um aumento na concentração de ácido abscísico (ABA). Por exemplo, em toranjas o déficit hídrico afeta simultaneamente a via metabólica da ABA e a biossíntese de antocianinas (DELUC *et al.* 2009). Similarmente, em morangos o estresse salino moderado induz o acúmulo de compostos fenilpropanóides, sendo acompanhado pela regulação positiva de vários genes da via de fenilpropanóidee e de genes relacionados à síntese de ABA. A partir desses resultados se pode hipotetizar que o estresse salino moderado induz a maturação de frutos de morango (*Fragaria x ananassa*) através de um mecanismo dependente de ABA (GALLI *et al.* 2016).

Além da relação do ABA com fenilpropanóides em condições de estresse, mais recentemente, tem sido relatado que, tanto em frutos climatérios quanto não-climatérios, o conteúdo de ABA aumenta durante a maturação (GIRIBALDI *et al.*, 2010; LI, B. *et al.*, 2011), apresentando uma correlação temporal positiva com o acúmulo de fenilpropanóides durante este processo. Por este motivo, o ABA tem sido considerado um possível candidato para o desenvolvimento de um processo de controle da maturação em frutos não-climatérios, de forma similar ao ocorrido com o etileno em frutos climatérios. Isto foi evidenciado em frutos de morango, onde a aplicação exógena de ABA

acelerou o desenvolvimento da coloração e o amolecimento com concomitante aumento no teor de antocianinas e na atividade da fenilalanina amônia liase (PAL) (JIANG; JOYCE, 2003). Da mesma forma, Ayub et al. (2016b) demonstraram que o ABA influencia o perfil de açúcares e compostos fenólicos em frutos de morango em diferentes estádios de desenvolvimento.

O ABA parece estar envolvido na biossíntese de antocianinas, a nível molecular, devido sua capacidade de aumentar os níveis de expressão de vários genes da via dos fenilpropanóides. O metabolismo do ABA envolve as vias de sua síntese, catabolismo e inativação (Figura 1). O primeiro passo na biossíntese de ABA é a conversão do carotenóide zeaxantina para trans-violaxantina, catalisada pela enzima zeaxantina epoxidase (ZEP/AtABA1). Na sequência, a enzima 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenase (NCED) catalisa a clivagem oxidativa do ácido 9-*cis*-violaxantina e/ou 9-*cis*-neoxantina produzindo o carotenóide xantoxina, em uma reação considerada limitante na biossíntese de ABA. A xantoxina é então exportada para o citosol e convertida em aldeído abscísico pela enzima desidrogenase/redutase de cadeia curta (ADR/AtABA2), sendo posteriormente oxidado a ABA pela enzima aldeído-oxidase (AAO/AO) (SEILER *et al.*, 2011). De modo geral o ABA na sua forma ativa é rapidamente catabolizado em plantas superiores através de duas rotas principais. Em uma das rotas ocorre degradação oxidativa do ABA, catalisada pela enzima ABA-8-hidroxilase (CYP707A), gera ABAs hidroxilados em ácido faseico (PA) que são subsequentemente reduzidos por uma enzima redutase solúvel a dihidrofaseico (DPA). O outro caminho leva a inativação do ABA por glicosilação, catalisada pela enzima ABA-glucosil transferase (ABA-GTase), formando ABA-glucosil ester (ABA-GE) ou ABA-glucosil éter (ABA-GS). Esta reação é reversível, sendo a desconjugação catalizada pela enzima β -glucosidase (BG) (VISHWAKARMA *et al.*, 2017).

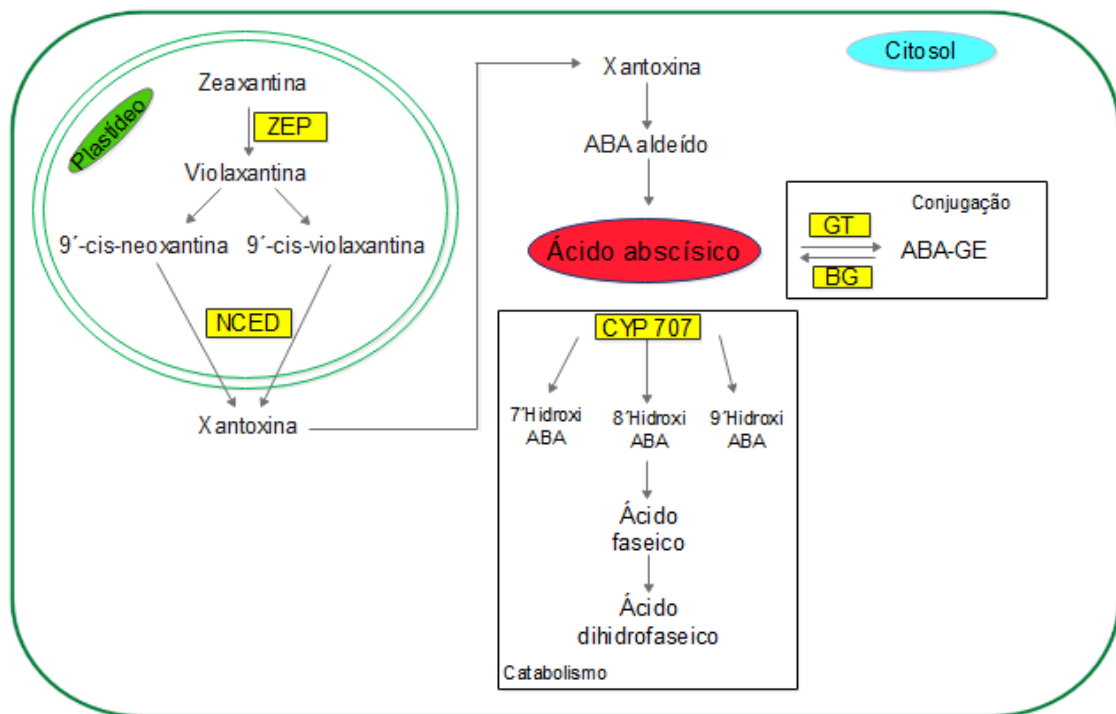


Figura 1: Síntese simplificada do ABA, conjugação e vias de catabolismo. ZEP (zeaxantinaepoxidase), NCED (9-cis-epoxicarotenoide dioxigenase), GT (β -glicosiltransferase), BG (β -glucosidase) e CYP707A (ABA-8-hidroxilase).

Estudos com genes mutantes associados à síntese e ao catabolismo do ABA também foram muito úteis na compreensão do efeito do ABA sobre o metabolismo dos fenilpropanóides. Mccarty et al.(1989) demonstraram que um mutante de *A. thaliana* com sensibilidade reduzida a ABA mostrou bloqueio da biossíntese de antocianina. O silenciamento do gene *NCED* em cerejas vermelhas bloqueou os níveis endógenos de ABA, bem como os níveis de transcrição de *CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR*, *UFGT* (genes da rota de biossíntese de fenilpropanóides) e *MYBA* (gene que codifica para fator de transcrição que regula genes da rota de fenilpropanóides). O silenciamento de *FaNCED1* também levou ao atraso no amadurecimento de frutos em morangos (CHAI et al., 2011).

3.3.4 Cálcio

O íon cálcio (Ca^{2+}) desempenha importante papel nos diferentes processos celulares em plantas. A exemplo disso, a aplicação pré-colheita de Ca^{2+} é uma prática horticultural de rotina visando melhorar a integridade celular e a resistência a doenças (DAYOD et al., 2010; MANGANARIS et al., 2005). O

efeito da sua aplicação foliar no aumento da produtividade também foi demonstrado em plantas de brócolis (KOU *et al.*, 2014) e tomate (HALEEMA; RAB; HUSSAIN, 2018). Benefícios da aplicação pós-colheita de soluções contendo cálcio também têm sido largamente relatados (LU, Y. Q. *et al.*, 2013; MADANI *et al.*, 2014). Mais recentemente, seu efeito na indução de compostos fenilpropanóides em frutos tem sido investigado como uma alternativa para modular o processo de maturação, biofortificar os frutos com estes compostos, ou mesmo aumentar a produção de defesas contra estresses (ARFAOUI *et al.*, 2016; PENG *et al.*, 2016; XU; YOO; HWANG, 2014).

O cálcio desempenha um papel importante na biossíntese de antocianinas em frutas. A aplicação de cálcio em frutos de morango, antes da colheita, estimula a expressão de genes como di-hidroflavonol 4-redutase (DFR), antocianidina sintase (ANS) e UGT, bem como, aumenta o acúmulo de antocianinas (XU *et al.*, 2014). De forma similar, em *Daucus carotae*, o tratamento com baixos níveis de cálcio resultou no aumento do crescimento de células e da produção de antocianinas em culturas celulares (SUDHA e RAVISHANKAR 2003).

Apesar de haver evidências da relação causa efeito entre cálcio e o metabolismo de fenilpropanóides, os mecanismos envolvidos neste processo ainda permanecem incertos. De modo geral, os efeitos observados quando da aplicação de Ca^{2+} tem sido associados com o fato de este atuar como mensageiro secundário, regulando a expressão de genes associados a diferentes respostas celulares, através de cascatas de sinalização, em organismos que vão desde algas unicelulares até plantas superiores multicelulares (MOHANTA, T. K.; KUMAR; BAE, 2017). Entretanto, para atuar como mensageiro secundário, esse íon deve primeiro ser absorvido pelas células vegetais, acumulado em organelas especializadas e disponibilizado no citosol em sua forma livre. A disponibilidade extracelular de cálcio, seu influxo e sua mobilização intracelular são necessários para um aumento no conteúdo de metabólitos especializados (KISELEV; SHUMAOVA; MANYAKHIN 2013). Portanto, o conhecimento sobre como esses processos ocorrem na célula pode auxiliar na compreensão da maneira pela qual ocorre o acúmulo de compostos fenilpropanóides, pelo menos sob condições de estresse. Segundo

3.3.5 Proteínas quinases dependentes de cálcio

As plantas possuem várias proteínas de ligação a Ca^{2+} que funcionam como sensores celulares para a sinalização em cascata. Entre elas, as proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs) são proteínas que se ligam diretamente aos íons de cálcio e fosforilam substratos envolvidos em vias metabólicas, osmose, resposta hormonal e sinalização do estresse (VALMONTE *et al.*, 2014). CDPKs compreendem uma família de genes presente em plantas, protistas, oomicetos e algas verdes, que não são encontradas em animais e fungos. Entre os sensores de Ca^{2+} em plantas, as CDPKs são as únicas que unem recursos de ligação e sinalização de Ca^{2+} dentro de um único produto gênico (HAMEL; SHEEN; SÉGUIN, 2014; ZHANG, X. S.; CHOI, 2001).

A estrutura das CDPKs é formada por cinco domínios: um domínio N-terminal variável que tem sido sugerido como determinante da localização celular da proteína; um domínio quinase serina/treonina, responsável pela fosforilação de proteínas alvo; um pequeno domínio C-terminal; um domínio autoregulatório/autoinibitório; e um domínio regulatório do tipo *calmodulin-like* (CaM-LD). Este último contém um domínio de ligação do Ca^{2+} altamente homólogo a CAM, o domínio calmodulin like domain CLD. Logo após o influxo de cálcio para dentro da célula, a interação entre o domínio CLD e o domínio de auto-inibição provoca a alteração conformacional da proteína e conduz à ativação do domínio quinase (GAO; COX; HE, 2014). Foi proposto que durante a evolução por meio da fusão de uma CAM e uma CaMK foram desenvolvidas as CDPKs. O CLD normalmente contém quatro pontos de ligações de Ca^{2+} (*EF-hand*). Em condições de aumento da concentração de cálcio citosólico por estímulos externos como estresses abióticos, por exemplo, ocorre a ativação de CDPK induzida por ligação do Ca^{2+} . Essa ativação altera a conformação da proteína e leva a liberação do segmento pseudosubstrato do local do domínio quinase ativo (Figura 2) (GAO; COX; HE, 2014; LIESE; ROMEIS, 2013).

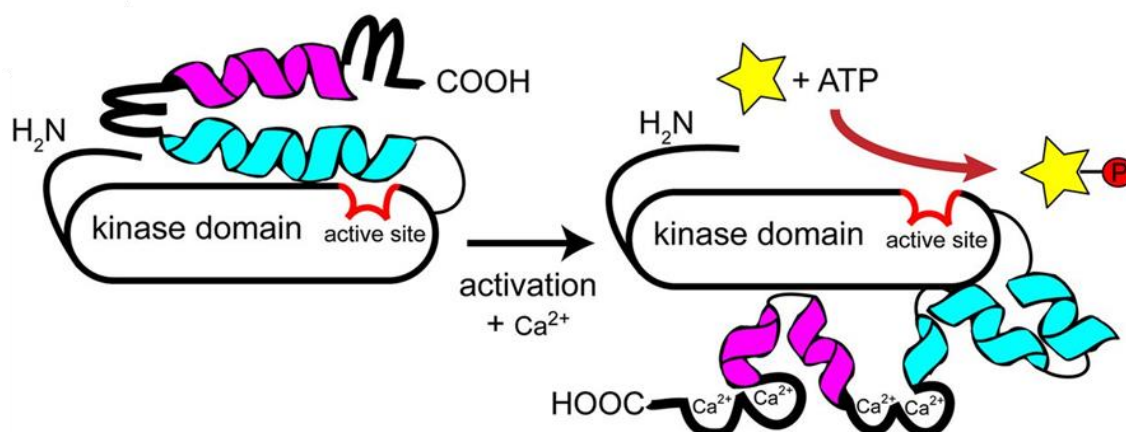


Figura 2: Modelo de ativação das CDPKs. A ligação de cálcio à EF-hand induz uma mudança conformacional: o domínio de ligação ao cálcio gira em torno do domínio kinase, o domínio N-terminal se torna mais acessível e o sítio ativo é liberado para que este possa fosforilar o substrato.

Fonte: Schulz, et al. (2013).

Levando em consideração a grande variedade de genes CDPK em plantas, é importante investigar os fatores que determinam quais isoformas podem estar associadas a respostas ao estresse ou ao processo de amadurecimento dos frutos. As isoformas de CDPKs diferem em seu domínio variável N-terminal (NTV), localização subcelular, parâmetros cinéticos, especificidade do substrato, dependência de Ca²⁺ por sua atividade quinase e padrões de expressão. Isso sugere que os diferentes membros da família podem ser capazes de perceber diferentes estímulos e responder especificamente a estes estímulos (FANTINO *et al.*, 2017).

O controle da síntese de fenilpropanoides também parece ser dependente de isoformas, uma vez que em morangos a expressão do gene *FaCDPK1* não foi detectada em frutos jovens (frutos verdes); no entanto, os transcritos se acumularam quando os frutos se tornaram brancos. Além disso, a expressão desse gene demonstrou níveis crescentes durante a maturação dos frutos, coincidindo com o aumento nos níveis de fenilpropanóides (LLOP-TOUS, 2002). Da mesma forma, o *FvCDPK1* de morango diploide selvagem é expresso em frutos durante o amadurecimento e é regulado positivamente por ABA (FENG, J. *et al.*, 2013).

Além do tecido e do estágio de desenvolvimento, diferentes estímulos determinam quais das diferentes isoformas serão ativadas/inativadas. O

silenciamento do gene *AtCDPK27* demonstrou que as plantas com silenciamento eram mais sensível ao estresse salino do que as plantas controle, em relação à germinação de sementes e crescimento de plântulas pós-germinativas (ZHAO, R. *et al.*, 2015). Análises funcionais usando vetores para o silenciamento induzido por vírus (VIGS) revelaram que os diferentes genes CDPK de tomate (SlCDPK) estão envolvidos na resistência a diferentes patógenos (WANG, J. P. *et al.*, 2016).

Entre os vários alvos fosforilados pelas CDPKs, destaca-se a sua relação direta com o metabolismo dos fenilpropanóides pela regulação da enzima PAL. Este fator foi relatado pela primeira vez pela detecção da fosforilação de PAL em culturas de células de suspensão de feijão francês (BOLWELL, 1992). Posteriormente, uma quinase que fosforila PAL em um resíduo de treonina, na mesma cultura foi purificada e identificada como sendo uma CDPK (ALLWOOD *et al.*, 1999). O mesmo grupo realizou avaliações adicionais sob condições de estresse, onde foi observada a mesma reação que no feijão francês, demonstrando que PAL tem um papel significativo na defesa de plantas e que é fosforilada por uma CDPK (ALLWOOD *et al.*, 2002). Esta fosforilação também foi estudada em *Arabidopsis thaliana*, sugerindo que este resíduo de treonina/serina poderia ser um potencial mecanismo de modificação em plantas superiores (CHENG, S. *et al.*, 2001). A sequência do polipeptídeo de PAL utilizada no ensaio é largamente conservada nas enzimas homólogas de outras espécies, implicando que esta fosforilação do tipo treonina/serina em PAL pode ser um mecanismo de modificação ubíqua que ocorre nas plantas superiores (ALLWOOD *et al.*, 1999).

3.3.6 Fenilpropanoides

Os fenilpropanoides pertencem ao maior grupo de metabólitos especializados produzidos por plantas e estão diretamente envolvidos nas respostas aos estresses bióticos e abióticos (KORKINA, 2007). Nas últimas décadas, o interesse por esse grupo de compostos vem aumentando devido a seus benefícios para a saúde humana. Estudos demonstram que o consumo de vegetais com alto teor destes compostos exerce efeitos antialérgicos, anti-inflamatórios, antimicrobianos, antioxidantes, cardioprotetores e vasodilatadores. Entre os vegetais ricos em fenilpropanoides estão azeitonas,

uva, extrato de semente de uva, suco de romã, suco de amora, amora, morango, dentre outros (KARLUND *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2016).

Nas plantas, a síntese de fenilpropanóides advém da via do chiquimato, sendo a fenilalanina amônia liase (PAL) a enzima chave para a biossíntese de ligninas, taninos e antocianinas. PAL catalisa o primeiro passo na via dos fenilpropanóides convertendo a fenilalanina em 4-coumaroil-CoA. Este composto é combinado com três unidades de malonil-CoA pela enzima chalcona sintase (CHS), produzindo o intermediário chalcona naringenina. Subsequentemente, a flavanona 3-hidroxilase (F3H), o flavonóide 3'-hidroxilase (F3'H) e o flavonóide 3'5'-hidroxilase (F3'5'H) levam à formação das antocianidinas, cianidina e delphinidina. As antocianidinas são convertidas em leucoantocianinas pela enzima leucoantocianidina dioxigenase/antocianidina sintase (LDOX/ANS) e posteriormente glicosiladas por UDP-glicose: flavonoides-O-glicosiltransferase (UFGT). O-metil transferases (OMTs) catalisam a formação de antocianidinas O-metiladas, tais como malvidina, peonidina e petunidina (KONG *et al.*, 2015; ZHANG, X.; LIU, 2015) (Figura 3).

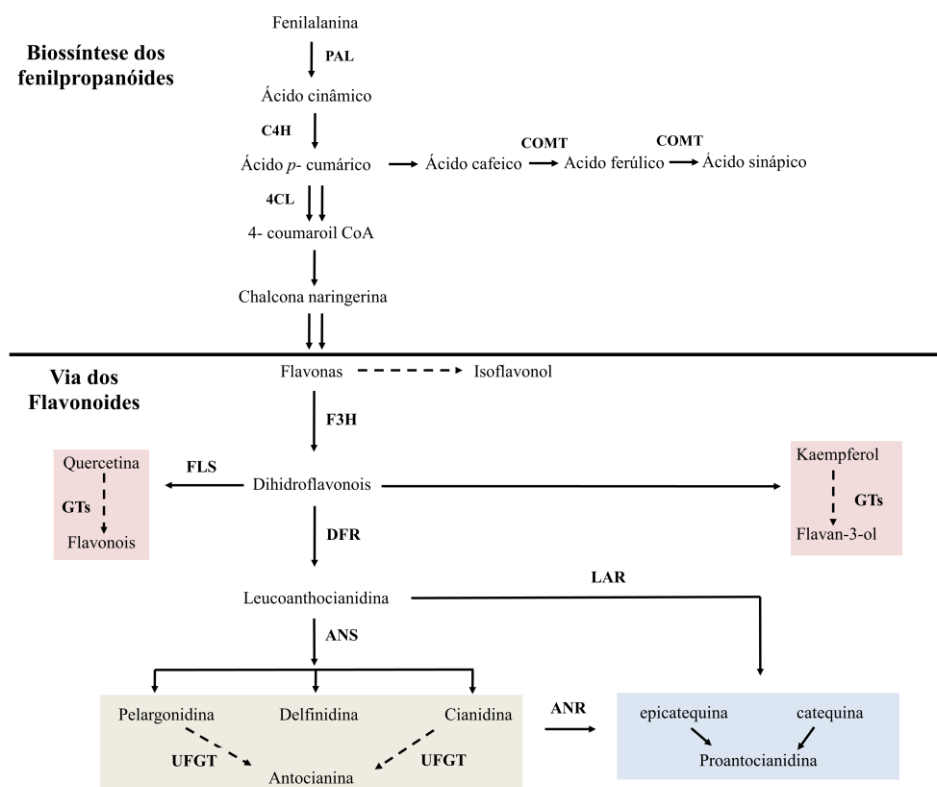


Figura 3. Via metabólica dos fenilpropanóides. PAL (fenilalanina amônia liase), C4H (cinamato 4-hidroxilase), 4CL (β -cumarato ligase), COMT (ácido cafeico independente de cátion), F3H (flavanona 3-hidroxilase), FLS (flavonol sintase), DFR (dihidroflavonol 4 -redutase), LAR (leucoantocianidina redutase), UFGT (flavonóide glicosiltransferase UDP), ANR (antocianidina redutase).

A síntese desses compostos é regulada durante o amadurecimento dos frutos, bem como em resposta aos estresses bióticos e abióticos, resultando no aumento de alguns desses compostos e diminuição dos demais. Por exemplo, Castellarin e Di Gaspero (2007) relataram que em *Vitis vinifera*, as concentrações de antocianinas tri-hidroxiladas, tais como delfinidina, petunidina e malvidina, foram maiores nas plantas sob déficit hídrico do que nos tratamentos controle. No entanto, as concentrações de antocianinas di-hidroxiladas, como a cianidina e a peonidina, foram semelhantes nos tratamentos controle e estresse por seca. Embora existam evidências claras da regulação desta via metabólica sob condições de estresse, o papel desses compostos nessas situações ainda não foi elucidado. Chalker-Scott (1999) sugeriu que as antocianinas desempenham um papel na regulação osmótica,

contribuindo para a manutenção da pressão de turgescência e, assim, proporcionando tolerância à seca.

Embora a via metabólica biossintética para estes compostos tenha sido amplamente descrita, e sua função nos processos de maturação e resposta ao estresse tenha sido relatada anteriormente, as moléculas envolvidas na indução desses compostos e na maneira como elas são reguladas ainda precisam ser elucidadas. Há evidências de que uma das vias de indução de fenilpropanóides durante a maturação dos frutos e em resposta a estresses é dependente do ácido abscísico (ABA), e é desencadeada por uma cascata de sinalização envolvendo cálcio (Ca^{2+}) e proteína quinases dependentes de cálcio (CDPKs).

3.4 Materiais e métodos

3.4.1 Identificação de genes de CDPK em morango

O banco de dados Genome Database for Rosaceae (GDR) (<https://www.rosaceae.org/>), e os bancos de RNA seq *in house* foram utilizados para encontrar os genes putativos de *Fa*CDPKs. Foram utilizadas como iscas 38 sequências de CDPKs previamente caracterizadas em *A. thaliana*, *F. ananassa* e *F. vesca*, disponíveis no banco de dados NCBI. A busca por sequências homólogas nos bancos de RNA seq foi realizada utilizando sequências não redundantes do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), e do banco de dados do Swiss-prot (<http://www.expasy.ch/sprot/>), aplicando o programa BLASTX (e-value<1e⁻⁶). As sequências putativas foram traduzidas em peptídeos a partir do maior 'open reading frame' utilizando a ferramenta ORFFinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>).

Para verificar a confiabilidade destas sequências candidatas, verificou-se a presença dos domínios típicos de CDPKs, incluindo o domínio de ligação ao Ca²⁺, o domínio quinase, N-terminal e autoinibitório, utilizando a ferramenta PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>).

3.4.2 Predição da localização celular

A predição da localização subcelular foi realizada utilizando as ferramentas SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), Cello v.2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>), TargetP 1.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), ChloroP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) e TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

3.4.3 Predição de exons e introns

O genoma de *F. ananassa* na forma de *scaffolds* foi utilizado, juntamente com os cDNA de cada um dos genes para avaliar o padrão de distribuição de exons e introns. Essa distribuição foi realizada utilizando a ferramenta de bioinformática GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>).

3.4.4 Análise filogenética

As sequências putativas identificadas em *F. ananassa*, juntamente com sequências CDPKs previamente descritas em *A. thaliana* (AtDPKs) foram alinhadas no ClustalW 1.8.1, utilizando os parâmetros padrão. Este alinhamento foi utilizado para inferir as relações filogenéticas dos genes de CDPK. A árvore filogenética foi construída no programa MEGA6, utilizando o método de agrupamento NeighborJoining, com valores de bootstrap de 1000 (TAMURA *et al.*, 2007).

Com base na comparação dos domínios identificados, relações evolutivas entre as sequências foram aferidas através da ferramenta MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.html>).

3.4.5 Análise de sintenia e localização cromossômica

A localização cromossômica dos genes *FaCDPK* foi realizada com base nas informações de *Fragaria vesca* disponíveis no National Center for Biotechnology Information (NCBI), obtidas por meio do BLASTP com a referência $E < 1e^{-5}$. O mapa foi elaborado usando o software Mapchart (<https://www.wageningen-ur.nl/en.htm>). Os blocos sintênicos foram usados para construir um mapa de análise sintênica dentro do genoma do morango (*Fragaria vesca*) e de *Arabidopsis*. Os diagramas foram gerados usando o programa Circos (versão 0.69) (<https://circos.ca/>). Com base nos resultados da análise da árvore filogenética, as substituições de nucleotídeos sinônimos (Ks) e não-sinônimos (Ka) entre pares de genes ortólogos e parálogos foram calculados usando os programas ClustalW e PAL2NAL.

3.4.6 Obtenção das amostras para avaliação da expressão gênica dos genes candidatos a CDPKs

Para avaliação da expressão dos genes de CDPKs *in silico* e por PCR em tempo real, foram utilizadas amostras obtidas em experimento conduzido em casa de vegetação na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (CPACT/Pelotas/RS/BR), entre maio e dezembro de 2012. Mudanças de morango "Camarosa" foram transplantadas e cultivadas em vasos de 9L, contendo uma mistura de solo e vermiculita (3:1). O fornecimento de nutrientes

foi realizado semanalmente via fertirrigação de acordo com as recomendações técnicas para a cultura (CQFS, 2004).

A irrigação foi realizada diariamente por gotejamento, e o volume de água foi ajustado semanalmente, de acordo com o valor de ET_c da cultura, tal como proposto por Marouelli et al. (2008). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições e três tratamentos.

As plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos:

C- Controle;

ES- estresse salino

EH - déficit hídrico

ABA - Aplicação exógena de 200µM de padrão comercial de ABA (Sigma)

NDGA - Aplicação de 50µM de inibidor de ABA (ácido nordihidroguaiarético – Sigma).

Com relação ao estresse salino, foram aplicados 50 mL de NaCl 80 mM uma vez por semana. Já para o déficit hídrico, as plantas foram submetidas a irrigação equivalente a 85% da água utilizada para o tratamento controle. Ambas condições estressoras foram aplicadas desde a fase de florescimento até o final do ciclo. O ABA e o inibidor de ABA foram aplicados semanalmente através de pulverização foliar. Morangos maduros foram coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer a -80°C até a realização das avaliações de expressão gênica.

Para avaliar a expressão dos genes durante o desenvolvimento dos frutos de morango, amostras de seis estádios de maturação (7, 14, 18, 21, 24 e 28 dias pós-antese), foram coletadas de um cultivo a campo. Após a coleta, os frutos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o momento das análises.

3.4.7 Avaliação da expressão das CDPKs putativas por PCR em tempo real

O isolamento do RNA total, a síntese de cDNA e a amplificação por RT-qPCR foram realizados conforme descrito por Galli et al. (2015). *Primers* específicos foram desenhados para amplificar as sequências desejadas, como mostrado na Tabela 1. Os genes de referência PIRUV_DESCARB (piruvato

descarboxilase) e HISTH4 (histona H4) foram usados para normalizar os níveis de transcrição, conforme proposto por Galli et al. (2015). Os dados da expressão relativa foram calculados de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta C_q}$ e são apresentados como expressão relativa. A análise foi realizada em quatro repetições biológicas e três replicatas analíticas.

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando os efeitos dos tratamentos foram significativos ($p \leq 0,05$) os dados foram submetidos à comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando software SAS.

Tabela 1: Sequência de *primers* gerados a partir das sequências selecionadas de CDPK de morango

Nome	Contig	Foward primer	Reverse primer
FaCDPK1	FaMAX17complete	GGTGAAACAGTGAGAGCAAGGC	AAATCCCTCTTGTATGCCAGC
FaCDPK2	FaCDPK2	TGGATTTACCCGAGTTTGTTG	AGGCTAATCTTCCCGTCTTTGT
FaCDPK3	cl14contig12	CACCAAACCCAACTCAACATT	TATGGCGGTCAGAGTAGTAGGAGT
FaCDPK4	cl3033contig1	TCGGGTTGTCAGTGTTTCATCG	CTCAAAGTCAATCTCTCCCTCCAA
FaCDPK5	cl3670contig1	GCAGGCAGCAGATGTAGATAATAGC	AACATCCTCTACACCAAACCTCCTCA
FaCDPK6	cl3928contig1	TGACAAGGATGGAAGTGGCTAT	CGCCCATCCTTGTCAGTGT
FaCDPK7	cl4123contig1	AAGCAACTGAGAGCAATGAATAAGC	TTGCCTTGACTTCCGTTTCTGAT
FaCDPK8	cl5105contig1	CTGCTAAGGATGAGAGTTCGCC	ACACTCCATACATCAGCCTCCG
FaCDPK9	cl5393contig1	CGACAAAGATGGAAGCGGG	CCATTTCCCTTCCTCATCATTG
FaCDPK10	cl6644contig2	TGAACAGAATGGATAGAGGGACC	TAATGCTTTGTTTCGTCACCCAT
FaCDPK11	Locus 4415 6 14	TTTGACTTCATCTTGTTTGTG	CACCGAGACAACTTACACGCTA

3.4.8 Análise de interatoma

Uma rede de interação de *FaCDPK4* e *FaCDPK11* foi construída usando a ferramenta on-line STRING 10 (<http://string-db.org/>), utilizando *Fragaria vesca* como organismo modelo.

3.5 Resultados

Métodos de bioinformática foram utilizados para coletar informações na tentativa de identificar membros da família CDPK em morango (*F. ananassa*). Nesse estudo, uma análise genômica da família *FaCDPK* foi realizada com a ajuda de informações do Genome Database for Rosaceae (GDR) e de um banco de RNAseq *in house*. Para verificar a confiabilidade das sequências candidatas, verificou-se a presença dos domínios típicos de CDPKs, incluindo o domínio de ligação ao Ca^{2+} , o domínio quinase, N-terminal e autoinibitório, utilizando a ferramenta PROSITE. A pesquisa identificou nove novas possíveis sequências CDPKs em *F. ananassa*, sendo que a maior apresenta 600 aminoácidos (*FaCDPK8*), enquanto que a menor apresenta 351 aminoácidos (*FaCDPK9*). O menor ponto isoelétrico dentre as proteínas foi de 4,78 (*FaCDPK3*) e o maior 4,91 (*FaCDPK7*). Já o peso molecular variou de 18,1 (*FaCDPK9*) a 29,7 KDa (*FaCDPK3*). Todas as sequências identificadas correspondem à sequência completa da proteína e apresentaram pelo menos um domínio quinase e um domínio *EF-hand*, como demonstrado na Tabela 2. Cinco sequências apresentaram domínio N-miristoilação, o qual indica que essas proteínas são membranares.

Tabela 2: Informações sobre as sequências de *CDPKs* identificadas em *F. ananassa*

Nome	Contig	Tamanho (aa)*	Posição inicial (aa)*	Posição final (aa)*	Domínios quinase	Domínios EF-hand	pI	P.M. (KDa)	N-miristoilação	Palmitoilação
FaCDPK3	CL14contig12	451	686	1137	1	1	4,78	29,7	sim	não
FaCDPK4	CL3033contig1	541	353	894	1	4	4,84	26,7	sim	sim
FaCDPK5	CL3670contig1	562	173	735	1	4	4,90	21,6	não	sim
FaCDPK6	CL3928contig1	547	150	697	1	4	4,90	20,2	não	sim
FaCDPK7	CL4123contig1	545	190	735	1	4	4,91	19,1	sim	sim
FaCDPK8	CL5105contig1	600	191	791	1	1	4,87	21,7	sim	sim
FaCDPK9	CL5393contig2	351	442	794	1	4	4,89	18,1	não	não
FaCDPK10	CL6644contig2	519	191	710	1	4	4,89	18,2	não	não
FaCDPK11	Locus_4415_ Transcript6/14	544	149	693	1	4	4,85	18,6	sim	sim

pI – ponto isoelétrico

As isoformas de CDPKs diferem em seu domínio variável N-terminal e com isso se diferenciam quanto à localização subcelular. A predição da localização subcelular foi realizada utilizando diferentes programas de bioinformática. O SignalP verifica a presença de peptídeo sinal, indicando se a proteína é ou não citosólica. Nesse estudo observou-se que todas *FaCDPK* não apresentam peptídeo sinal, porém os programas Cello, TargetP e ChloroP sugeriram que as *FaCDPKs* estão atuando na mitocôndria, núcleo, cloroplasto e algumas são citoplasmáticas. Utilizando TMHMM observou-se que seis *FaCDPKs* estão localizadas nas membranas.

Tabela 3: Localização subcelular das quinases dependentes de cálcio (CDPKs) identificadas em *F. ananassa*

Nome	Contig	SignalP	cello	TargetP	ChloroP	TMHMM
FaCDPK3	CL14contig12	-	Mitocôndria Núcleo	-	Cloroplasto	-
FaCDPK4	CL3033contig1	-	Citoplasmática	-	-	+
FaCDPK5	CL3670contig1	-	Citoplasmática	-	-	-
FaCDPK6	CL3928contig1	-	Citoplasmática	-	-	+
FaCDPK7	CL4123contig1	-	Núcleo	Cloroplasto	-	+
FaCDPK8	CL5105contig1	-	Cloroplasto	-	Cloroplasto	-
FaCDPK9	CL5393contig2	-	Citoplasmática	-	-	+
FaCDPK10	CL6644contig2	-	Citoplasmática	Cloroplasto	Cloroplasto	+
FaCDPK11	Locus_4415_	-	Citoplasmática Núcleo	Cloroplasto	-	+

Divergências estruturais entre os *FaCDPKs*, como a presença e posição dos domínios, podem indicar a história evolutiva dentro da família gênica (KUDLA; BATISTIC; HASHIMOTO, 2010). Desta forma, onze genes *FaCDPKs* foram confirmados quanto a presença de domínios, sendo identificados três porções conservadas quanto à presença e posição (Figura 4). Três sequências apresentaram uma região adicional e uma das sequências apresentou apenas duas das três porções conservadas, sugerindo que houve eventos de duplicação e deleção a partir da sequência ancestral que caracterizaram mudanças inclusive nos domínios.

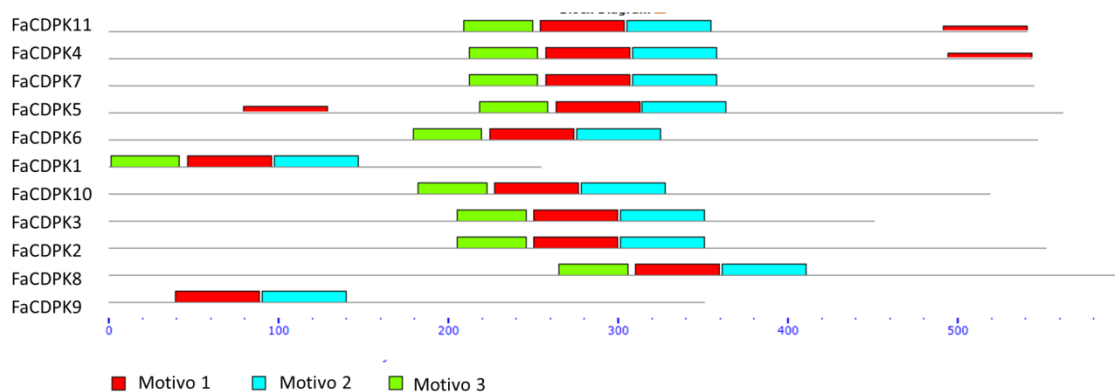


Figura 4: Organização dos diferentes padrões (porções/regiões) em 11 genes da família de proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPK) presentes em *F. ananassa*. Os motivos conservados foram detectados usando as ferramentas on-line MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.html>).

A organização dos éxons/íntrons e o número de íntrons presentes também podem indicar a história evolutiva dentro de uma família gênica (BOUDET *et al.*, 2001), e por isso as estruturas gênicas das nove *FaCDPKs* foram avaliadas para se obter mais informações. A análise revelou que *FaCDPK10*, *FaCDPK11*, *FaCDPK3* e *FaCDPK4* apresentam 4 íntrons, enquanto que *FaCDPK5*, *FaCDPK6* e *FaCDPK7* possuem 3 íntrons. A presença de 5 e 2 íntrons foi observada nas *FaCDPK8* e *FaCDPK9*, respectivamente (Figura 5).

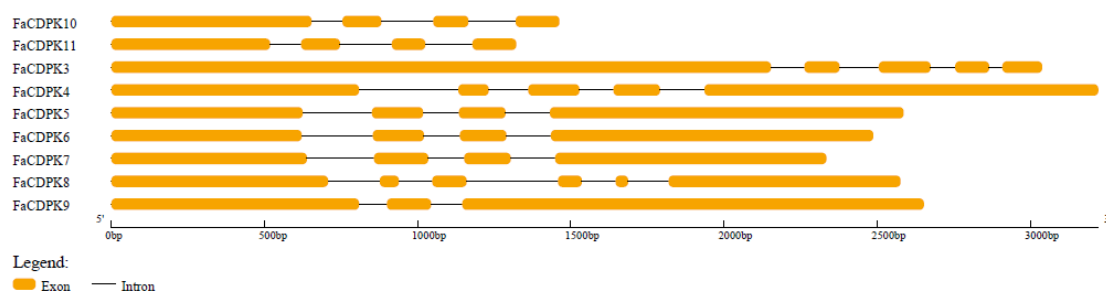


Figura 5: Estrutura dos éxons e íntrons dos 11 genes da família de proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPK) presentes em *F. ananassa*. Éxons e íntrons são indicados por caixas laranjas e linhas pretas, respectivamente.

As relações evolutivas dos genes de CDPK também foram observadas a partir de uma árvore filogenética. As onze *FaCDPKs* foram atribuídas a quatro subfamílias principais de acordo com a topologia da árvore (Grupos A, B, C e D), que combinavam com a classificação das *AtCDPKs* (Figura 6). Onze

*Ath*CDPKs e quatro *Fa*CDPKs (*Fa*CDPK7, 4, 11 e 10) pertencem ao grupo A; doze *Ath*CDPKs e duas *Fa*CDPKs (*Fa*CDPK9 e 5) ao grupo B; oito *Ath*CDPKs e duas *Fa*CDPKs (*Fa*CDPK6 e 1) ao grupo C; e três *Ath*CDPKs e três *Fa*CDPKs (*Fa*CDPK8, 3 e 2) ao grupo D. Os resultados da análise filogenética das sequências de proteínas *Fa*CDPK previstas revelaram que não há uma representação igualitária de proteínas de *F. ananassa* e *A. thaliana* nos quatro subgrupos, uma vez que o gene CDPK ancestral foi submetido a eventos de duplicação de múltiplos genes.

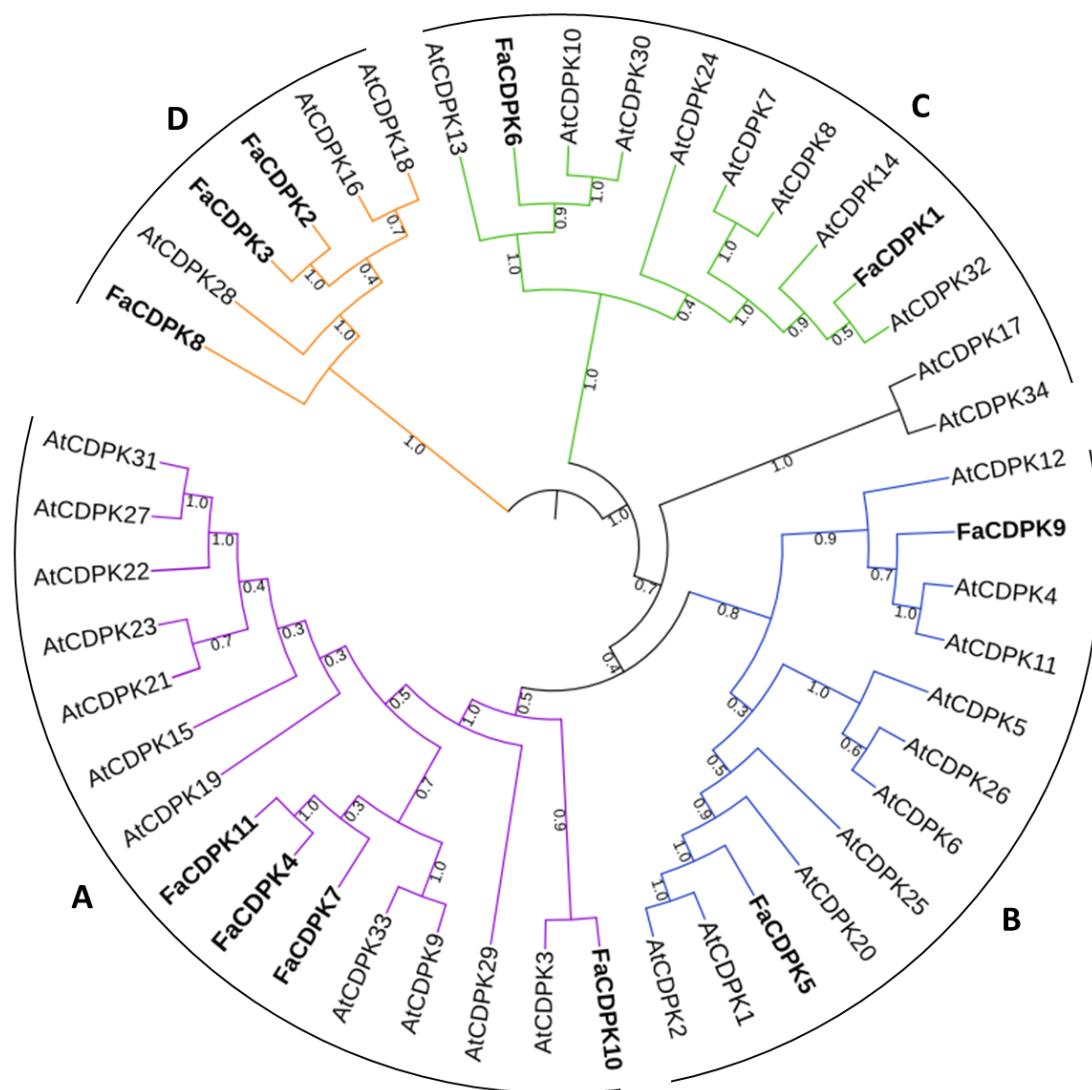


Figura 6: Relação filogenética entre as proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPK) de morango (*F. ananassa*) e *Arabidopsis thaliana*. A árvore filogenética foi construída com base em um alinhamento de sequência de aminoácidos utilizando método Neighbor-Joining com análise de *bootstrap* (1000 réplicas).

Os genes CDPK foram mapeados nos cromossomos do genoma do morango selvagem (*Fragaria vesca*). O cromossomo 4 foi o único cromossomo sem gene *FaCDPK* (Figura 7). Por outro lado, o cromossomo 3 incluiu três *FaCDPKs* (*FaCDPK4*, *FaCDPK7* e *FaCDPK11*), os cromossomos 1, 5 e 6 incluíram dois *FaCDPKs* cada (*FaCDPK2* e *FaCDPK3*, *FaCDPK6* e *FaCDPK10*, *FaCDPK1* e *FaCDPK9*, respectivamente) e os cromossomos 2 e 7 incluíram apenas um gene *FaCDPK8* e *FaCDPK5*, respectivamente.

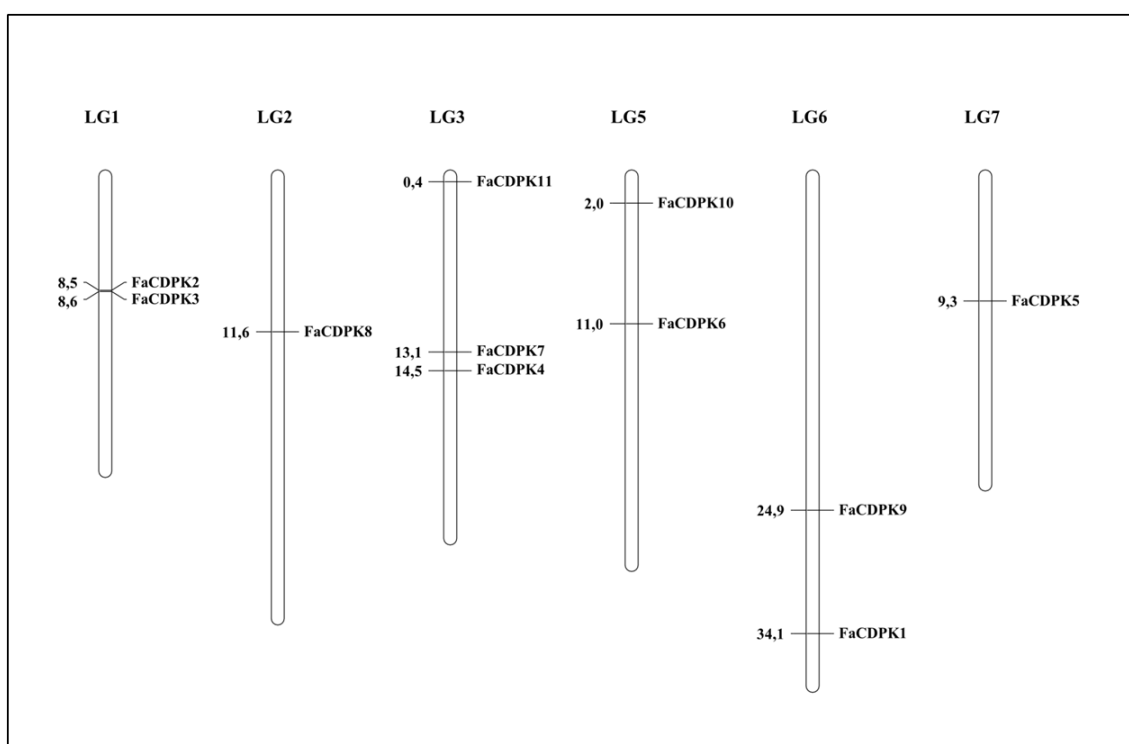


Figura 7: Distribuição cromossômica das proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPK) de *F. ananassa* nos cromossomos de *F. vesca*.

A fim de investigar a variação estrutural geral dentro do genoma foi realizada a análise de sintenia. A análise de sintenia é utilizada na genômica comparativa para fazer novas inferências sobre um genoma a partir de estudos feitos em genomas relacionados. Essas comparações podem revelar a manutenção de agrupamentos gênicos e sequências regulatórias importantes em determinadas regiões genômicas (Van Straalen & Roelofs, 2006). Verificou-se que *FaCDPKs* mantêm sintenia com CDPKs dos quatro cromossomos de *Arabidopsis* (Figura 8). Dois genes ligados entre si por uma linha são definidos

como genes sintênicos. Os cromossomos dos genomas de *Fragaria vesca* e *Arabidopsis* foram conectados por linhas da mesma cor, indicando uma similaridade evolutiva entre esses genomas. A maioria dos genes CDPK foi preservada durante a poliploidização, indicando sua importância evolutiva. Os genes CDPK também foram distribuídos uniformemente dentro dos genomas.

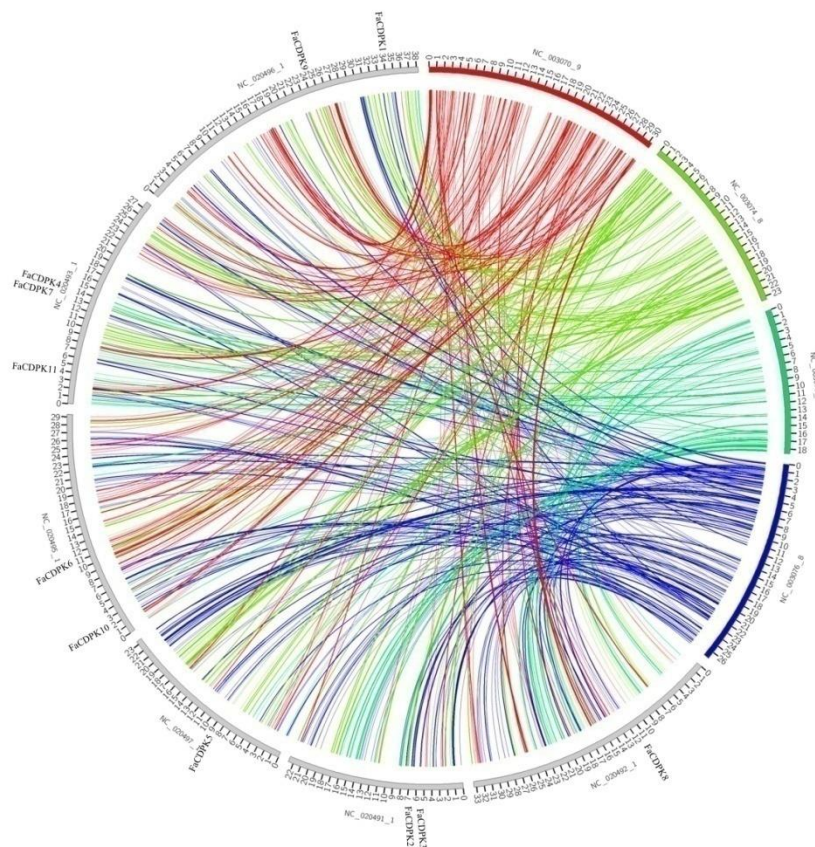


Figura 8: Análise de sintonia dos genes de proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPK) entre morango (*Fragaria x ananassa*) e *Arabidopsis thaliana*.

A predição do padrão evolutivo com base no cálculo das taxas de substituição de sinônimos (Ks) e não sinônimos (Ka) fornece informações sobre o tipo de seleção de pares de genes durante o processo de divergência, como seleção purificadora, positiva e neutra (JURETIC *et al.*, 2005). Razões Ka/Ks abaixo de 1,00 indicam tipos purificantes, enquanto que iguais e acima de 1,00 indicam seleção neutra e positiva, respectivamente. Nesse estudo o Ka, Ks e Ka/Ks dos pares de genes ortólogos foram calculados com base nos resultados da análise da árvore filogenética (Tabela 4). O tempo entre 22 pares ortólogos de genes FaCDPK também foi determinado e observou-se que 12 dos 22 pares de genes FaCDPK ortólogos produziram uma razão Ka/Ks<1,00, indicando

seleção purificadora. No entanto, os 10 genes *FaCDPK* restantes exibiram uma razão $Ka/Ks > 1,00$, o que sugere uma seleção positiva dos pares ortólogos. Além disso, o tempo de divergência e o tempo de duplicação variaram de 0,07 a 8,4 (valores Ks) e 2,4 a 280 milhões de anos atrás (MYA), respectivamente.

Tabela 4: Blocos sintenicos de genes *CDPK* entre *Fragaria* x *ananassa* e *Arabidopsis*

Nome do gene		Ka	Ks	Ka/Ks	Tipo de seleção	Tempo (MYA)
Gene 1	Gene 2					
FaCDPK1	AtCDPK32	0,08	1,81	0,04	Purificadora	60,2
FaCDPK2	FaCDPK3	0,03	0,07	0,47	Positiva	2,4
FaCDPK2	AtCDPK16	0,15	6,13	0,02	Purificadora	204,3
FaCDPK2	AtCDPK18	0,16	2,34	0,07	Positiva	78,1
FaCDPK3	AtCDPK16	0,18	7,53	0,02	Positiva	250,9
FaCDPK3	AtCDPK18	0,16	3,73	0,04	Positiva	124,2
FaCDPK4	FaCDPK11	0,11	0,58	0,18	Purificadora	19,3
FaCDPK4	FaCDPK7	0,16	2,01	0,08	Positiva	66,9
FaCDPK4	AtCDPK33	0,14	3,80	0,04	Purificadora	126,5
FaCDPK4	AtCDPK9	0,14	2,43	0,06	Purificadora	81,0
FaCDPK5	AtCDPK1	0,11	2,99	0,04	Positiva	99,7
FaCDPK5	AtCDPK5	0,11	2,99	0,04	Purificadora	99,7
FaCDPK6	AtCDPK10	0,10	3,32	0,03	Positiva	110,7
FaCDPK6	AtCDPK30	0,10	2,88	0,04	Positiva	95,9
FaCDPK7	FaCDPK11	0,04	0,45	0,11	Positiva	14,9
FaCDPK7	AtCDPK33	0,18	5,45	0,03	Purificadora	181,8
FaCDPK7	AtCDPK9	0,20	3,07	0,07	Purificadora	102,2
FaCDPK9	AtCDPK4	0,17	8,43	0,02	Purificadora	280,9
FaCDPK9	AtCDPK11	0,16	4,98	0,03	Purificadora	165,9
FaCDPK10	AtCDPK3	0,15	4,27	0,04	Positiva	142,3
FaCDPK11	AtCDPK33	0,18	5,34	0,03	Purificadora	177,9
FaCDPK11	AtCDPK9	0,19	3,35	0,06	Purificadora	111,7

Para elucidar os papéis regulatórios das *FaCDPKs* durante o desenvolvimento dos frutos de morango, foi realizada a expressão por RT-qPCR de diferentes estádios de desenvolvimento dos frutos (7, 14, 18, 21, 24 e 28 dias pós-antese). Os resultados mostram que durante o desenvolvimento dos frutos, os maiores níveis de expressão das *FaCDPK3*, *FaCDPK4* e *FaCDPK10* foram no estágio final de maturação (E6), enquanto que as demais foram nos estádios iniciais (E1 ou E2). Somente *FaCDPK3* apresentou um aumento progressivo da expressão durante a maturação dos frutos (Figura 9).

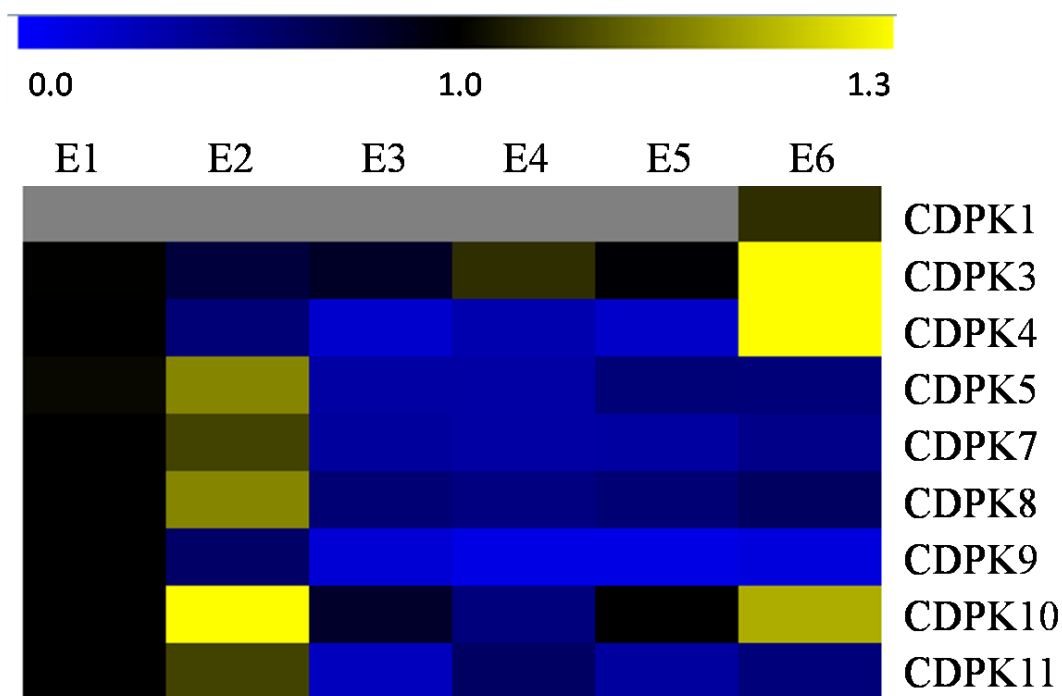


Figura 9: Mapa de cor (Heat map) mostrando a expressão das proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPK) durante os estádios de desenvolvimento dos frutos de morango. E1- 7 dias, E2- 14 dias, E3- 18 dias, E4- 21 dias, E5- 24 dias, E6- 28 dias pós-antese.

As CDPKs vêm sendo relatadas como fatores essenciais na regulação da tolerância das plantas frente a situações de estresses bióticos e abióticos. Neste estudo, foi avaliado o perfil de expressão gênica das *FaCDPKs* em resposta a estresses por déficit hídrico e salinidade (Figura 10). Os resultados mostram que a expressão de 9 *FaCDPKs* foi alterada em função dos tratamentos, sendo que seis destes genes (*FaCDPK1*, *FaCDPK3*, *FaCDPK5*, *FaCDPK6*, *FaCDPK8* e *FaCDPK9*) aumentaram sua expressão mediante o tratamento com sal e três (*FaCDPK4*, *FaCDPK10* e *FaCDPK11*) no estresse por déficit hídrico. Em contrapartida, *FaCDPK5*, *FaCDPK6*, *FaCDPK7* e *FaCDPK8* reduziram seus níveis transcricionais no tratamento por déficit hídrico. Isto sugere que diferentes genes estão envolvidos em respostas a salinidade e déficit hídrico.

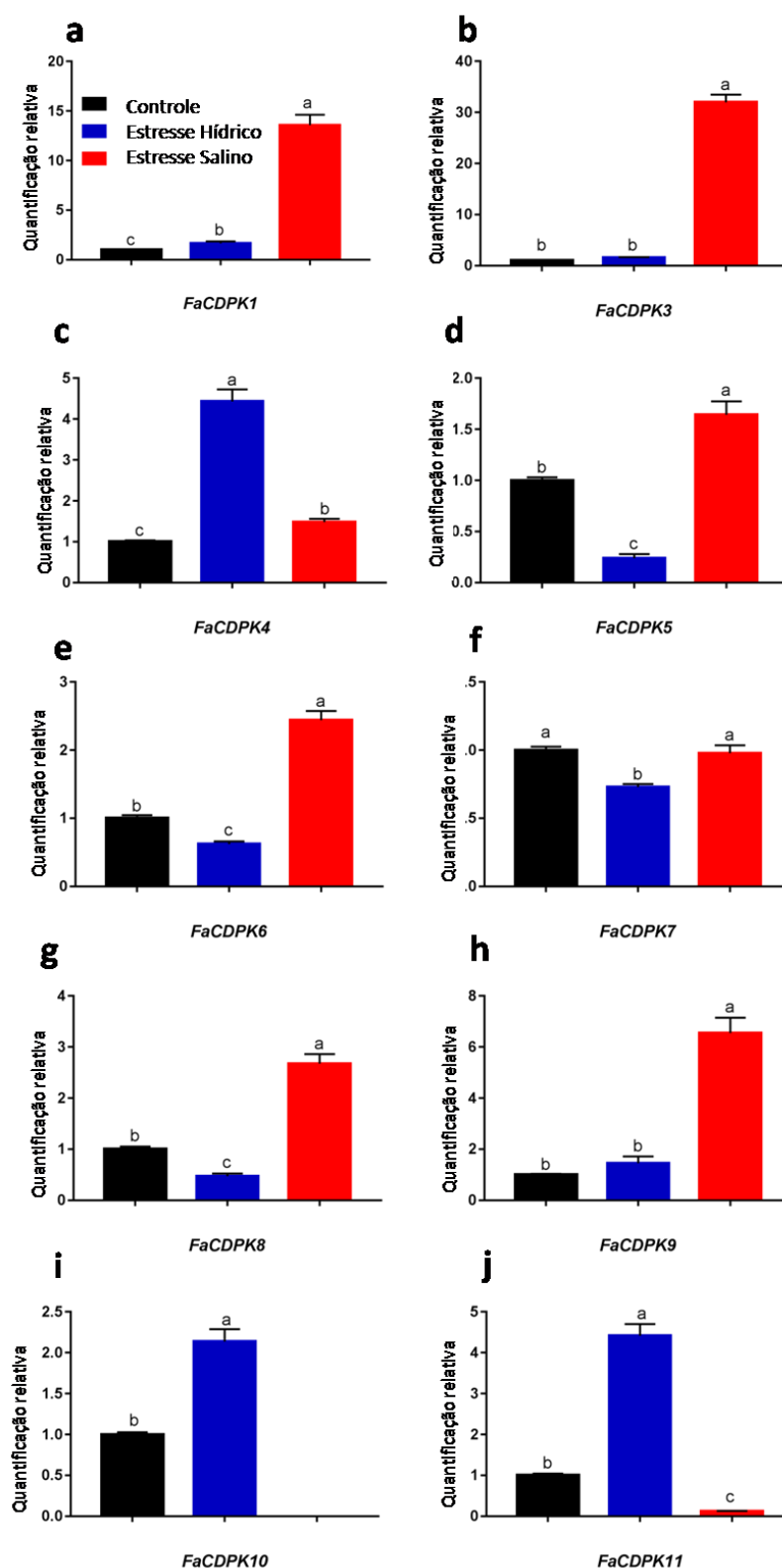


Figura 10: Acúmulo relativo de transcritos de genes que codificam para proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs) identificadas em morangos submetidos à déficit hídrico ou estresse salino. Os valores de quantificação relativa estão expressos em média $\pm$ desvio padrão; medias acompanhadas por letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos para cada um dos genes.

A regulação da tolerância a estresses bióticos e abióticos mediado pelas CDPKs, em alguns casos, vem acompanhada da modulação da sinalização de ácido abscísico (ABA). Para melhor compreender essa relação os níveis de expressão das *FaCDPKs* foram avaliados em frutos de morango que receberam aplicação de ácido abscísico (ABA) e inibidor de ABA [ácido nordihidroguaiarético (NDGA)]. Os resultados mostraram que os genes *FaCDPK4* e *FaCDPK11* aumentaram sua expressão frente aplicação de ABA (Figura 11). A expressão dos genes de *FaCDPK1* e *FaCDPK7* também foi influenciada pela aplicação de ABA e NDGA, entretanto os maiores níveis de expressão foram observados nos frutos que receberam aplicação de NDGA.

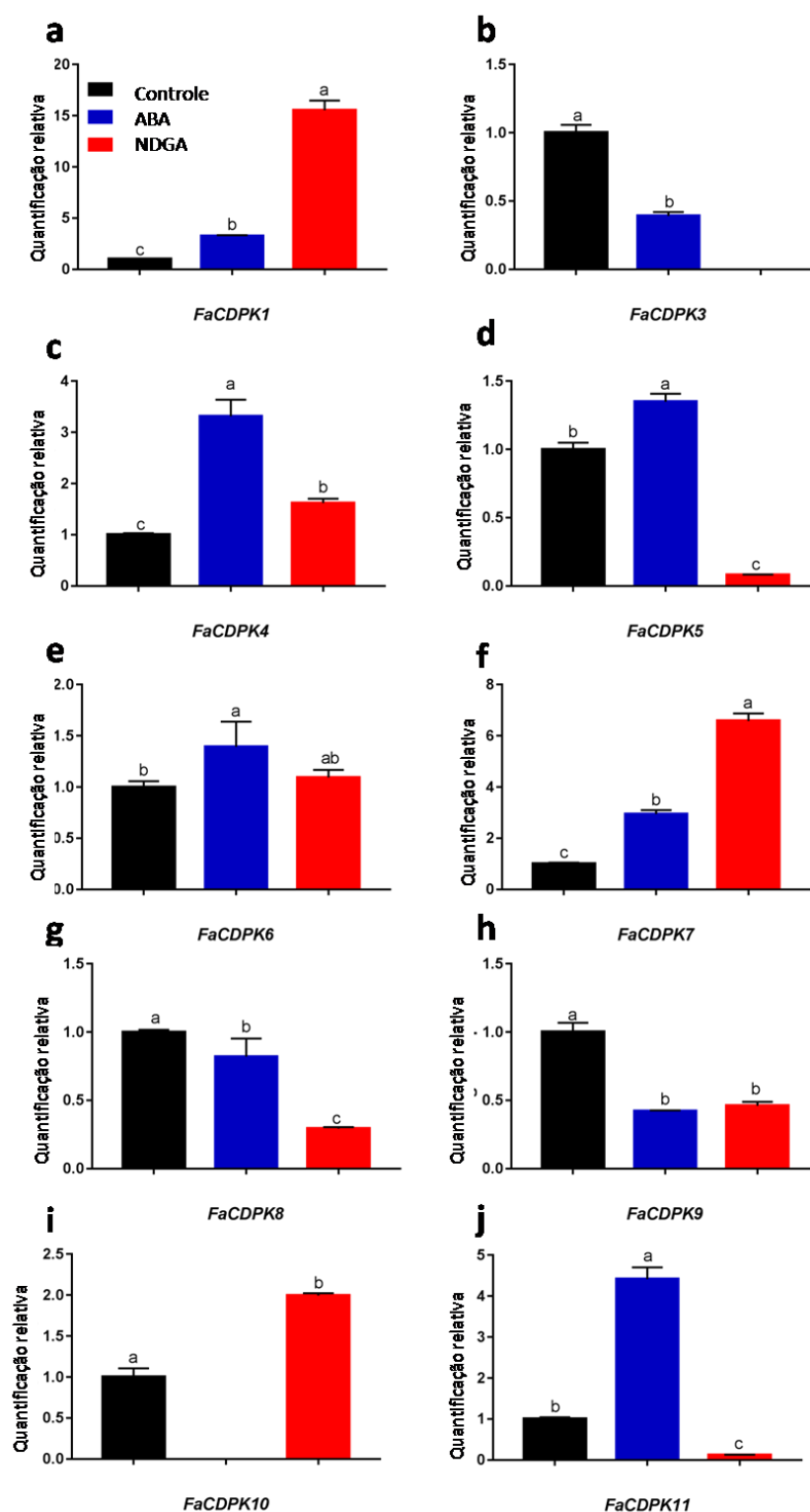


Figura 11: Acúmulo relativo de transcritos de genes que codificam para proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs) identificadas em morangos submetidos a aplicação de ácido abscísico (ABA) e ácido nordihidroguaiarético (NDGA). Os valores de quantificação relativa estão expressos em média $\pm$ desvio padrão; letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos para cada um dos genes.

Os resultados acima indicam um possível envolvimento dos genes *FaCDPK4* e *FaCDPK11* na resposta ao estresse abiótico por meio de interações entre CDPK e outras proteínas. A análise de interação de rede é um método que possibilita estudar a função de genes. Uma rede de interação para proteínas CDPK foi construída com base no gene ortólogo de *Fragaria x vesca* usando ferramentas do banco de dados STRING 10. Assim, descobriu-se que as CDPKs estão envolvidos nas vias de sinalização relacionadas ao crescimento e desenvolvimento da planta e em resposta a estresses abióticos. Observou-se que FvCPK2 (homólogo a *FaCDPK4* de *Fragaria x ananassa*) está associado a várias proteínas homólogas da oxidase respiratória (RBOH), que promovem a eliminação de ROS (Figura 12). O FvCPK2 também interage com a proteína semelhante à calcineurina B (CBL), um regulador positivo das respostas de sal e seca, bem como a pirofosfoquinase de tiamina (TPK) e o canal aniônico tipo S da célula de guarda (SLAC), que estão envolvidos na produção de energia e respostas estomáticas. Da mesma forma, FvCDPK29 (homólogo a *FaCDPK11*) interage com proteínas RBOH. Além disso, o FvCDPK29 interage com a serina descarboxilase (SDC), uma enzima relacionada à formação de fosfolípidios de membrana e um fator de transcrição (Provável fator de transcrição PosF21). FvCDPK29 também interage com serina/treonina proteína quinase semelhante ao receptor LRR (GSO) um regulador de divisão celular e com um cofator de dobramento de tubulina (TFCA), que desempenha papéis na modulação do dobramento de tubulina. Assim, os resultados da análise de rede indicam um possível envolvimento de FvCDPK29 na manutenção da integridade celular. Dada a homologia entre esses CDPKs com *FaCDPK4* e *FaCDPK11*, é possível que esses *FaCDPKs* desempenhem funções semelhantes.

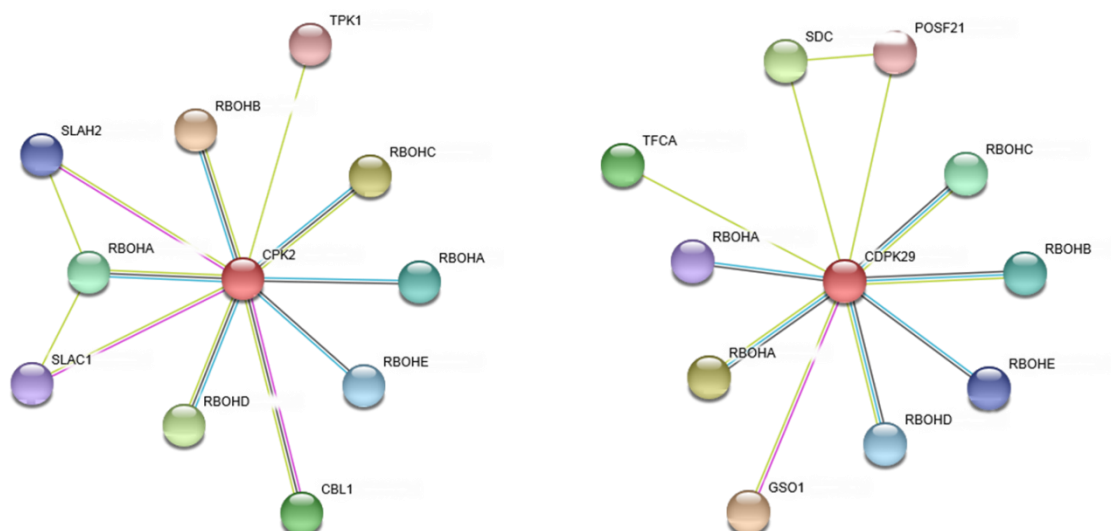


Figura 12: Análise da rede de interação das proteínas FaCDPK4 e FaCDPK11 identificadas em *Fragaria x ananassa*. A análise foi realizada com o respectivo homólogo em *Fragaria vesca* (CPK2 para FaCDPK4 e CDPK29 para FaCDPK11). A cor da linha indica o tipo de interação: a linha preta indica co-expressão; A linha verde indica citação no mesmo texto; A linha azul indica bancos de dados.

3.6 Discussão

A primeira proteína quinase dependente de cálcio (CDPK) foi identificada em ervilha, há mais de 30 anos (HETHERINGTON & TREWAVAS, 1982). Desde então, CDPKs foram identificadas em várias plantas e alguns protozoários (CHENG *et al.*, 2002). Em *F. ananassa*, até o momento, apenas duas sequências codificadoras de CDPKs haviam sido identificadas. Nesse estudo, a análise das sequências genômicas de morango (*F. ananassa*) revelou a presença de 11 genes de CDPK. Em *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* (arroz) já foram identificados 34 genes e 31 genes desta família, respectivamente (ASANO *et al.*, 2005; CHENG *et al.*, 2002).

As CDPKs apresentam em sua estrutura pelo menos um domínio N-terminal variável, um domínio de proteína-quinase, um domínio de junção, um domínio de ligação a Ca^{2+} semelhante à calmodulina e um domínio C-terminal. Nesse estudo, todas as CDPKs analisadas apresentaram sequências completas, incluindo o domínio N-terminal variável, o domínio C terminal, pelo menos um domínio quinase para fosforilação e um domínio *EF-hand*. No entanto, sete das nove novas sequências exibiram um padrão de quatro motivos *EF-hand*, que permitem a ligação de Ca^{2+} , conforme relatado para as CDPKs de *Arabidopsis*, arroz e trigo (EDEL *et al.*, 2017). Esta configuração, contendo domínios *EF-hand* adicionais capazes de se ligar a até quatro íons de cálcio, possivelmente surgiu por meio de dois ciclos de duplicação e fusão gênica, e possibilitou a cooperatividade entre os sítios de ligação de cálcio. Do ponto de vista evolutivo, essa organização estrutural com novas estruturas repetitivas pode ser interpretada como uma forma de obter diferentes movimentos de domínio e, assim, diversificar o reconhecimento molecular (MOHANTA, T. *et al.*, 2019). Os motivos das mãos *EF-hand* existem principalmente em pares para aumentar a estabilidade estrutural. A presença de um único motivo EF-hand, como observado em *FaCDPK3* e *FaCDPK8*, reduz drasticamente a sensibilidade da quinase para a ligação de cálcio, e a subsequente mudança conformacional induzida por cálcio (LIESE; ROMEIS, 2013). Por exemplo, uma redução de 60 vezes na afinidade de ligação para íons Ca^{2+} foi demonstrada em uma CDPK com um único motivo EF-hand em *Plasmodium falciparum* (ZHAO *et al.*, 1994).

Levando em consideração a grande variedade de genes CDPK em plantas, é importante elucidar os fatores que determinam as isoformas que respondem a diferentes sinais, os efeitos na fosforilação de proteínas e nas respostas fisiológicas. A especificidade de sinalização pode ser determinada pela sua localização subcelular, que podem ser reguladas em níveis de tradução e pós-tradução. As previsões *in silico* indicam que as *FaCDPKs* estão localizadas em vários compartimentos celulares, incluindo o cloroplasto, o núcleo, o peroxissoma e o citoplasma. Além disso, também foi predito a maioria das *FaCDPKs* incluem motivos de N-miristoilação e/ou palmitoilação. A presença de um motivo N-miristoilação pode fazer parte de uma sinalização primária que dirige estas proteínas para um sítio de ligação na membrana celular (LU, S. X.; HRABAK, 2013; MARTÍN; BUSCONI, 2000). Além disso, a palmitoilação, outro tipo de modificação lipídica, também foi relatada como necessária para aumentar a estabilidade durante associação às membranas (MARTÍN; BUSCONI, 2000). Motivos de N-miristoilação e palmitoilação foram observados em cinco e seis dos *FaCDPKs* avaliados nesse estudo, respectivamente. No entanto, a associação de CDPKs com a membrana é complexa e pode ser afetada pela presença de outros motivos. Por exemplo, em trigo (*Triticum aestivum* L), *TaCPK3* e *TaCPK15* sem regiões de miristoilação encontravam-se associadas às membranas (LI, Ai Li *et al.*, 2008), enquanto que em milho (*Zea mays*) observou-se que *ZmCPK1*, que foi predita ter um padrão de N-miristoilação foi encontrada no citoplasma e núcleo (WANG, C. T.; SHAO, 2013). Outros estudos mostraram que as localizações subcelulares de CDPKs podem ser restritas a um único compartimento ou amplamente distribuídas por toda a célula. CDPKs já foram observados na membrana plasmática, citoplasma, núcleo, retículo endoplasmático, mitocôndria, cloroplastos, corpos oleosos, peroxissomos e complexo de Golgi (ASAI *et al.*, 2013). Portanto, estudos *in vitro* adicionais são necessários para determinar a localização subcelular de *FaCDPKs*.

Genes originados de um ancestral comum compartilham funções protéicas semelhantes. Assim, uma análise sintênica foi realizada e uma árvore filogenética foi construída a fim de compreender as relações evolutivas entre as CDPKs presentes em *F. ananassa* e *A. thaliana*. Todos os homólogos *FaCDPK* identificados em *Arabidopsis* mostraram alta similaridade de sequência,

indicando um alto nível de conservação e um ancestral comum para cada potencial par ortólogo. Quatro grupos (A, B, C e D), cada um com pelo menos uma contraparte de *Arabidopsis*, foram identificados na árvore filogenética. Essa conformação indica uma conservação funcional de CDPKs entre as duas plantas. Classificação evolutiva semelhante também foi encontrada em outras espécies, como uva, abacaxi, mandioca e arroz (CHEN, F. *et al.*, 2013; HU *et al.*, 2016; RAY *et al.*, 2007; ZHANG, M. *et al.*, 2020). Nesse estudo, FaCDPK4, FaCDPK7 e FaCDPK11 estavam presentes com AtCDPK23 no subgrupo A. AtCDPK23 desempenha papéis importantes nas respostas à seca e ao estresse salino (MA; WU, 2007), sugerindo possível envolvimento de FaCDPK4 e FaCDPK11 em resposta a essas condições de estresse em morango. Em estudo realizado com algodão, observou-se que GrCDPK16, estava associada à tolerância das plantas ao estresse por seca e esta encontrava-se no mesmo grupo da AtCDPK23 (LI, Li bei *et al.*, 2015). AtCPK30 atua como um sensor de Ca^{2+} e está envolvido na sinalização das vias hormonais (YUAN *et al.*, 2007), FaCDPK6 tem identidade de 92% com AtCDPK30, e portanto, pela elevada similaridade pode estar envolvida na sinalização hormonal em morango. Os genes CDPK também estão envolvidos na resistência a diferentes patógenos. Em batata, foi relatado que StCDPK7 contuibui para a resistência contra a infecção por *Phytophthora infestans* (FANTINO *et al.*, 2017). StCDPK7 também foi encontrado no mesmo grupo filogenético que AtCDPK1. Além disso, foi relatado que a superexpressão heteróloga de AtCPK1 em *Arabidopsis thaliana* regula genes de resistência a doenças responsáveis pela proteção de amplo espectro contra a infecção por patógenos (COCA; SAN SEGUNDO, 2010). Assim, a presença de FaCDPK5 no mesmo grupo filogenético que AtCDPK1 sugere que FaCDPK5 pode estar envolvido na resposta à infecção por patógenos em morango. No entanto, são necessárias investigações adicionais para determinar se os homólogos possuem funções semelhantes.

Divergência estrutural, ou seja, a presença e posição de domínios, bem como a organização de exons/íntrons podem indicar uma história evolutiva dentro de uma família de genes, e também estão intimamente relacionadas à função de proteínas (BOUDET *et al.*, 2001; KUDLA; BATISTIC; HASHIMOTO, 2010). Nesse estudo, o número de íntrons variou entre um e sete. A mesma variação foi relatada em cevada e em *Populus trichocarpa* (FEDOROWICZ-

STRONSKA *et al.*, 2017; ZUO *et al.*, 2013), indicando semelhanças na estrutura dos genes de CPDK entre diferentes espécies. Genes com fases de íntron semelhantes compartilham um ancestral comum. Uma mudança na fase do íntron reflete uma divergência de homologia entre os genes durante a evolução. A inserção ou deleção de um pequeno fragmento de DNA pode alterar o transcrito e, assim, levar a uma mudança na função do gene (LONG *et al.*, 1998). Em *Arabidopsis*, a diversidade de estruturas de RNA mostrou surgir devido a um grande número de deleções e adições de íntrons ao ancestral (BOUDET *et al.*, 2001). De acordo com Mittal *et al.*, (2017), a variação na frequência dos íntrons no milho, arroz e sorgo pode ser uma das razões para a diversidade funcional dos CDPKs, pois essa variação aumenta a possibilidade de *splicing* alternativo e embaralhamento de exon. No entanto, as informações da literatura sobre a edição de *splicing* alternativo de CDPK são muito limitadas. Nishiyama *et al.*, (1999) relataram um *splicing* alternativo de um gene CDPK, em que as sequências do motivo EF-hand foram modificadas. Almadanim *et al.*, (2018) mostraram que OsCPK13, OsCPK17, OsCPK18 e OsCPK19 produziram transcritos com *splicing* alternativo em arroz, que codificam proteínas truncadas sem domínios inteiros ou parciais com diferentes funções biológicas. Similarmente, Ding *et al.*, (2020) detectaram duas transcrições de CsCDPK1 em *C. sinensis* usando RT-qPCR. A identificação de variantes de *splicing* alternativo em transcrições de CDPK é particularmente importante para o desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas com tolerância ao estresse biótico e abiótico. Portanto, estudos futuros para identificar variantes de *splicing* de genes CDPK e o impacto em sua diversidade funcional são relevantes.

Levando em consideração que as isoformas de CDPKs diferem em seu domínio variável N-terminal, localização subcelular, parâmetros cinéticos, especificidade do substrato, dependência de Ca^{2+} para sua atividade quinase e padrões de expressão, distintas isoformas desta família podem ser capazes de perceber diferentes estímulos e responder com especificidade (FANTINO *et al.*, 2017). A especificidade e os padrões de expressão gênica são claramente alterados durante os estágios de desenvolvimento da planta (SIMEUNOVIC *et al.*, 2016). Nesse estudo, *FaCDPK1* não foi detectado em frutos jovens. Esse resultado está de acordo com o relatado por Llop-tous, (2002), que observou

que a *FaCDPK1* só foi expressa na fase final de desenvolvimento do fruto (28 DAA); no entanto, os níveis de transcritos se acumularam quando os frutos se tornaram brancos. Além disso, a expressão desse gene demonstrou níveis crescentes durante a maturação dos frutos. Nesse estudo, o aumento de expressão durante o amadurecimento dos frutos foi observado apenas para *FaCDPK3*. Li *et al.*, (2015) também observaram resultados semelhantes em algodão (*Gossypium raimondii*), em que apenas a expressão de *GrCDPK11* aumentou durante o desenvolvimento do fruto. Os níveis de expressão dos outros *GrCDPKs* permaneceram inalterados ou diminuíram. O processo de amadurecimento do morango envolve uma série de eventos moleculares e fisiológicos que levam a modificações no tamanho, cor, textura, sabor e aroma da fruta. Portanto, compreender os mecanismos subjacentes a este processo é essencial para alcançar a qualidade ideal da fruta, bem como uma longa vida de prateleira. Estudos transcriptômicos, metabolômicos e de silenciamento gênico demonstraram que esse processo em frutas não-climatéricas, como o morango, é dependente de ABA (JIA *et al.*, 2011) e desencadeado por uma cascata de sinalização envolvendo cálcio (Ca^{2+}) e proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs) (VIGHI *et al.*, 2019). A expressão aumentada de *FaCDPK3* indica um possível papel durante o processo de maturação do morango. No entanto, mais estudos são necessários para estabelecer a dependência de ABA desse processo.

Além do tecido e do estágio de desenvolvimento, diferentes estímulos determinam quais isoformas serão ativadas ou inativadas e qual será seu papel neste cenário. Por exemplo, *OsCDPK4* confere tolerância ao sal e à seca ao arroz (CAMPO *et al.*, 2014), enquanto *ZmCDPK1* desempenha um papel regulador vital na resposta ao estresse abiótico do milho (WANG, C. T.; SHAO, 2013). A seca e a salinidade do solo afetam negativamente o crescimento das plantas e a produção agrícola. Portanto, um melhor entendimento da resposta molecular contra esses estresses é necessário para o desenvolvimento de cultivares mais resistentes. O morango é geralmente considerado moderadamente sensível a altos níveis de sal. No entanto, a cultivar Camarosa utilizada neste estudo é considerada tolerante à seca e ao estresse salino em comparação com outras cultivares (AL-SHORAFA; MAHADEEN; AL-ABSI, 2014; GHASEMI *et al.*, 2018). Por exemplo, os níveis de estresse usados neste

estudo não resultaram em necrose, desidratação extensa ou morte de plantas. Por outro lado, as plantas mostraram resposta ao estresse, conforme evidenciado pelos resultados da análise RT-qPCR mostrando aumentos nos níveis de expressão de *FaCDPK1*, *FaCDPK3*, *FaCDPK4*, *FaCDPK5*, *FaCDPK6*, *FaCDPK8* e *FaCDPK9* após tratamento com sal, enquanto os de *FaCDPK4*, *FaCDPK10* e *FaCDPK11* aumentaram os níveis de expressão em condições de seca. Este resultado sugere que as proteínas FaCDPK desempenham papéis na tolerância desta cultivar à salinidade e ao déficit hídrico, e corrobora as relações entre sequência, estrutura e função da proteína. *FaCDPK4*, *FaCDPK10* e *FaCDPK11* foram agrupados no mesmo subgrupo filogenético (A) que *AtCDPK23*, que foi relatado como envolvido na tolerância à seca de *Arabidopsis* (MA; WU, 2007). Embora o estresse osmótico seja causado tanto por estresse salino quanto por seca, o acúmulo excessivo de íons Na^+ e Cl^- também pode ocorrer sob alta salinidade devido à disponibilidade reduzida de água no solo. O acúmulo de Na^+ e Cl^- também é prejudicial aos processos bioquímicos e leva à clorose e necrose. *FaCDPK4* foi o único gene de CDPK superexpresso em ambas as condições experimentais. *FaCDPK4* pode, portanto, estar associado a respostas fisiológicas desencadeadas por ambos os estresses, como a regulação do movimento estomático e a repressão do crescimento celular e da fotossíntese. Como exemplo, a *AtCPK1* contribui para a tolerância ao estresse salino e hídrico por meio da diminuição da produção de H_2O_2 e malondialdeído e do aumento do acúmulo de prolina (HUANG *et al.*, 2018). Uma vez que a maioria dos genes CDPK foram expressos diferencialmente entre essas condições de estresse, e devido às especificidades de substrato variáveis das isoformas de CDPK, esse resultado sugere que plantas de morango são capazes de responder diferencialmente a esses estresses e a cascata de quinase formada pelas proteínas CDPK podem ter um papel nessa resposta diferencial.

Embora as plantas usem mecanismos de resposta intimamente relacionados contra a salinidade e a seca, os efeitos desse estresse nas plantas não são idênticos. Mudanças no potencial osmótico observadas em ambos os estresses parecem desencadear a indução de diferentes CDPKs. Por exemplo, a tolerância à seca e ao estresse salino em *Morus atropurpurea* foi relatada como estando relacionada à interação de *MaCDPK1* com

elementos de resposta ABA (elementos MBS, ABRE e motivo GARE) (CAO *et al.*, 2020). No entanto, as cópias de CDPK e a indução da cascata de fosforilação podem diferir entre esses dois agentes estressores. Em *Poncirus trifoliata*, a superexpressão de *PtrCDPK10* resultou em maior tolerância ao déficit hídrico em comparação com o tipo selvagem devido à interação de *PtrCDPK10* com ascorbato peroxidase (*PtrAPX*), o que levou a uma redução no acúmulo de ROS (MENG *et al.*, 2020). Em contraste, *OsCDPK21* mostrou desempenhar um papel crucial na adaptação ao estresse salino no arroz por meio da fosforilação de *OsGF14*. Na videira, *VaCPK21* pode atuar como um regulador positivo envolvido na resposta ao estresse salino (DUBROVINA *et al.*, 2016). *MaCDPK363* e *AtCDPK27* desempenham funções semelhantes em banana e *Arabidopsis*, respectivamente (WANG, Z. *et al.*, 2016; ZHAO, R. *et al.*, 2015).

As respostas das plantas às condições de estresse ocorrem por meio de várias redes de transdução de sinal, e o ácido abscísico (ABA) desempenha um papel crucial nessas respostas. O ABA atua principalmente como um regulador do balanço hídrico da planta e da tolerância ao estresse osmótico (DAR *et al.*, 2017). As isoformas de CDPK também mostraram diferir em sua afinidade por Ca^{2+} , e o influxo de cálcio gerado pelo ABA é um dos determinantes da indução de CDPKs (VIGHI *et al.*, 2019). Como exemplo, ZHANG *et al.*, (2014) realizaram uma análise dos transcritos de 21 genes *BnaCDPK* em mudas de canola após diferentes tratamentos sob condições de estresse abiótico e descobriram que diferentes genes CDPK podem participar dos processos de sinalização de um único fator de estresse, e um único gene CDPK provavelmente desempenha um papel em múltiplas respostas ao estresse. De forma concordante, no arroz, o *OsCDPK4* desempenha um papel positivo na tolerância ao estresse salino e ao déficit hídrico através da proteção da membrana contra a peroxidação lipídica (CAMPO *et al.*, 2014). Enquanto o *OsCPK12* aumenta a tolerância ao sal, reduzindo os níveis de ROS, sugerindo que diferentes cópias trabalham em múltiplas vias de sinalização para regular positivamente a tolerância ao sal (ASANO *et al.*, 2012a).

Nesse estudo, *FaCDPK4* e *FaCDPK11* apresentaram os mais altos níveis de expressão frente ao déficit hídrico, e esses genes também foram as cópias com melhor resposta ao tratamento com ABA. Isso sugere que esses genes

desempenham papéis importantes na resposta ao déficit hídrico, e o mecanismo de resposta é dependente de ABA. Essa relação também foi observada em *Arabidopsis*, em que mutantes sem expressão de *AtCDPK10* foram prejudicados em sua capacidade de inibir a abertura estomática induzida por ABA. Em um estudo de Zhu *et al.*, (2007), *AtCPK4* e *AtCPK11* mostraram regular positivamente a sinalização ABA por meio da fosforilação dos fatores de transcrição responsivos ao estresse ABF1 e ABF4. O ABA também demonstrou ativar a proteína quinase dependente de cálcio (ACPK1) no mesocarpo da uva por meio de um mecanismo complexo que envolve o influxo de cálcio para o citosol (YU *et al.*, 2006). Portanto, as variações na descarga do sinal de Ca^{2+} induzida por ABA (concentração, tamanho, distribuição temporal de picos ou ondas) podem resultar em transdução de sinal específico para induzir a expressão de genes específicos de CDPK. Consequentemente, a proteína CDPK induzida desempenha papéis específicos dependendo do tipo de estresse infligido por meio da fosforilação de substratos específicos.

Os estresses salino e hídrico aumentam o conteúdo de compostos fenólicos e antocianínicos, bem como a expressão de genes em vias metabólicas relacionadas (GALLI *et al.*, 2016; PERIN *et al.*, 2019). O teor de ABA também aumenta em frutos de morango sob estresse salino e hídrico; no entanto, os genes relacionados à biossíntese de ABA (*FaNCEDs*, *FaCYP707As*, *FaGTs* e *FaBGs*) são regulados positivamente apenas em frutas estressadas por seca (PERIN *et al.*, 2019). Da mesma forma, apenas o déficit hídrico aumentou as concentrações de ácido ascórbico, açúcares e metilsiringina, enquanto o estresse salino induziu a síntese de aminoácidos nas frutas (ANTUNES *et al.*, 2019; GALLI *et al.*, 2018). Um mecanismo de resposta ao sal e à seca em frutos de morango com base nesses resultados anteriores e nos dados de expressão gênica deste estudo é mostrado na Figura 13. A resposta ao estresse salino foi encontrada para ser mediada por vários *FaCDPKs*, em particular *FaCDPK1* e *FaCDPK3* através de um mecanismo independente de ABA. Em contraste, *FaCDPK4* e *FaCDPK11* estão envolvidos na tolerância ao déficit hídrico e utilizam ABA como molécula de sinalização para aumentar o conteúdo de compostos fenólicos, antocianinas, ácido ascórbico e açúcares.

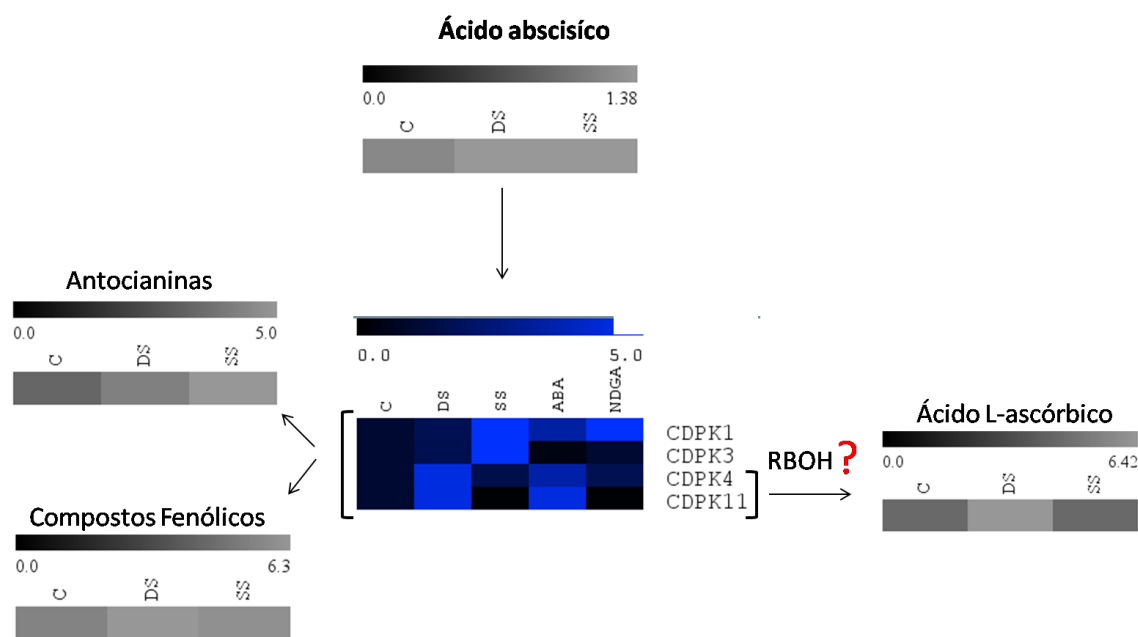


Figura 13: Esquema simplificado de possíveis atuações de CDPK sob condições de estresse osmótico.

Os resultados desse estudo sugerem um envolvimento de *FaCDPKs* na resposta ao estresse do sal e da seca. Vários outros estudos relataram que os CDPKs desempenham papéis importantes na tolerância ao estresse abiótico (ASANO *et al.*, 2012b; KARDILE *et al.*, 2018). No entanto, os mecanismos bioquímicos subjacentes ainda são desconhecidos. A determinação das interações proteína-proteína é um passo essencial para a compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da tolerância aos estresses abióticos. A resposta ao estresse envolve a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e pode induzir o fluxo de cálcio para a célula. Ambas as moléculas de sinalização induzem eventos de sinalização a jusante que resultam na ativação de proteínas sensoras de Ca^{2+} incluindo CDPK, bem como a enzima produtora de ROS e *Respiratory Burst Oxidase Homolog* (RBOH) (VIGHI *et al.*, 2019).

Os genes *FaCDPK4* e *FaCDPK11* provavelmente estiveram envolvidos na resposta ao estresse abiótico, especialmente na seca, e a rede de interação com base na análise de co-expressão revelou que *FaCDPK4* e *FaCDPK11* estavam possivelmente associados a RBOHs. RBOHs são proteínas integrais de membrana que geram ânions superóxidos, que são então convertidos em

H₂O₂. Além disso, as proteínas RBOH contêm dois motivos de mão EF de ligação ao cálcio e vários locais de fosforilação em seus terminais N que participam da regulação da atividade enzimática. Além de seus papéis nas respostas aos estresses abióticos, os RBOH desempenham papéis fundamentais em diversos processos metabólicos, como crescimento celular e respostas de hipersensibilidade (FOREMAN *et al.*, 2003). As RBOHs são expressas diferencialmente de acordo com o tecido e o estágio de desenvolvimento (TORRES; DANGL, 2005). Além disso, diferentes estímulos determinam quais isoformas serão ativadas/inativadas (VALMONTE *et al.*, 2014). Por exemplo, em *Arabidopsis*, descobriu-se que *AtRBOHD* é responsável pela geração de ROS em resposta à infecção por patógenos (ANGEL *et al.*, 2015). No morango, o *FvRBOHA* e o *FvRBOHD* são necessários para o acúmulo de ROS durante a resposta de defesa da planta ao estresse pelo frio (ZHANG, Y. *et al.*, 2018). Da mesma forma, os níveis de expressão de *VvRBOHA*, *VvRBOHB* e *VvRBOHC1* foram significativamente aumentados em uvas após tratamentos com sal e déficit hídrico. Além disso, *VvRBOHB* foi regulado positivamente por tratamentos ABA exógenos (CHENG, C. *et al.*, 2013). No presente estudo, *FaCDPK4* e *FaCDPK11* foram responsivos à seca e aos tratamentos com ABA. Isso sugere que a resposta ao estresse envolve a captação/síntese celular de ABA e Ca²⁺, e podem induzir uma sinalização a jusante que resulta no aumento da produção de H₂O₂ pelas RBOH e consequente a indução de ácido ascórbico para mitigar a produção de ROS (CHOUDHURY *et al.*, 2017).

Além das proteínas RBOH, uma proteína semelhante à calcineurina B (CBL) foi destaque na rede de interação da *FaCDPK4*. CBL são proteínas sensoras de cálcio que se integram e interagem especificamente com uma família de proteínas quinases (CIPKs) (BATISTIČ; KUDLA, 2009). Os CBL-CIPKs estão envolvidos nas respostas ao estresse abiótico, além do crescimento e desenvolvimento das plantas (CHEN, Liang *et al.*, 2013; LUO *et al.*, 2017). A resposta ao estresse mediada por CBL-CIPKs também mostrou ser dependente de ABA em vários estudos (PANDEY, G. K. *et al.*, 2015; TRIPATHI *et al.*, 2009).

FaCDPK4 também mostrou um padrão de expressão semelhante ao da tiamina pirofosfoquinase (TPK), uma proteína responsável pela ativação do

pirofosfato de tiamina e um cofator essencial de várias enzimas que participam do metabolismo de carboidratos e aminoácidos (RAPALA-KOZIK; GO; KUJDA, 2009). Além disso, a tiamina também confere resistência sistêmica adquirida (RSA) a várias plantas, como arroz (*Oryza sativa*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), pepino (*Cucumis sativus*) e *Arabidopsis* (AHN; KIM; LEE, 2005). Em *Arabidopsis*, foi demonstrado que esse processo é dependente das vias de sinalização relacionadas ao ácido salicílico e ao Ca^{2+} (AHN *et al.*, 2007).

Outra proteína identificada na rede de interação FaCDPK4 é o canal aniônico tipo S da célula de guarda (SLAC). SLAC desempenha papéis importantes na sinalização de estresse e hormônio, bem como no crescimento e desenvolvimento das plantas (CHEN, G. *et al.*, 2018). A SLCA1 também é uma proteína essencial para a abertura estomática e é ativada por ABA e Ca^{2+} citosólico. Os canais SLAC1 também são ativados por CDPKs (ASSMANN; JEGLA, 2016). Como exemplo, as células-guarda de *A. thaliana* com os genes *CDPK3* e *CDPK6* silenciados mostraram ativação reduzida dos canais iônicos de Ca^{2+} e ABA, e o fechamento estomático foi parcialmente prejudicado (MORI *et al.*, 2006).

Semelhante a FaCDPK4, as proteínas mais proeminentes na rede de interação de proteínas para FaCDPK11 foram as RBOHs. No entanto, várias outras proteínas também se destacaram, como a serina descarboxilase (SDC). SDC é responsável pela conversão de serina em etanolamina, um precursor de fosfolipídios em plantas (LIU, Y. *et al.*, 2018). Fosfolipídios são componentes essenciais das membranas biológicas e atuam na transdução de sinal em plantas (NAKAMURA, 2017). Os fosfolipídios também influenciam na sensibilidade das CDPK ao cálcio. Em milho a interação das quinases com os fosfolipídios mostrou diminuir sua necessidade de cálcio (SZCZEGIELNIAK *et al.*, 2000). Além disso, FaCDPK11 interagiu com o provável fator de transcrição (POSF)/zíper de leucina básico (bZIP). Os bZIPs estão envolvidos em vários processos celulares relacionados ao desenvolvimento das plantas, sinalização ambiental e resposta ao estresse (DROGE-LASER *et al.*, 2018). Os bZIPs são parte de uma rede de sinalização complexa envolvendo ABA e CDPK na resposta ao estresse abiótico. Na presença de ABA, a classe de receptores PYR sequestra PP2C, que por sua vez libera SnRK2. Como resultado, SnRK2

ativa CDPK e resulta em uma cascata de fosforilação envolvendo bZIP (BANERJEE; ROYCHOUDHURY, 2017). Em *Arabidopsis*, três CDPKs (CDPK4, CDPK6 e CDPK33) fosforilam bZIP de forma eficiente (KAWAMOTO *et al.*, 2015).

FaCDPK11 também pode estar associado com a serina/treonina-proteína quinase semelhante ao receptor LRR (GSO). As GSOs são proteínas transmembrana envolvidas em vários processos fisiológicos, incluindo desenvolvimento, respostas ao estresse, percepção de hormônios e resistência a doenças (PASSRICHA *et al.*, 2019). Sob condições de estresse abiótico, as GSOs percebem os ligantes extracelulares e ativam as vias a jusante por meio da fosforilação dos domínios intracelulares de serina/treonina quinase (FENG, L. *et al.*, 2014). GSO também desempenha um papel importante no processo de amadurecimento junto com ABA. O silenciamento de *FaRIPK1* inibiu o amadurecimento e reduziu a expressão de vários genes envolvidos no amolecimento, produção de açúcar, pigmentação e biossíntese e sinalização de ABA em plantas de morango (HOU; XU; SHEN, 2018).

Em resumo, todas as proteínas destacadas nas redes de interação FaCDPK4 e FaCDPK11 têm papéis bem documentados nas respostas das plantas ao estresse por meio da sinalização de Ca^{2+} . Essas respostas envolvem direta ou indiretamente o fitohormônio ABA. A única proteína na rede de interação FaCDPK11 sem *crosstalk* evidente com ABA e resposta ao estresse é o cofator de dobramento de tubulina (TFCA). O TFCA está envolvido na biogênese dos microtúbulos e, portanto, influencia diretamente o crescimento celular (KIRIK *et al.*, 2002). Em *Arabidopsis*, a necessidade de TFCA foi demonstrada para a formação de células tricomas (CHEN, Liangliang *et al.*, 2016). No entanto, estudos *in vivo* adicionais são necessários para validar a existência dessa interação prevista pela análise de rede de interação *in silico*.

3.7 Considerações finais

Este estudo possibilitou a identificação de nove novas cópias da família gênica das *CDPKs* em *Fragaria x ananassa* por meio da análise da estrutura do genoma e caracterização filogenética. Essas novas cópias foram classificadas em quatro grupos principais, com base na análise filogenética e nas características estruturais. Os perfis de expressão das *FaCDPKs* identificados durante o desenvolvimento e amadurecimento dos frutos indicaram que apenas a expressão de *FaCDPK3* aumentou durante o amadurecimento dos frutos. A caracterização do acúmulo de mRNA em condições de estresse salino e hídrico revelou que diferentes genes de *FaCDPK* atuam em respostas aos estresses osmóticos. As cópias *FaCDPK1* e *FaCDPK3* foram influenciadas pelo estresse salino, enquanto que *FaCDPK4* e *FaCDPK11* foram significativamente influenciadas pelo déficit hídrico e pelo tratamento com ABA, sugerindo o envolvimento desse fitohormônio na resposta à seca mediada por essas proteínas. Além disso, a análise da rede de interação proteína-proteína destacou algumas proteínas envolvidas na resposta ao estresse e que são dependentes de ABA e Ca^{2+} , especialmente RBOHs. Futuros estudos permitirão elucidar o papel das *FaCDPKs*, visando o desenvolvimento de frutos biofortificados e tolerantes ao estresse.

8. Referências Bibliográficas

- AHN, I. *et al.* Vitamin B 1 -Induced priming is dependent on hydrogen peroxide and the NPR1 Gene in Arabidopsis 1. **Plant Physiology**, v. 143, p. 838–848, 2007.
- AHN, I.; KIM, S.; LEE, Y. Vitamin B 1 functions as an activator of plant disease resistance. **Plant Physiology**, v. 138, p. 1505–1515, 2005.
- AL-SHORAF, W.; MAHADEEN, A.; AL-ABSI, K. Evaluation for salt stress tolerance in two strawberry cultivars. **American Journal of Agricultural and Biological Science**, v. 9, n. 3, p. 334–341, 2014.
- ALLWOOD, E. G. *et al.* Phosphorylation of phenylalanine ammonia-lyase : evidence for a novel protein kinase and identification of the phosphorylated residue. **FEBS Letters**, v. 457, p. 47–52, 1999.
- ALLWOOD, E. G. *et al.* Regulation of CDPKs , including identification of PAL kinase , in biotically stressed cells of French bean. **Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 533–544, 2002.
- ALMADANIM, M. C. *et al.* The rice cold-responsive calcium-dependent protein kinase OsCPK17 is regulated by alternative splicing and post-translational modifications. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1865, n. 2, p. 231–246, 2018.
- ANGEL, M. *et al.* Arabidopsis gp91phox homologs AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 1, p. 517–522, 2015.
- ANTUNES, A. C. N. *et al.* Untargeted metabolomics of strawberry (*Fragaria x ananassa* 'Camarosa') fruit from plants grown under osmotic stress conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, p. 6973–6980, 2019.
- ARFAOUI, A. *et al.* Pre-treatment with calcium enhanced defense-related genes' expression in the soybean's isoflavones pathway in response to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 93, p. 12–21, 2016.
- ASAI, S. *et al.* The variable domain of a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK) confers subcellular localization and substrate recognition for NADPH oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 20, p. 14332–14340, 2013.
- ASANO, T. *et al.* A rice calcium-dependent protein kinase OsCPK12 oppositely modulates salt-stress tolerance and blast disease resistance. **Plant Journal**, v. 69, n. 1, p. 26–36, 2012a.
- ASANO, T. *et al.* CDPK-mediated abiotic stress signaling. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 7, p. 817–821, 2012b.

- ASANO, T. *et al.* Genome-wide identification of the rice calcium-dependent protein kinase and its closely related kinase gene families: Comprehensive analysis of the CDPKs gene family in rice. **Plant and Cell Physiology**, v. 46, n. 2, p. 356–366, 2005.
- ASSMANN, S. M.; JEGLA, T. Guard cell sensory systems : recent insights on stomatal responses to light , abscisic acid, and CO₂. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 33, p. 157–167, 2016.
- ATKINSON, N. J.; URWIN, P. E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: From genes to the field. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 10, p. 3523–3544, 2012.
- AYUB, R. A. *et al.* Absciscic acid involvement on expression of related gene and phytochemicals during ripening in strawberry fruit *Fragaria × ananassa* cv. Camino Real. **Scientia Horticulturae**, v. 203, p. 178–184, 2016.
- BANERJEE, A.; ROYCHOUDHURY, A. Absciscic-acid-dependent basic leucine zipper (bZIP) transcription factors in plant abiotic stress. **Protoplasma**, v. 254, p. 3–16, 2017.
- BATISTIČ, O.; KUDLA, J. Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1793, n. 6, p. 985–992, 2009.
- BOLWELL, G. P. A role for phosphorylation in the down-regulation of phenylalanine ammonia-lyase in suspension-cultured cells of french bean. **Phytochemistry**, v. 31, n. 12, p. 4081–4086, 1992.
- BOUDET, N. *et al.* Evolution of intron/exon structure of DEAD helicase family genes evolution of intron / exon structure of DEAD helicase family genes in Arabidopsis, Caenorhabditis, and Drosophila. **Genome Research**, v. 11, p. 2101–2114, 2001.
- CAMPO, S. *et al.* Overexpression of a calcium-dependent protein kinase confers salt and drought tolerance in rice by preventing membrane lipid peroxidation. **Plant Physiology**, v. 165, n. 2, p. 688–704, 2014.
- CAO, Z. *et al.* Functional characteristics of a calcium-dependent protein kinase (MaCDPK1) enduring stress tolerance from *Morus atropurpurea* Roxb. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 141, n. 1, p. 131–143, 2020.
- CASTELLARIN, S. D.; DI GASPERO, G. Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in extreme phenotypes for berry pigmentation of naturally occurring grapevines. **BMC Plant Biology**, v. 7, p. 1–10, 2007.
- CHAI, Y. M. *et al.* FaPYR1 is involved in strawberry fruit ripening. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 14, p. 5079–5089, 2011.
- CHALKER-SCOTT, L. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. **Photochemistry and Photobiology**, v. 70, n. 1, p. 1–9, 1999.

- CHEN, F. *et al.* The evolutionary history and diverse physiological roles of the grapevine calcium-dependent protein kinase gene family. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.
- CHEN, G. *et al.* Genomics Genome-wide survey and expression analysis of the SLAC / SLAH gene family in pear (*Pyrus bretschneideri*) and other members of the Rosaceae. **Genomics**, p. 0–1, 2018.
- CHEN, J. *et al.* Detachment-accelerated ripening and senescence of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch. cv. Akihime) fruit and the regulation role of multiple phytohormones. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 9, p. 2441–2451, 2014.
- CHEN, J. *et al.* Transcriptome profiling of postharvest strawberry fruit in response to exogenous auxin and abscisic acid. **Planta**, v. 243, n. 1, p. 183–197, 2016.
- CHEN, L. *et al.* Arabidopsis CBL-interacting protein kinase (CIPK6) is involved in plant response to salt/osmotic stress and ABA. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 8, p. 4759–4767, 2013.
- CHEN, L. *et al.* Interacts with KCBP / ZWICHEL to Regulate trichome cell shape in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS Genetics**, v. 1, p. 1–21, 2016.
- CHENG, C. *et al.* Genome-wide analysis of respiratory burst oxidase homologs in grape (*Vitis vinifera* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 12, p. 24169–24186, 2013.
- CHENG, S. *et al.* Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active Arabidopsis CDPK expressed in maize protoplasts. **FEBS letters**, v. 503, p. 185–188, 2001.
- CHENG, S. *et al.* Update on calcium signaling through protein kinases . The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family 1. **Plant Physiology**, v. 129, p. 469–485, 2002.
- CHITARRA, M. I.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2ed. Lavras: Ed. UFLA, 2005. p. 785.
- CHOUDHURY, F. K. *et al.* Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. **Plant Journal**, v. 90, n. 5, p. 856–867, 2017.
- COCA, M.; SAN SEGUNDO, B. AtCPK1 calcium-dependent protein kinase mediates pathogen resistance in Arabidopsis. **Plant Journal**, v. 63, n. 3, p. 526–540, 2010.
- CUTLER, S. R. *et al.* **Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network**. [S. l.: s. n.], 2010. ISSN 1543-5008.v. 61
- DAR, N. A. *et al.* Abscisic acid: A key regulator of abiotic stress tolerance in plants. **Plant Gene**, v. 11, p. 106–111, 2017.

- DAYOD, M. *et al.* Calcium storage in plants and the implications for calcium biofortification. **Protoplasma**, v. 247, n. 3, p. 215–231, 2010.
- DELUC, L. G. *et al.* Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavor and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay. **BMC Genomics**, v. 10, p. 1–33, 2009.
- DING, Y. *et al.* Alternative splicing in tea plants was extensively triggered by drought, heat and their combined stresses. **PeerJ**, v. 2020, n. 1, 2020.
- DROGE-LASER, W. *et al.* The Arabidopsis bZIP transcription factor family — an update. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 45, p. 36–49, 2018.
- DUBROVINA, A. S. *et al.* VaCPK21, a calcium-dependent protein kinase gene of wild grapevine *Vitis amurensis* Rupr., is involved in grape response to salt stress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 124, n. 1, p. 137–150, 2016.
- EDEL, K. H. *et al.* The evolution of calcium-based signalling in plants. **Current Biology**, v. 27, n. 13, p. 667–679, 2017.
- FAIT, A. *et al.* Reconfiguration of the achene and receptacle metabolic networks during strawberry fruit development. **Plant Physiology**, v. 148, p. 730–750, 2008.
- FANTINO, E. *et al.* Analysis of the potato calcium-dependent protein kinase family and characterization of StCDPK7, a member induced upon infection with *Phytophthora infestans*. **Plant Cell Reports**, v. 36, n. 7, p. 1137–1157, 2017.
- FEDOROWICZ-STROŃSKA, O. *et al.* Genome-wide identification, characterisation and expression profiles of calcium-dependent protein kinase genes in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Applied Genetics**, v. 58, n. 1, p. 11–22, 2017.
- FENG, J. *et al.* Isolation and Characterization of a Calcium-Dependent Protein Kinase Gene, FvCDPK1, Responsive to Abiotic Stress in Woodland Strawberry (*Fragaria vesca*). **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 31, n. 2, p. 443–456, 2013.
- FENG, L. *et al.* Leucine-Rich repeat receptor-like kinase FON1 regulates drought stress and seed germination by activating the expression of ABA-responsive genes in rice. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 32, p. 1158–1168, 2014.
- FOREMAN, J. *et al.* Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. **Nature**, v. 422, p. 442–446, 2003.
- GALLI, V. *et al.* Mild salt stress improves strawberry fruit quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 693–699, 2016.
- GALLI, V. *et al.* Transcriptome analysis of strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits under osmotic stresses and identification of genes related to ascorbic acid pathway. **Physiologia Plantarum**, v. 166, p. 979–995, 2018.

GALLI, V. *et al.* Validation of reference genes for accurate normalization of gene expression for real time-quantitative PCR in strawberry fruits using different cultivars and osmotic stresses. **Gene**, v. 554, n. 2, p. 205–214, 2015.

GAO, X.; COX JR., K.; HE, P. Functions of calcium-dependent protein kinases in plant innate immunity. **Plants**, v. 3, n. 1, p. 160–176, 2014.

GHASEMI, H. *et al.* Response of some strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) cultivars to deficit irrigation regarding leaf area and some quantitative and qualitative characteristics of fruit. **Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture**, v. 9, n. 1, p. 25–39, 2018.

GIAMPIERI, F. *et al.* The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. **Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 9–19, 2012.

GILROY, S. *et al.* ROS, Calcium, and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants. **Plant Physiology**, v. 171, n. 3, p. 1606–1615, 2016.

GIRIBALDI, M. *et al.* Proteomic analysis of the effects of ABA treatments on ripening *Vitis vinifera* berries. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 9, p. 2447–2458, 2010.

GRANT, O. M. *et al.* Physiological and morphological diversity of cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa*) in response to water deficit. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, n. 3, p. 264–272, 2010.

HALEEMA, B.; RAB, A.; HUSSAIN, S. A. Research article effect of calcium, boron and zinc foliar application on growth and fruit production of tomato. **Sarhad Journal of Agriculture**, v. 34, n. 1, p. 19–30, 2018.

HAMEL, L. P.; SHEEN, J.; SÉGUIN, A. Ancient signals: Comparative genomics of green plant CDPKs. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 2, p. 79–89, 2014.

HOU, B.; XU, C.; SHEN, Y. A leu-rich repeat receptor-like protein kinase , FaRIPK1 , interacts with the ABA receptor , FaABAR , to regulate fruit ripening in strawberry. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 7, p. 1569–1581, 2018.

HRABAK, E. M. *et al.* The Arabidopsis CDPK-SnRK Superfamily of Protein Kinases. **Plant Physiology**, v. 132, n. June, p. 666–680, 2003.

HU, W. *et al.* Genome-wide survey and expression analysis of the calcium-dependent protein kinase gene family in cassava. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 291, n. 1, p. 241–253, 2016.

HUANG, K. *et al.* Arabidopsis calcium-dependent protein kinase AtCPK1 plays a positive role in salt/drought-stress response. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 498, n. 1, p. 92–98, 2018.

JIA, H.-F. *et al.* Absciscic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. **Plant Physiology**, v. 157, n. 1, p. 188–199, 2011.

- JIANG, Y.; JOYCE, D. C. ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. **Plant Growth Regulation**, v. 39, n. 2, p. 171–174, 2003.
- JOGAIAH, S.; GOVIND, S. R.; TRAN, L. S. P. Systems biology-based approaches toward understanding drought tolerance in food crops. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 23–39, 2013.
- JURETIC, N. *et al.* The evolutionary fate of MULE-mediated duplications of host gene fragments in rice. **Genome Research**, v. 15, n. 9, p. 1292–1297, 2005.
- KARDILE, H. B. *et al.* Calcium-Dependent Protein Kinases (CDPK) in abiotic stress tolerance. **the Journal of Plant Science Research**, v. 34, n. 2, p. 259–265, 2018.
- KARLUND, A. *et al.* Polyphenols in Strawberry (*Fragaria × ananassa*) Leaves Induced by Plant Activators. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 20, p. 4592–4600, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf405589f>
- KAWAMOTO, N. *et al.* responsible for the phosphorylation of a florigen complex formation. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–9, 2015.
- KIM, H. J. *et al.* Salt in irrigation water affects the nutritional and visual properties of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 10, p. 3772–3776, 2008.
- KIRIK, V. *et al.* Functional analysis of the tubulin-folding cofactor C in *Arabidopsis thaliana*. **Current Biology**, v. 12, n. 02, p. 1519–1523, 2002.
- KISELEV, K. V.; SHUMAKOVA, O. A.; MANYAKHIN, A. Y. Effects of the calmodulin antagonist W7 on resveratrol biosynthesis in *Vitis amurensis* Rupr. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 31, n. 6, p. 1569–1575, 2013.
- KLAMKOWSKI, K.; TREDER, W. Morphological and physiological responses of strawberry plants to water stress. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 71, n. 4, p. 159–165, 2014.
- KONG, D. *et al.* Arabidopsis glutamate receptor homolog3.5 modulates cytosolic Ca²⁺ level to counteract effect of abscisic acid in seed germination. **Plant Physiology**, v. 167, n. 4, p. 1630–1642, 2015.
- KORKINA, L. G. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: From plant defense to human health. **Cellular and Molecular Biology**, v. 53, n. 1, p. 15–25, 2007.
- KOU, L. *et al.* Pre-harvest calcium application increases biomass and delays senescence of broccoli microgreens. **Postharvest Biology and Technology**, v. 87, p. 70–78, 2014.
- KUDLA, J.; BATISTIC, O.; HASHIMOTO, K. Calcium Signals: the lead currency of plant information processing. **The Plant Cell**, v. 22, n. 3, p. 541–563, 2010.

LANDMANN, C.; FINK, B.; SCHWAB, W. FaGT2: a multifunctional enzyme from strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits involved in the metabolism of natural and xenobiotic compounds. **Planta**, v. 226, p. 417–428, 2007.

LI, A. L. *et al.* Evolutionary and functional study of the CDPK gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Molecular Biology**, v. 66, n. 4, p. 429–443, 2008.

LI, B. *et al.* Modulation of the root-sourced ABA signal along its way to the shoot in *Vitis riparia*×*Vitis labrusca* under water deficit. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 6, p. 1731–1741, 2011.

LI, L. bei *et al.* Genome-wide analysis of the calcium-dependent protein kinase gene family in *Gossypium raimondii*. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 1, p. 29–41, 2015.

LIESE, A.; ROMEIS, T. Biochemical regulation of *in vivo* function of plant calcium-dependent protein kinases (CDPK). **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 7, p. 1582–1589, 2013.

LIN, D. *et al.* An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1–19, 2016.

LIU, F. *et al.* Water relations and yield of lysimeter-grown strawberries under limited irrigation. **Scientia Horticulturae**, v. 111, p. 128–132, 2007.

LIU, Y. *et al.* Arabidopsis Serine decarboxylase 1 (SDC1) in phospholipid and amino acid metabolism plant materials and growth conditions. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1–9, 2018.

LLOP-TOUS, I. Characterization of a strawberry cDNA clone homologous to calcium-dependent protein kinases that is expressed during fruit ripening and affected by low temperature. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 378, p. 2283–2285, 2002.

LONG, M. *et al.* Relationship between “proto-splice sites” and intron phases: Evidence from dicodon analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 1, p. 219–223, 1998.

LU, S. X.; HRABAK, E. M. The myristoylated amino-terminus of an Arabidopsis calcium-dependent protein kinase mediates plasma membrane localization. **Plant Molecular Biology**, v. 82, n. 3, p. 267–278, 2013.

LU, Y. Q. *et al.* Synergistic roles of leaf boron and calcium during the growing season in affecting sugar and starch accumulation in ripening apple fruit. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 8, p. 2483–2492, 2013.

LUDWIG, A. A. *et al.* CDPK-mediated signalling pathways : specificity and cross-talk. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 395, p. 181–188, 2018.

LUO, Q. *et al.* BdCIPK31, a calcineurin b-like protein-interacting protein kinase,

regulates plant response to drought and salt stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. July, p. 1–16, 2017.

MA, S. Y.; WU, W. H. AtCPK23 functions in Arabidopsis responses to drought and salt stresses. **Plant Molecular Biology**, v. 65, n. 4, p. 511–518, 2007.

MADANI, A. *et al.* Impact of a hands-on component on learning in the Fundamental Use of Surgical Energy™ (FUSE) curriculum: a randomized-controlled trial in surgical trainees. **Surgical Endoscopy and Other Interventional Techniques**, v. 28, n. 10, p. 2772–2782, 2014.

MANGANARIS, G. A. *et al.* The effect of preharvest calcium sprays on quality attributes, physicochemical aspects of cell wall components and susceptibility to brown rot of peach fruits (*Prunus persica* L. cv. Andross). **Scientia Horticulturae**, v. 107, n. 1, p. 43–50, 2005.

MARTÍN, M. L.; BUSCONI, L. Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation. **Plant Journal**, v. 24, n. 4, p. 429–435, 2000.

MCCARTY, D. R. *et al.* Molecular analysis of viviparous-1: an abscisic acid-insensitive mutant of maize. **Plant Cell**, v. 1, n. 5, p. 523–532, 1989.

MENG, L. *et al.* PtrCDPK10 of Poncirus trifoliata functions in dehydration and drought tolerance by reducing ROS accumulation via phosphorylating PtrAPX. **Plant Science**, v. 291, p. 110320, 2020.

MESSIAS, S. *et al.* Micronutrient and functional compounds biofortification of maize grains micronutrient and functional compounds biofortification of maize grains. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 1, p. 123–139, 2015.

MITTAL, S. *et al.* Comparative analysis of CDPK family in maize, Arabidopsis, rice, and sorghum revealed potential targets for drought tolerance improvement. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, p. 1–17, 2017.

MOHANTA, T. *et al.* Molecular players of ef-hand containing calcium signaling event in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 6, p. 1476, 2019.

MOHANTA, T. K.; KUMAR, P.; BAE, H. Genomics and evolutionary aspect of calcium signaling event in calmodulin and calmodulin-like proteins in plants. **BMC Plant Biology**, v. 17, n. 1, p. 1–19, 2017.

MORI, I. C. *et al.* CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell s-type anion- and Ca²⁺ - permeable channels and stomatal closure. **PLoS Biolo**, v. 4, n. 10, 2006.

NAKAMURA, Y. Plant Phospholipid diversity : emerging functions in metabolism and protein – lipid interactions. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 12, p. 1027–1040, 2017.

NISHIYAMA, R. *et al.* Two mRNA species encoding calcium-dependent protein kinases are differentially expressed in sexual organs of *Marchantia polymorpha* through alternative splicing. **Plant and Cell Physiology**, v. 40, n. 2, p. 205–212, 1999.

PANDEY, G. K. *et al.* Calcineurin B-like protein-interacting protein kinase CIPK21 regulates osmotic and salt stress responses in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 169, n. 1, p. 780–792, 2015.

PANDEY, P. *et al.* Impact of combined abiotic and biotic stresses on plant growth and avenues for crop improvement by exploiting physio-morphological traits. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. April, p. 1–15, 2017.

PASSRICHA, N. *et al.* **Receptor-Like Kinases Control the Development, Stress Response, and Senescence in Plants**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2019.

PENG, H. *et al.* Calcium/calmodulin alleviates substrate inhibition in a strawberry UDP-glucosyltransferase involved in fruit anthocyanin biosynthesis. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–11, 2016.

PERIN, E. C. *et al.* ABA-dependent salt and drought stress improve strawberry fruit quality. **Food Chemistry**, v. 271, p. 516–526, 2019.

PINELI, D. L. D. O. *et al.* Antioxidants and other chemical and physical characteristics of two strawberry cultivars at different ripeness stages. **Journal of Food Composition and Analysis** v. 24, p. 11–16, 2011. A

RAPALA-KOZIK, M.; GO, A.; KUJDA, M. Enzymes that control the thiamine diphosphate pool in plant tissues . Properties of thiamine pyrophosphokinase and thiamine- (di) phosphate phosphatase purified from *Zea mays* seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry journal**, v. 47, p. 237–242, 2009.

RAY, S. *et al.* Expression analysis of calcium-dependent protein kinase gene family during reproductive development and abiotic stress conditions in rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica). **Molecular Genetics and Genomics**, v. 278, n. 5, p. 493–505, 2007.

SCHAART, J. G. *et al.* Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits. **New Phytologist**, v. 197, n. 2, p. 454–467, 2013.

SEILER, C. *et al.* ABA biosynthesis and degradation contributing to ABA homeostasis during barley seed development under control and terminal drought-stress conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 8, p. 2615–2632, 2011.

SEYBOLD, H. *et al.* Ca²⁺ signalling in plant immune response: From pattern recognition receptors to Ca²⁺ decoding mechanisms. **New Phytologist**, v. 204, n. 4, p. 782–790, 2014.

SIMEUNOVIC, A. *et al.* Know where your clients are: Subcellular localization and targets of calcium-dependent protein kinases. **Journal of Experimental**

Botany, v. 67, n. 13, p. 3855–3872, 2016.

SUDHA, G.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of putrescine on anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* mediated through calcium ATPase. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 25, n. 1, p. 69–75, 2003.

SUZUKI, N. *et al.* Temporal-spatial interaction between reactive oxygen species and abscisic acid regulates rapid systemic acclimation in plants. **The Plant Cell**, v. 25, n. 9, p. 3553–3569, 2013.

SZCZEGIELNIAK, J. *et al.* Calcium-dependent protein kinase from maize seedlings activated by phospholipids. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 3827, p. 3818–3827, 2000.

TAMURA, K. *et al.* MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596–1599, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. Ed Porto alegre: Artmed, 2017.

TORRES, M. A.; DANGL, J. L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 4, p. 397–403, 2005.

TRIPATHI, V. *et al.* CIPK6, a CBL-interacting protein kinase is required for development and salt tolerance in plants. **Plant Journal**, v. 58, n. 5, p. 778–790, 2009.

VALMONTE, G. R. *et al.* Calcium-dependent protein kinases in plants: Evolution, expression and function. **Plant and Cell Physiology**, v. 55, n. 3, p. 551–569, 2014.

VIGHI, I. L. *et al.* Crosstalk during fruit ripening and stress response among abscisic acid, calcium-dependent protein kinase and phenylpropanoid. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 38, n. 2, p. 99–116, 2019.

VISHWAKARMA, K. *et al.* Absciscic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects. **Frontiers in Plant Science**, v. 08, n. February, p. 1–12, 2017.

WANG, C. T.; SHAO, J. M. Characterization of the ZmCK1 Gene Encoding a Calcium-Dependent Protein Kinase Responsive to Multiple Abiotic Stresses in Maize. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 31, n. 1, p. 222–230, 2013.

WANG, J. P. *et al.* Calcium-dependent protein kinase (CDPK) and cdpk-related kinase (CRK) gene families in tomato: Genome-wide identification and functional analyses in disease resistance. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 291, n. 2, p. 661–676, 2016.

WANG, Z. *et al.* Molecular cloning and expression analysis of eight calcium-dependent protein kinase (CDPK) genes from banana (*Musa acuminata* L .

AAA group , cv . Cavendish). **South African Journal of Botany**, v. 104, p. 134–141, 2016.

XU, Z.; YOO, Y.; HWANG, I. **Abscisic Acid: Metabolism, Transport and Signaling**. [S. l.: s. n.], 2014.

YE, N.; JIA, L.; ZHANG, J. ABA signal in rice under stress conditions. **Rice**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2012.

YU, X. *et al.* Absciscic acid stimulates a calcium-dependent protein kinase in grape berry. **Plant physiology**, v. 140, n. February, p. 558–579, 2006.

ZHANG, H. *et al.* Identification and characterization of CBL and CIPK gene families in canola (*Brassica napus* L.). **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 1–24, 2014.

ZHANG, M. *et al.* Genome-wide investigation of calcium-dependent protein kinase gene family in pineapple: Evolution and expression profiles during development and stress. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 1–16, 2020.

ZHANG, X.; LIU, C. J. Multifaceted regulations of gateway enzyme phenylalanine ammonia-lyase in the biosynthesis of phenylpropanoids. **Molecular Plant**, v. 8, n. 1, p. 17–27, 2015.

ZHANG, X. S.; CHOI, J. H. Molecular evolution of calmodulin-like domain protein kinases (CDPKs) in plants and protists. **Journal of Molecular Evolution**, v. 53, n. 3, p. 214–224, 2001.

ZHANG, Y. *et al.* Identification of NADPH oxidase family members associated with cold stress in strawberry. **FEBS Open Bio**, v. 8, n. 4, p. 593–605, 2018.

ZHAO, R. *et al.* The Arabidopsis Ca^{2+} -dependent protein kinase CPK27 is required for plant response to salt-stress. **Gene**, v. 563, n. 2, p. 203–214, 2015.

ZHAO, Y. *et al.* Calcium-binding properties of a calcium-dependent protein kinase from *Plasmodium falciparum* and the significance of individual calcium-binding sites for kinase activation. **Biochemistry**, v. 33, n. 12, p. 3714–3721, 1994.

ZHU, J. Abiotic stress signaling and responses in plants. **Cell**, v. 167, n. 2, p. 313–324, 2017.

ZHU, S.-Y. *et al.* Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 19, n. 10, p. 3019–3036, 2007.

ZUO, R. *et al.* Genome-wide identification, classification, and expression analysis of CDPK and its closely related gene families in poplar (*Populus trichocarpa*). **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 3, p. 2645–2662, 2013.