

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial



DISSERTAÇÃO

**EFEITO DA RADIAÇÃO UV-C NA EXPRESSÃO GÊNICA E NAS
RESPOSTAS BIOQUÍMICO-FISIOLÓGICAS EM FRUTOS DE
TOMATE (*Solanum lycopersicum* Mill.)**

Aline Tiecher
Química Industrial de Alimentos

Pelotas, 2010

ALINE TIECHER

**EFEITO DA RADIAÇÃO UV-C NA EXPRESSÃO GÊNICA E NAS
RESPOSTAS BIOQUÍMICO-FISIOLÓGICAS EM FRUTOS DE
TOMATE (*Solanum lycopersicum* Mill.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Ciência e Tecnologia Agroindustrial).

Comitê de orientação:

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi

Dr. Fábio Clasen Chaves

Dra. Luciane Arantes de Paula

Pelotas, outubro de 2010

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

T559e Tiecher, Aline
 Efeito da radiação UV-C na expressão gênica e nas res-
postas bioquímico-fisiológicas em frutos de tomate (*Solanum*
lycopersicum Mill.) / Aline Tiecher. – 70f. – Dissertação (Mes-
trado). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia
Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade
de Agronomia Eliseu Maciel. Pelotas, 2010. – Orientador Ce-
sar Valmor Rombaldi ; co-orientador Luciane Arantes de Pau-
la, Fábio Clasen Chaves.

1.Tomates. 2.*Solanum lycopersicum*. 3.Ultravioleta.
4.Amadurecimento. 5.Etileno. 6.1-metilciclopropeno.
7.Metabolismo secundário. I.Rombaldi, Cesar Valmor.
II.Paula, Luciane Arantes de. III.Chaves, Fábio Clasen.
IV.Título.

CDD: 635.642

Banca examinadora:

Prof. Dr. Antônio de Oliveira

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi

Prof. Dr. Walter Ruiz

Dr. Fábio Clasen Chaves

Dra. Luciane Arantes de Paula

Dedico
À minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Cesar Valmor Rombaldi, pela inestimável orientação, confiança e incentivo na realização deste trabalho, e ao Dr. Fábio Clasen Chaves e Dra. Luciane Arantes de Paula pelas contribuições, ajuda e participação no comitê de orientação.

Aos membros da banca examinadora, professor Dr. Antônio de Oliveira, professor Dr. Cesar Valmor Rombaldi, professor Dr. Walter Ruiz, Dr. Fábio Clasen Chaves e Dra. Luciane Arantes de Paula.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudo e ao CNPq pelo suporte financeiro.

À Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela oportunidade na realização do curso.

Ao Laboratório de Pós-colheita de Frutas e Hortaliças, Laboratório de Cromatografia de Alimentos e ao Laboratório de Genômica e Fitomelhoramento pela colaboração na execução dos trabalhos.

Ao departamento de Fitotecnia, na pessoa de Antônio Antero Ribeiro de Albuquerque Neto pelo cultivo dos tomates utilizados nesse trabalho.

Aos amigos e colegas de pós-graduação pela ajuda preciosa, convivência, contribuições e companheirismo durante o trabalho, em especial Camila Pegoraro, Roberta Manica-Berto, Joseana Severo, Andressa Carolina Jacques, Cleonice da Rosa e Marcos André Nohatto.

Aos bolsistas e estagiários pelo apoio na realização dos experimentos, disposição e empenho, em especial Carolina Terra Borges, Jader Job Franco, Gustavo Zimmer, José Henrique Hamm, Railson S. Santos e Jardel Casaril.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pelos ensinamentos, pela dedicação e amizade.

Ao funcionário Marcos, pelo convívio, troca de ideias e amizade.

Ao meu namorado, André Belarmino, pelo amor, compreensão e alegria.

Aos meus queridos pais, Neri e Silvia, que sempre me encorajaram e estimularam a crescer profissional e pessoalmente, e pelo amor incondicional.

Ao meu irmão Alisson, aos demais familiares e amigos pela torcida, carinho, auxílio e amizade.

A Deus pelo dom da vida e bênçãos.

RESUMO

TIECHER, Aline. **Efeito da radiação UV-C na expressão gênica e nas respostas bioquímico-fisiológicas em frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.)**. 2010. 62f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A radiação UV-C é utilizada na pós-colheita de frutos com o objetivo de reduzir o inóculo e a incidência de doenças. Porém, é possível que atue como estressor abiótico, ativando mecanismos de defesa dos tecidos vegetais, que é qualificado pela indução do metabolismo secundário, especialmente pela síntese de compostos fenólicos e carotenóides, envolvidos na proteção ao estresse oxidativo. Nesse contexto, foram avaliadas alterações moleculares decorrentes da ação da radiação UV-C no armazenamento de tomates (20-23°C), e suas relações com as respostas bioquímico-fisiológicas e com os eventos influenciados pelo hormônio vegetal etileno. Para isso realizaram-se os seguintes tratamentos: UV-C a 3,7 kJ m⁻²; 1-metilciclopropeno (1-MCP) a 2 ppm; e 1-MCP + UV-C. Desses tratamentos, observou-se que ocorreu redução na firmeza dos frutos não-tratados e tratados com UV-C à medida que a maturação avançou, acompanhado do acúmulo de transcritos do gene que codifica para a enzima poligalacturonase (PG), indicando que o tratamento UV-C não contribui para a preservação desse atributo de qualidade. Por outro lado, o 1-MCP participou na preservação da firmeza de polpa, mesmo tendo havido acúmulo de transcritos da PG, sugerindo não ser esse gene o responsável maior por essa propriedade. A radiação UV-C promoveu incremento no teor de etileno, e mesmo assim houve retardo no desenvolvimento da coloração nos frutos submetidos a esse tratamento. Como esperado, frutos tratados com 1-MCP apresentaram retardo no pico da produção de etileno, no desenvolvimento de coloração e na diminuição da firmeza de polpa. O teor de licopeno foi menor nos frutos submetidos ao tratamento com 1-MCP. No entanto, nos frutos que foram submetidos ao tratamento com 1-MCP + UV-C, o teor de β-caroteno foi significativamente superior no epicarpo dos frutos, o que lhes conferiu uma coloração alaranjada. O ácido *p*-hidroxibenzóico foi o composto fenólico predominante encontrado no epicarpo e mesocarpo dos frutos, e a quercetina apresentou maiores teores nos frutos submetidos ao tratamento com 1-MCP + UV-C. δ-tocoferol foi o único tocoferol identificado nos frutos de tomate, o qual apresentou elevados teores no epicarpo dos frutos. Os genes que codificam para as enzimas responsáveis pela síntese de carotenóides fitoeno sintase (PSY) e ζ-caroteno desaturase (ZCD); pela síntese de fenilpropanóides, fenilalanina amônia liase (PAL) e chalcona sintase (CHS); enzimas antioxidantes, catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) apresentaram alto acúmulo de transcritos inicialmente no epicarpo e posteriormente no mesocarpo dos frutos submetidos à radiação UV-C. De modo geral, a radiação UV-C estimulou a produção de etileno, e mesmo assim reduziu a velocidade de maturação, especialmente no que tange à alteração de coloração. A firmeza de polpa não foi afetada pelo tratamento com UV-C. As respostas moleculares à aplicação da radiação UV-C iniciam no epicarpo e, em seguida, são observadas no mesocarpo.

Palavras-chave: ultravioleta, amadurecimento, etileno, 1-metilciclopropeno, metabolismo secundário.

ABSTRACT

TIECHER, Aline. **Effect of UV-C radiation on gene expression and biochemical and physiological responses in tomato fruit (*Solanum lycopersicum* Mill.)**. 2010. 62f. Dissertation (Masters Degree) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas.

UV-C radiation is utilized in postharvest of fruits with the objective of reducing inoculum and disease incidence. However, it is possible that it acts as an abiotic stressor agent, activating defense mechanisms of plant tissues, which is characterized by the induction of secondary metabolism, especially through the synthesis of phenolics compounds and carotenoids, involved in the protection of oxidative stress. In this context, molecular changes derived from the action of UV-C radiation were evaluated in tomato, during storage (20-23°C), and its relationship with biochemical and physiological responses and with events influenced by the plant hormone ethylene. For such, the following treatments were performed: UV-C at 3,7 kJ m⁻²; 1-methylcyclopropene (1-MCP) at 2 ppm, and 1-MCP + UV-C. From these treatments it was observed that a reduction in fruit firmness occurred in untreated and UV-C treated fruit as maturation advanced, accompanied by the accumulation transcripts of a gene encoding the enzyme polygalacturonase (PG), indicating that UV-C treatment did not contribute for the maintenance of this quality attribute. On the other hand, 1-MCP participated in the maintenance of flesh firmness, even though PG transcript accumulation was found, suggesting this gene is not the primary responsible for this property. UV-C radiation induced an increase in ethylene content, but still, a delay in fruit color development occurred in fruit from this treatment. As expected, 1-MCP treated fruit showed a delayed peak of ethylene production, of the color development, and of decrease in flesh firmness. Lycopene content was lower in fruit subjected to 1-MCP treatment. However, in fruit treated with 1-MCP + UV-C, β-carotene content was significantly higher in the exocarp of the fruit, which conferred them an orange color. *p*-Hydroxybenzoic acid was the predominant phenolic compound found in exocarp and mesocarp, and quercetin was found in higher content in fruits subjected to 1-MCP + UV-C treatment. δ-tocopherol was the only tocopherol identified in tomato fruit, present in high levels in the exocarp of the fruit. Genes coding for enzymes responsible for synthesis of carotenoids, phytoene synthase (PHS) and ζ-carotene desaturase (ZCD) for the synthesis of phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase (PAL) and chalcone synthase (CHS), antioxidant enzymes, catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) showed initially high accumulation of transcripts in the exocarp and later in the mesocarp of fruit subjected to UV-C radiation. In general, UV-C radiation induced ethylene production, and yet slowed down maturation, particularly regarding color changes. Flesh firmness was not affected by UV-C treatment. Molecular responses to UV-C radiation application started in the exocarp and were in sequence found in the mesocarp.

Key-words: ultraviolet, ripening, ethylene, 1-methylcyclopropene, secondary metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Secção transversal de tomate.....	12
Figura 2. Esquema representativo da biossíntese de etileno.....	14
Figura 3. Esquema representativo da biossíntese de carotenóides.....	15
Figura 4. Esquema representativo da biossíntese de fenilpropanóides.....	18
Figura 5. Acúmulo relativo de transcritos de genes da ACC sintase (<i>ACC</i>), poligalacturonase (<i>PG</i>), fitoeno sintase (<i>PSY</i>), ζ -caroteno desaturase (<i>ZCD</i>), fenilalanina amônia liase (<i>PAL</i>), chalcona sintase (<i>CHS</i>), catalase (<i>CAT</i>), superóxido dismutase (<i>SOD</i>), ascorbato peroxidase (<i>APX</i>), álcool desidrogenase (<i>ADH</i>) no epicarpo de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. O nível de transcritos é apresentado numa escala de 0 a 1. A cor verde à esquerda da escala indica o nível de expressão mínimo (0), a cor preta no centro representa 0.5 vezes o nível de expressão mínima e a cor vermelha representa 1 vez mais do que o mínimo. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.....	30
Figura 6. Acúmulo relativo de transcritos de genes da ACC sintase (<i>ACC</i>), poligalacturonase (<i>PG</i>), fitoeno sintase (<i>PSY</i>), ζ -caroteno desaturase (<i>ZCD</i>), fenilalanina amônia liase (<i>PAL</i>), chalcona sintase (<i>CHS</i>), catalase (<i>CAT</i>), superóxido dismutase (<i>SOD</i>), ascorbato peroxidase (<i>APX</i>), álcool desidrogenase (<i>ADH</i>) no mesocarpo de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. O nível de transcritos é apresentado numa escala de 0 a 10. A cor verde a esquerda da escala indica o nível de expressão mínimo (0), a cor preta no centro representa 5 vezes o nível de expressão mínima e a cor vermelha representa 10 vez mais que o mínimo. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.....	31
Figura 7. Produção de etileno em tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. Barras verticais indicam o intervalo de confiança a 95%. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.....	31
Figura 8. Mudança de firmeza em tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. Barras verticais indicam o intervalo de confiança a 95%. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.....	32
Figura 9. Coloração em tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. Barras verticais indicam o intervalo de confiança a 95%. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.....	35
Figura 10. Coloração e aparência geral de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias, após aplicação dos tratamentos: Controle; 1-MCP a 2 ppm; UV-C a 3,7 kJ m ⁻² ; 1-MCP + UV-C. Os Algarismos 0, 1, 3, 5 e 7 representam os dias após a instalação do experimento. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.....	36

Figura 11. Teor de carotenóides individuais: licopeno (A), β -caroteno (B), luteína+zeaxantina (C) e total (D) no epicarpo de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. Barras verticais indicam o intervalo de confiança a 95%. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.....	38
Figura 12. Teor de carotenóides individuais: licopeno (A), β -caroteno (B), luteína+zeaxantina (C) e total (D) no mesocarpo de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. Barras verticais indicam o intervalo de confiança a 95%. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.....	39
Figura 13. Cromatograma típico da separação de carotenóides via CLAE (1- luteína+zeaxantina; 2-licopeno; 3- β -caroteno) no epicarpo e mesocarpo de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.....	40
Figura 14. Cromatograma típico da separação de compostos fenólicos via CLAE (1- ácido <i>p</i> -hidróxibenzóico; 2- ácido <i>p</i> -cumárico; 3- quercetina) no epicarpo e mesocarpo de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.....	41
Figura 15. Teor de compostos fenólicos individuais: <i>p</i> -hidroxibenzóico (A), <i>p</i> -cumárico (B), quercetina (C) e total (D) no epicarpo de tomates Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. Barras verticais indicam o intervalo de confiança a 95%. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.....	42
Figura 16. Teor de compostos fenólicos individuais <i>p</i> -hidroxibenzóico (A), <i>p</i> -cumárico (B), quercetina (C) e total (D) no mesocarpo de tomates Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. Barras verticais indicam o intervalo de confiança a 95%. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.....	43
Figura 17. Conteúdo de δ -tocoferol no epicarpo (A) e mesocarpo (B) de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de 7 dias após os tratamentos. Barras verticais indicam o intervalo de confiança a 95%. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i> específicos sintetizados para qPCR. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.....	27
Tabela 2. Eficiência de amplificação dos <i>primers</i> para qPCR. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.....	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	12
2 MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1 Material vegetal e delineamento experimental.....	20
2.2 Etileno.....	21
2.3 Firmeza	21
2.4 Cor.....	21
2.5 Carotenóides individuais.....	22
2.6 Compostos fenólicos individuais.....	23
2.7 Tocoferóis.....	24
2.8 PCR quantitativa (qPCR).....	24
2.8.1 Desenho de <i>primers</i>	25
2.8.2 Eficiência de amplificação.....	25
2.9 Análise estatística.....	26
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1 Efeito da radiação UV-C no acúmulo de transcritos de ACC sintase e na produção de etileno.....	29
3.2 Efeito da radiação UV-C no acúmulo de transcritos da PG e na firmeza dos frutos.....	32
3.3 Variação de coloração, teores de carotenóides individuais e expressão transcricional de genes envolvidos com sua biossíntese nos tomates submetidos à radiação UV-C.....	34
3.4 Teores de compostos fenólicos individuais e expressão transcricional de genes envolvidos com sua biossíntese nos tomates submetidos à radiação UV-C.....	40
3.5 Teores de tocoferol nos tomates submetidos à radiação UV-C.....	44
3.6 Acúmulo de transcritos codificadores de enzimas antioxidantes em tomates submetidos à radiação UV-C.....	45
3.7 Expressão transcricional do gene <i>ADH</i> em tomates submetidos à radiação UV-C.....	46
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	47
5 REFERÊNCIAS	49
APÊNDICES	63

1 INTRODUÇÃO GERAL

O tomate é o fruto do tomateiro, planta pertencente à família *Solanaceae*, gênero *Solanum*, espécie *Solanum lycopersicum*. É uma espécie originária da zona Andina da América do Sul, mais especificamente do Peru, Bolívia e Equador (NAIKA et al., 2006; ROCA, 2009), que produz frutos carnosos, indeiscentes, suculentos e de coloração variada, designado como baga, derivado de um único ovário de uma flor, contendo numerosas sementes. Na Fig. 1 se apresenta um fruto de tomate, formado pelo pericarpo (parede do ovário), constituído por três camadas: epicarpo (casca), mesocarpo (polpa) e endocarpo (envolve os loci ou cavidades) (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

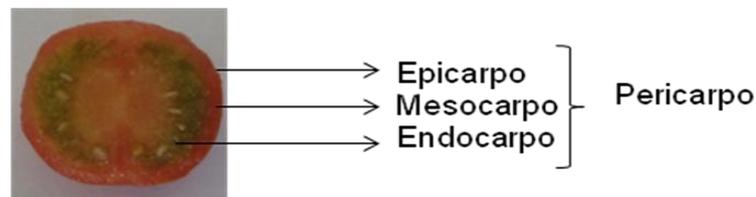


Figura 1. Secção transversal de tomate.

A versatilidade do uso do tomate contribuiu para a expansão da cultura. É consumido *in natura* ou processado, na forma de suco, molho, pasta e desidratado. Recentemente, a demanda por tomate foi reforçada principalmente após estudos epidemiológicos que revelaram que o consumo de tomate está associado à prevenção de doenças crônicas, com destaque ao câncer do sistema digestivo e de próstata (STEINMETZ; POTTER, 1996; GIOVANNUCCI, 1999; VAN'T VEER et al., 1999).

Nutricionalmente, o tomate é constituído por aproximadamente 94,5% de água, sendo fonte de vitaminas A, C e E, de minerais como potássio, fósforo e cálcio, de carotenóides (licopeno e β -caroteno), e de compostos fenólicos (DUMAS et al., 2003; CANENE-ADAMS et al., 2005). Contudo, a composição varia de acordo com a variedade, estágio de maturação, luz, temperatura, solo, fertilização, irrigação, e condições de cultivo e armazenamento (YILMAZ, 2001; DUMAS et al., 2003).

O amadurecimento, como em todo fruto climatérico, é acompanhado por um pico de respiração e significativo incremento na produção do hormônio vegetal etileno, que é o principal agente promotor do amadurecimento do fruto

(ALEXANDER; GRIERSON, 2002; CARA; GIOVANNONI, 2008). Após a síntese, o etileno é percebido por receptores (ETRs) localizados na membrana do retículo endoplasmático, os quais levam a transdução do sinal até o núcleo. Esse processo ocorre através de uma cascata de sinalização, que inclui reguladores positivos e negativos (CTR, EIN2, EIN3), para finalmente regular a expressão de genes alvo por fatores de transcrição, denominados de fatores de resposta ao etileno (ERFs) que, posteriormente, serão responsáveis por mudanças nas vias biossintéticas (ADAMS-PHILLIPS et al., 2004; BAPAT et al., 2010). Esse processo culmina com respostas bioquímico-fisiológicas, tais como a degradação da clorofila e acúmulo de carotenóides, mudanças de textura pelas modificações na parede celular e com o desenvolvimento de aroma e sabor, estes decorrentes do aumento de compostos voláteis e do balanço entre ácidos e açúcares (ALEXANDER; GRIERSON, 2002; GIOVANNONI, 2004; PRASANNA et al., 2007; CARA; GIOVANNONI, 2008).

Simplificadamente, a biossíntese do etileno ocorre a partir do aminoácido metionina, que é convertido em S-adenosilmetionina (SAM), pela enzima AdoMet sintetase. A enzima 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintase realiza a conversão da SAM em ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). A etapa seguinte é a conversão do ACC a etileno por oxidação pela ACC oxidase (Fig. 2). No início da maturação dos frutos, a expressão de genes ACC sintase é ativada, o que resulta em aumento da produção de ACC. Na maioria dos casos é a atividade da enzima ACC sintase que determina a taxa de biossíntese de etileno e esse é um dos mecanismos utilizados pelas plantas para controlar a produção de ACC. Além de ACC, a ACC sintase também produz metiltioadenosina (MTA), que é reciclada no Ciclo de Yang, para regeneração da metionina, assegurando que altas taxas de síntese de etileno possam ser mantidas mesmo quando os níveis de metionina são baixos (BLEECKER; KENDE, 2000; ALEXANDER; GRIERSON, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2004; PRASANNA et al., 2007; CARA; GIOVANNONI, 2008; LIN et al., 2009; BAPAT et al., 2010). Diversos fatores de estresse (por exemplo, ataque de patógenos e danos mecânicos) e aplicação de etileno e propileno foram mostrados como capazes de alterar a transcrição de genes ACC sintase, cada um de uma forma específica. Além destes fatores, outros hormônios vegetais também podem alterar a expressão de diferentes genes de ACC sintase (YANG; HOFFMAN, 1984; TAIZ; ZEIGER, 2004; TSUCHISAKA; THEOLOGIS, 2004; DUGARDEYN; VAN DER STRAETEN, 2008).

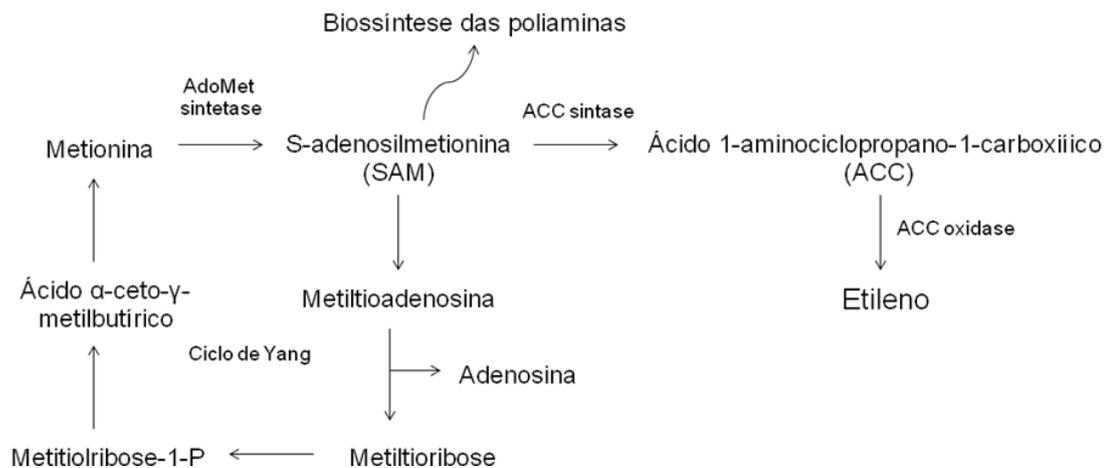


Figura 2. Esquema representativo da biossíntese de etileno (adaptado de BAPAT et al., 2010).

Uma das mais visíveis alterações que ocorrem na maturação do tomate corresponde à degradação da clorofila e síntese de pigmentos denominados carotenóides, que são responsáveis pela coloração característica de frutos maduros, os quais são sintetizados e armazenados nos cromoplastos (BARSAN et al., 2010). O geranylgeranilpirofosfato (GGPP) é o precursor da formação dos carotenóides, o qual, pela ação da enzima fitoeno sintase (PSY), é transformado em fitoeno, que, na sequência, através da fitoeno desaturase (PDS) e da ζ-caroteno desaturase (ZDS), é convertido em licopeno, que é o principal carotenóide encontrado nos frutos de tomate. A ciclização do licopeno pode gerar as formas α- ou β-caroteno. Esta via de biossíntese plastidial também é importante por ser precursora do grupo da vitamina E, incluindo os tocoferóis. (Fig. 3) (BRAMLEY, 2002; TANAKA et al., 2008; FRASER et al., 2009).

Dentre os principais trabalhos realizados com a finalidade de compreender o mecanismo de biossíntese de carotenóides durante a maturação de frutos, está o realizado por Fraser et al. (1994), que verificaram que durante a maturação de tomates o teor de carotenóides totais aumentou com uma concomitante diminuição no teor de clorofilas. Embora o maior teor de carotenóides (que se constitui principalmente de licopeno e β-caroteno) foi encontrado em frutos maduros, a maior atividade de enzimas da via de biossíntese dos carotenóides foi encontrada em frutos verdes, e que a enzima fitoeno sintase (PSY) é que catalisa o passo limitante na via de carotenóides durante a maturação dos frutos de tomate. Em tomateiro

existem dois genes dessa enzima, *PSY-1* e *PSY-2* (BRAMLEY, 2002). Mutantes de tomateiro defectivos para a isoforma *PSY-1*, específica de frutos, acumulam poucos carotenóides nesse órgão, tornando-os apenas amarelados, ao invés de vermelhos, quando maduros, com redução dos níveis de carotenóides em até 97% (BRAMLEY et al., 1992).

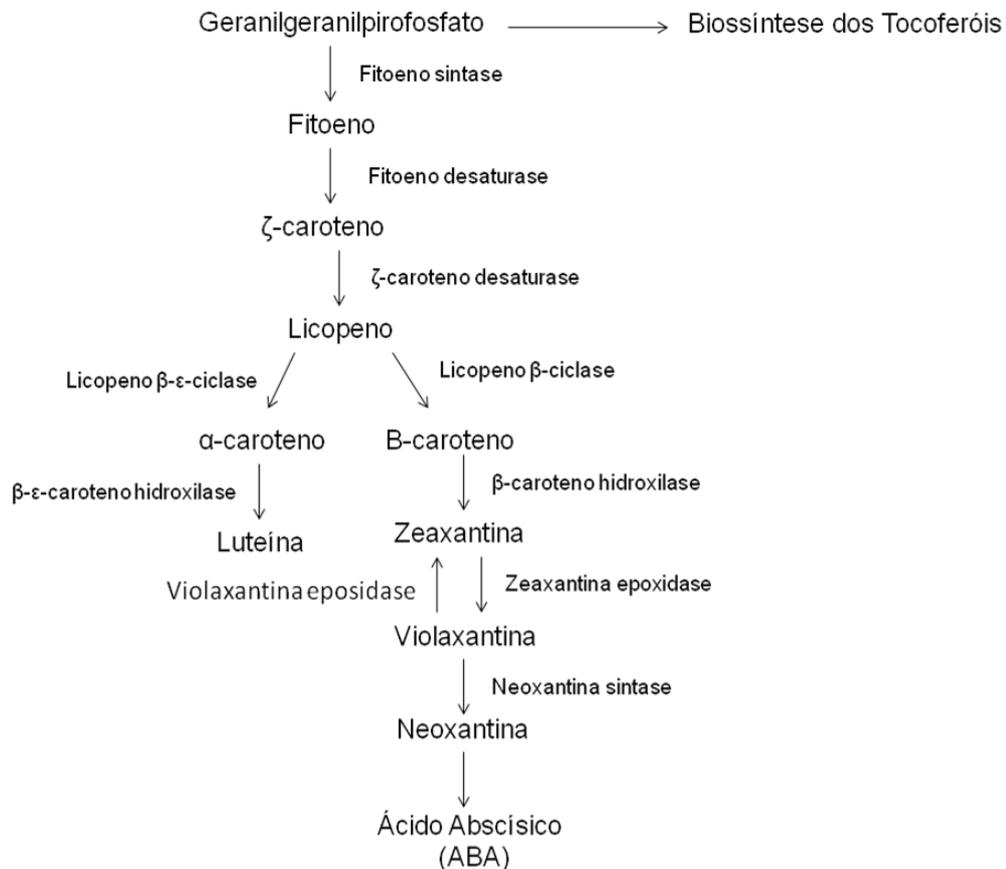


Figura 3. Esquema representativo da biossíntese de carotenóides em plantas (adaptado de TANAKA et al., 2008).

A perda de firmeza durante a maturação até a senescência é, em grande parte, atribuída à ação de enzimas envolvidas na despolimerização e solubilização da parede celular, como é o caso das poligalacturonases, pectato liases, pectina metilesterases, β-galactosidases, α-arabinofuranosidases, β-glucanases, β-xilosidase, expansinas e outras (BRUMMELL et al., 2004; NISHIYAMA et al., 2007; PRASANNA et al., 2007; MIEDES; LORENCES, 2009). A redução da atividade de uma ou mais dessas enzimas permite prevenir o amolecimento dos frutos, como é o caso das linhagens de tomate “longa vida” (KRAMER et al., 1992; KRAMER; REDENBAUGH, 1994).

Além da coloração e da firmeza, os aromas produzidos pelo tomate são outra característica interessante do ponto de vista sensorial. Os compostos voláteis são derivados de diferentes rotas de biossíntese, tais como do catabolismo de lipídeos, carotenóides, ligninas e aminoácidos (KRUMBEIN et al., 2004). De maneira geral, aldeídos ramificados e alifáticos provenientes das diferentes rotas de biossíntese são reduzidos a álcoois pela ação da enzima álcool desidrogenase (ADH). Em tomate, duas ADH têm sido descritas, sendo que ADH2 foi identificada como a mais importante no desenvolvimento de aromas no amadurecimento de frutos (SPEIRS et al., 1998).

Para prolongar a conservabilidade de frutos e hortaliças, estratégias tecnológicas vem sendo desenvolvidas, a fim de reduzir perdas nos atributos de qualidade dos frutos. Refrigeração (NUÑES et al., 1995), atmosfera modificada (HERTOG et al., 2001; ODRIOZOLA-SERRANO et al., 2008), irradiação gama (D'AMOUR, et al., 1993; PRAKASH et al., 2002) e tratamento com compostos químicos, como por exemplo, 1-metilciclopropeno (1-MCP) (ABLE et al., 2002; LEVERENTZ et al., 2003; CLIFF et al., 2009) são alguns exemplos dessas estratégias. O 1-MCP é frequentemente utilizado como inibidor da ação do etileno, pois compete pelos mesmos sítios receptores do etileno, impedindo-o de agir nos tecidos vegetais. Dessa maneira, promove atraso na maturação e, conseqüentemente, na senescência dos frutos. No entanto, os métodos alternativos no controle de doenças pós-colheita e no retardo da senescência que têm recebido destaque, são os métodos físicos, especialmente porque não deixam resíduo nos produtos tratados.

O tratamento pós-colheita com o uso de radiação ultravioleta-C (UV-C), um tipo de radiação não-ionizante com comprimento de onda entre 100 e 280 nm, constitui-se num método físico amplamente utilizado pela indústria alimentícia, principalmente para a desinfecção do ar, controle da contaminação de superfícies e embalagens, e na pós-colheita de frutos e hortaliças. Marquenie et al. (2002) verificaram que o tratamento com UV-C foi eficiente no controle de podridões causadas por *Botrytis cinerea* em morangos, e Stevens et al. (1998) relataram a eficácia da radiação UV-C em pêssegos infectados com *Monilinia fructicola*. Vicente et al. (2004, 2005) verificaram a manutenção da firmeza em frutos de amora e em pimentão submetidos à aplicação da radiação UV-C na pós-colheita. Em brócolis, Costa et al. (2006) sugeriram que a radiação UV-C pode ser um método útil para

retardar a senescência, incluindo o atraso na degradação de clorofilas. Desse modo, a radiação UV-C tem sido apresentada como um método capaz de retardar o processo de amadurecimento e não afetar negativamente a qualidade de frutos durante o armazenamento, prolongando a vida de prateleira (STEVENS et al., 1998; MAHARAJ et al., 1999; HEMMATY et al., 2006).

Além disso, a radiação UV-C age como estressor abiótico capaz de ativar mecanismos de defesa dos tecidos vegetais (MERCIER et al., 1993, MERCIER; KÚC, 1997). Estes mecanismos incluem o acúmulo de compostos antimicrobianos (fitoalexinas), modificação da parede celular, aumento da atividade de enzimas do sistema antioxidante e indução do metabolismo de carotenóides e compostos fenólicos (BARKA, 2001; GONZÁLEZ-AGUILAR et al., 2007; CHARLES et al., 2008 a,b; ERKAN et al., 2008; ALOTHMAN et al., 2009; LIU et al., 2009).

Em morango, o tratamento com radiação UV-C promoveu incremento nos teores de antocianinas (BAKA et al., 1999), compostos fenólicos e na atividade antioxidante (ERKAN et al., 2008). González-Aguilar et al. (2007) verificaram que a radiação UV-C também foi capaz de estimular a síntese de compostos fenólicos em mangas. Charles et al. (2008 a,b) demonstraram que a radiação UV-C promoveu a indução de resistência às podridões causadas por *Botrytis cinerea*, devido ao incremento da síntese de compostos fenólicos em células do epicarpo e mesocarpo, além do aumento da lignificação e suberização do epicarpo de frutos de tomate, e Barka (2001) observou aumento da atividade de enzimas do sistema antioxidante em tomates expostos à radiação UV-C. Recentemente, Liu et al. (2009) verificaram um aumento no teor de licopeno em tomates submetidos à radiação UV-C e Campos e Vieites (2009) observaram que o aumento nas doses de radiação UV-C em tomates promoveu um incremento nos teores de carotenóides totais. Desse modo, o uso de radiação UV-C pode resultar em efeitos benéficos no que concerne à síntese de compostos bioativos em frutos, os quais incluem a síntese de carotenóides e compostos fenólicos, além de estimular a ação de enzimas do sistema antioxidante como a superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, catalase, dehidroascorbato redutase, glutathiona redutase e monodehidroascorbato redutase, a fim de proteger as células e compartimentos sub-celulares dos efeitos citotóxicos das espécies de oxigênio reativos (ROS) (FOYER et al. 1994).

A principal via de síntese de compostos fenólicos em plantas é derivada da rota do ácido chiquímico, pela ação da enzima fenilalanina amônia liase (PAL). No

entanto, alguns compostos fenólicos também podem ser derivados da via do ácido mevalônico (MANN, 1987). Os compostos fenólicos são acumulados nos vacúolos das células, especialmente como mecanismo de proteção contra os danos potenciais causados pela radiação ultravioleta (FROHNMEYER; STAIGER, 2003). Além da ação da enzima PAL, para que haja biossíntese de flavonóides, é necessária a atuação da chalcona sintase (CHS), que forma as chalconas (Fig. 4). A partir desta estrutura básica, haverá a formação do anel flavonóide básico, que irá conduzir a formação de importantes flavonóides como as antocianinas, os flavonóis, os taninos (hidrolisados ou condensados) e os isoflavonóides, que são derivados da ação dessas enzimas (FERRER et al., 2008).

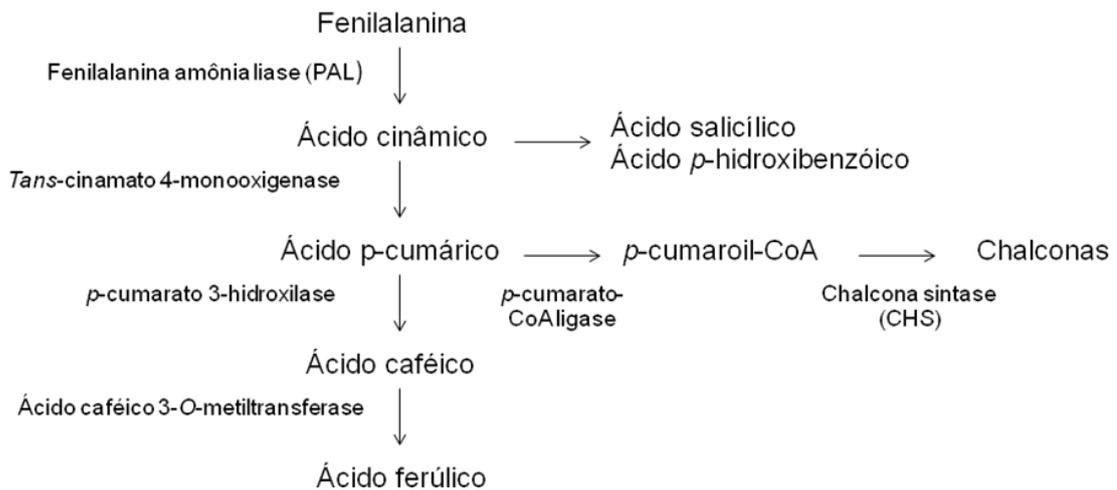


Figura 4. Esquema representativo da biossíntese de fenilpropanóides (adaptado de WEISSHAAR; JENKINS, 1998).

As espécies de oxigênio reativos estão presentes nas células na forma de superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\cdot}). Essas moléculas tóxicas são formadas durante funções metabólicas normais, como na respiração e fotossíntese, ou induzidas por estímulos ambientais, aos quais as plantas estão constantemente expostas, como temperatura, salinidade, poluentes atmosféricos, metais e radiação ultravioleta (BREUSEGEM et al., 2001; MITLLER, 2002; CHITARRA e CHITARRA, 2005). Devido à alta reatividade dos radicais hidroxilas, os organismos aeróbios preferem eliminar as formas precursoras menos reativas, tais como $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 . As superóxido dismutases (SOD) são consideradas as principais enzimas de defesa antioxidante, pois regulam a concentração celular

de O_2^- e H_2O_2 ($O_2^- \rightarrow H_2O_2 + O_2$). A forma H_2O_2 é eliminada por catalases (CAT) e ascorbato peroxidases (APX). Catalases removem a maior parte do H_2O_2 , enquanto ascorbato peroxidases podem eliminar H_2O_2 , que é inacessível para a CAT por apresentar maior afinidade com H_2O_2 e ter presença em diferentes localizações subcelulares (INZÉ; VAN MONTAGU, 1995; BREUSEGEM et al., 2001).

Os estudos relatados precedentemente permitem inferir que o processo de maturação é um evento geneticamente programado, o qual pode ser parcialmente controlado, através do uso de alguns mecanismos que interfiram na vida de prateleira do fruto. Entretanto, persistem lacunas e desafios técnico-científicos a serem superados com informações úteis para gerar conhecimentos e tecnologias de tratamentos pós-colheita a serem transferidas ao setor produtivo, de modo a ampliar o tempo entre a colheita e consumo, e reduzir as significativas perdas de matéria-prima que ocorrem ao longo da cadeia agroindustrial de frutos e hortaliças no Brasil (FEHR; ROMÃO, 2001; VILELA et al., 2003).

Embora o tratamento pós-colheita com UV-C se constitua em alternativa tecnológica para aumento da conservabilidade de frutos e hortaliças, neste trabalho o objetivo maior está centrado na geração de conhecimento científico relacionado com a compreensão de como se dá regulação gênica e respostas bioquímico-fisiológicas decorrente do estresse abiótico causado pela radiação UV-C em frutos de tomate cv. Flavortop. Neste contexto, serão avaliados os efeitos sobre a produção de etileno, firmeza, desenvolvimento de coloração, teor de carotenóides e compostos fenólicos individuais, além de avaliar a expressão transcricional de genes relacionados com essas vias metabólicas e com as enzimas antioxidantes. Para tal, partiu-se da hipótese que o estresse abiótico causado pela radiação UV-C promove a indução da síntese de etileno, ativando genes de vias metabólicas reguladas por esse hormônio.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e delineamento experimental

Tomates (*Solanum lycopersicum* cv. Flavortop) no estágio de maturação *breaker*, estágio caracterizado por Zegzouti et al. (1999), foram obtidos em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Os tomates foram semeados em bandejas de isopor, tendo como substrato vermiculita, e quando atingiram 5 cm de altura foram transplantados para local definitivo, onde foram cultivados através de sistema hidropônico em casas de vegetação no Campus Capão do Leão da Universidade Federal de Pelotas. A partir de testes preliminares observou-se que é nesse estágio que se obtêm as maiores respostas fisiológicas ao UV-C. Apenas frutos livres de defeitos, com tamanho aproximado de 2 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro e massa aproximada de 5,5 g foram utilizados. Imediatamente após a colheita, os frutos foram submetidos ao tratamento com radiação UV-C. A fonte de radiação foi composta de quatro lâmpadas germicidas (Phillips® 30W), com comprimento de onda de 254 nm. A intensidade da radiação emitida foi determinada com medidor de luz ultravioleta digital (RS-232 Modelo MRUR-203, Instrutherm®). Os frutos foram expostos à radiação com distância de 60 cm da extremidade distal, com dose pré-estabelecida de 3,7 kJ m⁻² durante 16 minutos (MAHARAJ et al., 1999; CHARLES et al., 2008 a,b). A cada 4 minutos, os frutos foram girados 180°, a fim de permitir que todos recebessem uma radiação completa e uniforme. Como a radiação UV-C induz a síntese de etileno, um tratamento foi destinado a avaliar o efeito do UV-C sem a ação do etileno, utilizando como inibidor do etileno o 1-metilciclopropeno (1-MCP). Deste modo, tiveram-se os seguintes tratamentos: Controle (não-tratados); UV-C a 3,7 kJ m⁻²; 1-MCP a 2 ppm e 1-MCP a 2 ppm seguido de UV-C a 3,7 kJ m⁻². Para aplicação do 1-MCP, foi utilizado o produto comercial Smartfresh contendo 0,34% de ingrediente ativo (1-MCP). O produto foi solubilizado em água e imediatamente transferido para o frasco contendo os frutos, os quais foram mantidos nessa condição por 24 horas em temperatura de 20 a 23°C. A concentração foi calculada de modo a gerarem-se 2 ppm de 1-MCP no interior do frasco. No tratamento com 1-MCP mais UV-C, a radiação foi aplicada 24 horas após a colheita. O delineamento foi inteiramente casualizado, no sistema bifatorial 4 x 5 (tratamentos x dias), composto de 3 amostras com 3 repetições analíticas. Depois de tratados, os frutos

foram acondicionados em bandejas plásticas e mantidos no escuro em temperatura de 20 a 23°C, com umidade relativa de 85%. As coletas para as análises de cada tratamento foram realizadas no momento da colheita e se estenderam por sete dias.

Para as análises de carotenóides, compostos fenólicos individuais, tocoferóis e expressão gênica, as sementes e o gel foram eliminados, avaliando-se apenas o epicarpo e mesocarpo dos frutos, separadamente.

A seguir estão indicados os procedimentos e técnicas experimentais adotadas na condução desse estudo.

2.2 Etileno

Para análise de etileno, foram pesados aproximadamente 40 g de frutos e, logo após, acondicionados em frascos de polipropileno de 80 mL, com tampa rosca. Depois de 1 hora da instalação dos frutos nos frascos, foi coletado 1 mL de atmosfera gasosa do interior dos recipientes plásticos, com auxílio de uma seringa hipodérmica. O etileno produzido foi expresso em nanolitros por grama por hora ($\text{nL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$), sendo determinado por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama, de acordo com Girardi et al. (2005).

2.3 Firmeza

A firmeza dos frutos foi determinada pelo texturômetro (Texture Analyzer, TA.XT plus, Stable Micro Systems Texture Technologies®), com sonda de 2 mm (diâmetro). Cada fruto foi penetrado em 25%, com velocidade de 1 mm s^{-1} e mensurada na região equatorial de cada fruto. Os resultados foram expressos em Newton (N).

2.4 Cor

A coloração da epiderme dos frutos foi medida com o emprego de colorímetro (Minolta Chromometer Modelo CR 300, D65, Osaka, Japan), com 8 mm de abertura no padrão CIE-L*a*b*. Para calcular o ângulo Hue (°Hue), que define a tonalidade de cor, usaram-se os valores de a* e b* ($^{\circ}\text{Hue} = \tan^{-1}b^*/a^*$). Valores de °Hue próximos a 180° representam frutos mais verde; aqueles próximos a 90°, são

mais amarelos; e quando tendem a 0°, vermelhos. As medições foram realizadas em faces opostas e na região equatorial de cada fruto.

2.5 Carotenóides individuais

O método de extração e análise cromatográfica foi realizado segundo o método descrito por Rodriguez-Amaya (2001), seguido de saponificação no extrato etéreo, conforme metodologia descrita por Zambiasi (1997). Os carotenóides foram extraídos triturando a amostra com celite, seguido de filtragem à vácuo e lavagens com acetona, até total remoção de pigmentação. O filtrado foi transferido para um funil de separação, onde foi adicionado éter de petróleo e água até completa remoção da acetona. Após a etapa de extração, foi realizada a saponificação da amostra, com solução de hidróxido de potássio (1,5 N) em etanol, à temperatura ambiente, por 18 horas e na ausência de luz. Depois, a fração orgânica obtida foi evaporada em evaporador rotativo à 40°C. O resíduo de carotenóides foi dissolvido em uma mistura de metanol e acetonitrila (30:70, v/v). O extrato diluído foi centrifugado à 9000 x g por 6 minutos, e uma alíquota de 25 µL do sobrenadante foi injetada no cromatógrafo.

Os carotenóides foram quantificados utilizando o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), da Shimadzu, equipado com injetor automático, detector UV-VIS a 450 nm, coluna de fase reversa RP-18 CLC-ODS (5 µm, 4,6 mm x 150 mm, Shimadzu) e coluna de guarda CLC-GODS (5 µm, 2 cm x 4 mm, Supelco). A separação foi efetuada utilizando o sistema de eluição por gradiente, com fases móveis metanol (solvente A), acetonitrila (solvente B) e acetato de etila (solvente C), com um fluxo de 1 mL min⁻¹. A fase inicial era composta por 30% de A e 70% de B; alterou-se aos 10 minutos para 10% de A, 80% de B e 10% de C; aos 35 minutos para 5% de A, 80% de B e 15% de C; retornou à fase inicial aos 40 minutos, e se manteve por mais 2,5 minutos, para reequilíbrio do sistema.

Os picos foram identificados por comparação com o tempo de retenção dos padrões e quantificados por comparação com as curvas de calibração externas, para os padrões β-criptoxantina ($y = 7,7943e^{-0,05} x + -5,8298e^{-0,12} x^2$, com R²: 0,9997), licopeno ($y = 2,2694e^{-0,07} x + 8,7785e^{-0,16} x^2$, com R²: 0,9970), β-caroteno ($y = 4,4075e^{-0,08} x + 2,8316e^{-0,16} x^2$, com R²: 0,9983), luteína e zeaxantina ($y = 4,7943e^{-0,08} x$

+ $6,916e^{-0,16} x^2$ com $R^2: 0,9954$) (Sigma-Aldrich), com os resultados expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ de amostra fresca.

2.6 Compostos fenólicos individuais

A determinação de fenólicos individuais foi realizada de acordo com o método descrito por Häkkinen et al. (1998). Para a extração se empregou a mistura de metanol acidificado com ácido clorídrico. O extrato foi homogeneizado em banho-maria (35°C), durante o período de 24 horas. Em seguida, a mistura foi filtrada e evaporada em evaporador rotativo a 35°C . O resíduo concentrado foi redissolvido em metanol até o volume final de 5 mL, o qual foi centrifugado ($7.000 \times g$ por 10 minutos). Uma alíquota de 30 μL do sobrenadante foi injetada no cromatógrafo.

Os compostos fenólicos foram separados e quantificados utilizando o equipamento CLAE da Shimadzu, equipado com injetor automático, detector UV-VIS a 280 nm, coluna de fase reversa RP-18 CLC-ODS (5 μm , 4,6 mm x 150 mm, Shimadzu) e coluna de guarda CLC-GODS (5 μm , 2 cm x 4 mm, Supelco). A fase móvel se constitui num gradiente de eluição com solução de ácido acético em água (99:1) (solvente A) e metanol (solvente B), com fluxo de $0,9 \text{ mL min}^{-1}$, cuja proporção se iniciou com 100% de A, alterando-se gradativamente até 60% de A e 40% de B, em 25 minutos; manteve-se constante esta proporção por 2 minutos, e em seguida foi sendo gradativamente alterada até 95% de A e 5% de B, aos 37 minutos, mantendo-se constante por mais 5 minutos, e, após, retornou à fase inicial, com tempo total de corrida de 45 minutos, segundo metodologia descrita por Zambiasi (1997).

Os compostos fenólicos foram identificados por comparação com o tempo de retenção dos padrões e quantificados com base nas curvas de calibração dos padrões externos, com as equações de reta expressa por $y = 2,14083e^{-0,07} x$, com $R^2: 0,9903$ para o ácido *p*-cumárico, $y = 2,9333e^{-0,07} x$, com $R^2: 0,9989$ para o ácido caféico, $y = 3,2716e^{-0,07} x$, com $R^2: 0,9995$ para o ácido ferúlico, $y = 6,4457e^{-0,07} x$, com $R^2: 0,9955$ para o ácido *p*-hidroxibenzóico, $y = 3,2551e^{-0,07} x$, com $R^2: 0,9969$ para o ácido gálico, $y = 5,8751e^{-0,07} x$, com $R^2: 0,9977$ para o ácido elágico, $y = 6,2498e^{-0,07} x$, com $R^2: 0,9926$ para a quercetina, $y = 1,3590e^{-0,06} x$, com $R^2: 0,9977$ para a (-)-epicatequina, $y = 1,3851e^{-0,06} x$, com $R^2: 0,9951$ para a (+)-catequina, $y = 1,3574e^{-0,06} x$, com $R^2: 0,9997$ para a miricetina e $y = 5,6644e^{-0,07} x$, com $R^2: 0,9990$ para o

campeferol (Sigma-Aldrich®). Os resultados foram expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ de amostra fresca.

2.7 Tocoferóis

A extração de tocoferóis foi realizada segundo metodologia descrita por Rodriguez-Amaya (2001), a qual é similar à extração de carotenóides. Após a extração da fase etérea, esta foi separada e centrifugada a $9000 \times g$ por 10 minutos, injetando $20 \mu\text{L}$ do sobrenadante no cromatógrafo. Os tocoferóis foram separados e quantificados utilizando o equipamento CLAE da Shimadzu, equipado com injetor automático, com detector de fluorescência, utilizando o comprimento de onda de 290 nm para excitação e de 330 nm para a emissão, com coluna de fase reversa RP-18 CLC-ODS ($5 \mu\text{m}$, $4,6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, Shimadzu) e coluna de guarda CLC-GODS ($5 \mu\text{m}$, $2 \text{ cm} \times 4 \text{ mm}$, Supelco). A separação foi realizada pelo sistema de eluição por gradiente, com fase móvel constituída de metanol (solvente A): isopropanol (solvente B): acetonitrila (solvente C), com fluxo de 1 mL min^{-1} . O gradiente iniciou com proporção de A:B:C de 40:50:10; foi alterado em 10 minutos para 65:30:5; após 2 minutos, para 40:50:10, e mantido constante até 15 minutos, segundo metodologia de Zambiasi (1997).

Os picos foram identificados por comparação com o tempo de retenção dos padrões e quantificados por comparação com as curvas de calibração externas, preparada com os padrões cromatográficos correspondentes ao α -, δ - e γ -tocoferol, com equações de reta expressa por $y = 1,0015e^{-0,08} x + 2,0179e^{-0,16} x^2$, com R^2 : 0,9972, $y = 4,2564e^{-0,09} x + -4,21971e^{-0,17} x^2$, com R^2 : 0,9984 e $y = 2,1663e^{-0,09} x + 6,5754e^{-0,17} x^2$, com R^2 : 0,9905, respectivamente. O teor total de tocoferóis em tomate foi expresso em $\mu\text{g g}^{-1}$ de amostra fresca.

2.8 PCR quantitativa (qPCR)

O RNA total foi isolado usando PureLink™ Plant Reagent (Invitrogen), seguido de digestão com DNase I™ (Invitrogen). A qualidade dos RNAs foi verificada em gel de agarose a 2% (m/v). O cDNA foi sintetizado usando SuperScript III RT™ (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. As reações de qPCR foram analisadas através do equipamento 7500 Real Time PCR System

(Applied Biosystems). A reação de qPCR constou de 12,5 µL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2 µL do DNA (diluído 25 vezes), 2 mM de *primers forward* e *reverse*, e água livre de nuclease em um volume total de 25 µL. As amostras foram depositadas em placas de 96 poços, cobertas com adesivo ótico. Os parâmetros de temperatura para a reação de qPCR foram: 50°C, por dois minutos; 95°C, por dez minutos, 40 ciclos de três etapas: 95°C, por 30 segundos; 57°C, durante um minuto e; 72°C, por um minuto, com extensão final de 72°C, por cinco minutos, a qual foi seguida pela curva padrão de dissociação, para verificar a especificidade dos *primers* utilizados.

A razão de expressão relativa (R) do gene-alvo foi calculada baseada na eficiência de amplificação (E) e no *threshold cycle* (Ct) da amostra *versus* um controle e expresso em comparação com um gene de referência, no caso, o *18S rRNA* (PFAFFL, 2001), a partir do modelo matemático:

$$R = \frac{(E_{alvo})^{\Delta CT_{alvo}(\text{controle-amostra})}}{(E_{ref})^{\Delta CT_{ref}(\text{controle-amostra})}}$$

2.8.1 Desenho de *primers*

As sequências de nucleotídeos para tomate foram obtidas no Sol Genomics Network e National Center for Biotechnology Information, usando *Vector*TM (Invitrogen, Carlsbad, CA, E.U.A.) para desenhar os *primers* gene-específicos (Tab. 1). Os critérios de seleção foram os seguintes: tamanho 18 e 20 pb; temperatura de anelamento entre 60-65°C; percentual de bases CG entre 40 e 60%; tamanho médio dos fragmentos amplificados entre 50 e 150 pb, e não mais de duas bases C ou G entre os cinco últimos nucleotídeos da extremidade 3'.

2.8.2 Eficiência de amplificação

Para a quantificação relativa é necessário primeiramente realizar a validação dos *primers* a serem utilizados, calculando a eficiência da amplificação. Para isso, prepararam-se diluições seriadas com os cDNAs das amostras de concentrações conhecidas, a fim de se construir curvas padrões, que serviram para quantificar as

amostras de interesse. A eficiência de amplificação da reação de qPCR foi calculada a partir da inclinação da reta (*slope*) da equação de regressão linear obtidos pelo *software* de análise, de acordo com a seguinte equação: $E = 10^{(-1/\text{slope})}$. A Tab. 2 apresenta os resultados da validação dos *primers* utilizados nesse estudo.

Dos 32 *primers* sintetizados para qPCR, além do 18S, seis *primers* apresentaram problemas. β -galactosidase (*β -Gal*), zeaxantina epoxidase (*ZEP*) e arginina descarboxilase (*ADC*) apresentaram amplificação inespecífica e trans-cinamato 4-monooxigenase (*CA4H*), *p*-cumarato 3-hidroxilase (*C3H*) e ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico oxidase (*ACO*) não amplificaram. Dos 26 restantes 10 foram selecionados para esse trabalho, sendo eles os genes codificantes para as enzimas: ACC sintase (*ACC*), poligalacturonase (*PG*), fitoeno sintase (*PSY*), ζ -caroteno desaturase (*ZCD*), fenilalanina amônia liase (*PAL*), chalcona sintase (*CHS*), catalase (*CAT*), superóxido dismutase (*SOD*), ascorbato peroxidase (*APX*) e álcool desidrogenase (*ADH*).

2.9 Análise estatística

Os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilks e à homocedasticidade pelo teste de Hartley. Posteriormente, foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Os efeitos dos tratamentos foram avaliados pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$) e tempos de amostragem por regressão ($p \leq 0,05$) (SAS Institute, 2002).

Tabela 1. Primers específicos sintetizados para qPCR. FAEM/UFPeI, Pelotas, 2010.

Genes	Número de Acesso	Forward	Reverse
Metabolismo de Parede Celular			
Pectina metilesterase (<i>PME</i>)	SGN-U575256	TCGGCCCCCGCCAATAATA	TCCGGCCACTCGCCGTTA
α -l-Arabinofuranosidase (α - <i>AF</i>)	SGN-U571043	CGGGATTCTGGGGCATGAAT	GCAGCAGCCAGCTTTTGCAA
β -Galactosidase (β - <i>Gal</i>)	GI 7939618	GCACAGTGGGCCGCCAAAAT	GGGGCATCGTCTTGCTTGCA
Expansina (<i>EXP</i>)	SGN-U578473	GCTCAGTACCGCGCTGGCAT	TCCTTGCTTTTCGGCATGGGA
Poligalacturonase (<i>PG</i>)	SGN-U577266	TGGGCCAGGCCATGGTATAA	ACCCAGAACCACCCTGCCA
Xiloglucana endotransglicosilase (<i>XET</i>)	SGN-U580011	TGCTGATGATTGGGCCACAA	GTGAATGGGGCTTGGGCC
Aromas			
Lipoxigenase (<i>LOX</i>)	SGN-U578028	GGCCGCGAACCAACCAAA	TCGCTCGTCCCTTGGGACA
Álcool desidrogenase (<i>ADH</i>)	SGN-U569057	CCCCTGGTGTGTGGCTGAT	TGCTCAGCCAGCGTTTTTGA
Biossíntese dos fenilpropanóides			
Fenilalanina amônia liase (<i>PAL</i>)	GI 30687012	CCGGTCGTCCCAATTCCAAA	ATCCAACCGCCGTGCCATT
Chalcona isomerase (<i>CHI</i>)	SGN-U602638	GCGAAAGCACCAGCAAACC	AGCTCCGAGGCCTTCGTCA
Chalcona sintase (<i>CHS</i>)	SGN-U579222	TGGATTTGGCCTGGGCTT	AGCCCAGCCCACTAAGCAGC
Trans-cinamato 4-monooxigenase (<i>C4H</i>)	GI 1235546	GGGGTTGAGTTTGGGTCACG	TCTTGTCATTCCCCGTGAA
<i>p</i> -cumarato 3-hidroxilase (<i>C3H</i>)	GI 42570397	GCGCCGAGCTAGCAAAGAA	GATCCTGACCGTTGCGGCTA
Biossíntese dos carotenóides			
Geranilgeranilpirofosfato sintase (<i>GGPS</i>)	SGN-U573348	TGAGTCCACAGCCATGCCAG	GCAAGAAGTGCATCCCCTGC
Fitoeno sintase (<i>PSY</i>)	GI 120969569	GCAGGCAGCCTTGGTGAAGA	CAAGCCCCAAATCCCCGGA
Fitoeno desaturase (<i>PDS</i>)	SGN-U565585	GCTTCTCCGCGCCCAACTA	AACCACCCAAACCTGCACCA
ζ -caroteno desaturase (<i>ZDS</i>)	SGN-U568537	TCGGGGGCCAAAGCTGAAA	TCGACATGCCTGCAAGCCC
Licopeno β - ϵ -ciclase (<i>LCY-E</i>)	SGN-U567885	CTTGCCGCGGAGTCAGCTAA	AAGATCAGGCCCAACGAGCC
Licopeno β -ciclase (<i>LCY-B</i>)	GI 150014714	TGGTTCATCCATCCACCGGT	TGGCATTGGCAACAACAGGA
β -caroteno hidroxilase (<i>CRTRB</i>)	SGN-U568606	TTGGGCGAGATGGGCACAC	TGGCGAAAACGTCGTTCCAGC
Zeaxantina epoxidase (<i>ZEP</i>)	SGN-U569421	ATGTGGGGGGAGGCAAGATG	GTTTGGGGCATCCGCACC
Neoxantina sintase (<i>NXS</i>)	GI 8249884	CGGGCTCAATTGACGTGAT	CAGCTAGCCTGAGCCCAGCA
Sistema Antioxidante			
Ascorbato peroxidase (<i>APX</i>)	SGN-U578449	TGACCGCCAATCCCCTTA	GGCATCTTCATCCGCAGCAT
Dehidroascorbato redutase (<i>DHAR</i>)	SGN-U577467	CAATGGCGGCTTCAATCGAA	GGTGAATGGGCAGTCACCGA
Catalase (<i>CAT</i>)	SGN-U578839	GCCACGCGACCAAGGATCTT	CCTCGGGTCCATTGTTTGG
Superoxido dismutase (<i>SOD</i>)	SGN-U581590	AGGCCGTCGCCGTCCTTA	CCAAGGGCATGGACATGGAA
Biossíntese de Poliaminas			
Ornitina descarboxilase (<i>ODC</i>)	SGN-U584902	GGTATCTCGCCGGACCGGAT	GTTGCCGTCGGTCATGGGTT
Arginina descarboxilase (<i>ADC</i>)	SGN-U578034	CTTCCC GCGCCGGAGTTGTT	ACGGCGGCGGCGTTTGTCT
Biossíntese de etileno			
Ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico sintase (<i>ACC</i>)	SGN-U567978	GAGCCAGGGTGGTTCCGAGT	GAATCCTCGCGAGCGCAATA
Ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico oxidase (<i>ACO</i>)	SGN-U579104	CCTTCGCGCTCACACGGA	GCTGATCGCCGAGGTTGATG
Controle endógeno			
18S rRNA	GI 18448	TGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAA	AAGTCGGGATTGTTGCACGTATT

Tabela 2. Eficiência de amplificação dos *primers* para qPCR. FAEM/UFPeI, Pelotas, 2010.

Genes	Slope	Eficiência
<i>PME</i>	-1.72	3.81
<i>α-AF</i>	-1.55	4.38
<i>EXP</i>	-1.35	5.52
<i>PG</i>	-3.75	1.84
<i>XET</i>	-3.18	2.06
<i>LOX</i>	-4.13	1.74
<i>ADH</i>	-2.03	3.10
<i>PAL</i>	-2.06	3.05
<i>CHI</i>	-3.73	1.85
<i>CHS</i>	-2.82	2.26
<i>GGPS</i>	-2.74	2.31
<i>PSY</i>	-2.82	2.26
<i>PDS</i>	-3.10	2.10
<i>ZCD</i>	-2.62	2.10
<i>LCY-E</i>	-3.09	2.10
<i>LCY-B</i>	-1.22	6.58
<i>CRTRB</i>	-1.12	7.78
<i>NXS</i>	-3.30	2.00
<i>APX</i>	-2.22	2.81
<i>DHAR</i>	-2.95	2.18
<i>CAT</i>	-2.73	2.32
<i>SOD</i>	-3.46	1.94
<i>ODC</i>	-1.87	3.42
<i>ACC</i>	-2.83	2.25
<i>18S</i>	-2.88	2.22

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da radiação UV-C no acúmulo de transcritos de ACC sintase e na produção de etileno

Nos frutos tratados com UV-C houve maior estímulo da expressão transcricional do gene putativo da ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintase (*ACC sintase*) (Fig. 5 e 6) e da produção de etileno (Fig. 7) quando comparados aos frutos controle. A enzima ACC sintase foi mais expressa inicialmente no epicarpo dos frutos, tendo posteriormente maior acúmulo de transcritos no mesocarpo, especialmente no sétimo dia do armazenamento. Resultado semelhante também foi obtido por Crisosto e Seguel (1998) e González-Aguilar et al. (2004), que verificaram incremento na produção de dióxido de carbono e etileno em pêssegos tratados com radiação UV-C. Contrariamente, Stevens et al. (1998) e Maharaj et al. (1999), observaram redução na produção de etileno em tomates submetidos ao tratamento com UV-C em comparação aos frutos controle. Embora essas diferenças tenham sido detectadas, em todos os trabalhos houve o retardo no amadurecimento dos frutos que foi atribuído, em parte, ao elevado nível de poliaminas, especialmente putrescina e espermina, as quais exerceriam efeito fisiológico oposto ao etileno. No entanto, Tassoni et al. (2006), ao analisar tomates tratados com 1-MCP, verificaram que o atraso da maturação está inteiramente associado ao etileno e sem envolvimento de poliaminas, as quais podem apenas prolongar a vida de prateleira no estágio maduro dos frutos antes de iniciar a senescência. Entretanto, é possível que ambos os mecanismos estejam envolvidos, tendo em vista que a S-adenosilmetionina (SAM) é o precursor comum para a síntese de poliaminas e etileno, e as enzimas S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC) e ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintase (*ACC sintase*) são responsáveis pela regulação de ambos os caminhos de biossíntese (MARTIN-TANGUY, 2001). Desse modo, durante a biossíntese de etileno existe uma regulação metabólica, onde diversos fatores podem alterar a transcrição de genes *ACC sintase*, tais como condições de estresse biótico e abiótico, e aplicação de etileno. Além destas condições,

outros hormônios vegetais também podem alterar a expressão de diferentes genes de *ACC sintase* (YANG; HOFFMANN, 1984; TSUCHISAKA; THEOLOGIS, 2004; DUGARDEYN; VAN DER STRAETEN, 2008).

Os tratamentos com 1-MCP e 1-MCP+UV-C resultaram num menor aumento na produção de etileno (Fig. 7), bem como no menor acúmulo de transcritos de *ACC sintase* no epicarpo e mesocarpo (Fig. 5 e 6) quando comparados aos frutos controle. Este resultado, como esperado, confirma o efeito do 1-MCP como inibidor da ação do etileno afetando também a sua produção. De acordo com Blankenship e Dole (2003), o 1-MCP se liga aos receptores de etileno, inibindo dessa forma a ação do hormônio. Com o passar do tempo, novos sítios de ligação são sintetizados, fazendo com que os tecidos recuperem parcialmente a sensibilidade ao etileno. Isso pode explicar o fato da produção de etileno só ter aumentado nos frutos tratados com 1-MCP, após três dias de armazenamento em 20 a 23°C (Apêndice A).

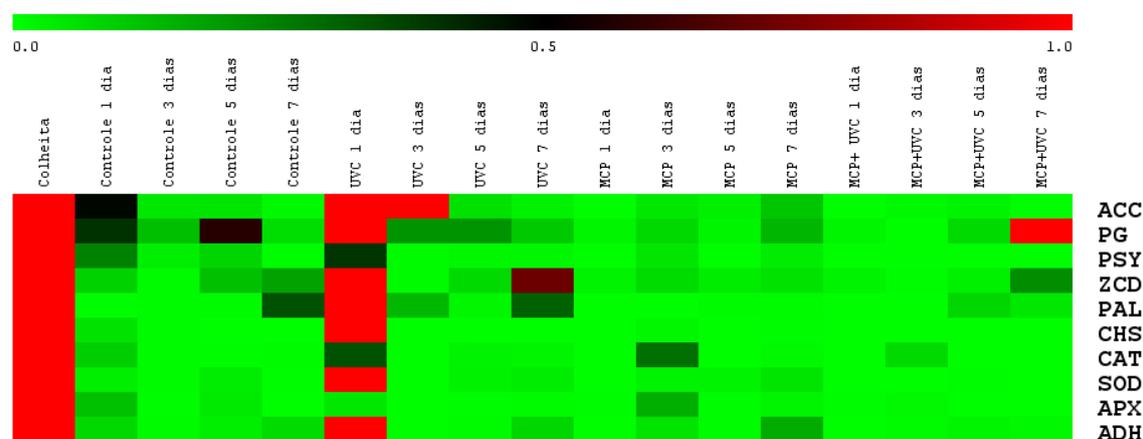


Figura 5. Acúmulo relativo de transcritos de genes da *ACC sintase* (*ACC*), poligalacturonase (*PG*), fitoeno sintase (*PSY*), ζ -caroteno desaturase (*ZCD*), fenilalanina amônia liase (*PAL*), chalcona sintase (*CHS*), catalase (*CAT*), superóxido dismutase (*SOD*), ascorbato peroxidase (*APX*), álcool desidrogenase (*ADH*) no epicarpo de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. O nível de transcritos é apresentado numa escala de 0 a 1. A cor verde à esquerda da escala indica o nível de expressão mínimo (0), a cor preta no centro representa 0.5 vezes o nível de expressão mínima e a cor vermelha representa 1 vez mais do que o mínimo. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.

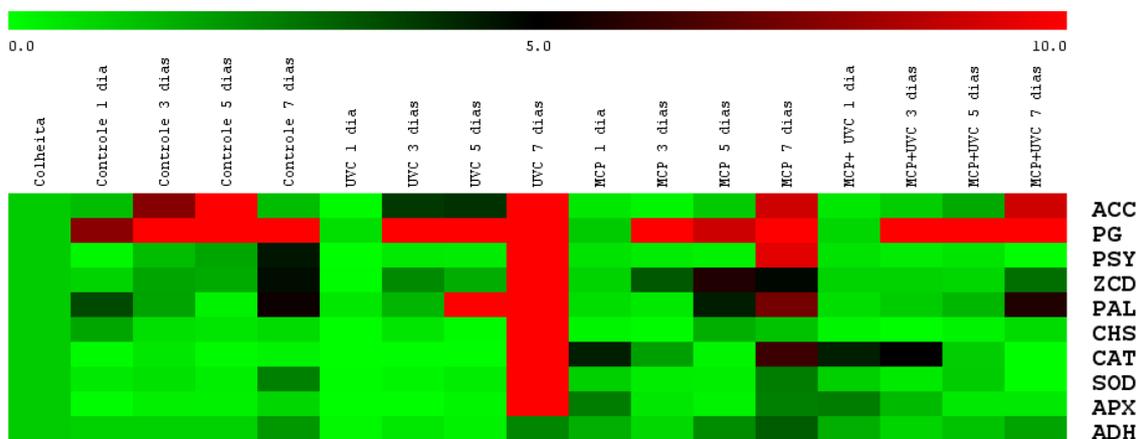


Figura 6. Acúmulo relativo de transcritos de genes da ACC sintase (*ACC*), poligalacturonase (*PG*), fitoeno sintase (*PSY*), ζ -caroteno desaturase (*ZCD*), fenilalanina amônia liase (*PAL*), chalcona sintase (*CHS*), catalase (*CAT*), superóxido dismutase (*SOD*), ascorbato peroxidase (*APX*), álcool desidrogenase (*ADH*) no mesocarpo de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. O nível de transcritos é apresentado numa escala de 0 a 10. A cor verde a esquerda da escala indica o nível de expressão mínimo (0), a cor preta no centro representa 5 vezes o nível de expressão mínima e a cor vermelha representa 10 vezes mais que o mínimo. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.

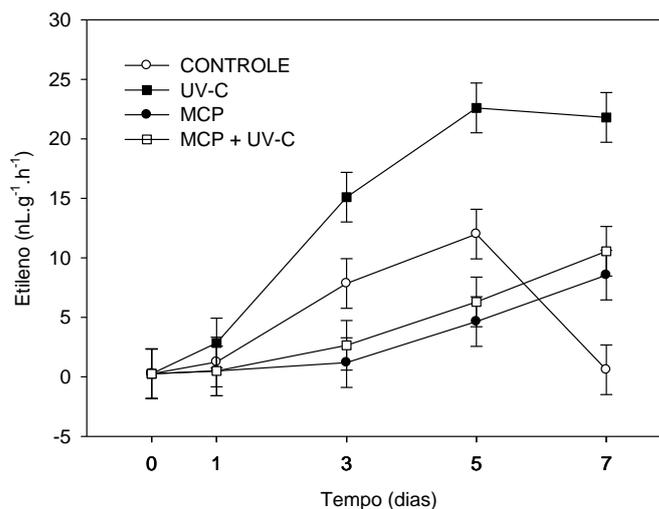


Figura 7. Produção de etileno em tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. Barras verticais indicam o intervalo de confiança a 95%. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.

3.2 Efeito da radiação UV-C no acúmulo de transcritos da PG e na firmeza dos frutos

A firmeza de polpa diminuiu em todos os frutos, mas em menor intensidade nos frutos tratados com 1-MCP (Fig. 8). Isso pode ser explicado pelo fato de que a maioria dos genes que codificam enzimas que promovem a solubilização e despolimerização dos constituintes da parede celular, tais como a poligalacturonase (PG), pectinametilesterase (PME), pectato liase (PL), β -D-galactosidases (β -Gal), são induzidas pelo etileno (BRUMMELL et al., 2004; NISHIYAMA et al., 2007; MIEDES; LORENCES, 2009). Observou-se elevado acúmulo de transcritos de PG em todos os dias do armazenamento, e em todos os tratamentos, sendo que a presença desses transcritos foi maior no mesocarpo (Fig. 6). Contrariamente a esses resultados, Stevens et al. (2004) verificaram que tomates tratados com UV-C se apresentavam mais firmes do que frutos sem tratamento com UV-C, e que isso se devia à redução na atividade da enzima PG em frutos tratados. Do mesmo modo, Barka et al. (2000) observaram diminuição da atividade das enzimas de parede celular, tais como PG, PME e β -D-Gal. Nos frutos do experimento aqui relatado, tratados com 1-MCP ou com 1-MCP+UV-C houve maior manutenção da firmeza quando comparado aos frutos controle e tratados com UV-C (Fig. 8).

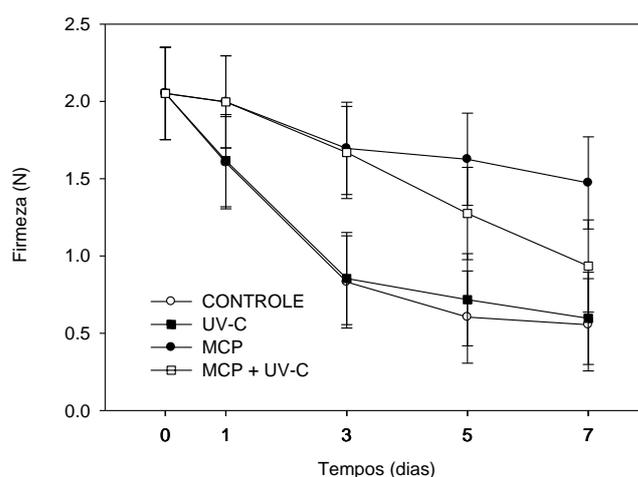


Figura 8. Mudança de firmeza de polpa em tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. Barras verticais indicam o intervalo de confiança a 95%. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.

Esses resultados indicam que o controle da firmeza não se deve à inibição da transcrição do gene da *PG*, tendo em vista que frutos tratados com 1-MCP mantiveram maiores valores de firmeza, e houve acúmulo de transcritos de *PG* (Fig. 6). No entanto, há que se considerar que, não se monitorou a atividade enzimática da *PG* e, em função disso, pode ter havido alguma regulação pós-transcricional. Aliás, as relações entre o acúmulo de transcritos, atividade enzimática da *PG* e perda de firmeza em tomate ainda é assunto controverso. Por exemplo, em plantas transgênicas, nas quais se silenciou um gene de *PG*, praticamente não se detectou a presença dos respectivos mRNAs, tampouco a atividade enzimática, mas houve redução da firmeza (SMITH et al., 1990; LANGLEY et al., 1994). Em outros casos, o silenciamento do gene da *PG* resultou em preservação da firmeza e prolongamento do tempo de armazenamento (KRAMER et al., 1992; SCHUCH et al., 1991).

No presente estudo, o emprego de 1-MCP retardou a diminuição da firmeza de polpa. Esta observação enfatiza a relação entre a firmeza e a produção e ação do etileno nos frutos, indicando que esse é um evento que depende, ao menos em parte, do etileno. Mesmo assim, não houve diferença entre frutos controle e aqueles irradiados com UV-C, esses últimos maiores produtores de etileno (Apêndice A). O que fica evidente é o fato de que a inibição da ação do etileno contribuiu significativamente para a prevenção da firmeza de tomates (Fig. 8). Não apenas em tomate a relação da expressão de *PGs* com a firmeza de polpa é controversa. Por exemplo, Nishiyama et al. (2007) determinaram a função do etileno no amolecimento de melões e suas inter-relações com o etileno. Desse estudo, que englobou a expressão de genes que codificam enzimas relacionadas com a solubilização da parede celular, incluindo as *PGs*, xiloglucanas, endotransglicosilases, expansinas e β -Gal foi observado que há genes específicos de cada família que podem ser classificados como totalmente dependentes de etileno, totalmente independentes ou parcialmente etileno-dependentes.

Neste experimento, ficou evidente que o tratamento com UV-C não se constituiu numa boa alternativa para a preservação da firmeza de polpa em tomates. O fator que afetou positivamente a preservação da firmeza dos frutos foi o 1-MCP, e isso já é amplamente conhecido (JEONG et al., 2002; KLUGE;

JACOMINO, 2002; OPIYO; YING, 2005). A aplicação de UV-C em tomates previamente tratados com 1-MCP compromete a manutenção da firmeza em apenas 3 dias após a aplicação da radiação, período em que também inicia-se a diferenciação da coloração entre os tratamentos (Fig. 9).

3.3 Variação de coloração, teores de carotenóides individuais e expressão transcricional de genes envolvidos com sua biossíntese nos tomates submetidos à radiação UV-C

Como esperado, os tratamentos com 1-MCP retardaram a mudança da coloração e os frutos mantiveram por mais tempo a coloração verde (alto valor do °Hue), o que confirma a ação do 1-MCP no retardo do amadurecimento de frutos (Fig. 9). A mudança de coloração durante a maturação de frutos climatéricos é devida à transição de cloroplastos em cromoplastos, e trata-se de um evento dependente do etileno (KAHLAU; BOCK, 2008; BARSAN et al., 2010). Nessa transição, há a degradação de clorofilas e a síntese de carotenóides, os quais são acumulados nos cromoplastos que são responsáveis pela coloração amarela, laranja e vermelha de muitos frutos (EGEA et al., 2010). Uma imagem representando as diferenças de coloração entre os frutos é apresentada na Fig. 10.

Os frutos que foram submetidos ao tratamento com 1-MCP seguido de radiação UV-C, apresentaram maior evolução de coloração alaranjada quando comparados ao tratamento com 1-MCP, demonstrando que a radiação UV-C pode estimular vias metabólicas clássicas de maturação, promovendo a degradação de clorofilas e síntese de carotenóides, responsáveis pela coloração vermelha característica de tomates maduros. Nos frutos submetidos à radiação UV-C, houve também retardo no desenvolvimento da coloração em relação aos frutos controle, onde se verificou que no decorrer da maturação os valores referentes ao °Hue diminuíram mais rapidamente (Fig. 9).

Desse modo, percebe-se que a radiação UV-C agiu como indutora da alteração da coloração em frutos em que a ação do etileno foi inibida pelo 1-MCP, mas reguladora negativa desse evento em frutos não tratados com o inibidor da ação do etileno (Fig. 9 e 10).

Pelo fato da radiação UV-C estimular a produção de etileno, que é conhecido pela ação de desencadeamento da síntese de licopeno e degradação de clorofila, esperava-se que esse tratamento pudesse estimular essas alterações, porém não foi o que ocorreu. As causas exatas não foram esclarecidas, mas acredita-se que, apesar da radiação UV-C ter estimulado a produção de etileno, possa também ter induzido sistemas antioxidantes retardadores da transição cloroplasto para cromoplasto. Barsan et al. (2010) e Egea et al. (2010) puseram em evidência que essa transição é acompanhada pelo colapso parcial do sistema antioxidante celular, e que quanto mais protegido for esse sistema, menores as alterações de cloroplasto para cromoplasto.

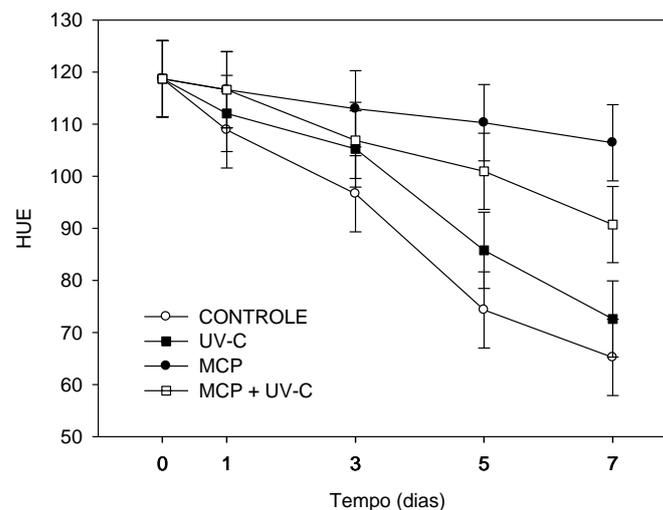


Figura 9. Coloração em tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. Barras verticais indicam o intervalo de confiança a 95%. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.

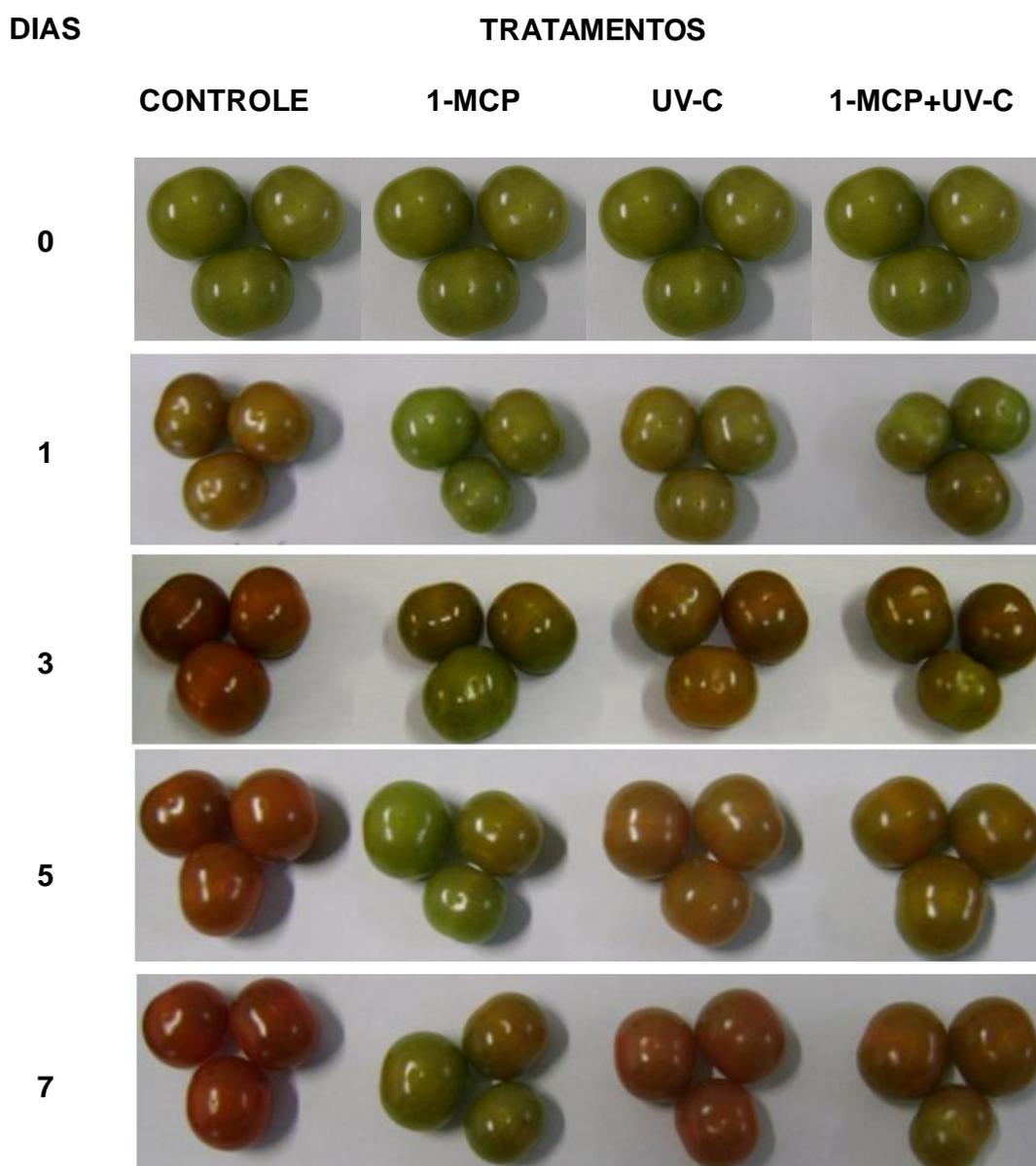


Figura 10. Coloração e aparência geral de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias, após aplicação dos tratamentos: Controle; 1-MCP a 2 ppm; UV-C a $3,7 \text{ kJ m}^{-2}$; 1-MCP + UV-C. Os Algarismos 0, 1, 3, 5 e 7 representam os dias após a instalação do experimento. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.

A avaliação do teor individual de carotenóides revelou que houve incremento no teor de licopeno nos frutos em todos os tratamentos ao longo do armazenamento, chegando a $32 \mu\text{g g}^{-1}$ no epicarpo e $4,4 \mu\text{g g}^{-1}$ no mesocarpo dos frutos não tratados no sétimo dia (Fig. 11A e 12A). Esses teores são

coerentes com os comumente detectados em tomate (NIIZU; RODRIGUEZ-AMAYA, 2005). Tomates tratados com UV-C tiveram um teor de $18 \mu\text{g g}^{-1}$ de licopeno no epicarpo e de $4 \mu\text{g g}^{-1}$ no mesocarpo, no sétimo dia de armazenamento. Embora se tenha uma diferença significativa entre os tratamentos no último dia no epicarpo dos frutos (Apêndice B) deve-se considerar que a radiação UV-C foi capaz de retardar o amadurecimento em aproximadamente dois dias. Desse modo, ao compararem-se os frutos no sétimo dia, está-se comparando frutos com estádios de maturação distintos. Liu et al. (2009) verificaram que o acúmulo de licopeno em tomates não é afetado pelo tratamento com UV-C, ao menos durante os quatro primeiros dias de armazenamento. Porém, entre quatro e 21 dias, o teor de licopeno aumentou nos frutos submetidos à radiação UV-C. Deste modo, seria interessante avaliar os frutos por maior período de tempo, a fim de verificar o comportamento de síntese de carotenóides nesses frutos.

O aumento nos níveis de carotenóides durante o armazenamento dos frutos submetidos ao tratamento com UV-C, especialmente o licopeno, pode ser resultado do acúmulo prévio de transcritos de *PSY* e *ZCD*, que codificam enzimas responsáveis pela síntese de carotenóides (FRASER et al., 2009), que tiveram a expressão transcricional elevada no epicarpo dos frutos no primeiro dia após o tratamento com UV-C e no último dia de armazenamento no mesocarpo (Fig. 5 e 6). Nos frutos não tratados com UV-C foi possível relacionar o aumento dos teores de licopeno no epicarpo dos frutos com a expressão dos genes *PSY* e *ZCD*, mas somente no mesocarpo, onde no último dia houve incremento no teor de licopeno e de β -caroteno, além do acúmulo de mRNAs (Fig. 5 e 6). Durante a maturação dos frutos, os níveis de mRNAs de enzimas que codificam para a produção de licopeno, tais como *PSY* e *PHD* aumentam, enquanto que mRNAs que codificam para enzimas que convertem licopeno em β -caroteno ou α -caroteno, diminuem, como a licopeno β - e ϵ -ciclases (YAHIA;ORNELAS-PAZ, 2010).

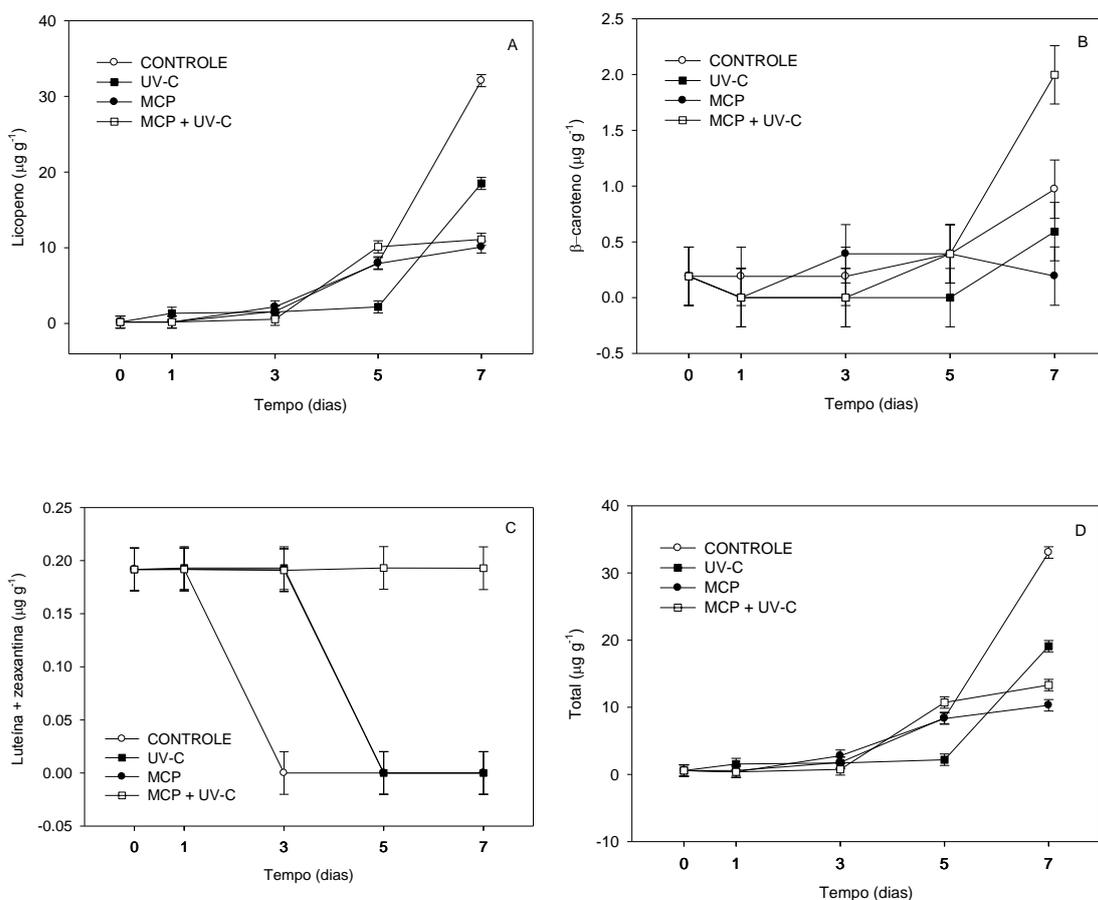


Figura 11. Teor de carotenóides individuais: licopeno (A), β -caroteno (B), luteína+zeaxantina (C) e total (D) no epicarpo de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. Barras verticais indicam o intervalo de confiança a 95%. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.

O teor de β -caroteno foi superior nos frutos submetidos ao tratamento com 1-MCP mais radiação UV-C, tanto no epicarpo quanto no mesocarpo dos frutos (Fig. 11B e 12B), apresentando diferença significativa no sétimo e quinto dias, no epicarpo e mesocarpo dos frutos, respectivamente (Apêndices B e C). Baixos níveis de luteína e zeaxantina foram detectados no epicarpo e mesocarpo dos tomates, no entanto os maiores teores foram encontrados nos frutos submetidos ao tratamento combinado 1-MCP + UV-C (Fig. 11C e 12C). Isso pode explicar a coloração mais alaranjada encontrada nos frutos submetidos a esse tratamento quando comparado aos que foram tratados somente com 1-MCP, pois β -caroteno, zeaxantina e luteína são pigmentos de coloração alaranjada, amarelo-alaranjada e amarelada, respectivamente

(TANAKA et al., 2008). Há que se destacar que os frutos submetidos a esse tratamento se encontravam em estágio de maturação menos avançado do que os frutos sem tratamento e aos tratados somente com UV-C, justificam-se os maiores teores de β -caroteno. No entanto, para complementar esse estudo, sugere-se avaliar o acúmulo de transcritos de todas enzimas responsáveis por essa via biossintética, as quais não foram avaliadas neste trabalho.

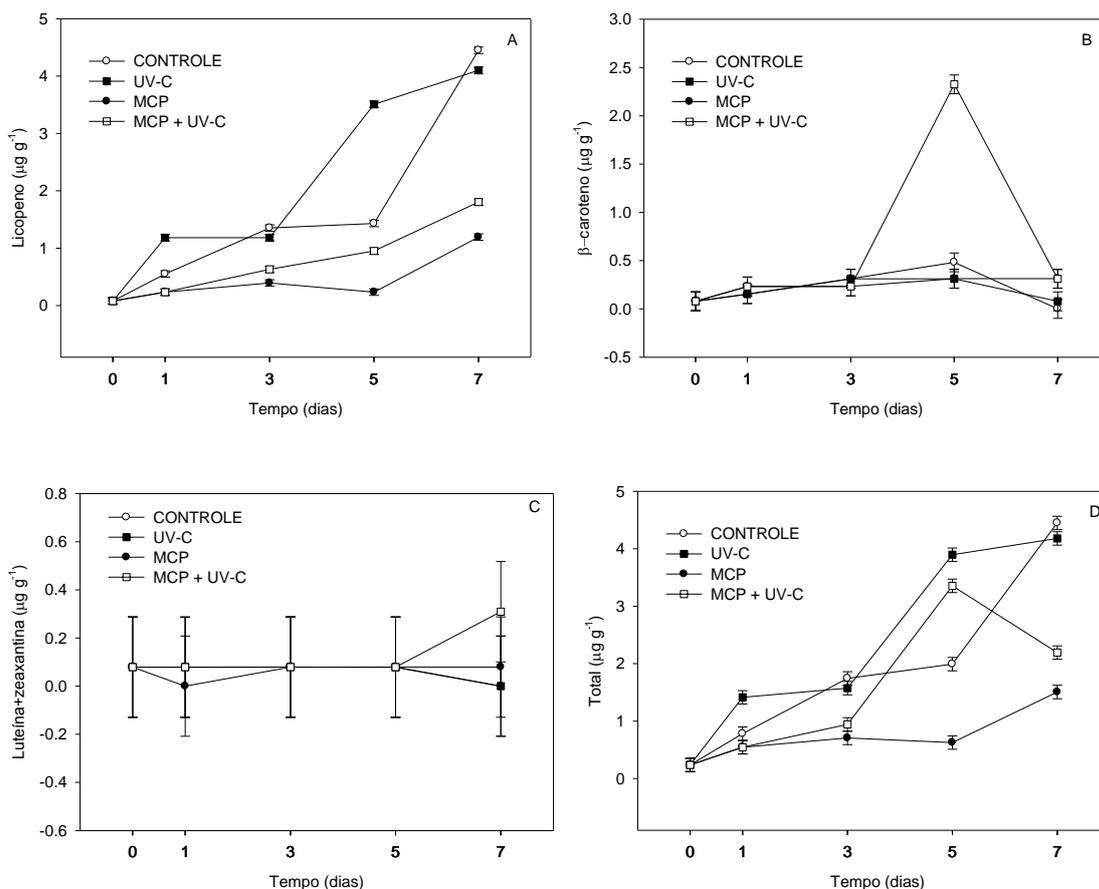


Figura 12. Teor de carotenóides individuais: licopeno (A), β -caroteno (B), luteína+zeaxantina (C) e total (D) no mesocarpo de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. Barras verticais indicam o intervalo de confiança a 95%. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.

O uso de 1-MCP, além de ampliar a conservabilidade e retardar o pico de etileno, diminuiu o acúmulo de licopeno e demais carotenóides analisados, o mesmo também foi observado em tomates cereja por Opiyo e Ying (2005). Rodrigo e Zacarias (2007) verificaram que a aplicação exógena de etileno reproduz e acelera a mudança de coloração e a expressão de genes

relacionados com a via de biossíntese de carotenóides durante a maturação de citros. Esses dados sugerem que a biossíntese e o acúmulo desses pigmentos sejam pelo menos parcialmente dependente de etileno.

A Fig. 13 apresenta o cromatograma típico para a identificação e determinação de carotenóides individuais em tomate cv. Flavortop.

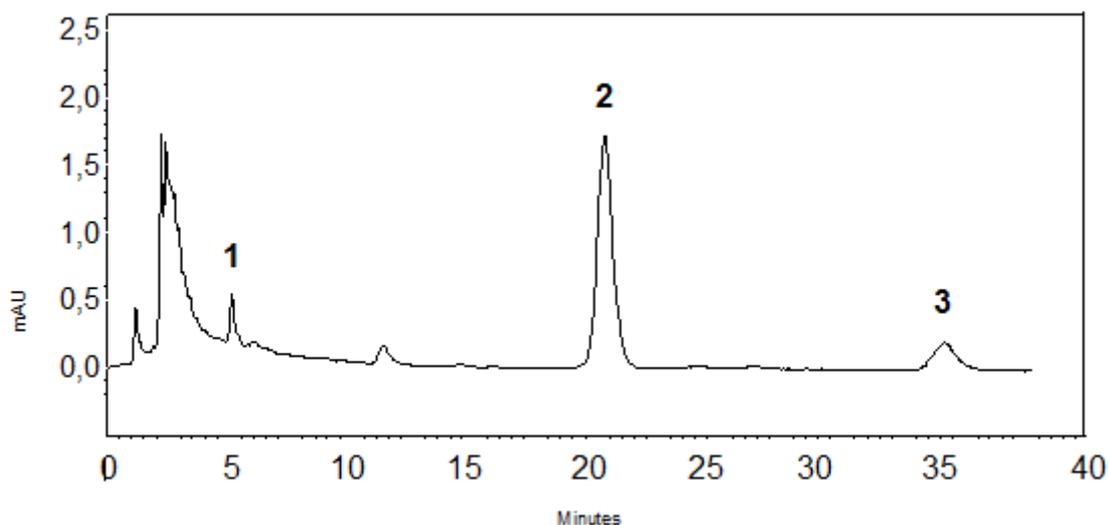


Figura 13. Cromatograma típico da separação de carotenóides via CLAE (1- luteína+zeaxantina; 2-licopeno; 3- β -caroteno) no epicarpo e mesocarpo de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.

3.4 Teores de compostos fenólicos individuais e expressão transcricional de genes envolvidos com sua biossíntese nos tomates submetidos à radiação UV-C

Foi possível identificar e quantificar dois ácidos fenólicos e um flavonóide nos frutos de tomate: o ácido *p*-hidróxibenzóico, o ácido *p*-cumárico e a quercetina, conforme a Fig. 14.

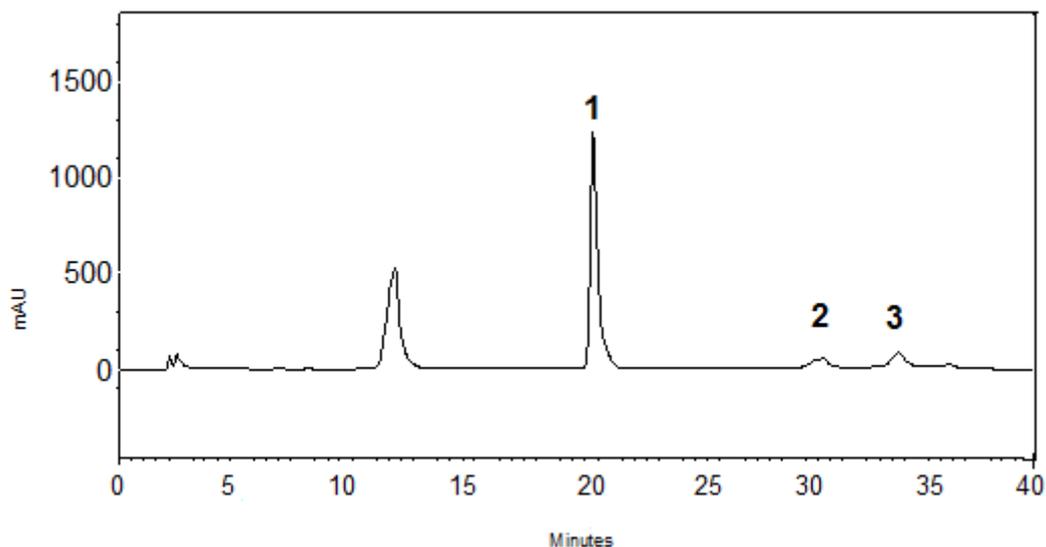


Figura 14. Cromatograma típico da separação de compostos fenólicos via CLAE (1- ácido *p*-hidróxibenzóico; 2- ácido *p*-cumárico; 3- quercetina) no epicarpo e mesocarpo de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.

O *p*-hidróxibenzóico, um composto fenólico simples, isômero do ácido salicílico, foi o ácido fenólico predominante no epicarpo e mesocarpo de tomate cv. Flavortop. De maneira geral, os teores do ácido *p*-hidróxibenzóico aumentaram para todos os tratamentos no epicarpo dos frutos, mas foi mais pronunciado nos frutos submetidos ao tratamento com UV-C no primeiro dia, provavelmente como forma de defesa do fruto, devido ao estresse gerado pela exposição ao UV-C (Fig. 15A). No mesocarpo, o ácido *p*-hidróxibenzóico diminuiu em todos os tratamentos, com exceção dos frutos tratados com 1-MCP (Fig. 16A). O acúmulo de ácido *p*-cumárico foi superior no terceiro dia no epicarpo dos frutos não-tratados e no mesocarpo nos tomates submetidos ao tratamento 1-MCP+UV-C (Fig. 15B e 16B). A quercetina não foi detectada no epicarpo dos frutos até o quinto dia de armazenamento, quando se verificou $16,95 \mu\text{g g}^{-1}$ nos frutos submetidos ao tratamento com 1-MCP mais UV-C (Fig. 15C). No mesocarpo houve incremento no acúmulo de quercetina ao longo do armazenamento e nos frutos tratados com 1-MCP+UV-C também se observou um elevado incremento no acúmulo de quercetina (Fig. 16C). Os apêndices D e

E apresentam os teores dos compostos fenólicos no epicarpo e mesocarpo durante os sete dias de armazenamento.

A percepção de um estresse biótico e/ou abiótico e respectiva transdução em resposta fisiológica inclui diversas vias de sinalização, tais como de hormônios vegetais (etileno) e de produtos do metabolismo primário (H_2O_2) e secundário (especialmente compostos fenólicos). As inter-relações entre os sinais e as respostas podem causar alterações no metabolismo das plantas. Isso pode explicar o fato dos maiores teores de quercetina nos frutos submetidos ao tratamento com 1-MCP+UV-C. Provavelmente a inter-relação entre a radiação UV-C e o hormônio etileno conduziram à síntese desse flavonóide.

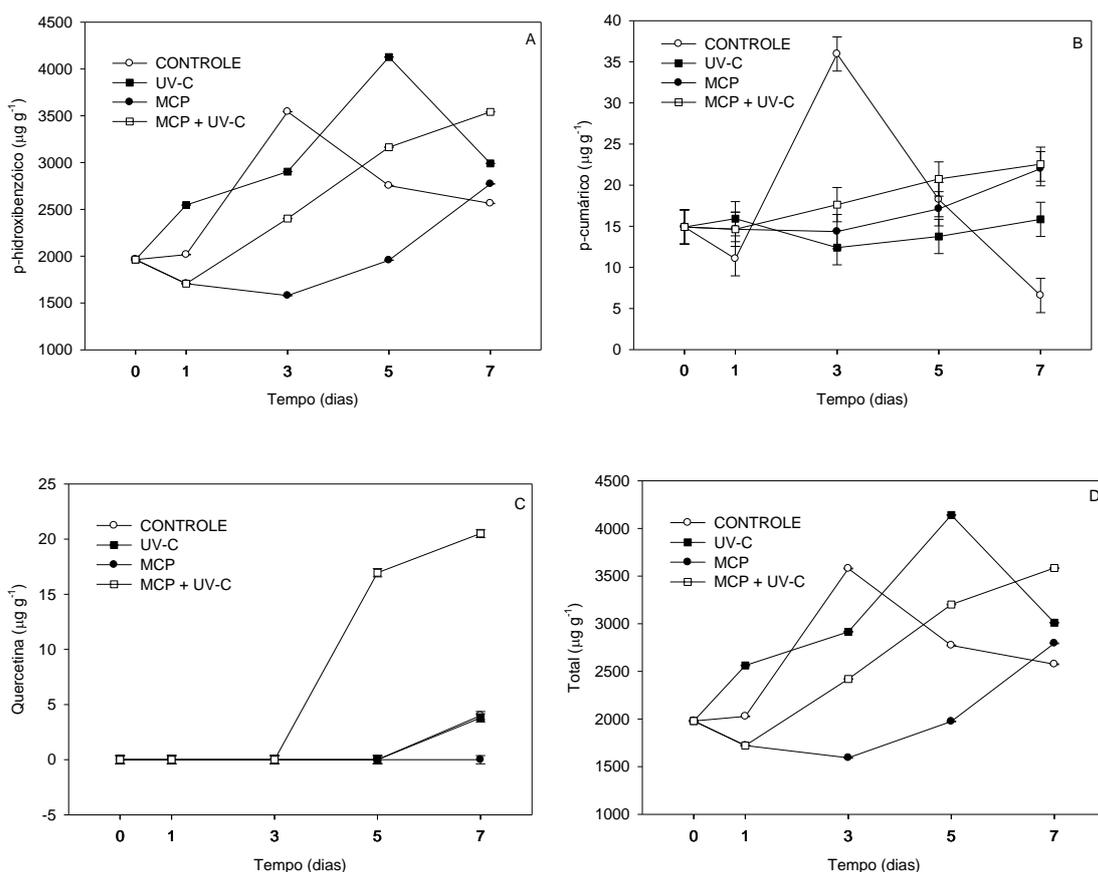


Figura 15. Teor de compostos fenólicos individuais: *p*-hidroxi-benzóico (A), *p*-cumárico (B), quercetina (C) e total (D) no epicarpo de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. Barras verticais indicam o intervalo de confiança a 95%. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.

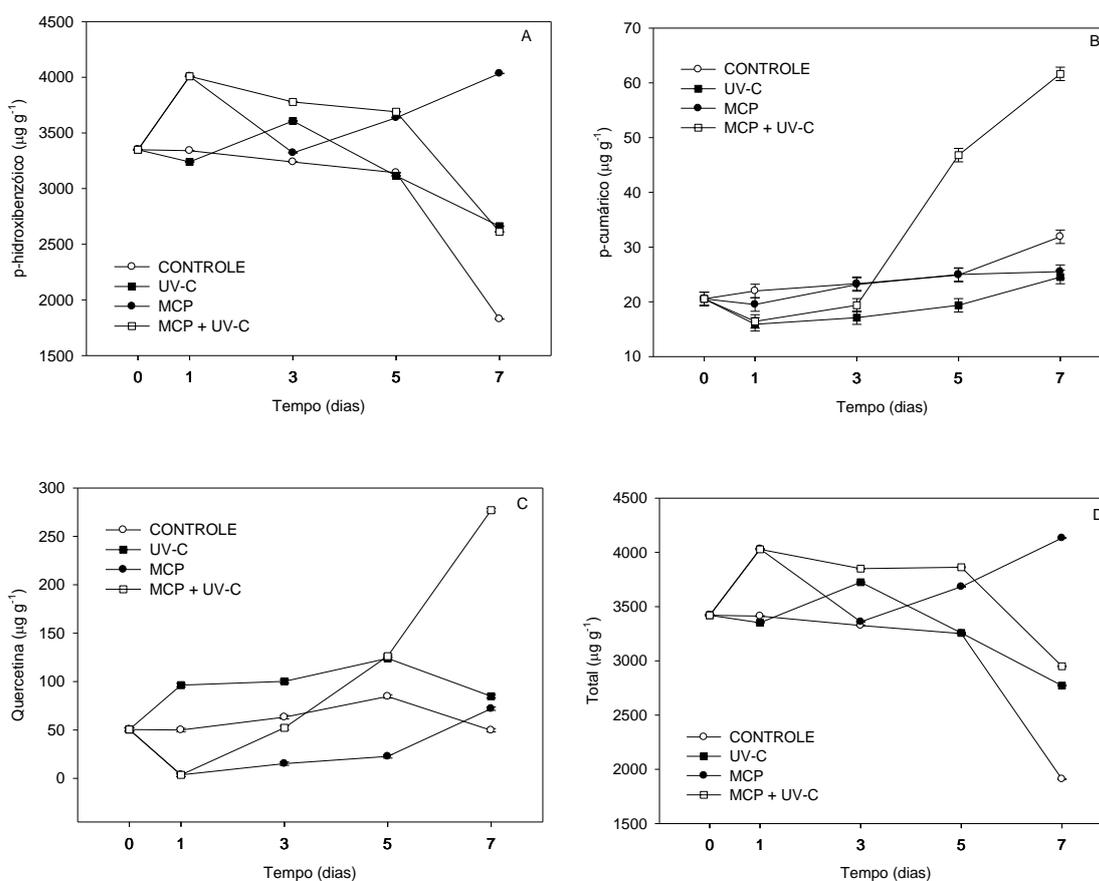


Figura 16. Teor de compostos fenólicos individuais *p*-hidroxibenzóico (A), *p*-cumárico (B), quercetina (C) e total (D) no mesocarpo de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. Barras verticais indicam o intervalo de confiança a 95%. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.

Os genes *PAL* e *CHS*, de enzimas envolvidas na biossíntese de fenilpropanóides (FERRER et al., 2008), apresentaram alto acúmulo de transcritos no primeiro dia em frutos submetidos à radiação UV-C, no epicarpo dos frutos (Fig. 5), o qual acompanhou o aumento do ácido *p*-hidroxibenzóico. No mesocarpo houve incremento da expressão de *PAL* principalmente no sétimo dia e para todos os tratamentos (Fig. 6).

De maneira geral, após a percepção da radiação pelas plantas, há uma transdução de sinal, a fim de ativar vias gênicas, especialmente aquelas ligadas com respostas ao estresse (ULM; NAGY, 2005). De acordo com Nigro et al. (2000), Barka (2001) e El Ghaouth et al. (2003), essa sinalização está relacionada com a indução de enzimas que atuam na eliminação de espécies

reativas de oxigênio (ROS) e de enzimas relacionadas com a biossíntese de fenilpropanóides, como PAL e CHS. Esses autores observaram aumento na atividade da PAL em morangos, tomates e pêssegos tratados com radiação UV-C. Por outro lado, o incremento de transcritos do gene *CHS* pode estar relacionado com o aumento no teor de quercetina ao longo do armazenamento em frutos submetidos ao UV-C. O aumento de expressão do gene *CHS* nos frutos tratados sugere que o UV-C ativa a biossíntese de flavonóides, o que é coerente com o aumento da expressão do gene *PAL*, que atua anteriormente na via de produção dos flavonóides. Como resultado, o acúmulo de compostos fenólicos que participam do sistema de proteção contra os danos causados pela radiação UV-C tem sido demonstrado em vários frutos, tais como manga (GONZÁLEZ-AGUILAR et al. 2007), morango (BAKA et al., 1999; ERKAN et al., 2008) e tomate (CHARLES et al. 2008 a,b).

A especificidade das respostas estimuladas por um determinado comprimento de onda pode ser determinada pela presença de compostos de sinalização ou a combinação de fatores de transcrição disponíveis (FROHNMEYER; STAIGER, 2003). Cominelli et al. (2008) avaliaram a expressão transcricional de genes que regulam a biossíntese de antocianinas em *Arabidopsis thaliana* expostos à radiação UV-A e UV-B, e observaram maior expressão de genes relacionados com a via metabólica de biossíntese quando comparado com controle. Além disso, demonstraram, também, que a radiação induz fortemente a expressão de genes *PAP1* e *PAP2*, ambos da família dos fatores de transcrição MYB, considerado regulador da biossíntese dos fenilpropanóides.

3.5 Teores de tocoferol nos tomates submetidos à radiação UV-C

Entre os tocoferóis, o único identificado nos frutos de tomate foi o δ -tocoferol. Houve incremento no teor ao longo do armazenamento no epicarpo e no mesocarpo dos frutos (Fig. 17A e 17B), sendo que os maiores teores foram verificados no epicarpo dos frutos controle ($14,641 \mu\text{g g}^{-1}$), seguido dos submetidos à radiação UV-C ($9,672 \mu\text{g g}^{-1}$) (Apêndice F). No mesocarpo verificou-se incremento no teor de δ -tocoferol no sétimo dia nos frutos tratados

com radiação UV-C (Apêndice G). Os teores de δ -tocoferol encontrados nos frutos de tomate podem ser considerados altos quando comparados com outros frutos (CHUN et al., 2006).

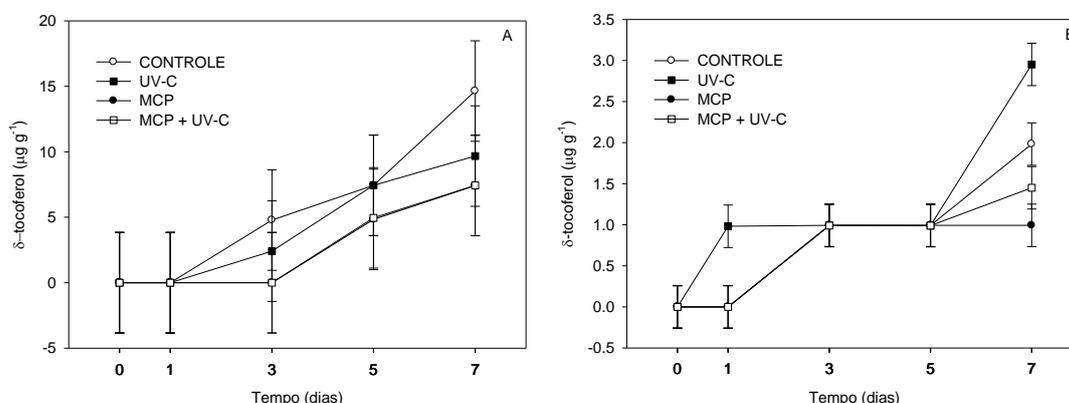


Figura 17. Teor de δ -tocoferol no epicarpo (A) e mesocarpo (B) de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. Barras verticais indicam o intervalo de confiança a 95%. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.

O grupo da vitamina E é constituído por um complexo de vitaminas lipossolúveis, que compreende alfa (α), beta (β), gama (γ) e delta (δ)-tocoferóis, além de α , β , γ e δ -tocotrienóis, cuja função é inibir ou retardar a oxidação, principalmente dos ácidos graxos insaturados e da vitamina A (RUPÉREZ et al., 2001). Os elevados teores de δ -tocoferol encontrados principalmente no epicarpo dos frutos podem estar relacionados com o seu papel como barreira de oxidação nas fases lipofílicas do tomate.

3.6 Acúmulo de transcritos codificadores de enzimas antioxidantes submetidos à radiação UV-C

Não houve incremento no acúmulo de transcritos de genes que codificam para as enzimas antioxidantes CAT, SOD e APX nos frutos não-tratados (Fig. 5 e 6). Quando se aplicou radiação UV-C se verificou que, após 24h do tratamento, ocorreu maior acúmulo de transcritos dos genes CAT e SOD no epicarpo dos frutos (Fig. 5). No mesocarpo, o maior acúmulo de mRNAs de genes que codificam para enzimas antioxidantes ocorreu no sétimo dia após o tratamento (Fig. 6). Esse incremento no nível de transcritos para os

genes putativos das enzimas antioxidantes estudadas pode ser resultado do mecanismo de defesa do fruto, a fim de proteger as células e compartimentos sub-celulares dos efeitos citotóxicos das espécies reativas de oxigênio (ROS) formadas após a aplicação do estresse abiótico (FOYER et al., 1994). Barka (2001) verificou que a radiação UV-C na dose de $3,7 \text{ kJ m}^{-2}$ em frutos de tomate, aumentou a atividade da guaiacol peroxidase e ascorbato peroxidase, enquanto que a atividade da catalase permaneceu inalterada. Erkan et al. (2008) observaram também aumento na atividade de enzimas antioxidantes em morangos tratados com diferentes dosagens de radiação UV-C.

Para os tratamentos com 1-MCP não houve elevação nos teores de transcritos no epicarpo dos frutos (Fig. 5). Já no mesocarpo, *CAT* apresentou pequeno incremento de acúmulo de mRNAs no primeiro e último dias de armazenamento no tratamento com 1-MCP, bem como no primeiro e terceiro dias em frutos submetidos ao tratamento com 1-MCP mais UV-C, provavelmente também em resposta ao efeito estressor da radiação UV-C (Fig. 6).

3.7 Expressão transcricional do gene *ADH* nos tomates submetidos à radiação UV-C

Incremento no acúmulo de transcritos para o gene putativo de *ADH* foi verificado somente no primeiro dia e no epicarpo dos frutos tratados com radiação UV-C (Fig. 5). O aumento da expressão desse gene era esperado, já que a intensidade aromática dos frutos tende a aumentar com o decorrer da maturação. A enzima ADH atua na redução de aldeídos em alcoóis, originados de aminoácidos e ácidos graxos (SPEIRS et al., 1998; ZHU et al., 2005). Speirs et al. (2002) observaram uma correlação entre o incremento na atividade enzimática da ADH, em seis variedades de tomate ao longo da maturação, e a perda de firmeza dos frutos. Embora tenha se observado o amolecimento dos frutos e altos níveis de transcritos do gene da *PG*, não se verificou incremento no acúmulo de mRNAs para *ADH*.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

De maneira geral, observou-se diminuição no nível de transcritos no epicarpo dos frutos em todos os tratamentos em relação à colheita, com exceção dos frutos tratados com UV-C no primeiro dia, onde se verificou um incremento no acúmulo de mRNAs para os genes estudados. Isto provavelmente pode estar relacionado com o estresse gerado pela radiação UV-C, que tem baixo poder de penetração. No entanto, nos frutos que foram submetidos ao tratamento com 1-MCP seguido de radiação UV-C, esse comportamento não foi observado, o que indica que o etileno está fortemente relacionado com a expressão relativa dos genes estudados. No mesocarpo dos frutos, o maior acúmulo de transcritos ocorreu também nos frutos submetidos ao tratamento com UV-C, mas no sétimo dia de armazenamento. Desse modo, percebe-se que a radiação UV-C age mais superficialmente e acarreta inicialmente maior expressão no epicarpo e, na sequência, no mesocarpo. É possível que peróxidos gerados pela ação da radiação UV-C sejam sinalizadores para que a expressão gerada no mesocarpo seja ativada. Essa hipótese resta ser testada.

Neste estudo, observou-se que a aplicação de UV-C não constitui-se numa boa alternativa para a preservação da firmeza de polpa, mas contribuiu para o retardamento das alterações de coloração, embora haja estímulo à produção de etileno.

Como o etileno é conhecido como o hormônio do amadurecimento, previa-se que com o incremento de sua produção, a síntese de carotenóides, que são os pigmentos que conferem a coloração em frutos de tomate, também tivesse sido estimulada. Contrariamente, verificou-se um atraso no desenvolvimento da coloração, o qual foi, provavelmente, induzido como resultado do estresse imposto pela dose de UV-C, o qual promoveu uma regulação negativa nessa via metabólica no fruto. Nos frutos submetidos ao tratamento 1-MCP+UV-C se observou coloração mais alaranjada quando se comparou somente com os tratados com 1-MCP, indicando, nesse caso, que a radiação UV-C pode ter estimulado a síntese de novos receptores capazes de estimular a síntese de carotenóides pelo aumento da sensibilidade ao etileno.

Os resultados gerados nesse trabalho demonstram que os tratamentos pós-colheita com UV-C constituem-se em alternativa tecnológica limitada para o aumento da vida de prateleira de tomates tendo em vista que atrasa a mudança de coloração de verde para vermelho, mas não afeta a firmeza de polpa. Mas, o foco do projeto está centrado na geração de conhecimento científico relacionado com a compreensão de como é percebido esse sinal e como se dá a regulação gênica decorrente do tratamento. Desse modo verificou-se que a radiação UV-C, apesar de aumentar a produção de etileno, contribuiu para retardar parcialmente a maturação. As respostas foram mais pronunciadas nas alterações de coloração do que na firmeza de polpa. Acredita-se que após a indução de genes precocemente expressos (genes primários de resposta ao tratamento com UV-C), haja uma cascata de sinalização, provavelmente envolvendo peróxidos e fatores de transcrição responsivos ao etileno (ERFs), induzindo genes das vias metabólicas mais estudadas do ponto de vista molecular, bioquímico e fisiológico, como é o caso da síntese de compostos fenólicos, carotenóides, ácido ascórbico e poliaminas. Supõe-se, também, que pelo menos em parte, os genes tardiamente expressos exerçam funções relacionadas com o metabolismo secundário. Nesse contexto, como ações para a continuidade desse trabalho, propõe-se:

- a) Estudar a expressão transcricional de ERFs sob a ação da radiação UV-C;
- b) Correlacionar a variação de expressão de ERFs com as alterações bioquímico-fisiológicas;
- c) Realizar estudo holístico de expressão diferencial gênica, no patamar transcricional, a partir da definição de um estágio no qual for detectada a indução de ERFs.
- d) Ampliar o número de genes a serem estudados, incluindo outros envolvidos na síntese de carotenóides, compostos fenólicos, tocoferóis, alcalóides, defesa celular, sinalização; e
- e) Realizar estudo da atividade enzimática das principais enzimas envolvidas nas rotas metabólicas estudadas.

5 REFERÊNCIAS

ABLE, A. J.; LUNG, S. W.; PRASAD, A.; O'HARE, T. J. 1-MCP is more effective on a floral brassica (*Brassica oleracea* var. *italica* L.) than a leafy brassica (*Brassica rapa* var. *chinensis*). **Postharvest Biology and Technology**, v. 26, p. 147-155, 2002.

ADAMS-PHILLIPS, L.; BARRY, C.; GIOVANNONI, J. Signal transduction systems regulation fruit ripening. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 331-338, 2004.

ALEXANDER, L.; GRIERSON, D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 2039-2055, 2002.

ALOTHMAN, M.; BHAT, R.; KARIM, A. A. UV radiation-induced changes of antioxidant capacity of fresh-cut tropical fruits. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, p. 512-516, 2009.

BAKA, M., MERCIER, J., CORCUFF, F., CASTAIGNE, F., ARUL, J. Photochemical treatment to improve storability of fresh strawberries. **Journal of Food Science**, v. 64, p. 1068-1072, 1999.

BAPAT, V. A.; TRIVEDI, P. K.; GHOSH, A.; SANE, V. A.; GANAPATHI, T. R.; NATH, P. Ripening of fleshy fruit: Molecular insight and the role of ethylene. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 94-107, 2010.

BARKA, E. A.; KALANTARI, S.; AKHLOUF, J.; ARUL, J. Impact of UV-C irradiation on the cell wall-degrading enzymes on ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 667-671, 2000.

BARKA, E. A. Protective enzymes against reactive oxygen species during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits in response to low amounts of UV-C. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 785-791, 2001.

BARSAN, C.; SANCHEZ-BEL, P.; ROMBALDI, C.; EGEEA, I.; ROSSIGNOL, M.; KUNTZ, M.; ZOUINE, M.; LATCHÉ, A.; BOUZAYEN, M.; PECH, J. C. Characteristics of the tomato chromoplast revealed by proteomic analysis. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 2413-2431, 2010.

BLANKENSHIP, S.; DOLE, J. M. 1-Methycyclopropene: a review. **Postharvest Biology and Technology**, v. 28, p. 1-25, 2003.

BLEECKER, A. B.; KENDE, H. Ethylene: A Gaseous Signal Molecule in Plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 16, p. 1-18, 2000.

BRAMLEY, P.; TEULIERES, C.; BLAIN, I.; BIRD, C.; SCHUCH, W. Biochemical characterization of transgenic tomato plants in which carotenoid synthesis has been inhibited through the expression of antisense RNA to pTOM5. **The Plant Journal**, v. 2, p. 343-349, 1992.

BRAMLEY, P. M. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 2107-2113, 2002.

BREUSEGEM, F. V.; VRANOVÁ, E.; DAT, J. F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, p. 405-414, 2001.

BRUMMELL, D. A.; CIN, V. D.; CRISOSTO, C. H.; LABAVITCH, J. M. Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 2029-2039, 2004.

CAMPOS, A. J.; VIEITES, R. L. Ultravioleta (UV-C) na conservação da qualidade de tomate 'Pitenza'. **Revista Eletrônica de Agronomia**, v.16, p. 20-26, 2009.

CANENE-ADAMS, K.; CAMPBELL, J. K.; ZARIPHEH, S.; JEFFERY, E. H.; ERDMAN, J. W. Jr. The Tomato as a Functional Food. **The Journal of Nutrition**, v. 135, p. 1226-1230, 2005.

CARA, B.; GIOVANNONI, J. J. Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. **Plant Science**, v. 175, p. 106-113, 2008.

CHARLES, M. T.; MERCIER, J.; MAKHLOUF, J.; ARUL, J. Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit I. Role of pre- and post-challenge accumulation of the phytoalexin-rishitin. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47 p. 10-20, 2008a.

CHARLES, M. T.; BENHAMOU, N.; ARUL, J. Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit III. Ultrastructural modifications and their impact on fungal colonization. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47 p. 27-40, 2008b.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2 ed. Lavras: UFLA, 2005. 783p.

CHUN, J.; LEE, J.; YE, L.; EXLER, J.; EITENMILLER, R.R. Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 196-204, 2006.

CLIFF, M.; LOK, S.; LU, C.; TOIVONEN, P. M. A. Effect of 1-methylcyclopropene on the sensory, visual, and analytical quality of greenhouse tomatoes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 53, p. 11-15, 2009.

COMINELLI, E.; GUSMAROLI, G.; ALLEGRA, D.; GALBIATI, M.; WADE, H. K.; JENKINS, G. I.; TONELLI, C. Expression analysis of anthocyanin regulatory genes in response to different light qualities in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 886-894, 2008.

COSTA, L.; ARIEL, V. R.; CIVELLO, P., M.; CHAVES, A. R.; MARTÍNEZ, G. A. UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets. **Postharvest Biology and Technology**, v. 39, p. 204-210, 2006.

CRISOSTO, C. H.; SEGUEL, X. Comparing pulsated ultraviolet light and postharvest fungicide for peach fruit decay control. **Acta Horticulture**, v. 465, p. 471-477, 1998.

D'AMOUR, J.; GOSSELIN, C.; ARUL, J.; CASTAIGNE, F.; WILLEMOT, C. Gamma irradiation affects cell wall composition of strawberries. **Journal of Food Science**, v. 58, p. 182-185, 1993.

DUMAS, Y.; DADOMO, M.; DI LUCCA, G.; GROLIER, P. Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 369-382, 2003.

DUGARDEYN, J.; VAN DER STRAETEN, D. Ethylene: Fine-tuning plant growth and development by stimulation and inhibition of elongation. **Plant Science**, v. 175, p. 59-70, 2008.

EGEA, I.; BARSAN, C.; BIAN, W.; PURGATTO, E.; LATCHÉ, A.; CHERVIN, C.; BOUZAYEN, M.; PECH, J. C. Chromoplast Differentiation: current status and perspectives. **Plant Cell Physiology**, v. 51, p. 1601-1611, 2010.

EL GHAOUTH, A. E.; WILSON, C. L.; CALLAHAN, A. M. Induction of chitinase, B-1,3-glucanase, and phenylalanine ammonia lyase in peach fruit by UV-C treatment. **Biological Control**, v. 93, p. 349-355, 2003.

ERKAN, M.; WANG, S. Y.; WANG, C. Y. Effect of UV treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme and decay in strawberries fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, p. 163-171, 2008.

FEHR, M.; ROMÃO, D. C. Measurement of fruit and vegetable losses in Brazil – A case study. **Environment, Development and Sustainability**, v.3, p. 253-263, 2001.

FERRER, J. L.; AUSTIN, M. B.; STEWART, C. Jr.; NOEL, P. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 356-370, 2008.

FOYER, C.; LEIANDAI, M.; KUNERT, K. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 92, p. 696-717, 1994.

FRASER, P. D.; ENFISSI, E.; M. A.; BRAMLEY, P. M. Genetic engineering of carotenoid formation in tomato fruit and the potential application of systems and synthetic biology approaches. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 483, p. 196-204, 2009.

FRASER, P. D.; TRUESDALE, M. R.; BIRD, C. R.; SCHUCH, W.; BRAMLEY, P. M. Carotenoid Biosynthesis during Tomato Fruit Development - Evidence for Tissue-Specific Gene Expression. **Plant Physiology**, v. 105, p. 405-413, 1994.

FROHNMEYER, H.; STAIGER, D. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. **Plant Physiology**, v.133, p. 1420-1428, 2003.

GIOVANNONI, J. J. Genetic Regulation of fruit development and ripening. **The Plant Cell**, v. 16, p. 170-180, 2004.

GIOVANNUCCI, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene and cancer: a review of the epidemiological literature. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, p. 317-331, 1999.

GIRARDI, C. L.; CORRENT, A. R.; LUCCHETTA, L.; ZANUZO, M. R.; DA COSTA, T. S.; BRACKMANN, A.; TWYMAN, R. M.; NORA, F. R.; NORA, L.; SILVA, J. A.; ROMBALDI, C. V. Effect of ethylene, intermittent warming and controlled atmosphere on postharvest quality and the occurrence of woolliness in peach (*Prunus persica* cv. Chiripa) during cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 38, p. 25-33, 2005.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; WANG, C. Y.; BUTA, J. G. UV-C irradiation reduces breakdown and chilling injury of peaches during cold storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 415-422, 2004.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; VILLEGAS-OCHOA, M. A.; MARTÍNEZ-TÉLEZ, M. A.; GARDEA, A. A.; AYALA-ZAVALA, J. F. Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C. **Journal of Food Science**, v. 72, p. 197-202, 2007.

HÄKKINEN, S. H.; KÄRENLAMPI, S. O.; HEINONEN, M.; MYKKÄNEN, H. M.; TÖRRÖNEN, A. R. HPLC Method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 77, p. 543-551, 1998.

HEMMATY, S.; MOALLEMI, N.; NASERI, L. Shelf-life and quality of apple fruits in response to postharvest application of UV-C radiation. **Journal of Applied Horticulture**, v. 8, n. 2, p. 114-116, 2006.

HERTOG, M. L. A. T. M.; NICHOLSON, S. E.; BANKS, N. H. The effect of modified atmospheres on the rate of firmness change in "Braeburn" apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 23, p. 175-184, 2001.

INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p. 153-158, 1995.

JEONG, J.; HUBER, D. J.; SARGENT, S. A. Influence of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on ripening and cell-wall matrix polysaccharides of avocado (*Persea americana*) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 25, p. 241-256, 2002.

KAHLAU, S.; BOCK, R. Plastid transcriptomics and translomics of tomato fruit development and chloroplast-to-chromoplast differentiation: chromoplast gene expression largely serves the production of a single protein. **The Plant Cell**, v. 20, p. 856-874, 2008.

KLUGE, R. A.; JACOMINO, A. P. Shelf life of peaches treated with 1-methylcyclopropene. **Scientia Agricola**, v. 59, p. 69-72, 2002.

KRAMER, M.; SANDERS, R.; BOLKAN, H.; WATERS, C.; SHEENY, R. E.; HIATT, W. R. Postharvest evaluation of transgenic tomatoes with reduced levels of polygalacturonase: processing, firmness and disease resistance. **Postharvest Biology and Technology**, v. 1, p. 241-255, 1992.

KRAMER, M. G.; REDENBAUGH, K. Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene: The FLAVR SARV™ tomato story. **Euphytica**, v. 79, p. 293-297, 1994.

KRUMBEIN, A.; PETERS P.; BRÜCKNER, B. Flavour compounds and a quantitative descriptive analysis of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) of different cultivars in short-term storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 32, p. 15-28, 2004.

LANGLEY, K. R.; MARTIN, A.; STENNING, R.; MURRAY, A. J.; HOBSON, G. E.; SCHUCH, W. W.; BIRD, C. R. Mechanical and optical assessment of the ripening of tomato fruit with reduced polygalacturonase activity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 66, p. 547-554, 1994.

LEVERENTZ, B.; CONWAY, W. S.; JANISIEWICZ, W. J.; SAFTNER, R. A.; CAMP, M. J.. Effect of combining MCP treatment, heat treatment, and biocontrol on the reduction of postharvest decay of 'Golden Delicious' apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 27, p. 221-233, 2003.

LIN, Z.; ZHONG, S.; GRIERSON, D. Recent advances in ethylene research. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 1-26, 2009.

LIU, L. H.; ZABARAS, D.; BENNETT, L. E.; AGUAS, P.; WOONTON, B. W. Effects of UV-C, red light and sun light on the carotenoid content and physical qualities of tomatoes during post-harvest storage. **Food Chemistry**, v. 115, p. 495-500, 2009.

MAHARAJ, R.; ARUL, J.; NADEAU, P. Effect of photochemical treatment in the preservation of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Capello) by delaying senescence. **Postharvest Biology and Technology**, v. 15, p. 13-23, 1999.

MANN, J. **Secondary metabolism**. 2 ed. New York: Oxford University Press, 1987. 374 p.

MARQUENIE, D. MICHAELS, C. W.; GEERAERD, A. H.; SCHENK, A.; SOONTJENS, C.; VAN IMPE, J. F.; NICOLAI, B. M. Using survival analysis to investigate the effect of UVC and heat treatment on storage rot of strawberry and sweet cherry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 187-196, 2002.

MARTIN-TANGUY, J. Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). **Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 135-148, 2001.

MERCIER, J.; ARUL, J.; JULIEN, C. Effect of UV-C on phytoalexin accumulation and resistance to *Botrytis cinerea* in stored carrots. **Journal of Phytopathology**, v. 139, p. 17-25, 1993.

MERCIER, J.; KÚC, J. Elicitation of 6-methoxymellein in carrot leaves by *Cercospora carotae*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 73, p. 60-62, 1997.

MIEDES, E.; LORENCES, E. P. Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases (XTHs) during tomato fruit growth and ripening. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 489-498, 2009.

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

NAIKA, S.; JEUDE, J. V. L.; GOFFAU, M.; HILMI, M.; VAN DAM, B. **A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização**. 1 ed. Wageningen: Fundação Agromisa e CTA, 2006. 104p.

NIGRO, F.; IPPOLITO, A.; LATTANZIO, V.; VENERE, D. D.; SALERNO, M. Effect of ultraviolet-C light on postharvest decay of strawberry. **Journal of Plant Pathology**, v.82, p. 29-37, 2000.

NIIZU, P. Y.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. New data on the carotenoid composition of raw salad vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis** v. 18, p. 739-749, 2005.

NISHIYAMA, K.; GUI, M.; ROSE, J. K. C.; KUBO, Y.; BENNETT, K. A.; WANGJIN, L.; KATO, K.; USHIJIMA, K.; NAKANO, R.; INABA, A.; BOUZAYEN, M.; PECH, J. C.; BENNETT, A. B. Ethylene regulation of fruit

softening and cell wall disassembly in Charentais melon. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 1281-1290, 2007.

NUÑES, M. C. N.; BRECHT, J. K.; MORAIS, A. M. M. B.; SARGENT, S. A. Physical and chemical quality characteristics of strawberries after storage are reduced by a short delay to cooling. **Postharvest Biology and Technology**, v. 6, p. 17-28, 1995.

ODRIOZOLA-SERRANO, I.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Effect of minimal processing on bioactive compounds and color attributes of fresh-cut tomatoes. **LWT- Food Science and Technology**, v. 41, p. 217-226, 2008.

OPIYO A. M.; YING, T. J. The effects of 1-methylcyclopropene treatment on the shelf life and quality of cherry tomato (*Lycopersicon esculentum* var. cerasiforme) fruit. **Journal of Food Science and Technology**, v. 40, p. 665-673, 2005.

PFÄFFL, M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2002-2007, 2001.

PRAKASH, A.; MANLEY, J.; DECOSTA, S.; CAPORASO, F.; FOLEY, D. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 63, p. 387-390, 2002.

PRASANNA, V.; PRABHA, T. N.; THARANATHAN, R. N. Fruit Ripening Phenomena – An Overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, p. 1-19, 2007.

ROCA, M. G. G. **Valorização do tomate comercial: Extração de licopeno por CO₂ supercrítico a partir de repiso de tomate**. 2009. 80f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) – Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

RODRIGO, M.; ZACARIAS, L. Effect of postharvest ethylene treatment on carotenoid accumulation and the expression of carotenoid biosynthetic genes in the flavedo of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 43, p. 14-22, 2007.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington: ILSI Press, 2001. 64p.

RUPÉREZ, F.J.; MARTÍN, D.; HERRERA, E. ; BARBAS, C. Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 935, p. 45-69, 2001.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide: statistics**, version 9.1. Cary: SAS Institute, 2002.

SCHUCH, W.; KANCZLER, J.; ROBERTSON, D.; HOBSON, G.; TUCKER, G.; GRIERSON, D.; BRIGHT, S.; BIRD, C. Fruit quality characteristics of transgenic tomato fruit with altered polygalacturonase activity. **HortScience**, v. 26, p. 1517-1520, 1991.

SMITH, C. J. S.; WATSON, C. F.; MORRIS, P. C.; BIRD, C. R.; SEYMOUR, G. B.; GRAY, J. E.; ARNOLD, C.; TUCKER, G. A.; SCHUCH, W.; HARDING, S. Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. **Plant Molecular Biology**, v. 14, p. 369-379, 1990.

STEINMETZ, K. A.; POTTER, J. D. Vegetables, fruit, and cancer prevention: A review. **Journal of American Dietetic Association**, v. 96, p. 1027-1039, 1996.

SPEIRS, J.; LEE, E.; HOLT, K.; KIM, Y. D.; SCOTT, N. S.; LOVEYS, B.; SCHUCH, W. Genetic manipulation of alcohol dehydrogenase levels in ripening tomato fruit affects the balance of some flavor aldehydes and alcohols. **Plant Physiology**, v. 117, p. 1047-1058, 1998.

SPEIRS, J.; CORRELL, R.; CAIN, P. Relationship between ADH activity, ripeness and softness in six tomato cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 93, p. 137-142, 2002.

STEVENS, C.; LIU, J.; KHAN, V. A.; LU, J. Y.; WILSON, C. L.; IGWEGBE, E. C. K.; KABWE, M. K.; CHALUTZ, E.; DROBY, S. Application of hormetic UV-C for delayed ripening and reduction of *Rhizopus* soft rot in tomatoes: the effect of tomatine on storage rot development. **Journal Phytopathology**, v. 146, p. 211-221, 1998.

STEVENS, C.; LIU, J.; KHAN, V.A.; LU, J.Y.; KABWE, M.K.; WILSON, C.L.; IGWEGBE, E.C.K.; CHALUTZ, E.; DROBY, S. The effects of low-dose ultraviolet light-C treatment on polygalacturonase activity, delay ripening and *Rhizopus* soft rot development of tomatoes. **Crop Protection**, v. 23, p. 551-554, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3° ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 312-333p.

TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **The Plant Journal**, v. 54, p. 733-749, 2008.

TASSONI, A.; WATKINS, C. B.; DAVIES, P. J. Inhibition of the ethylene response by 1-MCP in tomato suggest that polyamines are not involved in delaying ripening, but may moderate the rate of ripening or over-ripening. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 3313-3325, 2006.

TSUCHISAKA, A.; THEOLOGIS, A. Unique and overlapping expression patterns among the *Arabidopsis* 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. **Plant Physiology**, v.136, p. 2982-3000, 2004.

ULM, R.; NAGY, F. Signaling and gene regulation in response to ultraviolet light. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p.477-482, 2005.

VAN'T VERR, P.; JANSEN, M. C. J. F.; KLERK, M.; KOK, F. J. Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular disease. **Public Health Nutrition**, v. 3, p. 103-107, 1999.

VICENTE, A. R.; REPICE, B.; MARTINEZ, G. A.; CHAVES, A. R.; CIVELLO, P. M.; SOZZI, G. O. Maintenance of fresh boysenberry fruit quality with UV-C light and heat treatments combined with low storage temperature. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 79, p. 246-251, 2004.

VICENTE, A. R.; PINEDA, C.; LEMOINE, L.; CIVELLO, P. M.; MARTINEZ, G. A.; CHAVES, A. R. UV-C treatments reduce decay, retain quality and alleviate chilling injury in pepper. **Postharvest Biology and Technology**, v. 35, p. 69-78, 2005.

VILELA, N. J.; LANA, M. M.; MAKISHIMA, N. O peso da perda de alimentos para a sociedade: o caso das hortaliças. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 141-143, 2003.

YAHIA, E. M.; ORNELAS-PAZ, J. J. Chemistry, stability, and biological actions of carotenoids. In: **Fruit and vegetable phytochemicals – Chemistry, nutritional value and stability**, 1 ed. Ames: Editorial Office, 2010. 367p.

YILMAZ, E. The chemistry of fresh tomato flavor. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 25, p. 149-155, 2001.

YANG, S.F.; HOFFMAN, N. E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annual review of Plant physiology**, v. 35, p. 155-189, 1984.

WEISSHAAR, B.; JENKINS, G. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 1, p. 251-257, 1998.

ZAMBIAZI, R. C. **The role of endogenous lipid components on vegetable oil stability.** Foods and Nutritional Sciences Interdepartmental Program. University of Manitoba Winnipeg, Manitoba, Canada. 1997. 304 p.

ZEGZOUTI, H.; JONES, B.; FRASSE, P.; MARTY, C.; MAITRE, B.; LATCHÉ, A.; PECH, J. C.; BOUZAYEN, M. Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene-responsive and ripening-related genes isolated by differential display. **Plant Journal**, v. 18, p. 589-600, 1999.

ZHU, H. L.; ZHU, B. Z.; FU, D. Q.; XIE, Y. H.; HAO, Y. L.; LUO, Y. B. Role of ethylene in the biosynthetic pathways of aroma volatiles in ripening fruit. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 52, p. 691-695, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Efeito da radiação UV-C e do 1-MCP na produção de etileno, na firmeza, e coloração em tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias em 20 a 23°C. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.

Tratamentos	Tempos de amostragem (dias)				
	0	1	3	5	7
Etileno (nL.g ⁻¹ .h ⁻¹)					
Controle	0,26 a ^{1/}	1,25 b	7,85 b	12,00 b	0,60 c
UV-C	0,26 a	2,85 a	15,10 a	22,60 a	21,80 a
MCP	0,26 a	0,50 c	1,20 c	4,65 c	8,55 b
MCP+UV-C	0,26 a	0,50 c	2,65 c	6,30 c	10,55 b
Firmeza (N)					
Controle	2,05 a	1,60 a	0,83 b	0,60 c	0,56 c
UV-C	2,05 a	1,62 a	0,85 b	0,72 c	0,60 c
MCP	2,05 a	2,00 a	1,70 a	1,62 a	1,47 a
MCP+UV-C	2,05 a	2,00 a	1,67 a	1,27 b	0,93 b
Hue°					
Controle	118,72 a	108,91 b	96,64 b	74,33 d	65,22 d
UV-C	118,72 a	112,06 ab	105,26 ab	85,79 c	72,59 c
MCP	118,72 a	116,62 a	112,97 a	110,29 a	106,44 a
MCP+UV-C	118,72 a	116,62 a	106,89 ab	100,95 b	90,72 b

^{1/} Médias seguidas pela mesma letra na coluna (dias) não diferem entre si pelo teste de Duncan (p≤0,05).

APÊNDICE B - Teor de carotenóides individuais no epicarpo de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.

Tratamentos	Tempos de amostragem (dias)				
	0	1	3	5	7
Licopeno ($\mu\text{g g}^{-1}$)					
Controle	0,192 a ^{1/}	0,193 b	1,597 b	8,02 b	32,07 a
UV-C	0,192 a	1,352 a	1,518 b	2,19 c	18,49 b
MCP	0,192 a	0,192 b	2,199 a	7,92 b	10,10 d
MCP+UV-C	0,192 a	0,192 b	0,559 c	10,12 a	11,11 c
β-caroteno ($\mu\text{g g}^{-1}$)					
Controle	0,192 a	0,191 a	0,191 b	0,392 a	0,972 b
UV-C	0,192 a	ND *	ND	ND	0,592 bc
MCP	0,192 a	ND	0,393 a	0,393 a	0,193 c
MCP+UV-C	0,192 a	ND	ND	0,392 a	1,997 a
Luteína + zeaxantina ($\mu\text{g g}^{-1}$)					
Controle	0,192 a	0,192 a	ND	ND	ND
UV-C	0,192 a	0,193 a	0,193 a	ND	ND
MCP	0,192 a	0,192 a	0,191 a	ND	ND
MCP+UV-C	0,192 a	0,192 a	0,191 a	0,193 a	0,193 a
Total ($\mu\text{g g}^{-1}$)					
Controle	0,576 a	0,576 b	1,788 b	8,412 b	33,04 a
UV-C	0,576 a	1,545 a	1,711 b	2,190 c	19,08 b
MCP	0,576 a	0,384 c	2,783 a	8,313 b	10,29 d
MCP+UV-C	0,576 a	0,384 c	0,750 c	10,705 a	13,30 c

^{1/} Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *ND: não detectado.

APÊNDICE C - Teor de carotenóides individuais no mesocarpo de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.

Tratamentos	Tempos de amostragem (dias)				
	0	1	3	5	7
Lycopeno ($\mu\text{g g}^{-1}$)					
Controle	0,079 a ^{1/}	0,550 b	1,352 a	1,430 b	4,449 a
UV-C	0,079 a	1,182 a	1,183 b	3,506 a	4,100 a
MCP	0,079 a	0,233 c	0,393 d	0,233 d	1,193 c
MCP+UV-C	0,079 a	0,233 c	0,631 c	0,950 c	1,803 b
β -caroteno ($\mu\text{g g}^{-1}$)					
Controle	0,079 a	0,152 b	0,313 a	0,482 b	ND
UV-C	0,079 a	0,153 b	0,312 a	0,311 c	0,079 b
MCP	0,079 a	0,233 a	0,233 b	0,313 c	0,313 a
MCP+UV-C	0,079 a	0,233 a	0,232 b	2,325 a	0,311 a
Luteína + zeaxantina ($\mu\text{g g}^{-1}$)					
Controle	0,079 a	0,078 a	0,079 a	0,079 a	ND
UV-C	0,079 a	0,079 a	0,079 a	0,079 a	ND
MCP	0,079 a	ND	0,079 a	0,079 a	0,079 b
MCP+UV-C	0,079 a	0,079 a	0,079 a	0,079 a	0,309 a
Total ($\mu\text{g g}^{-1}$)					
Controle	0,237 a	0,780 b	1,744 a	1,991 c	4,449 a
UV-C	0,237 a	1,414 a	1,574 b	3,896 a	4,179 b
MCP	0,237 a	0,545 c	0,705 d	0,625 d	1,506 d
MCP+UV-C	0,237 a	0,545 c	0,942 c	3,354 b	2,192 c

^{1/} Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *ND: não detectado.

APÊNDICE D - Teor de compostos fenólicos individuais no epicarpo de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.

Tratamentos	Tempos de amostragem (dias)				
	0	1	3	5	7
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico ($\mu\text{g g}^{-1}$)					
Controle	1964 a ^{1/}	2017 b	3544 a	2754 c	2564 d
UV-C	1964 a	2546 a	2903 b	4127 a	2991 b
MCP	1964 a	1707 c	1579 d	1957 d	2772 c
MCP+UV-C	1964 a	1707 c	2403 c	3164 b	3541 a
Ácido <i>p</i> -cumárico ($\mu\text{g g}^{-1}$)					
Controle	14,91 a	11,04 c	35,95 a	18,25 ab	6,58 c
UV-C	14,91 a	15,93 a	12,40 d	13,76 c	15,84 b
MCP	14,91 a	14,64 b	14,36 c	17,12 b	22,00 a
MCP+UV-C	14,91 a	14,64 b	17,63 b	20,75 a	22,55 a
Quercetina ($\mu\text{g g}^{-1}$)					
Controle	ND *	ND	ND	ND	3,99 b
UV-C	ND	ND	ND	ND	3,79 b
MCP	ND	ND	ND	ND	ND
MCP+UV-C	ND	ND	ND	16,95 a	20,51 a
Total ($\mu\text{g g}^{-1}$)					
Controle	1979 a	2028 b	3580 a	2772 c	2574 d
UV-C	1979 a	2562 a	2916 b	4141 a	3011 b
MCP	1979 a	1722 c	1593 d	1974 d	2794 c
MCP+UV-C	1979 a	1722 c	2420 c	3202 b	3584 a

^{1/} Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *ND: não detectado.

APÊNDICE E - Teor de compostos fenólicos individuais no mesocarpo de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.

Tratamentos	Tempos de amostragem (dias)				
	0	1	3	5	7
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico ($\mu\text{g g}^{-1}$)					
Controle	3349 a ^{1/}	3340 b	3239 d	3142 b	1828 c
UV-C	3349 a	3239 c	3607 b	3115 b	2662 b
MCP	3349 a	4008 a	3321 c	3636 a	4034 a
MCP+UV-C	3349 a	4008 a	3778 a	3690 a	2611 b
Ácido <i>p</i> -cumárico ($\mu\text{g g}^{-1}$)					
Controle	20,55 a	21,98 a	23,32 a	24,88 b	31,88 b
UV-C	20,55 a	15,90 c	17,11 c	19,37 c	24,52 c
MCP	20,55 a	19,51 b	23,15 a	24,99 b	25,52 c
MCP+UV-C	20,55 a	16,42 c	19,37 b	46,79 a	61,63 a
Quercetina ($\mu\text{g g}^{-1}$)					
Controle	50,52 a	49,98 b	63,27 b	84,65 c	49,71 d
UV-C	50,52 a	96,31 a	100,24 a	124,02 b	84,84 b
MCP	50,52 a	3,60 c	15,21 d	22,69 d	72,03 c
MCP+UV-C	50,52 a	3,60 c	52,25 c	126,27 a	277,06 a
Total ($\mu\text{g g}^{-1}$)					
Controle	3420 a	3412 b	3326 c	3251 c	1910 d
UV-C	3420 a	3351 c	3724 b	3258 c	2771 c
MCP	3420 a	4031 a	3359 c	3684 b	4131 a
MCP+UV-C	3420 a	4028 a	3850 a	3863 a	2949 b

^{1/} Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *ND: não detectado.

APÊNDICE F - Teor de δ -tocoferol no epicarpo de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.

Tratamentos	Tempos de amostragem (dias)				
	0	1	3	5	7
	δ -tocoferol ($\mu\text{g g}^{-1}$)				
Controle	ND *	ND	4,781 a	7,437 a	14,641 a
UV-C	ND	ND	2,412 b	7,438 a	9,672 ab
MCP	ND	ND	ND	4,833 a	7,421 b
MCP+UV-C	ND	ND	ND	4,954 a	7,431 b

^{1/} Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *ND: não detectado.

APÊNDICE G - Teor de δ -tocoferol no mesocarpo de tomates cv. Flavortop armazenados pelo período de sete dias após os tratamentos. FAEM/UFPel, Pelotas, 2010.

Tratamentos	Tempos de amostragem (dias)				
	0	1	3	5	7
	δ -tocoferol ($\mu\text{g g}^{-1}$)				
Controle	ND *	ND	0,991 a	0,992 a	1,982 b
UV-C	ND	0,982 a	0,993 a	0,990 a	2,952 a
MCP	ND	ND	0,993 a	0,993 a	0,993 c
MCP+UV-C	ND	ND	0,990 a	0,990 a	1,450 c

^{1/} Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *ND: não detectado.