

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



Dissertação

**Acúmulo de compostos funcionais e ácido abscísico durante o
crescimento e desenvolvimento de frutos de butiazeiro (*Butia odorata*)
(Barb.Rodr.) Noblick & Lorenzi**

Jessica Paula Aparecida Costa Fonseca

Pelotas, 2021.

Jessica Paula Aparecida Costa Fonseca

Acúmulo de compostos funcionais e ácido abscísico durante o crescimento e o desenvolvimento de frutos de butiazeiro (*Butia odorata*) (Barb.Rodr.) Noblick & Lorenzi

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

Comitê de orientação: Prof^a Vanessa Galli; Prof. Cesar Valmor Rombal

Pelotas, 2021.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F677a Fonseca, Jessica Paula Aparecida Costa

Acúmulo de compostos funcionais e ácido abscísico durante o crescimento e o desenvolvimento de frutos de butiazeiro (*Butia odorata*) (Barb.Rodr.) Noblick & Lorenzi / Jessica Paula Aparecida Costa Fonseca ; Vanessa Galli, orientadora ; Cesar Valmor Rombaldi, coorientador. — Pelotas, 2021.

91 f. : il.

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

1. Metabolismo especializado. 2. HPLC-MS/MS. 3. Maturação. 4. Frutos nativos. I. Galli, Vanessa, orient. II. Rombaldi, Cesar Valmor, coorient. III. Título.

CDD : 664

Jessica Paula Aparecida Costa Fonseca

Acúmulo de compostos funcionais e ácido abscísico durante o crescimento e o desenvolvimento de frutos de butiazeiro (*Butia odorata*) (Barb.Rodr.) Noblick & Lorenzi

Data da Defesa: 26 de agosto de 2021.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi.

Doutor em Biologia Molecular

Ensat-Toulouse-France.

Prof. Dra. Vanessa Galli.

Doutora em Biologia Celular e Molecular

Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dra. Jessica Fernanda Hoffmann

Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Universidade Federal de Pelotas.

Dra. Helen Cristina dos Santos Hackbart

Doutora em Química e Doutora em Engenharia de Alimentos

Universidade Federal de Pelotas.

Dedico essa dissertação- e tudo que eu fizer
para os responsáveis por tudo que sou,
meus amados pais.

Agradecimentos

Nesses dois anos e meio de mestrado, de muito estudo, esforço e desafios, gostaria de agradecer algumas pessoas que foram fundamentais para realização deste sonho. Primeiramente o agradecimento mais importante, agradeço a Deus, a Nossa Senhora e a Jesus Cristo, por estarem sempre ao meu lado, me iluminando, abençoando e guiando cada passo meu. Obrigada pela fé e força, para enfrentar cada obstáculo que surgiu nesse caminho. Obrigada por me abençoarem com tantos presentes divinos, que talvez nem fosse digna de merecer. Obrigada por tudo de bom que tenho e sou. Agradeço a todos os santos e anjos, que sempre estão intercedendo e olhando por mim. Sem a intercessão divina nada disso seria possível. Agradeço aos meus pais Doroty e Eliseu; as minhas irmãs Larissa, Fabiana e Tatiane, pela compreensão, ao privá-los da minha companhia e atenção em muitos momentos importantes, e pelo grande apoio, me estimulando nos momentos mais difíceis. Obrigada por sempre desejarem o melhor pra mim, pelo esforço que fizeram para que eu pudesse superar cada desafio para chegar até esse momento, e pelo imenso amor que sempre demonstraram por mim. A essa família tão amada, sou eternamente grata por tudo que sou, por tudo que consegui conquistar e pela alegria que tenho. Minha gratidão especial ao Dr. Cesar Valmor Rombaldi e a Dra. Vanessa Galli, meus orientadores, pela pessoa e profissionais excelentes que vocês são. Obrigada pela dedicação, que fez, por muitas vezes, deixarem de lado momentos de descanso para me ajudar e orientar. Sem a orientação, apoio e confiança de vocês, não só neste trabalho, mas em todo caminho percorrido para chegarmos até aqui seria possível. Um obrigada especial, as minhas amigas e amigos que realmente considero como irmãs/irmãos, Adelina, Carol, Dalvana, Paolo e Maicon, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e torcendo por mim, independente da distância entre nós. As colegas de laboratório, Lauren, Uli, Paula e Giovana e as colegas que fizeram parte desse projeto de estudo (Rosane, Tatiane), e a todos aqueles envolvidos nos projetos da linha de frutas do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA-UFPel), cujo os esforços e auxílio tornaram possível a realização deste projeto. Um agradecimento especial, aos colegas que se tornaram amigos além do laboratório, Bruna, Pedro, Miguel e Vicente, com quem pude compartilhar,

problemas aflições e muito trabalho, e também muitas descobertas e conquistas durante esta caminhada e que não mediram esforços para me ajudar, mesmo sendo fim de semana ou pandemia. Sem vocês muita coisa não seria possível, obrigada por compartilharem conhecimentos importantes comigo, e me ensinarem coisas importantes, e estarem sempre ao meu lado, prontos para ajudar. Obrigada pela amizade e atenção, sou imensamente grata a vocês. Agradeço ao Movimento dos Focolares e a Chiara Lubich por todo ideal doado ao movimento, por me ajudarem a me manter no caminho e superar os momentos com Jesus Abandonado, obrigada a todos os irmãos e irmãs de ideal que fiz dentro do movimento Alen, Raquel, Lyl, Carlor, Vitor, Carol, Barbara, Lazaro, Ani, Simone, Belén, Eli, Gero, Franco e Diego e todos Focolarinos (as) e Voluntários (as) e demais membros do movimento. Obrigada por me acolherem, e estarem sempre ali para dar o suporte necessário e mostrar que Deus sempre está cuidando de tudo. Agradeço também a Dra. Jessica Fernanda Hoffmann e a Dra. Helen Cristina dos Santos Hackbart, mesas da banca de Mestrado, por aceitarem tão prontamente o convite para contribuir e enriquecer este trabalho. Por fim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para realização deste sonho.

“Nada do que é feito por amor é pequeno”

Chiara Lubich

Resumo

Fonseca, Jessica Paula Aparecida Costa. **Acúmulo de compostos funcionais e ácido abscísico durante o crescimento e o desenvolvimento de frutos de butiazeiro (*Butia odorata*) (Barb.Rodr.) Noblick & Lorenzi, 2021. 98p.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

O Butiá encontra-se entre os frutos de espécie nativa encontrados na América do Sul (Argentina, Brasil e Uruguai), pertencendo a família das Aracaceae. Esses frutos, são ricos com compostos resultantes do metabolismo especializado das plantas. Porém, os mecanismos envolvidos no acúmulo destes compostos ainda não foram elucidados. Dessa forma, o objetivo inicial do estudo foi descrever como se dá a síntese e o acúmulo de carotenoides durante o crescimento e o desenvolvimento de frutos de butiás, e sua provável relação com a síntese de ácido abscísico (ABA) e a abscisão dos frutos. Entretanto durante a execução do projeto, viu-se a necessidade de realizar adaptações à proposta original. O objetivo desse trabalho foi então caracterizar três eventos relevantes durante o crescimento e desenvolvimento de butiás: as alterações nos compostos fenólicos, no ácido L-ascórbico (AsA) e no ABA e seus derivados, em frutos colhidos de três diferentes acessos e cinco estádios de crescimento e desenvolvimento. Com os resultados obtidos, foi possível observar as mudanças fenotípicas que ocorreram durante o crescimento e desenvolvimento dos frutos, incluindo cor, massa, diâmetro e altura. Foram identificados 13 compostos fenólicos, sendo que a maioria apresenta redução na concentração ao longo dos estádios avaliados; apenas cinco (ácido siringico, ácido ferrulico, hesperetina, pinocembrina e metilsiringina,) apresentaram o comportamento oposto. Por outro lado, os picos de concentração de AsA foram observados em estádios intermediários e no último estágio avaliado. Além do AsA, dois outros ácidos foram detectados nos frutos de butiá: ácido málico e ácido cítrico, sendo o primeiro de maior concentração nestes frutos. O ABA parece ser um fitohormônio importante na maturação destes frutos, visto que sua concentração foi detectada nos estádios intermediários, atingindo o pico nos estádios de completa maturação e abscisão dos frutos. Embora estas alterações tenham se diferido entre os acessos, de acordo com a análise de componentes principais, a maior parte das alterações (69%) é explicada pelos estádios de crescimento desenvolvimento dos frutos. O estudo contribuiu para se ter um prévio conhecimento dos eventos que envolvem o processo de crescimento e desenvolvimento dos frutos, através da perspectiva de mudanças na concentração de alguns compostos do metabolismo especializado. Entretanto, se faz necessário o estudo de novas rotas metabólicas, bem como estudos genéticos direcionados.

Palavra-chave: metabolismo especializado, HPLC-MS/MS, maturação; frutos nativos.

Abstract

Fonseca, Jessica Paula Aparecida Costa. **Accumulation of functional compounds and abscisic acid during the growth and maturation of fruits of *Butia odorata* (Barb.Rodr.) Noblick & Lorenzi, 2021.** Dissertation (Masters in Food Science and Technology) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Butiá is among the native fruits species found in South America (Argentina, Brazil and Uruguay), belonging to the Aracaceae family. These fruits are rich with compounds resulting from the specialized metabolism of plants. However, the mechanisms involved in the accumulation of these compounds have not yet been elucidated. Thus, the initial objective of the study was to describe how the synthesis and accumulation of carotenoids occurs during the growth and development of butiá fruits, and its likely relationship with abscisic acid (ABA) synthesis and fruit abscission. However, during the execution of the project, it was necessary to make adjustments to the original proposal. The objective of this work was then to characterize three relevant events during the growth and development of butiás: changes in phenolic compounds, L-ascorbic acid (AsA) and ABA and its derivatives in fruits harvested from three different genotypes and five growth and development stages. With the results obtained, it was possible to observe the phenotypic changes that occurred during the growth and development of the fruits, including color, mass, diameter and height. Thirteen phenolic compounds were identified, most of which showed a reduction in concentration throughout the evaluated stages; only five (syringic acid, ferulic acid, hesperetin, pinocembrin and methylsyringin) showed the opposite behavior. On the other hand, AsA concentration peaks were observed in intermediate stages and in the last stage evaluated. In addition to AsA, two other acids were detected in butiá fruits: malic acid and citric acid, the first with the highest concentration in these fruits. ABA seems to be an important phytohormone in the maturation of these fruits, since its concentration was detected in the intermediate stages, reaching its peak in the stages of complete maturation and abscission of the fruits. Although these changes differed among accessions, according to the principal component analysis, most changes (69%) are explained by the development and maturation stages of the fruits. The study contributed to having a previous knowledge of the events that involve the process of growth and maturation of the fruits, through the perspective of changes in the concentration of some compounds of specialized metabolism. However, it is necessary to study new metabolic routes, as well as targeted genetic studies.

Keyword: specialized metabolism, HPLC-MS/MS, maturation; native fruits.

Lista de Abreviaturas e Siglas

Ácido abscísico – ABA

Ácido faseico - PA

Ácido dehidrofaseico - DPA

Ácido abscísico glicosil-éster - ABA-GE

Ácido L-ascórbico – AsA

Detector de arranjo diodo – DAD

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês: *HighPerformance Liquid Chromatography*)– HPLC

Espectrometria de massas (do inglês: *mass spectrometry*) - MS

Análise de Variância – ANOVA

Via citoplasmática do mevalonato - MVA

Sumário

1. Introdução.....	14
2. Referências bibliográficas.....	18
2.1. Butiá	18
2.2. Carotenoides	22
2.3. Ácido Abscísico	25
2.4. Compostos Fenólicos	28
3. Projeto de pesquisa.....	30
4. Relatório de Trabalho de Campo	43
5. Artigo	56
6. Considerações finais	84
7. Referencial teórico.....	85
8. Anexos.....	91

1. Introdução

A denominação butiá normalmente remete aos frutos produzidos por palmeiras de *Butia spp*, popularmente conhecidas como butiazeiros. Até o presente, foram identificadas 19 espécies (HEIDEN et al, 2020), as quais 18 delas, são encontradas no território brasileiro. Dessas 18 espécies, 8 são encontradas no estado do Rio Grande do Sul. Dentre essas 8 espécies, a *Butia odorata* (Barb.Rodr) Noblick & Lorenzi ocorre naturalmente no Bioma do Pampa, e seus frutos são utilizados na produção de sucos, licores, geleias e sorvetes, e suas folhas são, geralmente, utilizadas para produção de artesanatos (CRUZ et al., 2017; DOS SANTOS CRUXEN et al., 2017a; HOFFMANN, Jessica F. et al., 2014). Os frutos dos butiazeiros, deste ponto em diante denominados de butiás, apresentam uma coloração que varia entre o amarelado e o avermelhado, com polpa frequentemente fibrosa, com sabor ácido e aroma intenso (BESKOW et al., 2015). De modo geral, a polpa dos butiás tem pH próximo a 3,0, teor de sólidos solúveis que varia entre 5 e 15%, baixos teores de proteínas (< 3%), lipídeos (< 2%) e cinzas (<1%) (HOFFMANN et al., 2017a).

Os butiás são ricos em compostos conhecidos como resultantes do metabolismo secundário, também denominado de especializado, ou ainda compostos fitoquímicos. Os ácidos fenólicos e flavonoides são os que apresentam maiores focos de estudo. De modo geral, a polpa dos butiás da espécie *B. odorata* se diferencia das demais espécies, por apresentar, sempre, em sua composição, catequina, epicatequina e rutina (CRUZ et al., 2017; DOS SANTOS CRUXEN et al., 2017b)

Como consequência dos estudos relacionados à composição fitoquímica foi possível evidenciar propriedades nutricionais e funcionais dos butiás (antioxidantes, antiproliferativas e antimicrobianas), gerando perspectivas de interesse para alimentação, assim como propor potenciais usos tecnológicos (DOS SANTOS CRUXEN et al., 2017b; XU, 2019). MAIA et al. (2017) verificaram que um extrato de butiá (*B. odorata* Barb. Rodr.) proporcionou inibição de crescimento de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella typhimurium* em queijos; enquanto DOS SANTOS

CRUXEN *et al.* (2017) otimizaram a produção de sorvete de polpa de butiá com propriedade probiótica. Desse modo, se percebe que os butiás são frutos com potencial para produção de alimentos.

Como citado anteriormente, os butiás são ricos em compostos fenólicos e carotenoides. Nenhum trabalho publicado foi detectado demonstrando como se dá a dinâmica de acúmulo desses compostos durante a maturação desse fruto. Mas, sabe-se que, na maioria dos casos, na medida em que a maturação evolui para os estádios de amadurecimento e senescência, há incidência de abscisão dos frutos. Esse evento pode ser decorrência de participação de dois hormônios: etileno e ácido abscísico (ABA). Essa hipótese está embasada nos estudos com maçãs 'Imperial Gala' (PETRI; HAWERROTH; LEITE, 2010), em que, pela inibição da síntese de etileno, pela aplicação de aminoetoxivinínglica, se reduziu o percentual de abscisão de frutos. Portanto, por se tratar de composto diretamente ligado à maturação dos frutos, torna-se de grande relevância o estudo da dinâmica desses compostos, juntamente com aos hormônios que contribuem com o evento de maturação, como o ABA.

No que tange ao ABA, está cada vez mais consolidado o conhecimento de que esse hormônio contribui na plasticidade de plantas, regulando mecanismos adaptativos ao meio, sobretudo em condições em que há agentes estressores bióticos ou abióticos (DAVIES, P. J., 2010; DE SMET *et al.*, 2006). Além disso, está bem estabelecido que o ABA é fortemente regulador da maturação de frutos, de modo geral, classificados como não climatéricos, como é o caso do morango (JIA *et al.*, 2011a), mirtilo (CHUNG *et al.*, 2019), uva (ALFEREZ; DE CARVALHO; BOAKYE, 2021), dentre outros. Mesmo que se conheça mais a relevância do ABA na maturação desses frutos, sabe-se que ele também atua na maturação e amadurecimento de frutos com comportamento climatérico (JIA *et al.*, 2011b).

Frente ao exposto, se considerando que o ABA desempenha essas funções relevantes no metabolismo dos frutos, para entender o que ocorre em butiás, torna-se necessário estudar a dinâmica dos substratos da produção de ABA, ou seja, os carotenoides, assim como o próprio ABA. É nessa perspectiva que esse trabalho se apresenta. Assim, inicialmente será descrito o que se tem como

estabelecido em termos de carotenoides, depois, o metabolismo do ABA e, por fim, a hipótese dessa pesquisa.

Os carotenoides são amplamente citados como compostos relevantes na composição de alimentos, por serem precursores de vitaminas (e.g: vitamina A) e por terem putativas propriedades funcionais, com destaque para a antioxidante (e.g: astaxantina demonstram maior atividade quando comparada a α -caroteno, β -caroteno, luteína e licopeno) (BADEJO, 2018; MESQUITA, G. F. De; TORQUILHO, 2016; MESQUITA, S. D. S.; TEIXEIRA; SERVULO, 2017). Além disso, os carotenoides contribuem significativamente para a atratividade dos alimentos, pela coloração variada, que vai do amarelo claro ao vermelho (NISAR *et al.*, 2015; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; WURTZEL, 2019). De maneira análoga ao que ocorre em células animais (não capazes de sintetizar carotenoides), esses compostos têm função de destaque nas células vegetais, atuando como compostos de proteção antioxidante. Por exemplo, uma das funções relevantes dos carotenoides em vegetais é agir nas membranas dos tilacóides dos plastídios em interação com proteínas e lipídeos, e com o sistema antioxidante enzimático, atuando como foto protetor e antioxidante químico, especialmente em órgãos vegetais altamente fotossintéticos (CHO *et al.*, 2018; GIULIANO, 2014; NISAR *et al.*, 2015). Porém, podem ser encontrados também em tecidos e órgãos de menor atividade fotossintética, onde vão ser sintetizados para atender demandas como precursores de compostos voláteis (e.g. isoprenóides), e como moléculas de sinalização (e.g. ácido abscísico) (GIULIANO, 2014; VIGHI *et al.*, 2019). Por proporcionarem coloração às folhas, flores e frutos, e inclusive raízes, tubérculos e sementes, os carotenoides podem também desempenhar função no processo de comunicação entre as plantas e os animais, contribuindo para polinização e dispersão da espécie (STANGE, 2016). Estudos realizados em frutos de butiás maduros, realizados até o momento, determinaram apenas aqueles carotenoides que se encontram em maiores concentrações nas demais espécies de frutos como licopeno e betacaroteno (FARIA *et al.*, 2011)

Além da relevância dos carotenoides como nutrientes e compostos funcionais para o reino animal, esses compostos são fundamentais na propriedade de plasticidade das plantas, especialmente na sua capacidade de

adaptação às condições adversas do ambiente, seja pelo excesso ou falta de luminosidade, água, nutrientes e temperatura, além das agressões bióticas (DELLAPENNA; POGSON, 2006; SUN *et al.*, 2018). Também, já se tem o conhecimento de que a síntese de um dos principais hormônios sinalizadores em processo de defesa de plantas frente a agentes estressores de origem biótica ou abiótica, o ABA, decorre da degradação de carotenoides (FINDELSTEIN, 2013; JIA *et al.*, 2011a). Mais especificamente, violaxantina precursor da síntese de ácido abscísico nas plantas (DELLAPENNA; POGSON, 2006). O ABA provém da rota dos carotenoides, onde a zeaxantina é convertida através da enzima zeaxantina epoxidase (ZEP) em trans-violaxantina. Após a catálise, ocorre a formação de xantoxina pela clivagem da catálise oxidativa de 9-cis-violaxantina e/ou 9-cis-neoxantina provocada pela enzima 9-cis-epoxicarotenóide-dioxigenase (NCED). Ocorre, então, um transporte da xantoxina para o citosol, onde a enzima SDR/AtABA2 irá atuar transformando este carotenoide em aldeído abscísico, que sofre uma oxidação pela aldeído oxidase formando assim o ABA (Figura 3) (VIGHI *et al.*, 2019; VISHWAKARMA *et al.*, 2017).

O ABA recebe esta denominação porque foi inicialmente caracterizado como um hormônio regulador do processo de abscisão de folhas e frutos (VIGHI *et al.*, 2019; WANI *et al.*, 2016). Mas, sabe-se que se trata de um hormônio com múltiplas funções (CHITARRA & CHITARRA, 2006). Por exemplo, plantas em condições de falta de água, ou excesso de sais no solo, têm os eventos de controle de abertura e fechamento de estômatos parcialmente regulados pelo ABA, numa coordenação em cascata que envolve peptídeos sinalizadores, receptores desses peptídeos, Ca^{+2} e CDPKs, síntese, conjugação e degradação de ABA e seus receptores (ASANO *et al.*, 2012; DAVIES, W. J., 1978). Ainda, é cada vez mais evidente que o ABA é o hormônio regulador da síntese de antocianinas em alguns frutos, como é o caso do morango (JIA *et al.*, 2011a; JIANG; JOYCE, 2003).

Assim, há consenso da relevância do ABA nos eventos de aquisição de plasticidade das plantas frente a agentes estressores, e no amadurecimento de frutos climatéricos (ZHANG; YUAN; LENG, 2009) e não climatéricos (LI *et al.*, 2011). No caso específico de frutos, além dessas funções, o ABA também pode estar envolvido na abscisão de frutos, evento que ocorre de modo marcante em butiás.

2. Hipotese

Considerando que: a) o ABA é um hormônio sintetizado a partir dos carotenoides; b) o butiá é um fruto rico em carotenoides; c) o ABA participa do processo de formação de zona de abscisão em frutos; e, d) o butiá é um fruto que apresenta tipicamente o sintoma de abscisão durante o amadurecimento, lança-se a hipótese de que a alteração quantitativa e qualitativa na síntese de carotenoides antecede o aumento da síntese de ABA, coincidindo com o início da maturação\amadurecimento dos frutos, bem como da abscisão. Sendo assim, o

3. Objetivos

Descrever como se dá a síntese e o acúmulo de carotenoides durante o crescimento e o desenvolvimento de butiás da espécie *B. odoratae* sua provável relação com a síntese de ácido abscísico (ABA) e com a abscisão dos frutos.

4. Revisão Bibliográfica

4.1. *Butia spp.*

O butiá encontra-se entre os frutos de espécie nativa encontrados na América do Sul (Argentina, Brasil e Uruguai), pertencendo a família das Arecaceae. Atualmente, ainda não há um consenso sobre o número de espécies existentes. Essa variação entre as espécies reconhecidas está entre 11 (MARCATO, 2004), 18 (NOBLICK, 2010), 20 (SOARES, 2015), 21 (HEIDEN et al., 2020) e 24 (DEBLE *et al.*, 2017). Até o momento, considera-se a existência de 21 espécies catalogadas, dentre as quais 20 podem ser encontradas no território Brasileiro em áreas das regiões Nordeste (BA), Centro-Oeste (GO, MS), Sudeste (MG, SP) e Sul (PR, SC, RS), e é um fruto característico da região Sul do Brasil, em especial no estado do Rio Grande do Sul (RS), onde podem ser encontradas 8 espécies: *B. catarinensis*, *B. eriospatha*, *B. exilata*, *B. lallemantii*, *B. odorata*, *B. paraguayensis*, *B. witeckii* e *B. yatay* (DOS SANTOS CRUXEN et al., 2017; HOFFMANN et al., 2014; RODRIGUEZ-CONCEPCION et al., 2018;

PEREIRA, 2019; FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO, 2020). As plantas de *Butia* estão geralmente localizadas em campos, estando associadas com matas de araucária, cerrados, restinga arbustivas, e esporadicamente em matas de galeria, isso dependendo das exigências ambientais de cada espécie (HEIDEN, 2010; PEREIRA, 2019).

A utilização dos frutos como alimento, relaciona-se aos índios que foram os primeiros habitantes da região sul do Brasil, que consumiam não só os frutos, mas também as sementes (ROSSATO, 2007; PEREIRA, 2019). Apesar do gênero possuir várias espécies e estar distribuído em diferentes territórios, não existe uma área de produção comercial dos frutos; portanto, toda produção comercializada atualmente é obtida por extrativismo. A justificativa para essas ações é devida às espécies apresentarem uma baixa atividade de germinação, sendo muito lenta durante os primeiros anos de formação da planta (FIOR *et al.*, 2011). A produção dos primeiros frutos, se iniciam após um período maior que cinco anos, o que é um fator limitante para que as espécies possam se regenerar, deixando de ser viável o cultivo comercial (FIOR *et al.*, 2011). Outro ponto a ser considerado é que por se tratar de uma espécie nativa, as áreas de butiazais, são protegidas pelo Código Estadual Florestal, limitando o manejo e exploração comercial (BESKOW, 2012).

Após uma classificação taxonômica das espécies de *Butia spp.* realizadas no ano de 2010, a espécie de ocorrência no Bioma do Pampa foi denominada como *B. odorata* e as palmeiras encontradas no cerrado ficaram denominadas como *B. capitata*, sendo essas diferenciadas através das características morfológicas (HOFFMANN, *et al.*, 2014).

Os diferentes genótipos de butiazeiros proporcionam uma ampla oferta de frutos com característica biológicas, físico-químicas e sensoriais muito diferenciadas entre si. Geralmente, os frutos apresentam um período de maturação, que ocorre no verão entre os meses de novembro a maio, tendo seu pico mais elevado durante o mês de fevereiro. Os frutos gerados em butiazeiros apresentam uma coloração que variam entre os tons de amarelo e vermelho, são frutos considerados drupas comestíveis que possuem um mesocarpo carnoso e fibroso, apresentam um endocarpo duro que são formados por 1 a 3 lóculos com sementes (amêndoas) comestíveis com vantajoso endosperma e composta por óleo alimentar (BESKOW *et al.*, 2015). De acordo com Barbosa Rodrigues (1903)

a palavra indígena butiá, dita por Beccari (1887) para nomear o gênero, é uma definição de *mboitia* que por sua vez vem de *mbo* que significaria *fazer* e *tiá* cujo significado seria *dente curvo*, em alusão aos dentes que guarnecem lateralmente ao pecíolo das folhas em várias espécies do gênero.

O gênero *Butia*, espécie *B. odorata* ocorre no Rio grande do Sul e Uruguai (Departamento *Treinta y Tres*), apresenta um único caule (Figura 1) e possui potencial de produção de 20 ton ha⁻¹ com um rendimento médio de polpa de 55%. Os frutos dessa espécie apresentam um tamanho que varia entre 2,0 – 3,0cm, por 1,4 – 4,3 cm, sendo normalmente mais largos que compridos (BESKOW *et al.*, 2015; MISTURA *et al.*, 2016). Esses frutos têm despertando o interesse em pesquisadores, por apresentar características sensoriais: frutos redondos, com cores vivas (amarelo, alaranjado, avermelhado e purpura) (Figura 2),suculentos, doces e levemente acidificados, com um forte e característico aroma,nutritivas e funcionais que se deseja encontrar em alimentos, podendo ser consumidos in natura ou processados na forma de sucos, licores, geleias, bolos,sorvetes, entre outros (FIOR; DE SOUZA; SCHWARZ, 2013; MISTURA *et al.*, 2016).



Figura 1:Palmeira de *Butia odorata*, localizada no Centro Agropecuário da Palma- Capão do Leão



Figura 2: Frutos de *Butia odorata* e as variações de coloração.

Conforme FONSECA, (2012), foi detectado na polpa de frutos de *B. odorata* altos níveis de minerais (ferro, manganês e potássio), bem como diversos compostos bioativos com elevadas concentrações de compostos fenólicos totais, vitamina C e carotenoides; por isso, esses frutos podem ser considerados um importante alimento a ser utilizado na alimentação humana. Os frutos do butiazeiro são considerados ricos em ácido ascórbico (ácido L- -ascórbico), Vitamina A, compostos fenólicos e carotenoides (FARIA *et al.*, 2011). Conforme BESKOW *et al.*, (2015), o conteúdo de ácido L-ascórbico presente nos frutos sofre variação conforme o genótipo estudado, tendo uma variação entre 34,6-63,8 mg 100 g¹.

Os principais ácidos fenólicos observados nos frutos de *B. odorata* foram: ácidos gálico, protocatecuico, cafeico, clorogênico, hidroxibenzóico, cumarico e ferúlico, já entre os principais flavonoides encontram-se catequina, epicatequina, quercetina, kaempferol e rutina (HOFFMANN, 2017a). Com relação a composição de carotenoides encontrados até o momento na polpa e no suco do gênero *Butia*, podem ser citados β -criptoxantina, β -caroteno e luteína (BESKOW *et al.*, 2015). Conforme demonstrado em estudos anteriores, níveis de carotenoides encontrados em frutos de butiá variam entre 1710,3 \pm 243,2 a 2865,2 \pm 190,4 μ g de equivalentes de β -caroteno / 100 g de peso fresco (VINHOLES *et al.*, 2017).

Segundo Hoffmann *et al.* (2017), a polpa dos frutos é composta por 88,7% de umidade, 0,2% de cinzas, 0,8% de lipídios, 0,1% proteínas, 1,2% de proteína dietética sendo 0,9% de fibra solúvel e 0,3% de fibra insolúvel, e 9,0% de carboidratos.

Além do cultivo para a alimentação, as palmeiras também são muito utilizadas em paisagismo, tanto rural como urbano. Assim como, o uso das sementes para produção de óleos, que podem ser usados em diversas áreas industriais, como: cosméticas e farmacêuticas (ROSSATO, 2007).

Entretanto, mesmo se tratando de um fruto de uso tradicional que apresenta um grande potencial comercial, só recentemente os frutos e butiazeiros têm recebido uma maior atenção da comunidade científica, onde um grupo de pesquisa da Embrapa Clima Temperado mostrou um relevante papel nesse processo, juntamente com o apoio do Ministério do Meio Ambiente, além de instituições de ensino e pesquisa, ONGs e iniciativa privada (PEREIRA, 2019).

Um exemplo das ações, é o projeto Rota dos Butiazais, que trata de um espaço de integração que une Brasil, Uruguai, Paraguai e Argentina, que visa promover a valorização e conservação ambiental e o uso sustentável da biodiversidade relacionadas aos butiazais (EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, 2018; PEREIRA, 2019).

4.2. Carotenoides

Os carotenoides são compostos indispensáveis ao crescimento e desenvolvimento vegetal e participam do processo de plasticidade das plantas (RODRIGUEZ-CONCEPCION *et al.*, 2018). Além disso, têm participação nutricional e atividades antioxidante e funcional na dieta humana e de outros animais. É sobretudo pela importância como provitamina A e pela prevenção de doenças crônico-degenerativas, que os carotenoides se tornaram prioridade para os estudos fitoquímicos em alimentos (GRUNE *et al.*, 2010). A síntese desses compostos ocorre nos plastídios, mesmo que haja forte interlocução citoplasmática quando a síntese se dá pela via do mevalonato (RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN; BORONAT, 2015; SUN *et al.*, 2018). A via de biossíntese dos carotenoides é bem conhecida (SUN *et al.*, 2018). A seguir, será descrita a via de biossíntese, os principais carotenoides e as principais funções desses compostos nas plantas e para a nutrição humana.

2.2.1 A síntese de carotenoides em plantas

De acordo com (GIULIANO, 2014), a síntese dos carotenoides pelas plantas ocorre por duas vias metabólicas, a via citoplasmática do mevalonato (MVA) e a via localizada no plastídio, dependendo do organismo. Através da via MVA, a biossíntese ocorre em 3 etapas: síntese de terpenos básicos (C₅); a partir dos intermediários terpênicos C₅ ocorre a síntese de compostos de cadeia carbônica maior (C₄₀), onde atuam os intermediários acetoacetyl-CoA, mevalonato e isopropenilpirofosfato; e, por fim, a transformação desses compostos para se formarem os diferentes carotenoides através da ação do geranylgeranylpirofosfato e farnesilpirofosfato (STANGE, 2016). As primeiras etapas da síntese dos carotenoides percorrem vias usuais da biossíntese dos esteroides (Figura 1).

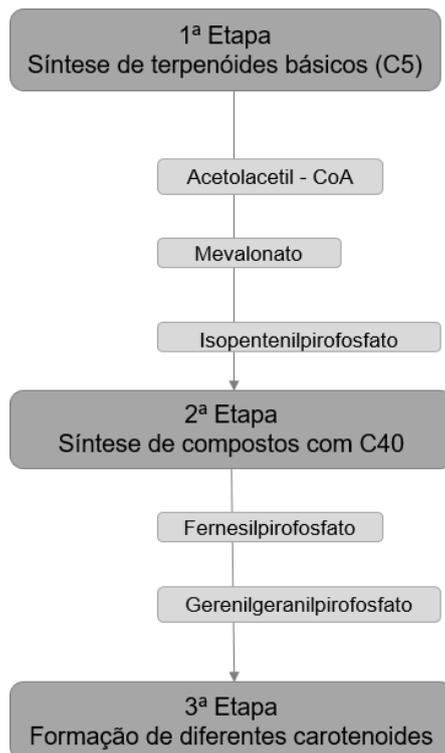


Figura 3: Fluxograma de Biossíntese de Carotenoides pela Via Citoplasmática do Mevalonato.

Através da via localizada nos plastídios, o início da biossíntese dos carotenoides se dá na via metileritriol fosfato (MEP), onde a partir do piruvato e do Gliceraldeído-3-fosfato ocorre a formação de isopentenilfosfato (IPP) (C₅) e difosfato ou pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) que, por condensação, formam geranildifosfato (C₁₀) que irá se condensar com duas moléculas de IPP para produzir geranylgeranildifosfato. Tanto na via MVA quanto na via MEP, para que ocorra a biossíntese dos carotenoides é necessária a enzima fitoeno sintase (PSY) que irá condensar duas moléculas de geranylgeranildifosfato (GGPPs) (C₂₀) em fitoeno carotenoide (C₄₀) (Figura 2) (DELLAPENNA; POGSON, 2006; MESQUITA, S. D. S.; TEIXEIRA; SERVULO, 2017; SUN *et al.*, 2018).

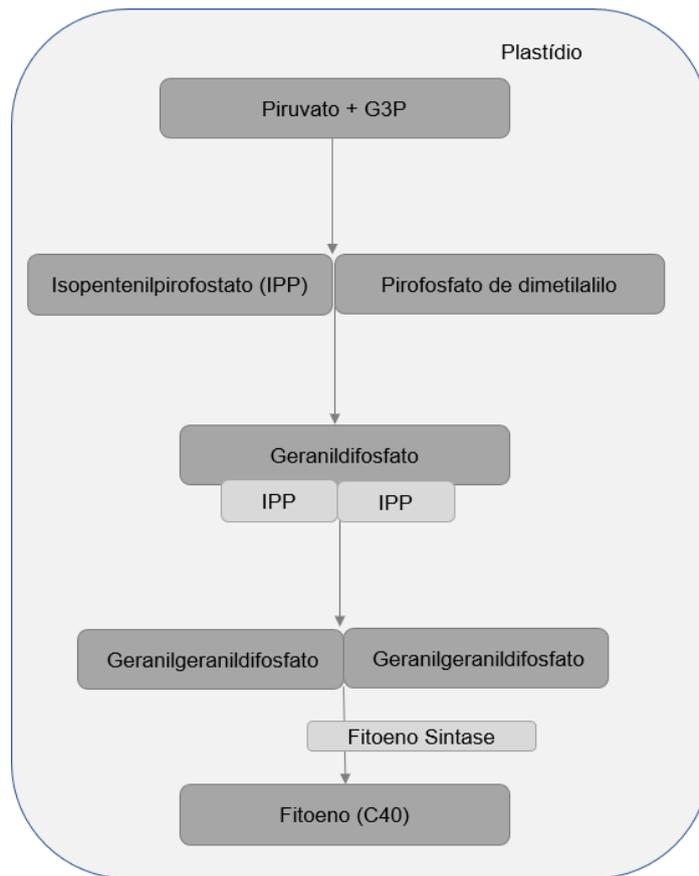


Figura 4: Fluxograma de Biossíntese de Carotenoides pela Via Metileritriol fosfato localizada no Plastídio.

2.2.2 Química dos carotenoides

Os carotenoides são compostos derivados a partir da rota metabólica dos isopropanóis, podendo ser sintetizados por organismos fotossintéticos (plantas, algas e cianobactérias) e organismos não fotossintéticos (bactérias fungos e animais). Quando sintetizados por organismos fotossintéticos, atuam na captura da luz sendo essenciais para fotoproteção. Outro atributo para este composto é que esse pode ser clivado e produzir outros compostos que são reguladores de crescimento como o ABA e estrigolactonas, entre outras (RODRIGUEZ-CONCEPCION *et al.*, 2018).

Até o momento n o banco de dados de carotenoides (<http://carotenoid db.jp>), podem ser encontradas informações sobre as estruturas químicas de aproximadamente 1.158 carotenoides presentes em aproximadamente 691 organismos vivos de todos os domínios. Esses compostos apresentam

tipicamente um esqueleto de hidrocarbonetos de 40 carbonos (C₄₀), sendo constituído por 8 unidades de isopreno (MESQUITA, G. F. De; TORQUILHO, 2016; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; UENOJO; MARÓSTICA; PASTORE, 2007). Normalmente, as diversas estruturas de carotenoides encontradas são derivadas de uma estrutura (C₄₀-H₅₆) acíclica, contendo um composto central de polieno conjugado, que é responsável por absorver na maioria das vezes luz azul violeta da região visível do espectro eletromagnético (400-500 nm) através do sistema cromofórico o que resulta na coloração característica em uma faixa que vai do amarelo ao vermelho (RODRIGUEZ-CONCEPCION *et al.*, 2018; STANGE, 2016).

Alguns carotenoides também podem apresentar uma estrutura mais curta (C₃₀) com apenas 6 unidades de isoprenos ou mais longa (C₄₅ ou C₅₀) formadas com 9 ou 10 isoprenos, respectivamente (RODRIGUEZ-CONCEPCION *et al.*, 2018). A cor refletida pelos carotenoides vai depender de suas concentrações, agregação ou interação com proteínas (RODRIGUEZ-CONCEPCION *et al.*, 2018).

Essa estrutura química básica, permite que diferentes modificações químicas ocorram, como variações de dessaturação e ciclização, de uma ou ambas extremidades, além de ocorrerem adições de grupos funcionais que contenham oxigênio (hidroxi, epóxi e oxo) (UENOJO; MARÓSTICA; PASTORE, 2007). Conforme as alterações, os carotenoides são classificados em carotenos e xantofilas, sendo esse último grupo o único a conter grupo funcional com oxigênio (BADEJO, 2018). Quando esses grupos funcionais estão presentes na estrutura dos carotenoides, sua solubilidade é afetada, o que torna as xantofilas mais polares do que os carotenos (STANGE, 2016). Os carotenoides também podem ser encontrados de forma associada a outras moléculas como: ácidos graxos, açúcares e proteínas.

4.3. Ácido abscísico (ABA)

O ABA é um fitohormônio que está presente em um grande número de plantas sendo produzido naturalmente por elas, e assim como outros fitohormônios atua na modulação celular ao interagir com proteínas para atuarem como receptores. É um derivado da rota de produção dos carotenoides

e apresenta uma alta atividade biológica mesmo estando presentes em baixas concentrações (TAIZ et al., 2017; Losco, 1991).

O ABA trata-se de um composto da classe dos terpenóides, cuja estrutura apresenta 15 carbonos e suas moléculas possuem em sua porção terminal, semelhante à dos carotenoides, podem ocorrer na forma cis ou trans, entretanto só apresenta atividade, quando se apresenta na forma cis ((+)-ABA) (CHITARRA & CHITARRA, 2006)., sendo este o isômero predominante na natureza (BERLI, 2011).

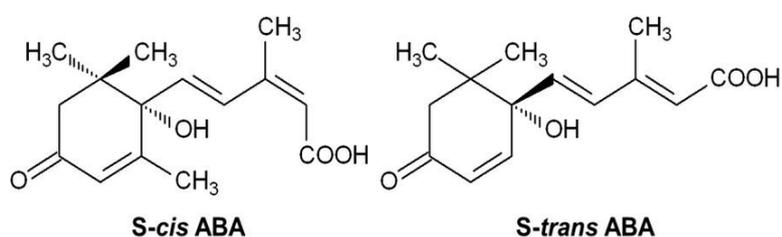


Figura 5: Ácido Abscísico nas conformações cis e trans. Fonte: BERLI, 2011.

O ABA é sintetizado através da via de fosfato de metileritritol (MEP) nos cloroplastos ou plastídios, onde inicialmente é produzido um carotenoide (BERLI, 2011), através de reações em cascata promovidas por diversas enzimas como: geranyl geranyl difosfato sintase (GGPPS), fitoeno sintase, fitoeno dessaturase e ξ -caroteno dessaturase, licopeno ϵ -ciclase ou licopeno β -ciclase. O primeiro carotenoide precursor do ABA é a zeaxantina, que através de reações enzimáticas de epoxidações e isomerizações e, por fim, uma reação de dioxigenação origina xantoxina. A xantoxina é enviada para o citoplasma onde sofrerá uma oxidação formando assim o ABA (BERLI, 2011).

Além desta síntese, o ABA pode ser metabolizado em moléculas inativas por meio de reações de hidroxilação e conjugação. A via de hidroxilação é catalisada pela enzima ABA-8-hidroxilase (CYP707A), formando dois catabólicos mais relevantes: o ácido faseico (PA) e ácido dehidrofaseico (DPA). Na segunda via, a inativação ocorre por glicosilação do ABA pela enzima ABA-glicosiltransferase (ABA-GTase); os resultantes dessa reação são ABA-glicosil éster (ABA-GE) ou ABA-glicosil éter (ABA-GS). Neste último caso o ABA pode ser reativado pela

ação da β -glicosidase (BG) (NAMBARA; MARION-POLL, 2005; VIGHI *et al.*, 2019).

2.3.1 Ácido abscísico no amadurecimento dos frutos

Conforme ocorre o crescimento e o desenvolvimento dos frutos na planta, os níveis de fitohormônio ativo nos tecidos é alterado, sendo suas concentrações reguladas por processos de biossíntese, catabolismo, conjugação, transporte e compartimentação (SCHWARTZ e ZEEVAART, 2004).

O ABA participa da regulação de diversos eventos relacionados ao crescimento e desenvolvimento da planta e do fruto; esses eventos incluem a maturação do embrião, dormência, germinação, divisão celular e alongamento da semente, indução floral e respostas a estresses ambientais, tais como seca, salinidade, frio, ataque de patógenos e radiação UV. O ABA recebeu este nome por inicialmente se acreditar que ele era responsável por promover a abscisão dos frutos das plantas. Entretanto, não demonstrou regular diretamente a abscisão; por serem encontrados em órgão de abscisão exprimem seu papel de promoção da senescência, resposta a algum estresse, eventos que antecedem a abscisão.

Durante o amadurecimento de frutos o ABA pode ser considerado um hormônio de controle para este evento ou iniciador, pois frutos verdes apresentam uma baixa quantidade deste composto, que vai aumentando conforme esses frutos vão amadurecendo (ZHANG; YUAN; LENG, 2009). Quando os frutos atingem os estádios finais de maturação, apresentam um comportamento semelhante ao do etileno, aparentando possivelmente um papel ainda mais importante que o etileno no amadurecimento e senescência dos frutos (ZHANG; YUAN; LENG, 2009; CHITARRA & CHITARRA, 2005; LI *et al.*, 2011). Em algumas espécies frutíferas, as concentrações de ABA nos frutos ocorrem somente ao final do desenvolvimento ou durante o amadurecimento, podendo ser degradado através da conjugação da molécula com uma glicose; proteína ou lipídio, e através de sua metabolização (CHITARRA & CHITARRA, 2006).

4.4. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos ou polifenóis são metabólitos secundários que desempenham diversas funções nas plantas, sendo sintetizados a partir da via ácido chiquímico e do acetato, que são produzidos nos cloroplastos ou citoplasmas, e tendo como local de armazenamento os vacúolos. O ácido chiquímico é formado através da junção do fosfoenolpiruvato e da eritrose-4-fosfato, já o acetato é formado a partir da descarboxilação do ácido pirúvico (VINHOLES *et al.*, 2017).

Os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de pelo menos um anel aromático (anel benzoico) que se encontra ligado a um ou mais grupos hidroxila, tendo uma estrutura que varia de uma simples molécula fenólica a polímeros complexos de elevado peso molecular (BALANGE & BENJAKUL, 2009; VAQUERO *et al.*, 2007). A maioria dos compostos podem estar conjugados a mono ou oligossacarídeos, ligados a um ou mais grupos fenólicos, ou se apresentar ligados a derivados funcionais (ésteres ou metil ésteres) (BALASUNDRAM *et al.*, 2006; HURTADO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2010; VICHAPONG *et al.*, 2010). Neste grupo de compostos estão incluídos os ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e cumarinas (SROKA; CISOWSKI, 2003; CHENG *et al.*, 2007; HOUNSOME *et al.*, 2008).

Estes compostos são sintetizados pela maioria das plantas, são responsáveis por desempenhar diversas funções nos organismos vegetais, devido a sua alta atividade antioxidante, atuando como agente redutor, sequestradores de radicais livres e supressores do ânion superóxido, em funções estruturais, atuando nos tecidos de sustentação e/ou proteção, defesa contra ataques de animais e de agentes patogênicos, agentes protetores contra condições de estresse (temperatura extrema, nutricional e hídrico, radiação ultravioleta (UV) e oxidação das biomoléculas) (BOUDET, 2007; CHUNGLONG *et al.*, 2008). Além disso, estes compostos estão também envolvidos nos eventos de reprodução e crescimento dos vegetais, assim como na atribuição de cor e aromas (compostos voláteis), que proporcionam as características sensoriais das plantas, tornando mais atrativos os alimentos de origem vegetal (BALASUNDRAM *et al.*, 2006; BOUDET, 2007).

Nos frutos, a presença destes compostos, tanto para o aspecto quantitativo quanto qualitativo, dependerá dos aspectos genéticos (gênero, espécie, cultivar), e de fatores edafoclimáticos e grau de maturação (LEE; DOSSETT; FINN, 2012). São considerados um dos maiores grupos de metabólitos em plantas estando presentes em todos os organismos vegetais. Apesar de estar sempre presente nos vegetais, os compostos fenólicos podem ser utilizados como biomarcadores, para identificação botânica e geográfica das plantas.

5. PROJETO DE PESQUISA

Putativas interrelações entre os metabolismos de carotenoides e de ácido abscísico com a maturação de frutos de butiazeiro (*Butia odorata*) (Barb.Rodr.) Noblick & Lorenzi

Jessica Paula Aparecida Costa Fonseca

Pelotas, 2020.

Introdução

Os carotenoides são amplamente citados como compostos relevantes na composição de alimentos, por serem precursores de vitaminas (e.g: vitamina A) e por terem putativas propriedades funcionais, com destaque para a antioxidante (e.g: astaxantina demonstram maior atividade quando comparada a α -caroteno, β - caroteno, luteína e licopeno.3) (BADEJO, 2018; MESQUITA, G. F. De; TORQUILHO, 2016; MESQUITA, S. D. S.; TEIXEIRA; SERVULO, 2017). Além disso, os carotenoides contribuem significativamente para a atratividade dos alimentos, pela coloração variada, que vai do amarelo claro ao vermelho (NISAR *et al.*, 2015; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; WURTZEL, 2019). De maneira análoga ao que ocorre em células animais (não capazes de sintetizar carotenoides), esses compostos também têm função de destaque nas células vegetais, essas capazes de sintetizá-los. Por exemplo, uma das funções dos carotenoides é agir nas membranas dos tilacóides dos plastídeos em interação com proteínas e lipídeos, e com o sistema antioxidante enzimático, atuando como fotoprotetor e antioxidante químico, especialmente em órgãos vegetais altamente fotossintéticos como cloroplastos (CHO *et al.*, 2018; GIULIANO, 2014; NISAR *et al.*, 2015). Porém, podem ser encontrados também em tecidos e órgãos de menor atividade fotossintética, onde vão ser sintetizados para atender demandas como precursores de compostos voláteis (e.g. isoprenóides), e como moléculas de sinalização (e.g. ácido abscísico) (GIULIANO, 2014; VIGHI *et al.*, 2019).

Por proporcionar uma coloração às flores e frutos, os carotenoides podem também desempenhar um papel biológico, relacionado à propagação e preservação das espécies de plantas, pois a coloração é atrativa a animais, que contribuem para polinização e dispersão de sementes (STANGE, 2016).

Pesquisas que levaram em consideração os pontos de vista químico, mostram que a família de carotenoides conta com aproximadamente 750 estruturas químicas (NISAR *et al.*, 2015). Esses compostos apresentam um esqueleto de hidrocarbonetos de 40 carbonos (C₄₀), sendo constituído por 8 unidades de isopreno (MESQUITA, G. F. De; TORQUILHO, 2016; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; UENOJO; MARÓSTICA; PASTORE, 2007). Normalmente, as diversas estruturas de carotenoides encontradas são

derivadas de uma estrutura (C₄₀-H₅₆) acíclica, contendo um composto central de polieno conjugado, que é responsável por absorver luz de parte da região visível do espectro eletromagnético (400-500 nm) através do sistema cromofórico (STANGE, 2016).

Essa estrutura química básica, permite que diferentes modificações químicas ocorram, como variações de dessaturação e ciclização, de uma ou ambas extremidades, além de ocorrerem adições de grupos funcionais que contenham oxigênio (hidroxi, epóxi e oxi)(UENOJO; MARÓSTICA; PASTORE, 2007). Conforme as alterações, os carotenoides são classificados em carotenos e xantofilas, sendo esse último grupo o único a conter grupo funcional com oxigênio (BADEJO, 2018). Quando esses grupos funcionais estão presentes na estrutura dos carotenoides, sua solubilidade é afetada, o que torna as xantofilas mais polares do que os carotenos (STANGE, 2016).

De acordo com Giuliano, (2014), a síntese dos carotenoides pelas plantas ocorre por duas vias metabólicas, a via citoplasmática do mevalonato (MVA) e a via localizada no plastídio, dependendo do organismo. Através da via MVA, a biossíntese ocorre em 3 etapas, sendo elas: síntese de terpenóides básicos (C₅); a partir dos intermediários terpênicos ocorre a síntese de compostos de cadeia carbônica (C₄₀), onde atuam os intermediários Acetoacetil- CoA, mevalonato e isopropenilpirofosfato; e, por fim, a transformação destes compostos para se formarem os diferentes carotenoides através da ação do geranylgeranylpirofosfato e farnesilpirofosfato (STANGE, 2016). As primeiras etapas da síntese dos carotenoides, percorrem vias usuais da biossíntese dos esteroides (Figura 1).

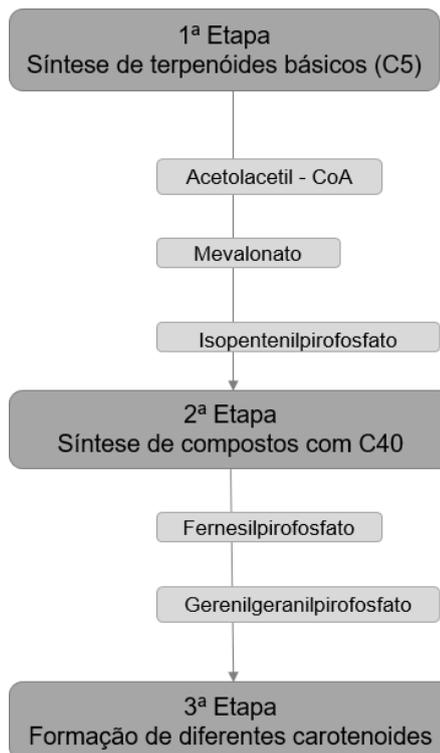


Figura 1: Fluxograma de Biossíntese de Carotenoides pela Via Citoplasmática do Mevalonato.

Através da via localizada nos plastídios, o início da biossíntese dos carotenoides se dá na via metileritriol fosfato (MEP), onde a partir do piruvato e do Gliceraldeído-3-fosfato ocorre a formação de Isopentenilfosfato (IPP) (C₅) e difosfato ou pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) que sofrem condensação formando geranildifosfato (C₁₀) que irá se condensar com duas moléculas de IPP para produzir geranylgeranildifosfato. Tanto na via MVA quanto na via MEP, para que ocorra a biossíntese dos carotenoides é necessário que ocorra catalise através da enzima Fitoeno sintase (PSY) que irá condensar duas moléculas de geranylgeranildifosfato (GGPPs) (C₂₀) em fitoeno carotenoide (C₄₀). A enzima utilizada durante esse processo irá influenciar a formação do pool de carotenoides (Figura 2) (DELLAPENNA; POGSON, 2006; MESQUITA, S. D. S.; TEIXEIRA; SERVULO, 2017; SUN *et al.*, 2018)

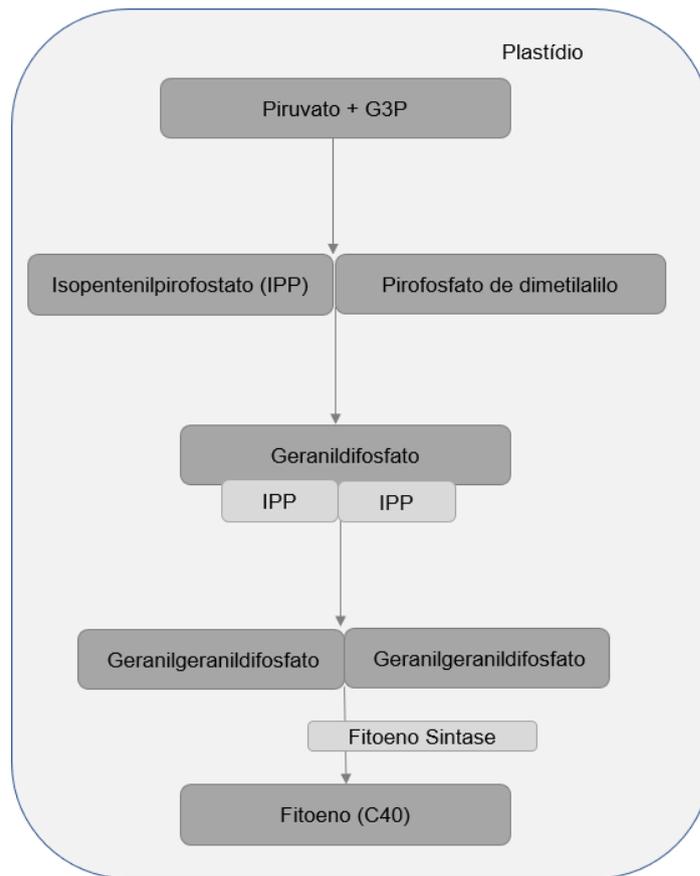


Figura 2: Fluxograma de Biossíntese de Carotenoides pela Via Metileritriol fosfato localizada no Plastídio.

Em órgãos, como flores (FENG et al., 2018) (tagetes, por exemplo) e grãos (PALMER et al., 2018; SAGARE et al., 2018; WURTZEL, 2004 (milho, por exemplo)), a via de biossíntese de carotenoides tem sido estudada e, de modo geral, tem alta similaridade estrutural, diferenciando-se, principalmente pela regulação e funcionalidade. Tão é relevante a importância dos carotenoides, tanto para a fisiologia da planta quanto como nutriente, é que o melhoramento genético dá ênfase a esses compostos, principalmente pela via da biofortificação (LEITE et al., 2012; MESSIAS et al., 2014).

O ácido abscísico (ABA), recebe este nome devido ao seu papel no processo de abscisão de folhas, sendo provavelmente o fitohormônio mais estudado por desempenhar múltiplas funções em plantas (amadurecimento, abscisão, dormência, desenvolvimento de sementes), e quando os frutos apresentam o estágio de amadurecimento sobre situações de estresse, este composto participa de uma das vias de indução de fenilpropanoides, que são

compostos do metabolismo secundário das plantas (VIGHI *et al.*, 2019; WANI *et al.*, 2016).

O ABA possui sua rota metabólica como uma sequência da rota dos carotenoides, onde a zeaxantina é convertida através de uma catálise utilizando a enzima Zeaxantina epoxidase (ZEP) em trans-vilaxantina. Após a catálise, ocorre a formação de xantoxina pela clivagem da catálise oxidativa 9-cis-violaxantina e/ou 9-cis-neoxantina provocada pela enzima 9-cis-epoxicarotenoide-dioxigenase (NCED). Ocorre então, um transporte da xantoxina produzida para o citosol, onde a enzima SDR/AtABA2 irá atuar transformando este carotenoide em aldeído abscísico, que sofre uma oxidação pela aldeído oxidase formando assim o ABA (Figura 3) (VIGHI *et al.*, 2019; VISHWAKARMA *et al.*, 2017).

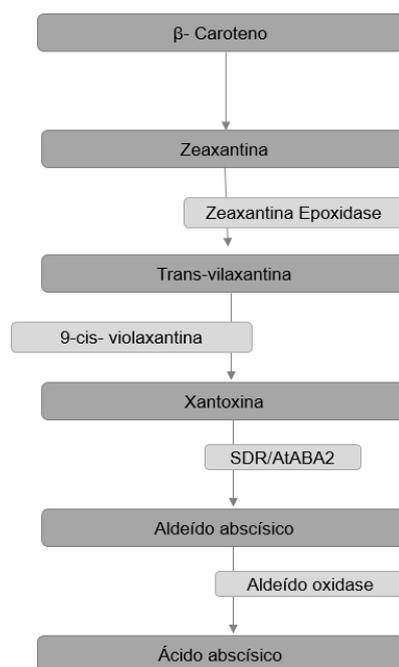


Figura 3: Fluxograma de Biossíntese de ABA pela Via de biossíntese de Carotenóides

Para verificar e descrever como ocorre a síntese e o acúmulo dos carotenoides e como estes estão relacionados com a síntese e o acúmulo do ABA, frutos de butiá (*Butia odorata*) serão utilizados como modelo de estudo. Estudos mostram que este fruto apresenta quantidades significativas de carotenoides, um exemplo de carotenoide encontrados no fruto de butiá é o β-caroteno (HOFFMANN *et al.*, 2017a). Além disso, esses frutos apresentam

características de abscisão, embora ainda não se saiba se esta característica resulta da ação do ABA. Além disso, os estudos sobre o Butiá até o momento, não demonstram quais carotenoides estão envolvidos e são acumulados durante os diferentes estágios de maturação, bem como se esses apresentam alguma relação com a síntese do ácido abscísico.

Hipóteses

Considerando que: a) o ABA é um hormônio sintetizado a partir dos carotenoides; b) o butiá é um fruto rico em carotenoides; c) o ABA regula, ao menos parcialmente, a síntese de fenilpropanoides; d) o ABA participa do processo de formação de zona de abscisão em frutos; e, e) o butiá é um fruto que apresenta tipicamente o sintoma de abscisão durante o amadurecimento, acredita-se que a alteração quantitativa e qualitativa na síntese de carotenoides é que antecederá o aumento da síntese de ABA, coincidindo com o início da maturação ou amadurecimento dos frutos, bem como com a abscisão.

Objetivo geral

Descrever como se dá a síntese e o acúmulo de carotenoides durante o crescimento e o desenvolvimento de frutos de butiás, e sua provável relação com a síntese de ácido abscísico (ABA) e a abscisão dos frutos.

a Objetivos específicos

- Coletar frutos de butiá durante o crescimento e desenvolvimento;
- Extrair, identificar e quantificar os carotenoides em frutos de butiá;
- Extrair, identificar e quantificar o teor de ABA em frutos de butiá;
- Extrair RNAs e quantificar o acúmulo relativo de transcritos de genes envolvidos na via de Biossíntese dos carotenoides;
- Quantificar o acúmulo relativo de transcritos de genes envolvidos na via de biossíntese do ABA; e,
- Correlacionar as mudanças qualitativas e quantitativas dos carotenoides, com as alterações de ABA.

Material e métodos

Colheita dos frutos

Para realização das análises serão coletados frutos de butiás (*Butiá odorata*). Os frutos serão coletados no Centro Agropecuária da Palma localizado na localizada na Universidade Federal de Pelotas- Campus Capão do Leão.

Os frutos serão coletados em 5 diferentes fases sendo: 2 coletas na floração e 3 frutificações. Após a colheita, os frutos serão congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultra freezer (- 80°C) para análises posteriores de quantificação e qualificação de carotenoides totais e individuais, quantificação de ácido abscísico, assim como quantificação dos transcritos da via de biossíntese de carotenoides e ABA.

Delineamento experimental

Nesse projeto de dissertação serão realizados dois estudos. No primeiro estudo, será realizada a otimização das condições de extração dos carotenoides de frutos de butiá utilizando um planejamento fatorial 2², com três repetições do ponto central. O delineamento utilizado está apresentado na tabela 1.

Pesar uma parte da amostra representativa e homogênea. O peso depende do conteúdo carotenóide da amostra, variando de 2 g de vegetais folhosos verde-escuros a 100 g de frutas ou vegetais com baixo teor de carotenóides. Misture em um liquidificador mecânico por 30 a 60 segundos com acetona fria suficiente para cobrir e celite ou Hyflosupercel. Como alternativa, moa a amostra com um almofariz e pilão, com acetona fria suficiente para cobrir e celite ou Hyflosupercel. Filtrar com sucção através de um funil Buchner ou funil de vidro sinterizado. Lave o liquidificador ou argamassa, funil e resíduo com pequenas quantidades de acetona, recebendo as lavagens no frasco de sucção com o extrato. Volte a colocar o resíduo no liquidificador ou na argamassa, adicione acetona fresca e macere novamente. Filtrar e lavar como antes. Repita a extração e a filtração até que o resíduo seja desprovido de qualquer cor e as lavagens sejam incolores (geralmente 3 vezes é suficiente).

A quantidade de solvente e o tempo de reação será realizado conforme especificação da tabela 1, que servirá de base para construção da matriz experimental.

Tabela 1. Variáveis e níveis codificados e decodificados

Variáveis (unidades)	Níveis codificados e decodificados				
	-1,68	-1,00	0	1,00	1,68
Solvente (ml)	2	8,12	11	16,36	20
Tempo (min)	30	40,2	45	53,93	60
Temperatura (°C)	30		40		50

Após a extração com solvente será adicionado ao tubo uma solução de hidróxido de potássio (10% p/v) seguindo saponificação a quente (20 minutos no banho maria a 56 °C). A mistura deverá permanecer à temperatura ambiente durante uma hora e depois ser adicionada de hexano e de solução de sulfato de sódio (10% p / v) (HOFFMANN *et al.*, 2017b). Após as amostras serão liofilizadas e armazenadas em ultra freezer (-80°C). as amostras serão recuperadas com adição de éter metiliter-butílico (MTBE) (JACHNA *et al.*, 2016). A quantificação será realizada conforme descrito abaixo no item (b).

No segundo estudo (Tabela 2), serão coletados frutos de butiá em diferentes estágios de crescimento e desenvolvimento e o teor de carotenoides, ABA e expressão gênica será determinado.

Tabela 2. Delineamento experimental para verificação da relação do teor de carotenoides, ABA e acúmulo de transcritos em frutos de butiá coletados em diferentes estágios de crescimento e desenvolvimento

Tratamentos	Variáveis independentes	Variáveis dependentes
1	Estádio 1	Análises físico-químicas (cor, altura, largura e massa)
2	Estádio 2	Identificação e Quantificação de carotenoides
3	Estádio 3	Identificação e Quantificação de ABA
4	Estádio 4	Acúmulo de transcritos (9) na biossíntese de Carotenoides e ABA
5	Estádio 5	Correlação qualitativa e quantitativa de carotenoides com ABA
6	Estádio 6	
7	Estádio 7	

Análises físico-químicas dos frutos de butiá

Para as características físico-químicas, serão utilizados 20 frutos que serão submetidos as análises dos parâmetros de cor, altura, largura e massa. A cor será determinada através do colorímetro (marca Konica Minolta, modelo:300), onde a leitura da cor ocorre em escala tridimensional $L^* a^* b^*$ ou CIELAB, na qual os valores de L^* corresponde à luminosidade ou claridade .As coordenadas a^* e b^* indicam a direção da cor: - a^* = verde e + a^* = vermelho; - b^* = azul e + b^* = amarelo. Através dos resultados obtidos na medição, serão calculados o ângulo h° (tonalidade da cor) expressos em graus onde será utilizada a formula ($h^\circ = \tan^{-1} b^*/a^*$). Para medidas de massa será utilizada balança analítica (marca: SHIMADZU, modelo: ATY224) e a altura e largura serão medidas através do uso de paquímetro.

Identificação e Quantificação dos carotenoides

A identificação e quantificação dos carotenoides individuais presentes nos frutos de butiá serão determinados através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) acoplada a espectrometria de massas (MS), conforme descrito por JACHNA et al. (2016). Onde o volume de injeção será de 5 μ L, a taxa de fluxo da fase móvel 1 mL min⁻¹ e a temperatura da coluna deverão ser mantidas a 33^oC. O gradiente de eluição da fase móvel será composto por (MTBE / água / metanol) será estabelecido em: 5: 90: 5 para iniciar, atingindo 0 : 95: 5 após 12 min, 0:89:11 às 25 min, 0:75:25 às 40 min e 0:50:50 às 45 min. Essas análises serão realizadas em laboratórios parceiros. As áreas sob os picos serão comparadas com as áreas das curvas padrão de calibração. Os resultados serão expressos como μ g de carotenoides g⁻¹ da amostra.

Quantificação de ABA

A quantificação do ABA será realizado utilizando CLAE – MS, sendo essas análises realizadas no laboratório de cromatografia e espectrometria de massas (LACEM), da Universidade Federal de Pelotas – UFPel conforme (PERIN et al., 2018)

Extração e quantificação de RNA

Será realizada a extração do RNA dos tecidos dos frutos de butiá nos diferentes estágios de crescimento e desenvolvimento, serão macerados com auxílio de nitrogênio líquido, e o RNA total será extraído com o método hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) modificado (DA SILVA MESSIAS *et al.*, 2014). A quantificação do RNA extraído será realizada através do protocolo Qubit Quantitation Platform que inclui o aparelho Qubit fluorômetro (Invitrogen™) e os reagentes do kit Quant-it (Invitrogen™). Os produtos de extração de RNA serão separados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) em tampão TBE com o corante GelRed™, com intuito de avaliar a qualidade do RNA extraído. A síntese de cDNA será realizada utilizando a enzima transcriptase reversa M-MLV e oligo(dt), conforme fabricante (Invitrogen™).

Expressão gênica

Será utilizado o método de RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) padrão ouro conforme descrito por Bustin et al. (2009), para

realização da síntese de cDNAs dos respectivos RNAs associados à síntese de carotenoides e ABA, presentes nas diferentes etapas do crescimento e desenvolvimento dos frutos de butiá. Após a síntese, os cDNAs serão submetidos a uma reação de PCR (Polymerase Chain Reaction), onde será possível identificar em quais etapas do crescimento e desenvolvimento o gene está sendo expresso.

Para as análises serão selecionados 8 genes envolvidos na rota de síntese de carotenoides em frutos sendo eles: fitoeno sintase (PSY), fitoeno dessaturase (FDS), ζ -caroteno dessaturase (ZDS), carotenoide isomerase (CRTISO), licopeno ϵ -ciclase (LCY ϵ), licopeno β -ciclase (LCY β), hidroxilase β -caroteno (HY β) e zeaxantina epoxidase (ZEP).

Oligonucleotídeos sintéticos serão projetados pelo grupo de pesquisa com auxílio do programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html) de modo a produzir amplicons com tamanho entre 100 e 250 pares de bases e visando uma temperatura de hibridização em torno de 60 °C.

Reações de RT-qPCR serão feitas em um volume final de 20 μ L, compostas de 10 μ L de cada amostra de cDNA diluída 100 vezes e mais 10 μ L de mix contendo 2 μ L de 1x PCR buffer, 1,5 μ L de 50 mM MgCl₂, 0,2 μ L dNTPs 5 mM, 0,2 μ L do par de oligonucleotídeos 10 μ M, 2,0 μ L de SYBR green (1:100,000 – Molecular Probe, OR, USA) e 0,25 U de Platinum Taq DNA polymerase (5 U/ μ L) (Invitrogen, CA, USA). As reações serão realizadas em termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems) utilizando as seguintes condições: 5" a 95 °C seguidos por 40 ciclos de 1" a 95 °C, 1' a 50 °C, 1' a 72 °C e extensão final de 7' a 72 °C. Após, as amostras serão aquecidas de 55 até 99 °C com um aumento de 0,1 °C/s para adquirir a curva de desnaturação dos produtos amplificados, utilizada para verificar a especificidade dos oligos. Para verificar as expressões do genes, serão testados previamente alguns genes normalizadores.

6. Relatório de Trabalho de Campo

O objetivo do presente estudo foi descrever como se dá a síntese e o acúmulo de carotenoides durante o crescimento e o desenvolvimento de butiás da espécie *B. odorata* (Barb.Rodr.) Noblick & Lorenzi, e sua provável relação com a síntese de ácido abscísico (ABA) e com a abscisão dos frutos.

Durante as etapas de desenvolvimento do estudo, esperava-se determinar e identificar o acúmulo de carotenoides e ácido abscísico durante os diferentes estádios de crescimento e desenvolvimento dos frutos de *B. odorata* (Barb.Rodr.) Noblick & Lorenzi, bem como identificar os diferentes genes de expressão destes compostos em cada um dos estádios selecionados.

Para a execução, o projeto foi dividido nas seguintes etapas:

- I. Coleta de Amostras
- II. Análise de dimensões dos frutos
- III. Extração de RNA e estudo da expressão relativas de genes
- IV. Obtenção dos extratos para fenólicos e para carotenóides
- V. Identificação e Quantificação de fenólicos e para carotenóides
- VI. Obtenção dos extratos para ABA e derivados
- VII. Quantificação de ABA e derivados
- VIII. Obtenção dos extratos para ácido ascórbico
- IX. Caracterização e Quantificação de ascórbico

Esse projeto foi desenvolvido no laboratório de frutas do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas – UFPel.

Desenvolvimento do projeto

A obtenção dos extratos para Compostos Fenólicos, ABA e derivados e Ácido Ascórbico, assim como as medidas de dimensões, foram todas realizadas no Laboratório de frutas e hortaliças (lab 710), do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Faculda de Agronomia Eliseu Maciel, Campus Capão do Leão- UFPel. Já a caracterização dos extratos, foi realizada no

Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LaCEM), da Universidade Federal de Pelotas- Campus Capão do Leão.

Etapa I: Coleta de Amostras

Antes de ser iniciado o trabalho de campo propriamente dito, foi criado um planejamento para coleta de frutos, para as análises a serem realizadas, assim como os locais e datas para suas realizações. O primeiro passo foi realizar a coleta dos frutos de *B. odorata*. Para isso fomos até o Centro Agropecuário da Palma (CAP) e fizemos a seleção de oito acessos que seriam acompanhados durante todo o processo de crescimento e desenvolvimento dos frutos; essa primeira visita foi realizada no início do mês de outubro; neste período os acessos estavam em floração (Figura 1).



Figura 1: Flores de *Butia odorata*, fotografada no mês de outubro no Centro Agropecuário da Palma. Acesso com flores amareladas e acesso com flores avermelhadas. Foto da autora.

Após a primeira visita e seleção dos acessos, sendo esses enumerados de 1A a 8A, iniciou-se um acompanhamento dos mesmos com uma visita semanal ao local da coleta, para que fosse possível realizar uma seleção visual dos estádios a serem analisados. Inicialmente foram selecionados 7 estádios. Porém, com o acompanhamento do crescimento e do desenvolvimento dos frutos nos acessos, foi concluído que 5 estádios seriam mais adequados, e assim foi feito: verde pequeno (VP), verde grande (VG), verde maduro (VM), maduro (M) e após abscisão (AB) (Figura 10).



Figura 2 :Frutos de *Butia odorata* nos diferentes estádios de crescimento e desenvolvimento.
 Figura da autora

Durante o acompanhamento dos acessos, dois deles tiveram que ser descartados pois, antes mesmo de saírem da fase floração, os cachos secaram, não havendo a formação de frutos. Assim, o acompanhamento seguiu com os seis acessos restantes, em cinco estádios. Após a coleta de cada um dos estádios, os frutos foram congelados com nitrogênio líquido e armazenados a -70°C em ultra freezer.

A primeira coleta foi realizada na segunda semana do mês de dezembro. Os frutos foram colhidos e selecionados. Nessa coleta, os frutos eram pequenos e totalmente verdes (nos frutos dos acessos provenientes de flores amareladas) e verdes com listras vermelhas (nos acessos que possuíam flores avermelhadas).

A coleta do segundo estágio foi realizada durante o início do mês de janeiro, durante a primeira e segunda semanas do mês. Neste período foi notado que apesar dos acessos terem sido selecionados no mesmo período, os estádios não eram atingidos no mesmo período, havendo pelo menos uma semana de diferença na mudança de um estágio para o outro. Os frutos ainda apresentavam coloração que seguia os mesmos padrões do estágio inicial (VP) e apresentando um comprimento superior.

O terceiro estágio foi coletado durante a primeira e segunda semana do mês de fevereiro. Nessa coleta, os frutos já começaram a apresentar uma

coloração amarelada misturada a pontos com uma coloração verde claro. Para os frutos de coloração verde total nos estádios anteriores e para os que apresentam colorações avermelhadas nos estádios anteriores esses frutos apresentaram três pontos de coloração diferentes (verde, amarelo e vermelho alaranjado). A partir do terceiro estágio as mudanças nos períodos de foram ocorrendo de forma mais rápida do que durante a passagem dos estádios iniciais.

O quarto estágio foi coletado a partir do final da terceira semana do mês de fevereiro e durante a quarta semana do mesmo mês, e início do mês de março. Nessa coleta, os frutos já apresentavam uma coloração totalmente amarelada nos acessos com florações amareladas. Para os frutos provenientes de acessos com floração avermelhada, a coloração era amarelada com pontos em vermelho neste estágio, os frutos ainda permaneciam presos aos cachos, ou seja, não havia abscisão. Neste estágio, no momento da coleta de um dos acessos, os frutos apresentaram manchas pretas nos frutos indicando uma provável contaminação por fungos (Figura 11). Desse modo viu-se a necessidade de descartar estes acessos. Dessa forma, o trabalho seguiu com o uso de 4 acessos.



Figura 3: Frutos de *Butia odorata* atacados por fungos. Foto da autora.

No quinto e último estágio, alguns frutos foram coletados na primeira semana de março, outros na segunda do mês de março. Nessa coleta, todos os frutos apresentavam coloração próxima ao alaranjado. Esses frutos foram coletados após seu desprendimento total da planta.

Durante a coleta deste último estágio, um desses acessos não atingiu a maturação no mesmo momento, sendo sua coleta adiada para a terceira semana do mês. Ao chegar ao local da coleta (última coleta), foi observado que havia ocorrido incêndio no pomar, causando danos aos acessos e aos frutos, não sendo possível a finalização da coleta desse último acesso, restando, assim, três acessos para realização da pesquisa.



Figura 4: Imagens da queimada do local de coleta dos frutos. Foto da autora.

Etapa II: Análises biométricas nos frutos

Após cada fase da coleta do frutos, ao chegar ao laboratório eram selecionados de forma aleatoria, dez frutos do estádio coletado no dia. E em seguida eram mensurados a altura e largura, com auxilio de um paquímetro e a massa utilizando balança analitica.

Etapa III: Extração de RNA

Realizar uma extração de RNA em alta quantidade e qualidade é um fator importante e pode sofrer limitações em tecidos vegetais em experimentos de biologia molecular. Entretanto, realizar metodologias de isolamento de RNA de alguns tecidos poder ser muito difícil e trabalhoso devido à presença de alta quantidades de compostos como polissacarídeos e compostos polifenólicos, que poderiam co-precipitar ou ligar-se ao RNA e resultar em baixos rendimentos (YU et al., 2012). Como um pré-teste para a extração foram avaliados 3 diferentes métodos, utilizado um mix do estádio maduro, dos 3 acessos de butiá, tendo em vista a seleção e otimização de um método mais adequado para a extração de RNA de frutos de butiá.

Extração RNA por CTAB

Foram pesados 100 mg de tecido macerado de butiá em micro tubos de 2ml auto clavados e adicionados 1210 μ L de solução extratora CTAB (605 μ L +605 μ L) pré-aquecida a 65°C e 42 μ L de β mercaptoetanol. Após o material foi incubado em banho maria 65°C por 5 minutos, e em seguida dividiu-se a amostra em dois micro tubos (1,5mL), transferindo \cong 625 μ L de amostra para cada tubo. Adicionou-se então 625 μ L de CHISAM (clorofórmio + álcool isoamílico na proporção 24:1). Agitou-se por inversão inicialmente de forma vigorosa e em seguida gentilmente por 15 min. Posteriormente centrifugou-se a 7300 x g por 20 minutos a -4°C. Os tubos foram retirados cuidadosamente da centrífuga sem agitá-los e coletou-se a fase superior para um novo tubo. Adicionou-se 625 μ L de CHISAM e centrifugou-se novamente os tubos a 7300 x g por 20 minutos a -4°C. As fases superiores foram juntadas em um novo tubo e adicionou-se 250 μ L de LiCl e armazenou-se os tubos para precipitação a 4°C por 12 h. Após o período de precipitação, centrifugou-se os tubos em 13000 x g por 30 minutos;

cuidadosamente o sobrenadante foi descartado sem perder o pellet e adicionou-se 200 μ L de SSTE pré-aquecido a 65°C e agitou-se o tubo com “petelecos” para dissolver o pellet e adicionou-se 200 μ L de CHISAM e centrifugou a 10000 x g por 10 min a 4°C. Transferiu-se a fase superior para um novo tubo e adicionou-se 200 μ L de CHISAM e centrifugou a 10000 x g por 10 min a 4°C. Após, a fase superior foi transferida para um novo tubo. Adicionou-se 18 μ L de NaAc (acetato de sódio) e 364 μ L de etanol absoluto e misturou-se por inversão e deixou-se precipitar o RNA a -70°C por 1h. Centrifugou-se a 18000 x g por 30 min a 4°C, para separação do RNA no pellet. Cuidadosamente, descartou-se o sobrenadante sem perder o pellet. Adicionou-se 100 μ L de etanol 70% para remover resíduos de sais e centrifugou-se a 18000 x g por 2 min 4°C. Cuidadosamente descartou-se o sobrenadante sem perder o pellet. Adicionou-se novamente 100 μ L de etanol 70% e centrifugou-se a 18000 x g por 2 min 4°C e cuidadosamente descartou-se o sobrenadante sem perder o pellet. Por fim, adicionou-se 25 μ L de H₂O ultrapura autoclavada e armazenou-se em ultrafreezer.

Extração de RNAs por TRIZol e por Concert

Duas metodologias utilizando reagentes comerciais foram testados, sendo utilizado 1 mL para o protocolo do TRIZol Reagente (Invitrogen™) e reagente Concert TM da Invitrogen, utilizando 0,5 ml de do reagente a 4°C, para cada 100 mg de amostra, sendo realizado conforme instruções do fabricante.

Análises espectrofotométricas de RNA

A concentração e pureza do RNA extraído foram determinadas através das razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} foram medidos com um Espectrofotômetro (NanoVue™ Plus Spectrophotometer; GE Healthcare) usando 1 μ L de cada amostra. Os espectros foram registrados para um faixa de 260 (DNA e RNA), 230 (Fenólicos) e 280 (Proteínas) nm.

Etapa IV- Obtenção do extrato para determinação de compostos fenolicos

Para obtenção dos extratos, foram utilizados 10 frutos de butiá de cada estágio e em cada acesso. Os frutos foram liofilizados sem o caroço, em seguida foram macerados com auxílio de nitrogênio líquido, e armazenados em falcon de 15 ml e protegidos da luz e umidade, em temperatura de -4°C .

Para obtenção do extrato, pesaram-se 100 mg de polpa de butiá liofilizada em microtubos de centrifuga de 2 mL. Adicionou-se 1 mL de solução de metanol:água (3:1; acidificada com 0,1% de ácido fórmico). A mistura foi agitada em vortex por 1 min. Os extratos foram sonicados por 15 min a uma frequência de 40 kHz, em temperatura ambiente. Em seguida, o extrato foi centrifugado a $9900 \times g$ por 15 min. Coletou-se o sobrenadante e realizou-se uma nova extração a partir do resíduo. Os sobrenadantes foram misturados e filtrados com filtro de membrana de PVDF ($0,22 \mu\text{M}$), e posteriormente transferidos para vials (Figura 13).



Figura 5: Etapas de Extração de Fenólicos. Imagem cedida por Tatiane Jessica Siebeneichler.

Etapa V- Identificação e Quantificação de fenólicos.

Para a identificação e quantificação compostos fenólicos, $10 \mu\text{L}$ do extrato obtido das amostras de cada estágio dos três acessos foram injetados em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (UFLC, Shimadzu, Japão) acoplada a um espectrômetro de massa ultrarrápido de tempo de voo quadrupolo (Maxis Impact, BrukerDaltonics, Bremen, Alemanha). Sendo esse operado no modo de ionização negativa. Utilizou-se como fase móvel, água acidificada com ácido

fórmico 0,1% (eluyente A) e acetonitrila acidificada com ácido fórmico 0,1% (eluyente B). A coluna utilizada nas corridas para separação dos compostos foi uma Cogent Bidentate C18 (2,2 μm 120 A - 100 mm x 2,1 mm) (MicroSolv Technology Corporation, Leland NC, EUA) e uma pré-coluna C18 (2,0 x 4 mm). Os espectros foram adquiridos em um intervalo de m/z 50–1200. Os parâmetros para os modos de ionização negativo foram: voltagem capilar 3,5 e 4,5 kV; fluxo de gás de secagem 8,0 e 9,0 L min^{-1} ; pressão do gás de nebulização 2,0 bar; temperatura do gás de secagem 180 e 200 °C; Colisão RF 500 Vpp; tempo de transferência 120 e 60 μs e armazenamento pré-pulso de 8,0 e 5,0 μs . A energia de colisão correspondente foi: m/z 100 15 eV; m/z 500 35 eV; e m/z 1000 50 eV, foi utilizado nitrogênio como gás de colisão. Para a calibração do equipamento, foi utilizado o formato de sódio 10 mM.

A quantificação dos compostos fenólicos se deu através de uma curva de calibração externa com padrões para cada composto. Os dados de MS e MS / MS foram processados usando o Data Analysis versão 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os compostos foram identificados comparando os valores observados de m/z , espectro de massa e padrões de fragmentação com bancos de dados online (METLIN, KEGG, PubChem, FooDB e ReSpect), com precisão de massa de 5 ppm. As identidades da catequina, epicatequina, ácido elágico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido hidroxibenzóico, kaempferol e rutina foram confirmadas com padrões externos (Sigma Aldrich). A análise quantitativa se deu através da construção uma curva de calibração para cada padrão fenólico disponível.

Etapa VI - Preparação dos Extratos para determinação do conteúdo de ABA e seus derivados

Para obtenção dos extratos, foram utilizados 10 frutos de butiá de cada estádio e em cada acesso. Os frutos foram liofilizados sem o caroço, em seguida foram macerados com auxílio de nitrogênio líquido, e armazenados em falcon de 15 ml e protegidos da luz e umidade, em temperatura de -4°C.

A determinação do conteúdo de ABA e seus derivados foi realizada de acordo com Perin et al. (2018). Brevemente, pesou-se 100 mg de amostra liofilizada de cada estádio dos três acessos em microtubos de 2 mL, adicionou-

se 1 mL de metanol (80 %) e agitou-se em vortex durante 1 min. Após, centrifugou-se a 18.500g por 5 min. O sobrenadante foi recolhido e transferido para um novo microtubo de 2 mL, e o resíduo foi re-extraído, conforme as etapas anteriores. Em seguida, uniu-se o sobrenadante da primeira extração com o sobrenadante da re-extração e filtrou-se o extrato com filtro de membrana de PVDF (0,22 μ M) (Figura 14).

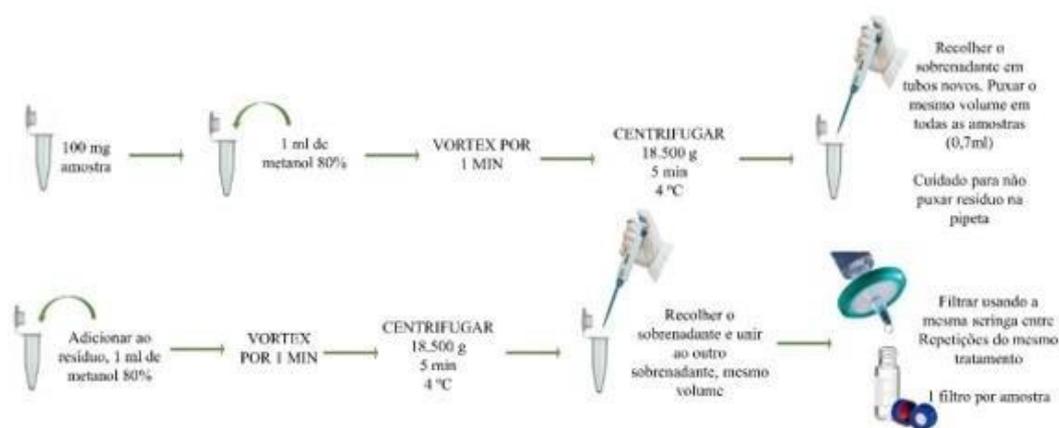


Figura 6: Etapas de Extração ABA e Derivados. Imagem cedida por Tatiane Jessica Siebeneichler.

Etapa- VII- Quantificação de ABA e seus derivados

Para a quantificação do ABA e seus derivados, foram injetados 10 μ L de extrato em cromatógrafo a líquido de ultra-alta eficiência (UFLC, Shimadzu, Japão) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução (tipo quadropolo-tempo de voo) (Maxis Impact, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Para a separação dos compostos foi utilizada uma coluna Hyperclone ODS C18 (Phenomenex, CA, USA), utilizando solução de água com 0,1 % de ácido fórmico (eluente A) e acetonitrila acidificada com 0,1 % de ácido fórmico (eluente B), como fase móvel. O fluxo utilizado foi de 0,2 mL min^{-1} e a temperatura da coluna de 40 °C. Para a separação utilizou-se um gradiente: 0,00 min – 20 %B, 2,00 min - 30 % B, 6,00 min – 38 % B, 8,00 min – 50 % B, 10,00 – 70 % B, 12,00 min – 20 % B, e terminando aos 15 min com 20 % B. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização negativo, com espectros adquiridos ao longo de uma faixa de massa de m/z 50 a 1200. Os parâmetros de capilaridade foram: voltagem do capilar em 3,5kV, gás de secagem em 8,0 L min^{-1} e temperatura de

180 °C, pressão do gás de nebulização de 2 bar, colisão de RF de 300 Vpp, tempo de transferência 120 μ S e armazenamento pré-pulso de 8 μ S. O equipamento foi calibrado com formiato de sódio 10 mM. Para o processamento dos dados de MS e MS/MS foi utilizado o software Data analysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Para a quantificação de ABA, ABA-GE, PA e DPA foi utilizada uma curva analítica de ABA, sendo esta análise realizada em triplicatas.

Etapa VIII- Preparação dos extratos para determinação do conteúdo de ácido ascórbico

Para obtenção dos extratos, foram utilizados 10 frutos de butiá de cada estádio e em cada acesso. Os frutos foram liofilizados sem o caroço, em seguida foram macerados com auxílio de nitrogênio líquido, e armazenados em falcon de 15 ml e protegidos da luz e umidade, em temperatura de -4°C.

A extração foi realizada através de uma adaptação do método descrito por Vinci (1995). Para isso adicionou-se 50 mg de amostra liofilizadas de cada estádio e de todos os acessos em 5 mL de solução extratora (água ultra pura acidificada com 4,5 % de ácido metafosfórico) e agitou-se em vórtex por 1 min. Centrifugou-se por 10 min, a 10.000 g, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para microtubos de 2 mL, e diluído 1:1 em solução extratora. Após, as amostras foram filtradas com filtros de membrana de PVDF (0,22 μ M) e transferidos para vials.

Etapa IX- Quantificação de ácido L-ascórbico

Para obtenção dos extratos, foram utilizados 10 frutos de butiá de cada estádio e em cada acesso. Os frutos foram liofilizados sem o caroço, em seguida foram macerados com auxílio de nitrogênio líquido, e armazenados em falcon de 15 ml e protegidos da luz e umidade, em temperatura de -4°C.

Para quantificação de ácido ascórbico, 10 μ L do extrato foram injetados em cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência (UFLC, Shimadzu, Japão), acoplado à espectrômetro de massas de alta resolução (tipo quadrupolo-tempo de vó) (Maxis Impact, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Utilizou-se uma coluna cromatográfica Hyperclone ODS C18 (Phenomenex, CA, USA), e como

fase móvel, utilizou-se solução de água ultra pura com 0,0085 % de ácido fórmico (eluente A) e metanol acidificado com 0,0085 % de ácido fórmico (eluente B). O fluxo utilizado foi de 0,2 mL min⁻¹ e a temperatura da coluna de 30°C. O gradiente utilizado foi de: 0,10 min – 30 % B, 5,00 min – 30 % B, 7,00 min – 100 % B, 9,00 min – 100 % B, 10,00 min – 30 % B, e terminando aos 18 min com 30 % de B. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização negativo com espectros adquiridos ao longo de uma faixa de massa de *m/z* 50 a 1200. Os parâmetros de capilaridade foram: voltagem do capilar em 3,5kV, gás de secagem em 8,0 L min⁻¹ e temperatura de 180 oC, pressão do gás de nebulização (N₂) de 2 bar, colisão de RF de 500 Vpp, tempo de transferência 120 ms e armazenamento pré-pulso de 8 µS. O equipamento foi calibrado com formiato de sódio 10 mM. Para o processamento dos dados de MS e MS/MS foi utilizado o software Data analysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). A quantificação foi baseada em uma curva analítica utilizado padrão de ácido L-ascórbico (Sigma Aldrich). Os resultados foram expressos em g 100g⁻¹, sendo esta alise realizada em triplicatas.

Resultados

A seguir, serão apresentados os resultados obtidos ao se testar três métodos de extração de RNA (CTAB, Trizol, Concert) em polpa de butiás. Foi observado que o maior rendimento, ou seja, a maior concentração, foi obtida quando se usou o método Concert. Por esse método, se obteve concentração de RNA, em média, 3,7 vezes maior do que com os outros métodos. Em contrapartida, foi com o uso de CTAB que se obtiveram as melhores relações de DO 260/280 (2,0) e 260/230 (1,9), indicando menor nível de potenciais contaminantes proteicos, compostos fenólicos e açúcares. (Tabela 1).

Tabela 1: Concentração (ug ul⁻¹) de RNA total obtida na extração com uso de métodos CTAB, Trizol e Concert, e relações de densidade ótica (DO) 260/280 e 260/230

Método	Concentração	260/280	260/230
CTAB	89,5	2,0	1,9
Trizol	95,6	0,9	0,1

Concert

336,0

1,8

0,4

Durante a execução do projeto, viu-se a necessidade de realizar adaptações à proposta original do projeto. Desta forma, foram adicionadas novas análises não planejadas previamente no projeto de pesquisa, como: compostos fenólicos e ácido ascórbico. Em contrapartida, através do reflexo da pandemia, as análises de quantificação e identificação de carotenoides individuais, que seriam realizadas em laboratórios parceiros não puderam ser realizadas. Assim como, devido a problemas de energia elétrica e funcionamento do ultrafreezer, onde as amostras encontravam-se armazenadas, as análises moleculares não puderam ser realizadas, por perda de amostras e do RNA já extraído.

Além da construção do projeto, foi realizada a participação em diferentes disciplinas, sendo elas descritas na tabela 2, com um total de 49 créditos.

Tabela 2: Disciplinas realizadas durante o período de Mestrado

Disciplina	Créditos	Semestre
Análise Sensorial de Alimentos	4	1º Semestre
Biologia Celular	4	1º Semestre
Bioquímica Metabólica em Alimentos	4	1º Semestre
Estágio em Docência Orientada I	1	1º Semestre
Metodologia da Pesquisa	4	1º Semestre
Princípios e Métodos de Conservação de Alimentos	4	1º Semestre
Tópicos em Alimentos IV	4	1º Semestre
Estágio em Docência Orientada II	1	2º Semestre
Fisiologia de Pós-Colheita de Frutas e Hortaliças I	6	2º Semestre
Seminários em Agroindústria I	1	2º Semestre
Tópicos em Alimentos III	3	2º Semestre
Tópicos em Alimentos IV	4	2º Semestre
Divulgação Científica Orientada I	1	3º Semestre
Seminários em Agroindústria II	1	4º Semestre
Tópicos em Alimentos II	4	4º Semestre

Além disso, no quarto semestre foi realizada a inscrição em algumas disciplinas que já tinham sido cursadas nos semestres anteriores, como Estágio em Docência orientada I e II e Seminários I, com o intuito de ampliar os conhecimentos nesse campo.

Os resultados das demais análises realizadas encontram-se, no artigo descrito a seguir.

7. Artigo

Dinâmica de acúmulo de compostos fenólicos, ácido ascórbico e ácido abscísico em frutos de *Butia odorata* (Barb.Rodr) Noblick& Lorenzi

Jessica Paula Aparecida Costa Fonseca^a, Pedro Lopes Reisser^a, Tatiane Jessica Siebeneichler^a, Rosane Lopes Crisel^a, CesarValmorRombaldi^a, Vanessa Galli^b

^aDepartamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

^b Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, UFPel, Brasil

Resumo:

O *Butia odorata* (Barb.Rodr) Noblick& Lorenzi é uma espécie nativa da América do Sul (Argentina, Brasil e Uruguai), pertencendo a família das Arecaceae. Os frutos maduros são ricos em compostos fenólicos; porém, a dinâmica de acúmulo destes e de outros compostos funcionais nos frutos de butiá, permanece desconhecida. Além disso, não há relatos do papel do ácido abscísico (ABA) no crescimento e desenvolvimento destes frutos. O objetivo desse trabalho foi caracterizar as alterações na concentração de compostos fenólicos, ácido L-ascórbico (AsA) e ABA e seus derivados, em frutos de butiá de três diferentes acessos durante cinco estádios de crescimento e desenvolvimento. As variáveis cor, massa, diâmetro e altura dos frutos foram relatadas, mostrando que diferem entre os acessos. Para detecção, identificação e quantificação dos compostos, foi utilizada cromatografia líquida ultra-rápida acoplada a espectrômetro de massas de alta resolução (tipo quadrupolo-tempo de vóo) (HPLC-MS/MS). Foram identificados 13 compostos fenólicos, sendo que a maioria apresenta redução na concentração ao longo dos estádios avaliados; apenas cinco (ácido siríngico, ácido ferúlico, hesperetina, pinocembrina e metilsiringina) apresentaram o comportamento oposto. Por outro lado, os picos de concentração de AsA foram observados em estádios intermediários e no último estádio avaliado. Além do AsA, dois outros ácidos foram detectados nos frutos de butiá: ácido málico e ácido cítrico, sendo o primeiro de maior concentração nestes frutos. O

ABA parece ser um fitohormônio importante na maturação destes frutos, visto que sua concentração foi detectada nos estádios intermediários, atingindo o pico nos estádios de completa maturação e abscisão dos frutos. Embora estas alterações tenham apresentado diferença entre os acessos, de acordo com a análise de componentes principais, a maior parte das alterações (69%) é explicada pelos estádios de crescimento e desenvolvimento dos frutos. O estudo contribuiu para se ter um prévio conhecimento dos eventos que envolvem o processo de crescimento e desenvolvimento dos frutos, através da perspectiva de mudanças na concentração de alguns compostos do metabolismo especializado. Entretanto, se faz necessário o estudo de novas rotas metabólicas, bem como estudos genéticos direcionados.

Palavras Chaves: metabolismo especializado, HPLC-MS/MS, maturação; frutos nativos.

1. Introdução

O gênero *Butia* pertence à família Arecaceae e é caracterizado por espécies de palmeiras de ocorrência natural no Uruguai e no sul do Brasil. Até o presente, foram identificadas 20 espécies de *Butia*, as quais 18 delas são encontradas no território brasileiro. Dessas 18 espécies, 8 são encontradas no estado do Rio Grande do Sul. Dentre essas 8 espécies, a *Butia odorata* (Barb.Rodr) Noblick & Lorenzi (*B. odorata*) ocorre naturalmente no Bioma do Pampa. Os frutos denominados butiás são utilizados na produção de sucos, licores, geleias e sorvetes; e suas folhas são, geralmente, utilizadas para produção de artesanatos (CRUZ et al., 2017; DOS SANTOS CRUXEN et al., 2017; HOFFMANN et al., 2014). Os butiás apresentam uma coloração que varia entre o amarelado e o avermelhado, com polpa frequentemente fibrosa, com sabor ácido e aroma intenso (BESKOW et al., 2015). De modo geral, a polpa dos butiás tem pH próximo a 3,0, teor de sólidos solúveis que varia entre 5 e 15%, baixos teores de proteínas (< 3%), lipídeos (< 2%) e cinzas (<1%) (HOFFMANN et al., 2017a).

Apesar de serem frutos que apresentam baixos teores de proteínas, lipídeos e minerais, os butiás são ricos com compostos do metabolismo especializado. De modo geral, a polpa dos butiás da espécie *B. odorata* se diferencia das demais espécies por apresentar, sempre, em sua composição, catequina, epicatequina e rutina (CRUZ et al., 2017; DOS SANTOS CRUXEN et al., 2017b).

Como consequência dos estudos relacionados à composição fitoquímica foram evidenciadas propriedades nutricionais e funcionais dos butiás (antioxidantes, antiproliferativas e antimicrobianas), gerando perspectivas de interesse para alimentação, assim como propor potenciais usos tecnológicos (DOS SANTOS CRUXEN *et al.*, 2017b). Mais detalhadamente, Hoffmann *et al.* (2017b) verificaram o potencial antioxidante da polpa e do néctar de butiá; Maia *et al.* (2017) verificaram que um extrato de butiá (*Butia odorata* Barb. Rodr.) proporcionou inibição de crescimento de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella typhimurium* em queijos; CRUXEN *et al.*, (2017b) otimizaram a produção de sorvete de polpa de butiá com propriedade probiótica; e Egea & Pereira-Netto (2019) relatam que os frutos de butiá foram os que apresentaram maior concentração de flavonoides (12,3 mg/100g) e menor concentração de fenólicos dentre cinco frutos nativos da Mata Atlântica [frutos de araçá amarelo e vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine), butiá (*Butia eriospatha* (Martius) Beccari), gabioba (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.), uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess)]; Hoffmann *et al.*, (2017), estudaram a composição e a estabilidade de compostos bioativos em polpas de butiá congeladas durante 12 meses, a pasteurização resultou na redução dos teores de ácido fenólico, flavonóide, carotenóide e ácido ascórbico. Desse modo, se percebe que os butiás são fontes potenciais de compostos funcionais. Entretanto, até o presente momento, os estudos estão centrados em frutos completamente maduros. Não se identificou na pesquisa bibliográfica estudos relatando a dinâmica desses compostos individuais durante o crescimento e desenvolvimento dos frutos.

Em butiás, à semelhança do que ocorre com a maioria dos frutos, durante o crescimento e desenvolvimento há alterações facilmente perceptíveis, como é o caso do aumento do tamanho, [alteração na coloração](#), alteração do sabor (acidez, doçura, adstringência, aroma) e elevada incidência de abscisão dos frutos, quando da plena maturação (BERÜTER; DROZ, 1991; CASTILLO-LLANQUE; RAPOPORT, 2009). A elevada abscisão pode ser decorrência da participação do ácido abscísico (ABA). O ABA, que está relacionado com a plasticidade das plantas, regulando mecanismos adaptativos ao meio, sobretudo em condições em que há agentes estressores bióticos ou abióticos, também tem participação no evento da maturação de frutos (DAVIES, P. J., 2010; DE SMET *et al.*, 2006). Está bem estabelecido que o ABA é fortemente regulador da maturação de frutos, de modo geral, classificados como não climatéricos, como é o caso do morango (JIA *et al.*, 2011a; PERIN *et al.*, 2018; SIEBENEICHLER *et al.*, 2020),

mirtilo, uva (BERLI, 2011)), dentre outros. Além disso, compostos derivados do ABA, como ácido faseico (PA) e ácido dehidrofaseico (DPA), catabólitos hidrolisados produzidos através da oxidação das moléculas de ABA (NAMBARA; MARION-POLL, 2005), e ABA glicosil-éster (ABA-GE), produzido através da conjugação do ABA a um monossacarídeo (HIRAI *et al.*, 2000), também participam do metabolismo de crescimento e desenvolvimento dos frutos.

Nesse contexto, neste estudo se dará ênfase à caracterização e ao entendimento de três eventos relevantes durante o crescimento e desenvolvimento de butiás: as alterações nos compostos fenólicos, no ácido L-ascórbico (AsA) e no ABA e seus derivados.

2. Material e Métodos

Os butiás (*B. odorata*) foram colhidos por um período de quatro meses (de dezembro de 2019 a março de 2020) no Centro Agropecuária da Palma localizado na Universidade Federal de Pelotas- Campus Capão do Leão (Latitude 31° 52' 00" S; Longitude 52° 21' 24" W Greenwich; Altitude de 13,24 metros). Foram coletados 10 frutos (a partir de diferentes cachos) de três acessos em cinco estádios de crescimento e desenvolvimento [Verde pequeno (VP), Verde grande (VG), verde/maduro (VM), maduro (M) e após a abscisão ou completamente maduro (AB)]. Imediatamente após a colheita, os butiás foram mensurados em relação ao diâmetro e ao comprimento (uso de paquímetro), pesados individualmente, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultra freezer (- 70°C). Foram selecionados 10 frutos de cada estádio nos três acessos, que foram liofilizadas inteiros e posteriormente separados do caroço, para realização das análises por cromatografia líquida ultra-rápida acoplada a um espectrômetro de massa com fonte de ionização por eletrospray e analisadores do tipo quadrupolo e tempo de voo (LC-ESI-qTOF-MS).

2.1. Identificação e quantificação de compostos fenólicos e ácidos orgânicos por LC-ESI-qTOF-MS

A identificação e quantificação de compostos fenólicos foi realizado de acordo com método descrito por Hoffmman et al. (2017). Para tanto, pesou-se 100 mg de polpa de butiá liofilizada em microtubos de centrifuga de 2 mL. Adicionou-se 1 mL de solução de metanol:água (3:1; acidificada com 0,1 % de ácido fórmico). A mistura foi agitada em

vortex por 1 min. Os extratos foram sonicados por 15 min a uma frequência de 40 kHz, em temperatura ambiente. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 9900 x g por 15 min. Coletou-se o sobrenadante e realizou-se uma nova extração a partir do resíduo. Os sobrenadantes foram misturados e filtrados com filtro de membrana de PVDF (0,22 µM), e posteriormente transferidos para vials.

Para a quantificação compostos fenólicos, 10 µL da amostra de cada estágio dos três acessos foram injetados em um cromatógrafo líquido ultra rápido (Prominence UFLC, Shimadzu, Japão) acoplada a um espectrômetro de massa com fonte de ionização por eletrospray e analisadores do tipo quadrupolo e tempo de voo (Maxis Impact, BrukerDaltonics, Bremen, Alemanha). Foi utilizado como fase móvel, água acidificada com ácido fórmico 0,1% (eluyente A) e acetonitrila acidificada com ácido fórmico 0,1% (eluyente B). A coluna utilizada nas corridas para separação dos compostos foi uma Cogent Bidentate C18 (2,2 µm 120 Å - 100 x 2,1 mm) (MicroSolv Technology Corporation, Leland NC, EUA) e uma pré-coluna C18 (2,0 x 4 mm). Os espectros foram adquiridos em um intervalo de m/z 50–1200, no modo de ionização negativa. Os parâmetros para os modos de ionização negativo foram: voltagem capilar 3,5 e 4,5 kV; fluxo de gás de secagem 8,0 e 9,0 L min⁻¹; pressão do gás de nebulização 2,0 bar; temperatura do gás de secagem 180 e 200 °C; Colisão RF 500 Vpp; tempo de transferência 120 e 60 µs e armazenamento pré-pulso de 8,0 e 5,0 µs. A energia de colisão correspondente foi: m/z 100 15 eV; m/z 500 35 eV; e m/z 1000 50 eV, foi utilizado nitrogênio como gás de colisão. Para a calibração do equipamento, foi utilizado o formato de sódio 10 mM.

A análise quantitativa se deu através da construção de uma curva de calibração para cada padrão fenólico disponível (Tabela 1. Os compostos identificados que não possuíam padrão, foram determinados a partir da massa e perfil de fragmentação. Os dados de MS e MS/MS foram processados usando o Data Analysis versão 4.0 (BrukerDaltonics, Bremen, Alemanha) para a quantificação dos compostos tanto identificados por padrões e os que foram identificados pela massa e perfil de fragmentação. Os compostos foram identificados comparando os valores observados de m/z , espectro de massa e padrões de fragmentação com bancos de dados online (METLIN, KEGG, PubChem, FooDB e ReSpect), com precisão de massa de 5 ppm. As identidades da catequina, epicatequina, ácido elágico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido hidroxibenzóico, kaempferol e rutina foram confirmadas com padrões externos (Sigma Aldrich).

Tabela 1: Curva de calibração de padrões para quantificação de compostos fenólicos

Composto	Curva (ng ml ⁻¹)	Equação da reta	R ²
Catequina		$y = 16107x - 22743$	R ² = 0,9604
(-)-Epicatequina		$y = 16134x - 21265$	R ² = 0,9832
Ácido 4-hidroxibenzoico	0,5, 2, 4, 6, 8, 10,	$y = 5637,7x - 5397,8$	R ² = 0,9896
Ácido Cafeico	12 e 14	$y = 15500x - 15714$	R ² = 0,9809
Quercetina		$y = 26410x - 41373$	R ² = 0,9956
Ácido p-cumarico		$y = 11756x - 4420,4$	R ² = 0,9865
Ácido Ferrulico		$y = 4850,6x - 4322,8$	R ² = 0,9941
Luteolina		$y = 18253x - 10998$	R ² = 0,9947

2.2. Quantificação de ácido L-ascórbico

A extração do ácido L-ascórbico foi realizada através de uma adaptação do método descrito por Vinci (1995). Para isso adicionaram-se 50 mg de amostra liofilizada em 5 ml de solução extratora (água ultra pura acidificada com 4,5 % de ácido metafosfórico) e agitou-se em vórtex por 1 min. Centrifugou-se por 10 min, a 10.000 rcf, a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e transferido para microtubos de 2 ml, e diluído 1:1 em solução extratora. Após, as amostras foram filtradas com filtros de membrana de PVDF (0,22 µM) e transferidos para vials. Em seguida, 10 µL do extrato foram injetados em cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência equipado com detector de arranjo diodo (DAD) (UFLC, Shimadzu, Japão). Foi utilizada uma coluna cromatográfica Hyperclone ODS C18 (Phenomenex, CA, USA), e como fase móvel, utilizou-se solução de água ultra pura com 0,1% de ácido fórmico (eluente A) e metanol acidificado com 0,1% de ácido fórmico (eluente B). O fluxo utilizado foi de 0,2 ml min⁻¹ e a temperatura da coluna de 30 °C. O gradiente utilizado foi de: 0,10 min – 30% B, 5,00 min – 30% B, 7,00 min – 100% B,

9,00 min – 100% B, 10,00 min – 30% B, e terminando aos 18 min com 30% de B. A quantificação foi baseada em uma curva analítica utilizando padrão de ácido L-ascórbico (Sigma-Aldrich). A curva foi construída utilizando os pontos (2,5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 ng mL⁻¹), e a equação da reta foi dada por ($y=7694 x - 7303$) com $R^2= 0,9992$. Os resultados foram expressos em g 100 g⁻¹, sendo esta análise realizada em triplicata.

2.3. Quantificação de ABA e derivados (ABA-GE, DPA e PA)

A determinação da concentração de ABA e seus derivados foi realizada de acordo com Perin et al. (2018). Brevemente, pesaram-se 100 mg de amostra liofilizada em microtubos de 2 ml, adicionou-se 1 ml de Metanol (80 %) e agitou-se em vortex durante 1 min. Após, centrifugou-se a 18.500 x g por 5 min. O sobrenadante foi recolhido e transferido para um novo microtubo de 2 ml, e o resíduo foi re-extraído (1 vezes), conforme as etapas anteriores. Em seguida, uniu-se o sobrenadante da primeira extração com o sobrenadante da re-extração e filtrou-se o extrato com filtro de membrana de PVDF (0,22 µM). Em seguida, foram injetados 10 µL de extrato em cromatógrafo a líquido de ultra-alta eficiência (UFLC, Shimadzu, Japão) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução (tipo quadrupolo-tempo de vóo) (Maxis Impact, BrukerDaltonics, Bremen, Germany). Para a separação dos compostos foi utilizada uma coluna Hyperclone ODS C18 (Phenomenex, CA, USA), utilizando solução de água com 0,1% de ácido fórmico (eluente A) e acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico (eluente B), como fase móvel. O fluxo utilizado foi de 0,2 ml min⁻¹ e a temperatura da coluna de 40 °C. Para a separação utilizou-se um gradiente: 0,00 min – 20% B, 2,00 min - 30% B, 6,00 min – 38% B, 8,00 min – 50% B, 10,00 – 70% B, 12,00 min – 20% B, e terminando aos 15 min com 20% B. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização negativo, com espectros adquiridos ao longo de uma faixa de massa de m/z 50 a 1200. Os parâmetros de capilaridade foram: voltagem do capilar em 3,5 kV, gás de secagem em 8,0 L min⁻¹ e temperatura de 180 °C, pressão do gás de nebulização de 2 bar, colisão de RF de 300 Vpp, tempo de transferência 120 µS e armazenamento pré-pulso de 8 µS. O equipamento foi calibrado com formiato de sódio 10 mM. Para o processamento dos dados de MS e MS/MS foi utilizado o software Data analysis 4.0 (BrukerDaltonics, Bremen, Alemanha). Para a quantificação de ABA, ABA-GE, PA e DPA foi utilizada uma curva analítica de ABA. A curva foi construída utilizando os pontos (2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0, 12,0 ng mL⁻¹), e a equação da reta foi dada por ($y=12981 x - 9207,1$) com $R^2= 0,9926$, sendo esta análise realizada em triplicatas.

2.4. Desenho experimental e análise estatística

Os experimentos foram realizados em delineamento casualizado. Para cada acesso, foram selecionados 10 frutos em cada estágio de crescimento e desenvolvimento, e na realização das análises realizaram-se triplicatas analíticas. Para determinar as significâncias das diferenças realizou-se a análise de variância ANOVA e teste de Tukey ($p \leq 0,05$). A análise estatística foi realizada utilizando o programa Rstudio. Para melhor visualizar as diferenças entre os acessos e seu comportamento nos diferentes estádios de crescimento e desenvolvimento, uma análise de componentes principais (PCA) foi realizada usando as seguintes variáveis dependentes: compostos fenólicos, ácidos orgânicos, ácido L-ascórbico, ácido abscísico e derivados. Uma transformação de log foi aplicada antes da análise para evitar o efeito de diferentes ordens de magnitude das variáveis. As análises de PCA foram realizadas utilizando o software MetaboAnalyst 3.0.

3. Resultados

3.1. Estádios de crescimento e desenvolvimento

Os butiás dos três acessos foram colhidos nos estádios verde pequeno (VP), verde grande (VG), verde/maduro (VM), maduro (M) e após a abscisão (AB) (Figura 1). Em média, no ciclo de crescimento e desenvolvimento compreendido entre o estágio VP e o AB foi possível observar que os frutos de butiá apresentaram um período de quatro meses para o crescimento e desenvolvimento.

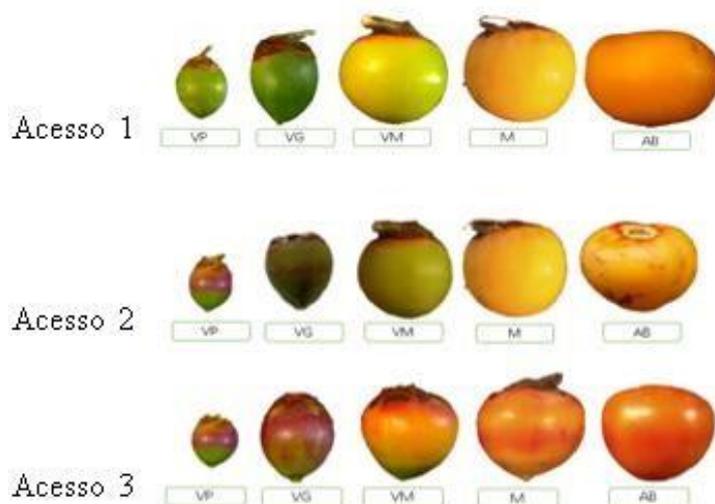


Figura 6: Aspecto visual dos butiás durante o crescimento e desenvolvimento [Verde pequeno (VP), Verde grande (VG), verde/maduro (VM), maduro (M) e após a abscisão ou completamente maduro (AB)]. Foi nos butiás desses cinco estádios de crescimento e desenvolvimento que se realizaram as análises de compostos fenólicos, ácido L-ascórbico, ABA e seus derivados.

De modo geral, as variações foram mais acentuadas no diâmetro e na massa, no intervalo do VP ao M, o que é coerente com o fato de serem os estádios mais caracterizados como de crescimento. Mesmo, assim, dependendo do acesso (Acesso 1), também houve incremento de massa durante o amadurecimento, resultado do aumento do diâmetro (Tabela 2). Assim, ao final do desenvolvimento os frutos atingiram um diâmetro médio de 29,120mm no Acesso 1, 28,686mm no acesso 2 e 29,308mm no Acesso 3, o qual não diferiu significativamente entre os Acessos 2 e 3. Quanto ao comprimento, atingiram uma média de 23,384mm no acesso 1, 24,870mm no Acesso 2 e 28,222mm no acesso 3, o qual não diferiu significativamente entre os Acessos 1 e 2. Na comparação entre os acessos, é possível observar que os frutos do acesso 3 apresentaram comprimento maior do que os frutos dos demais acessos nos cinco estádios de crescimento e desenvolvimento. A massa dos frutos atingiu em média 10,089g no Acesso 1, 11,832g no Acesso 2 e 11,379g no acesso 3, sendo que os acessos 2 e 3 não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 2)

Tabela 2: Diâmetro, comprimento e massa média de frutos de *Butia odorata* de três acessos, em cinco estádios de crescimento e desenvolvimento.

Composto	Acesso	Estádio									
		VP		VG		VM		M		AB	
Diâmetro (mm)	1	17,21 ± 1,50	eA	21,09 ± 1,20	dA	23,80 ± 2,03	cB	26,94 ± 1,18	bA	29,12 ± 1,43	aA
	2	17,06 ± 1,02	dA	20,84 ± 1,88	cA	26,69 ± 1,03	bA	26,88 ± 1,38	bA	28,67 ± 0,60	aA
	3	16,43 ± 0,89	dA	20,59 ± 1,36	cA	26,40 ± 2,08	bA	28,05 ± 3,72	abA	27,64 ± 1,46	aA
Comprimento (mm)	1	21,87 ± 1,81	aB	23,26 ± 1,17	aB	23,35 ± 0,83	aB	23,36 ± 0,75	aB	23,38 ± 0,90	aB
	2	21,73 ± 1,55	bB	23,27 ± 1,01	abB	23,94 ± 2,35	aAB	23,81 ± 0,53	aB	24,87 ± 1,38	aB
	3	26,71 ± 0,97	aA	26,69 ± 0,61	aA	23,7 ± 3,27	bA	28,12 ± 1,95	aA	28,22 ± 1,76	aA
Massa (g)	1	3,48 ± 0,93	cA	5,78 ± 0,91	bA	7,27 ± 1,51	bB	9,57 ± 0,86	aB	10,89 ± 1,44	aA
	2	3,36 ± 0,31	dA	5,83 ± 0,75	cA	10,66 ± 0,96	baA	11,43 ± 0,31	abA	11,83 ± 0,89	aA
	3	3,11 ± 0,42	cA	5,85 ± 0,83	bA	9,95 ± 1,60	aA	11,27 ± 1,15	aA	11,38 ± 1,98	aA

VP: verde pequeno; VG: verde grande; VM: Verde maduro; M: maduro; AB: abscisão. Letras minúsculas iguais no mesmo acesso indicam que os resultados não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Letras maiúsculas iguais nos mesmos estádios indicam que os resultados não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%, da média e desvio padrão dos três Acessos e cinco estádios de crescimento e desenvolvimento.

3.2. Identificação e quantificação de Compostos Fenólicos por LC-ESI-qTOF-MS

Através das análises de LC-ESI-qTOF-MS foi possível identificar 13 compostos fenólicos. As concentrações dos compostos fenólicos identificados no presente estudo estão expostos na (Tabela 3). Dentre estes, oito são classificados como ácidos fenólicos, sendo dois deles derivados do ácido benzoico (Hidroxibenzoico), sendo identificados como ácido-4-benzoico e o ácido siríngico. Os demais ácidos fenólicos identificados são derivados do ácido cinâmico (hidroxicinâmico), sendo eles o ácido clorogênico, o ácido cafeico, o ácido ρ -coumárico, e o ácido ferúlico.

Tabela 3 - Identificação dos compostos presentes nos 5 estádios de crescimento e desenvolvimento dos frutos de *Butia spp* derivados da análise de compostos fenólicos por LC-ESI-qTOF-MS no modo negativo

#	TR (min)	m/z experimental	m/z teórica	Erro (ppm)	Formula molecular [M-H]-	mSigma	Identificação
1	5,58	289,0718	289,0731	0	C15H13O6	31,3	Catequina
2	6,07	289,0717	289,0731	0	C15H13O6	27,1	(-)-Epicatequina
3	5,59	353,0873	353,0878	1,3	C16H17O9	44,1	Ácido clorogênico
4	6,13	137,024	137,0244	2,6	C7H5O3	5,2	Ácido 4-Hydroxbenzóico
5	6,15	179,0347	179,035	1,4	C9H7O4	23	Ácido cafeico
6	6,07	197,0448	197,0455	3,6	C9H9O5	10,6	Ácido ciringico
7	6,78	609,1463	609,1461	-0,2	C27H29O16	44,9	quercetina-3-O- rutinosídeo
8	6,9	163,0394	163,0401	4,3	C9H7O3	6,1	Ácido <i>p</i> -coumarico
9	6,34	193,0502	193,052	2,3	C10H9O4	34,2	Ácido ferúlico
10	9,13	285,0391	285,0405	4,9	C15H9O6	45,5	Luteolina
11	10,24	301,0705	301,0718	4,1	C16H13O6	20,5	Hesperetin
12	12,07	255,0657	255,0663	2,3	C15H11O4	44,2	Pinocembrina
13	1,67	133,0143	133,0142	-0,6	C4H5O5	6,2	Ácido (\pm)-malico
14	2,33	191,0197	191,0197	0,2	C6H7O7	13,6	Ácido citrico
15	9,2	385,1504	385,1504	-0,1	C18H25O9	42,9	Metilsiringina
16	9,44	427,1613	427,161	-0,8	C20H27O10	44,8	Ptelatoside B

Dentre os ácidos fenólicos identificados o ácido clorogênico apresentou maior concentração, principalmente no primeiro estádio de crescimento e desenvolvimento do fruto (VP), atingindo concentrações de 68,431, 61,407 e 57,106 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos Acessos 1, 2 e 3, respectivamente. De modo geral, pode-se observar uma redução e/ou oscilação das

concentrações destes compostos durante a passagem dos estádios de crescimento e desenvolvimento destes frutos. Outro fator a se observar é a presença do ácido p-cumárico apenas no Acesso 3, apontando a diversidade existente dentro de uma mesma espécie.

Outro grupo de fenólicos identificados nos frutos de butiá foram os flavonoides, sendo dois flavanóis (catequina e epicatequina), um flavonol (quercetina-3-O-rutinosídeo), uma flavona (luteolina) e duas flavanonas (hesperetina e pinocembrina). Com relação a esses compostos, tanto a catequina quanto a epicatequina tiveram suas concentrações reduzidas com a mudança dos estádios de crescimento e desenvolvimento dos frutos, apresentando uma concentração de 91,979, 95,236 e 100,710 $\mu\text{g g}^{-1}$ no primeiro estágio (VP) dos Acessos 1, 2 e 3, respectivamente; e uma concentração de 54,229, 16,975 e 14,891 $\mu\text{g g}^{-1}$ no último estágio (AB) dos Acessos 1, 2 e 3, respectivamente. Já os demais flavonoides encontrados apresentaram oscilações em suas concentrações durante a passagem de um estágio para outro. A quercetina-3-O-rutinosídeo teve suas maiores concentrações observadas nos primeiros estádios (VP e VG). Já a Luteolina demonstrou um comportamento diferente em cada acesso: no acesso 1 as maiores concentrações foram observadas no terceiro estágio (VM), atingindo 1,311 $\mu\text{g g}^{-1}$; já o Acesso 2 e 3 tiveram as maiores concentrações presentes no último estágio (AB), com concentrações de 1,965 e 1,335 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Concentração dos compostos fenólicos ($\mu\text{g g}^{-1}$) identificados em três acessos de *Butia odorata*. em cinco estádios de desenvolvimento dos frutos.

Composto	Acesso	Estádio									
		VP		VG		VM		M		AB	
Catequina	1	91,979 \pm 4,141	aB	74,938 \pm 3,258	bA	69,697 \pm 1,898	bA	60,086 \pm 3,263	cA	54,229 \pm 4,242	cA
	2	95,236 \pm 3,469	aAB	78,734 \pm 3,275	bA	47,339 \pm 3,168	cB	29,016 \pm 2,425	dB	16,975 \pm 2,310	eB
	3	100,710 \pm 2,007	aA	34,559 \pm 3,005	bcB	42,183 \pm 4,288	bB	29,554 \pm 3,799	cB	14,891 \pm 5,628	dB
(-)-Epicatequina	1	89,023 \pm 6,298	aA	75,845 \pm 2,366	abB	66,953 \pm 3,222	bcC	56,834 \pm 5,381	cdA	49,430 \pm 6,800	dA
	2	82,865 \pm 8,156	aA	78,990 \pm 2,779	aB	47,923 \pm 2,882	bB	29,515 \pm 1,789	cB	17,914 \pm 1,234	dB
	3	55,36 \pm 1,674	bB	83,211 \pm 4,336	aA	55,179 \pm 5,014	bB	41,942 \pm 6,510	cB	27,911 \pm 4,833	dB
Ácido Clorogênico	1	68,43 \pm 11,392	aA	20,955 \pm 0,309	bcB	22,890 \pm 1,234	bcB	33,903 \pm 2,191	bAB	17,281 \pm 1,448	cB
	2	61,407 \pm 6,204	aA	33,121 \pm 3,280	cA	49,482 \pm 4,145	bA	22,711 \pm 0,626	dB	20,784 \pm 1,535	dB
	3	57,106 \pm 2,162	aA	25,214 \pm 3,594	cB	28,881 \pm 4,591	cB	42,799 \pm 8,742	bA	32,989 \pm 3,277	bcA
Ácido 4-hidroxibenzoico	1	3,136 \pm 0,076	aC	2,808 \pm 0,112	bA	2,740 \pm 0,074	bA	2,648 \pm 0,072	bA	2,660 \pm 0,079	bA
	2	3,440 \pm 0,102	aB	2,945 \pm 0,069	bA	2,348 \pm 0,100	cB	2,058 \pm 0,052	dC	2,036 \pm 0,078	dB
	3	3,716 \pm 0,025	aA	2,735 \pm 0,139	bA	2,392 \pm 0,110	cB	2,275 \pm 0,083	cB	2,131 \pm 0,094	cB
Ácido Cafeico	1	4,128 \pm 1,238	aC	2,226 \pm 0,035	bc	2,627 \pm 0,520	abB	2,254 \pm 0,015	bB	2,329 \pm 0,031	bB
	2	18,275 \pm 1,277	aB	5,126 \pm 0,555	bB	4,036 \pm 0,474	bcA	2,608 \pm 0,105	cB	2,534 \pm 0,123	cB
	3	44,131 \pm 0,314	aA	14,870 \pm 0,257	bA	3,236 \pm 0,046	cAB	3,449 \pm 0,241	cA	3,098 \pm 0,160	cA
Ácido Siríngico	1	1,653 \pm 0,042	aA	1,695 \pm 0,015	aA	1,661 \pm 0,014	aA	1,695 \pm 0,009	aA	1,655 \pm 0,062	aA
	2	1,641 \pm 0,027	aA	1,738 \pm 0,054	aA	1,679 \pm 0,066	aA	1,698 \pm 0,022	aA	1,683 \pm 0,079	aA
	3	1,556 \pm 0,025	aB	1,549 \pm 0,009	aB	1,586 \pm 0,025	aA	1,560 \pm 0,014	aB	1,587 \pm 0,025	aA

ND: Não detectado; VP: verde pequeno; VG: verde grande; VM: Verde maduro; M: maduro; AB: abscisão. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença entre os estádios dentro do mesmo acesso pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Letras maiúsculas iguais nos mesmos estádios indicam que os resultados não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%, da média e desvio padrão dos três Acessos e cinco estádios de crescimento e desenvolvimento.

Continuação da Tabela 4: Concentração dos compostos fenólicos ($\mu\text{g g}^{-1}$) identificados em três acessos de *Butia odorata* em cinco estádios de desenvolvimento dos frutos.

Composto	Acesso	Estádio									
		VP		VG		VM		M		AB	
Quercetina-3-O-Rutinosídeo	1	132,758 ± 2,665	aA	89,306 ± 5,473	bC	122,932 ± 6,006	aA	77,873 ± 4,620	bcB	70,930 ± 7,516	cB
	2	79,631 ± 3,929	bC	111,405 ± 6,779	aB	78,934 ± 15,190	bB	80,898 ± 4,755	bB	38,064 ± 2,159	cC
	3	117,858 ± 8,227	bcB	159,106 ± 9,547	aA	143,904 ± 14,236	abA	120,78 ± 12,571	bcA	100,243 ± 12,327	cA
Ácido p-cumarico	1	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
	2	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
	3	3,455 ± 0,194	a	0,931 ± 0,019	b	0,962 ± 0,070	B	0,881 ± 0,033	B	0,965 ± 0,040	b
Ácido Ferúlico	1	2,151 ± 0,133	aB	2,039 ± 0,077	aB	2,115 ± 0,026	aB	2,199 ± 0,124	aB	2,317 ± 0,129	aAB
	2	2,690 ± 0,254	aA	2,489 ± 0,142	aA	2,594 ± 0,313	aA	2,769 ± 0,262	aA	2,705 ± 0,219	aA
	3	ND	-	2,047 ± 0,013	aB	2,012 ± 0,065	aB	2,141 ± 0,138	aB	2,206 ± 0,117	aB
Luteolina	1	ND	-	1,252 ± 0,046	aA	1,311 ± 0,128	aA	1,250 ± 0,051	aA	1,295 ± 0,027	aB
	2	1,242 ± 0,012	b	1,240 ± 0,014	bA	1,351 ± 0,039	bA	1,900 ± 0,152	aA	1,965 ± 0,153	aA
	3	ND	-	1,244 ± 0,010	aA	1,240 ± 0,007	aA	1,280 ± 0,021	aB	1,335 ± 0,147	aB
Hesperetina	1	2,014 ± 0,008	bA	1,978 ± 0,032	bA	2,141 ± 0,054	bA	2,502 ± 0,069	bB	8,747 ± 1,213	aA
	2	2,054 ± 0,045	bA	2,029 ± 0,056	bA	2,358 ± 0,122	bA	4,570 ± 0,131	aA	4,487 ± 0,574	aB
	3	ND	-	2,013 ± 0,030	aA	2,313 ± 0,083	aA	2,550 ± 0,288	aB	3,583 ± 1,578	aB
Pinocembrina	1	2,031 ± 0,004	cA	2,011 ± 0,025	cA	2,042 ± 0,027	cB	4,007 ± 0,121	bA	13,075 ± 0,759	aB
	2	2,039 ± 0,097	bA	2,033 ± 0,043	bA	2,212 ± 0,113	bB	3,766 ± 0,626	aA	4,494 ± 0,566	aC
	3	2,021 ± 0,012	cA	2,017 ± 0,014	cA	3,002 ± 0,291	bA	3,154 ± 0,049	bA	28282 ± 0,070	aA

ND: Não detectado; VP: verde pequeno; VG: verde grande; VM: Verde maduro; M: maduro; AB: abscisão. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença entre os estádios dentro do mesmo acesso pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Letras maiúsculas iguais nos mesmos estádios indicam que os resultados não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%, da média e desvio padrão dos três Acessos e cinco estádios de crescimento e desenvolvimento.

Continuação da Tabela 4: Concentração dos compostos fenólicos ($\mu\text{g g}^{-1}$) identificados em três acessos de *Butia odorata* em cinco estádios de desenvolvimento dos frutos

Composto	Acesso	Estádio									
		VP		VG		VM		M		AB	
Metilsiringina	1	ND	-	ND	-	2,010 \pm 0,020	cB	3,680 \pm 0,190	bC	8,509 \pm 0,798	aC
	2	ND	-	ND	-	2,332 \pm 0,095	cB	16,730 \pm 2,365	bA	44,036 \pm 5,437	aB
	3	ND	-	ND	-	8,079 \pm 1,022	cA	10,407 \pm 0,858	bB	62,696 \pm 0,995	aA

ND: Não detectado; VP: verde pequeno; VG: verde grande; VM: Verde maduro; M: maduro; AB: abscisão. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença entre os estádios dentro do mesmo acesso pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Letras maiúsculas iguais nos mesmos estádios indicam que os resultados não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%, da média e desvio padrão dos três Acessos e cinco estádios de crescimento e desenvolvimento.

3.3 Ácido Ascórbico e ácidos orgânicos

A concentração de AsA variou ao longo dos estádios de desenvolvimento dos frutos (Tabela 5). De modo geral, esta concentração aumentou do estágio VP ao VG, e então reduziu até o estágio M, quando aumentou novamente até o estágio AB. Neste estágio final, os frutos atingiram 9,602, 4,604 e 5,309 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AsA nos Acessos 1, 2 e 3, respectivamente. Além disso, é possível observar que, em todos os estádios, o Acesso 1 apresentou conteúdo maior deste composto comparado com os demais acessos.

Foi possível identificar também dois ácidos orgânicos (Tabela 5) nos frutos de butiá sendo eles o ácido cítrico e o ácido málico. Tanto o ácido málico quanto o ácido cítrico apresentaram variações de concentração durante a passagem de um estágio para o outro, apresentando as maiores concentrações nos estádios intermediários de crescimento e desenvolvimento dos frutos. Para o ácido cítrico é possível observar o maior pico de concentração ao atingir o segundo estágio de crescimento e desenvolvimento (VG), apresentando um declínio na concentração, a partir do terceiro estágio (VM). Já o ácido málico, apresentou o maior pico de concentração no estágio três (VM), com exceção do Acesso 2, que apresentou o maior pico no estágio 2 (VG). Para os três acessos, houve um declínio nas concentrações de ácido málico até atingir o estágio final de crescimento e desenvolvimento dos frutos (AB). O ácido málico foi o composto desta classe encontrado em maior concentração nestes frutos.

Tabela 5: Concentração de ácido ascórbico e ácidos orgânicos ($\mu\text{g g}^{-1}$) em frutos de três acessos de *Butia odorata*, em cinco estádios de desenvolvimento dos frutos

Composto	Acesso	Estádios									
		VP		VG		VM		M		AB	
Ácido Ascórbico	1	6.359±1.142	bA	8.195 ±0.956	abA	6.382±0.098		8.557±0.786	aA	8.557±0.786	aB
	2	3.002 ±0.125	bB	5.420±0.303	aB	5.302±0.757		4.342±0.676	aB	4.604±0.149	aB
	3	2.067±0.031	bB	5.354±1.249	aB	4.888±0.283		2.58 ^b ±0.434	bC	5.309±0.092	aB
Ácido Cítrico	1	198.246±19.322	bcB	239.795±1.739	aC	215.733 ±7.371		194.953 ±1.538	cA	223.751±4.790	abA
	2	257.431 ±12.514	bA	313.403±7.484	aA	215.395±3.454		204.015±18.702	cdA	180.033±5.670	dA
	3	225.934 ±8.723	aAB	271.268±16.350	aB	251.526 ±28.198		227.182±48.177	aA	223.300±54.857	aA
Ácido Málico	1	2193.118 ± 155,465	abcA	2583.040± 232,133	aA	2504.126±163.614		2154.643±99.255	bAB	1816.910 ±101.449	cA
	2	1993.891±165.660	bAB	2471.247 ±161.490	aAB	2578.587±199.107		2367.548±80.332	abA	1372.654±43.373	cB
	3	1718.743±73.242	cdB	2078.150±150.387	bB	2389.610±75.623		1931.955±149.474	bcAB	1487.363±58.031	dB

ND: Não detectado; VP: verde pequeno; VG: verde grande; VM: Verde maduro; M: maduro; AB: abscisão. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença entre os estádios dentro do mesmo acesso pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Letras maiúsculas iguais nos mesmos estádios indicam que os resultados não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%, da média e desvio padrão dos três Acessos e cinco estádios de crescimento e desenvolvimento.

3.3. Ácido abscísico e derivados

A concentração de ABA aumentou ao longo do crescimento e desenvolvimento dos butiás (Figura 2). Esse aumento foi mais pronunciado a partir do estágio VG nos Acessos 2 e 3, e a partir do estágio VM no Acesso 1. A partir do estágio M, os Acessos 1 e 2 apresentaram maior concentração de ABA, comparados ao Acesso 3, atingindo, em média $6,520 \mu\text{g g}^{-1}$, $6,520 \mu\text{g g}^{-1}$ e $2,809 \mu\text{g g}^{-1}$, nos Acessos 1, 2 e 3, respectivamente, no último estágio (AB).

A concentração dos derivados de ABA também aumentou ao longo do crescimento e desenvolvimento dos frutos (Figura 2). De forma distinta ao observado com o conteúdo de ABA, o acesso 3 apresentou maiores concentrações de ABA-GE e DPA do que os demais Acessos no estágio AB; e, juntamente com o Acesso 2, os maiores valores de PA, neste mesmo estágio. Além disso, é possível observar que o composto que atingiu as maiores concentrações foi o composto PA, nos Acessos 2 e 3.

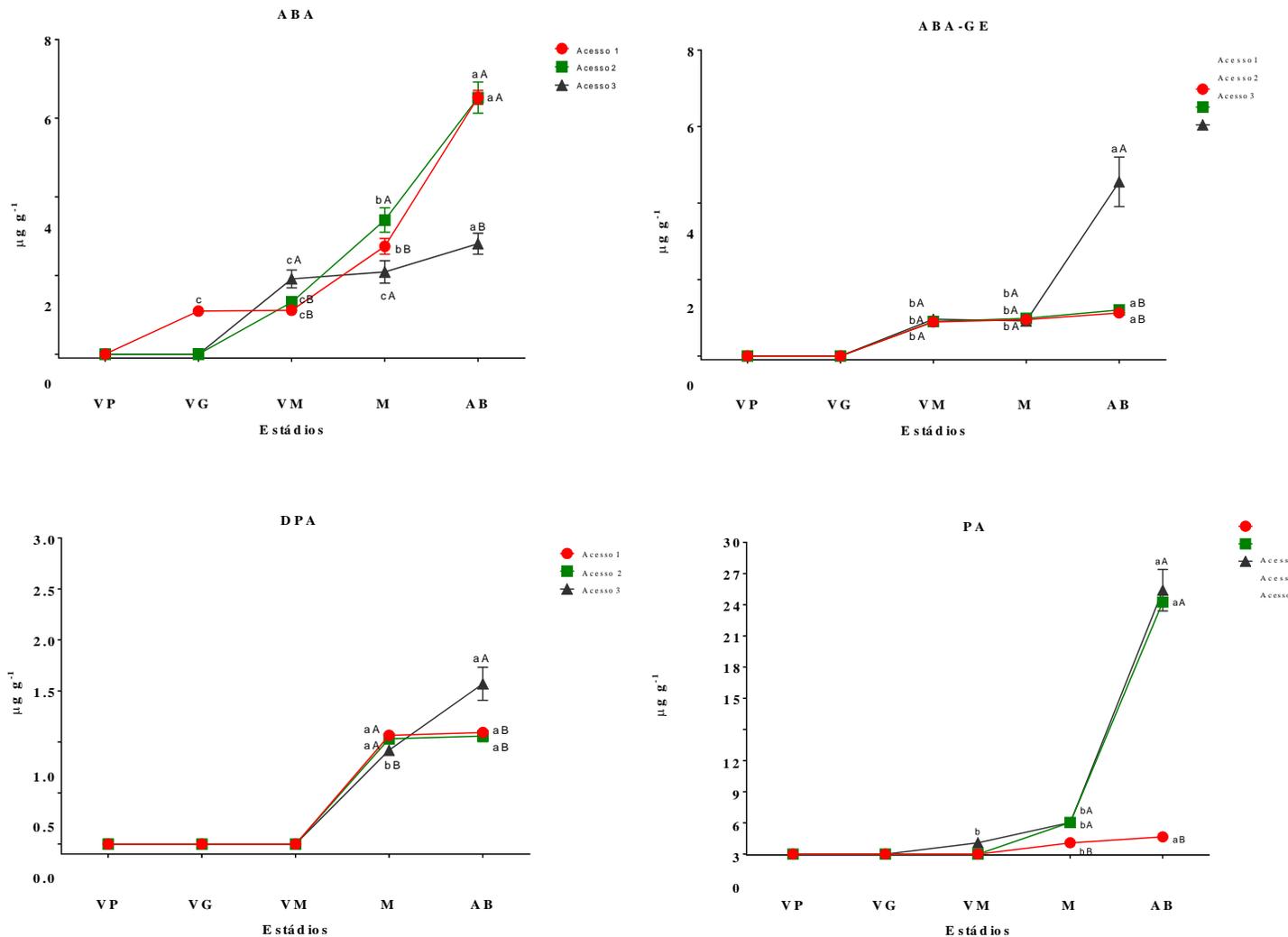


Figura 7: Concentração de ABA, ABA-GE, DPA e PA ($\mu\text{g g}^{-1}$) em frutos de *B. odorata* de três diferentes acessos e cinco estádios de crescimento e desenvolvimento. ND: Não detectado; VP: verde pequeno; VG: verde grande; VM: Verde maduro; M: maduro; AB: abscisão. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença entre os estádios dentro do mesmo acesso pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença entre os acessos, no mesmo estádio, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Letras maiúsculas iguais nos mesmos estádios indicam que os resultados não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%, da média e desvio padrão dos três Acessos e cinco estádios de crescimento e desenvolvimento.

3.4. Análise de Componentes principais

Para visualização da influência global dos compostos nos diferentes estádios de crescimento e desenvolvimento e dos diferentes acessos, realizou-se uma análise de componentes principais (PCA) levando em consideração algumas das variáveis independentes analisadas (compostos fenólicos, ácidos orgânicos, ácido ascórbico, ácido abscísico e seus derivados).

Os dois primeiros componentes principais (PC) explicam 83,9% da variação total, onde PC1 e PC2 explicam 69,3% e 14,6% respectivamente. O PC2 indica claramente a diferença do acesso 3 em relação aos demais acessos; enquanto o PC1 indica que a principal variação observada foi entre os estádios. É possível observar também que os estágios VP e VG se assemelham em termos de composição em todos os acessos (Figura 3A).

A partir da análise biplot (derivada do PCA), foram obtidas as variáveis que mais contribuíram para dispersão dos acessos (Figura 3B). Essas variáveis foram identificadas como metilsiringina, p-cumarico e ácido cafeico, onde a maior concentração desses compostos foi observada no acesso 3 (Tabela 4).

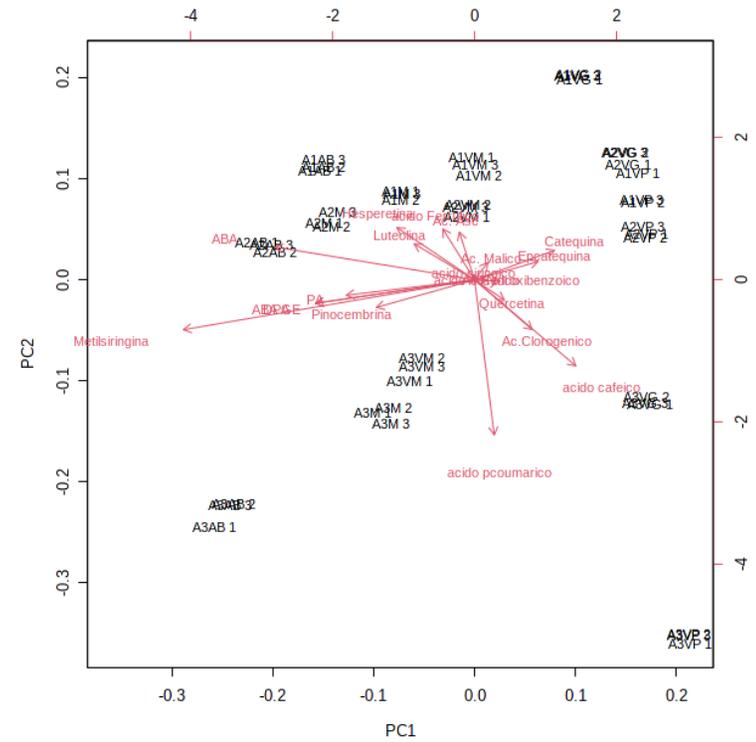
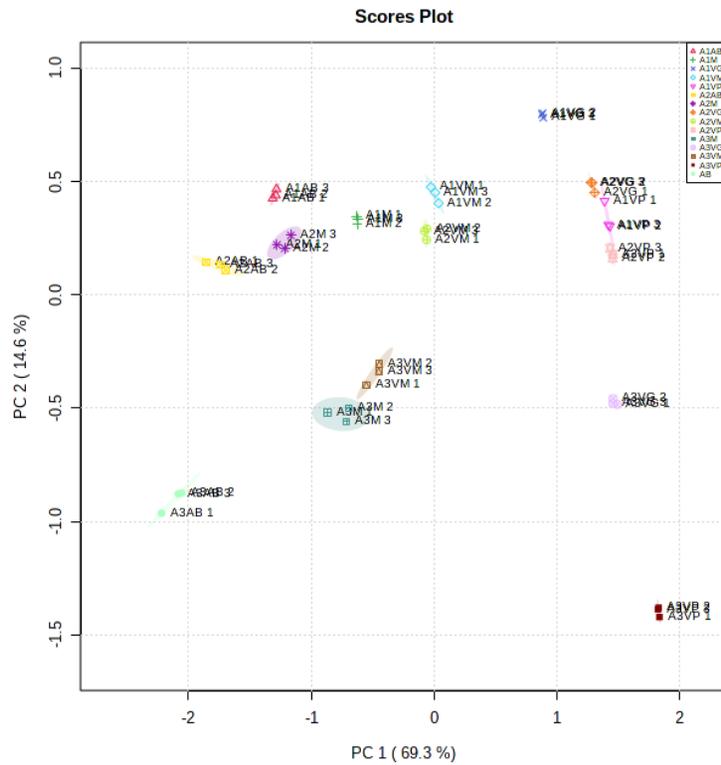


Figura 8: Análise de componentes principais dos dados de compostos fenólicos, ácido ascórbico, ácido abscísico, ácido ascórbico e ácidos orgânicos de frutos de *B. odorata* de três diferentes acessos e cinco estádios de crescimento e desenvolvimento. (A) Score plot e (B) loading plot.

4. Discussão

Os estudos realizados com frutos de butiá produzidos no sul do Brasil apresentam como foco a caracterização de compostos bioativos no fruto maduro e o desenvolvimento de produtos derivados (EGEA; PEREIRA-NETTO, 2019; FERRÃO et al., 2013; HOFFMANN et al., 2014). Entretanto, estudos que visam compreender os processos que levam ao acúmulo de compostos do metabolismo especializado como fenólicos, AsA, bem como sua relação com o acúmulo de ABA ainda não foram bem elucidados. Deste modo, esse estudo visou determinar a concentração de compostos fenólicos, ABA e AsA em cinco estádios de crescimento e desenvolvimento em três acessos, cultivados na cidade de Pelotas-RS.

Com relação aos aspectos dimensionais, todas as variáveis avaliadas apresentaram como esperado um aumento, sendo mais evidente no diâmetro e massa. Apesar disso, os valores médios de diâmetro e massa observados no fruto maduro foram inferiores aos observados por Ferrão et al (2013). Neste estudo, o diâmetro variou de 18,20 a 41,40mm, a altura do fruto variou de 15,65 a 31,25 mm e o peso de 6,52 a 27,47 g (FERRÃO *et al.*, 2013). Desta forma, o genótipo da planta, o local de cultivo e as diferentes condições edafoclimáticas tem influência direta no desenvolvimento das características físicas dos frutos de butiá.

Com relação aos compostos do metabolismo especializado, pouco se sabe sobre a composição e concentração em frutos de butiá. De acordo com Hoffmann et al. (2017), frutos de *Butia spp.* maduros armazenados por 12 meses, cultivados no mesmo local que os acessos descritos no presente estudo, apresentam 13 compostos fenólicos (ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido p-coumarico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido hidrogenado, ácido vanílico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, hesperetina, pinocembrina, quercetina e rutina). No presente estudo, 10 destes compostos também foram detectados em frutos maduros; porém, os compostos, ácido gálico, ácido vanílico e rutina não foram identificados. Por outro lado, os compostos, ácido siringico, luteolina e metilsiringina, que não haviam sido detectados por Hoffmann et al. (2017), foram detectados no presente estudo. Além disso, a concentração dos compostos identificados diferiram daqueles relatados por Hoffmann et al. (2017). Por exemplo, Hoffmann et al.,

(2017) detectou em média $463.0 \mu\text{g g}^{-1}$ de (-)epicatequina, valores superiores aos observados no presente estudo. Essas diferenças podem ser atribuídas à metodologia de análise adotada neste estudo, onde os acessos foram analisados individualmente, diferentemente da metodologia adotada por Hoffmann et al.(2017) onde foi analisado um mix de frutos da localidade, que passaram por uma análise 12 meses após a coleta. Além disso, os frutos foram coletados em anos distintos, validando a hipótese de que o acúmulo destes compostos é influenciado pelas condições climáticas e de armazenamento.

Visando compreender os processos que levam ao acúmulo destes compostos, além do estágio maduro, outros quatro estágios foram avaliados. Desta forma, foi possível observarmos que a síntese destes compostos é influenciada pelos estágios de crescimento e desenvolvimento. Essas mudanças se dão devido a influência de fatores genéticos, que estão associados ao crescimento e desenvolvimento dos frutos e ao metabolismo destes compostos nas plantas (Scalzo et al., 2005; Atkinson et al., 2006). Este estudo permitiu observar que, com a mudança dos estágios, a maioria dos compostos apresentaram uma redução na concentração, sendo eles: catequina (Acesso 1: - 41,04 %, Acesso 2: - 82,18 % e Acesso 3: -85,21 %), epicatequina (Acesso 1: - 44,48 %, Acesso 2: - 78,38 % e Acesso 3: - 49,58 %), ácido clorogênico (Acesso 1: - 74,74 %, Acesso 2: - 66,15 % e Acesso 3: - 42,23 %), ácido 4-hidroxibenzoico (Acesso 1: - 15,18 %, Acesso 2: - 40,81 % e Acesso 3: - 42,65 %), ácido cafeico (Acesso 1: - 43,58%, Acesso 2: - 86,13 % e Acesso 3: - 92,98 %), quercetina (Acesso 1: - 46,57 %, Acesso 2: - 52,20 % e Acesso 3: - 14,95 %), e ácido p-cumarico (Acesso 3: - 62,06 %). De forma similar, em frutas de nêspera (*Mespilus germanica*L.) observou-se que as concentrações de ácidos fenólicos diminuíram, principalmente à medida que o amadurecimento dos frutos progredia (GRUZ *et al.*, 2011). Em tomates, o conteúdo de ácido ferúlico e ácidos clorogênicos diminuiu continuamente durante o amadurecimento (ANTON, 2017). Em maçãs observou-se uma redução do conteúdo de ácidos fenólicos e flavonóides ao longo do processo de crescimento e desenvolvimento, sendo o maior teor encontrado nos frutos verdes e o menor em frutos em senescência (da SILVA 2019). A degradação destes compostos está possivelmente relacionada com a necessidade de viabilizar substratos para a síntese de compostos específicos desta fase de crescimento e desenvolvimento.

Entretanto, apesar da maioria dos compostos fenólicos identificados terem apresentado uma redução na concentração nos estágios de crescimento e desenvolvimento e abscisão, alguns compostos apresentaram o comportamento oposto, com concentrações

maiores nos últimos estádios. Por exemplo, ácido siríngico (Acesso 1: 0,12 %, Acesso 2: 2,56 % e Acesso 3: 1,99 %), ácido ferúlico (Acesso 1: 7,72 %, Acesso 2: 0,56 %), hesperetina (Acesso 1: 334,30 %, Acesso 2: 118,45 %), pinocembrina (Acesso 1: 543,77 %, Acesso 2: 120,40 % e Acesso 3: 1129,41 %) do estádio VP para AB e metilsiringina não apresentou concentrações nos primeiros estádios de maturação, do estádio VP para AB, respectivamente. A indução destes compostos fenólicos pode estar relacionada a fatores climáticos como incidência de radiação solar e temperatura ambiente (REAY & LANCASTER, 2001; ANDERSEN & JORDHEIM, 2006), uma vez que esses frutos atingem o ápice do desenvolvimento durante o verão do Rio Grande do Sul, período com grande incidência solar e temperaturas superiores a 30 °C. Compostos fenólicos são geralmente produzidos em resposta a estresses, como pragas e fatores climáticos, sendo a radiação ultravioleta a que possui maior influência nesse metabolismo (REAY & LANCASTER, 2001; ANDERSEN & JORDHEIM, 2006).

É interessante observar que, apesar de terem sido cultivados no mesmo local, e sob as mesmas condições edafoclimáticas, a concentração de compostos fenólicos diferiu entre os acessos (Tabela 2). Essa variação de composição também pode ser entendida como um reflexo da variação genética existente dentro da espécie. Uma vez que não existem variedades de butiá melhoradas, disponíveis comercialmente, o conhecimento sobre esta variação genética é de suma importância e, poderá ser utilizada em futuros esforços de melhoramento genético.

Além dos compostos fenólicos, outro composto do metabolismo especializado com potencial antioxidante em diferentes frutas é o AsA. Entretanto, diferente do observado com os compostos fenólicos, não foi observado um aumento ou redução linear na concentração de AsA em frutos de butiá ao longo do desenvolvimento. Este composto apresentou pico de concentração em momentos específicos em estádios intermediário e no final do desenvolvimento. Este comportamento difere também do observado em tomate e mirtilo, onde esse aumento ocorre de forma mais progressiva, apresentando uma redução na concentração apenas no último estádio (PAULA *et al.*, 2015; TAŞ *et al.*, 2021); e de frutos de pimenta doce verde, onde ocorre uma diminuição após os primeiros estádios, seguido de um aumento nos estádios finais (BARATA-SOARES *et al.*, 2004).

A concentração de ácidos orgânicos atingiu níveis mais elevados em estádios de crescimento e desenvolvimento intermediários nos frutos de butiá. Já é consolidado o conhecimento de que os ácidos orgânicos se degradam durante o crescimento e

desenvolvimento dos frutos promovendo uma diminuição da acidez; enquanto isso é promovida uma síntese de açúcares (BARATA-SOARES *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2005).

Com relação ao ABA, diversos estudos já consolidaram a participação deste composto na abscisão dos frutos, na resposta ao estresse, no processo de crescimento e desenvolvimento de frutos (LI *et al.*, 2011; VIGHI *et al.*, 2019). No entanto, seu papel em frutos de butiá ainda permanece incerto. Neste estudo, observou-se um aumento crescente na concentração de ABA durante o processo de crescimento e desenvolvimento dos frutos, entretanto esse aumento não foi tão significativo no Acesso 3 quando comparado aos demais. A importância do ABA no processo de regulação do crescimento e desenvolvimento de frutos foi demonstrado em estudos com frutos de morangos (JIA *et al.*, 2011a). O aumento dos níveis endógenos de ABA e o acúmulo de antocianinas também foram observados em plantas de morangueiro submetidas a condições de estresse (PERIN *et al.*, 2018; SIEBENEICHLER *et al.*, 2020; VIGHI *et al.*, 2019). Similarmente, em mirtilo a aplicação de ABA exógeno teve efeitos também na síntese de antocianinas, conseqüentemente na coloração dos frutos (CHUNG *et al.*, 2019). Outro ponto importante a se observar neste estudo foi que, o aumento de ABA ocorreu principalmente no momento em que houve a abscisão dos frutos da planta; isso demonstra uma forte ligação entre a síntese deste fitohormônio, não só com a maturação dos frutos, mas também com o processo de abscisão.

Além do ABA, seus derivados (PA, DPA e ABA-GE) apresentaram um aumento de concentração ao longo dos estádios, sendo também mais evidente no estágio de abscisão. Entretanto, ao contrário do que ocorreu com o ABA, o Acesso 3 apresentou maior concentração de ABA-GE e DPA do que os demais acessos. Aparentemente, a maturação destes frutos é acompanhada pelo aumento de ABA; a homeostase de ABA é então atingida através da indução das vias de degradação, originando PA e DPA e da via de glicosilação, originando ABA-GE. Um comportamento similar foi observado em plantas de morangos submetidas a um estresse por sal e com aplicação exógena de ABA apresentaram maiores níveis de ABA-GE, PA e DPA, sugerindo que o ABA exógeno em plantas submetidas ao estresse salino afeta o metabolismo ABA, reprimindo a síntese de novo e ativando as vias conjugação e de catabolismo (VIGHI *et al.*, 2019). Os resultados do presente estudo demonstram uma possível participação dos derivados de ABA também na maturação e abscisão desses frutos, porém outros estudos são necessários para determinar qual é o papel destes compostos nestes processos.

De modo geral, o estudo permitiu observar que, as principais diferenças nas concentrações dos compostos fenólico, ABA e derivado e AsA, ocorrem principalmente por influência dos estádios de crescimento e desenvolvimento dos frutos. Esse fato, pode ser comprovado através da análise de PCA, que demonstrou que 69% das diferenças obtidas ocorreram em função dos estádios, e apenas 14% foi explicada pelas diferenças entre os acessos. Com relação a influência dos compostos, a metil siringina, ácido p-coumarico e ácido cafeico, foram os que apresentaram maior influência para diferenciação dos acessos, sendo o Acesso 1 o que menos se assemelha aos demais estudados. No trabalho realizado por Hoffmann ET al. 2017, a análise PCA foi empregada para discriminar butiás de diferentes acessos, genótipos e locais de cultivo e os compostos responsáveis por essa diferenciação foram galabiose e a rutina para a espécie de *B. odorata*.

Conclusão

Com este estudo foi possível concluir que existe uma diferença nas concentrações dos compostos, tanto entre os estádios como entre os acessos. Com relação aos fenólicos encontrados, em sua maioria ocorre uma diminuição da concentração como o ácido clorogênico, ácido cafeico, catequina e (-) -epicatequina, enquanto outros sofreram um aumento nas concentrações principalmente a Hesperetina e Pinocebrina. O acúmulo de AsA se difere do que ocorre em outros frutos, uma vez que nos frutos de butiá esse composto não apresentou um comportamento linear. O ABA e seus derivados desempenham um importante papel, não só para maturação dos frutos, como também no momento de abscisão, visto que apresentaram um pico de concentração nos estádios finais de maturação dos frutos, independentemente do acesso analisado. Entretanto se faz necessário um estudo mais direcionado para outros compostos do metabolismo secundário, para se entender de que modo isso ocorre.

8. Considerações finais

O estudo contribuiu para se ter um prévio conhecimento dos eventos que envolvem o processo de crescimento e desenvolvimento dos frutos, através da perspectiva de mudanças na concentração de alguns compostos do metabolismo especializado. Entretanto, se faz necessário o estudos de novas rotas metabólicas, bem como estudos genéticos direcionados.

Durante a execução do projeto, viu-se a necessidade de realizar adaptações à proposta original do projeto. Desta forma, foram adicionadas novas análises não planejadas previamente no projeto de pesquisa, como: compostos fenólicos e ácido ascórbico. Em contrapartida, através do reflexo da pandemia, as análises de quantificação e identificação de carotenoides individuais, que seriam realizadas em laboratórios parceiros não puderam ser realizadas. Assim como, devido a problemas de energia elétrica e funcionamento do ultrafreezer, onde as amostras encontravam-se armazenadas, as análises moleculares não puderam ser realizadas, por perda de amostras e do RNA já extraído. Entretanto, apesar dos imprevistos acontecidos foi possível realizar uma cinética de comportamento dos compostos durante o crescimento e desenvolvimento dos frutos. Vale ressaltar, que este estudo apenas identificou alguns compostos do metabolismo especializado, que apesar de atuarem nos eventos de crescimento e desenvolvimento dos frutos, são também dependentes da síntese de outros compostos e da ação de outros hormônios. Desse modo, torna-se viável um estudo, que envolva outras rotas metabólicas. Também, deve-se considerar que para se conhecer melhor as mudanças sofridas por determinado organismo, um estudo genético se faz necessário.

9. Referencial teórico

ALFEREZ, Fernando; DE CARVALHO, Deived Uilian; BOAKYE, Daniel. Interplay between abscisic acid and gibberellins, as related to ethylene and sugars, in regulating maturation of non-climacteric fruit. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 1–10, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22020669>

ASANO, Takayuki *et al.* CDPK-mediated abiotic stress signaling. **Plant Signaling and Behavior**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 817–821, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/psb.20351>

BADEJO, Adebajo Ayobamidele. Elevated carotenoids in staple crops: The biosynthesis, challenges and measures for target delivery. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 553–562, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.02.010>

BARATA-SOARES, Anderson D. *et al.* Ascorbic acid biosynthesis: A precursor study on plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 147–154, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1677-04202004000300004>

BERLI, Federico J. Respuesta de *Vitis vinifera* L. cv. Malbec a UV-b y ABA. [s. l.], n. March 2011, p. 43, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.20208.61449>

BERÜTER, J.; DROZ, Ph. Studies on locating the signal for fruit abscission in the apple tree. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 46, n. 3–4, p. 201–214, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(91\)90043-X](https://doi.org/10.1016/0304-4238(91)90043-X)

BESKOW, Günter Timm *et al.* Bioactive and yield potential of jelly palms (*Butia odorata* Barb. Rodr.). **Food Chemistry**, [s. l.], v. 172, p. 699–704, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.111>

CASTILLO-LLANQUE, Franco; RAPOPORT, Hava F. Identifying the location of olive fruit abscission. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 120, n. 2, p. 292–295,

2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.11.006>

CHO, Kyoung Sang *et al.* Recent advances in studies on the therapeutic potential of dietary carotenoids in neurodegenerative diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2018, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/4120458>

CHUNG, Sun Woo *et al.* Transcriptional regulation of abscisic acid biosynthesis and signal transduction, and anthocyanin biosynthesis in 'Bluecrop' highbush blueberry fruit during ripening. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 1–18, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220015>

CRUZ, Pollyanna N. *et al.* Antioxidant and antibacterial potential of butia (*Butia catarinensis*) seed extracts obtained by supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, [s. l.], v. 119, p. 229–237, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.09.022>

DA SILVA MESSIAS, Rafael *et al.* Isolation of high-quality rna from grains of different maize varieties. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 44, n. 7, p. 697–707, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2013.868355>

DAVIES, Peter J. Plant hormones: Biosynthesis, signal transduction, action! **Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!**, [s. l.], n. October, p. 1–802, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7>

DAVIES, W. J. Some effects of abscisic acid and water stress on stomata of *Vicia faba* L. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 175–182, 1978. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/29.1.175>

DE SMET, Ive *et al.* A novel role for abscisic acid emerges from underground. **Trends in Plant Science**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 434–439, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.07.003>

DEBLE, Leonardo P A Z *et al.* Resurrection and epitypification of *Butia poni* (Arecaceae), a neglected palm micro-endemic in the grasslands of Misiones, Argentina. [s. l.], v. 316, n. 2, p. 171–180, 2017.

DELLAPENNA, Dean; POGSON, Barry J. VITAMIN SYNTHESIS IN PLANTS: Tocopherols and Carotenoids. **Annual Review of Plant Biology**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 711–738, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144301>

DOS SANTOS CRUXEN, Claudio Eduardo *et al.* Probiotic butiá (*Butia odorata*) ice cream: Development, characterization, stability of bioactive compounds, and viability of *Bifidobacterium lactis* during storage. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 75, p. 379–385, 2017a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.09.011>

DOS SANTOS CRUXEN, Claudio Eduardo *et al.* Probiotic butiá (*Butia odorata*) ice cream: Development, characterization, stability of bioactive compounds, and viability of *Bifidobacterium lactis* during storage. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 75, p. 379–385, 2017b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.09.011>

EGEA, Mariana Buranelo; PEREIRA-NETTO, Aducto Bellarmino. Bioactive compound-rich, virtually unknown, edible fruits from the Atlantic Rainforest: changes in antioxidant activity and related bioactive compounds during ripening. **European Food Research and Technology**, [s. l.], v. 245, n. 5, p. 1081–1093, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3208-z>

FARIA, Juliana Pereira *et al.* Fruits of *Butia capitata* (Mart.) Becc as good sources of β -carotene and provitamina. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s. l.], v. 33, n. spe1, p. 612–617, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-29452011000500084>

FENG, Guodong *et al.* The transcriptome analyses of *Tagetes erecta* provides novel insights into secondary metabolite biosynthesis during flower development. **Gene**, [s. l.], v. 660, n. March, p. 18–27, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.03.051>

FERRÃO, Tassiane S. *et al.* Evaluation of composition and quality parameters of jelly palm (*Butia odorata*) fruits from different regions of Southern Brazil. **Food Research International**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 57–62, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.002>

FINKELSTEIN, Ruth. Abscisic Acid Synthesis and Response. **The Arabidopsis Book**, [s. l.], v. 11, p. e0166, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1199/tab.0166>

FIOR, Claudimar Sidnei *et al.* Superação de dormência em sementes de *Butia capitata* Overcoming dormancy in seeds of *Butia capitata*. [s. l.], p. 1150–1153, 2011.

FIOR, Claudimar Sidnei; DE SOUZA, Paulo Vitor Dutra; SCHWARZ, Sergio

Francisco. Emergência de plântulas de *Butia odorata* (Barb. Rodr.) noblick em casa de vegetação. **Revista Arvore**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 503–510, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-67622013000300013>

FONSECA, Liane Xavier. Caracterização de frutos de butiazeiro (*Butia odorata* Barb. Rodr.) Noblick & Lorenzi e estabilidade de seus compostos bioativos na elaboração e armazenamento de geleias. [s. l.], p. 68, 2012.

GIULIANO, Giovanni. Plant carotenoids: Genomics meets multi-gene engineering. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 19, p. 111–117, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.05.006>

GRUNE, Tilman *et al.* Grune T, Lietz G, Palou A, Ross AC, Stahl W, Tang G, *et al.* Betacarotene is an important vitamin A source. *American Society for Nutrition. The Journal of Nutrition*. 2010:2268S-85S. [s. l.], 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3945/jn.109.119024.ants>

GRUZ, Jiri *et al.* Phenolic acid content and radical scavenging activity of extracts from medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit at different stages of ripening. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 124, n. 1, p. 271–277, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.030>

HIRAI, Nobuhiro *et al.* Biosynthesis of abscisic acid by the non-mevalonate pathway in plants, and by the mevalonate pathway in fungi. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, [s. l.], v. 64, n. 7, p. 1448–1458, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1271/bbb.64.1448>

HOFFMANN, Jessica F. *et al.* *Butia* spp. (Arecaceae): An overview. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 179, p. 122–131, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.08.011>

HOFFMANN, Jessica Fernanda *et al.* *Butia* spp. (Arecaceae) LC-MS-based metabolomics for species and geographical origin discrimination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 65, n. 2, p. 523–532, 2017a. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03203>

HOFFMANN, Jessica Fernanda *et al.* Stability of bioactive compounds in butiá (*Butia odorata*) fruit pulp and nectar. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 237, p. 638–644, 2017b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.154>

JACHNA, Tiphaine J. *et al.* Bioactive compounds in pindo palm (*Butia capitata*) juice and in pomace resulting of the extraction process. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 96, n. 4, p. 1216–1222, 2016. Disponível em:

<https://doi.org/10.1002/jsfa.7209>

JIA, Hai Feng *et al.* Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 157, n. 1, p. 188–199, 2011a. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.111.177311>

JIA, Hai Feng *et al.* Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 157, n. 1, p. 188–199, 2011b. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.111.177311>

JIANG, Yueming; JOYCE, Daryl C. ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. **Plant Growth Regulation**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 171–174, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1022539901044>

LEITE, Taisa Bandeira *et al.* Alterações nos teores de ácido ascórbico, antocianinas e carotenoides em morangos produzidos a partir de mudas de matrizes radiadas com uv-c. [s. l.], 2012.

LI, Chunli *et al.* Abscisic acid perception and signaling transduction in strawberry: A model for non-climacteric fruit ripening. **Plant Signaling and Behavior**, [s. l.], v. 6, n. 12, p. 1950–1953, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/psb.6.12.18024>

MESQUITA, Grazielle Falcão de; TORQUILHO, Helena De Souza. O USO DOS CAROTENÓIDES PARA PROMOÇÃO DA. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 1–28, 2016.

MESQUITA, Sabrina Da S.; TEIXEIRA, Cláudia M.L.L.; SERVULO, Eliana F.C. Carotenoids: Properties, applications and market. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 672–688, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170040>

MESSIAS, Rafael da Silva *et al.* Carotenoid biosynthetic and catabolic pathways: Gene expression and carotenoid content in grains of maize landraces. **Nutrients**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 546–563, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu6020546>

MISTURA, Claudete Clarice *et al.* Descriptors for on-farm conservation and use of *Butia odorata* natural populations. **Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 35–40, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S1479262115000040>

NAMBARA, Eiji; MARION-POLL, Annie. Abscisic acid biosynthesis and

catabolism. **Annual Review of Plant Biology**, [s. l.], v. 56, p. 165–185, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046>

NISAR, Nazia *et al.* Carotenoid metabolism in plants. **Molecular plant**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 68–82, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.007>

PALMER, Amanda C. *et al.* Impact of biofortified maize consumption on serum carotenoid concentrations in Zambian children. **European Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 72, n. 2, p. 301–303, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41430-017-0054-1>

PAULA, Juliana T. *et al.* Características físico-químicas e compostos bioativos em frutos de tomateiro colhidos em diferentes estádios de. **Horticultura Brasileira**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 434–440, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-053620150000400005>

PERIN, Ellen Cristina *et al.* Extraction and Quantification of Abscisic Acid and Derivatives in Strawberry by LC-MS. **Food Analytical Methods**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 2547–2552, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1224-z>

PETRI, José Luiz; HAWERROTH, Fernando José; LEITE, Gabriel Berenhauser. Maturação, qualidade e queda pré-colheita de maçãs “imperial gala” em função da aplicação de aminoetoxivinilglicina. **Bragantia**, [s. l.], v. 69, n. 3, p. 599–608, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0006-87052010000300011>

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **a Guide To Analysis in Foods**. [S. l.: s. n.], 2001.

RODRIGUEZ-CONCEPCION, Manuel *et al.* A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. **Progress in Lipid Research**, [s. l.], v. 70, n. February, p. 62–93, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.04.004>

RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, Manuel; BORONAT, Albert. Breaking new ground in the regulation of the early steps of plant isoprenoid biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 25, p. 17–22, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.04.001>

SAGARE, Deepti B. *et al.* Maize: Potential crop for provitamin a biofortification. **Maydica**, [s. l.], v. 63, n. 2, 2018.

SERAGLIO, Siluana Katia Tischer *et al.* Determinação De Compostos Fenólicos Por Lc-Ms/Ms E Capacidade Antioxidante De Acerola Em Três Estádios De

Maturação Comestíveis. **Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 96–110, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5965/24473650412018096>

SIEBENEICHLER, Tatiane Jéssica *et al.* The postharvest ripening of strawberry fruits induced by abscisic acid and sucrose differs from their in vivo ripening. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 317, n. September 2019, p. 126407, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126407>

STANGE, Claudia. **Carotenoids in Nature**. [S. l.: s. n.], 2016. v. 79 Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7>

SUN, Tianhu *et al.* Carotenoid Metabolism in Plants: The Role of Plastids. **Molecular Plant**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 58–74, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.09.010>

TAŞ, Akgül *et al.* Influence of pre-harvest gibberellic acid and post-harvest 1-methyl cyclopropane treatments on phenolic compounds, vitamin C and organic acid contents during the shelf life of strawberry fruits. **Plants**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–16, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants10010121>

UENOJO, Mariana; MARÓSTICA, Mário Roberto; PASTORE, Gláucia Maria. Carotenóides: Propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 616–622, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000300022>

VIGHI, I. L. *et al.* Crosstalk During Fruit Ripening and Stress Response Among Abscisic Acid, Calcium-Dependent Protein Kinase and Phenylpropanoid. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 99–116, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07352689.2019.1602959>

VINHOLE, Juliana *et al.* In vitro assessment of the antihyperglycemic and antioxidant properties of araçá, butiá and pitanga. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 19, p. 92–100, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.06.005>

VISHWAKARMA, Kanchan *et al.* Abscisic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 08, n. February, p. 1–12, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00161>

WANI, Shabir H. *et al.* Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. **Crop Journal**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 162–176, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.01.010>

WU, B. H. *et al.* Changes in sugar and organic acid concentrations during fruit maturation in peaches, *P. davidiana* and hybrids as analyzed by principal component analysis. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 103, n. 4, p. 429–439, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.08.003>

WURTZEL, Eleanore T. Changing Form and Function through Carotenoids and Synthetic Biology. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 179, n. 3, p. 830–843, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.18.01122>

WURTZEL, Eleanore T. Chapter five Genomics, genetics, and biochemistry of maize carotenoid biosynthesis. **Recent Advances in Phytochemistry**, [s. l.], v. 38, n. C, p. 85–110, 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0079-9920\(04\)80006-6](https://doi.org/10.1016/S0079-9920(04)80006-6)

XU, Changmou. Trends in phytochemical research. **Journal of Food Biochemistry**, [s. l.], v. 43, n. 6, p. 169–174, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfbc.12913>

ZHANG, Mei; YUAN, Bing; LENG, Ping. The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 60, n. 6, p. 1579–1588, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/erp026>

