

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Dissertação

Putativas inter-relações entre a síntese de carotenóides, ácido abscísico, flavonoides e ácido L-ascórbico durante a maturação de morangos (*Fragaria x ananassa* cv. San Andreas)

Pedro Lopes Reisser

Pelotas, abril de 2022.

Pedro Lopes Reisser

Putativas inter-relações entre a síntese de carotenóides, ácido abscísico, flavonoides e ácido L-ascórbico durante a maturação de morangos (*Fragaria x ananassa* cv. San Andreas)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de orientação: Prof^a Dr^a Vanessa Galli e Prof Dr Cesar Valmor Rombaldi

Pelotas, abril de 2022.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

R378p Reisser, Pedro Lopes

Putativas inter-relações entre a síntese de carotenóides, ácido abscísico, flavonoides e ácido L-ascórbico durante a maturação de morangos (*Fragaria x ananassa* cv. San Andreas) / Pedro Lopes Reisser ; Vanessa Galli, Cesar Valmor Rombaldi, orientadores. — Pelotas, 2022.

94 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. Morangos - Amadurecimento. 2. Ácido L-ascórbico . 3. Carotenóides. 4. Ácido abscísico. I. Galli, Vanessa, orient. II. Rombaldi, Cesar Valmor, orient. III. Título.

CDD : 664

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Pedro Lopes Reisser

Putativas inter-relações entre a síntese de carotenóides, ácido abscísico, flavonoides e ácido L-ascórbico durante a maturação de morangos (*Fragaria x ananassa* cv. San Andreas)

Data da Defesa: 25 de abril de 2022

Banca examinadora:

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

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi,
Doutor em Biologia Molecular,
Ensat-Toulouse-France.

Dra. Rosane Lopes Crizel,
Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos,
Universidade Federal de Pelotas.

Dr. Sandro Bonow,
Doutor em Fitotecnia,
Universidade Federal de Lavras.

Dra. Ellen Cristina Perin,
Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos,
Universidade Federal de Pelotas.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que indiretamente estiveram relacionadas a esse trabalho e meu caminhar de vida. A esse trabalho em especial meus colegas de laboratório, meus orientadores, aos órgãos de fomento à pesquisa, principalmente a Capes pela bolsa de mestrado, e ao produtor, por colaboraram diretamente com esse manuscrito.

Muito obrigado por tudo.

Resumo

Reisser, Pedro Lopes. **Putativas inter-relações entre a síntese de carotenóides, ácido abscísico, flavonoides e ácido L-ascórbico durante a maturação de morangos (*Fragaria x ananassa* cv. San Andreas), 2022 88p.** Dissertação (Mestrado 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, 2022.

O morango, *Fragaria x ananassa* Duch., é consumido amplamente devido suas características sensoriais atrativas como sabor, aroma e aparência. Além de ser uma cultura importante, o morangueiro é um modelo de pesquisa para frutas não climatéricas, devido ao seu porte e o seu rápido cultivo. Diversos estudos têm relatado o papel do Ácido Abscísico (ABA), um fitohormônio oriundo da degradação de carotenóides fotossintéticos, na indução de antocianinas de frutos não-climatéricos. Porém, as inter-relações entre ABA, carotenoides e compostos de metabolismo especializado, como fenilpropanóides e ácido L-ascórbico (AsA) ainda não foram elucidadas, e pouco se sabe sobre a dinâmica temporal de acúmulo de compostos especializados neste fruto. No presente trabalho objetivou-se colocar a hipótese a prova de que para que ocorra o processo de amadurecimento dos frutos, ocorre inicialmente o aumento na síntese de carotenóides, seguido da bioconversão em ABA, culminando na indução do processo de amadurecimento de frutos de morango. Para tanto, o delineamento experimental foi pensado para abranger o maior número de estádios de desenvolvimento, totalizando 9 estádios da cultivar San Andreas. Para o ensaio da hipótese, foram projetadas duas dimensões de análise, uma bioquímica através de UFLC-MS/MS (cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas em tandem) e outra genômica através de RT-qPCR(reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real). Apesar disso, apenas algumas das análises bioquímicas previstas foram realizadas, sendo elas: sólidos solúveis totais; teor de ABA, ABA-glicosilado, ácido faseico, ácido dehidrofaseico; teor de ácido L-ascórbico; fenilpropanoides; antocianinas. Esses resultados foram compilados em um artigo, cujo tema foi a relação entre o ABA e o AsA e os fenilpropanóides, oferecendo novas perspectivas sobre a regulação do ABA. Neste estudo, observou-se que o teor de sólidos solúveis totais reduziu nos estágios iniciais e aumentou nos de crescimento e voltou a reduzir no amadurecimento. Além disso, com o

amadurecimento observou-se um aumento do conteúdo de ABA, de AsA e de pelargonidinas. O teor de cianidina aumentou nos estádios iniciais e logo reduziu, apresentando correlação negativa com o teor de ABA. O PCA (análise de componentes principais) e PLS (regressão parcial de mínimos quadrados) permitiram definir grupos distintos de amostras de acordo com seu perfil bioquímico e verificar que os compostos que mais contribuíram para esta distinção foram AsA, catequina e pelargonidina 3 glicosídeo. No entanto, devido aos contratemplos, o cerne principal da hipótese não pode ser questionado, e a relação de carotenoides e o ABA ainda permanece inconclusiva. Ainda permanecem perguntas a respeito do ciclo das xantofilas que parece relevante para entender a regulação de ABA, a disponibilidade de AsA e seus respectivos acúmulos nos frutos. Assim, espera-se que esse estudo possa contribuir para os novos estudos científicos e tecnológicos que virão a respeito de células vegetais e o processo de amadurecimento em frutos.

Abstract

Reisser, Pedro Lopes. **Interrelationships between the synthesis of carotenoids, abscisic acid, flavonoids and L-ascorbic acid during ripening of strawberries (*Fragaria x ananassa* cv. San Andreas), 2022 88p.** Dissertation (Masters in Food Science and Technology) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

The strawberry, *Fragaria x ananassa* Duch., is widely consumed due to its attractive sensory characteristics such as flavor, aroma and appearance. In addition to being an important crop, strawberry is a research model for non-climacteric fruits, due to its size and rapid cultivation. Several studies have reported the role of Abscisic Acid (ABA), a phytohormone originating from the degradation of photosynthetic carotenoids, in the induction of anthocyanins in non-climacteric fruits. However, the interrelationships between ABA, carotenoids and compounds of specialized metabolism, such as phenylpropanoids and L-ascorbic acid (AsA) have not yet been elucidated, and little is known about the temporal dynamics of accumulation of specialized compounds in this fruit. In the present work, the objective was to put the hypothesis to the test that for the ripening process of the fruits to occur, there is initially an increase in the synthesis of carotenoids, followed by the bioconversion into ABA, culminating in the induction of the ripening process of strawberry fruits. Therefore, the experimental design was designed to cover the largest number of development stages, totaling 9 stages of the San Andreas cultivar. To test the hypothesis, two dimensions of analysis were designed, one biochemical through UFLC-MS/MS (high performance liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometer) and another genomic through RT-qPCR (polymerase chain reaction real-time quantitative). Despite this, only some of the biochemical analyzes planned were performed, namely: total soluble solids; ABA content, ABA-glycosylated, phaseic acid, dehydrophaseic acid; L-ascorbic acid content; phenylpropanoids; anthocyanins. These results were compiled in an article, whose theme was the relationship between ABA and AsA and phenylpropanoids, offering new perspectives on the regulation of ABA. In this study, it was observed that the total soluble solids content decreased in the initial stages and increased in the growth stages and decreased again during ripening. In addition, with ripening, an increase in the content of ABA, AsA and pelargonidins was observed. The cyanidin content increased in the initial stages and then reduced, showing a negative

correlation with the ABA content. PCA (principal component analysis) and PLS (partial least squares regression) allowed us to define distinct groups of samples according to their biochemical profile and to verify that the compounds that most contributed to this distinction were AsA, catechin and pelargonidin 3 glycoside. However, due to setbacks, the main thrust of the hypothesis cannot be questioned, and the relationship of carotenoids and ABA still remains inconclusive. Questions about the xanthophyll cycle still remain, which seems relevant to understand the regulation of ABA, the availability of AsA and their respective accumulation in the fruits. Thus, it is expected that this study can contribute to new scientific and technological studies that will come about plant cells and the process of ripening in fruits.

Lista de Figuras

- Figura 1. Rota dos Fenilpropanóides, Flavonoides e Antocianinas; Fonte: Adaptado de VIGHI et al., 2019 19
- Figura 2. ROTA DE SÍNTESE DO ÁCIDO L-ASCÓRBICO, Fonte: adaptado de VALPUESTA; BOTELLA, 2004. 21
- Figura 3. Ciclo de Renovação do asa e seus derivados, fonte: adaptado de SMIRNOFF, 2018. 23
- Figura 4. *Carotenóides* precursores de ácido abscísico. Fonte: Adaptado da enciclopédia de genes e genomas de kyoto (Kegg) <https://www.genome.jp/entry/map00906> 25
- Figura 5. Ciclo das xantofilas. Fonte: Adaptado de JAHNS; LATOWSKI; STRZALKA, 2009 27
- Figura 6. Sistema de plantio sobre slab, em estufa aberta, produtor local próximo a Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão 41
- Figura 7. INÍCIO DA FORMAÇÃO DO FRUTA, NO ESTÁDIO FLORAL. 41
- Figura 8. ESTÁDIOS DE CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO COLETADOS, ESTÁDIO INICIAL (I), ESTÁDIO DE CRESCIMENTO (C) E ESTÁDIOS DE AMADURECIMENTO (A). 42
- Figura 9. Varredura do espectro luminoso de uma amostra A3. 46

Lista de Quadros

Quadro 1. Delineamento experimental da relação do teor de carotenoides, ABA e acúmulo de transcritos em frutos de morango coletados em diferentes estágios de crescimento e desenvolvimento	39
Quadro 2. Cronograma de atividades para a realização da dissertação	40

Lista de Abreviatura e Siglas

ABA	Ácido abscísico
PA	Ácido faseico
DPA	Ácido dehidrofaseico
ABA-GE	Ácido abscísico glicosil-ester
AsA	Ácido L-ascórbico
MDHA	Monodehidroascorbato
MDHAR	Monodehidroascorbato redutase
DHA	Dehidroascorbato
DHAR	Dehidroascorbato redutase
GSH	Glutationa
GSSG	Glutationa oxidada
ATP	Adenosina trifosfato
IPP	Isoprenil difosfato
MEP	Rota metabólica do 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato
MEV	Rota metabólico do ácido mevalônico
DMAPP	Difosfato de dimetilalilo
GDP	Difosfato de geranila
GGDP	Geranilgeranil difosfato
PSY	Fitoeno sintase
PDS	Fitoeno desaturase
ZEP	Zeaxantina epoxidase
NCED	9-cis-epoxicarotenoide dioxigenase
ABA2	Xantoxina desidrogenase
AAO3	Aldeído-abscísico oxidase
DAD	Detector de arranjo diodo
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
UFLC	Cromatógrafo Líquido Ultra Rápido (do inglês: Ultra Fast Liquid Chromatography)
MS	Espectrometria de massas (do inglês: mass spectrometry)
ANOVA	Análise de Variância
EROS	Espécies Reativas de oxigênios

Sumário

1. Introdução	11
2. Hipótese	13
3. Objetivos	13
4. Revisão bibliográfica	14
4.1 O morango (Fragaria x ananassa Duch.)	15
4.2 Crescimento e desenvolvimento do morango	15
4.3 Fenilpropanóides	18
4.4 Ácido L-ascórbico	20
4.5 Carotenóides e clorofilas	23
4.6 Ácido Abscísico	26
5. Projeto de pesquisa	29
5.1 Introdução	31
5.2 Objetivos	34
5.2.1 Objetivo geral	34
5.2.2 Objetivos específicos	34
5.3 Materiais e Métodos	35
5.3.1 Coleta de material	35
5.3.2 Quantificação dos metabólitos	35
5.3.2.1 Ácido abscísico	35
5.3.2.2 Antocianinas individuais	35
5.3.2.3 Ácido l-ascórbico	35
5.3.2.4 Sólidos solúveis totais	35
5.4 Variáveis	36
6. Relatório de trabalho de campo	38

6.1 Procedimentos adotados para a definição do tema de trabalho, da pergunta de pesquisa e emissão de hipótese	39
6.2 Desenvolvimento do projeto	40
6.2.1 Etapa I: Coleta e processamento do material biológico	40
6.2.2 Etapa II: Extração de RNA e síntese cDNA	42
6.2.3 Etapa III: Realização das análises no UFLC-MS/MS	43
6.2.3.1 Ácido abscísico	44
6.2.3.2 Ácido L-Ascórbico	44
6.2.3.3 Antocianinas e Fenólicos	45
6.3 Problemas encontrados e o redimensionamento do projeto	46
6.4 Contribuições futuras	47
7. Artigo	48
7.1 Inter-relações entre a síntese de ácido abscísico, flavonoides e ácido L- ascórbico durante a maturação de morangos	49
7.2 Abstract	49
7.3 Resumo	49
7.4 Introdução	51
7.5 Materiais e métodos	55
7.5.1 Coleta do material	55
7.5.2 Sólidos solúveis totais	56
7.5.3 Ácido Abscísico	56
7.5.4 Antocianinas e Fenólicos	56
7.5.5 Ácido L-ascórbico	57
7.5.6 Análise estatística	58
7.6 Resultados	59
7.6.1 Sólidos solúveis totais	59
7.6.2 Teor de ácido ascórbico	59
7.6.3 Antocianinas	60

7.6.4 Ácido Abscísico	61
7.6.5 Compostos fenólicos	62
7.6.6 PCA, PLS e correlação	66
7.7 Discussão	68
7.8 Conclusão	72
7.9 Referências	73
7.10 Suplementar	78
8. Conclusões Finais	82
9. Referências	83

1. INTRODUÇÃO

O fruto do morango (*Fragaria x ananassa* Duch.), apesar de ser conhecido como a parte carnosa, doce e succulenta, é na verdade seus pequenos aquênios distribuídos sobre a superfície do receptáculo. Essa estrutura é popularmente chamada de fruta, e tem importância para diversas regiões, sendo umas das frutas mais cultivadas do mundo (PERKINS-VEAZIE, 1995; WHITAKER et al., 2020).

Além de sua importância econômica, o morango é um modelo de estudo importante para frutas, em especial frutas não-climatéricas. Esse tipo de frutas apresenta um padrão de crescimento e desenvolvimento diferente de frutas como tomate, maçã e banana, tidas como climatéricas. O amadurecimento de frutas climatéricas está associado com um pico de respiração e uma resposta autocatalítica do fitormônio etileno (ALEXANDER, 2002). Já em frutas não-climatéricas, como o morango, este pico de respiração não é evidenciado, e o fitohormônio ácido abscísico (ABA) tem sido apontado como um dos principais responsáveis pelo processo de maturação (FIGUEROA et al., 2021; JIA et al., 2011).

Durante o crescimento e amadurecimento do morango ocorrem diversas alterações, iniciando com a antese, abertura dos botões florais, seguido de divisão celular, formação e maturação da semente, e desenvolvimento da polpa. As principais alterações na polpa incluem o amolecimento, avermelhamento e desenvolvimento de sabor e aroma (PERKINS-VEAZIE, 1995). Durante o amadurecimento ocorre um acúmulo de moléculas do metabolismo especializado, como fenilpropanóides, flavonóis, flavonas e especialmente antocianinas, as quais estão associadas com a coloração avermelhada do fruto (FAIT et al., 2008). Ocorre também o acúmulo de ácido L-ascórbico a partir da degradação da pectina, importante para os humanos por ser uma vitamina, e para as plantas, por se tratar de um poderoso antioxidante solúvel (SMIRNOFF, 2018).

Embora diversos estudos tenham demonstrado o papel importante do ABA no amadurecimento de frutos de morango (JIA et al., 2016; LI et al., 2011), as inter-relações entre ABA e os compostos de metabolismo especializado, como fenilpropanóides e AsA ainda não foram elucidadas. Além disso, o ABA é sintetizado a partir da rota metabólica dos terpenos, mais especificamente, dos carotenoides, e pode ser regulado por 3 vias: sua biossíntese, seu catabolismo e sua conjugação com açúcar. Assim, o estudo destas vias de regulação pode fornecer informações

relevantes sobre o controle do conteúdo de ABA livre na célula e, por consequência de sua atuação no processo de maturação.

2. HIPÓTESE

No início dos estádios de crescimento ocorre uma indução na via dos carotenóides, os quais servirão de substrato para a síntese de ABA durante o desenvolvimento, e conseqüente indução de AsA e compostos fenilpropanóides, resultando na maturação da fruta.

3. OBJETIVOS

Analisar as inter-relações entre o conteúdo de carotenóides, ABA, fenilpropanóides e ácido L-ascórbico ao longo do crescimento e desenvolvimento da fruta de morango.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 O morango (*Fragaria x ananassa* Duch.)

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) é originado da Europa, sendo um híbrido entre *Fragaria chiloensis* Mill. e *Fragaria virginiana* Duch., que se formou por volta de 1750. É uma angiosperma dicotiledônea pertencente à família Rosaceae, é uma herbácea perene octaploide, sendo 7 o número básico de cromossomos ($8n=56$). O morango é tecnicamente um pseudofruto, sendo coloquialmente chamado como fruto. No entanto, o fruto verdadeiro do morangueiro são seus aquênios, pequenos pontos dispostos no corpo do morango. No decorrer desse trabalho, o termo fruto será usado para designar a fruta morango. O tempo de crescimento e desenvolvimento do fruto é de 20 a 50 dias, dependendo da variedade, e das condições em que o morangueiro é cultivado (ANTUNES et al., 2016; DARNELL et al., 2010).

O morango é um dos frutos mais apreciados no planeta; estima-se que a produção mundial do fruto seja de 4,5 milhões de toneladas, e a produção cresce 3% a 5% ao ano (ANTUNES et al., 2016). É um fruto amplamente consumido *in natura* ou em produtos processados, devido seu sabor atrativo e por ser benéfico à saúde. Apresenta altos teores de compostos antioxidantes, como o ácido L-ascórbico, compostos fenólicos, esses últimos principalmente representados pelas antocianinas (GIAMPIERI et al., 2012).

Os programas de melhoramento do morangueiro possuem propostas variadas que vão da produtividade por planta, ciclo de produção, resistência a pragas, tolerância a agentes estressores, qualidade do fruto, conservabilidade, saudabilidade e sensorialidade (FAEDI; MOURGUES; ROSATI, 2002; GASTON et al., 2020; LEWERS; LUO; VINYARD, 2012). Além disso, o morangueiro tem sido usado como modelo de pesquisa para frutos não climatéricos, devido seu pequeno porte, fácil propagação, ciclo vegetativo curto e rápido desenvolvimento do fruto (SYMONS et al., 2012).

4.2 Crescimento e desenvolvimento do morango

O processo de pré-formação de um fruto ocasiona modificações como a criação das gônadas e estruturas florais típicas de angiospermas, através da alteração do meristema vegetativo para o reprodutivo. A floração do morangueiro pode ser dependente do fotoperíodo e da temperatura, sendo parte importante da classificação das cultivares. Atualmente, as cultivares são classificadas em dois grupos - as de dias curtos e as neutras no fotoperíodo. O aumento da temperatura e do fotoperíodo tem

um efeito inibitório na diferenciação do meristema reprodutivo em cultivares de dia curto; já, as de dia neutro são indiferentes nesse quesito para frutificarem (ANTUNES et al., 2016).

O fruto, é um órgão de dreno (do inglês, 'sink tissue'); nele ocorre o acúmulo de fotoassimilados, fornecendo energia para multiplicação de células que resultam na expansão do receptáculo, formação de compostos como pectina e clorofilas, estruturando a porção carnosa do fruto (PERKINS-VEAZIE, 1995). O fruto (pseudofruto, porção carnosa e doce) se origina a partir da modificação do receptáculo floral, onde os aquênios, o fruto verdadeiro, se desenvolvem. O processo de formação desses frutos ocorre após a antese, ou seja, a abertura do botão floral que viabiliza os estigmas para a chegada do pólen; começa então o crescimento e o desenvolvimento do fruto, desde sua formação até a senescência. De modo geral, a fase de crescimento é entendida como a fase em que as alterações majoritárias são quantitativas, levando ao aumento da massa dos frutos. Essa fase compreende a fecundação até o momento que se começa a verificar a alteração da coloração dos frutos, esverdeado para esbranquiçado. Nessa etapa há acelerada divisão celular, embora também haja expansão celular, mas prevalecendo a primeira. A partir daí, inicia a fase convencionada como maturação, sub-classificada em maturação, amadurecimento e senescência. A maturação compreende o estágio em que os frutos estão alterando a coloração para o esbranquiçado/rosado; o amadurecimento quando os frutos atingem o recobrimento da coloração total com o róseo ou vermelho; e, a senescência, quando os frutos iniciam a perda de integridade física (PERKINS-VEAZIE, 1995). Esse descritivo é feito considerando morangos mais amplamente cultivados e consumidos no planeta, tendo em vista que há genótipos que produzem morangos esbranquiçados, azulados e outras tonalidades de coloração.

O fruto do morango age como reservatório energético para o desenvolvimento do fruto verdadeiro, os aquênios. Uma das formas de reserva é através da síntese e acúmulo de diferentes tipos de carboidratos, sendo esses produtos da fotossíntese e substratos para o crescimento e desenvolvimento (PERKINS-VEAZIE, 1995). Os principais carboidratos produzidos nas folhas e acumulados no fruto são glicose, frutose e sacarose, variando entre as cultivares (AKŠIĆ et al., 2019; KALLIO et al., 2000). Em contrapartida, o amido acumulado nos cloroplastos é degradado ao longo do desenvolvimento do fruto. Estas alterações no conteúdo de carboidratos afetam as características sensoriais do fruto, tornando-o mais doce ao final da fase de

maturação, bem como podem ter influência regulatória da sacarose na síntese de pigmentos em morangos (LUO et al., 2020; SIEBENEICHLER et al., 2020). Há autores (JIA et al., 2013; LI et al., 2019) que lançam a hipótese de que a síntese e bioconversão de açúcares possa ser um metabolismo regulador da maturação de frutos. Porém, a demonstração de que essa relação é uma relação de interferência resta a ser comprovada.

A textura é reflexo de alterações que ocorrem na parede celular dos frutos. Neste contexto, a celulose aparenta estar em baixa concentração na parede celular, e não varia significativamente durante o amadurecimento de morangos (BRUMMELL, 2006; PANIAGUA et al., 2017; PERKINS-VEAZIE, 1995). Por outro lado, a pectina, que é um polissacarídeo formado por polímeros de ácido galacturônico, como ramificações com ramnose, arabinose e galactose, é o principal agente estruturante de frutos. Ainda, mas em menor concentração, há polímeros glicanos (celulose) e xiloglucanos (hemicelulose) na parede celular de morangos (BRUMMELL, 2006; PANIAGUA et al., 2017; PERKINS-VEAZIE, 1995).

A acidez do fruto é um parâmetro apreciado pelos consumidores; os ácidos orgânicos se acumulam no vacúolo podendo ser utilizados para respiração ou conversão em açúcares. No morango se destacam principalmente ácido L-ascórbico, o ácido cítrico e ácido málico, e outros ácidos provenientes da rota do shikimato (início da rota dos fenilpropanóides gerando ácidos fenólicos). O ácido L-ascórbico, e o ácido elágico se acumulam no decorrer do desenvolvimento do fruto, enquanto o conteúdo de ácido cítrico e málico se reduz (PERKINS-VEAZIE, 1995).

O aroma do fruto de morango é um dos mais complexos dentre os frutos. São mais de 360 compostos voláteis, sendo eles majoritariamente ésteres (correspondem de 25-90% do total) e em menores concentrações furanona, terpenóides e compostos sulfurados, que além de conferirem o aroma característico, interferem no sabor, variando entre cultivares (EL HADI et al., 2013; FAN et al., 2021). Os mais importantes ésteres que constituem o aroma do fruto maduro são butanoato de metila, butanoato de etila, hexanoato de etila e 2-botanoato de metila; enquanto no fruto verde predominam aldeídos e álcoois como o hexanal, trans-2-hexanal, cis-3-hexen-1-ol (FORNEY; KALT; JORDAN, 2000).

Além disso, durante a maturação ocorre o aumento do conteúdo de ABA e a regulação nas rotas metabólicas de fenilpropanóides, ácido L-ascórbico (AsA) e

carotenóides, os quais, por sua relação direta ao trabalho serão descritos com maiores detalhes nos tópicos a seguir.

4.3 Fenilpropanóides

Ao longo do desenvolvimento ocorre um acúmulo de flavonóides e compostos fenólicos. Esses metabólitos são sintetizados a partir da rota metabólica dos fenilpropanóides que é oriunda dos aminoácidos fenilalanina, triptofano e tirosina (Figura 1). Esses compostos possuem diversas funções, desde proteção contra estresses bióticos e abióticos, capacidade antioxidante, modula o transporte de auxina, e através das antocianinas, pigmentam flores e frutos (DENG; LU, 2017). Além disso, são ditos benéficos a saúde por possuir possíveis efeitos antialérgicos, anti-inflamatório, antimicrobiano, cardioprotetor e vasodilatador (GIAMPIERI et al., 2015; VIGHI et al., 2019).

A síntese, acúmulo e bioconversão de compostos fenilpropanóides em vegetais é conhecida como mecanismo adaptativo e gerador de plasticidade (DONG; LIN, 2021). A partir dos aminoácidos aromáticos, pela via do chiquimato, são sintetizados ácidos fenólicos, flavonóides e antocianinas (VIGHI et al., 2019). Esses compostos geralmente se encontram glicosilados. Os ácidos fenólicos mais comuns encontrados nos frutos maduros são os ácidos clorogênico, gálico, elágico e *p*-cumárico (DEL POZO-INSFRAN et al., 2006; PERKINS-VEAZIE, 1995). Os principais flavonóides são subdivididos em antocianinas, flavonóis e flavanóis. As antocianinas mais presentes são a pelargonidina e a cianidina em suas formas glicosiladas, sendo a principal a pelargonidina 3-glicosídeo. São comuns também a pelargonidina rutinosídeo e a cianidina 3-glicosídeo. Já os flavonóis que se destacam são quercetina e kaempferol; e por fim, os flavanóis mais abundantes no fruto são a catequina e a epicatequina (LABADIE et al., 2020; WARNER et al., 2021).

De modo geral, a via de biossíntese das antocianinas é acelerada durante a maturação de frutos que acumulam esses compostos e, principalmente em frutos comumente classificados como não climatéricos. Em morangos com aplicação exógena de ABA ocorre uma indução dessas vias, o que também é observado quando os morangos sofrem estresses bióticos e abióticos, vista a atuação deste fitohormônio

na resposta a estes estresses (GALLI et al., 2016; PERIN et al., 2019; SIEBENEICHLER et al., 2020; VIGHI et al., 2019).

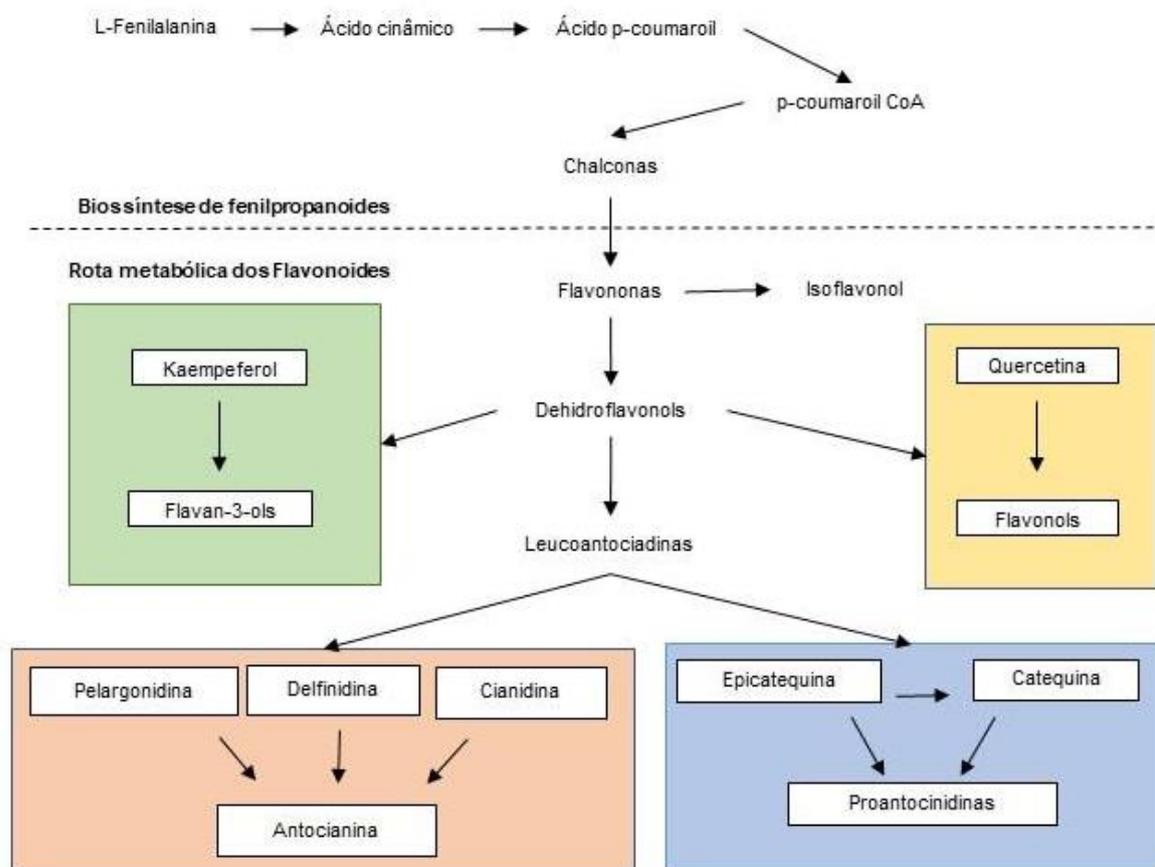


Figura 1: Rota dos Fenilpropanóides, Flavonoides e Antocianinas. Fonte: Adaptado de VIGHI et al., 2019.

4.4 Ácido L-ascórbico

O ácido L-ascórbico (AsA), usualmente conhecido como vitamina C, é um antioxidante solúvel, capaz de prevenir o escorbuto e promissor em estudos contra diferentes tipos de câncer, além de ser um requisito diário devido à incapacidade de primatas sintetizá-lo (PADAYATTY; LEVINE, 2016). Tanto em animais, como em plantas, é responsável por combater espécies reativas de oxigênio (EROs), formas prejudiciais de oxigênio que são gerados pela célula em diferentes processos, e que acabam interferindo em processos biológicos (SMIRNOFF, 2018). Em plantas, é sintetizado *de novo* pela via D-manose (via Smirnoff-Wheeler), e pelas vias alternativas propostas como, a via do mio-inositol e a via do D-galacturonato (FENECH et al., 2019; ISHIKAWA et al., 2008). O fruto do morango possui uma variação grande do conteúdo AsA; algumas cultivares chegando em entorno de 10 mg, outras até 80 mg por 100g⁻¹ de fruto fresco (CRUZ-RUS et al., 2011; GIAMPIERI et al., 2015; MEZZETTI et al., 2016).

A via Smirnoff-Wheeler é a síntese predominante de AsA em tecidos verdes, e é funcional em frutos. Esta via inicia com a conversão de D-glucose-6-fosfato em D-frutose-6-fosfato através da ação da enzima fosfoglicose isomerase, que por sua vez é convertido a D-manose-6-fosfato e D-manose-1-fosfato pela ação da fosfomanose isomerase e pela fosfomanomutase. Então, a enzima GDP-D-manose-pirofosforilase transfere uma guanossina difosfato formando a GDP-D-manose. Este composto é então convertido a GDP-L-galactose pela GDP-D-manose´-3´, 5 -epimerase. Em seguida, através de uma série de reações enzimáticas realizadas pelas enzimas GDP-L-galactose-fosforilase, L-galactose-1-fosfato fosfatase, L-galactose desidrogenase e

L-galactono-1,4-lactone desidrogenase, a GDP-L-galactose é convertida a ácido L-ascórbico (Fig. 2) (SMIRNOFF, 2018).

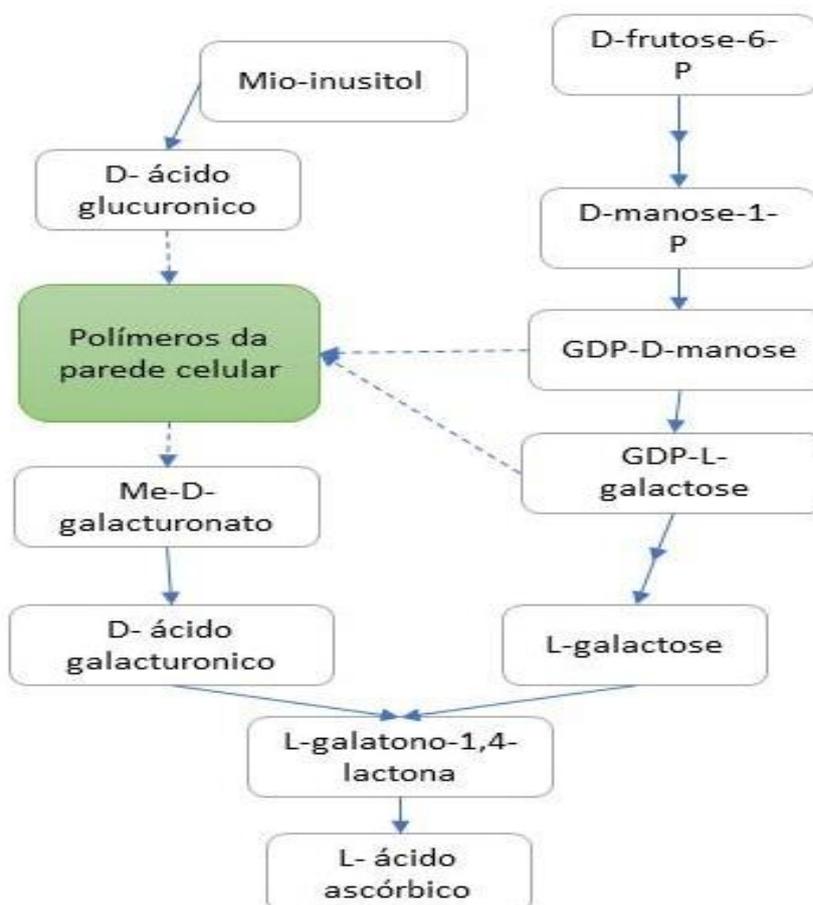


Figura 2: Rota de síntese do ácido L-ascórbico. Fonte: adaptado de VALPUESTA; BOTELLA, 2004.

Nos estádios iniciais de crescimento da fruta, a pectina encontra-se insolúvel, e na medida que inicia e evolui o amadurecimento, é solubilizada (PANIAGUA et al., 2017). Isso acaba fornecendo substrato para a via D-galacturonato. A via começa com a D-galacturonato redutase usando os açúcares da parede como substrato para produzir L-ácido galacturônico, e logo é convertido a L-galactono-1,4-lactona, que é substrato para a síntese de AsA. Em adicional a essa via, o mio-inositol ao ser oxidado produz o D-galacturonato. Essas vias ajudam a explicar tanto o acúmulo de AsA quanto o amolecimento do fruto no processo de amadurecimento (FENECH et al., 2019). A atividade da enzima D-galacturonato redutase chega a aumentar 150 vezes ao longo do desenvolvimento, mostrando que possui um importante papel no acúmulo da vitamina C (CRUZ-RUS et al., 2011).

Além das vias de biossíntese, no proteoma de plantas ocorre um ajuste entre a utilização do AsA e sua reciclagem através dos produtos oxidados, o monodehidroascorbato (MDHA) e o dehidroascórbico (DHA) (Fig. 3). MDHA é a forma do ascorbato oxidada somente uma vez, e o DHA é sua oxidação completa, onde já entregou sua capacidade produtiva inteira. Ao ocorrer a primeira oxidação e formar o MDHA é possível ocorrer a reversão através da enzima MDHA redutase que utilizada como agente redutor um NADH. A enzima DHA redutase é dependente de glutatona, outro antioxidante, e NADPH. Além disso, o MDHA pode reduzir outro MDHA se tornando um DHA e regenerando um AsA no processo (DAVEY et al., 2000; SMIRNOFF, 2018).

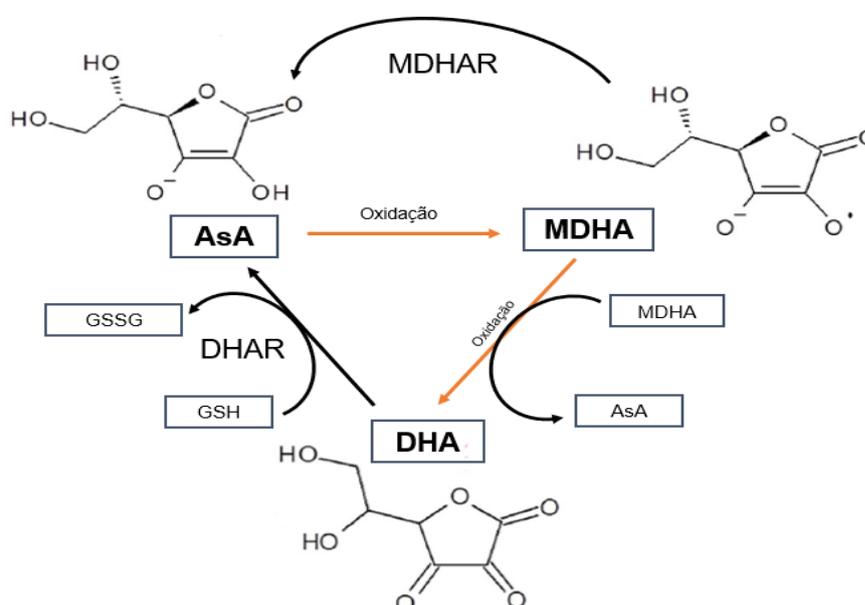


Figura 3: Ciclo de renovação do AsA e seus derivados. Fonte: adaptado de Smirnoff, 2018.

Enzimas que utilizam o AsA, como ascorbato peroxidase, ascorbato oxidase e superóxido dismutase além de remover EROs, controlam o estado redox das células e do apoplasto, e isso interfere na conformação de receptores de sinais e de outras enzimas (PIGNOCCHI; FOYER, 2003; SMIRNOFF, 2018). Esses processos têm sido largamente estudados, no entanto pouco se sabe sobre os agentes que os regulam e sua conexão com os hormônios vegetais (MOYA-LEÓN; MATTUS-ARAYA; HERRERA, 2019; RAMOS et al., 2018).

4.5 Carotenóides e clorofilas

Os carotenóides são uma grande família com mais de 750 compostos; são essenciais para a fotossíntese, estando presentes em todos os organismos fotossintéticos e alguns não-fotossintéticos. A produção de carotenóides foi evolutivamente benéfica a organismos fotossintéticos, permitindo a sobrevivência em meios sob presença de oxigênio, calor e luz (STANGE, 2016). São conhecidos como pigmentos acessórios, fazendo parte do complexo antena que antecede o centro de reação fotossintética, onde agem como amplificador da recepção do espectro luminoso e fotoprotetor.

A clorofila é uma molécula altamente reativa, consegue absorver energia do espectro eletromagnético, proveniente do sol no vermelho distante (600~700nm) e no azul (450-495nm); no entanto, a energia proveniente do comprimento azul é muito energética devido sua alta frequência, sendo assim degradada caso capture essa energia. Já os carotenóides conseguem absorver próximo ao azul e roxo (400-500 nm) e refletem o amarelo-vermelho. A única cor que não consegue ser absorvida é o verde, por isso o cloroplasto apresenta coloração esverdeada como também os tecidos que o contém (TAIZ; ZEIGER, 2010).

A energia absorvida pelos pigmentos é utilizada para fazer a oxidação da água, sendo utilizada para formar uma diferença de potencial entre as membranas. Essa diferença de gradiente entre membranas é a força para a produção de adenosinas trifosfato (ATP), molécula altamente energética utilizada para as reações químicas celulares. No entanto, a clorofila é uma molécula extremamente reativa, e pode gerar uma reação pró-oxidante a ponto de criar EROs. Por isso, os carotenóides desempenham sua principal função, a fotoproteção da clorofila. Os carotenóides agem como moléculas protetoras para que esse dano oxidativo não destrua a clorofila e também as membranas (TAIZ; ZEIGER, 2010).

Existem três carotenóides que estão contidos próximos aos centros de reação fotossintéticos: a zeaxantina, a violaxantina, e a anteraxantina. Essas moléculas são chamadas de xantofilas, pois são carotenóides que contêm em sua estrutura oxigênios. Essas três moléculas estão relacionadas ao *quenching* não fotoquímico, processo de dissipação energética da clorofila atrás de aquecimento. E, por fim, essas moléculas são precursoras do ABA (STANGE, 2016).

Os carotenóides são sintetizados a partir da molécula de isoprenil difosfato (IPP). Sua formação pode ocorrer através da via plastidial, a rota do 2-C-metil-D-

eritritol 4-fosfato (MEP), ou citosólica, pela rota do ácido mevalônico (MEV). Ambas as vias usam moléculas provenientes da glicólise, e em plantas, diferentemente de outros organismos, ambas vias ocorrem concomitantemente (LANGE et al., 2000).

Com a molécula de IPP formada, ocorre uma isomerização de um IPP em difosfato de dimetilalilo (DMAPP), e ocorre a troca de uma insaturação, alterando a geometria espacial da molécula. Então uma molécula de IPP e DMAPP são condensadas, gerando um difosfato de geranila (GDP), composto por dez carbonos, reação catalisada pelo geranyl difosfato sintase. O GDP então é condensado com outro GDP formando um geranylgeranyl difosfato (GGPP), com 20 carbonos; essa é a molécula base para a formação dos carotenóides. Na sequência, uma série de desnaturação, ciclizações, hidroxilações e epoxidação levam à formação dos diferentes carotenóides existentes (DONG; PARK; HWANG, 2015).

Para a síntese do ABA nas plantas, o GGPP é transformado pela fitoeno sintase (PSY), em fitoeno, que então é modificado pela enzima fitoeno desaturase (PDS), formando o ζ -caroteno. Então o ζ -caroteno é transformado em licopeno através da enzima ζ -caroteno desaturase (Fig. 4) (DONG; PARK; HWANG, 2015).

O licopeno pode ser convertido em δ -caroteno, pela ação da enzima licopeno ciclase épsilon; por outro, pode ser convertido a β -caroteno, por ação da licopeno ciclase beta (Fig 4). Ao β -caroteno é acrescentado um grupamento hidroxila, formando a β -criptoxantina. Então outro grupamento hidroxila é adicionado, resultando na formação de zeaxantina. Essas reações são catalisadas pela β -caroteno hidroxilase (STANGE, 2016).

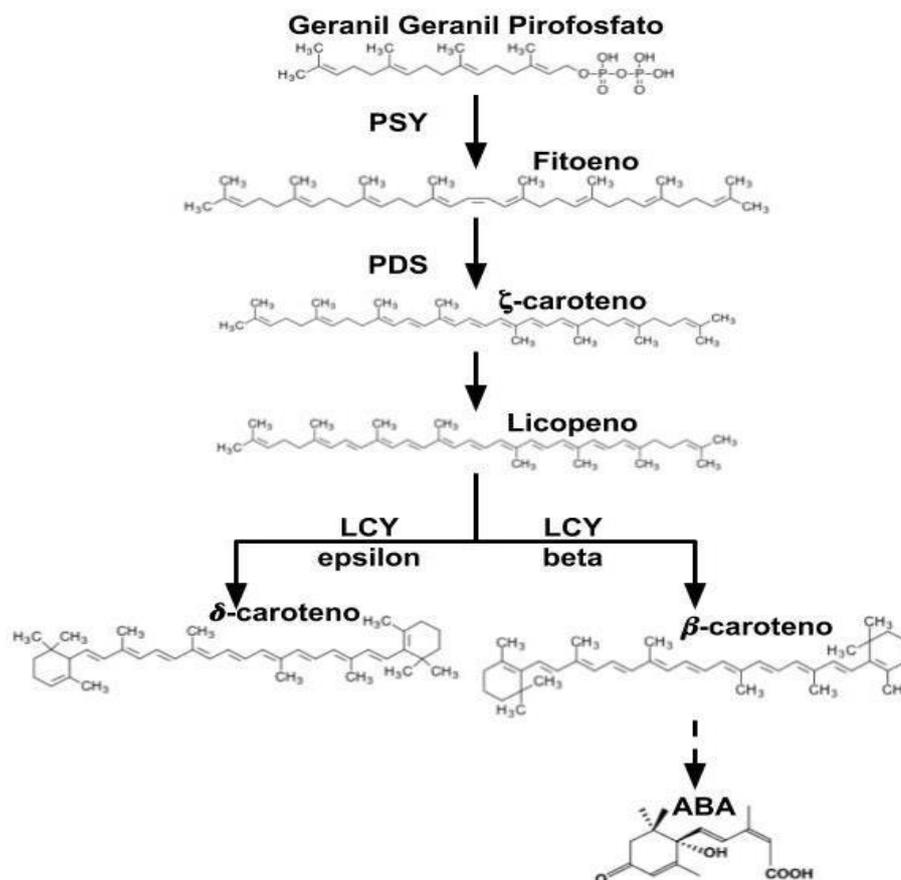


Figura 4: Carotenóides precursor de ácido abscísico. Fonte: Adaptado da enciclopédia de genes e genomas de kyoto (Kegg).

A rota de síntese de carotenóides foi acompanhada ao longo do desenvolvimento de frutos de morango por (ZHU et al., 2015), os quais relataram que os principais carotenóides são luteína, β -caroteno, zeaxantina e β -criptoxantina. Os genes iniciais da rota, *FaPSY*, *FaPDS* e *FaZDS*, apresentaram um aumento de expressão ao longo do desenvolvimento, enquanto os genes do final da rota, *FaLCYB*, *FaLCYE* e *FaCHXB* apresentaram redução na expressão. Em tomate, organismo modelo para frutos climatéricos, que possui um conhecido acúmulo de carotenóides, os genes do início desta rota apresentam um aumento de expressão durante o desenvolvimento, enquanto os genes após a etapa de síntese do licopeno apresentam uma redução da expressão, levando assim ao acúmulo de licopeno (LIU et al., 2015). Em uvas, os principais carotenóides acumulados são β -caroteno e luteína e são encontradas baixas concentrações de violaxantina, zeaxantina e neoxantina (YOUNG et al., 2012).

4.6 Ácido Abscísico

O ABA é um ácido fraco, sesquiterpeno, presente em todas as plantas vasculares. É regulador do ciclo vegetal que participa de uma ampla gama de processos fisiológicos vegetais como a dormência de sementes, a germinação, o controle dos estômatos foliares, o desenvolvimento de frutos e respostas a estresses bióticos e abióticos (DONG; PARK; HWANG, 2015). O ABA parece regular a expressão dos genes da rota dos fenilpropanóides e flavonoides, moléculas que se destacam por fazerem parte do aroma, sabor e cor do morango (JIA et al., 2011; PERIN et al., 2018). No entanto, apesar de existirem diversos estudos, ainda há informações descobertas de relação entre o ABA e outros compostos do amadurecimento como flavonóides, fenilpropanóides e AsA (CRUZ-RUS et al., 2011; LENG et al., 2014; LI et al., 2015; VIGHI et al., 2019).

Conforme mencionado anteriormente, os eventos são de duas magnitudes na vida do fruto, crescimento e desenvolvimento, os quais, a priori, são regulados pelas auxinas e pelo ABA, respectivamente. Está se formando um consenso científico de que o ABA é o principal regulador da maturação de frutos não climatéricos (GALLI et al., 2016; JIA et al., 2016; LI et al., 2011; MELLIDOU; KANELIS, 2017; PERKINS-VEAZIE, 1995). O ABA está conectado com os eventos de maturação como a coloração, através da indução de fatores de transcrição (MEDINA-PUCHE et al., 2014), e o amolecimento da estrutura de parede (VALENZUELA-RIFFO et al., 2020). O ABA é conhecido por ser o hormônio controlador de estresses e senescência, eventos esses que geram EROS. O ABA, assim como o AsA, este último por ser a principal antioxidante no morango, são acumulados ao longo do desenvolvimento do morango; no entanto, as relações que levam ao acúmulo simultâneo destes compostos ainda não foram exploradas. Uma parte importante para a síntese do ABA é o ciclo das xantofilas (o qual será detalhado mais adiante), uma regulação necessária para a planta controlar danos foto degradativos, onde o AsA é uma coenzima desse ciclo. Estudos com mutante de *Arabidopsis thaliana* deficientes de AsA, apresentou um aumento de ABA em folhas (KERCHEV et al., 2011).

O avanço da bioinformática está proporcionando novas visões desses processos. O genoma da *Fragaria vesca*, morango silvestre diplóide, é comumente utilizado como referência, pela disponibilidade da primeira versão do genoma rascunho da *F. ananassa* foi proposto (EDGER et al., 2019; FOLTA; BARBEY, 2019; SHULAEV et al., 2011). Estas informações podem ser exploradas visando

compreender melhor o papel do ABA nos eventos que ocorrem durante a maturação. Por exemplo, os mecanismos moleculares envolvidos na biossíntese de carotenóides, os quais são os precursores na biossíntese de ABA, ainda não foram elucidados em morango, o que representa uma lacuna de informações que podem dar sustento para os processos fisiológicos e metabólicos dos frutos, tanto de morango quanto de outros.

A rota de biossíntese do ABA começa com a conversão da molécula de zeaxantina, proveniente da rota de carotenóides, em violaxantina. Nessa etapa ocorre uma regulação dependente de luz. Quando a planta está em baixa incidência luminosa, a zeaxantina é convertida a violaxantina, através da enzima zeaxantina epoxidase (ZEP), que é utilizada para a síntese do ABA. No entanto, caso a incidência luminosa seja muito alta, ocorre a conversão da violaxantina em zeaxantina. Essa modificação é causada pela violaxantina de-epoxidase, que AsA como coenzima. Essa é uma forma de proteção que a planta possui, conhecida como ciclo das xantofilas (Figura 5). É o mais importante sistema de fotoproteção que a membrana do tilacóide possui (JAHNS; LATOWSKI; STRZALKA, 2009).

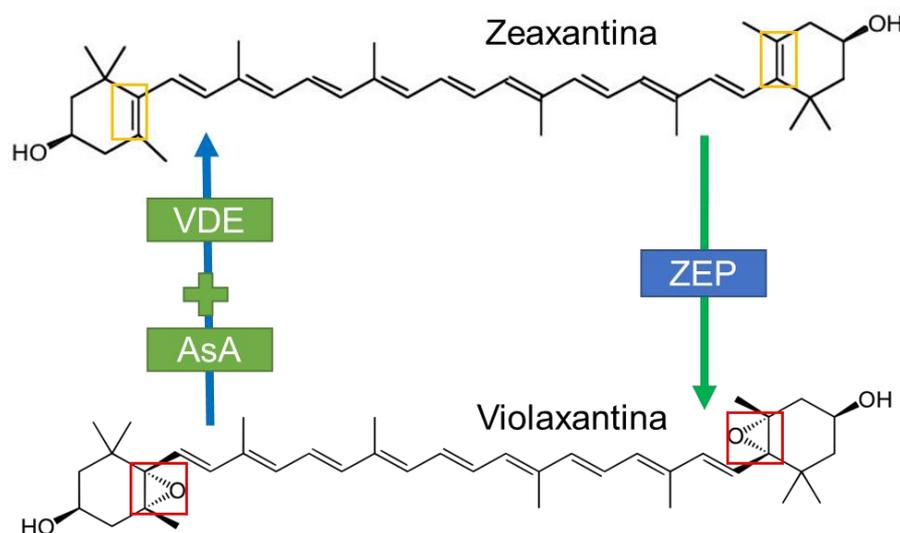


Figura 5: Ciclo das xantofilas. VDE, violaxantina de-epoxidase; ZEP, zeaxantina epoxidase; AsA, Ácido L-Ascórbico. Fonte: Adaptado de JAHNS; LATOWSKI; STRZALKA, 2009.

Se a planta não estiver sobre um estresse luminoso, a violaxantina é transformada em neoxantina, pela neoxantina sintase e após, a 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenase (NCED) forma a xantoxina (NAMBARA; MARION-POLL, 2005). A formação do ABA ocorre então pela transformação da xantoxina em

abscisato por ação da xantoxina desidrogenase (ABA2) e aldeído-abscísico oxidase (AAO3) (LENG et al., 2014).

Considerando que a maturação do morango é regulada pelo ABA, e que sua síntese se dá através dos carotenóides, levanta-se o questionamento sobre a forma que atuam no amadurecimento em morangos, e sua relação com as vias dos flavonoides e ácido L-ascórbico.

5. PROJETO DE PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

Projeto de Pesquisa

**Putativas inter-relações das vias de carotenóides, ácido abscísico, flavonoides
e ácido L-ascórbico na maturação de *Fragaria ananassa***

Comitê de Orientação
Prof^a. Dr^a. Vanessa Galli (Orientadora)
Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi

Pedro Lopes Reisser

Pelotas, maio 2019

5.1 Introdução

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) produz frutos que, de fato, são pseudofrutos, já que são o resultado do receptáculo floral com vários ovários que crescem e se desenvolvem, se agregando e maturando juntamente com o fruto (aquênio-semente). Apesar dessa conceituação botânica, daqui em diante, será utilizada a denominação fruto ou morango. Trata-se de um fruto muito estudado, por ser amplamente consumido em função da boa aparência, sabor e aroma, e por se tratar de um organismo modelo em pesquisas vegetais, quando o assunto é frutos não climatéricos (GIAMPIERI et al., 2012; GUNNESS et al., 2009; LI et al., 2011), embora haja questionamentos sobre essa conceituação (IANNETTA et al., 2006; MERCHANTE et al., 2013).

Além disso, o morango é conhecido como fonte nutricional relevante pelo aporte de açúcares, ácidos, vitaminas, minerais e compostos bioativos como ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas e ácido L-ascórbico (GIAMPIERI et al., 2012). No que concerne aos carotenóides, ainda se tem pouco conhecimento acerca desse grupo de fitoquímicos em morangos (ZHU et al., 2015). De modo geral, as cultivares mais aceitas no mercado internacional são aquelas que produzem morangos de cor rosada a vermelho intenso, doces e aromáticos, sendo essas as características desenvolvidas ao longo da maturação e amadurecimento (GUNNESS et al., 2009).

Durante o crescimento, os morangos são caracterizados pela rápida divisão celular. Com a evolução do crescimento, atingem a fase de maturação, quando se observa a redução da coloração esverdeada, surgimento da cor de fundo esbranquiçada e início da aquisição da coloração avermelhada. A partir daí, as taxas de crescimento diminuem, havendo alocação majoritária dos fotoassimilados para o acúmulo de açúcares, remetabolização dos ácidos orgânicos, síntese de ácido L-ascórbico, antocianinas e compostos voláteis, e redução da firmeza de polpa (BALDI et al., 2018; PERKINS-VEAZIE, 1995). Da mesma forma que foi citado anteriormente, pouco se conhece acerca da dinâmica metabólica de carotenóides no crescimento e desenvolvimento de morangos.

As alterações durante o crescimento e desenvolvimento dos morangos são acompanhadas de uma dinâmica hormonal relativamente bem estabelecida. Durante o estágio de crescimento, tem-se elevados níveis de giberelinas e auxinas; na fase de transição para a maturação, e no estágio de maturação-amadurecimento há redução dos teores desses hormônios e incremento dos níveis de ácido abscísico (ABA),

principalmente (GU et al., 2019; LIAO et al., 2018). Assim, cada vez mais, vai-se formando um consenso científico de que o ABA é protagonista na maturação e amadurecimento de morangos, ao menos naqueles que acumulam antocianinas como pigmentos principais (JI et al., 2012; JIA et al., 2011; LEE et al., 2020; LIAO et al., 2018; MOYA-LEÓN; MATTUS-ARAYA; HERRERA, 2019; SYMONS et al., 2012; VIGHI et al., 2019). Por exemplo, ao se silenciar o gene que codifica para enzima 9-cis-epoxicarotenóide dioxigenase (NCED), que atua na síntese de ABA, houve retardo do amadurecimento, principalmente pela inibição da síntese de antocianinas. Da mesma forma, não houve pleno estabelecimento da produção de antocianinas, nem da coloração do morango (JIA et al., 2011). Em contrapartida, ao se aplicar ABA em morangos, acelera-se a síntese de antocianinas e o amadurecimento (JIANG; JOYCE, 2003). Além disso, ao se aplicarem agentes estressores abióticos, conhecidos como indutores da síntese de ABA, como é o caso de restrição hídrica ou excesso de Na^{+2} , os morangos apresentam maiores níveis de ABA e de antocianinas (GALLI et al., 2016; PERIN et al., 2019). Como o amadurecimento antecede a senescência, é nesse estágio que também há aceleração da taxa respiratória e, como consequência, o sistema químico antioxidante é expresso em elevado nível, principalmente com incremento de ácido L-ascórbico, importante metabólito no processo de homeostase celular vegetal, e como pró-vitamina C, pensando-se na alimentação humana (CRUZ-RUS et al., 2011; FENECH et al., 2019; MELLIDOU; KANELLIS, 2017).

Esses achados químicos, bioquímicos e fisiológicos se consubstanciam com os avanços gerados a partir dos estudos transcriptômicos em morangos (GALLI et al., 2019). Esses estudos apontam claramente para o aumento relativo de transcritos de vias metabólicas associadas aos fenilpropanóides, ácidos orgânicos (em especial ácido L-ascórbico), às antocianinas (que também são fenilpropanóides), às proteínas envolvidas no *light harvest system*, às enzimas da solubilização da parede celular e da síntese de ésteres, principalmente com a evolução da maturação para o amadurecimento (LI et al., 2015; YE et al., 2015). Os resultados de transcriptômica apontam para alterações no metabolismo de carotenóides em frutas, principalmente através dos fatos de transcrição RIN-MADS (GRASSI et al., 2013), no entanto poucos estudados em morangos. Isso é relevante, porque um dos principais hormônios reconhecidos como fundamental na maturação desse fruto, o ABA, é sintetizado a partir desses compostos, mais especificamente a via do beta caroteno, que leva para

a zeaxantina.

A via de biossíntese e reciclagem de ABA envolve possibilidades que vão da síntese, via enzima NCED (gene *NCED*), com a possível glicosilação ou deglicosilação por ABA glicosiltransferase (*GTs*) e β -glucosidases (*BGs*), até a degradação em ácido faseico (PA) e ácido dehidrofaseico (DPA), com participação de genes *CYP707A* (LENG et al., 2014; LIAO et al., 2018; NAMBARA; MARION-POLL, 2005). Nesse contexto, surge a hipótese de que são as alterações na biossíntese de carotenóides, em especial com indução da síntese de zeaxantina, que precedem o aumento das concentrações de ABA, que dão origem ao início e à evolução da maturação dos morangos.

5.2 Objetivos

5.2.1 OBJETIVO GERAL

O ensaio da hipótese. Estudar relações entre as vias de ABA, Flavonoides e AsA com as da via de carotenóides.

5.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Extrair e quantificar os compostos da via de carotenóides nestes frutos;

Quantificar o teor o ácido abscísico, os flavonoides e o ácido ascórbico nesses frutos;

Acompanhar a expressão relativa de transcritos das vias supracitadas ao longo do crescimento e desenvolvimento destes frutos; e,

Coletar, analisar e interpretar os resultados obtidos.

5.3 Materiais e Métodos

5.3.1 COLETA DE MATERIAL

Os morangos serão colhidos em um produtor próximo ao Campus Capão (aproximadamente 1 quilômetro), da Universidade Federal de Pelotas, em 10 estádios de maturação diferentes com 3 repetições, cada repetição apresentando 8 morangos. Os estádios serão definidos de acordo com a literatura. Serão projetados para abranger a vida máxima do morango na planta, após colhidos, serão selecionados e logo congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

5.3.2 QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS

5.3.2.1 ÁCIDO ABSCÍSICO

O método será empregado de acordo de acordo com (PERIN et al., 2018) utilizando 100 mg de amostra liofilizada para a quantificação de ABA, ABA-GE, PA e DPA utilizando curva analítica do ABA.

5.3.2.2 ANTOCIANINAS INDIVIDUAIS

As antocianinas individuais (pelargonidina, cianidina, cianidina 3-glicosídeo e cianidina, rutinosídeo, peonidina, malvidina e deofinidina) e os compostos fenólicos individuais (ácido ferúlico, p-cumárico, gálico, cafeico, sináptico, elágico, epicatequina, catequina, quercitina, kaempferol e miricetina) serão quantificados de acordo com (PERIN et al., 2019), através de Cromatógrafo Líquido Ultra Rápido (UFLC) acoplada a espectrometria de massas em tandem (MS/MS).

5.3.2.3 ÁCIDO L-ASCÓRBICO

O ácido L-ascórbico será determinado utilizando UFLC pela metodologia descrita por (VINCI et al., 1995).

5.3.2.4 SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS

A análise será realizada utilizando amostras frescas em um refratômetro digital da marca WM-7 ATAGO, o branco será água ultrapura.

5.4 Variáveis

Quadro 1. Delineamento experimental da relação do teor de carotenoides, ABA e acúmulo de transcritos em frutos de morango coletados em diferentes estágios de crescimento e desenvolvimento.

Variáveis independentes	Variáveis dependentes
Estádios de desenvolvimento do morango	Teor de compostos fenólicos Teor de antocianinas Teor de ácido L – ascórbico Teor de ABA , PA e DPA Expressão de transcritos Concentração de carotenóides
Análises serão em triplicata	

6. RELATÓRIO DE TRABALHO DE CAMPO

6.1 Procedimentos adotados para a definição do tema de trabalho, da pergunta de pesquisa e emissão de hipótese

No primeiro semestre foi acordado, com os orientadores, que realizaram reuniões semanais para discutirmos propostas de projeto. Essas semanas foram utilizadas para levantamento bibliográfico generalizado na área de Biotecnologia Vegetal; foram enumeradas questões de pesquisa acerca de eventos em metabolismo vegetal, levantadas algumas hipóteses e alguns objetivos, com o objetivo de definir a pergunta de pesquisa, hipótese, objetivos e estratégias de trabalho. Essas reuniões eram efetivadas com os professores orientadores e colegas que iriam atuar em temáticas equitativas: Jéssica Machado e Uli Trindade.

Desse trabalho, definiu-se que o tema seria carotenóides no processo de crescimento e desenvolvimento de morango, regido pela hipótese 'A mudança na rota metabólica dos carotenóides leva à alteração na rota metabólica do ácido abscísico que, então, altera o processo de amadurecimento de morangos'. Assim, ao longo dos estádios onde ocorreu o aumento expressivo do conteúdo de ABA, esperava-se um aumento anterior no conteúdo de carotenóides específicos, assim culminando na formação do ABA. Além disso, esperava-se a busca por mais informações acerca dessa importante rota para o estudo de frutos.

Nas reuniões seguintes, o desenho experimental e os métodos necessários foram discutidos. Definiu-se que o modelo experimental a ser utilizado seria o fruto de morango; que cada repetição conteria oito frutos, cada teste iria ser repetido três vezes por estádio e totalizaríamos dez estádios de crescimento e desenvolvimento. Isso totaliza 480 frutos.

A caracterização dos estádios foi idealizada no intuito de abranger ao máximo os eventos do crescimento e desenvolvimento; para isso foi realizada uma revisão bibliográfica, utilizando como base os artigos que deram origem à pergunta preliminar: (BALDI et al., 2018; FAIT et al., 2008; JIA et al., 2013; PERKINS-VEAZIE, 1995). Esses autores já utilizaram esses parâmetros em seus trabalhos, em geral caracterizando sete estádios de desenvolvimento do fruto de morango. Neste trabalho, decidiu-se ampliar para dez estádios, de modo a poder-se detectar o início das alterações que são objeto da hipótese. A orientação para a condução de pesquisa bibliográfica propôs usar bases que incluem o Google Acadêmico, PubMed NCBI, ScienceDirect e Periódicos Capes.

Os métodos a serem empregados para colocar a hipótese em teste foram baseados em conceitos de química e de biologia molecular. Ficou acertado utilizar cromatografia líquida de alta pressão acoplada à espectrometria de massas em tandem para detecção, tentativa de identificação e quantificação de metabólitos (UFLC-MS/MS), e a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) para a quantificação relativa do acúmulo de transcritos de genes de interesse nesse trabalho.

6.2 Desenvolvimento do projeto

6.2.1 ETAPA I: COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Os estádios para coleta das amostras foram denominados de: Floral (F), Iniciais (I), Crescimento (C) e Amadurecimento (A). Além disso, os estádios I, C e A foram subdivididos em três sub-estádios cada. As coletas foram realizadas em cultivo comercial de produtor local, a aproximadamente 2 km da Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão. Para contemplar esse desenho experimental, foram realizadas três coletas, realizadas em novembro e dezembro. Foram utilizadas para o experimento a cultivar San Andreas, lançada em 2009, pela Universidade da Califórnia, EUA. Essa cultivar tem como características de cultivo ser moderadamente

resistente ao oídio, antracnose, murcha de *Verticillium* e podridão da coroa de *Phytophthora* além de ser tolerante a ácaro rajado (ANTUNES et al., 2016).



Figura 6: Sistema de plantio sobre slab, em estufa aberta, produtor local próximo a Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão.



Figura 7: Início da formação da fruta, no estágio floral.

Foram coletados, ao todo, 600 morangos, colocados em saquinhos ziplock e armazenados em isopor com gelo, para transferência até a Universidade. O produtor

pediu para pararmos com as coletas das flores, uma vez que estava afetando o crescimento dos outros morangueiros e a sua produção de mel. Por consequência, esse estágio foi removido do desenho experimental, por quantidade insuficiente de amostra.

Na Universidade, os morangos foram selecionados e separados de acordo com o estágio de maturação. Em seguida, parte das amostras foi liofilizada para realização das análises de metabolômica e parte foi macerada para as análises de transcriptômica. Após esses procedimentos, todas as amostras foram congeladas com auxílio de nitrogênio líquido, e posteriormente guardados em ultra freezer até a realização das análises.



Figura 8: Estádios de crescimento e desenvolvimento coletados, estágio inicial (i), estágio de crescimento (c) e estádios de amadurecimento (a).

6.2.2 ETAPA II: EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE CDNA

Para a análise de RT-qPCR foi realizada a extração de RNA utilizando o protocolo usando Brometo de Cetrimônio (CTAB) de acordo com (DA SILVA MESSIAS et al., 2014). Para a realização desse protocolo foram preparadas três soluções previamente: solução de extração CTAB (2% CTAB, 2% Polivinilpirrolidona, 2 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM ácido etileno diamino tetra-acético e, logo após autoclavar, adiciona-se 3.3% β -mercaptoetanol), o tampão SSTE (1 M NaCl, 0.5% dodecil sulfato sódico, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) e por fim uma solução de cloreto de lítio (10 M LiCl). Todas as vidrarias e reagentes termorresistentes foram autoclavados na pressão de trabalho por 45 min.

Após, 100 mg de tecido foi macerado juntamente com auxílio de nitrogênio líquido e colocado em microtubo de 2 mL, no qual foi adicionado 1210 μ L de CTAB aquecido a 65 °C. O tubo foi agitado no homogeneizador vortex por 1 min, e incubado em banho maria aquecido por 5 min a 65 °C. O processo de homogeneização e incubação em banho maria foi então repetido.

As amostras foram divididas em 2 tubos de 2 mL. A cada tubo foi adicionado clorofórmio e álcool isoamílico (24:1), agitando-se por 5 min e, em seguida, centrifugados a 4 °C por 20 min a 7300 x g. Retirados os tubos, a fase superior foi transferida a novos tubos e a inferior foi descartada. A adição de clorofórmio e álcool isoamílico foi repetida, e os tubos novamente centrifugados. Ao final deste processo, o sobrenadante dos dois tubos contendo a mesma amostra inicial foi unido em um novo tubo, ao qual foi acrescentado o cloreto de lítio seguido de incubação a -20 °C por 12h. Na sequência, a amostra foi centrifugada a 13000 x g por 30 min, foi descartado o sobrenadante e o pellet foi ressuscitado em 200 µL SSTE aquecido a 65 °C, sendo intercalado entre agitação e aquecimento para dissolver o precipitado. Logo em seguida foi adicionado 200 µL clorofórmio:isoamílico (24:1), e os tubos foram homogeneizados por inversão e centrifugados a 10000 x g por 10 min. A fase superior foi transferida para um novo tubo, e repetido o processo de adição, centrifugação e transferência. Então, foi adicionado 18 µL de NaAc 3 M pH 5,5 (acetato de sódio) e 364 µL de etanol absoluto, misturado por inversão e foi precipitado a -70 °C por 1h. Então os tubos foram centrifugados a 18000 x g por 30 min, e o sobrenadante descartado. Acrescentou-se 100 µL de álcool 70%, e centrifugou-se por 18000 x g por 2 min, e o sobrenadante foi descartado. A lavagem do pellet formado com álcool 70% foi repetida e, ao final, o pellet foi suspenso em água ultrapura autoclavada. As amostras foram armazenadas em ultra-freezer a -80 °C para posterior síntese de cDNA.

Nesse momento, estávamos no início da pandemia, e fomos instruídos a parar as atividades no Laboratório e entrarmos em isolamento social, conforme regramentos públicos e, por conseguinte, da UFPel. Nessa mesma época, o equipamento da UFLC-MS/MS apresentava uma falha mecânica que exigiu assistência técnica especializada. Houve agendamento com a equipe técnica da Shimadzu e, em abril, foi consertado, com recursos do CNPq.

6.2.3 ETAPA III: REALIZAÇÃO DAS ANÁLISES NO UFLC-MS/MS

Em abril as atividades no Campus Capão do Leão foram retomadas com protocolos de biossegurança e, em maio, foram preparados os extratos para a identificação de metabólitos utilizando UFLC-MS/MS. Foram utilizadas as amostras liofilizadas; foram pesadas as amostras em triplicata pelos 9 estádios para cada

protocolo de extração: ácido abscísico, ácido L-ascórbico, antocianinas e compostos fenólicos.

6.2.3.1 ÁCIDO ABSCÍSICO

O protocolo foi padronizado por (PERIN et al., 2018), no LACEM do DCTA-UFPEL. Para a extração pesou-se 100 mg de amostra liofilizada em microtubos de 2 mL, adicionou-se a amostra 1 mL de Metanol (80 %) e agitou-se em vortex durante 1 min. Após, centrifugou-se a 18.500 x g por 5 min, o sobrenadante foi recolhido e transferido para um novo microtubo de 2 mL, e o resíduo foi re-extraído, conforme as etapas anteriores. Em seguida, uniu-se o sobrenadante da primeira extração com o sobrenadante da re-extração e filtrou-se o extrato com filtro de membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,22 µM sendo transferido para vials.

Foram injetados 10 µL de extrato em cromatógrafo a líquido de ultra-alta eficiência (UFLC, Shimadzu, Japão) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução (tipo quadrupolo-tempo de voo) (Maxis Impact, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Para a separação dos compostos foi utilizada uma coluna Hyperclone ODS C18 (Phenomenex, CA, USA), com solução de água com 0,1 % de ácido fórmico (eluente A) e acetonitrila acidificada com 0,1 % de ácido fórmico (eluente B), como fase móvel. O fluxo utilizado foi de 0,2 mL min⁻¹ e a temperatura da coluna de 40 °C. Para a separação utilizou-se um gradiente: 0,00 min – 20 % B, 2,00 min 30 % B, 6,00 min – 38 % B, 8,00 min – 50 % B, 10,00 – 70 % B, 12,00 min – 20 % B, e terminando aos 15 min com 20 % de B (PERIN et al., 2018). O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização negativo, com espectros adquiridos ao longo de uma faixa de *m/z* 50 a 1200. Os parâmetros de capilaridade foram: voltagem do capilar em 3,5 kV, gás de secagem em 8,0 L min⁻¹ e temperatura de 180 °C, pressão do gás de nebulização de 2 bar, colisão de RF de 300 Vpp, tempo de transferência 120 µs e armazenamento pré-pulso de 8 µs. O equipamento foi calibrado com formiato de sódio 10 mM. Para o processamento dos dados de MS e MS/MS foi utilizado o software Data analysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Para a quantificação de ABA, ABA-GE, PA e DPA foi utilizada uma curva analítica de ABA, os resultados foram expressos em mg por 100 gramas de extrato liofilizado.

6.2.3.2 ÁCIDO L-ASCÓRBICO

O ácido L-ascórbico foi analisado com o método descrito por (VINCI et al., 1995). Para isso, 1 g de amostra macerada foi acrescida de 100 ml de ácido metafosfórico 4.5% m/v, misturado em temperatura ambiente por uma hora em intervalos de 15 minutos. A amostra foi sonicada e centrifugada a 5000 rpm por 10 min, e o sobrenadante foi filtrado em membrana de nitrocelulose 0,4 μm . Foi injetado 10 μL em UFLC com coluna RP-C18 CLC-ODS (5 μm ; 4.6 mm x 150 mm) e usado detector UV a 254 nm. O teste foi realizado usando duas fases móveis, uma solução isocrática de água e ácido acético (99.9 0.1 v/v) e a fase móvel contendo metanol. A taxa de fluxo foi de 0.8 mL min^{-1} ; foi utilizado curva de calibração para mensurar o conteúdo de AsA e os resultados foram expressos em mg 100 g^{-1} em massa fresca.

6.2.3.3 ANTOCIANINAS E FENÓLICOS

Para a extração foram utilizados 100 mg de amostra liofilizada e acrescidas de 1 mL de metanol (75%) acidificado com 0,1% ácido fórmico. A solução foi agitada em vórtex por 10 segundos e colocada em banho ultrassônico por 15 minutos; logo foi centrifugado a 9,900 x g por 10 minutos a 25 °C. O sobrenadante foi recolhido e o resíduo foi novamente extraído com as mesmas etapas acima. Os sobrenadantes foram unidos e a uma fração de 998 μL de extrato foram acrescidos 2 μL de reserpina (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, padrão interno). Este extrato foi filtrado usando seringa e filtro PVDF (0,22 μM) para os frascos de injeção.

Foram injetados 10 μL da amostra de cada estágio em UFLC (Shimadzu, Japão) acoplada a um espectrômetro de massa em tandem, tempo de voo e quadrupolo (Maxis Impact, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Foram utilizadas duas fases móveis, água com ácido fórmico 0,1% (eluente A) e acetonitrila com ácido fórmico 0,1% (eluente B). O fluxo utilizado foi de 0,2 mL min^{-1} e a temperatura da coluna de 40 °C. Para a separação utilizou-se um gradiente: 2,00 min – 10 % B, 10,00 min – 75 % B, 15,00 min – 75 % B, 18,00 – 90 % B, 21,00 min – 90 % B, 23,00 min – 10 % B. A coluna usada nas corridas para separação dos compostos foi uma Cogent Bidentate C18 (22 m 120A - 100 mm 12,1 mm) (MicroSolv Technology Corporation Leland NC, EUA) a uma pré-coluna C18 (2,0 x 4 mm). O intervalo dos espectros foi 50-1200 m/z . A ionização foi em modo negativo para fenólicos e positivo para antocianinas, com tensão capilar 3,5 e 4,5 kV: uso de gás de secagem 8,0 e 9,0 L min^{-1} ; pressão do gás de nebulização 20 bar, temperatura do gás de secagem 180-200 °C; Colisão RF 500 Vpp; tempo de transferência 120 e 60 μs e armazenamento pré-

pulso de 8,0 e 5,0 μ s. A energia de colisão foi: m/z 100 15 eV; m/z 500 35 eV; e m/z 1000, 50 eV. Foi usado azoto como gás de colisão. O equipamento foi calibrado com formato de sódio 10 mM.

Os dados foram processados usando o Data Analysis 4.0 (Bruker Datonis, Bremen, Alemanha). Os compostos foram identificados comparando os valores observados de m/z , espectro de massa e padrões de fragmentação com banco de dados online (METLIN, KEGG, PubChem, FoodDB e ReSpect), com precisão de massa de 5 ppm. A análise quantitativa se deu através da construção de uma curva de calibração para cada padrão fenólico disponível; e para antocianinas foi utilizado uma curva analítica de Pelargonidina.

6.3 Problemas encontrados e o redimensionamento do projeto

Devido ao fato de o equipamento de UFLC-MS/MS disponível não ser equipado com o sistema de ionização necessário para as análises de carotenóides, previu-se a realização destas análises em laboratórios parceiros. Fizeram-se extrações especulativas para otimização do método em uma amostra A3, onde não foi observado uma grande absorção no comprimento de 400-500 nm, e sim uma grande absorção no ultravioleta entre 200~350 nm (Fig 9.). Além disso, não houve o detalhamento do perfil de carotenóides, pois os dois laboratórios parceiros previstos no projeto estavam com restrição total de acesso nesse momento de pandemia.

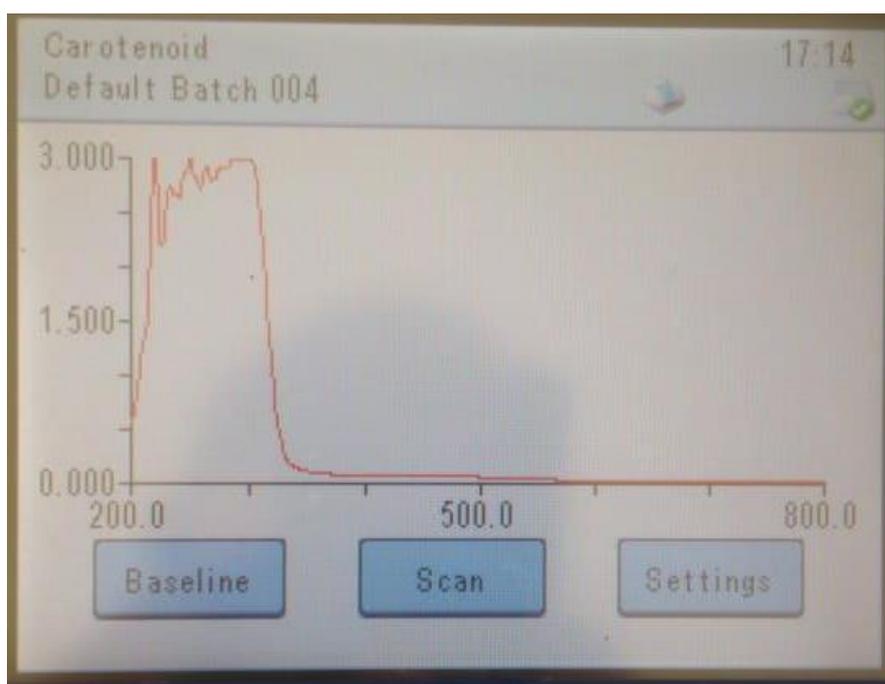


Figura 9: Fotografia da varredura do espectro luminoso da amostra A3.

Frente às circunstâncias, houve necessidade de rever o projeto, redimensionar a hipótese e as estratégias de trabalho, essas alterações são contempladas no artigo científico apresentado nessa dissertação. Junte-se a isso, uma falha no ultra-freezer que levou a perda de todas amostras frescas e o RNA extraído.

6.4 Contribuições futuras

No processo de separação dos frutos, foi realizado por cinco pessoas, cada uma julgando o estágio através da comparação com uma fotografia fornecida aos analistas. Isso certamente interferiu na seleção das amostras; no entanto, esse método foi realizado devido ao grande volume de frutos, os quais necessitavam ser separados com rapidez para evitar alterações metabólicas induzidas pelo ambiente pós-colheita. Os frutos foram separados de acordo com a necessidade dos métodos (macerados ou liofilizados), entretanto o melhor seria ter utilizado os mesmos frutos para os dois, através de uma divisão vertical no fruto, o que pouparia tempo de coleta e processamento. Então o ideal seria marcar os frutos após a antese e contar os dias, e por fim utilizar a mesma amostra para ambos os teste para reduzir o volume de amostras.

As análises foram feitas e projetadas para os morangos na sua totalidade; no entanto, os principais hormônios que afetam a maturação, como ácido abscísico e as auxinas, estão majoritariamente nos aquênios. Por isso, sugeriu-se separar os aquênios do receptáculo, e fosse feita uma abordagem mais precisa para identificar os carotenoides, uma vez que o ácido abscísico é, provavelmente, sintetizado majoritariamente nos aquênios (SYMONS et al., 2012).

Para mais, novos estudos são necessários como o acompanhamento dos carotenoides ao longo do crescimento e desenvolvimento; criar um desbalanço no ciclo das xantofilas, que antecedem a síntese de ABA, através de radiação, estresses e silenciamentos genéticos, a fim de induzir alterações na rota metabólica do ABA, podem ajudar a trazer novas informações sobre a regulação nessa etapa.

7. ARTIGO

7.1 Inter-relações entre a síntese de ácido abscísico, flavonoides e ácido L-ascórbico durante a maturação de morangos

7.2 Abstract

Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) is a fruit widely consumed worldwide due to its attractive sensory characteristics. Furthermore, it is a model for the study of non-climacteric fruits. Some studies have shown that the phytohormone abscisic acid (ABA) plays a key role in the ripening process in non-climacteric fruits, especially in the induction of anthocyanins. ABA is formed through photosynthetic carotenoids when they are under low photosynthetic activity. In this step, L-ascorbic acid (AsA) is used to reduce carotenoids again, and protect the chlorophyll from oxidative damage. However, the relationship between ABA accumulation, AsA content and the phenolic compounds involved in the ripening of strawberry fruits is still unknown. Thus, this study aimed to relate the accumulation of ABA with that of AsA and compounds of the phenylpropanoid pathway during the growth and development of strawberry fruits. For the test, strawberries in nine stages of growth and development were harvested, and submitted to UFLC-MS/MS analysis. The ABA content at ripening increased, while the increase in AsA happened before ABA. Statistical analysis identified AsA as the main biochemical differentiator between the stages in this study, and showed a positive correlation with ABA. The total soluble solids content reduced in the initial stages, rising again in the growth, and remaining in the ripening. ABA had a strong positive correlation with pelargonidins, however, with the cyanidin detected in the study, there was no positive correlation. The hypothesis cannot be denied, as there was a reduction in AsA accumulation at the time of ABA increment. Thus, new studies are relevant to put the hypothesis to the test.

7.3 Resumo

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) é uma fruta muito consumida mundialmente devido suas características sensoriais atrativas. Além disso, é um modelo para o estudo de frutos não-climatéricos. Alguns estudos têm demonstrado que o fitohormônio ácido abscísico (ABA) desempenha um papel fundamental no processo de maturação em frutos não-climatéricos, especialmente na indução de antocianinas. O ABA é formado através de carotenóides fotossintéticos quando estão

sob baixa atividade fotossintética. Nessa etapa é utilizado ácido L-ascórbico (AsA) para reduzir os carotenóides novamente, e proteger a clorofila de dano oxidativo. No entanto, a relação entre o acúmulo de ABA, o teor de AsA e os compostos fenólicos envolvidos no amadurecimento dos frutos de morango ainda são uma incógnita. Desta forma, este estudo objetivou relacionar o acúmulo de ABA com o de AsA e de compostos da rota de fenilpropanóides ao longo do crescimento e desenvolvimento de frutos de morango. Para o ensaio, morangos da cultivar San Andreas em nove estádios de crescimento e desenvolvimento foram colhidos, e submetidos à análise de sólidos solúveis totais, e à identificação e quantificação do teor de ABA e derivados, AsA e compostos fenólicos através de UFLC-MS/MS. O teor de ABA no amadurecimento aumentou, enquanto o incremento de AsA aconteceu anteriormente ao ABA. A análise estatística identificou o AsA como principal diferenciador bioquímico entre os estádios nesse estudo, e apresentou uma correlação positiva com o ABA. O teor de sólidos solúveis totais reduziu nos estádios iniciais, voltando a subir no crescimento, e se mantendo no amadurecimento. O ABA apresentou correlação positiva com as pelargonidinas; no entanto, não apresentou correlação positiva com a cianidina detectada no estudo. A hipótese não pode ser negada, pois houve uma redução no acúmulo de AsA no momento do incremento de ABA. Assim novos estudos se fazem relevantes para entender a relação entre AsA e o acúmulo de ABA ao longo dos estádios.

7.4 Introdução

O pseudofruto morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) é amplamente consumido pelos atributos de aparência, textura, cor e sabor, além das propriedades nutricionais e funcionais (GIAMPIERI et al., 2015). De modo geral, as cultivares mais plantadas são aquelas produtoras de morangos de coloração rosada ou avermelhada (ZEIST; RESENDE, 2019). Morfologicamente, o pseudofruto morango é constituído de dois órgãos: a parte carnosa (fruta) e os aquênios (frutos)(ANTUNES et al., 2016). Nesse trabalho, como se estudou o conjunto da parte carnosa com os aquênios, sem separação, passar-se-á a denominar o morango genericamente como fruto.

Durante o crescimento e desenvolvimento dos morangos, as alterações mais facilmente perceptíveis são o aumento do tamanho e da massa, as alterações de coloração, textura, sabor e aroma (PERKINS-VEAZIE, 1995). Essas mudanças são consequência de uma inter-relação de eventos moleculares, bioquímicos e fisiológicos (GAPPER; MCQUINN; GIOVANNONI, 2013; GU et al., 2019), os quais vem sendo largamente estudados. Assim, por exemplo, se dispõe do repertório genômico do morangueiro (SHULAEV et al., 2011), de transcriptomas do fruto (CHEN et al., 2016; GU et al., 2019; KIM et al., 2019), caracterização parcial de enzimas, metabólitos (BALDI et al., 2018a), hormônios (GU et al., 2019), e as principais alterações de atributos de qualidade nutricional, funcional e sensorial (PERKINS-VEAZIE, 1995).

Esses avanços têm contribuído marcadamente para o entendimento de como se dá a maturação e amadurecimento do morango, bem como para se lançar hipóteses de como ocorrem essas alterações. Por exemplo, há consenso de que a maturação de morangos, de modo geral, se enquadra como um metabolismo não climatérico (JI et al., 2012; LI et al., 2011; NUNES et al., 2006; PERKINS-VEAZIE, 1995; ZHONGJIE et al., 2015), embora haja respostas em menor escala de produção de etileno semelhantes àsquelas observadas em frutos climatéricos (IANNETTA et al., 2006; MERCHANTE et al., 2013; PERKINS-VEAZIE'; HUBER; BRECHT, 1995). Da mesma forma, consolida-se o conhecimento de que a redução da síntese e acúmulo de auxinas e o aumento da síntese e acúmulo de ácido abscísico (ABA) se relacionam com as alterações típicas da maturação e amadurecimento (LIAO et al., 2018). Esses avanços são relevantes porque ao longo do crescimento e desenvolvimento se observa concomitantemente a perda da coloração esverdeada, início do surgimento

da coloração rosada e avermelhada, amolecimento dos tecidos, diminuição da adstringência, aumento do sabor adocicado e dos aromas (GIOVANNONI, 2004). Essas alterações, que impactam a aceitação por parte dos consumidores, vêm acompanhadas de alterações nutricionais e funcionais (RAHMAN et al., 2016).

Diferentemente de frutos tipicamente climatéricos, em que a maioria dos eventos da maturação e amadurecimento são fortemente etileno-dependentes (QUINET et al., 2019), em morangos, o ABA desempenha função reguladora nesses eventos (JI et al., 2012; JIA et al., 2016). Esse hormônio é amplamente conhecido por regular respostas dos vegetais a agentes estressores, com destaque para aquisição de plasticidade das plantas frente à falta de água, à salinidade, ao aumento da temperatura, atuar na maturação e dormência de sementes, regular o crescimento do sistema radicular e aéreo, diferenciação foliar e no controle da floração (TAIZ et al., 2017). Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que agentes estressores por aumento da salinidade e diminuição do aporte hídrico geram acúmulo tanto de ABA como de antocianinas, e alterações nos níveis de ácido L-ascórbico (AsA) também foram evidenciados em morangos (CRIZEL et al., 2020; GALLI et al., 2016; PERIN et al., 2019). Além disso, já foi demonstrado que aplicações exógenas de ABA alteram o amadurecimento de morangos, acelerando o amolecimento e o avermelhamento destes frutos (CHEN et al., 2016; JIANG; JOYCE, 2003; SIEBENEICHLER et al., 2020).

A biossíntese do ABA é proveniente da rota dos isoprenóides, mais especificamente da degradação do β -caroteno (STANGE, 2016). A síntese desse hormônio começa na transformação da zeaxantina pela enzima zeaxantina epoxidase em violaxantina. Essa etapa pode ser revertida através da ação da violaxantina de-epoxidase com gasto de ácido L-ascórbico (AsA) (JAHNS; LATOWSKI; STRZALKA, 2009). Após uma série de reações enzimáticas, a violaxantina é convertida a ABA aldeído, o qual é oxidado para formação do ABA pela ação do aldeído abscísico oxidase (WANG et al., 2021). A biodisponibilidade do ABA ainda pode ser regulada através de sua degradação irreversível a ácido faseico (PA), o qual é convertido a ácido dehidrofaseico (DPA); ou pela conjugação reversível com glicose, formando ABA glicosil ester (ABA-GE) (NAMBARA; MARION-POLL, 2005). Esse metabolismo ocorre nos plastídios e, a partir da síntese, pode ser transportado para outros

compartimentos celulares, tecidos e órgãos, de modo a atuar como hormônio regulador dos eventos anteriormente citados (FINDELSTEIN, 2013).

Outra alteração significativa que ocorre durante a maturação de morangos é a síntese de AsA (CRUZ-RUS et al., 2011). De modo geral, morangos são considerados frutos medianamente ricos em AsA, com teores chegando até a 60 mg/kg (GIAMPIERI et al., 2012; PERKINS-VEAZIE, 1995). Esse ácido orgânico, com elevado potencial antioxidante (SMIRNOFF, 2018) é sintetizado a partir de 4 vias mais conhecidas: 1) Wheeler-Smirnoff, a partir da D-glicose; 2) a partir da GDP-L-gulose; 3) a partir do mio inositol; e; 4) a partir do ácido D-galacturônico, componente principal das pectinas da parede celular (FENECH et al., 2019). Em morangos, a via do D-galacturonato parece ser relevante na síntese de AsA no fruto (DO NASCIMENTO et al., 2005). Essa via estaria correlata à solubilização de pectinas, gerando substrato para a produção de AsA (FENECH et al., 2019). Essa hipótese foi consubstanciada no estudo em que, por transgenia, foi reduzida a solubilização da pectina no amadurecimento e reduzindo o conteúdo de AsA (AGIUS et al., 2003).

Semelhante ao AsA, a síntese, bioconversão e acúmulo de compostos fenólicos é importante em morangos, já que se tratam de características sensoriais e nutracêuticas e os frutos são relativamente ricos em ácidos fenólicos (CRIZEL et al., 2020; VIGHI et al., 2019). Esse metabolismo ocorre nos plastídios, partindo de aminoácidos aromáticos, especialmente fenilalanina, seguindo a via de biossíntese do ácido chiquímico (DONG; LIN, 2021). Nessa via metabólica são sintetizados ácidos fenólicos, chalconas, flavononas (isoflavonas), dehidroflavononas (kaempferol, quercitina), leucoantocianidinas (catequinas, epicatequinas) e antocianinas (pelargonidina, cianidina, delphinidina) (VOGT, 2010). Diversos genes e enzimas dessas vias metabólicas já foram parcialmente caracterizados em morangos (XU et al., 2019), alguns deles como a fenilalanina amônia liase são induzidos pelo ABA (JIANG; JOYCE, 2003); além disso ao silenciar a rota de biossíntese do ABA não ocorre a coloração característica (JIA et al., 2011). De modo geral, juntamente ao ABA se observa que esse metabolismo é fortemente afetado por agentes estressores bióticos e abióticos (CRIZEL et al., 2020; GALLI et al., 2016; PERIN et al., 2019), sugerindo o envolvimento desses compostos na adaptação de plantas ao ambiente. Também, são afetados pelo crescimento e desenvolvimento vegetal (FECKA et al., 2021). Esses compostos, gerados por via metabólica plastidial, podem ser reciclados

ou transportados para vacúolos até que haja demanda celular para alguma via metabólica normalmente associada à tolerância a um estresse (VOGT, 2010).

Apesar desses avanços, a maioria dos trabalhos que abordam a maturação em morangos focam em um dos metabolismos em específico ou analisam um estágio de maturação. Aqui, se está propondo acompanhar a dinâmica da síntese de ABA, AsA e de compostos fenólicos durante o crescimento de morangos. Sob a suspeita que para haver síntese de ABA (hormônio sintetizado nos plastídios) há uma redução no consumo de AsA (metabólito mitocondrial), e, ao haver incremento significativo de ABA, iniciam-se as alterações mais significativas de compostos fenólicos (sintetizados nos plastídios), especialmente flavonóis. Essa hipótese é baseada no conhecimento de que para haver a síntese de ABA, ocorre uma redução do uso de AsA nas bioconversões de carotenóides, e que, para haver indução da síntese de flavonóis (antocianinas, especialmente), há necessidade da ação reguladora pelo ABA. Assim, comparamos o acúmulo de AsA e ABA ao longo do amadurecimento do morango com a quantidade de ácidos fenólicos e flavonoides presentes no mesmo.

7.5 Materiais e métodos

7.5.1 COLETA DO MATERIAL

Os morangos da variedade San Andreas (Califórnia, EUA) foram colhidos próximos a Universidade Federal de Pelotas em um produtor local no Capão do Leão (aproximadamente 2 quilômetros) (31°46'59.6"S, 52°24'53.0"W), sob os princípios da agricultura orgânica. Para o trabalho foram coletados 9 estádios de crescimento e maturação diferentes com 3 repetições biológicas, e cada repetição apresentando 8 morangos. Assim, o experimento foi realizado com um somatório total de 216 morangos (9 estádios X 3 repetições X 8 morangos). Os estádios foram separados de acordo com os trabalhos de (BALDI et al., 2018b; FAIT et al., 2008; JIA et al., 2013; PERKINS-VEAZIE, 2010) e projetados para abranger a vida máxima do morango em planta.



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

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

7.5.2 SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS

Para a análise de sólidos solúveis totais (SST) foram utilizados morangos previamente macerados e armazenados em ultra-freezer. A mensuração foi feita em triplicata e realizada usando somente a parte líquida da fruta descongelada em temperatura ambiente (25 °C). Foi utilizada água destilada para tarar o refratômetro digital modelo WM-7 da marca Atago®. Os resultados foram expressos em °Brix.

7.5.3 ÁCIDO ABCSÍCIO

O ácido ABA e seus derivados foram determinados de acordo com PERIN et al., 2018. Para a análise de ABA, ABA-GE, PA e DPA foram usadas três repetições biológicas. Para a separação foram usadas 100 mg de amostra liofilizada com 1 mL de metanol (80%) e vórtex de 1 min, seguido de centrifugação (Eppendorf Centrifuge 5430R, Hamburg, Germany) a 18500 x g por 5 min. O resíduo foi extraído novamente com o mesmo procedimento, e as extrações foram unidas e filtradas com filtro de membrana PVDF 0,22 µM (Analítica, São Paulo, Brazil). Foram então injetados 10 µL do extrato no cromatógrafo a líquido de ultra-alta eficiência (UFLC) (Shimadzu®, Japão) acoplado a espectrômetro de massa de alta resolução (quadropolo-tempo de voo, Maxis Impact HD Bruker Daltonics®, Bremen, Alemanha) (UFLC-MS/MS). Para a separação foi utilizada uma coluna Hyperclone ODS C18 (Phenomenex®, CA, USA). Como fase móvel foi usado água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (eluente A) e acetona acidificada com 0,1% de ácido fórmico (eluente B). O fluxo foi de 0,2 mL⁻¹ a 40 °C. O gradiente de separação começou a 20% B, 30% B em 2 min, e subiu linearmente até 38% B em 6 min, 50% B em 8 min, 70% B 10 min, e retornou para 20% B em 2 min, e foi mantido por 3 min. O espectrômetro de massas estava operando em modo ionização negativo com varredura de massas m/z 50–1200. O equipamento foi calibrado com 10 mM de formato de sódio, e para quantificação dos compostos ABA, ABA-GE, PA e DPA foi usado curva analítica do ABA (Sigma-Aldrich). Os resultados foram analisados com o software Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemanha), e expressos em µg g⁻¹ de tecido liofilizado.

7.5.4 ANTOCIANINAS E FENÓLICOS

As antocianinas e os compostos fenólicos foram quantificados de acordo com Antunes e colaboradores (2019) através de UFLC-MS/MS descrito anteriormente. Foram usados 100 mg de amostra liofilizada, com três repetições. As amostras foram acrescidas de 1 mL de metanol (75%) acidificado com 0.1% de ácido fórmico. O extrato foi para o vórtex por 1 min e sonificado por 15 min logo após centrifugado (Eppendorf Centrifuge 5430R, Hamburg, Alemanha) a 9900 x g por 10 min. O sobrenadante foi coletado e o resíduo extraído novamente. Uma alíquota de 998 µL de cada sobrenadante foi combinada e 2 µL de reserpina (padrão interno), volume final de 1000 µL. A amostra foi filtrada com membrana PVDF 0,22 µM (Analítica, São Paulo, Brasil). O volume de injeção foi de 10 µL no UFLC-MS/MS. Para a separação foi usado a coluna Bidentate C18 (100 × 2,1 mm; MicroSolv Technology Corporation, Leland NC). Como fase móvel foi usado água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (eluente A) e acetona acidificada com 0,1% de ácido fórmico (eluente B). O fluxo foi de 0,2 mL⁻¹ a 40 °C. O gradiente empregado iniciou com 10% B em 10 min, mantido 5 min a 75% B, aumento linear até 90% B em 18 min, e foi mantido 90% B por 3 min, retornou a 10% B em 2 min e mantido por mais 7 min. O espectrômetro estava operando em modo de ionização negativa e para determinação das antocianinas foi usado o modo positivo. O espectro foi ajustado para m/z 50–1200. O equipamento foi calibrado com 10 mM de formato de sódio. Os compostos fenólicos foram quantificados com curvas de calibração externas com padrões para os compostos quercetina, luteolina, ácido elágico, epicatequina, rutina e ácido hidroxibenzoico (Sigma-Aldrich). Para os compostos fenólicos em que não se dispunha de padrão, a identificação foi realizada através da fragmentação pelo MS/MS e os resultados foram comparados com os bancos de dados (METLIN, KEGG, PubChem, FooDB e ReSpect) com precisão de 5 ppm. Para quantificação das antocianinas foi usado a curva analítica da pelargonidina. Os resultados estão expressos em µg g⁻¹ de tecido liofilizado. E para quantificação dos fenólicos foram usadas as curvas da catequina, ácido elágico, epicatequina, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-cumárico, quercitina, luteína, rutina.

7.5.5 ÁCIDO L-ASCÓRBICO

O ácido L-ascórbico foi analisado com o método descrito por (VINCI et al., 1995). Foi usado 1 g de amostras, com três repetições biológicas a qual foi dissolvida em 100 mL de ácido metafosfórico 4,5% m/v, homogeneizado em temperatura ambiente em intervalos de 15 minutos por 1 h. A amostra foi sonicada e centrifugada

a 2935 g por 10 min, e o sobrenadante foi filtrado em membrana de nitrocelulose 0,4 μm . Foram injetados 10 μL de extrato em UFLC com coluna RP-C18 CLC-ODS (5 μm ; 4,6 mm x 150 mm) e usado detector UV $\lambda = 254 \text{ nm}$. Para identificação foi usado curva de calibração com o padrão de AsA. Os resultados estão expressos em $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ de massa fresca.

7.5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0.05$) e, caso observada significância estatística, as médias foram comparadas por teste de Tukey ($p \leq 0,05$); os valores então foram expressos em médias \pm desvio padrão. Foi utilizado o site Metaboanalyst ("<https://www.metaboanalyst.ca/>"), com os dados normalizados em logaritmo, para a análise de componentes principais (PCA) e regressão parcial de mínimos quadrados (PLS), e análise de correlação.

7.6 Resultados

7.6.1 SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS

A análise de sólidos solúveis totais (SST) é a forma de mensurar indiretamente a doçura de frutas. O estágio I1 apresentou 6,86° Brix; após houve uma redução até o seu mínimo de 4,93° Brix no estágio C1, último estágio onde os frutos apresentam coloração totalmente verde. A partir de então há um aumento de SSTs até o estágio C3 (7° Brix). Nos estádios de amadurecimento o conteúdo de SSTs atinge um platô entre 6,1° - 5,96° Brix (Figura 2).

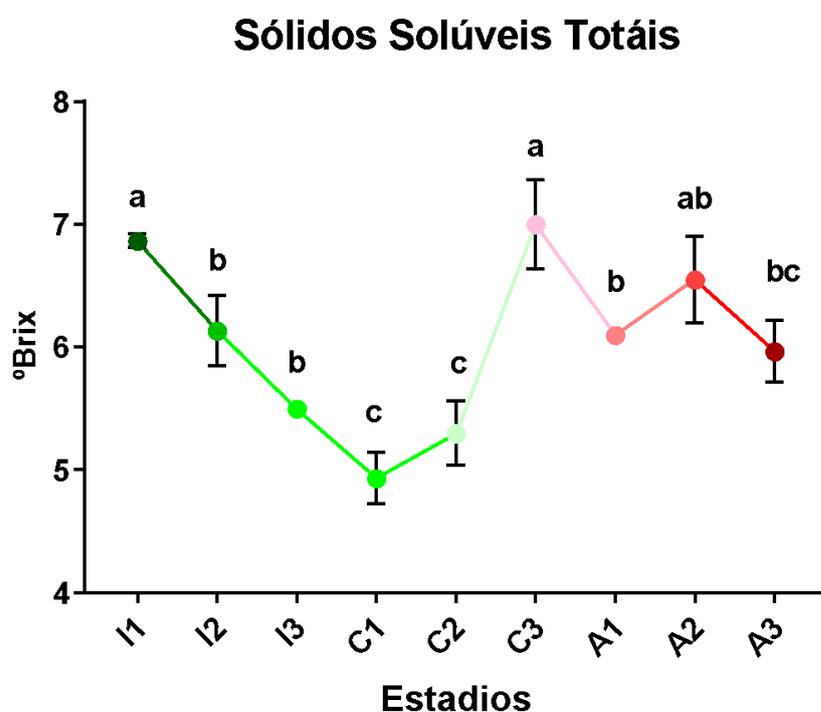


Figura 2: Sólidos Solúveis Totais no crescimento e desenvolvimento de frutos de morango. Estádios Iniciais representados pela letra "I", de crescimento pela letra "C", e amadurecimento pela letra "A". Significância do teste $p < 0,05$. Em minúsculas, as letras representam a comparação de Tukey's entre os estádios.

7.6.2 TEOR DE ÁCIDO ASCÓRBICO

O conteúdo de ácido ascórbico aumentou 162% do estágio I1 até o estágio C2, de 2,28 mg 100g⁻¹ a 5,99 mg 100g⁻¹ respectivamente, indicando ser este o momento de maior indução do conteúdo deste composto durante o crescimento do morango. O conteúdo de AsA não foi alterado significativamente entre os estádios C2, C3, A1 e A2. Do estágio A2 para o A3 houve uma redução para 4,43 mg 100g⁻¹ (Figura 3).

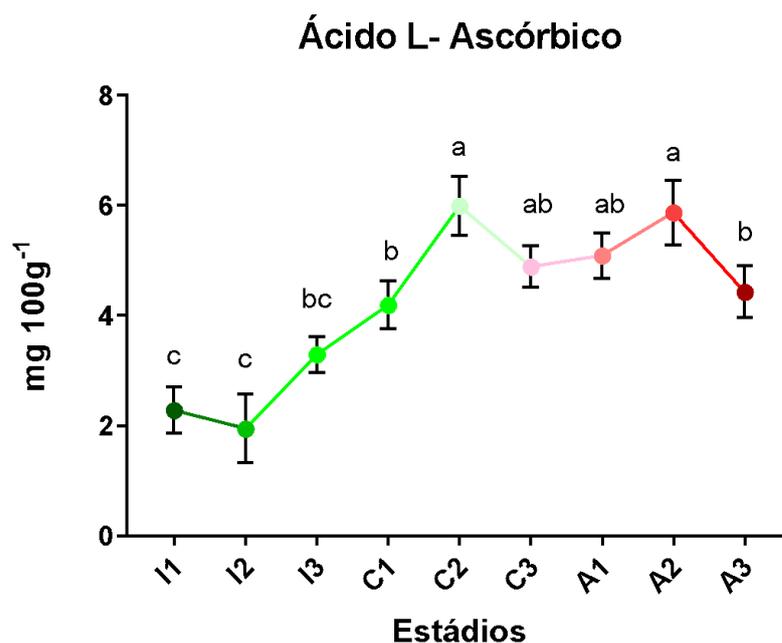


Figura 3: Ácido L-Ascórbico no crescimento e desenvolvimento de frutos de morango. Estádios Iniciais representados pela letra "I", de crescimento pela letra "C", e amadurecimento pela letra "A". Significância do teste $p < 0,05$. Em minúsculas, as letras representam a comparação de Tukey's entre os estádios.

7.6.3 ANTOCIANINAS

Os estádios iniciais e de crescimento dos frutos de morango são caracterizados por apresentarem teor basal de pelargonidinas glicosiladas, o qual é expressivamente induzido a partir do estágio A1, chegando respectivamente a $91,31 \mu\text{g g}^{-1}$ e $105,51 \mu\text{g g}^{-1}$ nos estádios A2 e A3 para a pelargonidina 3-O-rutinosídeo e $702,02 \mu\text{g g}^{-1}$ e $725,84 \mu\text{g g}^{-1}$ para a pelargonidina 3-O-glucosídeo (Figura 4A e 4B).

Quanto a cianidina-3-(6'-malonilglucosídeo), o maior teor foi evidenciado anteriormente, mais precisamente no estágio I3 ($17,62 \mu\text{g g}^{-1}$), quando é gradativamente reduzido, chegando ao estágio final, A3, com um teor de $9,02 \mu\text{g g}^{-1}$ (Figura 4C).

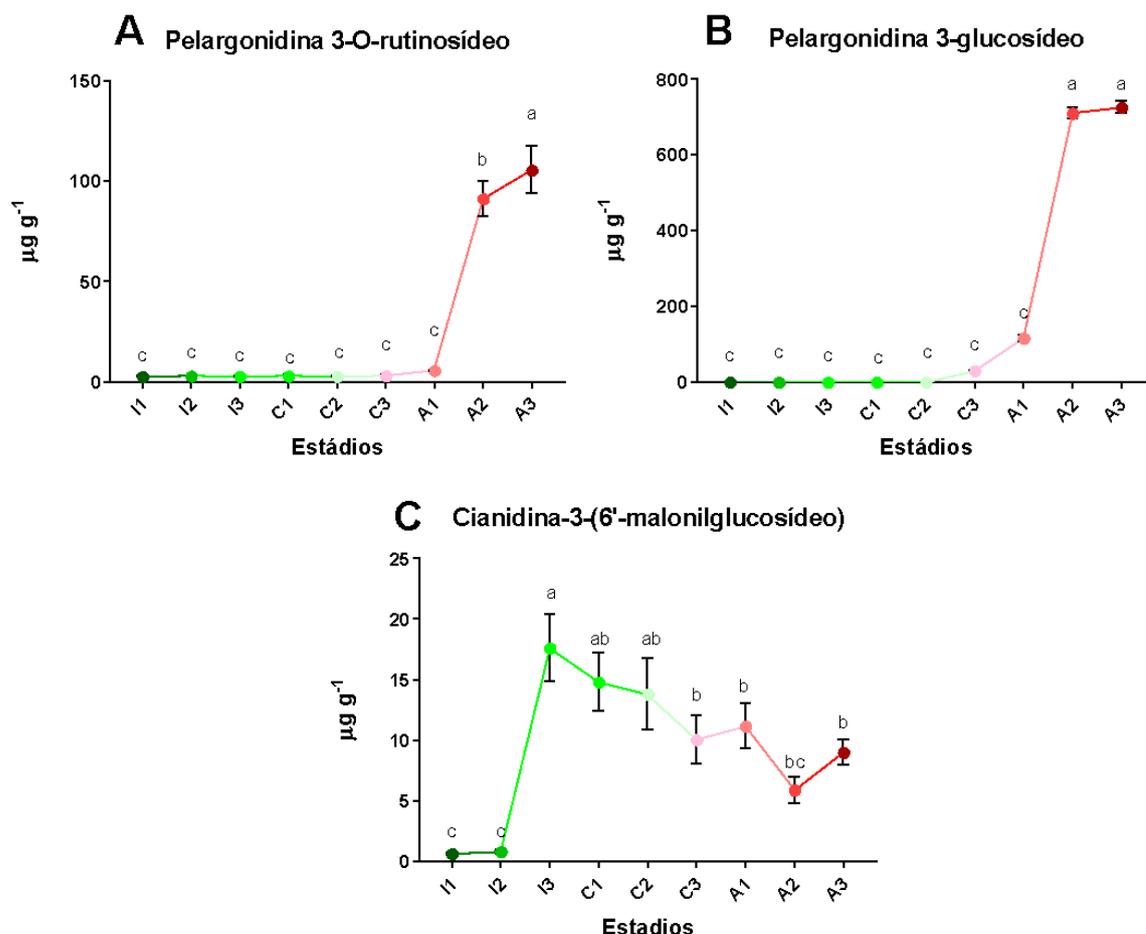


Figura 4: Teor das antocianinas: (A) Pelargonidina 3-O-rutinosídeo, (B) Pelargonidina 3-O-glucosídeo e (C) Cianidina-3-(6'-malonilglucosídeo). Estádios Iniciais representados pela letra "I", de crescimento pela letra "C", e amadurecimento pela letra "A". Significância dos testes $p < 0,05$. Em minúsculas, as letras representam a comparação de Tukey's entre os estádios.

7.6.4 ÁCIDO ABCÍSCICO

O teor de ABA aumentou ao longo do crescimento e desenvolvimento (Figura 5A). No estágio I1 os frutos apresentaram $1,516 \mu\text{g g}^{-1}$ de ABA, não diferindo até o estágio A1 ($1,692 \mu\text{g g}^{-1}$). No estágio A2 aumentou o conteúdo para $2,412 \mu\text{g g}^{-1}$, e chegou a $2,7413 \mu\text{g g}^{-1}$ no estágio A3, representando um aumento de 80% do estágio I1 para A3 (Figura 5A). Já o ABA glicosilado (ABA-GE) não variou até o estágio A1 ($1,538 \mu\text{g g}^{-1}$) e aumentou nos últimos estádios, chegando a $1,757 \mu\text{g g}^{-1}$ no estágio A3, o que corresponde a 14% de aumento do A1 para o A3 (Figura 5B). Já na rota de degradação, o teor de PA foi estatisticamente superior nos estádios I2, C1 e A1, mostrando um comportamento de aumento e diminuição ao longo dos estádios; enquanto que o teor de DPA não apresentou diferença significativa entre os estádios (Figura 5C e 5D).

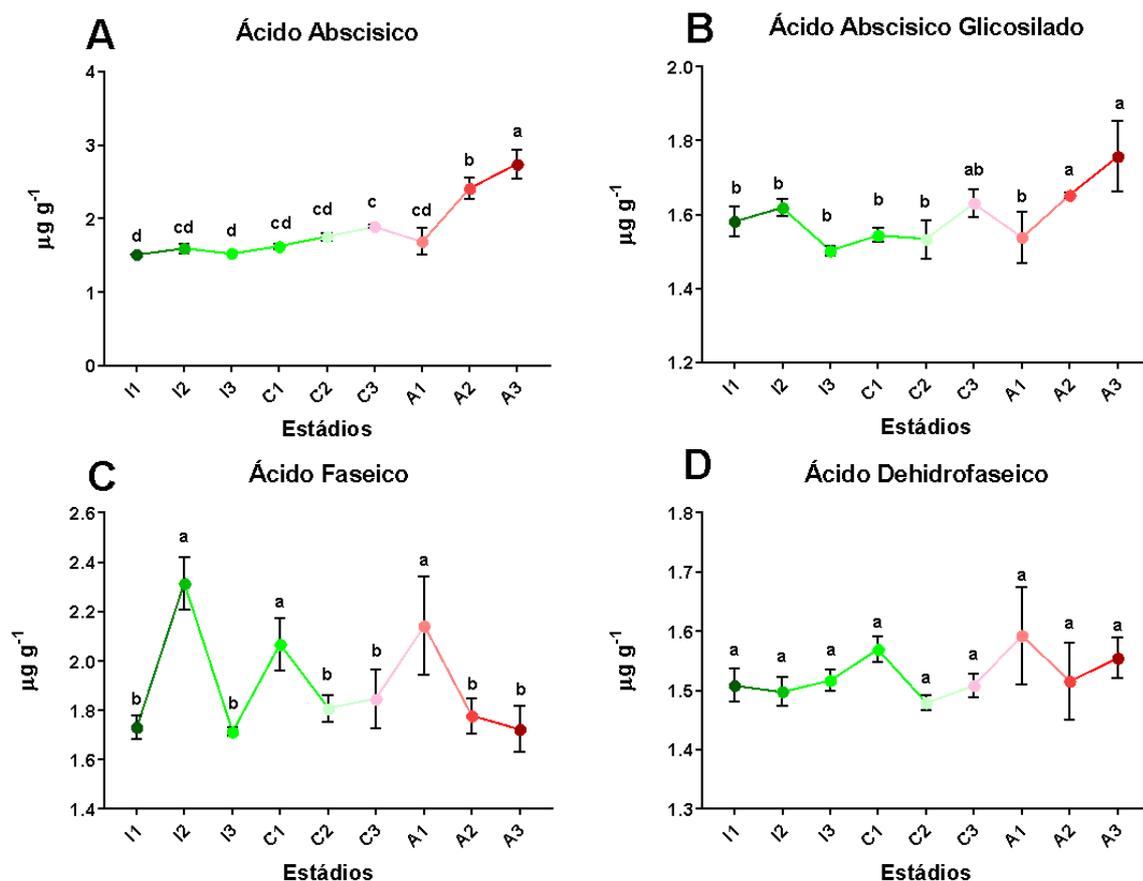


Figura 5. Ao longo do crescimento e desenvolvimento de frutos de morango, (A) Teor de Ácido Abscísico (B) Ácido Abscísico Glicosilado, (C) Ácido Faseico e (D) Ácido Dehidrofaseico. Estádios Iniciais representados pela letra "I", de crescimento pela letra "C", e amadurecimento pela letra "A". Significância dos testes $p < 0,05$, exceto pelo Ácido Dehidrofaseico. Em minúsculas, as letras representam a comparação de Tukey's entre os estádios.

7.6.5 COMPOSTOS FENÓLICOS

A quantificação dos compostos especializados ao longo do crescimento e desenvolvimento de frutos de morango foi realizada com UFLC-MS/MS (Tabela 1). Os compostos foram identificados de duas formas: com padrão externo ou através do perfil de fragmentação. Para a quantificação foi utilizado curva padrão dos compostos e para os que não tiveram curva, usou-se compostos com similaridade estrutural como: catequina, ácido elágico, epicatequina, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-cumárico, quercitina, luteína, rutina. Os compostos separados por barras apresentaram fragmentação conhecida nos bancos de dados, no entanto devido sua estrutura e o método de fragmentação, não foi possível distinguir entre eles.

Alguns compostos aumentaram seu conteúdo ao longo do crescimento e desenvolvimento dos frutos. Foram eles: ácido p-cumárico, que não diferiu em seu conteúdo até o estágio A2, quando atingiu o pico de $1,18 \mu\text{g g}^{-1}$; apigenina- 4'-glucosídeo, com pico no estágio A3 de $70,8 \mu\text{g g}^{-1}$; quercetina- 4'-glicuronídeo com pico de $74,77 \mu\text{g g}^{-1}$ no estágio C3; eriodictiol-7-O-glucosídeo (isômero 1) que no A3 chegou a $95,85 \mu\text{g g}^{-1}$; luteolina 3'-glucuronídeo/kaempferol 3-glicuronídeo com pico no A3 de $33,15 \mu\text{g g}^{-1}$. Alguns apresentaram pico em estágios intermediários do crescimento e desenvolvimento, como a rutina, com pico no estágio C3 de $5,46 \mu\text{g g}^{-1}$; kaempferol 3-O-acetil-glicosídeo/quercetina 3-O-acetil-rhamnosídeo (isômero 1), com pico no I3 de $13,16 \mu\text{g g}^{-1}$; e o ácido elágico 2-ramnose, com pico em C2 de $18,90 \mu\text{g g}^{-1}$. Outros foram detectados apenas nos últimos estágios, como o kaempferol 3-O-acetil-glicosídeo/quercetina 3-O-acetil-rhamnosídeo (isômero 2), metilsiringina, apigenina, eriodictiol-7-O-glucosídeo (isômero 2). Por outro lado, foram detectados compostos que apresentaram um padrão de redução ao longo do crescimento e desenvolvimento, são eles: catequina, epicatequina, epicatequina-epicatequina-catequina, epigalocatequina-catequina, ácido elágico, ácido 4-hidroxibenzoico/ácido salicílico.

Tabela 1: Quantificação dos compostos fenólicos identificados por UFLC-MSMS, ao longo do crescimento e desenvolvimento de frutos de morango, dados estão em $\mu\text{g g}^{-1}$. Concentração não detectada (ND).

Compostos ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Teor no crescimento e desenvolvimento								
	I1	I2	I3	C1	C2	C3	A1	A2	A3
Ácido p-cumárico *	0,95 \pm 0,02 c	0,91 \pm 0,02 c	1,00 \pm 0,05 c	1,03 \pm 0,08 c	0,96 \pm 0,05 c	1,03 \pm 0,03 bc	1,09 \pm 0,01 ac	1,18 \pm 0,05 a	1,13 \pm 0,051 abc
Apigenina- 4'-glucosídeo **	2,92 \pm 0,44 b	3,29 \pm 0,55 b	3,06 \pm 0,20 b	4,03 \pm 0,52 b	3,69 \pm 0,13 b	4,12 \pm 0,39 b	2,47 \pm 0,24 b	71,44 \pm 9,80 a	70,80 \pm 7,87 a
Quercetina- 4'-glicuronídeo **	12,49 \pm 1,52 e	18,79 \pm 5,13 e	42,18 \pm 3,01 d	54,37 \pm 4,11 cd	72,77 \pm 4,09 ab	74,77 \pm 9,17 ab	59,60 \pm 7,20 bc	58,46 \pm 3,72 bc	54,09 \pm 4,93 cd
Eriodictiol-7-O-glucosídeo (isômero 1) **	8,19 \pm 0,78 b	5,95 \pm 0,45 b	7,39 \pm 1,05 b	7,04 \pm 0,65 b	6,02 \pm 0,09 b	7,03 \pm 1,14 b	14,93 \pm 0,29 b	95,23 \pm 11,55 a	95,85 \pm 12,47 a
Luteolina 3'-glicuronídeo/Kaempferol 3-glicuronídeo **	2,65 \pm 0,42 e	16,33 \pm 0,23 c	5,50 \pm 0,64 de	9,88 \pm 0,66 d	20,16 \pm 2,73 bc	24,65 \pm 1,49 b	11,90 \pm 0,25 cd	33,25 \pm 3,49 a	33,15 \pm 2,61 a
Rutina *	ND	ND	3,76 \pm 0,01 b	4,22 \pm 0,10 b	4,91 \pm 0,32 ab	5,46 \pm 0,45 a	4,4 \pm 0,44 b	4,8 \pm 0,12 ab	4,4 \pm 0,02 b
Kaempferol 3-O-acetil-glicosídeo/Quercetina 3-O-acetil-rhamnoside o (isômero 1) **	3,26 \pm 0,04 c	3,29 \pm 0,11 c	13,16 \pm 1,81 a	12,7 \pm 1,72 a	12,96 \pm 0,65 a	7,08 \pm 0,98 b	12,61 \pm 1,30 a	5,14 \pm 0,49 bc	5,95 \pm 0,60 bc
Ácido Elágico 2-Ramnose **	13,80 \pm 1,44 b	14,78 \pm 0,60 ab	17,36 \pm ,1,65 ab	18,55 \pm 0,98 a	18,90 \pm 1,61 a	18,25 \pm 2,84 a	16,71 \pm 0,36 ab	14,85 \pm 1,4 ab	13,39 \pm 0,65 b
Kaempferol 3-O-acetil-glicosídeo/Quercetina 3-O-acetil-rhamnosideo (isômero 2) **	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4,23 \pm 0.24 a	4,25 \pm 0.11 a
Metilsiringina **	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6,1 \pm 1,06 b	16,83 \pm 0,7 a
Apigenina **	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,44 \pm 0,02 b	2,21 \pm 0,26 a	2,14 \pm 0,29 a

Eriodictiol-7-O-glucosídeo (isômero 2) **	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	25.96±3.24 b	35.31±2.12 a
Catequina *	1558,20 ±11,06 a	1595,01±3,16 a	885,38±51,63 b	611,83±25,25 b	674,05±113,48 c	605,66±49,41 c	525,99±50,48 cd	376,43±38,83 d	425,14±72,1 cd
Epicatequina *	35,08±1,30 a	23,83 ±1,42 b	12,04±0,88 c	9,93±0,49 cd	8,50±0,06 d	8,97±0,49 d	7,94±0,30 d	4,13±0,51 e	4,37±0,59 e
Epicatequina-epicatequina-catequina **	48,35±8,11 a	45,76±0,42 a	31,10±2,85 b	24,94±2,16 bc	20,17±0,35 c	20,69±1,83 c	19,37±2,05 c	7,59±1,24 d	8,18±1,28 d
Epigalocatequina-catequina **	16,52±2,48 a	9,67±0,04 b	8,10±1,22 b	4,51±0,17 c	4,26±0,27 c	4,06±0,7 c	4,25±0,53 c	3,32±0,22 c	3,44±0,06 c
Ácido Elágico *	14,52±0,41 a	11,63±1,02 b	11,19±1,46 c	8,14±0,84 d	8,48±0,43 d	6,73±0,59 d	7,20±0,29 d	7,85±0,10 d	6,58±0,32 d
Ácido hidroxi-4-benzóico * Ácido Salicílico **	10,18±0,66 a	10,45±0,2 a	2,92±0,1 b	2,79±0,16 b	3,61±0,31 b	3,28±0,6 b	2,83±0,22 b	2,96±0,24 b	3,04±0,15 b

* composto identificado com padrão externo.

** composto identificado com o auxílio do seu perfil de fragmentação e comparação em bases de dados METLIN, KEGG, PubChem, FooDB e ReSpect

7.6.6 PCA, PLS E ANÁLISE DE CORRELAÇÃO

A PCA conseguiu explicar 98,5% dos eventos, sendo o PC1 94,6% e o PC2 3,9%. Houve uma divisão do grupo de amadurecimento, onde a amostra A1 se assemelhou bioquimicamente ao crescimento, e no grupo inicial a amostra I3 se assemelhou também, bioquimicamente, (Fig. 6A). Os compostos principais para a separação foram pelargonidina 3 glicosídeo, AsA e catequina (Fig 6B).

O PLS apresentou padrão semelhante ao PCA, com componente 1 representando 94,6% e componente 2 representando 3,9%. De forma similar ao PCA, as amostras A1 e I3 também tiveram um perfil bioquímico mais próximo ao crescimento (Fig. 7A). Os principais dispersores para formação dos grupos foram AsA, catequina e pelargonidina 3 glicosídeo (Fig 7B). Os dados de acurácia do modelo R2 e Q2 ficaram próximos (Fig. Sup).

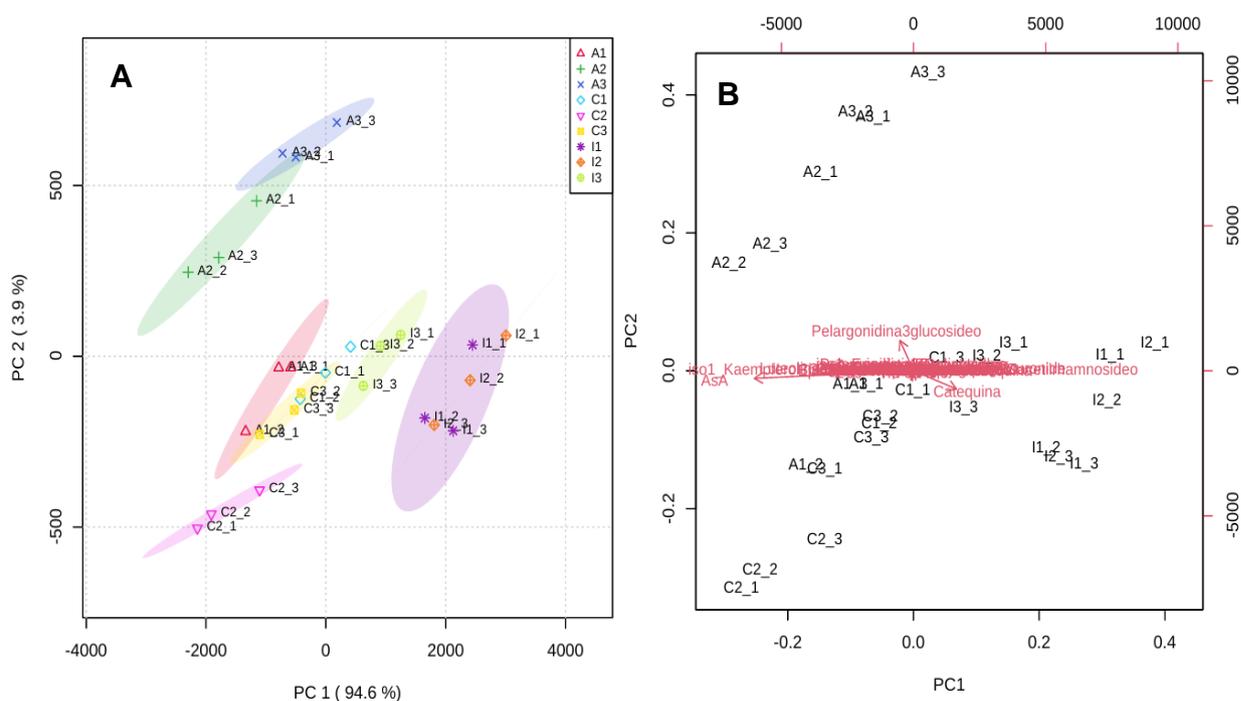


Figura 6. (A) Análise de componentes principais (PCA), eixo Y PC2 representando 3,9% e eixo X PC1 representando 94,6%. (B) Principais variáveis segregadoras dos grupos, a variável mais próxima do seu grupo teve maior influência na sua distinção.

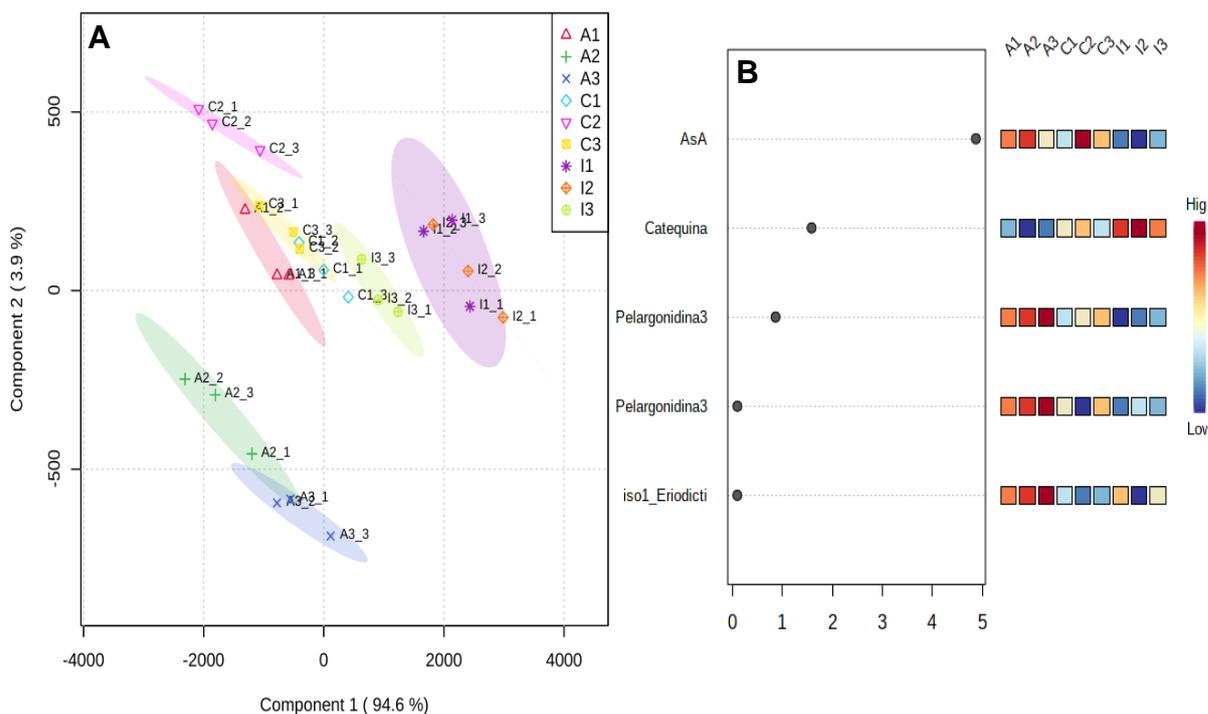


Figura 7. (A) Análise de regressão parcial de mínimos quadrados (PLS), eixo Y componente 2 representando 3,9%, e eixo X componente 1 representando 94,6%. (B) Principais variáveis separadoras dos grupos.

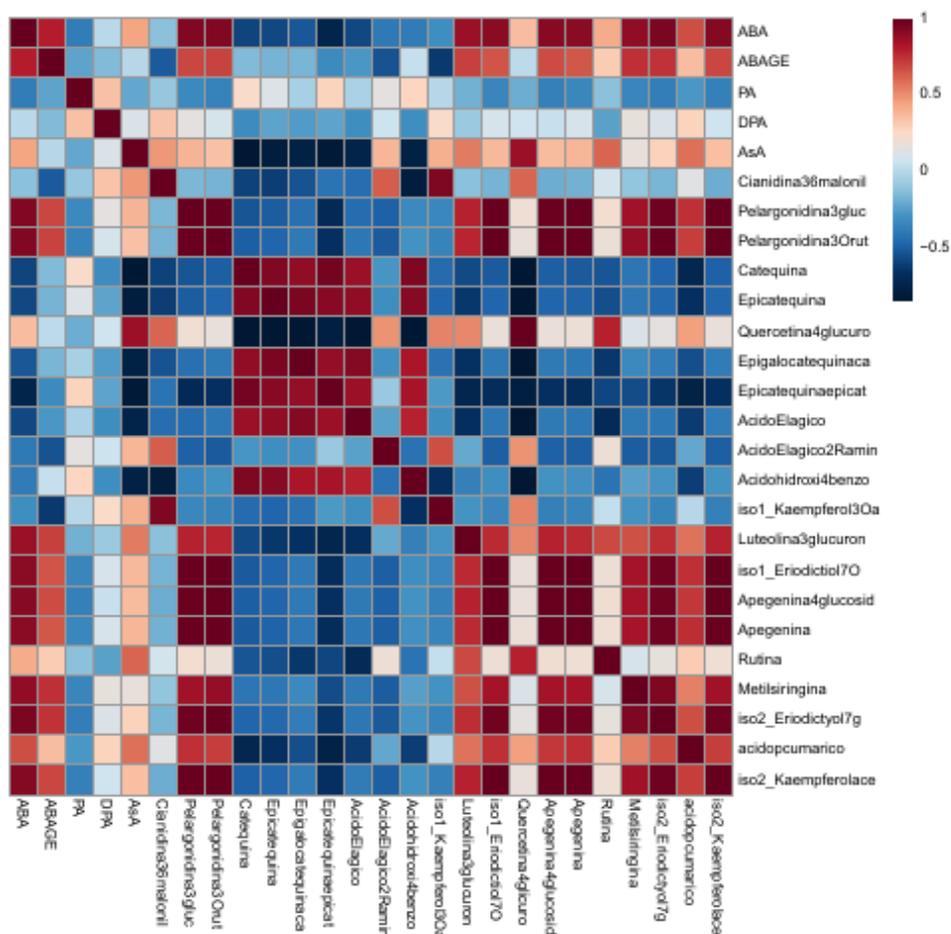


Figura 8. Correlação dos compostos, em vermelho correlação positiva e em azul correlação negativa. Tabela de correlação está no material suplementar.

A correlação foi positiva entre ABA e ABA-GE (80%), antocianinas como pelargonidina-3-glucósido (92%), pelargonidina-3-O-rutinosídeo (93%), para compostos fenólicos como luteolina-3-glucuronide (87%), eriodictiol-7-O-glucoside (iso_1, 91%), apigenina-4-glucoside (91%), apigenina (90%), metilsiringina (89%), eriodictiol-7-O-glucoside (iso_2, 94%), kaempferol 3-O-acetil-glicosídeo (iso_2, 92%). Já pelo contrário ficou negativo com compostos como catequina (59%), epicatequina (57%). O AsA teve uma correlação positiva somente com a quercitina-4-glucuronide (86%). O AsA teve correlação negativa com catequina (85%), epicatequina (79%), epicatequina (77%), epigallocatequina (82%), ácido elágico (75%), ácido hidroxibenzoico (77%).

7.7 Discussão

O conhecimento sobre a dinâmica temporal de acúmulo de compostos durante o crescimento e desenvolvimento do fruto de morango é relevante para que se possam delinear estratégias para o controle da maturação e para aumentar a qualidade pós-colheita destes frutos. No presente trabalho, o acúmulo de compostos relacionados com a maturação do morango foi monitorado ao longo de 9 estádios, divididos em 3 grupos morfofisiológicos, cada um com 3 estádios: grupo inicial, de crescimento, e de amadurecimento. Apesar desta divisão ter se baseado em características morfofisiológicas, majoritariamente dimensão e coloração, as análises de PCA e PLS, baseadas em variáveis bioquímicas apontaram a separação em diferentes grupos dos que havíamos proposto na modelagem experimental. Interessante salientar que bioquimicamente os estádios de crescimento (C) e amadurecimento (A) se assemelham, considerando que permaneceram nos mesmos quadrantes, diferentemente dos estádios iniciais (I). Porém, é importante considerar que o processo de amadurecimento envolve diversas alterações bioquímicas que não foram analisadas neste estudo, como acúmulo de compostos voláteis, alterações na parede celular e acúmulo de açúcares.

É interessante que o principal composto responsável pela separação das amostras em grupos distintos no PCA foi o AsA. Ao longo do desenvolvimento é notável perceber um pico no acúmulo de AsA no estágio C2, que se torna estável no amadurecimento (Fig. 3). Isso pode indicar que durante os estádios de

amadurecimento há um fraco retorno de violaxantina para zeaxantina, visto que depende de AsA. Esta conversão de violaxantina para zeaxantina faz parte do chamado ciclo das xantofilas, o qual desempenha um papel fundamental na dissipação de energia nos centros de reação fotossintética (JAHNS; LATOWSKI; STRZALKA, 2009). Desta forma, é possível que o AsA desempenhe um papel importante neste ciclo em órgãos com alta atividade fotossintética, como as folhas e possivelmente, menos evidente em frutos, como foi observado neste estudo. Nos frutos, a atuação como antioxidante do AsA pode ser mais significativa e, de acordo com os resultados deste estudo, sua presença se faz mais necessária nos frutos nos estádios intermediários de seu desenvolvimento.

Além disso, a inibição do ciclo das xantofilas pode ser uma das estratégias utilizadas pela célula vegetal para garantir a disponibilidade de violaxantina para as etapas subsequentes desta rota metabólica que culmina na síntese de ABA, necessário para indução de processos fisiológicos associados à maturação desses frutos, como o acúmulo de antocianinas (JAHNS; LATOWSKI; STRZALKA, 2009; LI et al., 2011). Esta relação entre AsA e ABA foi evidenciada em mutantes *vtc1* em *Arabidopsis thaliana*, cujo teor de AsA é reduzido, e suas folhas apresentaram um aumento de 60% no conteúdo de ABA em comparação com o controle (PASTORI et al., 2003). Além disso, através da superexpressão de ZEP, uma enzima do ciclo das xantofilas, mutantes de *Arabidopsis* apresentaram um aumento de conteúdo de ABA nas sementes (PARK et al., 2008); já a superexpressão em arroz da enzima VDE, oposta a ZEP, acaba regulando negativamente a rota do ABA (WANG et al., 2022). Conclui-se que o ciclo das xantofilas é um importante foco de estudo para a compreensão da disponibilidade de ABA, no entanto em frutos de morango ainda foi pouco explorado.

A partir do estágio C2, quando ocorre o pico de detecção de AsA, ainda é possível perceber a troca de coloração esverdeada para branco-avermelhada (Fig 1). É nesse estágio C2, que ocorre também um aumento nos SST (Fig 2), que corresponde a 80%-90% dos açúcares em morango (PERKINS-VEAZIE, 1995). Além de ser um parâmetro importante para o consumidor, recentemente tem se estudado a possibilidade dos açúcares estarem agindo como sinalizadores de maturação, principalmente a sacarose, que acaba sendo um sinal de regulação no amadurecimento (JIA et al., 2013; LUO et al., 2020; SIEBENEICHLER et al., 2020).

Após os estádios de maior acúmulo de AsA e SST, iniciam os estádios finais de maturação, quando o ABA teve um expressivo aumento em sua concentração, que coincide com o aumento da concentração das pelargonidinas. Se sabe que o ABA induz a síntese de fatores de transcrição relacionados às antocianinas (BAI; HUANG; SHEN, 2021); assim a correlação entre ambas foi acima de 90% (Sup. 1), fortalecendo a hipótese regulatória do ABA com a coloração. Outros trabalhos reportaram que ao silenciar o gene inicial da rota do ABA o processo de maturação foi evitado (JIA et al., 2011). Apesar disso, quando se aplica ABA exógeno em frutos verdes não há alteração no conteúdo de açúcares, antocianinas e AsA (SIEBENEICHLER et al., 2020), no entanto ao se aplicar em morango 90% maduros, ocorre um aumento de cor, antocianinas e compostos fenólicos (JIANG; JOYCE, 2003). Desta forma, os mecanismos envolvidos na indução de antocianinas pelo ABA ainda não estão completamente elucidados. Interessantemente, de acordo com o presente estudo, o ABA induz antocianinas específicas: neste caso, induziu pelargonidinas, mas não foi observada correlação com a concentração de cianidinas, o que é um dado inovador, uma vez que outros pesquisadores reportaram uma indução de cianidinas através do ABA (KADOMURA-ISHIKAWA et al., 2015; MEDINA-PUCHE et al., 2014; PERIN et al., 2019; SIEBENEICHLER et al., 2022). É importante salientar que o presente trabalho só identificou um tipo de cianidina glicosilada, não podendo estender e analisar a totalidade de cianidinas presentes nos frutos, uma vez que a principal glicosilação na cianidina em frutos de morangos é a 3-O glucosídeo, não detectada nas amostras (DA SILVA et al., 2007). Uma explicação ainda possível para esse resultado é que, devido as amostras serem de um morango comercial (cv. San Andreas), o melhoramento genético da cultivar pode ter favorecido o vermelho claro, fornecido pelas pelargonidinas, em detrimento do vermelho escuro, fornecido pelas cianidinas, pois é uma preferência do consumidor (DZHANFEZOVA et al., 2020).

Neste estudo foram identificados 18 compostos fenólicos. A correlação entre o ABA e os compostos fenólicos: ácido p-cumarico, apigenina, apigenina-4'-glucósido, luteolina 3'-glucuronide, eriodictiol-7-O-glucosídeo isômero 1 e 2, metilsiringina, e rutina foi positiva uma vez que aumentam sua concentração no amadurecimento. Sugerindo uma regulação positiva desses compostos através do ABA, o que é corroborado com estudos mostrando que o ABA induz a transcrição de genes na rota dos fenilpropanoides (VIGHI et al., 2019). Além disso, a glicosilação desses

compostos provavelmente é decorrente de estresses oxidativos (a)bióticos, como frio, seca e salinidade sofridos pela planta (BEHR et al., 2020). Já para catequina, epicatequina, epigallocatequina, epicatequina catequina, ácido elágico, ácido elágico 2-raminose, ácido hidroxibenzoico são negativas indicando serem compostos produzidos em maior quantidade nos estádios iniciais e/ou de crescimento, servindo de substrato para a síntese dos compostos produzidos durante os estádios de amadurecimento. Esses últimos compostos têm sabores adstringentes e sua produção pode ocorrer devido a necessidade de proteção dos aquênios ainda não maduros de animais dispersores. Sendo esses compostos precursores da rota dos fenilpropanóides, à medida que ocorre a maturação, tais compostos são metabolizados em substâncias mais palatáveis para esses animais (HEIL et al., 2002; MONTEIRO et al., 2005).

7.8 Conclusão

No presente trabalho foi possível observar o aumento de AsA nos estádios iniciais e crescimento, como também no de amadurecimento o aumento do ABA, e isso provavelmente resultou no incremento de compostos fenólicos e na pelargonidinas. No entanto, o ensaio não conseguiu negar a hipótese, uma vez que foi observado uma redução do acúmulo de AsA à medida que o ABA tem seu crescimento, assim a relação do ABA e AsA ainda é uma incógnita. No futuro, estudos ômicos que visem determinar o conteúdo de carotenóides, especialmente de violaxantina e zeaxantina nos estádios, poderão ajudar a elucidar o papel da regulação do ciclo das xantofilas na disponibilidade de AsA no tecido, e sua relação com o acúmulo de ABA.

7.9 Referências

AABY, K. et al. Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 86–97, 2012.

AGIUS, F. et al. Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 177–181, 2003.

ANTUNES, Ana CN 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, n. 15, p. 6973-6980, 2019.

ANTUNES, L. E. C.; REISSER JUNIOR, C.; SCHWENGBER, José Ernani. Morangueiro. Embrapa Clima Temperado-Livro técnico (INFOTECA-E), 2016.

BAI, Q.; HUANG, Y.; SHEN, Y. The Physiological and Molecular Mechanism of Abscisic Acid in Regulation of Fleshy Fruit Ripening. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 619953, 11 jan. 2021.

BALDI, P. et al. Gene expression and metabolite accumulation during strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit development and ripening. **Planta**, v. 248, n. 5, p. 1143–1157, 2018a.

BALDI, P. et al. Gene expression and metabolite accumulation during strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit development and ripening. **Planta**, v. 248, n. 5, p. 1143–1157, 2018b.

BEHR, M. et al. You want it sweeter: How glycosylation affects plant response to oxidative stress. **Frontiers in Plant Science**, p. 1443, 2020.

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, 1 jan. 2016.

CRIZEL, R. L. et al. Abscisic acid and stress induced by salt: Effect on the phenylpropanoid, L-ascorbic acid and abscisic acid metabolism of strawberry fruits. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 152, n. April, p. 211–220, 2020.

CRUZ-RUS, E. et al. Regulation of L-ascorbic acid content in strawberry fruits. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 12, p. 4191–4201, 2011.

DA SILVA, F. L. et al. Anthocyanin pigments in strawberry. **LWT-Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 374-382, 2007.

DEL POZO-INSFRAN, D. et al. Polyphenolics, Ascorbic Acid, and Soluble Solids Concentrations of Strawberry Cultivars and Selections Grown in a Winter Annual Hill

Production System. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 131, n. 1, p. 89–96, jan. 2006.

DO NASCIMENTO, J. R. O. et al. L-Ascorbate biosynthesis in strawberries: L-Galactono-1,4-lactone dehydrogenase expression during fruit development and ripening. **Postharvest Biology and Technology**, v. 38, n. 1, p. 34–42, out. 2005.

DONG, N. Q.; LIN, H. X. Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant–environment interactions. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 63, n. 1, p. 180–209, 2021.

FAIT, A. et al. Reconfiguration of the achene and receptacle metabolic networks during strawberry fruit development. **Plant Physiology**, v. 148, n. 2, p. 730–750, out. 2008.

FECKA, I. et al. The effect of strawberry ripeness on the content of polyphenols, cinnamates, L-ascorbic and carboxylic acids. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 95, p. 103669, jan. 2021.

FENECH, Mario et al. Vitamin C content in fruits: biosynthesis and regulation. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 2006, 2019.

FINKELSTEIN, R. Abscisic Acid Synthesis and Response. **The Arabidopsis Book**, v. 11, n. 11, p. e0166, 2013.

GALLI, V. et al. Mild salt stress improves strawberry fruit quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 693–699, 2016.

GAPPER, N. E.; MCQUINN, R. P.; GIOVANNONI, J. J. Molecular and genetic regulation of fruit ripening. **Plant Molecular Biology**, v. 82, n. 6, p. 575–591, 2013.

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

GIAMPIERI, F. et al. Strawberry as a health promoter: an evidence based review. **Food & Function**, v. 6, n. 5, p. 1386–1398, 2015.

GIOVANNONI, James J. Genetic regulation of fruit development and ripening. **The plant cell**, v. 16, n. suppl_1, p. S170-S180, 2004.

GU, T. et al. Transcriptome and hormone analyses provide insights into hormonal regulation in strawberry ripening. **Planta**, v. 250, n. 1, p. 145–162, 2019.

IANNETTA, P. P. M. et al. Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit. **Physiologia Plantarum**, v. 127, n. 2, p. 247–259, 2006.

JAHNS, Peter; LATOWSKI, Dariusz; STRZALKA, Kazimierz. Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: the role of antenna proteins and membrane lipids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1787, n. 1, p. 3-14, 2009.

JI, K. et al. Non-climacteric ripening in strawberry fruit is linked to ABA, FaNCED2 and FaCYP707A1. **Functional Plant Biology**, v. 39, n. 4, p. 351–357, 2012.

JIA, H. et al. Sucrose functions as a signal involved in the regulation of strawberry fruit development and ripening. **New Phytologist**, v. 198, n. 2, p. 453–465, abr. 2013.

JIA, H. et al. Abscisic acid and sucrose regulate tomato and strawberry fruit ripening through the abscisic acid-stress-ripening transcription factor. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 10, p. 2045–2065, 2016.

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

JIANG, Yueming; JOYCE, Daryl 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.

KAFKAS, E. et al. Quality characteristics of strawberry genotypes at different maturation stages. **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 1229–1236, jan. 2007.

KIM, J. et al. Analysis of eight phytohormone concentrations, expression levels of ABA biosynthesis genes, and ripening-related transcription factors during fruit development in strawberry. **Journal of Plant Physiology**, v. 239, n. May, p. 52–60, 1 ago. 2019.

LI, C. et al. Abscisic acid perception and signaling transduction in strawberry: A model for non-climacteric fruit ripening. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6, n. 12, p. 1950–1953, 2011.

LIAO, X. et al. Interlinked regulatory loops of ABA catabolism and biosynthesis coordinate fruit growth and ripening in woodland strawberry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 49, p. E11542–E11550, 2018.

MERCHANTE, C. et al. Ethylene is involved in strawberry fruit ripening in an organ-specific manner. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 14, p. 4421–4439, 2013.

MUSA, Cristiane Inês et al. Avaliação do teor de Vitamina C em morangos de diferentes cultivares em sistemas de cultivo distintos no município de Bom Princípio/RS. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 2, p. 368–373, 2015..

NAMBARA, Eiji; MARION-POLL, Annie. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.*, v. 56, p. 165–185, 2005

NUNES, M. C. N. et al. Physicochemical changes during strawberry development in the field compared with those that occur in harvested fruit during storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 2, p. 180–190, 30 jan. 2006.

ORNELAS-PAZ, J. DE J. et al. Physical attributes and chemical composition of organic strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch, Cv. Albion) at six stages of ripening. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 372–381, maio 2013.

PERIN, E. C. et al. Extraction and Quantification of Abscisic Acid and Derivatives in Strawberry by LC-MS. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 9, p. 2547–2552, 2018.

PERIN, E. C. et al. ABA-dependent salt and drought stress improve strawberry fruit quality. **Food Chemistry**, v. 271, p. 516–526, 15 jan. 2019.

PERKINS-VEAZIE, P. Growth and Ripening of Strawberry Fruit. In: **Horticultural Reviews**. Oxford, UK: Jules Janick, 1995. v. 17p. 267–297.

PERKINS-VEAZIE, P. Growth and Ripening of Strawberry Fruit. In: **Horticultural Reviews**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Inc., 2010. v. 17p. 267–297.

PERKINS-VEAZIE', P. M.; HUBER, D. J.; BRECHT, J. K. Characterization of ethylene production in developing strawberry fruit. v. 17, n. 1, p. 33–39, 1995.

QUINET, M. et al. Tomato Fruit Development and Metabolism. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. November, p. 1–23, 2019.

RAHMAN, M. M. et al. Maturity stages affect the postharvest quality and shelf-life of fruits of strawberry genotypes growing in subtropical regions. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 15, n. 1, p. 28–37, 2016.

REIS, L. et al. Metabolic Profile of Strawberry Fruit Ripened on the Plant Following Treatment With an Ethylene Elicitor or Inhibitor. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 995, 10 jul. 2020.

SHULAEV, V. et al. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). **Nature Genetics**, v. 43, n. 2, p. 109–116, 2011.

SIEBENEICHLER, T. J. et al. The postharvest ripening of strawberry fruits induced by abscisic acid and sucrose differs from their in vivo ripening. **Food Chemistry**, v. 317, n. February, p. 126407, 2020.

SIEBENEICHLER, T. J. et al. Changes in the abscisic acid, phenylpropanoids and ascorbic acid metabolism during strawberry fruit growth and ripening. **Journal of Food Composition and Analysis**, p. 104398, 2022.

SMIRNOFF, Nicholas. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 122, p. 116-129, 2018.

STANGE, Claudia (Ed.). Carotenoids in nature: biosynthesis, regulation and function. **Springer**, 2016.

STURM, K.; KORON, D.; STAMPAR, F. The composition of fruit of different strawberry varieties depending on maturity stage. **Food Chemistry**, v. 83, n. 3, p. 417–422, nov. 2003.

TAIZ, Lincoln et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.

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.

VINCI, Giuliana et al. Ascorbic acid in exotic fruits: a liquid chromatographic investigation. **Food Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 211-214, 1995.

VOGT, T. Phenylpropanoid Biosynthesis. **Molecular Plant**, v. 3, n. 1, p. 2–20, jan. 2010.

WANG, P. et al. Double NCED isozymes control ABA biosynthesis for ripening and senescent regulation in peach fruits. **Plant Science**, v. 304, p. 110739, mar. 2021.

XU, Y. et al. Preharvest UV-C treatment affected postharvest senescence and phytochemicals alternation of strawberry fruit with the possible involvement of abscisic acid regulation. **Food Chemistry**, v. 299, p. 125138, nov. 2019.

ZEIST, A. R.; RESENDE, J. T. V. DE. Strawberry breeding in Brazil: current momentum and perspectives. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 1, p. 7–16, mar. 2019.

ZHONGJIE, L. I. U. et al. Over-expression of Gene FaASR Promotes Strawberry Fruit Coloring. **Horticultural Plant Journal**, v. 1, n. 3, p. 147–154, 2015.

7.10 Suplementar

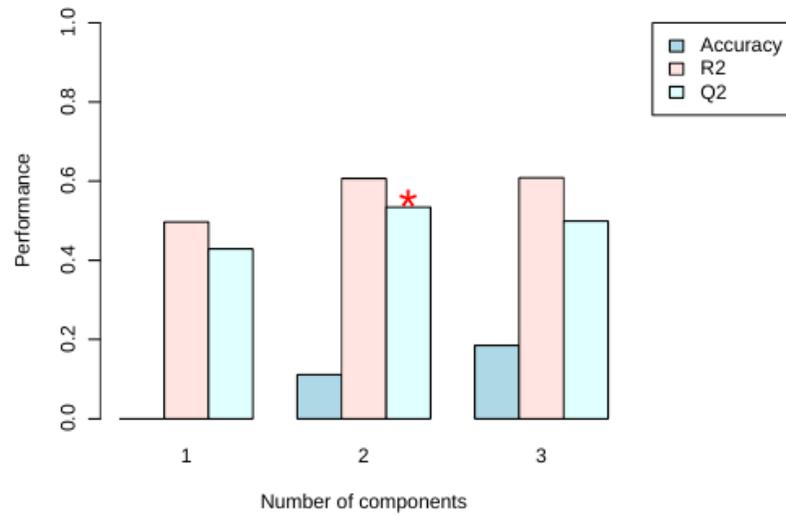


Fig. Suplementar. Dados do modelo PLS, a acurácia desse modelo, o R2 e Q2 indicando respectivamente a qualidade do ajuste e da previsão.

Tabela Suplementar. Tabela suplementar do artigo, apresentado as correlações entre os compostos, em verde estão destacadas as correlações com $p < 0,05$

Compostos	ABA	ABAGE	PA	DPA	AsA	Cyanidin36malonylg	Pelargonidina-3-glucosideo	Pelargonidin3Oruti	Catequina
ABA	1	0,80144	-0,38705	0,0076877	0,43624	-0,12318	0,92888	0,93054	-0,59086
ABAGE	0,80144	1	-0,23234	-0,14354	-0,0036241	-0,51159	0,69121	0,6999	-0,14419
PA	-0,38705	-0,23234	1	0,34892	-0,22121	-0,09867	-0,33065	-0,36158	0,24606
DPA	0,0076877	-0,14354	0,34892	1	0,11171	0,33613	0,14813	0,090616	-0,31952
AsA	0,43624	-0,0036241	-0,22121	0,11171	1	0,47279	0,38734	0,34552	-0,85026
Cyanidin36malonylg	-0,12318	-0,51159	-0,09867	0,33613	0,47279	1	-0,16359	-0,17721	-0,59831
Pelargonidin3gluco	0,92888	0,69121	-0,33065	0,14813	0,38734	-0,16359	1	0,9884	-0,53875
Pelargonidin3Oruti	0,93054	0,6999	-0,36158	0,090616	0,34552	-0,17721	0,9884	1	-0,49946
Catequina	-0,59086	-0,14419	0,24606	-0,31952	-0,85026	-0,59831	-0,53875	-0,49946	1
Epicatequina	-0,57982	-0,17236	0,12126	-0,23399	-0,79404	-0,61242	-0,50993	-0,47644	0,93406
Quercetin4glucuron	0,35727	0,012986	-0,19871	0,070766	0,86486	0,6111	0,20438	0,17186	-0,84616
Epigalocatequinaca	-0,52848	-0,16642	-0,04366	-0,25954	-0,77184	-0,54217	-0,4319	-0,39581	0,89376
Epicatequinaepicat	-0,74897	-0,32329	0,28296	-0,23089	-0,82508	-0,41884	-0,70157	-0,66711	0,96017
AcidoElagico	-0,57806	-0,27904	-0,037846	-0,30921	-0,7503	-0,44221	-0,44733	-0,40788	0,87411
AcidoElagico2Ramin	-0,39936	-0,53976	0,14785	0,066384	0,38159	0,63691	-0,49341	-0,51111	-0,27981
Acidohidroxi4benzo	-0,3903	0,04541	0,27082	-0,31228	-0,77311	-0,79369	-0,33303	-0,29865	0,93581
iso1_Kaempferol3Oa	-0,30929	-0,62952	-0,00090367	0,24313	0,4056	0,93999	-0,34144	-0,35858	-0,45483
Luteolina3glucuron	0,8716	0,70382	-0,18343	-0,080855	0,55711	-0,12657	0,78678	0,77685	-0,57236
iso1_Eriodictiol7O	0,91113	0,65898	-0,34956	0,099813	0,37508	-0,17523	0,99117	0,99457	-0,5146
Quercetina4glicuro	0,35727	0,012986	-0,19871	0,070766	0,86486	0,6111	0,20438	0,17186	-0,84616
Apegenina4glucosid	0,91797	0,67644	-0,36791	0,051805	0,36565	-0,19313	0,98511	0,99409	-0,49933
Apegenina	0,90943	0,65207	-0,33867	0,10273	0,38221	-0,18186	0,99081	0,99038	-0,51584
Rutina	0,41914	0,30907	-0,12536	-0,23948	0,61549	0,082455	0,21681	0,18802	-0,53442
Metilsiringina	0,89185	0,75355	-0,34843	0,16846	0,17222	-0,1069	0,85435	0,88991	-0,4103
iso2_Eriodictyol7g	0,94687	0,74602	-0,37841	0,1166	0,28949	-0,17102	0,97224	0,9858	-0,47751
acidopcumarico	0,66886	0,35925	-0,27899	0,2828	0,58483	0,13639	0,75198	0,71704	-0,72852
iso2_Kaempferolace	0,92294	0,69289	-0,36764	0,073213	0,35438	-0,19445	0,99146	0,99472	-0,49495

Epicatequina	Quercetin4glucuron	Epigallocatequina	Epicatequinaepicat	AcidoElagico	AcidoElagico2Ramin	Acidohidroxi4benzo	iso1_Kaempferol3Oa
-0,57982	0,35727	-0,52848	-0,74897	-0,57806	-0,39936	-0,3903	-0,30929
-0,17236	0,012986	-0,16642	-0,32329	-0,27904	-0,53976	0,04541	-0,62952
0,12126	-0,19871	-0,04366	0,28296	-0,037846	0,14785	0,27082	-0,00090367
-0,23399	0,070766	-0,25954	-0,23089	-0,30921	0,066384	-0,31228	0,24313
-0,79404	0,86486	-0,77184	-0,82508	-0,7503	0,38159	-0,77311	0,4056
-0,61242	0,6111	-0,54217	-0,41884	-0,44221	0,63691	-0,79369	0,93999
-0,50993	0,20438	-0,4319	-0,70157	-0,44733	-0,49341	-0,33303	-0,34144
-0,47644	0,17186	-0,39581	-0,66711	-0,40788	-0,51111	-0,29865	-0,35858
0,93406	-0,84616	0,89376	0,96017	0,87411	-0,27981	0,93581	-0,45483
1	-0,84512	0,94885	0,9147	0,89845	-0,31012	0,91481	-0,4754
-0,84512	1	-0,84677	-0,78943	-0,85052	0,49206	-0,84097	0,53642
0,94885	-0,84677	1	0,8875	0,92227	-0,30154	0,83133	-0,42865
0,9147	-0,78943	0,8875	1	0,86428	-0,089186	0,83439	-0,26682
0,89845	-0,85052	0,92227	0,86428	1	-0,23858	0,78523	-0,30954
-0,31012	0,49206	-0,30154	-0,089186	-0,23858	1	-0,42513	0,67293
0,91481	-0,84097	0,83133	0,83439	0,78523	-0,42513	1	-0,66376
-0,4754	0,53642	-0,42865	-0,26682	-0,30954	0,67293	-0,66376	1
-0,63923	0,52291	-0,65631	-0,74123	-0,67027	-0,21339	-0,36919	-0,29088
-0,48114	0,18116	-0,39847	-0,67705	-0,40561	-0,50194	-0,3095	-0,34899
-0,84512	1	-0,84677	-0,78943	-0,85052	0,49206	-0,84097	0,53642
-0,47593	0,18066	-0,39679	-0,66625	-0,39569	-0,49405	-0,29752	-0,36875
-0,48455	0,18428	-0,4034	-0,67863	-0,40957	-0,49824	-0,30808	-0,35245
-0,55711	0,79575	-0,63919	-0,58358	-0,69295	0,1914	-0,42303	0,034731
-0,40267	0,1164	-0,33319	-0,56369	-0,39601	-0,50485	-0,24979	-0,29472
-0,46102	0,14982	-0,3821	-0,64662	-0,40477	-0,5189	-0,28706	-0,35793
-0,66297	0,45676	-0,55799	-0,77095	-0,62021	-0,21704	-0,61494	-0,002705
-0,4724	0,16974	-0,39275	-0,66501	-0,39404	-0,50339	-0,29417	-0,37201

Luteolina3glucuron	iso1_Eriodictiol7O	Apegenina4glucosid	Apegenina	Rutina	Metilsiringina	iso2_Eriodictyol7g	acidopcumarico	iso2_Kaempferolace
0,8716	0,91113	0,91797	0,90943	0,41914	0,89185	0,94687	0,66886	0,92294
0,70382	0,65898	0,67644	0,65207	0,30907	0,75355	0,74602	0,35925	0,69289
-0,18343	-0,34956	-0,36791	-0,33867	-0,12536	-0,34843	-0,37841	-0,27899	-0,36764
-0,080855	0,099813	0,051805	0,10273	-0,23948	0,16846	0,1166	0,2828	0,073213
0,55711	0,37508	0,36565	0,38221	0,61549	0,17222	0,28949	0,58483	0,35438
-0,12657	-0,17523	-0,19313	-0,18186	0,082455	-0,1069	-0,17102	0,13639	-0,19445
0,78678	0,99117	0,98511	0,99081	0,21681	0,85435	0,97224	0,75198	0,99146
0,77685	0,99457	0,99409	0,99038	0,18802	0,88991	0,9858	0,71704	0,99472
-0,57236	-0,5146	-0,49933	-0,51584	-0,53442	-0,4103	-0,47751	-0,72852	-0,49495
-0,63923	-0,48114	-0,47593	-0,48455	-0,55711	-0,40267	-0,46102	-0,66297	-0,4724
0,52291	0,18116	0,18066	0,18428	0,79575	0,1164	0,14982	0,45676	0,16974
-0,65631	-0,39847	-0,39679	-0,4034	-0,63919	-0,33319	-0,3821	-0,55799	-0,39275
-0,74123	-0,67705	-0,66625	-0,67863	-0,58358	-0,56369	-0,64662	-0,77095	-0,66501
-0,67027	-0,40561	-0,39569	-0,40957	-0,69295	-0,39601	-0,40477	-0,62021	-0,39404
-0,21339	-0,50194	-0,49405	-0,49824	0,1914	-0,50485	-0,5189	-0,21704	-0,50339
-0,36919	-0,3095	-0,29752	-0,30808	-0,42303	-0,24979	-0,28706	-0,61494	-0,29417
-0,29088	-0,34899	-0,36875	-0,35245	0,034731	-0,29472	-0,35793	-0,002705	-0,37201
1	0,76553	0,78403	0,76515	0,68422	0,66391	0,76029	0,57482	0,7862
0,76553	1	0,99611	0,9981	0,19243	0,84716	0,96796	0,75045	0,9941
0,52291	0,18116	0,18066	0,18428	0,79575	0,1164	0,14982	0,45676	0,16974
0,78403	0,99611	1	0,9943	0,20991	0,84503	0,97013	0,72823	0,99683
0,76515	0,9981	0,9943	1	0,1995	0,8357	0,96498	0,75868	0,99095
0,68422	0,19243	0,20991	0,1995	1	0,099593	0,16315	0,31154	0,19898
0,66391	0,84716	0,84503	0,8357	0,099593	1	0,94078	0,54032	0,85329
0,76029	0,96796	0,97013	0,96498	0,16315	0,94078	1	0,67154	0,97533
0,57482	0,75045	0,72823	0,75868	0,31154	0,54032	0,67154	1	0,71593
0,7862	0,9941	0,99683	0,99095	0,19898	0,85329	0,97533	0,71593	1

8. CONCLUSÕES FINAIS

No presente trabalho objetivou-se entender melhor a dinâmica de crescimento e desenvolvimento dos frutos de morango, tendo como premissa seu importante reflexo para as frutas no geral. Desse modo, foi levantado o questionamento sobre a baixa concentração de carotenoides no interior da fruta nos estádios de amadurecimento, e assim foi hipotetizado que estaria correlacionado ao composto subsequente, o ABA, como sinalizador dos eventos de amadurecimento, e por conseguinte com os parâmetros de qualidade sensorial dos frutos, em especial o AsA.

Devido aos problemas citados ao longo do trabalho, não foi possível entrar no cerne da hipótese. Entretanto, foi possível analisar os estádios de crescimento e desenvolvimento propostos no trabalho, sob a ótica da bioquímica. E houve diferenças entre o perfil metabólico entre os nove estádios. O estágio A1 possui um perfil metabólico mais próximo aos estádios de crescimento, mesmo que aparentemente se aproximasse dos estádios de amadurecimento; o mesmo aconteceu com o estágio I3, metabolicamente se aproximou mais dos estádios de crescimento que os iniciais, assim portanto talvez seja mais interessante reclassificar os estádios de crescimento de C1 a C5, sendo C1 o I3, e o C5 o A1.

Nos próximos estudos, ainda é necessário, buscar o ensaio da hipótese, e entender a relação das xantofilas com o acúmulo de ABA. Mesmo assim, o presente trabalho mostrou-se favorável à hipótese do ABA como agente no amadurecimento, visto que teve uma correlação positiva com pelargonidinas e essas serem os principais responsáveis da coloração do fruto, além disso, ainda foi possível perceber que existe uma relação entre o ABA e o AsA, que ainda precisa ser mais explorada. Para isso, estudos exploratórios com bioinformática e bioquímicos de carotenoides entre diferentes tratamentos com indutores ou repressores a síntese de ABA talvez dessem pistas sobre o ciclo das xantofilas, o acúmulo de AsA e o processo de amadurecimento, e posteriormente a manipulação dessas rotas através de silenciamento e/ou superexpressão possam ajudar a criar novas tecnologias para biofortificação em frutos, controle de maturação ou na adaptação a estresses bióticos e abióticos.

9. REFERÊNCIAS

- AKŠIĆ, M. F. et al. Comparison of Sugar Profile between Leaves and Fruits of Blueberry and Strawberry Cultivars Grown in Organic and Integrated Production System. **Plants**, v. 8, n. 7, p. 205, 4 jul. 2019.
- ALEXANDER, L. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 377, p. 2039–2055, 2002.
- ANTUNES, L. E. C.; REISSER JUNIOR, C.; SCHWENGBER, José Ernani. Morangueiro. **Embrapa Clima Temperado - Livro técnico** (INFOTECA-E), 2016.
- BALDI, P. et al. Gene expression and metabolite accumulation during strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit development and ripening. **Planta**, v. 248, n. 5, p. 1143–1157, 2018.
- BEHR, M. et al. You want it sweeter: How glycosylation affects plant response to oxidative stress. **Frontiers in Plant Science**, p. 1443, 2020.
- BRUMMELL, D. A. Cell wall disassembly in ripening fruit. **Functional Plant Biology**, v. 33, n. 2, p. 103, 2006.
- CRUZ-RUS, E. et al. Regulation of L-ascorbic acid content in strawberry fruits. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 12, p. 4191–4201, 2011.
- DA SILVA MESSIAS, R. et al. Isolation of high-quality rna from grains of different maize varieties. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, n. 7, p. 697–707, 2014.
- DARNELL, R. L. et al. The Physiology of Flowering in Strawberries. **Horticultural Reviews**, p. 325–349, 2010.
- DAVEY, M. W. et al. Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 825–860, 2000.
- DEL POZO-INSFRAN, D. et al. Polyphenolics, Ascorbic Acid, and Soluble Solids Concentrations of Strawberry Cultivars and Selections Grown in a Winter Annual Hill Production System. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 131, n. 1, p. 89–96, jan. 2006.
- DENG, Y.; LU, S. Biosynthesis and Regulation of Phenylpropanoids in Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 36, n. 4, p. 257–290, 2017.
- DONG, N.; LIN, H. Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant–environment interactions. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 63, n. 1, p. 180–209, jan. 2021.
- DONG, T.; PARK, Y.; HWANG, I. Abscisic acid: Biosynthesis, inactivation, homeostasis and signalling. **Essays in Biochemistry**, v. 58, p. 29–48, 2015.

- EDGER, P. P. et al. Origin and evolution of the octoploid strawberry genome. **Nature Genetics**, v. 51, n. 3, p. 541–547, 2019.
- EL HADI, M. et al. Advances in Fruit Aroma Volatile Research. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 8200–8229, 11 jul. 2013.
- FAEDI, W.; MOURGUES, F.; ROSATI, C. Strawberry breeding and varieties: Situation and perspectives. **Acta Horticulturae**, v. 567, p. 51–59, 2002.
- FAIT, A. et al. Reconfiguration of the achene and receptacle metabolic networks during strawberry fruit development. **Plant Physiology**, v. 148, n. 2, p. 730–750, 2008.
- FAN, Z. et al. Strawberry sweetness and consumer preference are enhanced by specific volatile compounds. **Horticulture Research**, v. 8, n. 1, p. 66, dez. 2021.
- FENECH, M. et al. Vitamin C Content in Fruits: Biosynthesis and Regulation. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. January, p. 1–21, jan. 2019.
- FIGUEROA, N. E. et al. Contrasting dynamics in abscisic acid metabolism in different *Fragaria* spp. during fruit ripening and identification of the enzymes involved. **Journal of Experimental Botany**, v. 72, n. 4, p. 1245–1259, 24 fev. 2021.
- FOLTA, K. M.; BARBEY, C. R. The strawberry genome: a complicated past and promising future. **Horticulture Research**, v. 6, n. 1, p. 19–21, 2019.
- FORNEY, C. F.; KALT, W.; JORDAN, M. A. The Composition of Strawberry Aroma Is Influenced by Cultivar, Maturity, and Storage. **HortScience**, v. 35, n. 6, p. 1022–1026, out. 2000.
- 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 x ananassa*) fruits under osmotic stresses and identification of genes related to ascorbic acid pathway. **Physiologia Plantarum**, v. 166, n. 4, p. 979–995, ago. 2019.
- GASTON, A. et al. Applying the Solanaceae Strategies to Strawberry Crop Improvement. **Trends in Plant Science**, v. 25, n. 2, p. 130–140, fev. 2020.
- GIAMPIERI, F. et al. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. **Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 9–19, 2012.
- GIAMPIERI, F. et al. Strawberry as a health promoter: An evidence based review. **Food and Function**, v. 6, n. 5, p. 1386–1398, 2015.
- GRASSI, S. et al. Comparative genomics reveals candidate carotenoid pathway regulators of ripening watermelon fruit. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 781, dez. 2013.

GU, T. et al. Transcriptome and hormone analyses provide insights into hormonal regulation in strawberry ripening. **Planta**, v. 250, n. 1, p. 145–162, 2019.

GUNNESS, P. et al. Sensory analysis of individual strawberry fruit and comparison with instrumental analysis. **Postharvest Biology and Technology**, v. 52, n. 2, p. 164–172, 2009.

IANNETTA, P. P. M. et al. Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit. **Physiologia Plantarum**, v. 127, n. 2, p. 247–259, jun. 2006.

ISHIKAWA, T. et al. The Pathway via D-Galacturonate/L-Galactonate Is Significant for Ascorbate Biosynthesis in *Euglena gracilis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 45, p. 31133–31141, nov. 2008.

JAHNS, P.; LATOWSKI, D.; STRZALKA, K. Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: The role of antenna proteins and membrane lipids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1787, n. 1, p. 3–14, jan. 2009.

JI, K. et al. Non-climacteric ripening in strawberry fruit is linked to ABA, FaNCED2 and FaCYP707A1. **Functional Plant Biology**, v. 39, n. 4, p. 351, 2012.

JIA, H. et al. Sucrose functions as a signal involved in the regulation of strawberry fruit development and ripening. **New Phytologist**, v. 198, n. 2, p. 453–465, 2013.

JIA, H. et al. Abscisic acid and sucrose regulate tomato and strawberry fruit ripening through the abscisic acid-stress-ripening transcription factor. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 10, p. 2045–2065, out. 2016.

JIA, H.-F. F. et al. Abscisic 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.

KALLIO, H. et al. Sugars and acids of strawberry varieties. **European Food Research and Technology**, v. 212, n. 1, p. 81–85, 5 dez. 2000.

KERCHEV, P. I. et al. The transcription factor ABi4 Is required for the ascorbic acid-dependent regulation of growth and regulation of jasmonate-dependent defense signaling pathways in arabidopsis. **Plant Cell**, v. 23, n. 9, p. 3319–3334, 2011.

LABADIE, M. et al. Metabolite Quantitative Trait Loci for Flavonoids Provide New Insights into the Genetic Architecture of Strawberry (*Fragaria x ananassa*) Fruit Quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 25, p. 6927–6939, 24 jun. 2020.

LANGE, B. M. et al. Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and

distinct pathways across genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 24, p. 13172–13177, 2000.

LEE, G. B. et al. Phytohormone profiles of 'Seolhyang' and 'Maehyang' strawberry fruits during ripening. **Horticulture Environment and Biotechnology**, v. 61, n. 2, p. 229–239, 2020.

LENG, P. et al. The role of abscisic acid in fruit ripening and responses to abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 16, p. 4577–4588, 2014.

LEWERS, K. S.; LUO, Y.; VINYARD, B. T. Evaluating strawberry breeding selections for postharvest fruit decay. **Euphytica**, v. 186, n. 2, p. 539–555, jul. 2012.

LI, C. et al. Abscisic acid perception and signaling transduction in strawberry: A model for non-climacteric fruit ripening. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6, n. 12, p. 1950–1953, 2011.

LI, D. et al. Comparative Transcriptome Analysis Reveals the Influence of Abscisic Acid on the Metabolism of Pigments, Ascorbic Acid and Folic Acid during Strawberry Fruit Ripening. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0130037, jun. 2015.

LI, D. et al. Effect of exogenous sucrose on anthocyanin synthesis in postharvest strawberry fruit. **Food Chemistry**, v. 289, p. 112–120, ago. 2019.

LIAO, X. et al. Interlinked regulatory loops of ABA catabolism and biosynthesis coordinate fruit growth and ripening in woodland strawberry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 49, p. E11542–E11550, 2018.

LIU, L. et al. Regulation of Carotenoid Metabolism in Tomato. **Molecular Plant**, v. 8, n. 1, p. 28–39, jan. 2015.

LUO, Y. et al. ABA and sucrose co-regulate strawberry fruit ripening and show inhibition of glycolysis. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 295, n. 2, p. 421–438, 2020.

MEDINA-PUCHE, L. et al. MYB10 plays a major role in the regulation of flavonoid/phenylpropanoid metabolism during ripening of *Fragaria × ananassa* fruits. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 2, p. 401–417, 2014.

MELLIDOU, I.; KANELLIS, A. K. Genetic Control of Ascorbic Acid Biosynthesis and Recycling in Horticultural Crops. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, n. July, p. 1–8, 2017.

MERCHANTE, C. et al. Ethylene is involved in strawberry fruit ripening in an organ-specific manner. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 14, p. 4421–4439, nov. 2013.

MEZZETTI, B. et al. Breeding Strawberry for Higher Phytochemicals Content and Claim It: Is It Possible? **International Journal of Fruit Science**, v. 16, n. sup1, p. 194–206, 30 nov. 2016.

MOYA-LEÓN, M. A.; MATTUS-ARAYA, E.; HERRERA, R. Molecular events occurring during softening of strawberry fruit. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. May, 2019.

NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. Abscisic Acid Biosynthesis and Catabolism. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, n. 1, p. 165–185, 2005.

PADAYATTY, S. J.; LEVINE, M. Vitamin C physiology: the know and the unknown and Goldilocks. **Oral Dis.**, v. 22, n. 6, p. 463–493, 2016.

PANIAGUA, C. et al. Structural changes in cell wall pectins during strawberry fruit development. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, p. 55–63, 2017.

PERIN, E. C. et al. Extraction and Quantification of Abscisic Acid and Derivatives in Strawberry by LC-MS. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 9, p. 2547–2552, 2018.

PERIN, E. C. et al. ABA-dependent salt and drought stress improve strawberry fruit quality. **Food Chemistry**, v. 271, n. March 2018, p. 516–526, 2019.

PERKINS-VEAZIE, P. Growth and Ripening of Strawberry Fruit. Em: **Horticultural Reviews**. Oxford, UK: Jules Janick, 1995. v. 17p. 267–297.

PIGNOCCHI, C.; FOYER, C. H. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 4, p. 379–389, 2003.

RAMOS, P. et al. Cell wall-related enzymatic activities and transcriptional profiles in four strawberry (*Fragaria x ananassa*) cultivars during fruit development and ripening. **Scientia Horticulturae**, v. 238, n. February, p. 325–332, 2018.

SHULAEV, V. et al. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). **Nature Genetics**, v. 43, n. 2, p. 109–116, 2011.

SIEBENEICHLER, T. J. et al. The postharvest ripening of strawberry fruits induced by abscisic acid and sucrose differs from their in vivo ripening. **Food Chemistry**, v. 317, n. February, p. 126407, 2020.

SIEBENEICHLER, T. J. et al. Changes in the abscisic acid, phenylpropanoids and ascorbic acid metabolism during strawberry fruit growth and ripening. **Journal of Food Composition and Analysis**, p. 104398, 2022.

SMIRNOFF, N. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 122, n. November 2017, p. 116–129, jul. 2018.

STANGE, Claudia (Ed.). Carotenoids in nature: biosynthesis, regulation and function. **Springer**, 2016.

SYMONS, G. M. et al. Hormonal changes during non-climacteric ripening in strawberry. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 13, p. 4741–4750, 2012.

TAIZ, Lincoln et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.

VALPUESTA, V.; BOTELLA, M. A. Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 12, p. 573–577, dez. 2004.

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.

VINCI, G. et al. Ascorbic acid in exotic fruits: a liquid chromatographic investigation. **Food Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 211–214, 1995.

WARNER, R. et al. A Review of Strawberry Photobiology and Fruit Flavonoids in Controlled Environments. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 611893, 1 fev. 2021.

WHITAKER, V. M. et al. A roadmap for research in octoploid strawberry. **Horticulture Research**, v. 7, n. 1, p. 1–17, 2020.

YE, J. et al. Transcriptome profiling of tomato fruit development reveals transcription factors associated with ascorbic acid, carotenoid and flavonoid biosynthesis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–25, 2015.

YOUNG, P. R. et al. The genes and enzymes of the carotenoid metabolic pathway in *Vitis vinifera* L. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, 2012.

ZHU, H. et al. Isolation and characterization of the carotenoid biosynthetic genes LCYB, LCYE and CHXB from strawberry and their relation to carotenoid accumulation. **Scientia Horticulturae**, v. 182, p. 134–144, 2015.