



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FUNDAMENTAIS E SOCIAIS



TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**METABOLISMO DO ÁCIDO ASCÓRBICO DURANTE A MATURAÇÃO DE
FRUTOS DA GOIABEIRA 'PALUMA' SOB ADUBAÇÃO NITROGENADA**

RENATO PEREIRA LIMA

Areia, PB

Fevereiro de 2015

Renato Pereira Lima

**METABOLISMO DO ÁCIDO ASCÓRBICO DURANTE A MATURAÇÃO DE
FRUTOS DA GOIABEIRA ‘PALUMA’ SOB ADUBAÇÃO NITROGENADA**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à coordenação do curso de
Agronomia da Universidade Federal da
Paraíba como parte dos requisitos para
obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Silvanda de Melo Silva, Ph.D – Orientadora

2015

**METABOLISMO DO ÁCIDO ASCÓRBICO DURANTE A MATURAÇÃO DE
FRUTOS DA GOIABEIRA ‘PALUMA’ SOB ADUBAÇÃO NITROGENADA**

Aprovado em 11 de Fevereiro de 2015

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à coordenação do curso de
Agronomia da Universidade Federal da
Paraíba como parte dos requisitos para
obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

BANCA EXAMINADORA

Prof. SILVANDA DE MELO SILVA, Ph.D.
Orientadora
DCFS/CCA/UFPB

JOSILENE AMARO DA SILVA, D.Sc.
Examinadora
PPGCTA/UFPB

GEORGE HENRIQUE CAMÊLO GUIMARÃES, M.Sc.
Examinador
PPGA/CCA/UFPB

Areia, PB
Fevereiro de 2015

*Aos meus pais, **Paulo e Zenilda**, pelos genes que determinaram meu corpo, sangue (vida) e mente, pelo o amor dedicado e por todos os ensinamentos que refletiram no ser humano que sou.*

*Aos meus irmãos, **Paulo Roberto, Ricardo, Cassia, Daniel e Emanuel**, pelo afeto, amizade e companheirismo em todos os momentos de nossas vidas.*

*A minha namorada, **Roberta**, pelo companheirismo, carinho e pela nova forma de viver e encarar as dificuldades que aprendi ao seu lado.*

*A minha prima, **Ana Dantas**, e seu esposo, **Renato Dantas**, pela oportunidade única de convivência, aprendizado pessoal e acadêmico e por me servirem de bom exemplo.*

*In memoriam, à **João Paulo**, pelo coleguismo e amizade durante o segundo e terceiro ano do ensino médio.*

Dedico!

*A **Deus**, pelo sopro de vida, por me manter com sua mão poderosa e por conduzir meu destino por caminhos repletos de alegria, realizações e conquistas.*

*Em especial à **professora Silvana de Melo Silva** pelo exemplo de profissionalidade e competência, pela confiança, incentivo, orientação e pela idealização do trabalho.*

*Ao professor **Walter E. Pereira**, pela pessoa e profissional que muito me serve de exemplo e pelos ensinamentos acadêmicos.*

*Ao professor **Jacinto Batista** pelo incentivo, confiança, e tutoria no grupo PET, e demais integrantes da equipe PET.*

*A **Dra. Josilene Amaro** e o **Doutorando George Henrique** pela contribuição dada a este trabalho, com a participação como examinadores.*

*Aos grandes colegas de turma **Joel Cabral, Mariana Neves, Mileny Souza e Caroline Vargas**, com os quais pude contar durante todo o curso, na vida profissional e pessoal. A amizade de vocês foi essencial para o alcance de meus objetivos.*

*Aos meus amigos, **Alex** (tesouro), **Rinaldo, Cazuza Moura, Haron, Antônio Neto** (afilhado), **Raylson, Jardel, Expedito, Tayron, Lemerson, Flaviano, Matheus Borba, Matheus Ayres**, e **João Italo**, pela amizade e pelo carinhoso e irônico apelídeo de Mestre. Aprendi muito com cada um de vocês!*

*A **equipe do Laboratório de Biologia e Tecnologia Pós-Colheita**, a **Dona Rosane** e a **Gerciane Cabral** (que conduziu o experimento de campo), agradeço a todos os colegas de pesquisa.*

Agradeço!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo Geral.....	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. A cultura da goiabeira ‘Paluma’	4
3.2. O ácido ascórbico	5
3.3. A influência da adubação nitrogenada e da maturação nos teores de ácido ascórbico em frutos.....	6
3.4. A biossíntese do ácido ascórbico	7
3.5. A oxidação do ácido ascórbico	9
3.6. A reciclagem do ácido ascórbico	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1. Obtenção dos frutos	12
4.2. Avaliações	12
4.3. Análise estatística	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
6. CONCLUSÃO	28
7. REFERÊNCIAS	29

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Via biosintética do ácido ascórbico nos vegetais. Adaptado de Barata-Soares et al. (2004).. 8
- Figura 2.** Etapa final da biossíntese do ácido ascórbico (AA) catalisada pela L-galactano-1,4-lactano desidrogenase (GLDH), reações de oxidação do ácido ascórbico, reduzindo o peróxido de hidrogênio a partir da ação da Ácido Ascórbico Peroxidase (APX) e oxigênio pela glicoproteína Ascorbato oxidase (AO) na parede celular, e a recuperação desta molécula biológica, a partir da redução do ácido deidroascórbico (DHA) catalisada pela deidroascórbico redutase (DHAR) e do monodeidroascórbico (MDHA) através da enzima monodeidroascórbico redutase (MDHAR). Adaptado de Goggin et al. (2010) & Smirnoff (2000). 11
- Figura 3.** Conteúdo de ácido ascórbico – AA ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$) em frutos da goiabeira ‘Paluma’ colhidos em quatro estádios de maturação (A) e adubadas com diferentes doses de nitrogênio (50, 100, 150 a 200 g de $\text{N}\cdot\text{planta}^{-1}$) (B). 17
- Figura 4.** Atividade da ácido ascórbico oxidase – AAO (μmol ácido ascórbico oxidado $\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) em frutos da goiabeira ‘Paluma’ em quatro estádios de maturação. 18
- Figura 5.** Atividade da ácido ascórbico peroxidase – APX (μmol ácido ascórbico oxidado $\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) em frutos da goiabeira ‘Paluma’ adubadas com diferentes doses de nitrogênio (50, 100, 150 a 200 g de $\text{N}\cdot\text{planta}^{-1}$), colhidos em quatro estádios de maturação. 20
- Figura 6.** Conteúdo de peróxido de hidrogênio – H_2O_2 ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) em frutos da goiabeira ‘Paluma’ adubadas com diferentes doses de nitrogênio (50, 100, 150 a 200 g de $\text{N}\cdot\text{planta}^{-1}$), colhidos em quatro estádios de maturação. 21
- Figura 7.** Atividade da deidroascórbico redutase – DHAR (μmol de ácido ascórbico formado $\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) em frutos da goiabeira ‘Paluma’ colhidos em quatro estádios de maturação (A) e adubadas com diferentes doses de nitrogênio (50, 100, 150 a 200 g de $\text{N}\cdot\text{planta}^{-1}$) (B). 22
- Figura 8.** Atividade da Monodeidroascórbico Redutase – MDHAR (μmol NADH oxidado $\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) em frutos da goiabeira ‘Paluma’ adubadas com diferentes doses de nitrogênio (50, 100, 150 a 200 g de $\text{N}\cdot\text{planta}^{-1}$), colhidos em quatro estádios de maturação. 23
- Figura 9.** Matriz de dispersão e valores de correlação para os conteúdos de ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio e atividade de enzimas do sistema redox do ácido ascórbico durante a maturação de frutos da goiabeira ‘Paluma’. 25
- Figura 10.** Evolução relativa do ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio e da atividade de enzimas envolvidas no sistema redox do ácido ascórbico em relação ao avanço da maturação de frutos da goiabeira ‘Paluma’. 26
- Figura 11.** Evolução relativa do ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio e da atividade de enzimas envolvidas no sistema redox do ácido ascórbico de frutos da goiabeira ‘Paluma’ em relação ao aumento nas doses de nitrogênio (50, 100, 150 a 200 g de $\text{N}\cdot\text{planta}^{-1}$). 27

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido ascórbico
DHA	Ácido deidroascórbico
DHAR	Deidroascórbico redutase
MDHAR	Monodeidroascórbico redutase
AO	Ácido ascórbico oxidase
APX	Ácido ascórbico peroxidase
GLDH	Galactano-1,4-lactano desidrogenasse
ROS	Espécies reativas de oxigênio

LIMA, R. P. **METABOLISMO DO ÁCIDO ASCÓRBICO DURANTE A MATURAÇÃO DE FRUTOS DA GOIABEIRA ‘PALUMA’ SOB ADUBAÇÃO NITROGENADA.** Fev. de 2015, 44p. Trabalho de Conclusão de Curso em Agronomia, Universidade Federal da Paraíba. Orientador: Silvanda de Melo Silva

RESUMO

A vitamina C está presente em muitos frutos e hortaliças na forma reduzida, ácido L-ascórbico (AA), ou na forma oxidada, ácido dehidroascórbico (DHA). Devido a sua elevada capacidade antioxidante, o AA apresenta potencial para minimizar o estresse oxidativo, reduzindo a peroxidação lipídica e degradação da membrana, atuando nos sistemas de defesa das plantas e na regulação do crescimento vegetal. Contudo, o conteúdo de AA nos frutos pode variar em função de fatores pré-colheita como a adubação e maturação. Baseado no exposto, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da maturação e da adubação nitrogenada na atividade de enzimas relacionadas com a oxidação e a reciclagem do ácido ascórbico em frutos da goiabeira ‘Paluma’ produzidos no litoral Paraibano. Frutos da goiabeira ‘Paluma’ adubada com diferentes níveis nitrogênio (50, 100, 150 e 200 g de N.planta⁻¹) foram avaliados em quatro estádios de maturação (IP – Início de Pigmentação amarela, VA – Verde Amarelado, AE – Amarelo Esverdeado e TA – Totalmente Amarelos). O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 4x4, com cinco repetições. O experimento foi conduzido no município de Alhandra-PB, em pomar comercial da cultivar Paluma com 16 meses de formação. A aplicação do N (ureia) foi realizada manualmente na projeção da copa, sendo parcelada em três aplicações, após a poda de frutificação, bem como, aos 45 e 75 dias. Os frutos foram colhidos e selecionados segundo a coloração da casca e ausência de defeitos. Em seguida, foram devidamente acondicionados em caixa plástica e transportados imediatamente ao laboratório de Biologia e Tecnologia Pós-Colheita, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal da Paraíba, em Areia-PB. No laboratório os frutos foram novamente selecionados, classificados e avaliados. Elevadas doses de N, na adubação da goiabeira, reduzem a atividade das enzimas de reciclagem do ácido ascórbico, deidroascórbico redutase (DHAR) e monodeidroascórbico redutase (MDHAR), proporcionando a redução nos teores de ácido ascórbico dos frutos até a dose de 147 g.planta⁻¹. Doses elevadas de nitrogênio favoreceram o aumento da atividade da ácido ascórbico peroxidase nos frutos da goiabeira ‘Paluma’ no início da maturação, que por sua vez, minimizaram os conteúdos de peróxido de hidrogênio nos frutos mais verdes. A dose de 170 g de N.planta⁻¹ favorece a qualidade dos frutos da goiabeira ‘Paluma’, pois mantém o conteúdo de ácido ascórbico e reduz o estresse oxidativo, mensurado a partir dos níveis de peróxido de hidrogênio. Nos frutos da goiabeira ‘Paluma’, o avanço da maturação, independentemente da adubação nitrogenada, promove o aumento da atividade da ácido ascórbico peroxidase e das enzimas de reciclagem (DHAR e MDHAR) e reduz a atividade da ácido ascórbico oxidase, aumentando o conteúdo de ácido ascórbico.

Palavras chave: *Psidium guajava* L., estresse oxidativo, oxidação do ácido ascórbico, deidroascórbico redutase, monodeidroascórbico redutase.

LIMA, R. P. ASCORBIC ACID METABOLISM DURING RIPENING OF GUAVA 'PALUMA' FRUITS UNDER NITROGEN FERTILIZATION. Feb. 2015, 44p. Term Report for the Degree in Agronomy, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba. Advisor: Prof. Silvana de Melo Silva

ABSTRACT

Vitamin C is present in many fruits and vegetables as the reduced form, L-ascorbic acid (AA) or in oxidized form, dehydroascorbic acid (DHA). Due to its high antioxidant capacity, the AA has the potential to minimize oxidative stress, reducing lipid peroxidation and degradation of the membrane, acting in defense systems of plants and in the regulation of plant growth. However, the AA content in the fruits may vary according to factors such as pre-harvest fertilization and maturation. Based on the above, this study aimed to evaluate the effect of ripening and nitrogen fertilization in the activity of enzymes related to the oxidation and recycling of ascorbic acid in fruits of guava 'Paluma' produced in Paraíba State coast. Fruits of guava 'Paluma' fertilized with different nitrogen levels (50, 100, 150 and 200 g N.planta⁻¹) were evaluated in four maturation stages (IP - begin of yellow pigmentation, VA - yellowish green, AE - yellow green and TA - fully yellow). The experimental design was randomized block by 4x4 factorial design with five repetitions. The experiment was conducted in the Alhandra-PB municipality, in a commercial orchard of cv Paluma with 16 months of formation. The application of N (urea) was performed manually in the crown projection, being subdivided in three applications after winter pruning and, at 45 and 75 days. The fruits were harvested and selected according to skin color and absence of defects. Fruits were packed in plastic box and transported to the laboratory of Biologia e Tecnologia Pós-Colheita in the Centro de Ciências Agrárias, on Universidade Federal da Paraíba, in Areia-PB. In the laboratory the fruits were selected by maturity, classified and evaluated. High nitrogen levels in fertilization of guava, reduce the activity of enzymes recycling of ascorbic acid, dehydroascorbic reductase (DHAR) and monodeidroascórbico reductase (MDHAR), providing a reduction in ascorbic acid content of the fruit until the dose of 147 g. plant⁻¹. High levels of nitrogen favored the increased activity of ascorbic acid peroxidase in guava 'Paluma' fruits at the beginning of maturation, which in turn, dropped down the hydrogen peroxide content in the greener fruit. The dose of 170 g N.planta⁻¹ promotes fruit quality of guava 'Paluma' as it keeps the contents of ascorbic acid and reduces oxidative stress, measured from the hydrogen peroxide levels. In guava 'Paluma', fruits the advancing ripening, regardless of nitrogen, promoted increased activity of ascorbic acid peroxidase and recycling enzymes (DHAR and MDHAR) and reduces the activity of ascorbic acid oxidase, increased the content of ascorbic acid.

Keywords: *Psidium guajava* L., oxidative stress, oxidation of ascorbic acid, dehydroascorbic reductase, monodeidroascórbico reductase.

1. INTRODUÇÃO

Os frutos da goiabeira (*Psidium guajava* L.) são nutritivos e ricos em compostos aromáticos que respondem pelo odor característico associado ao excelente sabor (PORAT et al., 2011), além de apresentar compostos antioxidantes como vitaminas e fenólicos que as põe em posição de destaque em relação aos demais frutos tropicais (LIM et al., 2007). Os fatores pré-colheita, como condições climáticas, práticas culturais e grau de maturação influenciam significativamente nos teores de ácido ascórbico, compostos fenólicos e outros agentes do poder funcional dos frutos (POIROUX-GONORD et al., 2010). Segundo Dumas et al. (2003) os fertilizantes nitrogenados em altas taxas tendem a diminuir o teor de vitamina C em muitos frutos e hortaliças. Lima et al. (2008) estudando o efeito dos níveis de nitrogênio e potássio na produtividade e na maturação de frutos da goiabeira irrigada no Vale do São Francisco, utilizaram doses de nitrogênio que variaram de 67 à 267 kg N por hectare, e observaram que as aplicações de 200 kg de N + 100 kg de K por hectare favoreceram menor degradação do ácido ascórbico.

Durante o amadurecimento de frutos da goiabeira ocorrem várias alterações na coloração, textura e sabor dos frutos, que se tornam aptos ao consumo. Contudo, estas mudanças são acompanhadas pelo aumento na atividade de enzimas oxidativas, peroxidação lipídica e liberação de espécies reativas de oxigênio (MONDAL et al., 2009). Neste contexto, maior atividade da ácido ascórbico peroxidase (APX) pode representar melhor defesa contra o estresse oxidativo ao escurecimento interno nos frutos, pois esta enzima, juntamente com o AA, desempenha papel importante no controle das reações desencadeadas pelo H₂O₂ (Peróxido de Hidrogênio), retardando a senescência e a peroxidação lipídica da membrana (LIN et al., 2015). Além do ácido ascórbico, que é um dos principais compostos de poder funcional nos frutos pelo seu potencial antioxidante, os compostos fenólicos e uma diversidade de enzimas, estão envolvidos nos sistemas oxidativos e de função antioxidante nestes frutos, minimizando o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) em estágios mais avançados de maturação dos frutos (DEVI & GIRIDHAR, 2015; NUKUNTORNPRAKIT et al., 2015).

A vitamina C ocorre naturalmente na forma reduzida, ácido L-ascórbico (AA), ou na forma oxidada, ácido dehidroascórbico (DHA). Essas formas ocorrem por que o AA doa átomos de hidrogênio para as ROS e radicais livres e torna-se oxidado (BOHNDIEK et al., 2011). Um dos processos de oxidação do AA mais estudado envolve a redução do peróxido de hidrogênio com a formação do ácido monodeidroascórbico (MDHA) pela ação da ácido

ascórbico peroxidase (APX) (GOGGIN, et al., 2010). A partir de duas moléculas de MDHA tem-se a recuperação do ácido ascórbico e a formação do ácido dehidroascórbico (GALLIE et al., 2013). A oxidação do AA pode, ainda, ocorrer através da atividade da enzima ácido ascórbico oxidase (AAO), tendo como produto o DHA (GARChERY et al., 2013).

As principais vias de recuperação do ácido ascórbico em frutos ocorrem a partir da redução do ácido MDHA, pela ação catalítica da monodeidroascórbico redutase (MDHAR) e a redução do ácido deidroascórbico pela ação da enzima dehidroascórbico redutase (DHAR) (GALLIE et al., 2013; GOGGIN, et al., 2010). Em frutos da goiabeira, o equilíbrio entre as atividades enzimáticas de síntese, oxidação e reciclagem, é um importante fator de regulação dos teores de AA, principalmente durante o amadurecimento, durante o qual ocorre um aumento na atividade da enzima APX, como forma de minimizar o estresse oxidativo ocasionado pelas ROS, ao passo que a atividade da DHAR aumenta para compensar a oxidação do AA, já que o aumento do conteúdo de AA nos frutos durante esta fase do desenvolvimento estar associado, também, a sua reciclagem (GOMEZ & LAJOLO, 2008).

Assim, o sistema redox do ácido ascórbico, que é a relação oxidação-redução, é principal fator para a manutenção e defesa das células, permitindo uma eficiente habilidade em controlar o estresse causado pelo meio intra e extracelular altamente oxidante a partir do ácido ascórbico (GALLIE et al., 2013; BOHNDIEK et al., 2011). Além disso, a maturação dos frutos e os níveis de nitrogênio aplicados na planta afetam os teores de ácido ascórbico (LEE et al., 2000). As diversas alegações funcionais associadas a presença desses compostos se baseiam na capacidade que esses têm de modular o estresse oxidativo (TURRENS et al., 2003). Essas propriedades se configuram como elementos de agregação de valor aos frutos, sobretudo devido às suas aplicações em áreas diversas como farmacológicas, cosmética e na medicina (SPÍNOLA, 2013; POIROUX-GONORD et al., 2010). Sabe-se que goiaba é um fruto que apresenta relevantes conteúdos de ácido ascórbico. Dessa forma, estudos que avaliem as influências pré-colheita nos níveis de compostos bioativos em goiaba, sobretudo de ácido ascórbico e dos aspectos relacionados ao seu metabolismo, irão contribuir para a adequação do sistema de manejo visando a manutenção de níveis satisfatórios desses compostos nos frutos, de modo a ampliar os seus benefícios à saúde, e portanto agregar valor à cultura.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da maturação e da adubação nitrogenada no conteúdo de ácido ascórbico e nas atividades de enzimas relacionadas com a sua oxidação e a reciclagem em frutos da goiabeira 'Paluma' produzidos no litoral Paraibano.

2.2. Objetivos específicos

Determinar as mudanças no conteúdo de ácido ascórbico durante a maturação de frutos da goiabeira 'Paluma' sob crescentes doses de nitrogênio e com a evolução da maturação;

Avaliar o comportamento das atividades das enzimas oxidativas do ácido ascórbico (ácido ascórbico peroxidase e ácido ascórbico oxidase) e redutoras dos ácidos deidroascórbico e monodeidroascórbico (deidroascórbico redutase e monodeidroascórbico redutase) em função de níveis de adubação nitrogenada e durante a maturação de frutos da goiabeira 'Paluma';

Compreender as relações entre as mudanças nos conteúdos de ácido ascórbico, bem como das alterações nas atividades das enzimas de seu metabolismo e dos níveis de peróxido de hidrogênio em frutos de goiabeira 'Paluma', em função da adubação nitrogenada e durante a maturação.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. A cultura da goiabeira ‘Paluma’

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) é uma frutífera da família das mirtáceas adaptada às regiões tropicais e subtropicais que apresenta diversas cultivares exploradas comercialmente. Seus frutos são nutritivos e ricos em compostos aromáticos que respondem pelo odor característico associado ao excelente sabor (PORAT et al., 2011), além de apresentar compostos antioxidantes como vitaminas e fenólicos que as põe em posição de destaque em relação aos demais frutos tropicais (LIM et al., 2007). Segundo dados do IBGE, em 2013 o Brasil produziu cerca de 350 mil toneladas de frutos da goiabeira, estando à região nordeste como a segunda maior produtora da fruta. A Paraíba respondeu por 2.426 toneladas produzidas em 2013.

Para o mercado de frutas frescas, a preferência é por frutos de polpa avermelhada, firmes, com casca grossa e resistente, com polpa espessa, saborosa, doce e baixa acidez. As cultivares de polpa branca são recomendadas para fins de exportação, pois apresentam uma vida útil pós-colheita mais longa e um aroma mais suave, o que as torna mais finas e delicadas (FUMIS e SAMPAIO, 2011). Entretanto, dentre as cultivares exploradas, Paluma é considerada de dupla aptidão. Pois apresenta características de qualidade ideais para o consumo na forma de fruta fresca, além de atender as exigências da indústria. Desta forma, o produtor pode atender ao mercado de fruta fresca ou a indústria, dependendo da qualidade e demanda, o que lhes permite maiores chances de sucesso na comercialização.

A maturação desses frutos resulta em alterações na qualidade (AZZOLINI et al., 2004), o que pode ser determinante na conservação pós-colheita durante o transporte, armazenamento e comercialização. Estas alterações incluem aumento nos teores de ácido ascórbico e mudanças na atividade de enzimas (GOMEZ et al., 2008). A elevação nos teores de ácido ascórbico na maturação de goiabas tem sido reportado (GOMEZ et al., 2008; SILVA et al., 1998), podendo ocorrer aumento de até 50% ao final da maturação. Para Gomez et al. (2008) o aumento no teor de ácido ascórbico durante a maturação de frutos da goiabeira ocorre devido a um equilíbrio entre as atividades enzimáticas de síntese, catabolismo e reciclagem desta vitamina.

Outro fator determinante na qualidade dos frutos é o manejo agrônômico no processo produtivo, sobretudo o efeito da nutrição mineral. Lima et al. (2008), avaliando o efeito dos níveis de nitrogênio e potássio na produtividade e qualidade dos frutos de goiabeira irrigada no vale do São Francisco, observaram que a goiabeira ‘Paluma’ responde positivamente ao

aumento das doses destes nutrientes, expressando ótima qualidade para as aplicações de 200 kg de N + 100 kg de K por hectare. No entanto, para o estado da Paraíba esta frutífera demanda estudos mais detalhados quanto aos níveis de nutrientes requeridos, sobretudo relacionando, além dos aspectos de produção e produtividade, as características de qualidade.

3.2. O ácido ascórbico

O ácido ascórbico tem sido estudado como um dos principais compostos que contribui para a capacidade antioxidante de frutos e hortaliças capaz de minimizar o estresse oxidativo, principalmente na pós-colheita (DANTAS et al., 2012; HODGES et al., 2003). O ácido L-ascórbico é a forma ativa da vitamina C naturalmente encontrada nos frutos, embora esta também ocorra na forma oxidada, ácido deidroascórbico, que também apresenta atividade biológica. Os seres humanos necessitam obter este nutriente através da alimentação, uma vez que não são capazes de o sintetizar, embora demandem sua ação em sistemas bioquímicos, farmacológicos e eletroquímicos (SPÍNOLA, 2013; POIROUX-GONORD et al., 2010). Outra importante ação do ácido ascórbico é sua atuação como um cofator enzimático em processos bioquímicos, com atividade regulatória, envolvendo inclusive o DNA, nos mamíferos (YIN et al., 2013).

As espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como tais como H_2O_2 , O_2^- , e OH^- , estão presentes na maioria dos sistemas biológicos e ocorrem naturalmente como resultado de processos intracelulares na maioria dos tecidos, principalmente na cadeia respiratória mitocondrial (TURRENS et al., 2003). As espécies reativas de oxigênio podem surgir como resposta de defesa da planta ao ataque de patógenos ou estresses fisiológico no vegetal. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por exemplo, pode ser diretamente tóxico à patógenos de plantas e está envolvido com o fortalecimento da parede celular (RESENDE et al., 2003). No entanto, em níveis elevados, o H_2O_2 pode causar distúrbios fisiológicos, principalmente na pós-colheita dos produtos, acelerando o processo de senescência (HODGES et al., 2003).

Antioxidantes são compostos que podem retardar ou inibir a oxidação de lipídios ou outras moléculas, evitando o início ou propagação das reações de oxidação em cadeia (HALLIWELL, 2006). O ácido ascórbico, juntamente com compostos fenólicos e uma diversidade de enzimas estão envolvidos nos sistemas oxidativos de função antioxidante nos frutos, minimizando o acúmulo de ROS em estágios mais avançados de maturação dos frutos (MONDAL et al., 2009). Assim, o controle dos níveis de ROS nos sistemas biológicos a níveis não tóxicos é efetuado por uma variedade de antioxidantes e enzimas de regeneração

(TURRENS et al., 2003) com grande destaque para o ácido ascórbico, principalmente em frutos da goiabeira, que apresenta alta correlação com a capacidade antioxidante destes frutos (THAIPONG et al., 2006).

3.3. A influência da adubação nitrogenada e da maturação nos teores de ácido ascórbico em frutos

Atualmente o manejo agrônômico tem sido aplicado visando o aumento da qualidade nutricional das frutas e hortaliças, sobretudo para promover concentrações mais elevadas de vitaminas e metabólitos secundários benéficos para a saúde (POIROUX-GONORD et al., 2010). A vitamina C, incluindo sua forma reduzida e oxidada e compostos fenólicos são constituintes de qualidade nutricional nos frutos e hortaliças, com várias funções biológicas no corpo humano.

Os teores de ácido ascórbico e deidroascórbico nos frutos e vegetais sofrem influencia significativa de fatores pré-colheita, como diferenças genótípicas, condições climáticas, práticas culturais, condições de maturação e colheita, além dos fatores pós-colheita (POIROUX-GONORD et al., 2010; LEE et al., 2000). Assim, o acúmulo de ácido ascórbico em frutos na pré-colheita pode ser resultado de processos naturais do amadurecimento, com atividade de enzimas de síntese e reciclagem (GOMEZ et al., 2008), ou fatores exógenos que podem ou não serem controlados agronomicamente.

O estágio de maturação em que os frutos da goiabeira são colhidos é determinante no seu tempo de vida pós-colheita, além disso, o estudo da maturação destes frutos podem revelar mudanças em importantes índices de qualidade (AZZOLINI et al., 2004), colaborando, desta forma, para a melhor exploração do seu valor nutricional, adequada conservação pós-colheita e melhoria da comercialização. Esses autores verificaram que goiabas ‘Pedro Sato’ aumentam quantitativamente na maturação o conteúdo de ácido ascórbico de 56,02 a 60,02 mg.100g⁻¹. O aumento do AA na maturação de goiabas foi reportado por Gomez et al. (2008) e Silva et al. (1998) podendo ocorrer aumento de até 50% ao final da maturação. Para Gomez et al. (2008) o aumento no teor de AA durante a maturação de frutos da goiabeira ocorre por que há um equilíbrio entre as atividades enzimáticas de síntese, catabolismo e reciclagem desta vitamina.

Por outro lado, segundo Dumas et al. (2003) os fertilizantes nitrogenados em altas taxas tendem a diminuir o teor de vitamina C em muitos frutos e hortaliças. Lima et al. (2008) estudando o efeito dos níveis de nitrogênio e potássio na produtividade e na maturação de

frutos da goiabeira irrigada no Vale do São Francisco, utilizaram doses de nitrogênio que variaram de 67 à 267 kg N por hectare, e observaram que as aplicações de 200 kg de N + 100 kg de K por hectare favoreceram a qualidade do fruto, resultando em menor degradação do ácido ascórbico e manutenção da firmeza da polpa. Assim, a adubação da goiabeira visando a produção de frutos deve considerar as exigências nutricionais da cultura e a exportação de elementos pelos frutos que favorece a qualidade dos mesmos (NATALE et al., 2009). Neste contexto, os níveis de nitrogênio juntamente com o potássio devem ser considerados (LIMA et al., 2008).

Sabe-se que uma maior intensidade de luz direta durante a fase de desenvolvimento promove o aumento do conteúdo de vitamina C nos tecidos vegetais (LEE et al., 2000). Assim, pode-se inferir que a redução dos teores de vitamina C em frutos, a partir do aumento nas doses de N para as plantas, provavelmente ocorre por razões indiretas, uma vez que o fornecimento de N promove o desenvolvimento vegetativo em folhagem e, portanto, o sombreamento dos frutos nas plantas (DUMAS et al., 2003). De fato, o último passo da via biosintética do AA, representado pela ação catalítica da enzima GLDH, sofre influencia da presença da luz, sugerindo que existem interações entre luz, o metabolismo mitocondrial, e a síntese de ácido ascórbico (SMINOFF et al., 2001).

3.4. A biossíntese do ácido ascórbico

A biossíntese do ácido ascórbico tem sido estudada, principalmente pela importância deste composto. No entanto, em frutos esse estudo ainda encontra-se limitado (GOMEZ et al., 2008). Confrontando a literatura percebe-se que a produção de AA nos frutos difere não só entre os diferentes tipos de frutos, mas entre variedades de uma mesma espécie (PINTO et al., 2010), bem como em função da maturação para uma mesma variedade (LINHARES et al., 2007; AZZOLINI et al., 2004), sob influencia de fatores ambientais e agronômicos (DUMAS et al., 2003) e ainda em decorrência da defesa contra estresses oxidativos (HODGES et al., 2003). Desta forma, o entendimento do metabolismo do ácido ascórbico (AA), principalmente quando associado a fatores agronômicos, aos quais a cultura foi submetida, é uma ferramenta importante para uma melhor compreensão do metabolismo desta vitamina.

Apesar de algumas controvérsias a respeito da via biosintética do ácido ascórbico (HANCOCK et al., 2005) e haver fortes evidências de rotas diferenciadas (VALPUESTA et al., 2004), sabe-se que a sua biossíntese nos vegetais se inicia a partir da GDP-manose e termina com a conversão de L-galactono- γ -lactona para ácido ascórbico, através da ação

catalítica de L-galactono- γ -lactona desidrogenase (GLDH; EC 1.3.2.3) (VALPUESTA et al., 2004; TUDELA et al., 2003) (figura1). A GLDH utiliza eficazmente um único substrato que é o L-galactono- γ -lactona, no entanto, sua atividade varia em função do pH e pode ser inibida na presença de determinados compostos como o p-chloromercuribenzoate (PCMB) (ÔBA et al., 1995). Associado a isso, a atividade da GLDH é intimamente influenciada pelo regime de luz (SMINOFF et al., 2001). A atividade da GLDH pode aumentar nos frutos e hortaliças, a qualquer momento, em defesa de algum estresse e, conseqüentemente, aumentar os teores de AA (HODGES et al., 2003).

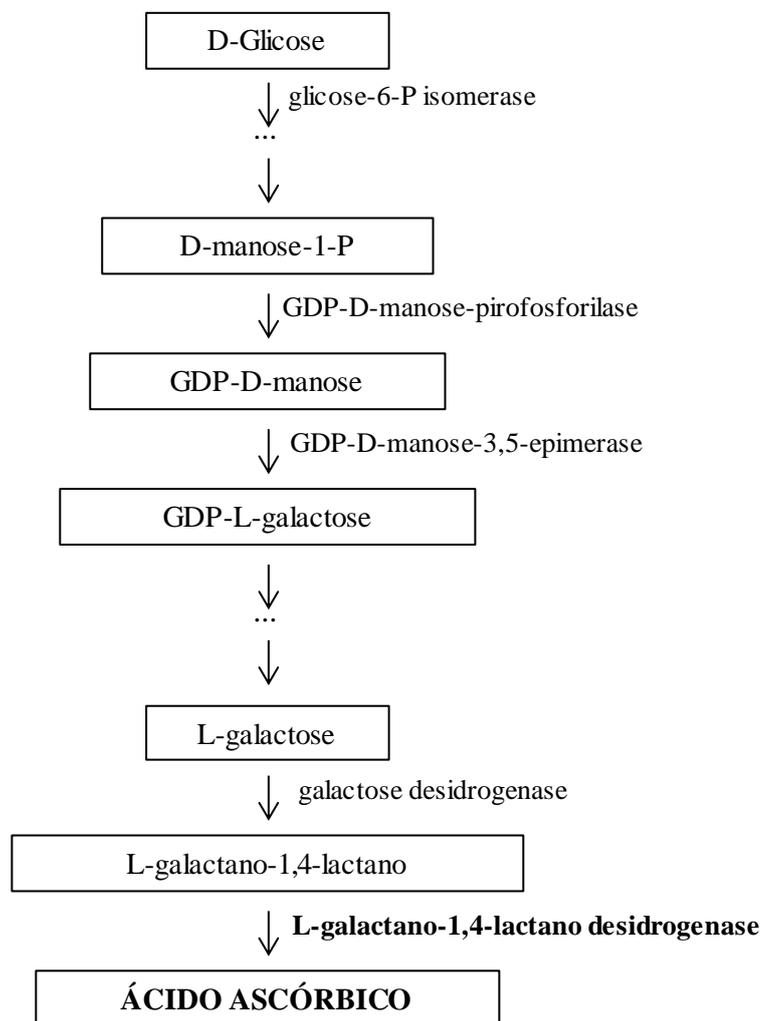


Figura 1. Via biosintética do ácido ascórbico nos vegetais. Adaptado de Barata-Soares et al. (2004).

3.5. A oxidação do ácido ascórbico

A vitamina C ocorre naturalmente na forma reduzida, ácido L-ascórbico (AA), ou na forma oxidada, ácido deidroascórbico (DHA). Essa variação ocorre por que o ácido ascórbico doa átomos de Hidrogênio para espécies reativas de oxigênio e radicais livres e torna-se oxidado (BOHNDIEK et al., 2011). Um dos processos de oxidação do AA mais estudado envolve a redução do peróxido de hidrogênio com a formação do ácido monodeidroascórbico (MDHA) intermediário (GOGGIN et al., 2010; HODGES et al., 2003). A partir de duas moléculas de MDHA tem-se a recuperação do ácido ascórbico e a formação do ácido deidroascórbico (SMINOFF, 2000) que é a forma oxidada do ácido ascórbico.

O ácido ascórbico pode ainda torna-se oxidado a DHA por outros processos de importância nos sistemas biológicos (SHIMADA et al., 2008). Essas complexões podem ocorrer na presença de íons metálicos, calor, luz ou em condições levemente alcalinas (pH acima de 6,0), com perda parcial da atividade vitamínica (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004). A oxidação do ácido ascórbico configura-se uma importante estratégia no controle das ações desencadeadas pelo excesso de espécies reativas de oxigênio nas células (TURRENS et al., 2003; HODGES et al., 2003) e é avaliada, principalmente, através da atividade de duas enzimas, a ácido ascórbico oxidase (AAO; EC 1.10.3.3) e a ácido ascórbico peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) (GOMEZ et al., 2008; HODGES et al., 2003).

A enzima AAO catalisa a oxidação do ácido ascórbico com o O₂ com a formação do ácido deidroascórbico e água (SHIMADA et al., 2008) (Figura 1). Apesar da atividade da AAO estar relacionada com o crescimento das plantas (SMIRNOFF et al., 2001), ainda não está completamente elucidada todas as suas funções nos sistemas biológicos, envolvendo o AA. Mas é sabido que a sua atividade pode diminuir durante o desenvolvimento de frutos e se correlacionar positivamente com o conteúdo de ácido ascórbico, mostrando que os teores de AA podem estar relacionados com a regulação da atividade da AAO (GOMEZ et al., 2008).

A APX catalisa a redução do H₂O₂ a H₂O e o ácido ascórbico torna-se ácido deidroascórbico (Figura 1). Este processo é fundamental durante o amadurecimento, armazenamento ou em situações de estresse oxidativo em que o AA minimiza o efeito oxidante do H₂O₂ (GOMEZ et al., 2008; HODGES et al., 2003). O acúmulo de peróxido de hidrogênio durante o amadurecimento é um dos principais eventos causadores de estresse oxidativos em frutos, observado pelo aumento da peroxidação lipídica (GAUTIER et al., 2010).

3.6. A reciclagem do ácido ascórbico

O ácido deidroascórbico pode ser convertido a ácido ascórbico, por ações catalíticas ou passar irreversivelmente a ácido dicetogulônico (BOHNDIEK et al., 2011), perdendo sua função como vitamina C. As principais vias de recuperação do ácido ascórbico estudadas em frutos são a redução do ácido monodeidroascórbico pela ação catalítica da monodeidroascórbico redutase (MDHAR; EC 1.6.5.4) e a redução do ácido deidroascórbico pela ação da enzima deidroascórbico redutase (DHAR; EC 1.8.5.1) (GAUTIR et al., 2010; GOMEZ et al., 2008) (Figura 1).

Durante a maturação de goiaba ocorre um aumento na atividade da APX, como forma de minimizar o estresse oxidativo ocasionado pelas ROS, ao passo que a atividade da DHAR aumenta para compensar a oxidação do AA, já que o aumento dos níveis de AA nos frutos durante esta fase de desenvolvimento estar associado, também, a sua reciclagem (GOMEZ et al., 2008). No entanto, apesar do aumento progressivo do estresse oxidativo e peroxidativo, durante maturação em frutos da goiabeira, ser acompanhado por um fortalecimento do sistema antioxidante, estes mecanismos de defesa começam a falhar em estágios mais avançados da maturação (MONDAL et al., 2009). Neste contexto, o sistema redox do ácido ascórbico, que é a relação oxidação-redução, é fator determinante para a manutenção e defesa das células, permitindo uma eficiente habilidade de controlar o estresse causado pelo meio extracelular altamente oxidante (GALLIE et al., 2013; BOHNDIEK et al., 2011). Assim, o estudo do sistema redox do ácido ascórbico é de fundamental importância no entendimento das estratégias utilizadas pelas plantas na manutenção dos conteúdos deste antioxidante e acionamento das defesas da planta.

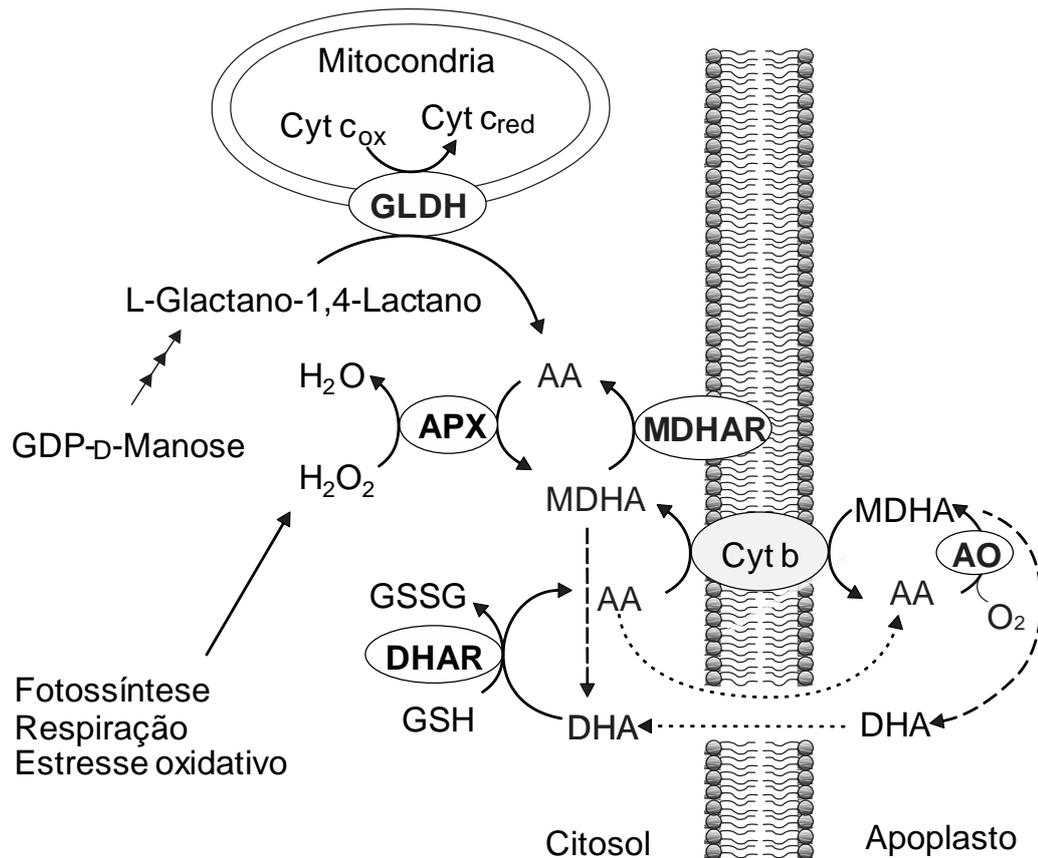


Figura 2. Etapa final da biossíntese do ácido ascórbico (AA) catalisada pela L-galactano-1,4-lactano desidrogenase (GLDH), reações de oxidação do ácido ascórbico, reduzindo o peróxido de hidrogênio a partir da ação da Ácido Ascórbico Peroxidase (APX) e oxigênio pela glicoproteína Ascorbato oxidase (AO) na parede celular, e a recuperação desta molécula biológica, a partir da redução do ácido deidroascórbico (DHA) catalisada pela deidroascórbico redutase (DHAR) e do monodeidroascórbico (MDHA) através da enzima monodeidroascórbico redutase (MDHAR). Adaptado de Goggin et al. (2010) & Smirnoff (2000).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção dos frutos

O experimento foi conduzido no município de Alhandra-PB, microrregião do Litoral Sul a uma distância de 32 Km da capital, João Pessoa-PB em um pomar comercial da cultivar Paluma com 16 meses de formação, cujas plantas foram propagadas por estacas herbáceas. Segundo a classificação de Kopper, o clima é seco (clima Tropical chuvoso com verão) e o solo é caracterizado como Latossolo Amarelo Distrófico argissólico (EMBRAPA, 2006).

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 4x4, com cinco repetições. Os tratamentos corresponderam a quatro estádios de maturação e quatro doses de nitrogênio. As doses de nitrogênio foram 50, 100, 150 e 200 g de N.planta⁻¹, correspondendo a 110, 220, 330 e 440 g de ureia.planta⁻¹. As plantas receberam ainda 150 g de K₂O.planta⁻¹, correspondendo 250 g de cloreto de potássio.planta⁻¹. O P₂O₅ aplicado foi 140 g.planta⁻¹, de acordo com Silva et al. (2006), correspondendo à 280 g de MAP (fosfato monoamônico).planta⁻¹. A aplicação foi feita manualmente na área da projeção da copa, sendo o fósforo aplicado em dose única, enquanto, o nitrogênio e o potássio foram parcelados em três aplicações, após a poda de frutificação, bem como, aos 45 dias e 75 dias.

Os frutos foram colhidos e selecionados segundo a coloração da casca e ausência de defeitos. Em seguida foram devidamente acondicionados em caixa plástica e transportados imediatamente ao laboratório de Biologia e Tecnologia Pós-Colheita, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal da Paraíba, em Areia-PB. No laboratório os frutos foram novamente selecionados e classificados em quatro estádios de maturação com base na escala proposta por Cavalini (2004). O estágio 1 caracterizou-se por frutos de coloração verde com Início de Pigmentação amarela (IP), o estágio 2 por frutos com coloração da casca parcialmente amarela, definidos como frutos de coloração Verde Amarelado (VA), o estágio 3 com frutos de coloração da casca predominantemente amarela, mas com algum tom de verde, definidos como frutos de coloração Amarelo Esverdeado (AE) e o estágio 4 caracterizou-se por frutos com coloração da casca Totalmente Amarela (TA). Foram avaliados 5 (cinco) frutos por repetição.

4.2. Avaliações

Níveis de ácido ascórbico: Foram determinados por titulometria utilizando-se 1 g da amostra em 50 ml de Ácido Oxálico 0,5% e solução de DFI (2,6-dicloro-fenol-indofenol 0,002%) para titulação até mudança coloração conforme Strohecker e Henning (1967).

Oxidação do ácido ascórbico

Atividade da ácido ascórbico oxidase (AAO): determinada segundo a metodologia descrita por Hodges et al. (2003). Foram homogeneizados 10 g de amostra, em almofariz previamente arrefecido em gelo, juntamente com 0,5 g de areia inerte, 0,1 g de PVP, e 10 ml do tampão de extração (100 mM de Fosfato de Potássio e 0,5 mM de EDTA, a pH 7,0) refrigerado. Em seguida os extratos foram centrifugados a 12.000 rpm durante 25 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram passados através de uma mini-coluna (Sephadex G25 PD-10) pré-equilibrada com o tampão de extração para remoção de moléculas de baixo peso molecular. Todos os procedimentos foram realizados em banho de gelo, mantendo a temperatura a $\pm 4^\circ\text{C}$.

A atividade foi determinada numa mistura de ensaio de 2 ml, contendo 50 mM de Fosfato de Potássio (pH 7,5), 1,0 mM de EDTA e 60 μL do extrato. A reação foi iniciada com a adição de 250 μM de ácido ascórbico e acompanhada a 25 °C a cada 30 s para verificação da faixa de linearidade enzimática. Por fim, foi determinada durante 4 minutos, em espectrofotômetro GenesesTM (10s UV VIS), medindo-se a oxidação do ácido ascórbico na absorbância de 265 nm. Utilizou-se o coeficiente de extinção de $14 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em μmol de ácido ascórbico oxidado. $\text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

Atividade da ácido ascórbico peroxidase (APX): A atividade da enzima ácido ascórbico peroxidase (APX) foi determinada segundo Nakano e Asada (1987) com as modificações descritas em Hodges et al. (2003). Foram homogeneizados 5 gramas da amostra em almofariz previamente arrefecido no gelo, juntamente com 0,5 g de areia inerte, 0,25 g PVP, e 5 mL de tampão de extração refrigerado. O tampão de extração continha 100 mM Tris-HCl (pH 7,8), 1,0 mM de EDTA, 0,05% (g/v) de D-Cisteína, e 1,0 mM de L - Ácido Ascórbico. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm durante 15 min a 4 °C e o sobrenadante foi analisado.

A atividade da APX foi determinada num volume final de 2 mL contendo 90 mM de Tampão Fosfato de Potássio (pH 7,0), 0,1 mM de EDTA, 0,65 mM de Ácido L-Ascórbico, e 15 μL do extrato. A reação foi iniciada com a adição de 1,0 mM de H_2O_2 . A atividade da enzimática foi acompanhada a cada 30 s para verificação da faixa de linearidade da enzima nas condições em que estava sendo determinada. A partir de então, a atividade foi determinadas a 25 °C por 5 min seguindo a oxidação do ácido ascórbico a 290 nm, em espectrofotômetro GenesesTM (10s UV VIS). Para efeito de cálculo, utilizou-se o coeficiente de extinção de $2,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em μmol ácido ascórbico oxidado $\text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

Reciclagem do ácido ascórbico

Atividade da monodeidroascórbico redutase (MDHAR): Os extratos para determinação da MDHAR foi obtido da mesma maneira que os extratos para determinação da APX. A atividade da enzima MDHAR foi analisada segundo Hossain et al. (1984) como descrito em Hodges et al. (2003).

A mistura de determinação, com volume final de 2 mL, continha 90 mM de Tampão Fosfato de Potássio (pH 7,5), Triton-X-100 a 0,0125%, 0,2 mM de NADH, 2,5 mM de Ácido L-Ascórbico e 60 µl do extrato. A reação foi iniciada com a adição de 0,4 unidades de Ascorbato Oxidase (Sigma-Aldrich®). A reação foi acompanhada a 25 ° C durante 1 min, medindo-se o decréscimo da absorbância a 340 nm, pela oxidação do NADH. O coeficiente de extinção utilizado no cálculo foi de 6,22 mM⁻¹. cm⁻¹. A atividade da enzima foi expressa em µmol de NADH oxidado min⁻¹.g⁻¹.

Atividade da deidroascórbico redutase (DHAR): os extratos também foram obtidos da mesma maneira que os extratos para determinação da APX, no entanto, após a centrifugação foram removidos os compostos de baixo peso molecular por passagem através de uma mini-coluna (Sephadex G25 PD-10) previamente equilibrada com o tampão de extração.

A determinação da atividade da DHAR seguiu a metodologia proposta por Doulis et al. (1997) como descrito em Hodges et al. (2003). O volume final de 1,5 mL da mistura de determinação continha 90 mM de Tampão Fosfato Potássio (pH 7,0), 1 mM de EDTA, 5,0 mM de Glutathiona Reduzida (GSH) e 10 uL extrato. A reação foi iniciada com a adição de 0,2 mM de DHA e a atividade determinada a 25 ° C, seguindo a redução de DHA a 265 nm, durante 3 minutos, após a verificação da faixa de linearidade. No cálculo, utilizou-se o coeficiente de extinção de 14 mM⁻¹. cm⁻¹. A atividade da enzima foi expressa em µmol de ácido ascórbico formado.min⁻¹.g⁻¹.

Níveis de H₂O₂

Os níveis de peróxido de hidrogênio nos frutos foram determinados seguindo metodologia descrita por (NUKUNTORNPRAKIT et al., 2015). Foram homogeneizadas 5 g de polpa em um almofariz previamente arrefecido no gelo juntamente com 5 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1% (g/v). O homogeneizado foi centrifugado a 11.000 rpm por 25 min a 4 °C. 1 mL do sobrenadante foi adicionada a 3,0 mL de tampão fosfato de potássio a 5 mM (pH 7,0) e 1 mL de iodeto de potássio 1 M. A absorbância da mistura final foi medida a 390 nm utilizando um espectrofotômetro Geneses™ (10s UV VIS). O conteúdo de peróxido

de hidrogênio foi determinado utilizando uma curva padrão de H₂O₂ preparada a partir de uma solução estoque de 10 mM do peróxido e os resultados foram expressos em μmol de H₂O₂.g⁻¹.

4.3. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e com base na significância do teste F foi aplicado análise de regressão polinomial até 2º grau admitindo-se coeficiente de determinação (R²) acima de 60% para explorar o efeito das doses de nitrogênio. As médias entre os estádios de maturação foram comparadas pelo teste de Tukey até 5% de probabilidade de erro. Quando necessário os dados foram transformados para log(y) + 1 e utilizados para montagem de esquemas que melhor demonstrassem o comportamento das variáveis estudadas. Utilizou-se o software SAS 9.3 (2011) para as análises.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O avanço da maturação elevou em mais de 50% o conteúdo de ácido ascórbico nos frutos da goiabeira ‘Paluma’ do estágio Início de Pigmentação (IP) para o Amarelo Esverdeado (AE) (Figura 3A). Por outro lado, o aumento nas doses de nitrogênio até a dose de 137 g.planta⁻¹ resultou na redução em mais de 40% no conteúdo do ácido ascórbico nos frutos (Figura 3B), a partir desta dose o conteúdo de AA tornou a se elevar. Estudos têm demonstrado que altas doses de nitrogênio diminuem o teor de AA em muitos frutos e hortaliças (LIMA et al., 2008; DUMAS et al., 2003; LEE et al., 2000). Para os frutos da goiabeira este comportamento em relação à adubação nitrogenada também foi observado por Lima et al. (2008), no entanto, poucas informações são disponíveis a respeito da influencia do nitrogênio sobre o ácido ascórbico.

O fornecimento de N na faixa ótima favorece o crescimento foliar, os teores de proteínas e a assimilação de CO₂, e não deprimem substancialmente outras vias biossintéticas relacionadas com os hidratos de carbono (MARSCHNER, 2012). No entanto, o nitrogênio em excesso, promove crescimento exagerado e diluição de constituintes nos tecidos das plantas, podendo reduzir os teores de AA (LEE & KADER, 2000). Outra possível explicação, é que o aumento no fornecimento de N, a partir da faixa ótima, não mantém efeito crescente sobre a taxa fotossintética líquida devido o sombreamento mutuo. Consequentemente, a demanda por esqueleto de carbono para assimilação de N, que se mantém elevada, resulta numa competição que muitas vezes leva a uma redução na concentração de constituintes orgânicos, tais como ácido ascórbico, além dos compostos não estruturais (açúcares, amido etc) e hidratos de carbono (celulose) (MARSCHNER, 2012).

Segundo Dumas et al. (2003), o excesso de folhagem e crescimento vegetativo, ocasionado pelos altos níveis de nitrogênio, podem fornecer frutos com menores teores de AA, pois ocasionam o sombreamento destes nas plantas. De fato, maior intensidade de luz direta durante a fase de desenvolvimento resulta em maior teor de ácido ascórbico em frutos e vegetais (LEE & KADER, 2000). Segundo Sminoff et al. (2001), esta influência está ligada ao último passo da via biosintética do AA, representado pela ação catalítica da enzima GLDH, que é estimulada na presença da luz. No entanto, neste trabalho pode-se perceber que a atividade de outras enzimas como a APX, a DHAR e a MDHAR, que também auxiliam na manutenção dos níveis de AA, também foram influenciadas pelo aumento nas doses de nitrogênio (Figuras 5, 7 e 8). Neste contexto, estudos mais aprofundados precisam ser

desenvolvidos para entender melhor a ação do nitrogênio sobre a atividade destas enzimas e, consequentemente, sobre os níveis de AA nos frutos.

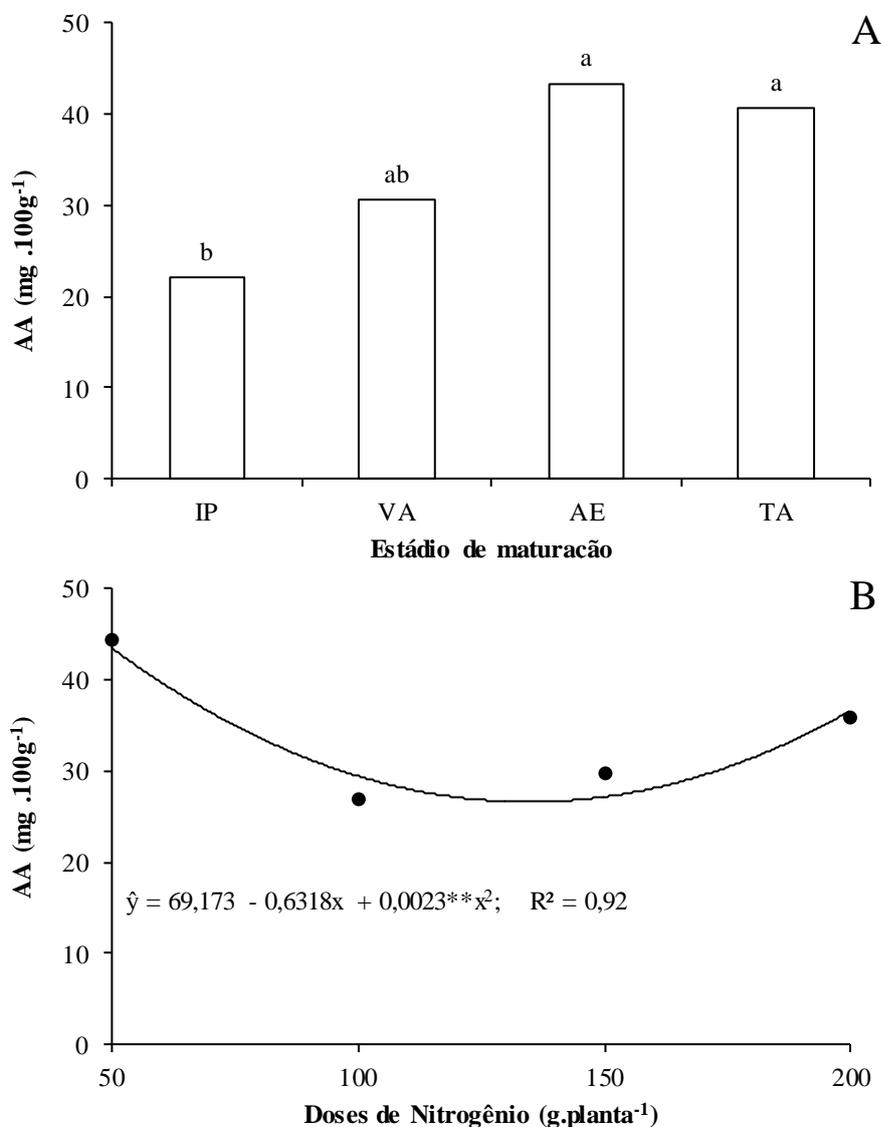


Figura 3. Conteúdo de ácido ascórbico – AA (mg.100g⁻¹) em frutos da goiabeira ‘Paluma’ colhidos em quatro estádios de maturação (A) e adubadas com diferentes doses de nitrogênio (50, 100, 150 a 200 g de N.planta⁻¹) (B).

IP = Início de Pigmentação; VA = Verde Amarelado; AE = Amarelo Esverdeado; TA = Totalmente Amarelo. Colunas com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (Pr \geq 0,5); **Significativo a 1% pelo teste F.

Não foi observado efeito da adubação nitrogenada sobre a atividade da ácido ascórbico oxidase (AAO). No entanto, com o avanço da maturação nos frutos da goiabeira ‘Paluma’ houve redução da atividade da AAO, havendo um decréscimo de 1,42 μ mol de ácido

ascórbico oxidado. $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$, na capacidade enzimática, entre os estádios IP (Início de Pigmentação Amarelada) e TA (Totalmente Amarelo) (Figura 4). Em contrapartida, Gomez et al. (2008) reportaram para manga e goiaba ‘Paluma’ que a atividade da AAO não variou durante o amadurecimento, no entanto diminuiu consideravelmente durante o desenvolvimento de manga. A ácido ascórbico oxidase é uma enzima que influencia o estado redox do ácido ascórbico (AA) no apoplásto (GARCHERY et al., 2013). Nesse contexto, sua função nos sistemas biológicos pode estar relacionada com a modulação de expansão e/ou divisão celular, com importância na germinação e crescimento rápido, possivelmente através do controle da relação AA/DHA, que é fundamental para estimular as respostas hormonais da auxina (PIGNOCCHI et al., 2006). No entanto, o sistema redox do AA apoplástico tem papel importante no metabolismo do fruto durante o amadurecimento, a exemplo da solubilização e despolimerização de polissacáridos pécticos que contribui para o amolecimento da polpa. Além disso, atua na proteção contra o estresse ocasionado por altas temperaturas, reduzindo possíveis distúrbios fisiológico nos frutos (ALONI et al., 2008).

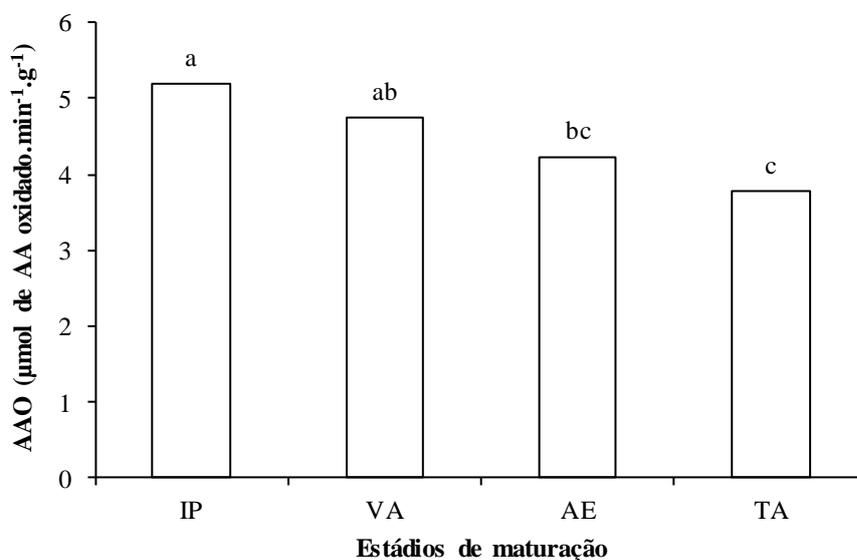


Figura 4. Atividade da ácido ascórbico oxidase – AAO ($\mu\text{mol ácido ascórbico oxidado min}^{-1}\text{.g}^{-1}$) em frutos da goiabeira ‘Paluma’ em quatro estádios de maturação.

IP = Início de Pigmentação; VA = Verde Amarelado; AE = Amarelo Esverdeado; TA = Totalmente Amarelo. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

A maturação e as doses de nitrogênio influenciaram conjuntamente na atividade da enzima ácido ascórbico peroxidase (APX) (Figura 5). O aumento nas doses de nitrogênio elevou significativamente a atividade da APX nos estádios iniciais de maturação (IP e VA).

No entanto, o avanço da maturação promoveu uma maior atividade dessa enzima mesmo em frutos produzidos sob as menores doses de nitrogênio, ou seja, o efeito da maturação se sobressaiu ao efeito da adubação, elevando a atividade da APX nos frutos, não sendo observado diferenças entre os dois últimos estádios de maturação avaliados (AE e TA). Este comportamento está de acordo com Mondal et al. (2009), que relataram que o estresse oxidativo/peroxidativo juntamente com o sistema antioxidante se eleva durante a maturação em frutos da goiabeira, mas não até estádios mais avançados da maturação. Sendo também observado, para diferentes variedades de soja, que o estresse hídrico elevou a atividade da APX após cinco dias de exposição (DEVI e GIRIDHAR, 2015). Neste trabalho, no entanto, a maior atividade da ácido ascórbico peroxidase foi observada ao final da maturação e em frutos produzidos sob altas doses de nitrogênio. Entretanto, Lata (2014) avaliando duas cultivares de repolho, reportou que diferentes níveis de nitrogênio não afetou a atividade da APX.

Atividade mais elevada da APX pode representar melhor defesa contra o estresse oxidativo e o escurecimento interno nos frutos, pois esta enzima, juntamente com o AA, desempenha papel importante no controle das reações desencadeadas pelo H_2O_2 , retardando a senescência rápida e a peroxidação lipídica da membrana (LIN et al., 2015; HODGES et al., 2003). Durante a maturação ocorre várias alterações na coloração, textura e sabor dos frutos, que se tornam aptos ao consumo. Contudo, estas mudanças provocam a formação de radicais livres como o H_2O_2 . Nesse contexto, o aumento na atividade da APX é necessário para desintoxicar os tecidos e minimizar o estresse oxidativo ocasionado pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) (GOMEZ et al., 2008). Por outro lado, uma alta atividade dessa enzima pode contribuir para menores teores de AA, que de forma controversa, explica, neste trabalho, o aumento do conteúdo de AA nos frutos da goiabeira 'Paluma'. Isto é explicado por que a oxidação do AA pode ser compensada pela atividade das enzimas de reciclagem e biossíntese (BOHNDIEK et al., 2011).

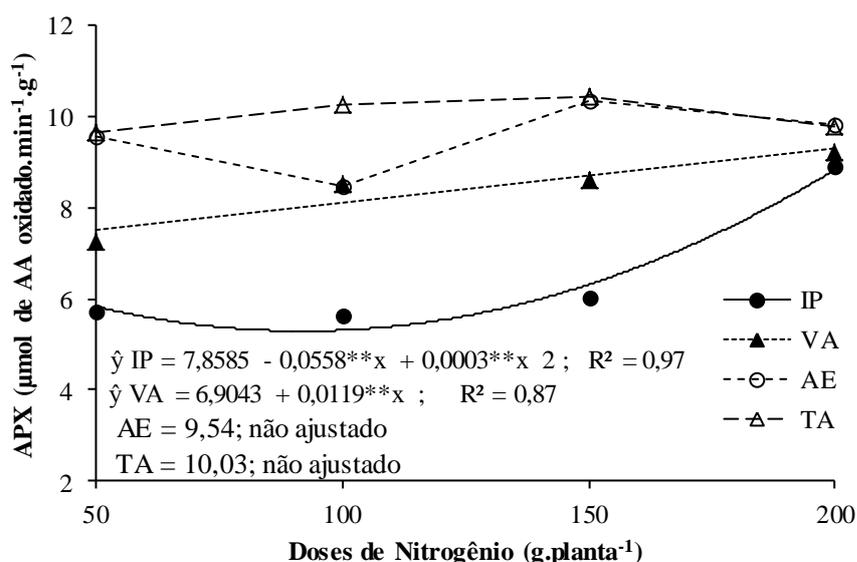


Figura 5. Atividade da ácido ascórbico peroxidase – APX (μmol ácido ascórbico oxidado $\text{min}^{-1}.\text{g}^{-1}$) em frutos da goiabeira ‘Paluma’ adubadas com diferentes doses de nitrogênio (50, 100, 150 a 200 $\text{g}.\text{planta}^{-1}$), colhidos em quatro estádios de maturação.

IP = Início de Pigmentação; VA = Verde Amarelado; AE = Amarelo Esverdeado; TA = Totalmente Amarelo.
 **Significativo a 1% pelo teste F.

O aumento no fornecimento de nitrogênio para as plantas da goiabeira ‘Paluma’ reduziu os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos frutos dos estádios de maturação mais verdes (Figura 6). A aplicação de 160 $\text{g}.\text{planta}^{-1}$ favoreceu uma redução em 40% nos conteúdos de H_2O_2 no estágio IP, quando comparada a dose de 50 $\text{g}.\text{planta}^{-1}$. Sabendo que elevados níveis de peróxido de hidrogênio no tecido vegetal podem estar associados a fatores de estresse (MONDAL et al., 2009 & RESENDE et al., 2003). Podemos supor que frutos da goiabeira ‘Paluma’ adubados com baixas doses de N apresentam-se, possivelmente, em condições de estresse nutricional. Pois a deficiência nutricional associada à alta intensidade de luz resulta numa diminuição da utilização de energia luminosa e representa um stress aos vegetais, elevando a taxa de senescência (MARSCHNER, 2012).

O avanço da maturação também reduziu os níveis do H_2O_2 , apresentando um aumento nos estádios mais avançados (AE e TA), principalmente na dose de 150 $\text{g}.\text{planta}^{-1}$. Observa-se que os níveis de peróxido de hidrogênio nos frutos foram antagônicos a atividade da APX tanto em relação aos estádios de maturação quanto aos níveis de N, ou seja, quanto maior a atividade da ácido ascórbico peroxidase menores os níveis de H_2O_2 nos frutos.

O peróxido de hidrogênio é um dos principais agentes pertencente ao grupo das espécies reativas de oxigênio (ROS), causadores das reações de oxidação em cadeia, e ocorre naturalmente como resultado de processos intracelulares na maioria dos tecidos, principalmente na cadeia respiratória mitocondrial (TURRENS et al., 2003). Portanto, minimizar os níveis de ROS nos frutos, como o H_2O_2 , pode representar maior tempo de vida útil pós-colheita, pois reduz a peroxidação lipídica e a deterioração da membrana, consequentemente, mantem a integridade da membrana e a estrutura dos tecidos (LIN et al., 2015) retardando os processos de senescência dos frutos.

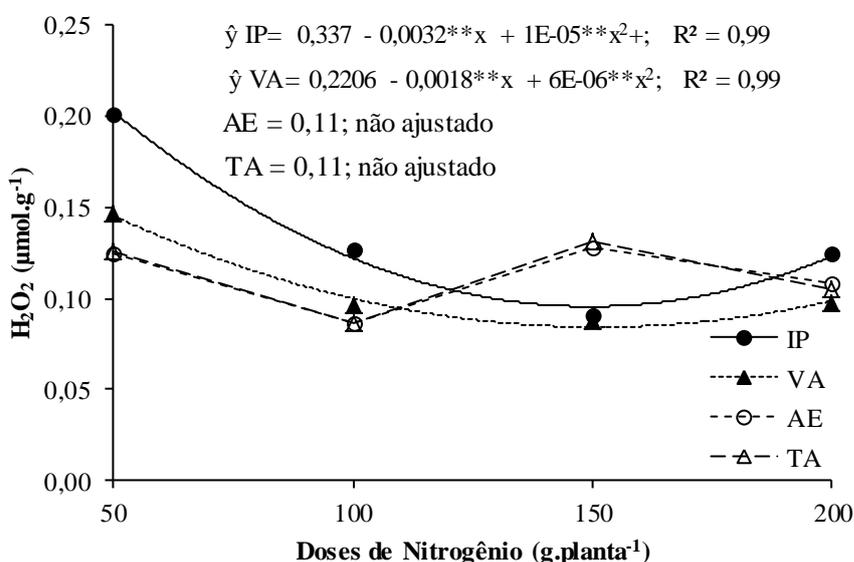


Figura 6. Conteúdo de peróxido de hidrogênio – H_2O_2 ($\mu\text{mol.g}^{-1}$) em frutos da goiabeira ‘Paluma’ adubadas com diferentes doses de nitrogênio (50, 100, 150 a 200 g de $N.\text{planta}^{-1}$), colhidos em quatro estádios de maturação.

IP = Início de Pigmentação; VA = Verde Amarelado; AE = Amarelo Esverdeado; TA = Totalmente Amarelo.

**Significativo a 1% pelo teste F.

Goiabas ‘Paluma’ com maturação avançada apresentaram maior atividade da deidroascórbico redutase (DHAR) (Figura 7A). Além disso, sua atividade se manteve elevada quando comparada as atividades das enzimas APX e AAO (Figura 4 e 5). Este comportamento certamente contribuiu para manter e até mesmo elevar os níveis de AA nos frutos durante a maturação como foi observado na Figura 3A. Por outro lado, o aumento nos níveis de nitrogênio reduziu linearmente a atividade da deidroascórbico redutase nos frutos da goiabeira ‘Paluma’ (Figura 7B), comportamento este que pode explicar a redução nos conteúdos de AA com o aumento nas doses de N (Figura 3B).

A deidroascórbico redutase e a monodeidroascórbico redutase (MDHAR) reduzem, respectivamente, o ácido deidroascórbico e o monodeidroascórbico para restaurar os níveis de AA nas plantas, e podem representar um compensatório da oxidação do AA pelas APX e AAO (GOGGIN et al., 2010). Neste contexto, Gomez et al. (2008) reportaram que o aumento na atividade da DHAR durante o amadurecimento de goiaba ‘Paluma’ ocorreu para compensar a oxidação do AA, contribuindo significativamente para o aumento desses níveis nos frutos durante esta fase de desenvolvimento.

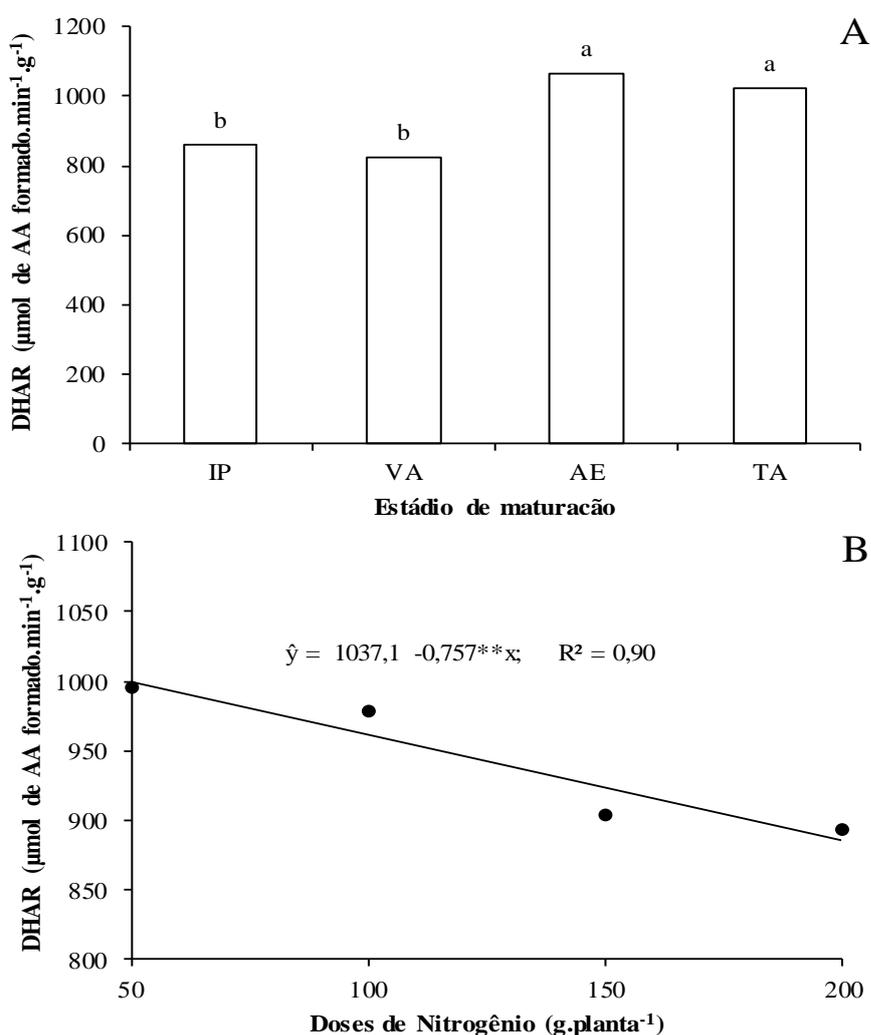


Figura 7. Atividade da deidroascórbico redutase – DHAR (μmol de ácido ascórbico formado.min⁻¹.g⁻¹) em frutos da goiabeira ‘Paluma’ colhidos em quatro estádios de maturação (A) e adubadas com diferentes doses de nitrogênio (50, 100, 150 a 200 g de N.planta⁻¹) (B).

IP = Início de Pigmentação; VA = Verde Amarelado; AE = Amarelo Esverdeado; TA = Totalmente Amarelo.
 **Significativo a 1% pelo teste F.

A monodeidroascórbico redutase (MDHAR) apresentou maior atividade nos frutos com maturação mais avançada e quando sob as menores doses de nitrogênio (Figura 8). Apesar das doses não se ajustarem ao modelo de regressão para o estágio AE (frutos de coloração Amarelo Esverdeados), doses elevadas de nitrogênio reduziram a atividade da enzima nos estádios mais maduros. Os frutos mais verdes (IP) apresentaram menor atividade da MDHAR principalmente em doses mais baixas de nitrogênio. Cruz-Rus et al. (2011) reportaram que a transcrição de genes que codificam a MDHAR, juntamente com enzimas da biossíntese do AA, se correlacionaram com os níveis de AA durante a maturação de frutos do morango. Rai et al. (2015) em uma cultivar de soja tropical tratada com o antioxidante etileno diureia (EDU/N-[2-(2-oxo-1-imidazolidinyl) ethyl- N'-phenylurea] e submetida a ambiente de O₃ (Ozônio), sugeriram que o aumento nos níveis de ácido ascórbico provém de sua regeneração para atuar como doador de elétrons na atividade da APX.

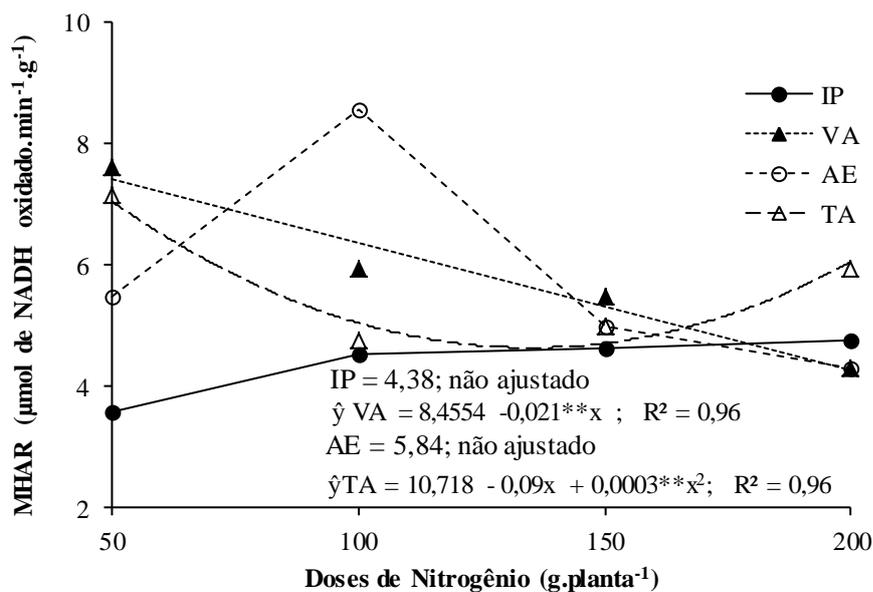


Figura 8. Atividade da Monodeidroascórbico Redutase – MDHAR ($\mu\text{mol NADH oxidado min}^{-1}.\text{g}^{-1}$) em frutos da goiabeira ‘Paluma’ adubadas com diferentes doses de nitrogênio (50, 100, 150 a 200 g de N.planta⁻¹), colhidos em quatro estádios de maturação.

IP = Início de Pigmentação; VA = Verde Amarelado; AE = Amarelo Esverdeado; TA = Totalmente Amarelo.
 **Significativo a 1% pelo teste F.

Avaliando em conjunto, pode-se sugerir que níveis elevados de nitrogênio pode resultar num desequilíbrio para o sistema redox do AA em frutos da goiabeira ‘Paluma’. Pois

o aumento nas doses de nitrogênio favorece maior oxidação do AA a partir da alta atividade da APX, ao passo que reduz as atividades da DHAR e da MDHAR. Este comportamento na atividade destas enzimas certamente influenciou nos níveis de AA dos frutos da goiabeira (GOMEZ et al., 2008).

Através da análise de correlação entre as variáveis estudadas, em função da maturação nos frutos da goiabeira ‘Paluma’ (Figura 9), pode-se visualizar como os níveis de ácido ascórbico aumentam nos frutos e sua importância durante o amadurecimento no controle do estresse oxidativo. Durante a maturação, a atividade da AAO apresentou correlação forte e negativa com ácido ascórbico ($r = -0,69$), indicando que a diminuição da sua oxidação por esta enzima contribui para o aumento de seus conteúdos durante a maturação. Entretanto, apesar da APX atuar na oxidação do AA, o aumento na sua atividade durante a maturação não foi capaz de reduzi-lo ($r = 0,76$). Por outro lado, a atividade da enzima APX se correlacionou moderadamente e de forma negativa com os níveis de H_2O_2 ($r = -0,54$). Isto indica que, ao longo da maturação, a atividade da APX pode atuar na redução dos níveis de peróxido nos frutos, e, apesar de oxidar o AA durante o processo (GALLIE et al., 2013), o sistema redox, através das enzimas de reciclagem e, também, a biossíntese conseguem manter e até elevar os conteúdos do ácido ascórbico nos frutos. Isto, é também observado através da correlação positiva que as atividades das DHAR e a MDHAR apresentaram com os níveis de AA e com a atividade da APX. Portanto, ao passo que a atividade da APX aumentou durante a maturação, houve também um aumento na atividade das enzimas de reciclagem (DHAR e MDHAR) para compensar a oxidação do AA e manter o sistema redox, que resultou no aumento de AA (Figura 10).

Neste contexto, o sistema redox do ácido ascórbico, que é a relação oxidação-redução, é fator determinante para a manutenção e defesa das células, conferindo uma eficiente habilidade em controlar o estresse causado pelo meio intra e extracelular altamente oxidante (GALLIE et al., 2013; BOHNDIEK et al., 2011). Além disso, segundo Bergquist et al. (2006), o AA pode ser utilizado como um parâmetro para a previsão da vida útil do produto após a colheita, principalmente pela atuação do AA na manutenção da qualidade durante o armazenamento de frutos e hortaliças. Dessa forma, é imprescindível a realização de estudos que caracterizam as mudanças no conteúdo de ácido ascórbico e atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo dos frutos durante a maturação, fornecendo subsídios para a adoção de estratégias que otimizem a qualidade e vida pós-colheita dos produtos.

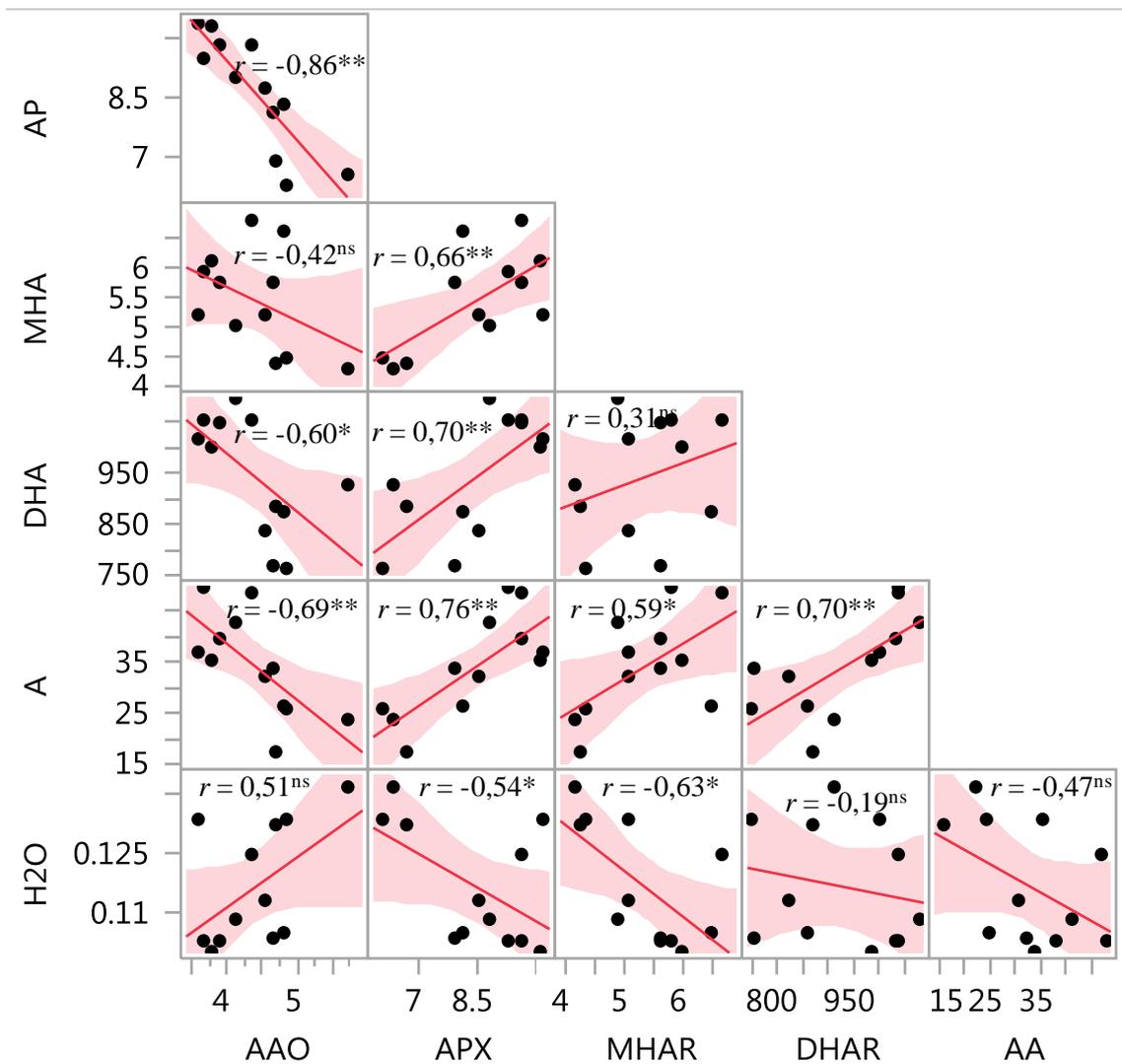


Figura 9. Matriz de dispersão e valores de correlação para os conteúdos de ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio e atividade de enzimas do sistema redox do ácido ascórbico durante a maturação de frutos da goiabeira 'Paluma'.

APX = ácido ascórbico peroxidase; MDHAR = monodeidroascórbico redutase; DHAR = deidroascórbico redutase; AA = ácido ascórbico; H₂O₂ = peróxido de hidrogênio.

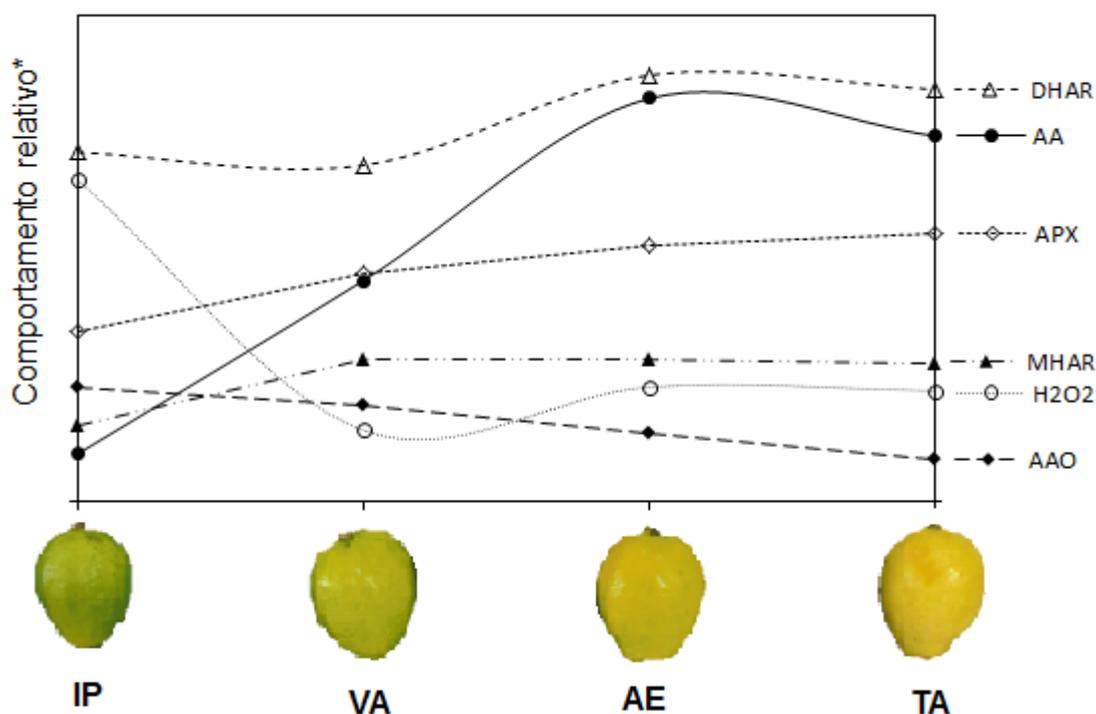


Figura 10. Evolução relativa do ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio e da atividade de enzimas envolvidas no sistema redox do ácido ascórbico em relação ao avanço da maturação de frutos da goiabeira 'Paluma'.

APX = ácido ascórbico peroxidase; DHAR = deidroascórbico redutase; MDHAR = monodeidroascórbico redutase; AA = ácido ascórbico; IP = Início de Pigmentação; VA = Verde Amarelado; AE = Amarelo Esverdeado; TA = Totalmente Amarelo.

*Valores transformados para $\log(y) + 1$.

O efeito das doses de nitrogênio sobre a atividade das enzimas do sistema redox do ácido ascórbico e sobre o conteúdo de AA não foi tão evidente quanto o observado na evolução da maturação. Contudo, na Figura 11, pode-se observar que o aumento nas doses de nitrogênio na goiabeira 'Paluma' reduziu a atividade das enzimas de reciclagem do AA (DHAR e MDHAR) e elevou a atividade da APX, contribuindo para a obtenção de menores conteúdos de ácido ascórbico nos frutos, como já previamente demonstrado neste trabalho.

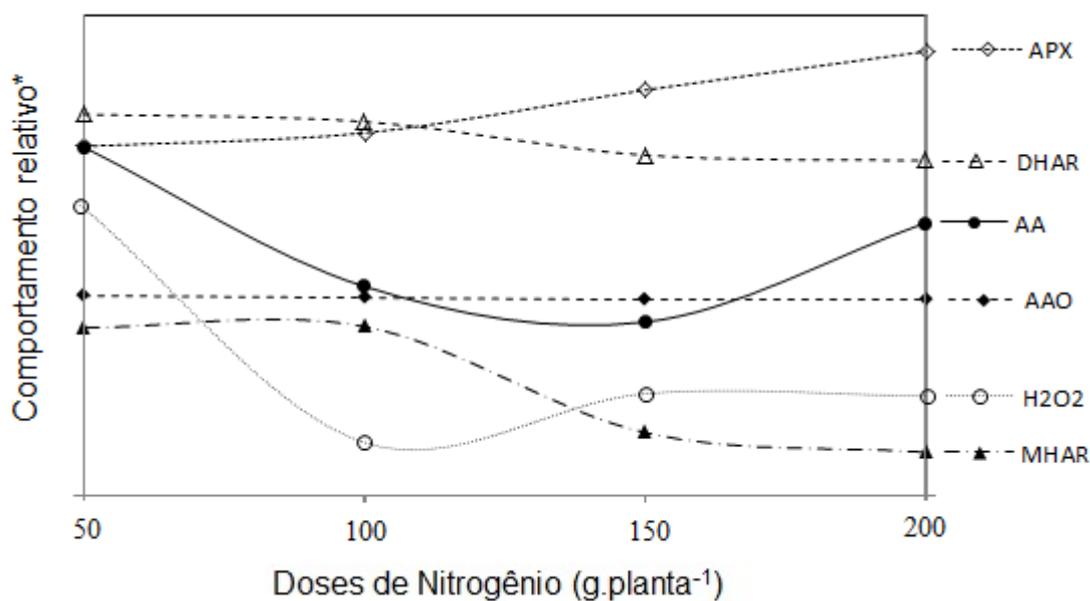


Figura 11. Evolução relativa do ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio e da atividade de enzimas envolvidas no sistema redox do ácido ascórbico de frutos da goiabeira ‘Paluma’ em relação ao aumento nas doses de nitrogênio (50, 100, 150 a 200 g de N.planta⁻¹).

APX = ácido ascórbico peroxidase; DHAR = deidroascórbico redutase; MDHAR = monodeidroascórbico redutase; AA = ácido ascórbico; IP = Início de Pigmentação; VA = Verde Amarelado; AE = Amarelo Esverdeado; TA = Totalmente Amarelo.

*Valores transformados para $\log(y) + 1$.

6. CONCLUSÃO

Elevadas doses de N, na adubação da goiabeira, reduzem a atividade das enzimas de reciclagem do ácido ascórbico, deidroascórbico redutase (DHAR) e monodeidroascórbico redutase (MDHAR), proporcionando a redução nos teores de ácido ascórbico dos frutos até a dose de 147 g.planta⁻¹.

Doses elevadas de nitrogênio favoreceram o aumento da atividade da ácido ascórbico peroxidase nos frutos da goiabeira 'Paluma' no início da maturação, que por sua vez, minimizaram os conteúdos de peróxido de hidrogênio nos frutos mais verdes.

A dose de 170 g de N.planta⁻¹ favorece a qualidade dos frutos da goiabeira 'Paluma', pois mantém o conteúdo de ácido ascórbico e reduz o estresse oxidativo, mensurado a partir dos níveis de peróxido de hidrogênio.

Nos frutos da goiabeira 'Paluma', o avanço da maturação, independentemente da adubação nitrogenada, promove o aumento da atividade da ácido ascórbico peroxidase e das enzimas de reciclagem (DHAR e MDHAR) e reduz a atividade da ácido ascórbico oxidase, aumentando o conteúdo de ácido ascórbico.

7. REFERÊNCIAS

ALONI, B.; KARNI, L.; DEVENTURERO, G.; TURHAN, E.; AKTAS, H. Changes in ascorbic acid concentration, ascorbate oxidase activity, and apoplastic pH in relation to fruit development in pepper (*Capsicum annuum* L.) and the occurrence of blossom-end rot. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 83, n. 1, p. 100-105, 2008

ÂNGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

AZZOLINI, M.; JACOMINO, A. P.; BRON, I. U. Índices para avaliar qualidade pós-colheita de goiabas em diferentes estádios de maturação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 2, p. 139-145, 2004.

BERGQUIST, S. Å. M.; GERTSSON, U. E.; OLSSON, M. E. Influence of growth stage and postharvest storage on ascorbic acid and carotenoid content and visual quality of baby spinach (*Spinacia oleracea* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 3, p. 346-355, 2006.

BOHNDIEK, S. E.; KETTUNEN, M. I.; HU, D. E.; KENNEDY, B. W.; BOREN, J.; GALLAGHER, F. A.; BRINDLE, K. M. Hyperpolarized [1-¹³C]-ascorbic and dehydroascorbic acid: vitamin C as a probe for imaging redox status in vivo. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 30, p. 11795-11801, 2011.

CAVALINI, F. C. **Índices de maturação, ponto de colheita e padrão respiratório de goiabas ‘Kumagai’ e ‘Paluma’**. Dissertação Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba – SP, 2004.

CRUZ-RUS, E., AMAYA, I., SÁNCHEZ-SEVILLA, J. F., BOTELLA, M. A., & VALPUESTA, V. Regulation of L-ascorbic acid content in strawberry fruits. **Journal of experimental botany**, p. err122, 2011.

DANTAS, A. L. **Qualidade, compostos bioativos, atividade antioxidante e enzimática de frutos de araçazeiros (*Psidium* sp.) do brejo paraibano**. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba, CCA/UFPB – Areia PB, 2011.

DANTAS, J. I. A.; PONTES, C. A.; LEITE, G. A.; FERNANDES, P. L. D. O.; FREITAS, W. E. D. S.; CARVALHO, C. A. C. D. Biossíntese de vitaminas em frutos e hortaliças. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 8, n. 4, p. 22-37, 2012.

DE GARA, L.; PACIOLLA, C.; DE TULLIO, M. C.; MOTTO, M.; ARRIGONI, O. Ascorbate-dependent hydrogen peroxide detoxification and ascorbate regeneration during germination of a highly productive maize hybrid: evidence of an improved detoxification mechanism against reactive oxygen species. **Physiologia Plantarum**, v. 109, n. 1, p. 7-13, 2000.

DEVI, M. A., & GIRIDHAR, P. Variations in Physiological Response, Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzyme Activities, Proline and Isoflavones Content in Soybean Varieties Subjected to Drought Stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 85, n. 1, p. 35-44, 2015.

DOULIS, A. G., DEBIAN, N., KINGSTON-SMITH, A. H., & FOYER, C. H. Differential localization of antioxidants in maize leaves. **Plant Physiology**, v. 114, n. 3, p. 1031-1037, 1997.

DUMAS, Y.; DADOMO, M.; DI LUCCA, G.; GROLIER, P. Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, n. 5, p. 369-382, 2003.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasília, DF: EMBRAPA SOLOS, 2006.

FUMIS, T. F.; SAMPAIO, A. C. **Biologia e Cultivares**. Em: SAMPAIO, A. C.. (Org.). Goiaba: do plantio à comercialização. 1aed.Campinas (SP). : CATI. 2011.v. 78, p. 01-12.

GALLIE, Daniel R. l-Ascorbic acid: a multifunctional molecule supporting plant growth and development. **Scientifica**, v. 2013, 2013.

GARCHERY, C.; GEST, N.; Do, P. T.; ALHAGDOW, M.; BALDET, P.; MENARD, G. A diminution in ascorbate oxidase activity affects carbon allocation and improves yield in tomato under water deficit. **Plant, cell & environment**, v. 36, n. 1, p. 159-175, 2013.

- GAUTIER, H.; LOPEZ-LAURI, F.; MASSOT, C. et al. Impact of ripening and salinity on tomato fruit ascorbate content and enzymatic activities related to ascorbate recycling. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 66-75, 2010.
- GOGGIN, F. L., AVILA, C. A., & LORENCE, A. Vitamin C content in plants is modified by insects and influences susceptibility to herbivory. **Bioessays**, v. 32, n. 9, p. 777-790, 2010.
- GOMEZ, M. L.; LAJOLO, F. M. Ascorbic acid metabolism in fruits: activity of enzymes involved in synthesis and degradation during ripening in mango and guava. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 5, p. 756-762, 2008.
- HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant physiology**, v. 141, n. 2, p. 312-322, 2006.
- HANCOCK, R. D.; VIOLA, R. Biosynthesis and catabolism of L-ascorbic acid in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, n. 3, p. 167-188, 2005.
- HODGES, D. M.; FORNEY, C. F. Postharvest ascorbate metabolism in two cultivars of spinach differing in their senescence rates. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 128, n. 6, p. 930-935, 2003.
- HOSSAIN, M. A., NAKANO, Y., & ASADA, K. Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. **Plant and Cell Physiology**, v. 25, n. 3, p. 385-395, 1984.
- JIMENÉZ, A.; GÓMEZ, J. M.; NAVARRO, E.; SEVILLA, F. Changes in the antioxidative systems in mitochondria during ripening of pepper fruits. **Plant Physiology**, v. 40, p. 515-20, 2002.
- ŁATA, B. Variability in enzymatic and non-enzymatic antioxidants in red and green-leafy kale in relation to soil type and N-level. **Scientia Horticulturae**, v. 168, p. 38-45, 2014.
- LEE, S. K.; KADER, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Postharvest biology and technology**, v. 20, n. 3, p. 207-220, 2000.
- LIM, Y.; LIM, Y. T. T.; TEE, J. J. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. **Food chemistry**, v. 103, n.3, p.1003-1008, 2007.

LIMA, M. A. C. D.; BASSOI, L. H.; SILVA, D. J.; SANTOS, P. D. S.; PAES, P. D. C.; RIBEIRO, P. R. D. A.; DANTAS, B. F. Effects of levels of nitrogen and potassium on yield and fruit maturation of irrigated guava trees in the São Francisco Valley. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 246-250, 2008.

LIN, Y.; LIN, Y.; LIN, H.; ZHANG, S.; CHEN, Y. & SHI, J. Inhibitory effects of propyl gallate on browning and its relationship to active oxygen metabolism in pericarp of harvested longan fruit. **LWT-Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 1122-1128, 2015.

LINHARES, L. A.; SANTOS, C. D. D.; ABREU, C. M. P. D.; CORRÊA, A. D. Chemical, physical and enzymatic transformations of guavas' PEDRO SATO'treated at post-harvest with calcium chlorite and 1-methylciclopropone and stored under refrigeration. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 3, p. 829-841, 2007.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 22, n. 2, 2004.

MARSCHNER, H. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. Academic press, Third Ed. 649p. 2012.

MONDAL, K.; MALHOTRA, S. P.; JAIN, V.; SINGH, R. Oxidative stress and antioxidant systems in Guava (*Psidium guajava* L.) fruits during ripening. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 15, n. 4, p. 327-334, 2009.

NAKANO, Y. & ASADA, K. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. **Plant and cell physiology**, v. 28, n. 1, p. 131-140, 1987.

NATALE, W.; PRADO, R. M.; QUAGGIO, J. A.; MATTOS JUNIOR, D. Goiabeira. In:_____. **Adubando para alta produtividade e qualidade: fruteiras tropicais do Brasil**. Tradução: CRISÓSTOMO, L. A. Fortaleza, CE: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009 pg. 104-121.

NUKUNTORNPRAKIT, O. A., CHANJIRAKUL, K., VAN DOORN, W. G., & SIRIPHANICH, J. Chilling injury in pineapple fruit: Fatty acid composition and antioxidant metabolism. **Postharvest Biology and Technology**, v. 99, p. 20-26, 2015.

ÔBA, K.; ISHIKAWA, S.; NISHIKAWA, M.; MIZUNO, H.; YAMAMOTO, T. Purification and properties of L-galactono- γ -lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots. **Journal of Biochemistry**, v. 117, n. 1, p. 120-124, 1995.

PALIYATH, G.; MURR, D. P. Biochemistry of Fruits. In: PALIYATH, G.; MURR, D. P.; HANDA, A. K.; LURIE, S. (eds) **Postharvest Biology and Technology of Fruits, Vegetables and Flower**. Wiley-Blackwell Publishing, cap 3, p. 19-50, 2008.

PIGNOCCHI, C., KIDDLE, G., HERNÁNDEZ, I., FOSTER, S. J., ASENSI, A., TAYBI, T., & FOYER, C. H. Ascorbate oxidase-dependent changes in the redox state of the apoplast modulate gene transcript accumulation leading to modified hormone signaling and orchestration of defense processes in tobacco. **Plant physiology**, v. 141, n. 2, p. 423-435, 2006.

PINTO, P. M.; JACOMINOI, A. P.; CAVALINI, F. C.; CUNHA JUNIOR, L. C.; INOUE, K. N. Estádios de maturação de goiabas ‘Kumagai’ e ‘Pedro Sato’ para o processamento mínimo. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, 2010.

POIROUX-GONORD, F., BIDEL, L. P., FANCIULLINO, A. L., GAUTIER, H., LAURI-LOPEZ, F., & URBAN, L. Health benefits of vitamins and secondary metabolites of fruits and vegetables and prospects to increase their concentrations by agronomic approaches. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 23, p. 12065-12082, 2010.

PORAT, R.; TIETEL, Z.; ZIPPORI, I.; DAGB, A. Aroma volatile compositions of high and low-aromatic guava varieties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 91: 2794-2798, 2011.

RAI, R.; AGRAWAL, M.; CHOUDHARY, K. K.; AGRAWAL, S. B.; EMBERSON, L. & BÜKER, P. Application of ethylene diurea (EDU) in assessing the response of a tropical soybean cultivar to ambient O₃: Nitrogen metabolism, antioxidants, reproductive development and yield. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 112 (2015) 29–38.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. São Paulo: Editora Edgar Blücher: Instituto Mauá de Tecnologia, 2004, 184p.

RUPASINGHE, H. P. V. The role of polyphenols in quality, postharvest handling, and processing of fruits In: PALIYATH, G.; MURR, D. P.; HANDA, A. K.; LURIE, S. (eds) **Postharvest Biology and Technology of Fruits, Vegetables and Flowers**. Wiley-Blackwell Publishing, cap 12, p. 260-281, 2008.

SHIMADA, Y.; KO, S. Ascorbic acid and ascorbic acid oxidase in vegetables. **Chugokugakuen journal**, v. 7, p. 7-10, 2008.

SILVA, E. M.; BENITO-BAUTISTA, P.; DE LOS ANGELES GARCÍA-VELASCO, M. Fruit development, harvest index and ripening changes of guavas produced in central Mexico. **Postharvest Biology and Technology**, v. 13, n. 2, p. 143-150, 1998.

SILVA, G.C. da; SOUZA, A. P. de; MENDONÇA, R. M. N; ARAÚJO. R.da C. **Produção de frutos da goiabeira submetida à adubação nitrogenada e Fosfática em areia de cultivo comercial na Paraíba**. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 19, 2006. Cabo Frio-RJ. Anais. Cabo Frio-RJ: SBF/UENF/UFRRJ. 2006, 529p.

SMIRNOFF, N.; CONKLIN, P. L.; LOEWUS, F. A. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. **Annual review of plant biology**, v. 52, n. 1, p. 437-467, 2001.

SOBRATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potencial antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutation Resarch**, v. 579, p. 200-213, 2005.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SPÍNOLA, V. A. R. **Novas metodologias para a determinação do conteúdo de ácido árcobico em alimentos frescos**. 2013, 181 p. Dissertação de mestrado apresentada à UNIVERSIDADE DA MADEIRA.

STROHECKER, R.; HENINING, H. M. **Análises de vitaminas: métodos comprobados**, 42 p. 1967.

THAIPONG, K., BOONPRAKOB, U., CROSBY, K., CISNEROS-ZEVALLOS, L., & BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of food composition and analysis**, v. 19, n. 6, p. 669-675, 2006.

TUDELA, J. A.; HERNÁNDEZ, J. A.; GIL, M. I.; ESPÍN, J. C. L-galactono- γ -lactone dehydrogenase activity and vitamin C content in fresh-cut potatoes stored under controlled atmospheres. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 15, p. 4296-4302, 2003.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of physiology**, v. 552, n. 2, p. 335-344, 2003.

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

YIN, R.; MAO, S. Q.; ZHAO, B., et al. Ascorbic acid enhances Tet-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 28, p. 10396-10403, 2013.