

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**QUOCIENTE RESPIRATÓRIO: INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA PARA O ARMAZENAMENTO DE
MAÇÃS EM ATMOSFERA CONTROLADA
DINÂMICA**

TESE DE DOUTORADO

Anderson Weber

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**QUOCIENTE RESPIRATÓRIO: INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
PARA O ARMAZENAMENTO DE MAÇÃS EM ATMOSFERA
CONTROLADA DINÂMICA**

Anderson Weber

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Agronomia.**

Orientador: Prof. Auri Brackmann

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**QUOCIENTE RESPIRATÓRIO: INOVAÇÃO TECNOLÓGICA PARA O
ARMAZENAMENTO DE MAÇÃS EM ATMOSFERA CONTROLADA
DINÂMICA**

elaborada por
Anderson Weber

como requisito para a obtenção do grau de
Doutor em Agronomia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Auri Brackmann
Prof. Dr. – UFSM
(Presidente/Orientador)

Luciane Almeri Tabbaldi
Prof^a. Dr. – UFSM

Cristiano André Steffens
Prof. Dr. – UDESC

Cesar Valmor Rombaldi
Prof. Dr. – UFPEL

Adriano Arriel Saquet
Prof. Dr. – IFF – Reitoria

Santa Maria, 6 de novembro de 2013

*À minha família,
que nunca mediu esforços e acreditaram na minha
formação para que esta tese se tornasse real.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela saúde e força para concluir esta tese e seguir em frente.

Aos meus pais, Osmar e Clari, pelo apoio incondicional e pelo exemplo de vida, trabalho, perseverança, dedicação e honestidade.

Aos meus irmãos, Anísio e André, e à minha irmã Ângela, aos(às) cunhados(as), e aos(às) sobrinhos(as) que me apoiaram durante toda minha formação profissional.

À Cristina Lovato pelo amor, carinho e companheirismo na etapa final da tese.

Ao professor Dr. Auri Brackmann, pela orientação, amizade e por possibilitar a iniciação científica durante a Graduação e a realização do Mestrado e Doutorado.

Aos pesquisadores Dr. Daniel Alexandre Neuwald e Dr. Dominikus Kitemann pela orientação, amizade e apoio no período de doutorado sanduíche no Centro de Competência em Fruticultura do Lago de Constança (KOB) na Alemanha.

Aos amigos(as) e funcionários(as) Alemães do KOB (Berenice, Sabine, Renate, Marlene, Rose, Martin) por me auxiliarem nos trabalhos de execução desta tese e aos amigos do “Stammtisch” por me acolherem e facilitarem a adaptação ao local.

Aos meus colegas e amigos do Núcleo de Pesquisa em Pós-Colheita: Vanderlei, Elizandra, Rogério, Fabio, Márcio, Linke, Thiago, Jorge, Adriano, Erani, Eduardo, Vagner, Altair e Liniker que me auxiliaram neste e/ou em tantos outros trabalhos.

Ao professor e amigo Cristiano André Steffens, pelos ensinamentos, incentivos e companheirismo.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de realizar a Graduação, o Mestrado e o Doutorado.

Ao CNPq, pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica durante a graduação, pela Bolsa de Mestrado, pela bolsa de Doutorado e pela bolsa de Doutorado Sanduíche.

À CAPES, por disponibilizar um portal com uma vasta coleção de periódicos, a partir dos quais obtive uma parte fundamental da minha formação acadêmica.

MUITO OBRIGADO.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

QUOCIENTE RESPIRATÓRIO: INOVAÇÃO TECNOLÓGICA PARA O ARMAZENAMENTO DE MAÇÃS EM ATMOSFERA CONTROLADA DINÂMICA

AUTOR: Anderson Weber
ORIENTADOR: Prof. Dr. Auri Brackmann
Santa Maria, 6 de novembro de 2013

A atmosfera controlada convencional resultou em significativa melhora na manutenção da qualidade de maçãs durante as últimas décadas. Entretanto, nesse sistema de armazenagem ainda ocorrem significativas perdas. Para tanto, recentemente foi desenvolvida uma nova técnica para armazenamento de maçãs denominada de atmosfera controlada dinâmica (ACD) e monitorada pela emissão de fluorescência de clorofilas. Este sistema é utilizado comercialmente em alguns países e é conhecido como HarvestWatch™ (ACD HW). O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade de maçãs armazenadas em um novo método de ACD com monitoramento do quociente respiratório (QR) e comparar este com o sistema comercial de ACD e com a atmosfera controlada convencional (AC). Além disso, avaliar o efeito da associação de 1-metilciclopropeno (1-MCP) ou temperaturas mais elevadas à ACD sobre a qualidade das maçãs. Foram conduzidos experimentos que foram separados em quatro artigos científicos nesta tese. Inicialmente, foram monitorados diferentes quocientes respiratórios que proporcionassem melhor manutenção da qualidade das maçãs armazenadas em ACD. Em seguida verificou-se também o efeito da associação de 1-MCP e elevação da temperatura no armazenamento em ACD de maçãs 'Royal Gala' e 'Fuji Suprema' no Brasil e 'Braeburn' na Alemanha, sempre comparando a nova ACD QR com a ACD HW e AC convencional. O tempo de armazenamento e temperatura foi de sete a nove meses e 0,5, 1 ou 1,5°C para as maçãs 'Royal Gala'; de nove meses e -0,5°C para as maçãs 'Fuji Suprema'; e de oito meses e 1 ou 3°C para as maçãs 'Braeburn', respectivamente. Após o armazenamento, as maçãs foram expostas por 7 dias a 20°C. A ACD com QR acima de 2 resulta em danos aos tecidos e sabor alcoólico da polpa das maçãs, portanto, não indicada para monitorar a ACD. O QR mais adequado para armazenagem de maçãs 'Royal Gala' e 'Fuji Suprema' foi de 1,5 a 2 e para maçãs 'Braeburn' de 1,5. Nestes quocientes respiratórios para controlar a pressão parcial de oxigênio na ACD, as maçãs apresentaram menor ocorrência de distúrbios fisiológicos e maior firmeza de polpa, principalmente, devido à redução da síntese de etileno e taxa respiratória. A redução na atividade metabólica é decorrente da produção de etanol na polpa de maçãs em condições de hipóxia, que resulta na inibição da rota de síntese de etileno e, portanto, na redução do avanço do processo de amadurecimento. A associação da aplicação de 1-metilciclopropeno ao armazenamento de maçãs 'Royal Gala' e 'Fuji Suprema' em ACD resultou em menor taxa respiratória e produção de compostos da fermentação e, conseqüentemente, manteve maior teor de sólidos solúveis e de ácidos, entretanto, sem efeito sobre a firmeza de polpa nas maçãs 'Royal Gala'. Maçãs 'Royal Gala', produzidas no Brasil, armazenadas na temperatura de 1,5°C e maçãs 'Braeburn', produzidas na Alemanha, a 3°C apresentaram menor ou igual ocorrência de distúrbios fisiológicos que às maçãs armazenadas em menor temperatura. Portanto, as temperaturas mais elevadas mantêm a mesma qualidade de maçãs e, além disso, tem-se o ganho na economia de energia nos sistemas de geração de frio.

Palavras-chave: Etanol. Aldeído Acético. Temperatura. Etileno. Respiração anaeróbica. Fluorescência de clorofila.

ABSTRACT

Doctor's Thesis
Graduate Program in Agronomy
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

RESPIRATORY QUOTIENT: TECHNOLOGICAL INNOVATION FOR APPLE STORAGE IN DYNAMIC CONTROLLED ATMOSPHERE

AUTHOR: Anderson Weber
ADVISER: Prof. Dr. Auri Brackmann
Santa Maria, November 6th, 2013

The conventional controlled atmosphere storage resulted in a significant improvement in the apples quality maintenance during the last decades, however, in this storage system further losses occur. Therefore, recently a new technique for storing apples was developed, called dynamic controlled atmosphere (DCA) which is monitored by chlorophylls fluorescence emission. This system is used commercially and is known as HarvestWatch™ (HW DCA). The aim of this study was to evaluate apple fruit quality with the use of the new DCA storage method with the respiratory quotient (RQ) monitoring and compare this new system with the HW ACD and the conventional controlled atmosphere (CA). Furthermore, the effect of the combination of 1-methylcyclopropene (1-MCP) application or higher temperature with the RQ DCA were evaluate. For that, experiments were divided in four scientific articles in this thesis. Initially, different levels of the respiratory quotient were tested to control the DCA for maintain the apple quality after storage. Thereafter, the effect of the combination of 1-MCP application and elevated storage temperature for 'Royal Gala' and 'Fuji Suprema' apples, produced in Brazil, and 'Braeburn' apples, produced in Germany was tested. The new RQ DCA was always compared with the HW DCA and the conventional CA. The storage time and temperature were 7 to 9 months and 0.5, 1 or 1.5°C for 'Royal Gala' apples, 9 months and -0.5°C for 'Fuji Suprema', and 8 months and 1 or 3°C for 'Braeburn' apples, respectively. After storage, the apples were also exposed in shelf life for 7 days at 20°C. The DCA with RQ higher than 2 results in tissue damage and alcoholic taste of apples flesh, therefore, not suitable for DCA monitoring. The RQ most suitable for storage of 'Royal Gala' and 'Fuji Suprema' apples were 1.5 to 2, and for 'Braeburn' apples, 1.5. With these respiratory quotients, for controlling oxygen partial pressures in the DCA, the apples after storage had a lower incidence of physiological disorders and higher flesh firmness, mainly due to the reduced synthesis of ethylene and respiratory rate. The reduction in the metabolic activity is due to the ethanol production in the apples flesh under the hypoxic conditions, which leads in the inhibition of ethylene biosynthesis way and, therefore, reducing the maturation process. For 'Royal Gala' and 'Fuji Suprema' apples, the association of 1-MCP application with the RQ DCA results in lower respiratory and fermentation rate and, therefore, maintained the highest total soluble solids and titratable acids content, however, the 1-MCP application had no effect on flesh firmness in 'Royal Gala' apples. The incidence of physiological disorders was the same or lower if the 'Royal Gala' apples, produced in Brazil, was stored at 1.5°C and the 'Braeburn' apples, produced in Germany, was stored at 3°C than if they were stored at 1°C. Therefore, higher temperatures maintain the same apple quality during and after storage and, in addition, energy can be saved due to the lesser cold generation necessity.

Key words: ethanol; acetaldehyde; temperature; ethylene; anaerobic respiration; fluorescence

LISTA DE FIGURAS

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
	Figura 1 – Modo de ação do estresse por baixo O ₂ e/ou alto CO ₂ no metabolismo fermentativo dos frutos.	42
3	ARTIGO 1	50
4	ARTIGO 2	65
	Figure 1 – ‘Braeburn’ apples treated with different ethanol doses after 6 months controlled atmosphere storage (1.2kPa O ₂ and <0.7kPa CO ₂) and exposed for more 7 days at shelf life at 20°C before evaluation.	77
	Figure 2 – ‘Braeburn’ apples treated with different ethanol doses after 6 months controlled atmosphere storage (1.2kPa O ₂ and <0.7kPa CO ₂) and exposed for more 7 days at shelf life at 20°C before evaluation.	78
5	ARTIGO 3	87
	Figura 1 – Atividade da ACC oxidase (A), concentração interna de etileno (CIE) (B) e de CO ₂ (CI CO ₂) (C) de maçãs ‘Royal Gala’ após o armazenamento por nove meses em diferentes condições de AC e ACD mais sete dias a 20°C.	99
	Figura 2 - Acidez titulável e sólidos solúveis totais (SST) de maçãs ‘Royal Gala’ após o armazenamento por nove meses em diferentes condições de AC e ACD mais sete dias a 20°C.	100
	Figura 3 - Firmeza de polpa e análise de correlação entre produção de etanol e firmeza de polpa de maçãs ‘Royal Gala’ após o armazenamento por nove meses em diferentes condições de AC e ACD mais sete dias a 20°C.	101
	Figura 4- Produção de aldeído acético, etanol e acetato de etila de maçãs ‘Royal Gala’ após o armazenamento por nove meses em diferentes condições de AC e ACD mais sete dias a 20°C.	102
	Figura 5 - Incidência de podridão (A), degenerescência de polpa (B), polpa farinácea (C) e porcentagem de frutas sadias (D) de maçãs ‘Royal Gala’ após o armazenamento por nove meses em diferentes condições de AC e ACD mais sete dias a 20°C.	103
6	ARTIGO 4	110

Figure 1 - Variation of respiratory quotient and oxygen level of 'Fuji Suprema' apples during storage under RQ1.5 DCA (A) and RQ2.0 DCA (B). Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, 2013..... 116

7 DISCUSSÃO..... 130

8 CONCLUSÃO GERAL 133

9 REFERÊNCIAS 135

LISTA DE TABELAS

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
3	ARTIGO 1	50
	Table 1. Ethylene production rate and ACC oxidase activity of ‘Royal Gala’ apples after eight months at different DCA conditions and temperature plus seven days shelf life at 20°C.....	57
	Table 2. Respiration rate of ‘Royal Gala’ apples after eight months at different DCA conditions and temperature plus seven days shelf life at 20°C.....	57
	Table 3. Flesh firmness, titratable acidity and soluble solids of ‘Royal Gala’ apples after eight months at different DCA conditions and temperature plus seven days shelf life at 20°C.....	58
	Table 4. Flesh breakdown, mealiness, low O ₂ injury, and healthy fruit percentages of ‘Royal Gala’ apples after eight months at different DCA conditions and temperature plus seven days of shelf life at 20°C.	60
4	ARTIGO 2	65
	Table 1 – Titratable acidity (TA) and soluble solids (SS) of ‘Braeburn’ apples after eight months at different DCA conditions and temperature plus seven days shelf life at 20°C.	73
	Table 2 – Pyruvate decarboxylase activity (PDC) and acetaldehyde production from ‘Braeburn’ apples after eight months at different DCA conditions and temperature plus seven days shelf life at 20°C.	74
	Table 3 – Alcohol dehydrogenase activity (ADH), ethanol and ethyl acetate production from ‘Braeburn’ apples after eight months at different DCA conditions and temperature plus seven days shelf life at 20°C.....	74
	Table 4 – ACC oxidase activity and ethylene production rate from ‘Braeburn’ apples after eight months at different DCA conditions and temperature and six or seven days shelf life at 20°C.....	75
	Table 5 – Respiration rate from ‘Braeburn’ apples after eight months at different DCA conditions and temperature and more six days shelf life at 20°C.	75
	Table 6 – Membrane permeability, β -galactosidase activity and flesh firmness of ‘Braeburn’ apples after eight months at different DCA conditions and temperature plus seven days shelf life at 20°C.	76

	Table 7 – Pearson correlation matrix among physical, chemical and biochemical parameters from ‘Braeburn’ apples after eight months storage more seven days shelf life at 20°C.	79
5	ARTIGO 3.....	87
	Tabela 1- Taxa de biossíntese de etileno e taxa respiratória de maçãs ‘Royal Gala’ armazenadas por nove meses em diferentes condições de AC e ACD e expostas durante seis dias a 20°C.	98
6	ARTIGO 4.....	110
	Table 1 – ACC oxidase enzyme activity, internal ethylene concentration (IEC) and ethylene production of ‘Fuji Suprema’ apples stored under controlled atmosphere (CA) and dynamic controlled atmosphere (DCA) by respiratory quotient (RQ DCA) and chlorophyll fluorescence (HW DCA) during 9 moths plus 7 days of shelf life. Santa Maria, 2013.	117
	Table 2 – Respiration rate, internal dioxide carbon concentration (ICO ₂) and titratable acidity of ‘Fuji Suprema’ apples stored under controlled atmosphere (CA) and dynamic controlled atmosphere (DCA) by respiratory quotient (RQ DCA) and chlorophyll fluorescence (HW DCA) during 9 moths. Santa Maria, 2013.	119
	Table 3 – Ethanol acetaldehyde, ethyl acetate and flesh firmness of ‘Fuji Suprema’ apples stored under controlled atmosphere (CA) and dynamic controlled atmosphere (DCA) by respiratory quotient (RQ DCA) and chlorophyll fluorescence (HW DCA) during 9 moths plus 7 days of shelf life. Santa Maria, 2013.	121
	Table 4 – Decay incidence, cavities, healthy fruits and soluble solids of ‘Fuji Suprema’ apples stored under controlled atmosphere (CA) and dynamic controlled atmosphere (DCA) by respiratory quotient (RQ DCA) and chlorophyll fluorescence (HW DCA) during 9 moths plus 7 days of shelf life. Santa Maria, 2013.	122
	Table 5 – <i>Pearson</i> correlation between ethylene production (Eth.), respiration rate (Resp.), internal ethylene concentration (IEC), internal dioxide carbon concentration (ICO ₂), titratable acidity (TA), healthy fruits (H.fr.), cavities (Cav.), flesh firmness (Firm.), ACC oxidase enzyme activity (ACC), ethanol (EtOH), acetaldehyde (AA) and ethyl acetate (EtAC) of ‘Fuji Suprema’ apples stored under controlled atmosphere and dynamic controlled atmosphere (DCA) by respiratory quotient and chlorophyll fluorescence during 9 moths plus 7 days of shelf life. Santa Maria, 2013.	123
7	DISCUSSÃO.....	130

8	CONCLUSÃO GERAL.....	133
9	REFERÊNCIAS	135

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: Temperatura em graus Celsius

$\mu\text{L L}^{-1}$: Microlitro por litro

1-MCP: 1-meticiclopropeno

AC: Atmosfera controlada

ACD: Atmosfera controlada dinâmica

ADH: Álcool desidrogenase

ATP: Adeosina trifosfato

BBD: Escurecimento de polpa da maçã 'Braeburn' (Braeburn Browning disorder)

C_2H_4 : Etileno

CO_2 : Dióxido de carbono

EROs: Espécies reativas de oxigênio

Fo: Fluorescência inicial mínima após a adaptação ao escuro

Fv/Fm: Redução na máxima eficiência fotoquímica quântica do fotossistema II

F α : Estimativa da fluorescência mínima

g: Grama

H_2O_2 : Peróxido de hidrogênio

kPa: Kilopascal

LDH: Lactato desidrogenase

LHCII: Complexo coletor de luz do fotossistema II

LOL: Limite mínimo de oxigênio (lowest oxygen limit)

mEq: Miliequivalente

mL: Mililitro

mM: Milimolar

mmol: Milimol

NAD^+ : Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo oxidado

NTPs: Nucleotídeos trifosfatos

O_2 : Oxigênio

PCA: Ponto de compensação anaeróbico

PDC: Piruvato descarboxilase

PDH: Piruvato desidrogenase

pH: Potencial hidrogeniônico

PQ: Plastoquinona

PSII: Fotossistema II

QR: Quociente respiratório

ULO: Ultrabaixo oxigênio (Ultra Low Oxygen)

$\eta\text{L L}^{-1}$: Nanolitro por litro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	21
1.1	Hipóteses.....	25
1.2	Objetivo geral	26
1.2.1	Objetivos específicos.....	26
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	Produção brasileira e capacidade de armazenagem de maçãs	27
2.2	Cultivares de maçãs produzidas no Brasil e Alemanha.....	28
2.3	Armazenamento de maçãs	29
2.3.1	Efeitos do baixo O ₂ e alto CO ₂ sobre o metabolismo dos frutos	29
2.3.2	O armazenamento em Atmosfera Controlada Dinâmica.....	32
2.3.2.1	O método da medição do etanol	33
2.3.2.2	O método da fluorescência de clorofilas	35
2.3.2.2.1	Princípio fisiológico	37
2.3.2.3	O método do quociente respiratório	40
2.3.3	O efeito do etanol no armazenamento de maçãs	41
2.3.4	O efeito da temperatura no armazenamento em ACD	46
2.3.5	O efeito do 1-metilciclopropeno no armazenamento de maçãs	47
3	ARTIGO 1	50
3.1	Dynamic controlled atmosphere based on respiratory quotient maintains quality of ‘Royal Gala’ apples	50
3.1.1	Introduction	52
3.1.2	Material and Methods.....	53
3.1.2.1	Experimental materials and storage conditions	53
3.1.2.2	Temperature and relative humidity control	54
3.1.2.3	Gases control	54
3.1.2.4	Biochemical and physical evaluations.....	55

3.1.2.5	Statistical analysis	56
3.1.3	Results and Discussion	56
3.1.4	Conclusions.....	61
3.1.5	Acknowledgements.....	61
3.1.6	References.....	61
4	ARTIGO 2	65
4.1	Flesh softening inhibition in ‘Braeburn’ apples with respiratory quotient dynamic controlled atmosphere or ethanol application in high temperature storage	65
4.1.1	Abstract.....	65
4.1.2	Introduction.....	66
4.1.3	Material and Methods	68
4.1.3.1	Plant materials and sample homogenization.....	68
4.1.3.2	Experiments	68
4.1.3.2.1	DCA experiment.....	68
4.1.3.2.2	Ethanol application experiment	69
4.1.3.3	Temperature and relative humidity control.....	69
4.1.3.4	Gases control.....	69
4.1.3.4.1	CA storage rooms	69
4.1.3.4.2	HarwestWatch™ DCA storage rooms.....	70
4.1.3.4.3	Respiratory quotient DCA storage rooms.....	70
4.1.3.5	Biochemical and physical evaluations	70
4.1.3.6	Statistical analysis.....	72
4.1.4	Results.....	73
4.1.5	Discussion.....	79
4.1.5.1	DCA and ethanol application effect on fruit quality.....	79
4.1.5.2	Storage temperature effect on fruit quality	81
4.1.6	Conclusion	82
4.1.7	Acknowledgements.....	83
4.1.8	References.....	83

5	ARTIGO 3.....	87
5.1	Armazenamento de maçãs ‘Royal Gala’ em atmosfera controlada dinâmica com uso de quociente respiratório associado ao 1-metilciclopropeno em diferentes temperaturas	87
5.1.1	Resumo.....	87
5.1.2	Abstract	88
5.1.3	Introdução.....	89
5.1.4	Material e Métodos.....	91
5.1.4.1	Material vegetal e homogeneização das amostras.....	91
5.1.4.2	Experimento	92
5.1.4.3	Controle da temperatura e umidade relativa do ar.....	92
5.1.4.4	Aplicação de 1-metilciclopropeno.....	92
5.1.4.5	Instalação e controle da atmosfera	93
5.1.4.5.1	Câmaras de AC.....	93
5.1.4.5.2	Câmaras de ACD pelo sistema HarvestWatch™.....	93
5.1.4.5.3	Câmaras de ACD com medição do quociente respiratório	94
5.1.4.6	Avaliações físicas e bioquímicas.....	94
5.1.4.7	Análise estatística	96
5.1.5	Resultados e Discussão	97
5.1.6	Conclusão	104
5.1.7	Agradecimentos.....	105
5.1.8	Referências	105
6	ARTIGO 4.....	110
6.1	Dynamic controlled atmosphere by respiratory quotient and chlorophyll fluorescence and its interaction with 1-methylcyclopropene on ‘Fuji Suprema’ apples quality.....	110
6.1.1	Abstract	110
6.1.2	Introduction	111
6.1.3	Material and Methods.....	112
6.1.3.1	Fruit source and sample homogenization	113
6.1.3.2	1-methylcyclopropene application	113

6.1.3.3	Storage conditions.....	113
6.1.3.4	Quality evaluation.....	114
6.1.3.5	Statistical analysis.....	115
6.1.4	Results and discussion	115
6.1.5	Conclusions.....	124
6.1.6	References.....	125
7	DISCUSSÃO	130
8	CONCLUSÃO GERAL.....	133
9	REFERÊNCIAS.....	135

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O desempenho do setor agrícola brasileiro tem sido responsável por grande parte dos crescentes aumentos no saldo da balança comercial. De setembro de 2012 a agosto de 2013, as exportações agrícolas do Brasil somaram US\$ 102,3 bilhões, o que representa 42,9% do total das exportações do país nesse ano, e a perspectiva para o ano de 2013 é que estes valores aumentem (MAPA, 2013). A cadeia produtiva da fruticultura é a área que mais cresce dentro do agronegócio brasileiro, sendo uma das atividades que mais proporciona retorno econômico e social (MAPA, 2011).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, com uma produção que supera 41 milhões de toneladas, sendo suplantado apenas por China e Índia. Deste montante, 2,6% são de maçãs, ou seja, aproximadamente 1,1 milhões de toneladas anuais. Entretanto, o país ocupa apenas a 15ª posição no ranking dos maiores exportadores (CARVALHO; MIRANDA, 2011; AGRIANUAL, 2012). Segundo Carvalho; Miranda (2011), a 15ª posição nas exportações é devida ao consumo de frutas frescas ou industrializada dentro do país. Portanto, além de produzir alto volume o país também é um grande consumidor de frutas. Dessa forma, a exigência do consumidor brasileiro também precisa ser atendida. Dörr; Marques (2006) afirmam que o mercado consumidor europeu de frutas brasileiras está cada vez mais rigoroso quanto à qualidade, exigindo a rastreabilidade e certificação da cadeia de produção. Frutas produzidas em um manejo integrado, com redução na utilização de produtos químicos, geram incremento no preço e conquistam a preferência destes mercados. Desta forma, o principal entrave para a expansão da fruticultura no Brasil é a obtenção de frutas que satisfaçam os padrões de qualidade comerciais e que permitam a manutenção de sua qualidade pós-colheita, pois além de ter um potencial de aumentar as exportações tem também um boa potencial de aumento do consumo interno de frutas frescas.

A produção brasileira de maçãs vem crescendo nos últimos anos. Entre as cultivares mais exploradas no Brasil destacam-se a ‘Fuji’, a ‘Gala’, e suas respectivas mutantes. As mutantes ‘Royal Gala’, ‘Galaxy’, ‘Brookfield’, ‘Maxi Gala’, ‘Fuji Suprema’ entre outras, têm ganhado considerável espaço na produção nacional, sendo usadas na renovação dos pomares, substituindo as tradicionais ‘Gala’ e ‘Fuji’. A principal variação das mutantes é a coloração vermelho intenso que cobre quase toda a epiderme do fruto, o que lhe agrega maior valor de mercado e melhor aceitação pelos consumidores brasileiros.

Para regular a oferta e demanda durante o ano, parte da produção da maçã é armazenada. No Brasil existe uma infraestrutura relativamente moderna para o armazenamento de maçãs, no entanto, ainda ocorrem muitas perdas durante armazenagem. Segundo Duarte (2010), pequenas perdas durante a pós-colheita da maçã já representam grandes perdas econômicas, em função do alto custo acumulado desde a instalação de pomar até a comercialização das frutas. As estimativas de perdas de frutos não são muito precisas, em virtude da grande dificuldade de quantificar exatamente as perdas. De acordo com a FAO (2013), as perdas em pós-colheita de vegetais podem variar de 15 a 50% do que é produzido devido, principalmente, pela colheita em fase de maturação fisiológica inadequada, excessiva exposição a chuvas, seca ou temperaturas extremas, contaminações por microrganismos e danos físicos durante a pós-colheita. Já, segundo Amarante et al. (2010a), as principais causas de perdas de frutos na fase pós-colheita são devidos a distúrbios fisiológicos, podridões e amadurecimento avançado. As perdas de maçãs armazenadas por sete a nove meses em atmosfera controlada variam de 20 a 40% (WEBER et al., 2011; 2013a; BRACKMANN et al., 2012b). Estes valores indicam que mesmo com o uso da melhor combinação de AC ainda ocorrem muitas perdas durante o período de armazenamento.

As principais causas de perdas pós-colheita variam em função da cultivar. A maçã 'Gala' apresenta, após longo período de conservação, degenerescência de miolo ou da polpa e ocorrência de polpa com aspecto farináceo, acompanhado por rápida perda da firmeza de polpa. As principais causas da ocorrência desses distúrbios são a maturação muito avançada na colheita, o excesso de umidade na câmara frigorífica, altas concentrações de etileno e uso inadequado de pressões parciais de oxigênio (O_2) e gás carbônico (CO_2) nas câmaras de atmosfera controlada (BRACKMANN et al., 2003). Na maçã 'Fuji', além da podridão carpelar, também ocorrem grandes perdas devido a dois distúrbios fisiológicos, a degenerescência interna, normalmente associada à suscetibilidade ao CO_2 e a escaldadura. Estes distúrbios também estão relacionados com as condições de armazenamento, anteriormente citadas para a cv. Gala.

Para prolongar o período de armazenamento de maçãs se utiliza a técnica de armazenamento conhecida como atmosfera controlada (AC), que retarda processos metabólicos relacionados ao amadurecimento e senescência de frutos. Esta técnica se baseia no manejo da refrigeração e da atmosfera de armazenagem, objetivando manter os frutos armazenados por longos períodos, afim de regular a oferta e a comercialização no período de entressafra. Entretanto, há a necessidade de manter os frutos com boa qualidade para o consumo, que nem sempre é conseguida através do armazenamento em AC sem a utilização de uma técnica

adicional. Dentre as técnicas auxiliares tem-se o rápido resfriamento e rápida instalação da atmosfera controlada, o manejo do etileno na câmara de armazenagem, através de sua absorção ou aplicação de produtos que inibem sua síntese, como o AVG (aminoetovinilglicina); ou sua ação, como o 1-MCP (1-metilciclopropeno), além do controle da umidade relativa durante o armazenamento. Todavia, algumas destas técnicas podem gerar um alto custo para as empresas armazenadoras de maçãs.

Na tentativa de reduzir as perdas após prolongado período de armazenamento, Weber (2010) armazenou maçãs em pressões parciais ultrabaixas de oxigênio (abaixo de 1 kPa) em atmosfera controlada convencional. Entretanto, estas condições resultaram em danos às maçãs manifestados na forma de escurecimento interno (WEBER et al., 2011). Porém, a aplicação de etanol em maçãs armazenadas em AC (1,2 kPa O₂ e 2,0 kPa CO₂) resultou em uma significativa alteração do metabolismo, que culminou com maior retenção da firmeza de polpa sem causar danos à polpa das maçãs (WEBER, 2010). Desta forma, surgiu uma evidência de que o etanol poderia agir reduzindo o amadurecimento das maçãs.

Recentemente, no Canadá e na Itália uma outra nova técnica complementar a AC foi desenvolvida e, atualmente, já se encontra em uso comercial. Esta técnica é conhecida internacionalmente como Atmosfera Controlada Dinâmica (ACD), que se baseia na modificação da pressão parcial de O₂ ao longo do período de armazenamento, conforme a exigência ou tolerância da maçã a baixas pressões de O₂. O armazenamento de frutos em baixas concentrações de oxigênio e altas de gás carbônico induz as vias fermentativas, resultando na produção de etanol e aldeído acético. A exposição dos frutos a estes produtos da fermentação, em doses que não causem estresse excessivo, pode diminuir a taxa respiratória, a produção de etileno e, principalmente, a incidência de distúrbios fisiológicos e podridões. Portanto, a técnica da AC Dinâmica necessita de um mecanismo de detecção do estresse do fruto, causado pela respiração anaeróbica. Quando o estresse atingir um ponto crítico, a técnica preconiza a elevação da pressão parcial de O₂ para que novamente diminua a respiração anaeróbica, que, se permanecer alta por muito tempo, poderá induzir a ocorrência de distúrbios fisiológicos. Portanto, ao invés de aplicar etanol em pós-colheita, a ACD pode induzir pequena taxa fermentativa reduzindo o avanço do amadurecimento das maçãs.

Existem três formas possíveis conhecidas para avaliar o nível de estresse em maçãs durante o armazenamento em AC Dinâmica, ou seja, através: a) da concentração de etanol no fruto e/ou na atmosfera da câmara; b) da emissão de fluorescência da clorofila; e c) do quociente respiratório. Os dois primeiros métodos de determinação do estresse dos frutos deverão ser melhorados e adaptados às cultivares de maçãs produzidas no Brasil, pois estes métodos, hoje

disponíveis e estudados na América do Norte e Europa, ainda apresentam deficiências. Já, o terceiro método, ainda não foi estudado e, portanto, ainda não foi adaptado para ser usado para monitorar a ACD.

No primeiro método de ACD, a concentração de etanol é medida na atmosfera de armazenagem ou na própria fruta retirada periodicamente da câmara. Este método tem como principal entrave a determinação do etanol, que se realizada a partir da atmosfera da câmara apresenta baixa relação com a taxa fermentativa das frutas. Segundo Liu et al. (2012), o etanol pode ser absorvido pelas próprias frutas e transformá-lo em outro composto, como por exemplo em acetato de etila e outros compostos responsáveis pelo aroma. Por este motivo, a empresa Marvil Itália desenvolveu um sensor de etanol, que determina a concentração deste composto da fermentação, a partir do suco extraído de uma amostra de maçãs coletada da câmara de armazenagem.

O segundo método, já bastante difundido nas empresas armazenadoras de maçãs, utiliza o princípio da emissão de fluorescência pelas clorofilas em condições de hipóxia. Entretanto, para iniciar um pico de emissão de fluorescência as maçãs são inicialmente submetidas a um estresse inicial por baixo oxigênio. A partir desse momento a técnica prevê a elevação da pressão parcial de oxigênio em aproximadamente 0,2 kPa acima do nível em que iniciou o estresse por baixo oxigênio. Porém, Brackmann et al. (2012a; 2013) verificaram que o estresse inicial por baixo oxigênio nas maçãs ‘Fuji’ e ‘Royal Gala’, produzidas no Brasil, não resultou em maior retenção da qualidade quando comparado à atmosfera controlada convencional e, além disso, ocorreu a indução de distúrbios fisiológicos. Portanto, esta técnica deve ser adaptada para as maçãs produzidas no Brasil.

O terceiro método de ACD, pelo monitoramento do quociente respiratório (QR), ainda não foi testado e adaptado para o controle da pressão parcial de oxigênio. Alguns trabalhos como os de Gasser et al. (2008, 2010), acompanharam a variação do QR com a redução da pressão parcial de oxigênio, entretanto, não o utilizaram como forma de controlar o oxigênio. Devido a capacidade do QR em detectar a transição da respiração aeróbica para a anaeróbica quando a pressão parcial de oxigênio é reduzida, utilizou-se esta relação para monitorar em tempo real o ponto de compensação anaeróbica (PCA). Este ponto é caracterizado pelo início de aumento da produção de CO₂ em função da redução da pressão parcial de oxigênio, ou seja, o início da fermentação.

A temperatura de armazenamento é um dos fatores mais importantes no controle do amadurecimento de frutas durante a pós-colheita (STEFFENS et al., 2007). Entretanto, a geração de frio é um importante fator de custo para as empresas que armazenam frutas. Na

Alemanha McCormick et al. (2012), objetivando reduzir o consumo de energia elétrica na geração de frio, armazenaram maçãs ‘Gala’ em ULO a 1,5°C ou 4°C associado com aplicação de 1-MCP, e verificaram que na última condição as maçãs apresentavam melhor acidez e firmeza de polpa durante as 21 semanas de armazenamento. A elevação da temperatura em 2,5°C resultou em economia de aproximadamente € 500,00 em apenas uma câmara com 200 toneladas de maçãs, ou seja, uma economia de 35% de energia durante a fase de armazenamento. A associação de temperatura mais elevada ao armazenamento em ACD com pressão parcial de oxigênio extremamente baixa ainda não foi testada. A ACD poderia, neste caso, substituir a aplicação de 1-MCP efetuada por McCormick et al. (2012).

Deve ser ressaltado que o armazenamento em AC Dinâmica é uma tecnologia limpa, que poderá substituir o uso de compostos químicos como difenilamina, usada em alguns países, no controle da escaldadura em maçãs ‘Fuji’, e evitar a aplicação de 1-MCP, que inibe a ação do etileno, para valorizar produtos orgânicos.

Desta forma, devido ao aumento da procura de produtos ecologicamente mais saudáveis por parte dos consumidores e pela procura de redução de custos e perdas no período de pós-colheita, justifica-se a importância da investigação de novas técnicas que conservem as maçãs por longo período de armazenamento, com baixo custo e acessíveis aos produtores.

1.1 Hipóteses

Os frutos armazenados em atmosfera controlada dinâmica mantêm melhor a qualidade após oito meses de armazenamento, comparado a condições de AC convencional normalmente usadas em empresas armazenadoras de maçãs.

A técnica do monitoramento do quociente respiratório para controle das câmaras de ACD pode ser mais eficiente que outras técnicas usadas para este fim.

O metabolismo fermentativo é importante para inibir o avanço do amadurecimento das maçãs durante a pós-colheita.

A atmosfera controlada dinâmica poderá substituir o uso de 1-metilciclopropeno em pós-colheita.

O armazenamento em atmosfera controlada dinâmica permite a utilização de temperatura mais elevada sem perda de qualidade das maçãs.

1.2 Objetivo geral

Avaliar a atmosfera controlada dinâmica para o armazenamento de maçãs, em especial, a controlada pelo monitoramento do quociente respiratório e associar com elevação da temperatura e aplicação de 1-metilciclopropeno sobre a qualidade das frutas, após prolongado período de armazenamento.

1.2.1 Objetivos específicos

Avaliar o nível do quociente respiratório mais adequado para o armazenamento em atmosfera controlada dinâmica de maçãs ‘Royal Gala’ e ‘Fuji Suprema’, produzidas no Brasil, e maçãs ‘Braeburn’, produzidas na Alemanha.

Avaliar e comparar as técnicas da fluorescência de clorofilas e do quociente respiratório sobre a manutenção da qualidade das maçãs armazenadas em atmosfera controlada dinâmica.

Comparar a eficiência de AC dinâmica com a da AC convencional e aplicação de 1-MCP na conservação de maçãs.

Avaliar o efeito da aplicação de 1-metilciclopropeno sobre a qualidade das maçãs armazenadas em atmosfera controlada dinâmica.

Avaliar a possibilidade de elevação da temperatura de armazenamento em 0,5 a 2,0°C acima da temperatura recomendada a fim de reduzir o gasto de energia elétrica para refrigeração.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção brasileira e capacidade de armazenagem de maçãs

A produção brasileira de maçã ocupa uma área de 38 mil hectares com produção anual superior a 1,1 milhões de toneladas e rendimento médio de 29 ton ha⁻¹ (REENTZ et al., 2009; AGRIANUAL, 2012), sendo autossuficiente para o consumo interno e, além disso, gera um excedente que é exportado. O principal destino das exportações brasileiras, aproximadamente 88%, corresponde ao mercado Europeu e o restante para Ásia (REENTZ et al., 2009). A safra brasileira coincide com a entressafra no hemisfério norte, sendo, portanto, um produto bastante atraente para o mercado europeu e asiático, o que resulta em bons preços na exportação nestes períodos. O Brasil exportou na safra 2007/2008 112,2 mil toneladas, o que equivale a um montante de 12,5% da produção anual brasileira, gerando um faturamento de US\$ 80,876 milhões (REENTZ et al., 2009). Em 2012, na região de Vacaria, os produtores exportaram 65.155 toneladas de maçã para pelo menos 45 países, atingindo um montante superior a 47 milhões de dólares (AGAPOMI, 2012). Portanto, a exportação têm importante papel na cadeia produtiva da maçãs para o mercado Gaúcho e Brasileiro.

Entretanto, DÖRR; MARQUES (2006), afirmam que o mercado europeu está cada vez mais rigoroso quanto à qualidade das maçãs, exigindo a rastreabilidade dentro da cadeia de produção e a certificação, onde frutas produzidas num manejo integrado, em que a utilização de produtos químicos é mínima, tem grande incremento no preço e preferência destes mercados.

Visando atender este mercado nacional e internacional, o Brasil possui uma estrutura frigorífica, instalada na região de produção, com capacidade de armazenamento de aproximadamente 650 mil toneladas de frutas. No Rio Grande do Sul a capacidade de armazenagem é de 38% em atmosfera refrigerada e 62% em atmosfera controlada (AGAPOMI, 2012), o que permite a oferta do produto ao longo do ano.

Nos últimos anos iniciou-se no Brasil a armazenagem de maçãs em atmosfera controlada dinâmica pelo método da medição da fluorescência de clorofila. Este pacote tecnológico é comercializado pela empresa Isolcell da Itália e é chamado de HarvestWatchTM. A empresa Schio Agropecuária – Vacaria/RS instalou 13 câmaras de 800 toneladas com monitoramento do fluorescência em 2010 e mais 10 câmaras de 1000 toneladas em 2013, atingindo a capacidade de 20 mil toneladas de maçãs em ACD. Outras empresas no RS, como a Frutini Fruticultura Aliprandini, a Dalaio Agropastoril e a Frutival - Cooperativa dos

Fruticultores da Região de Vacaria, e em SC, a Hiragami's Fruit, também estão construindo novas câmaras ou substituindo o tradicional armazenamento em atmosfera controlada estática pela nova técnica de atmosfera controlada dinâmica (*Informação pessoal*).

Na Europa a substituição das câmaras de AC pela ACD já iniciou em 2007. Esta tecnologia já é usada em cerca de 800 câmaras comerciais na Itália, Alemanha, Áustria, Eslovênia, Croácia, Israel, França, Espanha e Portugal com armazenamento de mais de 350.000 toneladas de maçãs usando a tecnologia HarvestWatch™ da Isolcell (ISOLCELL, 2012).

2.2 Cultivares de maçãs produzidas no Brasil e Alemanha

O consumidor brasileiro tem preferência por maçãs de epiderme vermelha e polpa com pouca acidez como as da cultivar Red Delicious e as cultivares Gala e Fuji, com suas respectivas mutantes. As cultivares como a Golden Delicious e a Granny Smith tem frutos de sabor muito ácido e epiderme verde que é pouco apreciada no Brasil.

Para atender a expectativa do mercado interno e externo, as cultivares Gala e Fuji, antes predominantes no setor produtivo, estão dando espaço às mutantes, como a 'Royal Gala', 'Maxi Gala', 'Galaxy', 'Imperial Gala', 'Fuji Kiku', 'Fuji Suprema', dentre outras. A produção de maçãs na Alemanha é muito mais diversificada que no Brasil. Enquanto no Brasil a produção está basicamente baseada nos grupos 'Gala' e 'Fuji', na Alemanha, várias outras cultivares tem importante parte no mercado de maçãs. As principais cultivares neste país são: 'Gala', 'Fuji', 'Braeburn', 'Jonagold', 'Elstar', 'Golden Delicious', 'Kanzi', 'Granny Smith', 'Idared', 'Pinova', dentre outras, sendo produzidas no sistema integrado (UNECE, 2005). A cultivar Topaz é especial para a produção orgânica pela sua resistência a sarna da macieira, menor suscetibilidade a outras doenças e teor de acidez acima de $6 \text{ meq } 100\text{mL}^{-1}$ (*Informação pessoal*).

Atualmente as principais maçãs produzidas no Brasil são originadas de mutação natural das cultivares Gala e Fuji (AGAPOMI, 2012). O fenômeno da mutação é uma modificação espontânea da informação genética, localizada na sequência do DNA, e que pode resultar em indivíduos ou células com alterações fenotípicas (RAMALHO et al., 2008). A mutação 'Royal Gala' foi originada em Matamata, Nova Zelândia, em 1971 e introduzida comercialmente no Brasil em 1974 (EPAGRI, 2002). Tem coloração mais intensa que a Gala, apresenta estrias mais pronunciadas que recobrem toda superfície do fruto, porém com menor intensidade de estrias no lado sombreado. É muito suscetível à sarna (*Venturia inaequalis*), mancha da 'Gala'

e podridão amarga (*Colletotrichum gloesporieoides*; *Glomerella cingulata*) (MANHART, 1995).

A cultivar Fuji Suprema, também utilizada nesta tese, é uma mutação espontânea da maçã ‘Fuji’ e foi encontrada em Curitiba/SC no ano de 1986. Esta cultivar apresenta coloração vermelha sólida que cobre mais de 80% da epiderme da fruta, tornando-a muito atrativa no mercado brasileiro. Esta cultivar geralmente é de tamanho médio a grande e de forma redondo achatado.

As maçãs ‘Braeburn’ são originárias da Nova Zelândia. Esta cultivar é resultado do cruzamento entre a maçã ‘Granny Smith’ e ‘Lady Hamilton’ que foi feito em 1952. Esta cultivar tem sido cultivada desde logo após a sua descoberta até os dias atuais em todas as regiões produtoras de maçãs no mundo. Dependendo do local de produção esta cultivar pode apresentar alta suscetibilidade à ocorrência de escurecimento interno da polpa, principalmente, quando armazenada em atmosfera controlada. Este distúrbio é conhecido como “Braeburn Browning disorder” (BBD). No sul da Alemanha esta cultivar é mediantemente suscetível a este distúrbio (*Informação pessoal*).

2.3 Armazenamento de maçãs

2.3.1 Efeitos do baixo O₂ e alto CO₂ sobre o metabolismo dos frutos

O armazenamento em atmosfera controlada (AC), que envolve a redução da concentração de oxigênio e/ou elevação do dióxido de carbono, é usado comercialmente para prolongar a vida pós-colheita e para manter a qualidade de muitos produtos hortícolas (KE; SALTVEIT, 1989). O armazenamento em AC reduz a produção de etileno (GORNY; KADER, 1997) e a taxa respiratória dos frutos (BRACKMANN et al., 2008), mantendo a qualidade dos mesmos. Entretanto, por períodos prolongados de armazenamento ainda podem ocorrer perdas, como ocorrência de podridões, distúrbios fisiológicos e perda de firmeza de polpa, que poderiam ser reduzidas por outras técnicas, como o armazenamento em condições ultrabaixas de oxigênio (ULO – *Ultra Low Oxygen*) (BALLA; HOLB, 2007).

O armazenamento em ULO é uma técnica complementar à AC, no entanto, devem-se respeitar os limites mínimos de O₂ a fim de evitar danos aos frutos, como a perda de aromas (ECHEVERRIA et al., 2002; GRAELL et al., 2008) ou ocorrência de distúrbios fisiológicos (WEBER et al., 2011). A diminuição da pressão parcial de oxigênio na câmara reduz a síntese

de etileno e a respiração celular, retardando o amadurecimento e favorecendo a manutenção da qualidade das frutas climatéricas.

A respiração é um processo metabólico que tem por objetivo fornecer energia química para as células efetuarem processos bioquímicos. Porém, além do fornecimento de energia química, a respiração também é a fonte de produção de vários compostos intermediários, importantes em outras rotas metabólicas (TAIZ; ZIEGER, 2010) como a produção de pigmentos, aminoácidos, ácido ascórbico, compostos fenólicos, compostos voláteis, além de outros compostos (PLAXTON, 1996, VALPUESTA, BOTELLA, 2004).

Em nível celular existem duas formas básicas da célula produzir energia: a respiração aeróbica e a anaeróbica. A respiração aeróbica é um processo biológico pelo qual compostos orgânicos reduzidos, normalmente provenientes das reservas da célula, são mobilizados e subsequentemente oxidados de maneira controlada em estruturas moleculares mais simples, incluindo o CO₂ e água. Durante a respiração, parte da energia livre é liberada e transitoriamente armazenada na forma de ATP (adenosina trifosfato), a qual pode ser prontamente utilizada para a produção de novos compostos indispensáveis para o bom funcionamento da célula (TAIZ; ZEIGER, 2010). Em frutos durante a fase de pós-colheita, o principal destino da energia química produzida na respiração é a manutenção da organização celular, preservação da permeabilidade seletiva das membranas e a produção de enzimas indispensáveis em várias rotas metabólicas, bem como, para processos de síntese e manutenção do metabolismo celular (SAQUET et al., 2000). Entretanto, alta taxa respiratória é importante fonte de perda de qualidade das frutas. Na respiração, o substrato orgânico glicose é quebrado fornecendo potencial redutor às enzimas terminais da rota aeróbica, porém, vários outros substratos podem ser oxidados e fornecer seu potencial redutor. O carbono reduzido pode ser proveniente de dissacarídeo sacarose, de triose-fosfato da fotossíntese, de polímeros contendo frutose e de outros açúcares, assim como de lipídios, de ácidos orgânicos e, algumas vezes, de proteínas (TAIZ; ZEIGER, 2010). Desta forma, quanto maior a taxa de respiração maior será a perda de açúcares, ácidos e outros polímeros contendo açúcares, que são importantes componentes das frutas.

A taxa respiratória pode ser reduzida pela diminuição da pressão parcial de oxigênio na região circundante às células, ou seja, promover uma alteração atmosférica para reduzir o suprimento de oxigênio à enzima oxidase terminal da cadeia transportadora de elétrons da respiração celular (TAIZ; ZEIGER, 2010). Entretanto, a redução da pressão parcial de oxigênio não deve exceder o limite mínimo tolerado pela fruta. O ponto em que o consumo de oxigênio é mínimo e a produção de CO₂ também é mínima, ou seja, onde a respiração aeróbica é mínima,

é denominado de ponto de compensação anaeróbico (PCA) (BOERSIG et al., 1988). Este ponto é também chamado de limite mínimo de oxigênio (LOL- *Lowest oxygen limit*) (GRAN; BEAUDRY, 1993). O LOL pode variar entre diferentes cultivares de frutas de uma mesma espécie (DeLONG et al., 2004), ou mesmo, entre a mesma cultivar produzida em regiões ou anos diferentes (DeLONG et al., 2004; ZANELLA et al., 2005). Esta variação entre espécies, cultivares, locais e anos de produção resulta em diferentes taxas respiratórias das frutas, permeabilidade de membrana, taxa de difusão de gases no tecido, estado energético das células, teor de açúcares e ácidos, que afeta diretamente o LOL (WRIGHT et al., 2012). Como resultado dessa variabilidade, geralmente as recomendações para o armazenamento em AC são de um nível de O₂ acima do limite mínimo, a fim de contemplar essa variação e armazenar o produto com segurança.

O armazenamento em ambientes com pressão parcial de oxigênio abaixo do limite mínimo, por um período maior que o tolerável pela fruta, induz a segunda forma de respiração, chamada de anaeróbica ou fermentação. A fermentação tem o importante papel de fornecer cadeias carbônicas para a produção de vários outros compostos, produzir pequena quantidade de energia na forma de ATP em nível de substrato, além da utilização do piruvato e do NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido) oriundos da glicólise, quando a cadeia de transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa estiverem inibidas (ZABALZA et al., 2009).

O consumo do NADH, produzido durante a glicólise, em algum processo é muito importante, pois, a molécula de NADH é um composto reduzido, e, portanto, altamente energético, e que poderia doar esse potencial redutor ao oxigênio formando espécies reativas de oxigênio (EROs). O efeito de EROs sobre o metabolismo de vegetais é relativamente bem conhecido, sendo que em altas concentrações é altamente danoso às células (MORI et al., 2009; SABBAN-AMIN et al., 2011). Segundo HODGES et al. (2004), a presença de EROs está diretamente relacionado com a senescência de frutas e hortaliças e, desta forma, com perdas na pós-colheita. Em tomate o aumento da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) resulta em oxidação de lipídeos e proteínas, culminando na perda da compartimentalização celular e, conseqüentemente, no amadurecimento e senescência dos frutos (JIMÉNEZ et al., 2002).

A oxidação do NADH reduzido também é importante para que a glicólise possa prosseguir e produzir pequena quantidade de energia em forma de ATP necessária para o metabolismo básico da célula. Se o suprimento celular de NAD⁺ estiver limitado, a glicólise não poderá continuar a operar, pois a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase cessa seu funcionamento (TAIZ; ZEIGER, 2010).

Como resultado da fermentação tem-se a síntese de aldeído acético, etanol, acetato de etila e outros compostos (PESIS, 2005). Alguns autores atribuem a perda de qualidade de frutas armazenadas por longos períodos a baixas pressões parciais de oxigênio ao efeito tóxico dos produtos da fermentação (SMAGULA et al., 1968; MARLOW; LOESCHER, 1984; LEE et al. 2012). Por outro lado, Pesis (2005), na revisão sobre efeitos dos produtos da fermentação sobre a qualidade de frutas, afirma que pequenas quantidades destes metabólitos apresentam um efeito benéfico nas frutas, com retardo no amadurecimento e senescência e aumento na produção de aromas, entretanto, a quantidade para iniciar o aparecimento do dano não é relatado.

O aumento da desordem fisiológica nos tecidos em função do aumento da fermentação pode ser devido ao efeito tóxico dos produtos do processo fermentativo ou pela produção de energia insuficiente para atender as demandas energéticas das células. Peras mantidas durante dois dias em uma atmosfera com 0,25 kPa de O₂, em comparação com o armazenamento refrigerado, apresentaram um decréscimo de cinco vezes na relação ATP/ADP (NANOS; KADER, 1993). Em outro trabalho, com pera 'Conference', a produção de ATP foi reduzida em aproximadamente 15 vezes quando a pressão parcial de O₂ na câmara de armazenagem foi reduzida de 20,8 kPa para 0,5 kPa (VELTMAN et al., 2003a). Portanto, um dos efeitos diretos do armazenamento em baixo O₂ é a redução do status de energia, expresso pela relação ATP/ADP (GEINGENBERGER, 2003). De acordo com Saquet et al. (2000), o baixo nível de energia e o dano às estruturas celulares, associado ao aumento dos produtos da fermentação e da permeabilidade da membrana, estão relacionados com o desenvolvimento de desordens em peras armazenadas em baixo O₂ e/ou alto CO₂.

Veltman et al. (2003a) verificaram que a diminuição da pressão parcial de O₂ e o aumento do CO₂, no armazenamento de peras, aumenta a incidência de escurecimento interno, diminui a concentração de ácido ascórbico e a produção de ATP. Estes autores sugerem que o início deste distúrbio é uma consequência do dano causado nas membranas pela combinação da ação de radicais livres de oxigênio e a falta de energia para sua manutenção. Esta combinação causaria a descompartimentalização das estruturas intracelulares e o aparecimento de pigmentos escurecidos.

2.3.2 O armazenamento em Atmosfera Controlada Dinâmica

Para reduzir a perda da qualidade das frutas por excesso de respiração aeróbica, ou evitar a indução da síntese de produtos da fermentação e reduzir drasticamente a relação ATP/ADP, que também pode danificar a polpa de frutas, foi desenvolvido uma nova metodologia de armazenagem. Esta técnica é chamada de atmosfera controlada dinâmica (ACD) e está baseada diretamente na medição e monitoramento do status metabólico em tempo real da fruta dentro da câmara de armazenagem.

O princípio de funcionamento da ACD está baseado em monitorar o limite mínimo de oxigênio no PCA, variando a concentração desse gás durante o armazenamento de acordo com o metabolismo dos frutos, de forma que o O_2 permaneça próximo do limite mínimo, o que não ocorre na AC convencional com concentração estática de O_2 . Dessa forma, é possível armazenar maçãs em concentrações de O_2 bem mais baixas e com segurança. Enquanto que em AC estática a concentração de O_2 recomendada para a maçã ‘Royal Gala’ é de 1,0 a 1,2 kPa (BRACKMANN et al., 2009a; WEBER et al., 2011), em ACD a concentração é variável durante o armazenamento, de acordo com o metabolismo do fruto, permanecendo em média em 0,4 kPa de O_2 para cultivar ‘Gala’ (ZANELLA et al., 2008), podendo chegar a 0,2 a 0,3 kPa em maçã ‘Elstar’, monitoradas pela medição de etanol (SCHOUTEN et al., 1997).

DeLong et al. (2007) afirmam que esta tecnologia mantém maior qualidade das frutas, comparado ao armazenamento em atmosfera controlada convencional e, ainda, pode ser uma opção de uso em um sistema de produção orgânico, por não necessitar do uso de compostos químicos para o controle do amadurecimento, de distúrbios fisiológicos e de podridões. Gasser et al. (2010), avaliando as cultivares de maçã ‘Golden Delicious’, ‘Maigold’, ‘Elstar’ e ‘Braeburn’, observaram maior firmeza de polpa e menor ocorrência de distúrbios fisiológicos em frutas armazenados em ACD, comparados aos armazenados em AC convencional.

Existem basicamente três formas de monitorar o limite crítico de O_2 durante o armazenamento em ACD, que são pela produção de etanol, pela fluorescência de clorofilas ou determinação do quociente respiratório (QR).

2.3.2.1 O método da medição do etanol

O método de avaliação do estresse da maçã, ou seja, do limite mínimo de oxigênio, através da concentração de etanol está baseado na determinação da presença deste composto nas câmaras de armazenamento ou na própria polpa da fruta, produzida pela respiração anaeróbica das frutas.

Há dois métodos para o controle da pressão parcial de oxigênio na câmara de armazenagem a partir da concentração de etanol. O primeiro pela medição de etanol do suco extraído de uma amostra de maçãs coletadas de dentro da câmara comercial. Este método é comercializado pela empresa Marvil da Itália e denominado de ILOS-Plus. Neste método quando a concentração de etanol no suco atingir o valor próximo a $200 \mu\text{L L}^{-1}$ deve-se aumentar em $0,2\text{kPa}$ a pressão parcial de oxigênio na câmara de armazenamento. A determinação de etanol por este método é realizada com a utilização de um biossensor enzimático do tipo descartável, conectado a um aparelho que indica a quantidade de etanol no suco extraído da amostra. O elemento sensor neste equipamento é a enzima álcool desidrogenase. Segundo a empresa, o custo dos materiais descartáveis é de cerca 2,50 Euros por amostra de teste, entretanto, por ser um sensor biológico este não tem vida útil estendida e, por este motivo, ainda não é utilizado no Brasil (MARVIL, 2013).

O outro método se baseia na medição do etanol no ar da câmara comercial. Esta metodologia foi desenvolvida por Veltman et al. (2003b), entretanto, sem muito sucesso na aplicação comercial. O principal entrave dessa metodologia é possibilidade do etanol ser reabsorvido pelas próprias frutas e ser transformado em outros compostos etílicos (LIU et al., 2012) e, portanto, a sua quantificação é prejudicada.

A ACD pelo monitoramento do etanol parte do princípio de que quando o teor de etanol na fruta ou na atmosfera da câmara estiver alto significa que a respiração anaeróbica está ocorrendo de forma demasiada e, portanto, é necessário aumentar ligeiramente a concentração de O_2 para que os frutos diminuam a respiração anaeróbica e aumentem a respiração aeróbica, reduzindo a concentração de etanol para níveis que não causem danos aos frutos (SCHOUTEN et al., 1997).

VELTMAN et al. (2003b) testaram a célula de combustível como sensor de etanol. Este sensor mostrou-se bastante estável quando submetido a condições de atmosfera controlada em nível experimental, além de apresentar uma correlação com a determinação de etanol por cromatografia, sem sofrer interferência da presença de etileno. Os autores armazenaram maçãs 'Elstar' de diferentes pomares em AC e em ACD e observaram que em ACD a firmeza de polpa permaneceu 10 N mais elevada, a cor de fundo permaneceu mais verde e reduziu a escaldadura. A maior manutenção da qualidade dos frutos foi clara em dois pomares, enquanto que em outro pomar não foi verificada diferença na qualidade dos frutos. Isto demonstra que a pressão parcial mínima de O_2 no armazenamento não é igual para todos os lotes de maçãs, mesma sendo da mesma cultivar, dependendo, assim, de parâmetros climáticos do local de produção, do ponto de colheita, nutrição, entre outros. Este é, portanto, um importante ponto do aperfeiçoamento

da técnica de ACD em relação a AC. Entretanto, em câmaras com grande quantidade de frutas este método não se mostrou estável e, portanto, ainda não utilizado comercialmente.

2.3.2.2 O método da fluorescência de clorofilas

O primeiro evento da fotossíntese em todos os órgãos das plantas que possuem clorofila é a absorção de luz pelas moléculas de clorofila. Este evento causa um aumento no estado energético da clorofila e, portanto, uma excitação dos elétrons. A maior parte da excitação (95 – 99 %) atinge os centros de reações. A energia absorvida pelos carotenoides é transferida por ressonância para a clorofila *b*, desta para a clorofila *a* e, finalmente, da clorofila *a* para o centro de reação do fotossistema. Estes três pigmentos são organizados por proteínas chamadas de complexos coletores de luz (LHC), normalmente em número de 14 clorofilas *a* e *b* e mais 4 carotenoides, sendo que cada antena contém vários LHC. A excitação que atinge o centro de reação é usada para promover reações da fotossíntese, como oxidação da água, evolução do oxigênio, redução do NADP^+ , transporte de prótons pela membrana e síntese de ATP (TAIZ; ZEIGER, 2010). Entretanto, parte da energia de excitação pode ser perdida como calor, no caminho da transferência da energia entre os pigmentos, ou como fluorescência, pela volta dos elétrons ao estado fundamental de excitação emitindo energia para o exterior do pigmento em outro comprimento de onda (DeELL et al., 1999; NOVO et al., 2012).

A fluorescência de clorofila reflete o processo primário da fotossíntese que ocorre nos cloroplastos, como absorção de luz, transferência da energia de excitação e as reações fotossintéticas no fotossistema II (PSII). Porém, a emissão de fluorescência depende de vários fatores como a intensidade luminosa, temperatura, pré-iluminação, estágio de adaptação à luz, composição gasosa, umidade, idade dos tecidos e outras condições de estresse em que o vegetal é exposto (DeELL et al., 1999). Portanto, a variação de emissão de fluorescência pode ser usada para detectar a variação de diferentes estresses induzidos ou que ocorrem naturalmente sobre o vegetal.

Muitas frutas, como maçãs, peras, bananas, kiwi, manga, abacate e outras, contêm clorofila na epiderme que emitem fluorescência de forma semelhante às folhas (DeELL et al., 1999; PRANGE et al., 2002) e, portanto, pode ser usado como forma não destrutiva para monitorar o estado fisiológico durante a pós-colheita e amadurecimento (NOVO et al., 2012).

Partindo deste princípio DeEll et al. (1999) afirmam que a fluorescência pode ser usada para avaliar a ocorrência de dano por frio em frutas tropicais, avaliação de amadurecimento e

senescência de frutas, prever o tempo de vida de prateleira e a ocorrência de escaldadura superficial e, além disso, indicar o nível de estresse por composição gasosa inadequada durante o armazenamento. Dessa forma, Prange et al. (1997) pesquisaram a possibilidade de usar a fluorescência das clorofilas como forma de controlar a atmosfera controlada para armazenamento de maçãs.

Maçãs 'Elstar' armazenadas a 2°C por 20 dias em atmosfera com 0,07 kPa de O₂ demonstraram aumento na produção de etanol e *off-flavours*. Além disso, ocorreu um aumento na fluorescência inicial após a adaptação ao escuro (Fo) e redução na máxima eficiência fotoquímica quântica do fotossistema II (Fv/Fm). Estas variações de emissão de fluorescência ocorreram devido à dissociação dos complexos coletores de luz e centros de reação do fotossistema II na membrana dos tilacoides (PRANGE et al., 1997). A dissociação resulta na redução da transferência de energia e, portanto, a energia absorvida nos complexos coletores de luz é emitida na forma de fluorescência aumentando Fo e diminuindo Fv/Fm. Estes mesmos autores verificaram que após a exposição das frutas por 7 dias em condições ambientais de oxigênio os parâmetros Fo e Fv/Fm retornaram ao nível normal. Em frutas armazenadas em baixo oxigênio, a relação de diminuição de Fv/Fm com o aumento da taxa de produção de etanol foi exponencial, evidenciando o efeito direto do acúmulo de etanol nos tecidos e membranas dos tilacoides sobre a emissão de fluorescência (DeELL et al., 1999).

Em 2007 Prange et al. (2007) patentearam o equipamento denominado de HarvestWatchTM que tem como objetivo o monitoramento da emissão de fluorescência pelas clorofilas de um grupo de seis frutas. O sistema foi desenvolvido especialmente para ser usado para detectar o limite mínimo de oxigênio (LOL) em que as frutas poderiam ser submetidas e verificar o ponto de compensação anaeróbico (PCA). Nesse ponto a evolução do CO₂ é mínimo e a respiração anaeróbica é baixa. Se a pressão parcial de oxigênio for diminuída para além deste ponto, a fermentação se torna a principal rota respiratória. O acúmulo de etanol, aldeído acético e outros compostos da fermentação em tais condições podem induzir a ocorrência de danos irreversíveis às células (LEE et al., 2012). Com a possibilidade de monitorar o LOL conseguiu-se a possibilidade de variar a pressão parcial de oxigênio e, portanto, controlar de forma dinâmica a atmosfera da câmara.

Na ACD com a tecnologia HarvestWatchTM a fluorescência é captada por um sensor FIRM (*Fluorescence Interactive Response Monitor*) e transmitida a um microcomputador com software. Ao sensor também são instalados quatro lâmpadas LED (*Light Emitting Diode*) que emitem luz na faixa do espectro do visível, a fim de estimular o fotossistema II. Quando as frutas estão sob estresse, como por exemplo, por baixo O₂, é emitida a fluorescência em resposta

à luz incidente, que pode ser devido à acidificação do estroma ou à deficiência na transferência de energia entre o LHCII e o centro de reação. O sistema de detecção incorporado no dispositivo capta a resposta do fruto, emitida na forma de fluorescência, e encaminha a resposta para um software analítico, que exibe em formato de gráfico, na tela do microcomputador.

O parâmetro medido no HarvestWatchTM durante o armazenamento é o $F\alpha$. Este parâmetro é uma estimativa da fluorescência mínima (F_0) da fluorescência de clorofilas. Quando a concentração de O_2 atinge um limite mínimo, o $F\alpha$ imediatamente aumenta, gerando um pico de emissão. Esse aumento de $F\alpha$ é reversível se a pressão parcial de oxigênio for aumentada acima do limite mínimo de oxigênio tolerado pela fruta (PRANGE et al., 2005a). Desta forma, quando for registrado um pico de $F\alpha$ no gráfico, a pressão parcial de O_2 deve ser aumentada em aproximadamente 0,2 kPa para retirar os frutos da condição de estresse e manter uma margem segura de armazenamento (DeLONG et al., 2004; WATKINS, 2008). Após esta etapa, a fluorescência de frutos estressados pelo baixo O_2 , rapidamente retorna para níveis próximos aos anteriores ao estresse. Aproximadamente 30 segundos após a elevação de O_2 , a fluorescência já apresenta um decréscimo pronunciável (WRIGHT et al., 2012).

Este método já vem sendo utilizado nos últimos anos em câmaras comerciais para o armazenamento de maçãs, e testado para outras frutas, como forma de monitorar o limite crítico de O_2 durante o armazenamento em ACD, mantendo a qualidade e reduzindo a ocorrência de distúrbios fisiológicos (TOIVONEN; DeELL, 2001; PRANGE et al., 2002; PRANGE et al., 2003; VELTMAN et al., 2003b; PRANGE et al., 2005a; ZANELLA; CAZZANELLI, 2007; LALLU; BURDON, 2007). Saquet; Streif (2002) também utilizaram a fluorescência de clorofilas como um método preditivo para detectar injúrias em peras armazenadas e concluíram que poderia ser um método promissor para detectar previamente injúrias por escurecimento.

2.3.2.2.1 Princípio fisiológico

A clorofila no estado de excitação possui quatro alternativas para liberar a energia disponível, podendo reemitir um fóton, num comprimento de onda levemente maior (na região vermelha do espectro) e, assim, retornar ao seu estado-base, o que se chama de fluorescência, com parte da energia sendo convertida em calor. Além disso, a clorofila excitada pode converter toda a energia em calor, transferir a energia para outra molécula ou pode ocorrer o processo fotoquímico, no qual a energia do estado excitado provoca a ocorrência de reações químicas (TAIZ; ZEIGER, 2010; NOVO et al., 2012).

A justificativa mais plausível de como o estresse por baixo O₂ e/ou alto CO₂ pode interferir na fluorescência de clorofila é pela acidose do citoplasma celular, que ocorre em condições que estimulam a respiração anaeróbica (GOUT et al., 2001; PRANGE et al., 2005b). A acidose celular é determinante na morte de células vegetais expostas em ambiente anóxico (DREW, 1997).

A acidose citoplasmática pode ocorrer basicamente por três motivos diferentes, porém, que ocorrem de forma simultânea (PRANGE et al., 2005b). A exposição das células a anóxia (deficiência de oxigênio no tecido) induz a síntese de lactato pela indução da respiração anaeróbica, que por sua vez acidifica o citoplasma celular (DREW, 1997; De SOUSA; SODEK, 2002). Outra forma de acidificação do citoplasma é relatado por Gout et al. (2001) e Prange et al. (2005b). Estes autores verificaram que, uma vez que a condição de anóxia está estabelecida, o surgimento da acidose citoplasmática correlaciona com a hidrólise de ATP e de outros nucleotídeos trifosfatos (NTPs) que geram o ácido fosfórico, de acordo com a reação: $ATP + H_2O \rightarrow ADP + H_3PO_4$.

O terceiro motivo da acidificação citoplasmática é pela perda de H⁺ do vacúolo. Enquanto o pH do citoplasma é de 7,3 a 7,4 o pH do vacúolo é de 5,8. O pH do vacúolo é mantido pela atividade da H⁺-ATPase que importa o H⁺ do citoplasma. Com a redução da respiração aeróbica e indução da respiração anaeróbica, que tem menor rendimento energético, a disponibilidade de ATP para a atividade da H⁺-ATPase decresce. Desta forma, o transporte de H⁺ para os vacúolos pode se tornar limitante e, assim, acidificar o citoplasma (DREW, 1997; De SOUSA; SODEK, 2002). Entretanto, esse evento não se correlaciona tão bem com a mudança do pH citoplasmático, a exemplo do que ocorre com a hidrólise dos NTPs.

Se a célula é exposta a normóxia, após um período de estresse por baixo O₂, o pH citoplasmático aumenta, enquanto que o pH extracelular e do vacúolo diminuem, ou seja, o estresse causado pelos níveis extremos de gases é reversível se esse ainda não causou danos às células e/ou tecidos. Esse fato sugere que a acidose do citoplasma é reduzida pelo transporte de H⁺ do citoplasma, não somente para o vacúolo, mas também para o espaço extracelular, através da plasmalema (GOUT et al., 2001). Essa acidificação da parede celular, após o retorno dos níveis de gases favoráveis à respiração aeróbica, pode promover o amolecimento da mesma, uma vez que a acidificação está relacionada com o processo de amolecimento da parede celular observada durante o processo de expansão celular (RAYLE; CLELAND, 1992; COSGROVE, 1999). Desde então, a acidose citoplasmática vem sendo considerada também como um sinal da morte celular, cujos efeitos positivos ou negativos da AC podem ser melhor entendidos com mais pesquisas sobre o efeito da AC na acidose citoplasmática (PRANGE et al., 2005b).

A acidose citoplasmática é considerada como uma resposta comum a uma produção insuficiente de ATP, em função da hidrólise de NTPs. Assim, um incremento em F_0 pode ser induzido, diretamente pela hipóxia, que reduz a atividade da enzima zeaxantina epoxidase do estroma dos cloroplastos, ou pela excessiva acidificação do lúmen (KRAMER et al., 2004). A enzima zeaxantina epoxidase é conhecida por ser responsável pela interconversão da xantofila em anteroxantina e, finalmente, em zeaxantina. Esta interconversão tem como principal função a dissipação de excesso de energia na forma de calor, impedindo a transferência de energia ao centro de reação do PSII quando este estiver totalmente reduzido (TAIZ; ZEIGER, 2010). Se a acidificação inibir a atividade da zeaxantina epoxidase no estroma a energia não é dissipada na forma de calor e, portanto, pode ser emitida na forma de fluorescência. Uma possível fonte para a acidificação do lúmen pode ser a acidificação do citoplasma que pode, por meio de translocadores de oxaloacetato e malato na membrana do cloroplasto (PELTEIER; COURNAC, 2002), acidificar o estroma do cloroplasto e reduzir o fluxo de H^+ para fora do lúmen (PRANGE et al., 2005b).

Outro estudo com objetivo de entender a emissão de fluorescência pelas clorofilas em situações de hipóxia ou anóxia é apresentado por Wright et al. (2011). A anóxia pode induzir a superredução da plastoquinona (PQ) mesmo em condições de completa ausência de luz (BENNOUN, 2002; TÓTH et al., 2007). O excesso de poder redutor citosólico se dá principalmente pela inibição da citocromo oxidase em condições de anóxia. Este potencial redutor pode ser transportado aos cloroplastos onde é utilizado para reduzir a plastoquinona. Como resultado a dissipação fotoquímica do potencial redutor é reduzida aumentando a F_0 (WRIGHT et al., 2011).

Apesar de todos esses estudos a respeito do método de fluorescência de clorofilas a fim de entender como esse sistema estaria atuando para detecção do estresse nos frutos, quando em condições de baixo O_2 , estudos atuais mostram que existem muitas variáveis que interferem na determinação desse método. Dentre eles, a temperatura e o tempo para reduzir o O_2 a níveis críticos podem interferir na intensidade do pico de fluorescência e no limite mínimo de O_2 , enquanto que o intervalo entre os escaneamentos pode interferir também na intensidade do pico (WRIGHT et al., 2010). Também, a variabilidade existente entre os frutos das amostras (são utilizados apenas seis frutos por conjunto de detecção do estresse) pode interferir no limite mínimo de O_2 detectado. Além disso, para um mesmo fruto pode haver diferença entre o lado exposto ao sol ou à sombra (WRIGHT et al., 2012).

2.3.2.3 O método do quociente respiratório

A velocidade do amadurecimento e a entrada no estado de senescência está diretamente ligada à taxa respiratória das frutas climatéricas. Alta taxa de biossíntese de etileno aumenta a taxa respiratória e, conseqüentemente, leva a exaustão dos açúcares e ácidos disponíveis e perda da qualidade da fruta (KADER, 2002). Portanto, a respiração celular deve ser diminuída ao máximo para evitar tais perdas, todavia, a um nível em que não ocorram danos às células. Para tanto, o monitoramento do quociente respiratório (QR) é um bom indicativo de mínima taxa respiratória. Quando QR é igual a um, ou seja, para cada oxigênio consumido há a liberação de uma molécula de CO₂, têm-se a indicação de que não está ocorrendo fermentação. O QR pode variar um pouco acima ou abaixo de um sem que esteja ocorrendo fermentação. Segundo Goyette et al. (2012), quando o QR é igual a um os substratos da respiração são compostos açucarados. Quando o QR for maior ou menor que um, ácidos orgânicos ou lipídeos estão sendo utilizados, respectivamente, no processo respiratório. Entretanto, quando o QR for muito maior que um, há a indicação de que a rota fermentativa está ativa e, portanto, grande quantidade de CO₂ está sendo liberado para pouco consumo de O₂ (GOYETTE et al., 2012).

O armazenamento em ACD, utilizando o método do quociente respiratório (QR), está associado ao ponto de compensação anaeróbico (PCA), ou seja, à concentração de O₂ em que a evolução de CO₂ é mínima (BOERSIG et al., 1988). Nessa condição o QR é de aproximadamente 1,0. Quando o O₂ estiver abaixo do PCA, para uma determinada cultivar, ocorre um drástico aumento na produção de CO₂ em função da ativação da respiração anaeróbica, aumentando também o QR. Como forma de retornar à condição normal (sem estresse), é necessário aumentar novamente o O₂ na câmara de armazenamento. Dependendo do QR que se deseja manter e da intensidade do estresse em que os frutos se encontravam, será necessário tomar a decisão sobre a quantidade de O₂ a injetar na câmara de armazenamento.

De acordo com Gasser et al. (2010), é possível acompanhar por meio do quociente respiratório o momento que a maçã está num nível crítico de produção de etanol, o qual poderá causar danos ao tecido. Esses autores monitoraram o PCA em maçãs 'Idared', 'Maigold', 'Elstar' e 'Braeburn'. O PCA das três primeiras cultivares foi de 0,2 a 0,3 kPa de O₂, já para a cultivar Braeburn, o PCA foi de 0,4 kPa. Quando o PCA foi atingido, a pressão parcial de O₂ foi aumentada em 0,1 a 0,3 kPa na atmosfera da câmara. Para as cultivares Idared, Maigold e Braeburn, a firmeza de polpa foi maior em ACD que em AC, além disso, os frutos armazenados em ACD não apresentaram escaldadura. Já Wright et al. (2012) observaram que o PCA de maçãs 'Honeycrisp' e 'Delicious' foi de aproximadamente 0,8 kPa de O₂ logo após a colheita,

diminuindo para 0,5 kPa após três meses de armazenamento na temperatura de 3,5 °C. Portanto, é possível verificar que o PCA varia de acordo com a cultivar, podendo variar também durante o armazenamento para uma mesma cultivar. Dessa forma, a determinação do QR durante todo o período de armazenamento permite acompanhar o PCA, mantendo os frutos em uma concentração de O₂ segura, uma vez que este varia nas frutas produzidas em diferentes anos ou locais de produção e nas diferentes cultivares (GASSER et al., 2010).

O monitoramento da ACD pelo método do QR pode representar um método mais confiável comparado com os demais. A produção de etanol, por exemplo, não é um método seguro como indicador do limite mínimo de O₂, pois esse composto pode estar presente mesmo acima do PCA em alguns casos (PRANGE et al., 2005a). Segundo Peppelenbos; Oosterhaven (1998), o momento em que o quociente respiratório aumenta ou quando o PCA é atingido já ocorre pequena taxa fermentativa. Também a fluorescência de clorofilas pode ser influenciada pela temperatura de armazenamento e pela taxa de redução de O₂ na instalação da atmosfera, afetando o limite mínimo de O₂ (WRIGHT et al., 2010). Entretanto, Gasser et al. (2010) verificaram que o aparecimento de um pico de F_a em maçãs 'Braeburn' coincidiu com o aumento no quociente respiratório quando o oxigênio foi lentamente reduzido.

2.3.3 O efeito do etanol no armazenamento de maçãs

O armazenamento de maçãs em atmosfera controlada dinâmica induz a via fermentativa pela exposição das frutas a pressões parciais de oxigênio extremamente baixas. A redução da pressão parcial de oxigênio abaixo do PCA, ou mesmo antes de atingir níveis abaixo do PCA, resulta na troca da via respiratória aeróbica para induzir a via respiratória anaeróbica (PEPPELENBOS; OOSTERHAVEN, 1998). A via fermentativa induz o acúmulo de aldeído acético, etanol e outros compostos da fermentação, entretanto, estes compostos ocorrem também naturalmente em condições de aerobiose na relação de uma parte de aldeído acético para cada 100 partes de etanol (PODD; Van STADEN, 1998, ZABALZA et al., 2009).

A rota metabólica da fermentação ocorre principalmente quando o suprimento de O₂ à oxidase terminal da respiração aeróbica é limitado, entretanto, essa rota também ocorre em condições normóxicas (ZABALZA et al., 2009).

A fermentação é composta das seguintes etapas sucessivas (Figura 1): inicia com a glicólise, que converte a glicose em piruvato e este, por sua vez, é convertido a lactato ou etanol e CO₂. Quando as pressões parciais de O₂ são insuficientes para a respiração aeróbica, o

piruvato é inicialmente reduzido a lactato, pela ação da enzima lactato desidrogenase (LDH) (ROBERTS et al., 1992). A diminuição das concentrações de O_2 no interior da célula também conduz à saída de prótons dos vacúolos e inibe a volta desses através do transporte ativo realizado pelas ATPases, localizadas no tonoplasto. Isso ocorre em função da quantidade de ATP produzida pela fermentação ser insuficiente para o transporte ativo dos prótons de volta aos vacúolos (TAIZ; ZEIGER, 2010). O aumento da concentração de lactato e de prótons H^+ no citosol, resultam em redução do pH citoplasmático. Em condições de pH ácido do citosol, as enzimas piruvato desidrogenase (PDH) e LDH são desativadas e a piruvato descarboxilase (PDC) é ativada (KE et al. 1995). Dessa forma, ocorre mudança da produção de lactato para a produção de aldeído acético. Além disso, o acúmulo de piruvato e acetil CoA ativam a rota de biossíntese fermentativa (MATHEWS; Van HOLDE, 1996).

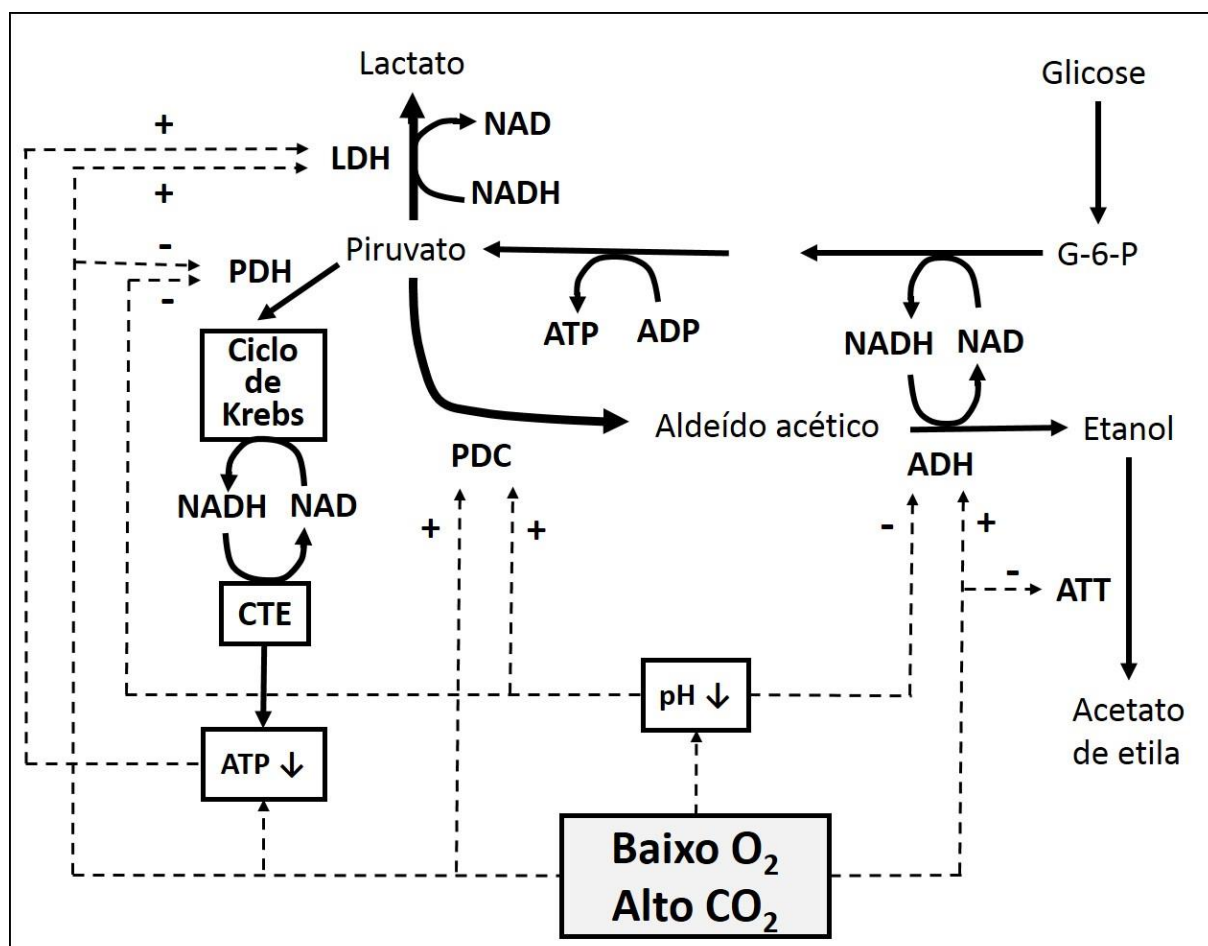


Figura 1 – Modo de ação do estresse por baixo O_2 e/ou alto CO_2 no metabolismo fermentativo dos frutos.

Símbolos e abreviaturas: (-) = redução ou inibição; (+) = aumento ou ativação; ATT = álcool acetiltransferase; ADH = álcool desidrogenase; G-6-P = glicose-6-fosfato; LDH = lactato

desidrogenase; PDC = piruvato descarboxilase; PDH = piruvato desidrogenase; CTE: cadeia transportadora de elétrons. Adaptado de Ke et al. (1995).

A reação de descarboxilação do piruvato pode ser dividida em dois passos: o primeiro é uma reação irreversível catalisada pela PDC produzindo o aldeído acético. No segundo passo, ocorre a redução do aldeído acético a etanol por meio da ação da enzima álcool desidrogenase (ADH), utilizando NADH derivado da atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Essa enzima atua na glicólise e fornece o poder redutor para a reação (ZABALZA et al., 2009). Os produtos finais dessa via são o etanol, CO₂ e 2 ATPs, estes últimos produzidos na glicólise (LEHNINGER et al., 2010).

Na literatura, o efeito do aldeído acético e etanol sobre a qualidade de frutas é controverso. Alguns autores observaram efeitos positivos, enquanto outros, evidenciaram os efeitos negativos sobre a qualidade das frutas (PESIS, 2005). A resposta das frutas ao etanol depende de vários fatores, como da espécie, da cultivar, do estágio de amadurecimento, da dose de etanol aplicado, do modo de aplicação e do tempo de exposição ao etanol (RITENOUR et al., 1997; PESIS, 2005; PLOTTO et al., 2006).

O etanol e o aldeído acético estão envolvidos na rota de síntese do etileno, no metabolismo respiratório, na produção de aroma e na expressão de algumas proteínas e enzimas e, dessa forma, tem diversos efeitos sobre atributos de qualidade pós-colheita em diversas frutas, hortaliças e flores (PODD; STADEN, 1998, PESIS, 2005, ASODA et al., 2009, MORI et al., 2009, BOTONDI et al., 2012; LIU et al., 2012). O etanol e aldeído acético são considerados compostos naturais e, portanto, passíveis de serem usados em sistemas de conservação de produtos vegetais produzidos de forma agroecológica (PESIS, 2005).

Em geral, a inibição do amadurecimento pelo etanol está associado à significativa redução da produção de etileno e, conseqüentemente, da respiração climatérica (PODD; STADEN, 1998). Segundo Suzuki et al. (2004) e Asoda et al. (2009), a aplicação de etanol inibe a produção de etileno e mantém a coloração verde de inflorescências de brócolis. Saltveit; Mencarelli (1988) mostraram que o etileno não é capaz de estimular o amadurecimento de tomates previamente tratados com etanol. A aplicação de etanol na cavidade seminal de melões resultou em redução da produção de etileno interno mantendo firmeza de polpa mais elevada e com maior teor de compostos voláteis responsáveis pelo aroma dessas frutas (LIU et al., 2012). Weber (2010) e Weber et al. (2013b) também verificaram redução na taxa de produção de etileno em maçãs 'Royal Gala', expostas ao vapor de etanol durante o armazenamento por oito

meses em atmosfera controlada, e em maçãs 'Braeburn', com aplicação de etanol durante o tempo de prateleira após a armazenagem de AC.

Recentemente Asoda et al. (2009) propuseram um sistema de ação do etanol sobre a inibição da produção de etileno. A aplicação de etanol em brócolis inibiu fortemente a produção de etileno e a atividade das enzimas ACC sintase e ACC oxidase. O amarelecimento das inflorescências de brócolis, que em condições naturais é acelerado pela presença de etileno, foi inibido. A inibição da resposta fisiológica do etileno em brócolis tratados com etanol, sugere que o etanol suprime a responsividade e a biossíntese do etileno em brócolis, reduzindo o processo de senescência das inflorescências.

O etileno afeta a expressão de vários genes, incluindo os genes responsáveis pela sua própria biossíntese (INABA, 2007). A produção de etileno é suprimida quando o amadurecimento e senescência são inibidas com etanol. Em brócolis a aplicação exógena de etileno estimula a atividade das enzimas ACC sintase e ACC oxidase, além da expressão dos seus genes, como a *BO-ACO1*, *BO-ACO2* e *BO-ACSI*. A aplicação de etanol, mesmo na presença de etileno, inibe a expressão dos genes responsáveis pela produção do etileno. Dessa forma, Asoda et al. (2009) concluíram que o mecanismo de regulação da produção de etileno pela aplicação de etanol se dá em nível molecular, pela supressão da expressão em nível transcricional das enzimas *BO-ACO1*, *BO-ACO2* e *BO-ACSI* e, desta forma, a produção de etileno é bloqueada.

A aplicação de etanol ou aldeído acético pode ter um efeito na redução da respiração em diversas frutas. Entretanto, em frutos não-climatéricos, como em laranja (FIDLER, 1968; PESIS; AVISSAR, 1989), figo (HIRAI et al., 1968), morango, mirtilo (JANES et al., 1978) e uva (PESIS; MARINIANSKY, 1992) a aplicação pós-colheita de aldeído acético pode causar a indução da produção de CO₂. Em frutas ou hortaliças responsivas ao etileno e que apresentam um pico climatérico durante a pós-colheita, a aplicação de produtos da fermentação pode ter significativo efeito sobre a redução da respiração. Em inflorescências de brócolis tratadas com etanol, independentemente do tratamento adicional com etileno, nenhum pico respiratório foi detectado (SUZUKI et al., 2004, ASODA et al., 2009). Em tomate (SALTVEIT, MENCARELLI, 1988), melão e abacate (RITENOUR et al., 1997) a aplicação de etanol também reduziu significativamente o pico respiratório.

Com a redução da taxa respiratória e da síntese de etileno ocorre significativa redução da perda de firmeza de polpa em diversas frutas como resultado da aplicação de aldeído acético e etanol (PESIS, 2005; WEBER, 2010; LIU et al., 2012) ou por meio da indução de sua produção pelo armazenamento em ULO (LOULAKAKIS et al., 2006), como em pêssego,

nectarina, tomate, uva e abacate. A redução da perda da firmeza é decorrente da redução da atividade de enzimas ligadas à degradação da parede celular. A atividade da poligalacturonase, por exemplo, é reduzida em pêssego, nectarina (LURIE; PESIS, 1992) e tomate (PESIS; MARINANSKY, 1993). Em abacate ocorre além da redução da poligalacturonase, também a redução da celulase, β -galactosidase e endoglucanase (DORI et al., 1995, RITENOUR et al., 1997, PESIS et al., 1998, LOULAKAKIS et al., 2006) e em maçãs 'Braeburn' da atividade da β -galactosidase (WEBER et al., 2013b).

O etanol e o aldeído acético podem ter efeito positivo no aumento da resistência do fruto ao dano por frio e inibição de desordens fisiológicas que envolvem atividade oxidativa como a escaldadura superficial (PESIS, 2005). Este distúrbio, que é resultado da oxidação do composto α -farneseno, foi controlado em maçãs 'Granny Smith', altamente suscetíveis, pela aplicação de etanol na dose de 0,5 a 1,0 g maçã⁻¹ na temperatura de 0 ou 20°C (SCOTT et al., 1995; GHAMAMANI; SCOTT, 1998).

Entretanto, a aplicação de produtos da fermentação ou pressões parciais de O₂ reduzidas abaixo do ponto de compensação anaeróbico, onde é induzido o acúmulo de aldeído acético e etanol, pode levar ao desenvolvimento de escurecimento da epiderme em maçãs (VIDRIH et al., 1999). Mattheis et al. (2013) encontraram uma correlação positiva entre acúmulo de etanol em peras 'd'Anjou' armazenadas em atmosfera controlada dinâmica com monitoramento de fluorescência de clorofila e a ocorrência de escurecimento de miolo, entretanto, os autores afirmam que não há como estabelecer se o acúmulo de etanol é causa ou resultado do desenvolvimento da desordem fisiológica. A incidência e severidade de degenerescência de miolo em peras aumentaram com o aumento de CO₂, sendo sugerido que degenerescência de miolo é indiretamente correlacionada com a fermentação, mas diretamente com o dano oxidativo (PINTO et al., 2001).

Em maçãs 'Braeburn' expostas ao vapor de etanol em baixa temperatura não foi observado escurecimento de polpa (JAMIESON et al., 2003). Por outro lado, é bem reportado que o acúmulo de aldeído acético e etanol em citros podem causar graves danos (COHEN et al., 1983 e COHEN et al., 1990). Frutas subtropicais estão entre as mais sensíveis a danos por anaerobiose, e são menos tolerantes a baixos níveis de O₂ na atmosfera, como tem sido mostrado em laranja (NORMAN, 1977) e mamão (YAHIA et al., 1992). Entretanto, em frutas de clima temperado como maçãs, peras, pêssegos, as doses moderadas de etanol ou em condições de armazenamento próximos ao PCA não causaram danos externos ou internos ligados diretamente aos produtos da fermentação.

2.3.4 O efeito da temperatura no armazenamento em ACD

A temperatura de armazenamento é a forma isoladamente mais eficaz para a manutenção da qualidade de frutas armazenados, pois, a velocidade dos processos metabólicos são grandemente governados pela temperatura em que os frutos são expostos durante a armazenagem, reduzindo entre outros processos a respiração celular (HONG; KIM, 2001, STEFFENS et al., 2007). Entretanto, temperatura muito baixa pode causar dano por frio (RUDELL et al., 2011) ou, se muito alta, pode provocar perdas excessivas de componentes importantes na qualidade de frutas, como ácidos, açúcares e pectinas (KADER, 2002).

A temperatura recomendada para o armazenamento de maçã 'Royal Gala' em AC varia de 0,5 a 1,0°C (BRACKMANN et al., 2009a; WEBER et al., 2011), entretanto, a temperatura para a armazenagem de maçãs em atmosfera controlada dinâmica, ou seja, pressão parcial de oxigênio extremamente baixa (normalmente <0,5kPa), ainda não foi estudado. Vários trabalhos têm mostrado que a temperatura de armazenagem e a pressão parcial de oxigênio normalmente apresentam fortes interações na variação destes fatores (CHU, 1999; WATKINS; LIU, 2010; WEBER, et al., 2011; KWEON et al., 2013).

O armazenamento em temperatura maior seria desejável em função da redução de gasto em energia elétrica com o sistema de refrigeração das câmaras. Entretanto, o armazenamento em temperatura maior implica na necessidade de aumento da concentração de O₂ nas câmaras de armazenamento em AC (WEBER et al., 2011). Isso se deve à menor solubilidade do oxigênio em temperaturas mais elevadas, o que causa um incremento no limite mínimo de O₂ com o aumento da temperatura (WRIGHT et al., 2010). Esses autores monitoraram o PCA pela exposição à baixa concentração de O₂ de maçãs 'Honeycrisp' submetidas às temperaturas de 20, 10, 3,5 e 0 °C e verificaram a ocorrência de pico de fluorescência em 0,72, 0,33, 0,22 e 0,08 kPa de O₂, respectivamente. Assim, monitorando o PCA das frutas, seja pelo método de fluorescência de clorofilas ou pelo QR, ter-se-ia a possibilidade de armazenar as frutas a uma temperatura um pouco mais elevada e, aumentando o O₂ para manter o metabolismo constante, seria possível uma economia de energia, sem perdas na qualidade dos frutos.

Para aumentar a temperatura de armazenamento e não ocorrer aumento de perdas, alguma técnica adicional precisará ser usada concomitante à AC. Na Alemanha tem-se testado o uso combinado de aplicação de 1-MCP com o armazenamento na temperatura de 4°C (McCORMICK et al., 2010; STREIF et al., 2010). O consumo de energia durante o resfriamento inicial é muito grande e influenciado por muitos fatores, o que dificulta a medida

até o presente momento. Por esse motivo os trabalhos realizados até o momento avaliaram o consumo de energia durante o armazenamento a partir do momento em que a temperatura já foi estabilizada. Nesse caso, foi possível a redução de 35% no consumo de energia no armazenamento de maçã ‘Gala’ armazenada a 4°C mais aplicação de 1-MCP comparado ao armazenamento em ULO a 1,5°C (McCORMICK et al., 2010; STREIF et al., 2010).

Algumas cultivares de maçãs são sensíveis ao armazenamento à temperatura próxima a 0°C, resultando em dano por frio manifestado normalmente na forma de escurecimento da polpa ou danos à epiderme da fruta. A degenerescência de polpa foi maior em maçãs ‘Empire’ armazenadas a 0 ou 0,5°C (WATKINS; LIU, 2010) ou, ‘McIntosh’ armazenadas a 1°C (CHU, 1999), que quando armazenadas a 3°C. Mesmo tendência foi observada em maçãs ‘Fuji’ por Kweon et al. (2013) comparando o armazenamento a 0 e 2°C.

2.3.5 O efeito do 1-metilciclopropeno no armazenamento de maçãs

O etileno é um hormônio vegetal que afeta o crescimento e desenvolvimento de plantas incluindo o processo de amadurecimento e senescência de frutas (LELIÈVRE et al., 1997). Em pós-colheita este hormônio vegetal pode ser importante para induzir o amadurecimento de bananas, entretanto, para a maioria das espécies o etileno é indesejável por acelerar o processo de amadurecimento nesta fase das frutas (WATKINS, 2006).

Uma estratégia para controlar a produção de etileno e, portanto, o amadurecimento e senescência de frutas, especialmente as climatéricas, se deu a partir da descoberta do 1-metilciclopropeno (1-MCP), um inibidor da ação do etileno. Este composto interage com os receptores de etileno na membrana celular inibindo as respostas dependentes deste fitohormônio (SISLER; SEREK, 1997, 2003). O 1-MCP tem ação não tóxica, com resíduos muito baixos e é ativo em concentrações muito baixas (E.P.A., 2002), sendo aplicado nas doses normalmente abaixo de 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$. Esta baixa dose na aplicação é decorrente da sua alta afinidade ao receptor de etileno que, segundo Sisler; Serek (1997), é 10 vezes maior que a do próprio etileno.

Em decorrência disso, o 1-MCP vem sendo extensivamente utilizado para armazenamento de maçãs, objetivando estender o tempo de armazenamento e vida de prateleira das frutas (WATKINS, 2006; MATTHEIS, 2008). Entretanto, a aplicação de 1-MCP interage com vários fatores de pré e pós-colheita, como a cultivar, estágio de maturação fisiológica,

temperatura de armazenamento, pressões parciais de oxigênio e dióxido de carbono (WATKINS, 2006).

A aplicação de 1-MCP tem forte efeito na redução do avanço do amadurecimento principalmente por reduzir a ação e, conseqüentemente, a síntese do etileno (WATKINS, 2006). A menor síntese de etileno resulta em uma série de vantagens, como menor taxa respiratória (MATTHEIS et al., 2005; TOIVONEN, LU, 2005), menor degradação de clorofilas, menor degradação de pectinas da parede celular reduzindo o amolecimento da polpa de frutas (TOIVONEN, LU, 2005; BRACKMANN et al., 2009b, ZHU et al., 2013), menor perda de ácidos (TOIVONEN; LU, 2005, BIZJAK et al., 2012) e açúcares (PRE-AYMARD et al., 2005, BIZJAK et al., 2012) e, além disso, pode reduzir alguns distúrbios fisiológicos, como a escaldadura de epiderme (SABBAN-AMIN et al., 2011).

Entretanto, a aplicação de 1-MCP pode causar alguns danos às frutas armazenadas em atmosfera controlada. Lee et al. (2012) observaram que a aplicação de 1-MCP em maçãs ‘Empire’ causou o desenvolvimento de um distúrbio fisiológico similar ao dano por frio, em que a polpa das maçãs apresentaram escurecimento sem amolecimento. DeEll et al. (2003), Fawbush et al. (2008) e Watkins; Nock (2012) observaram que as maçãs ‘Empire’ e ‘McIntosh’ se tornaram mais suscetíveis aos danos por dióxido de carbono quando o 1-MCP foi aplicado no início do armazenamento.

Outro efeito desfavorável da aplicação de 1-MCP, associado ao armazenamento em AC ou ACD, é a diminuição da síntese de compostos voláteis relacionados com o aroma em maçãs ‘Gala’ (MATTHEIS et al., 2005). A menor síntese e ação do etileno reduz a produção deste compostos, uma vez que sua produção, especialmente a de ésteres, possui alta dependência pelo etileno (JOHNSTON et al., 2009).

Nos últimos anos o 1-MCP vem sendo testado como ferramenta para possibilitar o armazenamento em temperatura mais elevada (McCORMICK et al., 2010; STREIF et al., 2010). Entretanto, a associação do 1-MCP em condições de atmosfera controlada dinâmica ainda não foi testado. Esta forma de armazenamento prevê a redução da pressão parcial de oxigênio até o limite mínimo tolerado pela fruta. Nessa situação normalmente ocorre a indução da síntese de etanol, que pode ser um potente inibidor da síntese do etileno (ASODA et al., 2009; LIU et al., 2012), e além disso, a baixa disponibilidade de oxigênio também limita ao máximo a atividade da enzima ACC oxidase (LIN et al., 2009) e, portanto, a síntese de etileno (SABBAN-AMIN et al., 2011). Portanto, pesquisas precisam ser realizadas para verificar o efeito adicional da aplicação de 1-MCP no armazenamento em atmosfera controlada dinâmica,

mesmo quando a ACD for associada à temperatura mais elevada de armazenamento, como a praticada por McCORMICK et al. (2010) e STREIF et al. (2010).

3 ARTIGO 1

3.1 Dynamic controlled atmosphere based on respiratory quotient maintains quality of ‘Royal Gala’ apples

Anderson Weber*¹, Auri Brackmann¹, Vanderlei Both¹, Elizandra Pivotto Pavanello¹, Rogério de Oliveira Anese¹, Fabio Rodrigo Thewes¹

¹ Federal University of Santa Maria, Rural Sciences Center, Department of Plant Science, Postharvest Research Center, Avenida Roraima 1000, Camobi, Santa Maria 97105-900, RS, Brasil. *anweba@gmail.com; auribrackmann@gmail.com; vanderleiboth@yahoo.com.br; elizandra_pavanello@yahoo.com.br; rogerio_anese@yahoo.com.br; fthewes@yahoo.com.br

Abstract - The aim of this study was to evaluate the fruit quality in the new method of dynamic controlled atmosphere (DCA) for ‘Royal Gala’ apple storage by monitoring the respiratory quotient (RQ), at two temperatures, and compare them with the commercially available HarvestWatch™ DCA system and static controlled atmosphere (CA). The storage conditions were: *a*) CA of 1.2 kPa O₂ plus 2.0 kPa CO₂; *b*) DCA with chlorophyll fluorescence measurement (HarvestWatch™ DCA); *c*) DCA with respiratory quotient (RQ) 2; *d*) RQ 2 DCA stored at 1°C; *e*) RQ 4 DCA; *f*) RQ 4 DCA stored at 1°C; and *g*) RQ 6 DCA. The CO₂ partial pressure was maintained at 1.2 kPa, and the temperature was 0.5°C, except for treatments *d* and *f*. Ethylene production and respiration rates were lower in apples stored in DCA than in apples from CA, as a result of lower 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase activity, especially in apples stored in RQ 2 DCA. Flesh firmness from apples stored in DCA did not differ from that stored in CA. Apples stored in RQ 2 and 4 DCA had higher titratable acidity after 7 days of shelf life at 20°C. However, with higher RQ, soluble solids were lower. Apples stored at 1°C had less flesh breakdown occurrence and high percentage of healthy fruit. ‘Royal Gala’ stored at RQ 2 DCA had lesser flesh breakdown than apples stored in CA; however, the apples stored in HarvestWatch™ DCA did not differ from those stored in CA. Apples stored at the highest RQ value (6 and 4), specially at 0.5°C, resulted in low O₂ injury after storage. The increase in temperature to 1.0°C reduced the occurrence of this disorder. Therefore, the storage in RQ2 DCA at 1°C is the most indicated for ‘Royal Gala’ apples quality maintenance after eight months storage.

Index terms: *Malus domestica*, ethylene, ACC oxidase activity, anaerobic respiration, ethanol, fruit quality.

Atmosfera controlada dinâmica pelo quociente respiratório, ao invés da fluorescência da clorofila, mantém a qualidade de maçãs 'Royal Gala'

Resumo - O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade de maçãs 'Royal Gala' em um novo método de armazenamento de maçãs em atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorado pelo quociente respiratório (QR), em duas temperaturas, e comparar este método com a ACD disponível comercialmente (HarvestWatch™) e a atmosfera controlada convencional (CA). As condições de armazenamento foram: *a*) CA de 1,2 kPa O₂ e 2,0 kPa CO₂; *b*) ACD com monitoramento da fluorescência de clorofila (ACD HW); *c*) ACD com quociente respiratório (RQ) 2 (ACD QR2); *d*) ACD QR2 armazenados a 1°C; *e*) ACD QR4; *f*) ACD QR4 armazenados a 1°C; e *g*) ACD QR6. A pressão parcial de CO₂ foi 1,2 kPa e a temperatura de 0,5 °C, exceto para o tratamento *d* e *f*. A produção de etileno e a taxa respiratória foram menores em maçãs armazenadas em ACD que em maçãs de AC, como resultado da menor atividade da enzima ACC oxidase, especialmente em maçãs armazenadas em ACD QR2. A Firmeza da polpa de maçãs armazenadas em ACD não diferiu das armazenadas em AC. As maçãs armazenadas em ACD QR2 e 4 apresentaram maior acidez titulável, após 7 dias de vida de prateleira. No entanto, com maior RQ os sólidos solúveis foram menores. Maçãs armazenadas a 1°C manifestaram menor incidência de degenerescência de polpa e maior percentual de fruta sadias. O armazenamento em ACD QR2 resultou maçãs com menor degenerescência da polpa que às armazenadas em AC, no entanto, as maçãs armazenadas em ACD HW não diferiram daquelas armazenados em AC. As maçãs armazenadas no nível mais elevado de QR (4 e 6), em especial a 0,5°C, apresentaram escurecimento da epiderme após o armazenamento. O aumento da temperatura para 1,0°C, reduziu a incidência desta desordem. Portanto, a ACD QR2 na temperatura de 1°C é a mais indicada para manter a qualidade de maçãs 'Royal Gala' após oito meses de armazenamento.

Termos para indexação: *Malus domestica*, etileno, atividade da ACC oxidase, respiração anaeróbica, etanol, qualidade de fruta.

3.1.1 Introduction

In Brazil, 'Royal Gala' apples are stored after harvest under controlled atmosphere (CA) conditions with about 1.0 to 1.2 kPa O₂ and 2.0 to 2.5 kPa CO₂ in combination with low temperature, between 0.5 to 1°C, and relative humidity at about 94% in order to extend their commercial storage life up to seven months (WEBER et al., 2011, 2012). In such conditions, gas exchange inside the fruit affects the respiration process and ethylene production, thus reducing quality losses. Non optimal storage conditions may lead to physiological disorders and loss of fresh product. If oxygen levels are excessively reduced, hypoxic and even anoxic zones may develop and switch aerobic respiration to fermentation, which can also lead to physiological disorders (PESIS, 2005, WATKINS, 2008; GASSER et al., 2010).

A new trend in CA storage conditions is to consider the use of dynamic rather than static controlled atmosphere. Dynamic controlled atmosphere (DCA), mainly with chlorophyll fluorescence to determine lowest oxygen limit (LOL) detection patented as HarvestWatch™ System (PRANGE et al., 2007), was used worldwide for storage of 350000 tons of apples in 2012, and it has been increasing in the last few years (ISOLCELL, 2013). This new apple storage technology has been used in Brazil since 2011.

In the DCA storage system, the oxygen level can change during the storage period, but such level is always slightly above the anaerobic compensation point (ACP), which is delimited by the LOL. Therefore, the lowest acceptable oxygen concentration must be measured at real time in the storage rooms. DCA reduces the incidence of superficial scald, flesh browning, core breakdown, and softening (PRANGE et al., 2003; PRANGE et al., 2005a; ZANELLA and CAZZANELLI, 2007).

Since 2010, we have been testing a new method to store apples in DCA. To control the changes in the physiological responses in this method, the respiratory quotient (RQ) has been used. RQ is the quotient of CO₂ production with O₂ uptake (BOERSIG et al., 1988). ACP happens at a certain concentration of O₂ in a storage chamber where the production of CO₂ is minimal and the respiratory quotient is approximately 1.0. Reducing O₂ levels below ACP generally triggers a sudden increase in the fermentative products and the RQ. Hence, the increase in RQ identifies the point where aerobic respiration becomes anaerobic. Monitoring the respiratory quotient helps to identify the moment when apples are at a critical level of ethanol production, which might damage their tissue (GASSER et al., 2010). Therefore, this method instantaneously monitors the stress to which the fruit is exposed and provides a safe way to achieve low oxygen levels.

Apples are often physiologically different on the sun-exposed and shaded sides (WRIGHT et al., 2012). Xanthophyll, anthocyanin content (MA and CHENG, 2003), soluble solids, titratable acids, ethylene and CO₂ evolution (WRIGHT et al., 2012) are typically higher on the sun-exposed compared to the shaded side of an apple. Therefore, Wright et al. (2012) concluded that higher metabolic activity on the sun-exposed side of the fruit might result in higher LOL if chlorophyll fluorescence is measured on this side of the fruit for HW-based DCA. LOL can be underestimated if the fruit sample in the plastic container is exposed to the shaded side, or if the fruit is originated from the inside part of the tree, where it normally has little sun exposure. On that basis, RQ-based DCA monitors a large amount of fruit as well as the whole fruit, rather than only a part of the fruit; thus, a more accurate LOL value is obtained.

Temperature is an important factor that affects fruit metabolism and, thus, DCA conditions. According to Wright et al. (2010), variation of ACP for the same cultivar may occur depending on storage temperature. If the storage temperature is higher, LOL increases, resulting in higher O₂ levels for storage. The temperature for 'Royal Gala' apple stored in CA conditions ranged from 0.5 to 1.0°C (WEBER et al., 2011; BRACKMANN et al., 2012). However, the storage temperature for DCA conditions, that mean in very low oxygen partial pressure (generally below 0.5kPa), was not yet studied. Researches show that the storage temperature generally have a high interaction with the oxygen partial pressure in the storage room (CHU, 1999; WATKINS; LIU, 2010; WEBER et al., 2011; KWEON et al., 2013).

The objective of this study was to evaluate 'Royal Gala' apples quality in the new Respiratory Quotient DCA technology, submitted to different RQ levels, and compare them with the static controlled atmosphere and the HarvestWatchTM DCA at two temperatures.

3.1.2 Material and Methods

3.1.2.1 Experimental materials and storage conditions

Research was carried out at the Postharvest Research Center of the Department of Plant Science at the Federal University of Santa Maria (UFSM). The experimental material consisted of 'Royal Gala' apples harvested from commercial orchards in the town of Vacaria, in the state of Rio Grande do Sul (Brazil), in 2011.

Fruit with any kind of injury or defect were discarded, and then they were randomized. Treatment was applied in experimental CA chambers with a volume of 233 liter and, finally, the samples were placed in two refrigerated chambers, at 0.5°C (± 0.1) and 1.0°C (± 0.1).

The experiment was conducted in a completely randomized design with four replication per treatment. Each replication was composed by 30 fruits, resulting in 120 fruit for each treatment. The experimental oxygen and carbon dioxide conditions were: *a*) Controlled atmosphere (CA) with 1.2kPa O₂ and 2.0 kPa CO₂; *b*) Dynamic controlled atmosphere (DCA) with chlorophyll fluorescence measurement (HarvestWatch™ DCA); *c*) DCA with respiratory quotient (RQ) 2; *d*) RQ 2 DCA stored at 1°C; *e*) RQ 4 DCA; *f*) RQ 4 DCA stored at 1°C; and *g*) RQ 6 DCA. The CO₂ partial pressure for all DCA conditions were maintained at 1.2 kPa, and the storage temperature was 0.5°C, except for treatments *d* and *f*.

3.1.2.2 Temperature and relative humidity control

Temperature was controlled by thermostats and checked daily by bulb mercury thermometers (with a 0.1°C resolution) inserted in the apples flesh, which were stowed in the storage chamber. Relative humidity was monitored by using psychrometers with mercury thermometers within the chambers, and it was maintained at 96% \pm 2%.

3.1.2.3 Gases control

O₂ partial pressure was reduced on the first storage day, about two days after harvest. O₂ reduction was obtained by flushing the chamber atmosphere with nitrogen until it reached the pre-established concentration. For DCA conditions, O₂ was reduced to 0.7 kPa, and the decrease thereafter resulted from the respiration process. CO₂ partial pressure was reached by injecting this gas until the desired concentration.

Gas concentration within the chamber was monitored and corrected by a Kronenberger/Siemens® device for automatic control. This equipment corrected O₂ concentration by injecting atmospheric air and absorbing the excess of CO₂ through air circulation within a CO₂ absorber containing hydrated lime until the desired gas concentrations were reached.

The HarvestWatch (HW) DCA was monitored according to the instructions from Prange et al. (2007). The HarvestWatch system (Satlantic Inc., Halifax, NS) was used to monitor

chlorophyll fluorescence from six apples during fruit exposure to low O₂. Apples cooled to 0.5°C were placed in a perforated plastic container (18cm width, 27cm length, 25 cm height) with the fluorescence sensors attached to the inside of the container top. The container was placed inside a CA chamber; the chamber was sealed, and the chamber door was covered with black plastic to exclude light. The fluorescence monitoring system was activated and then O₂ was subsequently reduced to 0.7 kPa because of respiration until a change in fluorescence was detected. The lower O₂ set point was determined by identifying the O₂ value where an inflection in the fluorescence signal was detected and then by increasing O₂ by 0.2 kPa as a safety factor. Chlorophyll fluorescence was monitored every hour for the entire storage period during the experiment.

Respiratory Quotient (RQ) DCA conditions were determined daily during the eight-month storage. For RQ determination, O₂ and CO₂ were measured immediately after the chambers were tightly closed. After 24 hours, the gas level was measured again. RQ was calculated with the ratio between the CO₂ released and the O₂ consumed within a period of 24 hours. If the calculated RQ was higher than the pre-established value, O₂ was increased to reduce fermentation and reduce RQ. If the calculated RQ was lower than pre-established RQ, the O₂ value was decreased to allow increased fermentation.

3.1.2.4 Biochemical and physical evaluations

The quality factors were evaluated after eight months of storage plus seven days of shelf life at 20°C. The factors were: a) ACC oxidase enzyme activity: determined according to the methodology proposed by Bufler (1986); b) Ethylene synthesis: determined through the stowage of approximately 1.5 kg of apples in a 5L container which was hermetically sealed for approximately one hour; after that, two aliquots of each container were drawn and injected into a Varian Star CX 3400 gas chromatograph (Varian, Palo Alto, CA, USA), equipped with a flame ionization detector (FID) and a Porapak N80/100 column, with the data being expressed in $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$; c) Respiratory rate: determined through air circulation, from the same ethylene synthesis analysis container, using an Agri-Datalog® gas analyzer, with an infrared gas analyzer (IRGA) system (Agri-datalog, Lana, BZ, Italy), which analyzed CO₂ concentration within the container. The data were expressed in $\text{mL CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$; d) Flesh firmness: determined with the aid of an FT 327 penetrometer (Effegi Systems, Milan, Italy) equipped with an 11mm probe and expressed in Newton; e) Flesh breakdown; f) Mealiness; g) Low O₂ injury:

determined by counting the apples that demonstrated such disorder, expressed as a percentage; h) Healthy fruit: determined by counting the apples which did not have any kind of physiological disorders or incidence of decay; i) Titratable acidity: determined by titration with 0.1N NaOH of a solution with 10mL of juice diluted in 100mL distilled water, until pH 8.1 was reached, with the data being expressed in meq 100 mL⁻¹; and j) Soluble solids: determined by refractometry and expressed in °Brix.

3.1.2.5 Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) was performed for all the parameters evaluated. ANOVA significant parameters were compared through Tukey's test at a 5% probability of error. The data were tested for normality and homogeneity of errors by Lilliefors' and Bartlett's tests, respectively. The data expressed in percentage were transformed by the formula \arcsin before analysis of variance; however, the averages shown in this paper have been back-transformed. The software Sisvar and Action for Excel were used to run the statistical analysis.

3.1.3 Results and Discussion

Ethylene production is suppressed by dynamic controlled atmosphere with respiratory quotient 4 and 6 at 0.5°C soon after chamber opening, but after 2 and 4 days of shelf life, all DCA conditions suppressed ethylene production. This result can be explained, specially for RQ 2 and 4 DCA, by the decrease of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase activity on the 'Royal Gala' apples (Table 1). The temperature increase from 0.5°C to 1.0°C just resulted in higher ethylene production for RQ 4 DCA at chamber opening, having no effect on ACC oxidase activity and on ethylene production during shelf life (Table 1). According to Yi et al. (2006) and Imahori et al. (2013), the reduced oxygen level in the storage room reduces oxidative metabolism by enhancing fermentative pathways, which induces ethanol production. Therefore, ripening may be delayed by the induced production of ethanol metabolites or ethanol application (ASODA et al., 2009), specially by decreasing ACC oxidase activity and ethylene production (LIU et al., 2012). Brackmann et al. (2013) also observed lower ACC oxidase activity in 'Royal Gala' apples if they are stored under low oxygen partial pressure (0.6 kPa). The highest ethylene production was measured right after chamber opening, and it decreased

during shelf life until 6 days at 20°C (Table 1), while the respiration onset occurred on the second day of shelf life (Table 2).

Table 1. Ethylene production rate and ACC oxidase activity of ‘Royal Gala’ apples after eight months at different DCA conditions and temperature plus seven days shelf life at 20°C.

DCA conditions	Temperature (°C)	Ethylene ($\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$)				ACC oxidase ($\eta\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
		Days at 20°C				
		½ day	2 days	4 days	6 days	
Initial Analysis**			0.39			18.9
CA***	0.5	0.18 aA*	0.06 aB	0.09 aB	0.06 aB	60.19 a
HW DCA	0.5	0.08 bcA	0.00 bB	0.01 bB	0.01 aB	39.00 b
RQ2 DCA	0.5	0.12 abA	0.01 bB	0.01 bB	0.03 aB	14.38 c
RQ2 DCA	1.0	0.09 bcA	0.03 bB	0.02 bB	0.03 aB	18.96 c
RQ4 DCA	0.5	0.05 cdA	0.02 bA	0.03 bA	0.02 aA	15.05 c
RQ4 DCA	1.0	0.14 abA	0.02 bB	0.02 bB	0.01 aB	25.47 c
RQ6 DCA	0.5	0.02 dA	0.00 bA	0.02 bA	0.01 aA	38.48 b
CV (%)			66.94			16.82

*Means followed by equal letters, lowercase in the columns and uppercase in the lines, do not differ by Tukey’s test, at 5% probability.

**Initial analysis took place before fruit storage.

***CA was 1.2 kPa O₂/2.0 kPa CO₂; CO₂ for DCA was 1.2 kPa.

Table 2. Respiration rate of ‘Royal Gala’ apples after eight months at different DCA conditions and temperature plus seven days shelf life at 20°C.

DCA conditions	Temperature (°C)	Respiration rate ($\text{mL CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$)			
		Days at 20°C			
		½ day	2 days	4 days	6 days
Initial Analysis**			5.89		
CA***	0.5	4.48 aA*	4.56 aA	3.41 aB	3.30 aB
HW DCA	0.5	3.79 abA	3.38 bcAB	2.56 bC	2.94 abBC
RQ2 DCA	0.5	2.47 dB	3.24 cA	2.50 bAB	2.34 bB
RQ2 DCA	1.0	2.78 cdB	3.60 bcA	2.50 bB	2.58 bB
RQ4 DCA	0.5	3.31 bcA	3.75 abcA	3.14 abA	3.22 aA
RQ4 DCA	1.0	3.11 cdB	3.87 abcA	3.10 abB	2.65 abB
RQ6 DCA	0.5	3.49 bcAB	4.17 abA	2.98 abB	3.25 aB
CV (%)			11.60		

*Means followed by equal letters, lowercase in the columns and uppercase in the lines, do not differ by Tukey’s test, at 5% probability.

**Initial analysis took place before fruit storage.

***CA was 1.2 kPa O₂/2.0 kPa CO₂; CO₂ for DCA was 1.2 kPa.

The respiration rate was higher in CA storage than in RQ 2 DCA even at 0.5 or 1.0°C. ‘Royal Gala’ apples stored at RQ 4 and 6 DCA did not show differences with CA storage during shelf life (Table 2). The respiration rate is normally closely associated with the ethylene production rate, specially when the oxygen level in the storage room is very low. If their rate is low, the entire metabolism is reduced and fruit quality is maintained (THOMPSON, 2010). However, flesh firmness was not related with respiration rate and ethylene production. Flesh firmness was lower at 1°C storage conditions, however differing only from RQ 6 DCA (Table 3).

Table 3. Flesh firmness, titratable acidity and soluble solids of ‘Royal Gala’ apples after eight months at different DCA conditions and temperature plus seven days shelf life at 20°C.

DCA conditions	Temperature (°C)	Flesh firmness (N)	Titratable acidity (mEq 100mL ⁻¹)	Soluble solids (°Brix)
Initial Analysis**		76.4	4.35	11.2
CA***	0.5	66.9 ab*	3.53 c	12.0 ab
HW DCA	0.5	68.8 ab	3.53 c	12.1 a
RQ2 DCA	0.5	66.9 ab	3.65 ab	12.0 ab
RQ2 DCA	1.0	63.7 b	3.95 a	11.9 abc
RQ4 DCA	0.5	67.0 ab	3.60 ab	11.7 cd
RQ4 DCA	1.0	63.1 b	3.85 ab	11.8 bcd
RQ6 DCA	0.5	70.2 a	3.78 ab	11.5 d
CV (%)		4.17	2.97	1.42

*Means followed by equal letters in the columns do not differ by Tukey’s test, at 5% probability.

**Initial analysis took place before fruit storage.

***CA was 1.2 kPa O₂/2.0 kPa CO₂; CO₂ for DCA was 1.2 kPa.

Fruit firmness is the dominant factor in consumer acceptance of apples, but sugar content and acid content also play a role in defining quality for specific cultivars (HARKER et al., 2008). In this experiment, flesh firmness of apples stored in DCA did not differ from those stored in CA; however, little flesh softening occurred in all treatments (6 to 13 N) after eight months of storage (Table 3). According to Kitemann (2012), flesh softening in apples occurs through the activation of cell wall degrading enzymes, such as polygalacturonase, pectate lyase, pectin methylesterase, endoglucanase, β-xylosidase, and especially β-galactosidase. These enzymes are activated by ethylene, as the application of 1-metilcyclopropene resulted in lower enzyme activity and gene expression for ‘Elstar’ and ‘Pinova’ apples (KITTEMANN, 2012). In addition to higher ethylene biosynthesis for apples stored at CA during the first four days at 20°C, the whole ethylene production was low. Therefore, the total amount of ethylene produced

maybe not have been enough to activate cell wall degrading enzymes, and therefore did not affect fruit firmness (Table 3).

Although DCA did not maintain higher flesh firmness of the apples stored in RQ 2 and 4, it kept higher titratable acidity after 7 days of shelf life. This result is in accordance with the lower respiration rate mainly just after chamber opening (Table 2). However, with higher RQ, that mean lower oxygen level in the storage chamber, lower soluble solids were measured (Table 3). Hypoxic concentration in a storage room results in an induction of the fermentative metabolic processes in order to supply cells with energy. However, the energetic yield on anaerobic respiration is very low, with only 2 ATPs produced for each glucose (Raymond, 1985). Therefore, for cells to maintain energy supply and maintain cell function, e.g., selective membrane permeability, basic metabolism, etc., a greater amount of glucose must enter glycolysis, which in turn, leads to a decrease in soluble solids and also an increase in ethanol accumulation that might culminate in higher physiological disorders (Franck et al., 2007).

Apples stored at 1°C showed lower occurrence of flesh breakdown and higher percentage of healthy fruit (Table 4). Weber et al. (2011) also observed lower occurrence of physiological disorders for ‘Royal Gala’ apples stored in CA at 1°C than those stored at 0.5 or 0.0°C. Flesh breakdown is often associated with deficient gas diffusion, which can cause anoxic spots in fruit flesh, resulting in the occurrence of this disorder (FRANCK et al., 2007). However, temperature normally does not influence tissue diffusion (SCHOTSMANS, 2003; HO et al., 2006). Therefore, the main reason for the higher occurrence of flesh breakdown at 0.5°C was probably chilling injury. According to James and Jobling (2008), diffuse flesh browning in ‘Pink Lady’™ apples is characterized by browning throughout the cortex tissue of the fruit, with the vascular tissue remaining clear and relatively unaffected. The authors explain that the cortex cells of apples are much larger than the vascular cells and also have much thinner cell walls. Consequently, these larger cells are more prone to collapse due to membrane damage resulting from chilling injury, as apples stored at 0.5°C, than the smaller and thicker walled vascular cells.

‘Royal Gala’ apples stored at RQ 2 DCA (at 0.5 or 1.0°C) and those stored in RQ 4 DCA at 1°C had lower flesh breakdown than those stored in CA; however, the apples stored in HarvestWatch DCA did not differ from those stored in CA (Table 4). Watkins (2008) showed that DCA was especially effective to reduce superficial scald development in ‘Cortland’ and ‘Delicious’ apples, but they did not mention flesh breakdown. According to Wright et al. (2012), LOL is inherently variable, like fruit mass, color, sugar or acid levels, even among apples from a given cultivar and tree or between the sun-exposed and shaded regions of a single

fruit. Therefore, the current HarvestWatch DCA recommendations suggest that O₂ levels should be set at 0.2-0.3 kPa above LOL (PRANGE et al., 2007). If the O₂ level is set above LOL, fruit quality might be not maintained at its best. As a result, apples stored in HarvestWatch DCA might not differ from those stored in CA condition.

Table 4. Flesh breakdown, mealiness, low O₂ injury, and healthy fruit percentages of ‘Royal Gala’ apples after eight months at different DCA conditions and temperature plus seven days of shelf life at 20°C.

DCA conditions	Temperature (°C)	Flesh breakdown (%)	Mealiness (%)	Low O ₂ injury (%)	Healthy fruit (%)
CA**	0.5	21.5 a*	39.1 a	0.0 c	56.9 bc
HW DCA	0.5	18.6 ab	34.6 ab	0.0 c	65.8 ab
RQ2 DCA	0.5	14.8 b	29.6 ab	0.8 c	65.6 ab
RQ2 DCA	1.0	7.9 c	29.3 ab	0.0 c	68.8 ab
RQ4 DCA	0.5	17.5 ab	33.5 ab	8.3 b	49.7 cd
RQ4 DCA	1.0	7.9 c	23.4 b	0.8 c	71.6 a
RQ6 DCA	0.5	17.5 ab	22.6 b	48.9 a	42.7 d
CV (%)		6.77	9.96	27.05	6.03

*Means followed by equal letters in the columns do not differ by Tukey’s test, at 5% probability.

**CA was 1.2 kPa O₂/2.0 kPa CO₂; CO₂ for DCA was 1.2 kPa.

Mealiness was higher in apples stored at CA condition; however, it differs only for apples stored at RQ 4 DCA plus 1°C and RQ 6 DCA (Table 4). Mealiness is a physiological disorder which is characterized by the sensation of a deteriorative texture and lack of juiciness that degrades the quality of apples and makes them unable for marketing. According to Billy et al. (2008), the intensity of juiciness decreased while the intensity of mealiness increased, and these changes were associated with the deterioration of the mechanical strength of apple tissue during storage. The same authors reported that the most relevant biochemical marker which is associated with texture change, as a mean of mealiness appearance, is the increase of galacturonic acid content analyzed in water soluble pectin extracts.

The apples stored at higher RQ value (6 and 4), specially at 0.5°C, showed skin browning after storage, probably because of the low oxygen level during storage (Table 4). The temperature increase to 1.0°C reduced the occurrence of this disorder. The apples from RQ 4 and 6 DCA had alcoholic taste after eight months of storage and even after 7 days in shelf life (data not shown). Therefore, skin injury probably occurs because of higher fermentation under high RQ conditions, which results in a larger amount of ethanol, acetaldehyde and ethyl acetate production which, in turn, can damage apple skin (Pesis, 2005). The disorder caused by low O₂

reduced the percentage of healthy apples stored at 0.5°C in the RQ 4 and 6 DCA treatments (Table 4).

3.1.4 Conclusions

1- ‘Royal Gala’ apples stored in RQ 2 DCA maintain better quality than those stored in HarvestWatch™ DCA and static CA after eight months of storage.

2- Temperature increase from 0.5°C to 1.0°C reduce the incidence of physiological disorders in ‘Royal Gala’ apples.

3.1.5 Acknowledgements

We would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and the Research Support Foundation of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS), for their financial support.

3.1.6 References

ASODA, T.; TERAJ, H.; KATO, M.; SUZUKI, Y. Effects of postharvest ethanol vapor treatment on ethylene responsiveness in broccoli. **Postharvest Biology and Technology**, v.52, p.216-220, 2009.

BILLY, L.; MEHINAGIC, E.; ROYER, G.; RENARD, C.M.G.C.; ARVISENET, G.; PROST, C.; JOURJON, F. Relationship between texture and pectin composition of two apple cultivars during storage. **Postharvest Biology and Technology**, v.47, p.315-324, 2008.

BOERSIG, M.R.; KADER, A.A.; ROMANI, R.J. Aerobic-anaerobic respiratory transition in pear fruit and cultured pear fruit cells. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.113, p.869-873, 1988.

BRACKMANN, A.; ANESE, R.O.; WEBER, A.; BOTH, V.; GASPERIN, A.R.; PAVANELLO, E.P. Effect of initial low oxygen stress combined with 1-methylcyclopropene in ‘Royal Gala’ apple quality stored under ultralow O₂. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, p.1185-1194, 2013.

BRACKMANN, A.; BOTH, V.; WEBER, A.; PAVANELLO, E.P.; SCHORR, M.R.W.; SANTOS, J.R.A. Changes in temperature, oxygen and CO₂ during controlled atmosphere storage of ‘Royal Gala’ apples. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, p.2247-2256, 2012.

BUFLER, G. Ethylene-promoted conversion of 1-aminocyclopropene-1-carboxylic acid to ethylene in peel of apple at various stages of fruit development. **Plant Physiology**, v.80, p.539-543, 1986.

CHU, C.L. Effects of Storage Temperature, Storage Atmosphere, and Growing Region on Internal Browning Disorder of 'McIntosh' Apples. **HortTechnology**, v.9 p.75-78, 1999.

FRANCK, C.; LAMMERTYN, J.; HO, Q.T.; VERBOVEN, P.; VERLINDEN, B.; NICOLAÏ, B.M. Browning disorders in pear fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.43, p.1-13, 2007.

GASSER, F.; EPPLER, T.; NAUNHEIM, W.; GABIOUD, S.; NISING, A. B. Dynamic CA storage of apples: monitoring of the critical oxygen concentration and adjustment of optimum conditions during oxygen reduction. **Acta Horticulturae**, v796, p.69-76, 2010.

HARKER, F.R.; KUPFERMAN, E.M.; MARIN, A.; GUNSON, F.A.B.; TRIGGS, C.M. Eating quality standards for apples based on consumer preferences. **Postharvest Biology and Technology**, v.50, p.70-78, 2008.

HO, Q.T.; VERLINDEN, B.E.; VERBOVEN, P.; NICOLAÏ, B.M. Gas diffusion properties at different positions in the pear. **Postharvest Biology and Technology**, 41, p.113-120, 2006.

IMAHORI, Y.; YAMAMOTO, K.; TANAKA, H.; BAI, J. Residual effects of low oxygen storage of mature green fruit on ripening processes and ester biosynthesis during ripening in bananas. **Postharvest Biology and Technology**, v.77, p.19-27, 2013.

ISOLCELL, **Dynamic Control Atmosphere (DCA)**. Disponível em: <http://www.isolcell.com/en/Isolcell-nitrogen-generators/dca.html> Acesso em: 15 de set. 2013.

JAMES, H.; JOBLING, J. The flesh browning disorder of 'Pink Lady'TM apples. **New York Fruit Quarterly**, v.16, p.23-28, 2008.

KITTEMANN, D. **Untersuchungen zu Fruchtfleischfestigkeit und Zellwandabbau von Apfelfrüchten während der Lagerung unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses von Ethylen**. 2012. 242p. Ph.D Thesis. Technische Universität München, München.

KWEON, H.-J.; KANG, I.-K.; KIM, M.-J.; LEE, J.; MOON, Y.-S.; CHOI, C.; CHOI, D. G.; WATKINS, C. B. Fruit maturity, controlled atmosphere delays and storage temperature affect fruit quality and incidence of storage disorders of 'Fuji' apples. **Scientia Horticulturae**, v.157, p.60-64, 2013.

LIU, W.W.; QI, H.Y.; XU, B.H.; LI, Y.; TIAN, X.B.; JIANG, Y.Y.; XU, X.F.; LV, D.Q. Ethanol treatment inhibits internal ethylene concentrations and enhances ethyl ester production during storage of oriental sweet melons (*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino). **Postharvest Biology and Technology**, v.67, p.75-83, 2012.

MA, S.S.; CHEN, P.M. Storage disorder and ripening behavior of 'Doyenne du Comice' pears in relation to storage conditions. **Postharvest Biology and Technology**, v.28, p.281-294, 2003.

PESIS, E. The role of the anaerobic metabolites, acetaldehyde and ethanol, in fruit ripening, enhancement of fruit quality and fruit deterioration. **Postharvest Biology and Technology**, v.37, p.1-19, 2005.

PRANGE, R.K.; DELONG, J.M.; HARRISON, P.; MCLEAN, S.; SCRUTTON, J.; CULLEN, J. Method and apparatus for monitoring a condition in chlorophyll containing matter. **U.S. Patent**, n.WO/2002/006795, 2007.

PRANGE, R.K.; DELONG, J.M.; DANIELS-LAKE, B.J.; HARRISON, P.A. Innovation in controlled atmosphere technology. **Stewart Postharvest Review**, v.3, p.1-11, 2005.

PRANGE, R.K.; DELONG, J.M.; HARRISON, P.A. Oxygen concentration affects chlorophyll fluorescence in Chlorophyll-containing fruit and vegetables. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.128, p.603-607, 2003.

RAYMOND, P.; AL-ANI, A.; PRADET, A. ATP production by respiration and fermentation, and energy charge during aerobiosis and anaerobiosis in twelve fatty and starchy germinating seeds. **Plant Physiology**, v.79, p.879-884, 1985.

SCHOTSMANS, W.; VERLINDEN, B.E.; LAMMERTYN, J.; NICOLAÏ, B.M. Simultaneous measurement of oxygen and carbon dioxide diffusivity in pear fruit tissue. **Postharvest Biology and Technology**, v.29, p.155-166, 2003.

THOMPSON, A. K. **Controlled atmosphere storage of fruits and vegetables**. 2nd ed., Oxfordshire: CAB International, 2010. 289p.

WATKINS, C.B.; LIU, F. W. Temperature and Carbon Dioxide Interactions on Quality of Controlled Atmosphere-stored 'Empire' Apples. **Hortscience**, v.45, p.1708-1712. 2010.

WATKINS, C.B. Dynamic Controlled Atmosphere Storage – A New Technology for the New York Storage Industry? **New York Fruit Quarterly**, v.16, n.1, 2008.

WEBER, A.; BRACKMANN, A.; ANESE, R.O.; BOTH, V.; PAVANELLO, E.P. 'Royal Gala' apple quality stored under ultralow oxygen concentration and low temperature conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.1597-1602, 2011.

WEBER, A.; BRACKMANN, A.; THEWES, F.R.; BOTH, V.; ANESE, R.O.; SCHORR, M.R.W. Relative humidity and its interaction with the storage temperature of 'Gala' apples and mutants. **Ciência Rural**, v.42, p.2159-2165, 2012.

WRIGHT, A.H.; DELONG, J.M.; HARRISON, P.A.; GUNAWARDENA, A.H.L.A.N.; PRANGE, R.K. The effect of temperature and other factors on chlorophyll a fluorescence and the lower oxygen limit in apples (*Malus domestica*). **Postharvest Biology and Technology**, v.55, p.21-28, 2010.

WRIGHT, A.H.; DELONG, J.M.; GUNAWARDENA, A.H.L.A.N.; PRANGE, R.K. Dynamic controlled atmosphere (DCA): Does fluorescence reflect physiology in storage? **Postharvest Biology and Technology**, v.64, p.19–30, 2012.

YI, C.; JIANG, Y.M.; SUN, J.; LUO, Y.B.; JIANG, W.B.; MACNISH, A. Effects of short-term N₂ treatment on ripening of banana fruit. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.81, p.1025–1028, 2006.

ZANELLA, A.; CAZZANELLI, P. DCA-Lagerung hat sich bewährt. **Apfel Aktuell: Lagerung**, p.16-17, 2007.

4 ARTIGO 2

4.1 Flesh softening inhibition in ‘Braeburn’ apples with respiratory quotient dynamic controlled atmosphere or ethanol application in high temperature storage

Anderson Weber^{1*}, Daniel Alexandre Neuwald², Dominikus Kiteman^{2,3}, Auri Brackmann¹

¹ Postharvest Research Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, 1000, Brazil. * e-mail: anweba@gmail.com

² Competence Center for Fruit Growing – Lake Constance, Schuhmacherhof, 6, Ravensburg, Germany.

³ Center for Fruit Growing –Constance Lake, Schuhmacherhof, 6, Ravensburg and Physiology of Specialty Crops, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany.

4.1.1 Abstract

Apples stored under low oxygen storage conditions switch the aerobic respiration to the anaerobic respiration. Ethanol is the main product of the fermentative pathway, however, many other compounds are produced during this biosynthetic way which can affect negatively fruit quality. For these reasons, our work aimed to research the effect of the new respiratory quotient dynamic controlled atmosphere (RQ DCA), which induces ethanol production by low oxygen storage, and the effect of ethanol application on the flesh firmness retention of ‘Braeburn’ apples stored in different temperatures. In the first experiment fruits were stored in controlled atmosphere (CA) and in DCA conditions (controlled by respiratory quotient or HarvestWatchTM) in extremely low oxygen partial pressure during eight months at 1°C or 3°C. In the second experiment ethanol was applied at the doses of 0, 50, 100, 250, 500 and 1000 µL L⁻¹ in a 22.4 L jar at 20°C after 6 months storage in controlled atmosphere with 1.2 kPa O₂ and 0.7 kPa CO₂. After 7 days in shelf life at 20°C fruit assessments were done. RQ DCA storage resulted in the activation of the alcohol dehydrogenase (ADH) activity, which resulted in higher ethanol production in comparison with the HarvestWachtTM dynamic controlled atmosphere (HW DCA) and conventional CA storage. The acetaldehyde and ethyl acetate production were also increased in the RQ DCA. If in one hand, the higher fermentation resulted in loss of sugars

content and acidity, in the other hand resulted in lower ethylene production, ACC oxidase activity, membrane permeability, β -galactosidase activity, and therefore lower firmness loss after long-term storage. These results were also shown with the ethanol application after CA storage, which resulted in decrease in the ethylene biosynthesis, which was reduced until the 500 $\mu\text{L L}^{-1}$ doses application. The effect on the ACC oxidase activity continued until the highest ethanol doses. Respiration rate was also significantly decreased with ethanol application, probably, due to the reduced damage on the cell membrane, as a mean of decreased membrane permeability with increased ethanol concentration. The reduced respiration rate, ACC oxidase activity and ethylene production kept higher green ground color of the fruit skin and reduced β -galactosidase activity. The 3°C temperature storage resulted in the lowest sugar content and acidity, however, did not induce the firmness loss after eight months of storage. Therefore, this work concluded that ‘Braeburn’ apples could be stored under 3°C at RQ1.5 DCA. In addition, ethanol produced by the fruit or applied externally, had a high effect on the apple flesh firmness maintenance during and after storage.

Keywords: fermentation, ACC oxidase activity, flesh firmness, β -galactosidase activity, fruit quality.

4.1.2 Introduction

‘Braeburn’ apples are normally stored under controlled atmosphere for seven or eight months with 1.0kPa O₂ and <1.5kPa CO₂ at 0.5 to 1.5°C (LAFER, 2008). Even so losses occur due to physiological disorders occurrence, specially core and flesh breakdown, and flesh softening. The effect of preharvest factors, like mineral status and growing regions (NEUWALD et al., 2008), and postharvest factors, like O₂, CO₂ and temperature in controlled atmosphere, for the ‘Braeburn’ browning disorder occurrence was widely studied (LEE et al., 2012; GWANPUA et al., 2012; HO et al., 2013). In the last 10 years, new storage technology called dynamic controlled atmosphere (DCA) was developed in order to maintain better fruit quality. The DCA technology is a non-chemical storage method and, therefore, it could be used for storage of organic produced apples and in all other cases where postharvest 1-metilcycloporpene (1-MCP) cannot be applied, as in the case of the internal browning susceptible cultivar ‘Braeburn’ (STREIF, 2010). Moreover, no works has been published about the effect of DCA on the firmness retention and its physiological mechanism.

The commercially used DCA technology (HarvestWatch™) is a fluorescence-based DCA technology, which monitors the chlorophyll fluorescence emission from the apple skin during the exposure at low O₂ levels. If the fluorescence spikes the O₂ must be raised to reduce the signal and so detect the lowest oxygen limit (LOL) (PRANGE et al., 2007).

In the last few years a new method to control oxygen in DCA system has been tested, using the respiratory quotient (RQ) methodology. The RQ is the quotient of CO₂ production with O₂ uptake (BOERSIG et al., 1988) with which is possible to monitor the anaerobic compensation point (ACP). ACP happens at a certain O₂ concentration in a storage room when the CO₂ production is minimal and the respiratory quotient is approximately 1.0. Reducing O₂ levels below ACP generally triggers a sudden increase in the fermentative products and RQ. Hence, the increase in RQ identifies the point when aerobic respiration becomes anaerobic. Monitoring the respiratory quotient helps to identify the moment when apples are at a critical level of ethanol production, which might damage their tissue in higher concentration (GASSER et al., 2010). Therefore, this method instantaneously monitors the stress to which the fruit is exposed and provides a safe way to achieve low oxygen levels.

In low oxygen storage conditions aerobic respiration can switch to the anaerobic respiration. Ethanol is the main product of the fermentative pathway, however, many other compounds are produced during this biosynthetic way which can affect fruit quality. According to Pesis et al. (2005) ethanol application or low oxygen atmospheres delay softening due to the reduction protein content of cellulase, β -galactosidase and endoglucanase (PESIS et al., 1998; LOULAKAKIS et al., 2006). Ethanol application also decrease *BO-ACO1*, *BO-ACO2* e *BO-ACSI* expression on broccoli reducing ethylene production (ASODA et al., 2009). Other important metabolic systems to maintain fruit quality can be affected by fermentation products. Mori et al. (2009) showed that ascorbate peroxidase, glutathione reductase and dehydroascorbate reductase activity are maintained high with ethanol application resulting in low reactive oxygen species damage and therefore quality maintenance.

Temperature decrease is well known as its high effect on reducing metabolic rate during storage of fruits and vegetables. However, the reduction of the temperature to 0.5 or 1.0°C in storage rooms represents a high costs variable for the storage companies. On that basis, some research was done trying increase storage temperature associated with 1-MCP application in order to save energy in the storage systems. According to McCormick et al. (2010 and 2012) 35% of energy consumption can be saved if the storage temperature is raised from 1.5°C to 4°C associated with 1-MCP application without quality losses. However, 1-MCP application represents a high cost for storage companies, which is higher than the 35% energy costs saved

at 4°C storage (McCORMICK et al., 2010 and 2012). 1-MCP can also increase CO₂ disorders in CO₂ sensitive cultivar, like ‘Braeburn’ apples (STREIF et al., 2010). Therefore, this work tested the effect of higher temperature associated with DCA instead of 1-MCP application to save energy and costs and maintain fruit quality.

The objective of this research was to study the effect of the new respiratory quotient DCA at higher temperature storage on the flesh firmness retention for ‘Braeburn’ apples, and compare them, with the static controlled atmosphere and the HarvestWatch™ DCA. Furthermore, this work also aimed to research the effect of the ethanol on ‘Braeburn’ apples metabolism.

4.1.3 Material and Methods

4.1.3.1 Plant materials and sample homogenization

The experiments were developed at the postharvest laboratory from the Competence Center for Fruit Production - Lake Constance in Germany. The experimental material consisted of ‘Braeburn’ apples harvested from own orchards in October 2011.

After harvest fruits were selected, excluding the ones that presented any kind of injury or defect. Thereafter, the experimental samples were homogenized and the treatment application in experimental CA rooms with a volume of 233 or 660 liters was carried out.

4.1.3.2 Experiments

4.1.3.2.1 DCA experiment

The experiment was conducted in a completely randomized design which assessed four CA or DCA conditions at two temperatures with four replicates of 30 fruits, resulting in a two-factor experiment way (4 x 2). The experimental oxygen conditions were: *a*) Controlled atmosphere (CA) with 1.2 kPa O₂; *b*) Dynamic controlled atmosphere (DCA) with chlorophyll fluorescence measurement (HarvestWatch™ DCA); *c*) DCA with respiratory quotient (RQ) 1.5; *d*) RQ 2.0 DCA. The CO₂ partial pressure for CA and all DCA conditions were maintained at 0.7 kPa. All treatments were stored in two temperatures, 1.0°C (±0.2) and 3.0°C (±0.2). The fruits were stored during eight month and evaluated after more seven days at 20°C.

4.1.3.2.2 Ethanol application experiment

In order to verify the isolated effect of ethanol on the fruit quality this second experiment was performed. Fruit for this experiment were collected after 6 months CA storage (1.2 kPa O₂ and 0.6 kPa CO₂) at 1°C. Immediately after the storage rooms opening 0, 50, 100, 250, 500 or 1000 µL L⁻¹ ethanol was injected once in a sealed 22 L jars, for 24 hours, containing the 20 fruits from each repetition. Fruits were maintained in air at 20°C during seven days before quality evaluation. Three replications for each dose were used.

4.1.3.3 Temperature and relative humidity control

Temperature was controlled by thermostats and checked daily by bulb mercury thermometers with a 0.1°C resolution inserted in the fruits flesh, that were stowed in the storage rooms. The relative humidity was monitored by using psychrometers, with mercury thermometers, within the storage rooms and maintained at 96%±2%.

4.1.3.4 Gases control

The apples were stored for 30 days in cold storage in order to delay the controlled atmosphere to reduce “Braeburn browning disorder” as recommended by Elgar et al. (1998). After that, the O₂ partial pressure was reduced through flushing the storage rooms atmosphere with nitrogen until it reached the pre-established concentration. For DCA conditions the O₂ was reduced until 0.7 kPa and thereafter the decrease was resulted from the respiration process. The CO₂ partial pressure was reached obtained by the injection of this gas until the desired concentration.

4.1.3.4.1 CA storage rooms

Due to the respiratory process of fruit, O₂ consumption and CO₂ production occurs and in order to monitor and correct the gas concentration within the storage rooms, the Isollcel® device for automatic control was used. This equipment corrected the O₂ concentration by injecting atmospheric air and absorbed the excess CO₂ through the air circulation within a CO₂ absorber containing potassium hydroxide until the desired gases concentrations was reached.

4.1.3.4.2 HarvestWatch™ DCA storage rooms

The HarvestWatch (HW) DCA was monitored according instruction from Prange et al. (2007). HarvestWatch system (Satlantic Inc., Halifax, NS) was used to monitor chlorophyll fluorescence from six apples during fruit exposure to low O₂. Fruit cooled to 1.0°C or 3.0°C were placed in a perforated plastic container with the fluorescence sensors attached to the inside of the container top. The container was placed inside a CA room, the storage rooms was sealed, and the door covered with black plastic to exclude external light. The fluorescence monitoring system was activated and then O₂ was reduced to 0.7 kPa and subsequently, by reduction due to the respiration until a change in fluorescence was detected. The lower O₂ set point was determined by identifying the O₂ where an inflection in the fluorescence signal was detected then increasing the O₂ by 0.2 kPa as a safety factor. Chlorophyll fluorescence was monitored at one hour intervals for the entire storage period during the experiment.

4.1.3.4.3 Respiratory quotient DCA storage rooms

Respiratory Quotient (RQ) DCA conditions were determined twice a week during the eight month of storage. For RQ determination, O₂ and CO₂ were measured and soon after the storage rooms were tightly closed. After 12 hours the gas level was measured again. The RQ was calculated with the ratio of the CO₂ released with the O₂ consumed in the time of 12 hours. If the calculated RQ was higher than the pre-established, O₂ value was increased in order to reduce fermentation and RQ. If the calculated RQ was lower than pre-established RQ, the O₂ value was decreased to allow increase fermentation and RQ.

4.1.3.5 Biochemical and physical evaluations

The parameters evaluated were: a) Titratable acidity (TA): determined by the titration with 0.1N NaOH of a solution with 10mL of juice diluted in 100mL distilled water, until pH 8.1 was reached, data was expressed in meq 100 mL⁻¹; b) Soluble solids: determined by refractometry and expressed in °Brix;

c) Pyruvate decarboxylase (PDC) and alcohol dehydrogenase (ADH) activities was measured according Saquet; Streif (2008): One hundred milligrams of lyophilized powdered tissue taken from 15 apples was homogenized in 500 µl of extraction solution containing 85

mM 2-(N-morpholino) ethane-sulfonic acid (MES) buffer, pH 7.5, 5 mM dithiothreitol (DTT), 1% (w/v) polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) and 20 μL triton X-100. The homogenate was kept below 4°C for 20 min and stirred continuously. The samples were then centrifuged at 14,000 g for 20 min at 4°C. The supernatant was used as a crude enzyme extract. These steps were repeated once.

To assay ADH, a 150 μL aliquot of the crude extract was added to a reaction mixture consisting of 2.65 mL of a 0.15 mM NADH solution in MES buffer (pH 6.5) and 200 μL of a 80 mM acetaldehyde. The PDC activity was measured in a reaction mixture with 2.25 mL containing 5 mM thiamine pyrophosphate with 50 mM MgCl_2 in MES buffer (pH 6.5); 300 μL of 0.85 mM NADH and 180 units mg^{-1} ADH; and 300 μL of 50 mM Na-pyruvate. To this solution 150 μL of crude extract was added. For both PDC and ADH, activity was measured by following spectrophotometrically the decrease in absorbance at 340 nm over time, due to NADH oxidation. Activity was defined as the decrease in absorbance at 340 nm min^{-1} , and the results were expressed as $\Delta \text{Abs. } 100\text{mg FW}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

d) Acetaldehyde, ethanol and ethyl acetate measured according Saquet; Streif (2008): fermentation products were analyzed by the headspace technique. For the measurements, 10 mL juice in an 20 mL airtight flask were warmed up to 65°C for 30 min and 1 mL of headspace gas was injected into a Fisons 3000 Series gas chromatograph fitted with a Porapaq Q column at 150°C and a flame ionisation detector (FID) at 180°C. Concentrations were calculated from the peak area using standard solutions of the respective products.

e) Ethylene synthesis: determined through the stowage of 4 fruits in a 4 liters jars, that was hermetically sealed for an approximate time of one hour after which two aliquots of each jar were drawn and injected into a Carlo Erba, Fractovap Series 2150 gas chromatograph, equipped with a flame ionization detector (FID) and a stainless Steel, 0.9m x 1/8" filled with activated alumina, 60 mesh column. Injector and oven temperature were 175°C and 100°C, respectively, being the data expressed in $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$;

f) ACC oxidase enzyme activity: determined according to the methodology proposed by Bufler (1986). ACC oxidase activity was determined in 3 g skin samples extracted from fruit equatorial region, from each experimental unit; these samples were immediately dipped into a solution containing 0.1 mol L^{-1} ACC and 10 mmol L^{-1} MES buffer [2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid] at pH 6.0; after 30 min, samples were transferred to hermetic 50 mL syringes, to which 1 mL CO_2 was added. The ethylene concentration in the syringes was measured by gas chromatography (like described above) after 30 min, and the results were expressed as $\eta\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

g) Respiratory rate: four fruits from each repetition were placed in airtight bottle at 20°C and continuously ventilated with air. The CO₂ released was measured using a CO₂ infrared analyzer (Hartmann and Braun GmbH, Germany). The data was expressed in mL CO₂ kg⁻¹ h⁻¹;

h) Membrane Permeability: tissue electrolyte leakage was used as an indirect measure of membrane damage. Fifteen discs (about 8g) with 10 mm diameter and 3 mm of thickness were floated on 25 mL of 0.4 M mannitol. The electrolyte content in the solution was measured using a conductivimeter (Hama Instruments Ltd., El-Hama, Israel) after 3 h of incubation in water bath at 25°C with continuous shaking. Total electrolyte content was determined in the same way after boiling for 30 min and more 15h storage at -38°C. Results were expressed as percentage of electrolyte leakage;

i) β-Galactosidase activity: determined according to the methodology proposed by apples Kitemann (2012) to evaluate β-Galactosidase activity 4-Nitrophenyl β-D-Galactopyranoside (PNP-Gal) (Sigma-Aldrich) was used as substrate. 600 μL of 10 mM PNP-Gal solution (pH 4.5) was put in a cuvette and after 700 μL enzyme extract was added. The blank was prepared by mixing 600 μL of PNP-Gal with 700 μL of an acetated buffer in a 50 mM concentration at pH 4.5 instead of enzyme extract. Then the solutions were incubated during 45 minutes at 40°C. Then a 300 μL aliquot was withdrawal and dissolved in 1000 μL of Na₂CO₃ at 0.4 M. Next, the absorbance was read in a cuvette (Plastibrand, 1.5ml halbmicro, PMMA) at a wave length of 410 nm. Finally, the concentration of free ρ-nitrophenol will be estimated from the previously plotted a standard curve in pH 4.5 and expressed as free ρ-Nitrophenol 100 mg Dry Weight⁻¹ h⁻¹;

j) Flesh firmness (FF): FF was measured from the equatorial region of the apple between the green/yellow (shaded side) and red blush (sun exposed side). The skin was removed and FF determined in Newtons (N) using a semi automatic penetrometer (Guess Fruit Texture Analyzer; South Africa) with an 11 mm diameter probe.

4.1.3.6 Statistical analysis

An analysis of variance (ANOVA) was performed for all the parameters evaluated. ANOVA significant parameters were compared through the Tukey test at a 5% probability of error. The data was tested regarding its normality and errors homogeneities by the Lilliefors and Bartlett test, respectively. Regression analysis was used to correlate ethanol application with its relationship to quality parameters. Coefficients of determination (R^2) and the

significance of regression models were calculated. Finally, the Pearson's correlation matrix was calculated in order to correlate the firmness with the other parameters. The software Sisvar and Action for Excel was used to run the statistical analysis.

4.1.4 Results

There was no interaction between storage temperature and CA and DCA conditions for titratable acidity and soluble solids content. At 3°C the acids and soluble solids content was lower after eight month storage and more seven days at 20°C in comparison to 1°C (Table 1). CA conditions maintained the highest acids and soluble solids content. In DCA conditions the increase in the fermentation rate, as a mean of higher RQ, resulted in lower SS (Table 1).

Table 1 – Titratable acidity (TA) and soluble solids (SS) of 'Braeburn' apples after eight months at different DCA conditions and temperature plus seven days shelf life at 20°C.

	TA (meq 100mL ⁻¹)			SS (°Brix)		
	1°C	3°C	Mean	1°C	3°C	Mean
I.A.**		8.9			11.3	
CA***	4.2	3.5	3.8 a*	11.9	11.9	11.9 a
HW DCA	3.7	3.2	3.4 b	11.8	11.4	11.6 b
RQ1.5 DCA	3.8	3.3	3.5 ab	11.6	11.4	11.5 b
RQ2 DCA	4.0	3.3	3.6 ab	11.4	11.0	11.2 c
Mean	3.9 A	3.3 B		11.7 A	11.4 B	
CV (%)		5.72			1.36	

*Means followed by equal letters, lowercase in the columns and uppercase in the lines, do not differ by Tukey's test, at 5% probability.

**Initial analysis took place before fruit storage.

***CA was 1.2 kPa O₂/0.7 kPa CO₂; CO₂ for DCA was <0.7 kPa.

Higher storage temperature resulted in reduced PDC activity, however, no effect on CA and DCA conditions was measured. The reduced PDC activity in fruit stored at 3°C only reduced the production of acetaldehyde (AA) from the RQ2.0 DCA (Table 2). However the RQ-based DCA induced higher AA production in the fruit stored at 1°C or even at 3°C (Table 2). The fruit stored in CA condition showed the lowest AA production with no difference with the HW DCA (Table 2). The same trend was observed for PDC activity, ethanol and ethyl acetate production, which CA condition maintained the lowest and RQ2.0 DCA the highest fermentation rate (Table 3). At 1°C storage decrease the ADH activity on fruit stored in HW DCA and RQ1.5 DCA, however this reduction on the enzyme activity had no effect on ethanol

production reduction. Higher temperature reduced the ethanol and ethyl acetate measurement on RQ-based DCA (Table 3), probably due to the higher volatilization at 3°C than at 1°C.

Table 2 – Pyruvate decarboxylase activity (PDC) and acetaldehyde production from ‘Braeburn’ apples after eight months at different DCA conditions and temperature plus seven days shelf life at 20°C.

	PDC (Δ Abs. 100mg FW ⁻¹ h ⁻¹)			Acetaldehyde (μ L L ⁻¹)		
	1°C	3°C	Mean	1°C	3°C	Mean
I.A.**		-0.87			0.0	
CA***	-1.4	-1.2	-1.3 a*	0.3 bA	1.4 cA	0.9
HW DCA	-1.5	-1.2	-1.4 a	2.8 bA	2.9 bcA	2.9
RQ1.5 DCA	-1.6	-1.3	-1.4 a	11.8 aA	8.9 abA	10.3
RQ2 DCA	-1.8	-1.6	-1.7 a	18.0 aA	13.0 aB	15.5
Mean	-1.6 A	-1.3 B		8.2	6.6	
CV (%)		19.61			44.31	

*Means followed by equal letters, lowercase in the columns and uppercase in the lines, do not differ by Tukey’s test, at 5% probability.

**Initial analysis took place before fruit storage.

***CA was 1.2 kPa O₂/0.7 kPa CO₂; CO₂ for DCA was <0.7 kPa.

The ACC oxidase activity was lower in both DCA conditions resulting in a strong reduction in the ethylene biosynthesis rate, specially at the QR-based DCA (Table 4). No clear temperature effect was observed. However, the 3°C storage reduced the respiration rate for the fruits stored under HW DCA differing from the RQ2 DCA at 3°C (Table 5).

Table 3 – Alcohol dehydrogenase activity (ADH), ethanol and ethyl acetate production from ‘Braeburn’ apples after eight months at different DCA conditions and temperature plus seven days shelf life at 20°C.

	ADH (Δ Abs. 100mg FW ⁻¹ h ⁻¹)			Ethanol (μ L L ⁻¹)			Ethyl acetate (μ L L ⁻¹)		
	1°C	3°C	Mean	1°C	3°C	Mean	1°C	3°C	Mean
I.A.**		-1.7			0.0			0.0	
CA***	-5.8 bA*	-5.7 cA	-5.8	0.0 cA	38.5 cA	19.2	0.0 bA	0.7 bA	0.4
HW DCA	-7.2 bB	-11.7 bA	-9.5	16.7 cA	55.0 cA	35.8	1.3 bA	2.4 bA	1.9
RQ1.5 DCA	-10.9 aB	-14.3 aA	-12.6	744.8 bA	309.0 bB	526.9	20.0 aA	10.9 abB	15.4
RQ2 DCA	-11.1 aA	-11.6 bA	-11.3	1149.5 aA	606.0 aB	877.8	30.3 aA	21.4 aB	25.8
Mean	-8.8	-10.8		477.8	252.1		12.9	8.9	
CV (%)		9.88			29.95			55.2	

*Means followed by equal letters, lowercase in the columns and uppercase in the lines, do not differ by Tukey’s test, at 5% probability.

**Initial analysis took place before fruit storage.

***CA was 1.2 kPa O₂/0.7 kPa CO₂; CO₂ for DCA was <0.7 kPa.

Table 4 – ACC oxidase activity and ethylene production rate from ‘Braeburn’ apples after eight months at different DCA conditions and temperature and six or seven days shelf life at 20°C.

	ACC oxidase ($\eta\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)			Ethylene ($\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$)					
				1 day at 20°C			6 days at 20°C		
	1°C	3°C	Mean	1°C	3°C	Mean	1°C	3°C	Mean
I.A.**		2.8					0.1		
CA***	195.4 aA*	201.9 aA	198.7	6.4 aA	5.3 aB	5.9	49.3	38.1	43.7 a
HW DCA	139.5 bA	70.8 bB	105.2	0.7 bA	1.5 bA	1.1	13.5	13.2	13.4 b
RQ1.5 DCA	77.2 cA	70.3 bA	73.8	0.5 bA	0.4 cA	0.4	2.9	2.7	2.8 c
RQ2 DCA	59.1 cA	45.2 bA	52.2	0.8 bA	0.6 cA	0.7	2.2	1.2	1.7 c
Mean	117.8	97.1		2.1	1.9		17.0 A	13.8 A	
CV (%)		23.5			12.8			25.85	

*Means followed by equal letters, lowercase in the columns and uppercase in the lines, do not differ by Tukey's test, at 5% probability.

**Initial analysis took place before fruit storage.

***CA was 1.2 kPa O₂/0.7 kPa CO₂; CO₂ for DCA was <0.7 kPa.

The decrease in the ethylene biosynthesis was also reported in the ethanol application experiment, which was reduced until the 500 $\mu\text{L L}^{-1}$ doses application (Figure 1A). The effect of the ethanol on the ACC oxidase activity continued until the highest ethanol doses (Figure 1B). Respiration rate was also decreased with ethanol application (Figure 1C) probably, due to the reduced damage on the cell membrane, as a mean of decreased membrane permeability with increased ethanol concentration (Figure 1D). The reduced respiration rate, ACC oxidase activity and ethylene production kept higher green ground color of the fruit skin (See Hue angle - Figure 1E and F).

Table 5 – Respiration rate from ‘Braeburn’ apples after eight months at different DCA conditions and temperature and more six days shelf life at 20°C.

	Respiration rate ($\text{mL CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$)					
	1 day at 20°C			6 days at 20°C		
	1°C	3°C	Mean	1°C	3°C	Mean
I.A.**				4.7		
CA***	5.59 bA*	6.40 aA	6.00	5.35 aA	5.76 abA	5.56
HW DCA	8.37 aA	5.22 aB	6.79	7.78 aA	4.36 bB	6.07
RQ1.5 DCA	8.26 aA	6.18 aB	7.22	6.59 aA	5.15 abA	5.87
RQ2 DCA	8.12 aA	7.22 aA	7.67	6.94 aA	7.13 aA	7.04
Mean	7.58	6.25		6.67	5.60	
CV (%)		15.46			19.09	

*Means followed by equal letters, lowercase in the columns and uppercase in the lines, do not differ by Tukey's test, at 5% probability.

**Initial analysis took place before fruit storage.

***CA was 1.2 kPa O₂/0.7 kPa CO₂; CO₂ for DCA was <0.7 kPa.

Ethanol application induced an increased acetaldehyde, ethanol and ethyl acetate production, and alcohol dehydrogenase activity (Figure 2 A, B, C and D). However, the highest doses (1000 µL L⁻¹) cause higher β-galactosidase activity (Figure 2E), but with no effect on flesh firmness (data not shown) and even an increase in flesh browning (Figure 2F).

No effect of the storage temperature was observed on the membrane permeability, however, a significant effect of the DCA conditions was induced (Table 6). On the RQ2 DCA treatment, which led in higher fermentation rate (Table 2 and 3), was observed the lowest membrane permeability (Table 6), showing the same effect as in the ethanol treatment experiment (Figure 1D). The highest electrolyte leakage was from the fruits stored on CA condition which not differ from those stored at HW DCA (Table 6).

Table 6 – Membrane permeability, β-galactosidase activity and flesh firmness of ‘Braeburn’ apples after eight months at different DCA conditions and temperature plus seven days shelf life at 20°C.

	Membrane Permeability (%)			β-Galactosidase (µmol pnp 100mg FW ⁻¹ h ⁻¹)			Flesh firmness (N)		
	1°C	3°C	Mean	1°C	3°C	Mean	1°C	3°C	Mean
I.A.**		37.1			0.72			90.3	
CA***	37.0	36.8	36.9 a*	0.46 aA	0.26 aB	0.36	70.1 bA	69.8 cA	69.9
HW DCA	36.1	36.1	36.1 ab	0.27 bA	0.09 bB	0.18	67.6 cB	79.3 bcA	73.5
RQ1.5 DCA	34.4	33.5	33.9 bc	0.18 cA	0.09 bB	0.13	83.2 aA	85.5 aA	84.4
RQ2 DCA	35.3	31.6	33.4 c	0.25 bA	0.10 bB	0.18	77.9 bB	83.5 abA	80.7
Mean	35.7 A	34.5 A		0.29	0.13		74.7	79.5	
CV (%)		4.83			12.44			3.24	

*Means followed by equal letters, lowercase in the columns and uppercase in the lines, do not differ by Tukey's test, at 5% probability.

**Initial analysis took place before fruit storage.

***CA was 1.2 kPa O₂/0.7 kPa CO₂; CO₂ for DCA was <0.7 kPa.

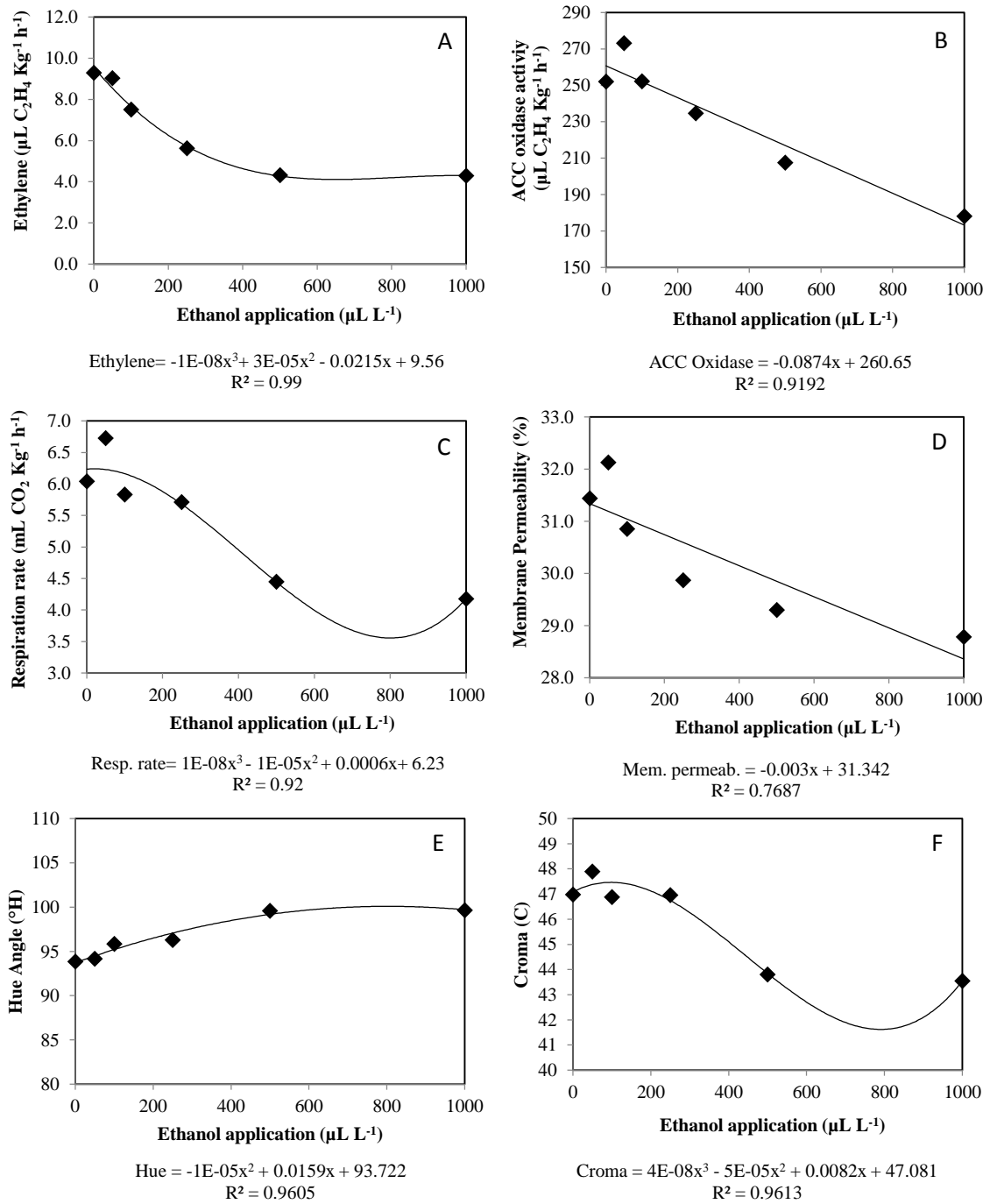


Figure 1 – ‘Braeburn’ apples treated with different ethanol doses after 6 months controlled atmosphere storage (1.2kPa O₂ and <0.7kPa CO₂) and exposed for more 7 days at shelf life at 20°C before evaluation.

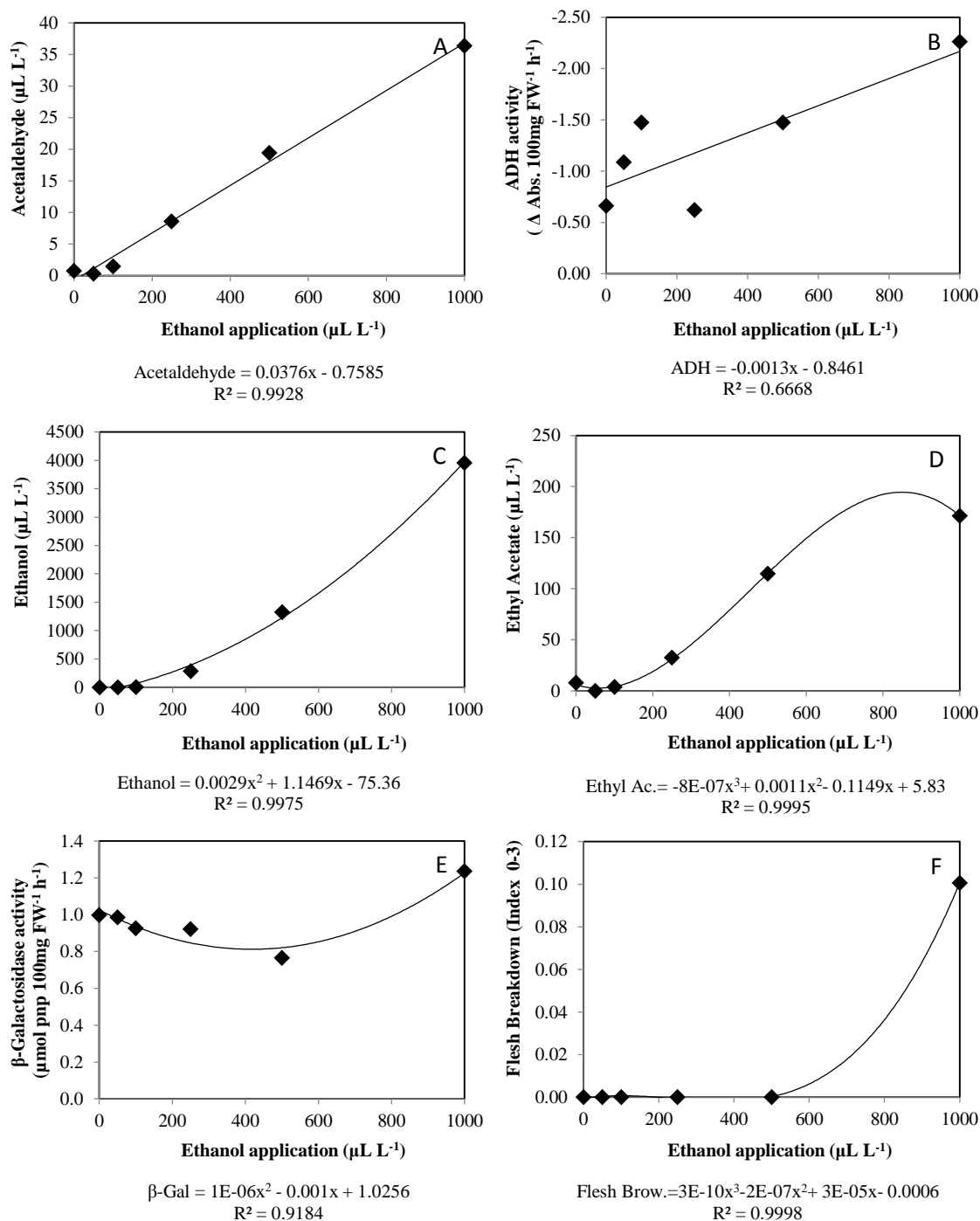


Figure 2 – ‘Braeburn’ apples treated with different ethanol doses after 6 months controlled atmosphere storage (1.2kPa O₂ and <0.7kPa CO₂) and exposed for more 7 days at shelf life at 20°C before evaluation.

The β -galactosidase activity was significantly reduced with 3°C storage, which in turn maintains higher flesh firmness (Table 6). DCA storage, with both stress monitoring systems, also reduced β -galactosidase activity (Table 6). The flesh firmness was kept highest at RQ1.5 DCA in both storage temperatures. In RQ2.0 DCA at 1°C a flesh softening occurred (Table 6).

The flesh firmness is positively correlated by the Pearson's correlation matrix with the fermentation products (acetaldehyde, ethanol and ethyl acetate) and fermentation enzyme activity (ADH) and negatively correlated with β -galactosidase and ACO activity and ethylene biosynthesis rate (Table 7). The ethylene production and ACO activity was always negatively correlated with the enzyme activity and product of the fermentation pathway (Table 7).

The cell membrane was not damaged with the increase in the fermentation products, since these products correlated negatively with the membrane permeability (Table 7). As higher the membrane permeability, β -galactosidase and ACO activity lower was the flesh firmness (Table 7).

Table 7 – Pearson correlation matrix among physical, chemical and biochemical parameters from 'Braeburn' apples after eight months storage more seven days shelf life at 20°C.

Pearson correlation matrix	TA	SS	β -Gal	FF	MP	PDC	ADH	EtOH	AA	EtAC	ACO	Ethyl.	Resp.
TA	1	0.44*	0.75**	-0.41*	ns	0.38*	-0.47**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
SS		1	0.70**	-0.71**	0.53**	ns	-0.69**	-0.53**	-0.60**	-0.53**	0.72**	0.72**	ns
β -Gal			1	-0.73**	0.50**	ns	-0.79**	ns	-0.37*	ns	0.72**	0.76**	ns
FF				1	-0.60**	ns	0.87**	0.54**	0.57**	0.52**	-0.73**	-0.69**	ns
MP					1	ns	-0.53**	-0.42*	-0.45*	-0.46**	0.56**	0.57**	ns
PDC						1	ns	0.55**	0.56**	0.54**	ns	ns	0.54**
ADH							1	0.49**	0.56**	0.49**	-0.82**	-0.80**	ns
EtOH								1	0.95**	0.97**	-0.65**	-0.65**	ns
AA									1	0.97**	-0.70**	-0.70**	ns
EtAC										1	-0.68**	-0.64**	ns
ACO											1	0.85**	ns
Ethyl.												1	ns
Resp.													1

*0.05 significance level; **0.01 significance level; ns: not significant

TA: Titratable acidity; SS: soluble solids; FF: Fresh firmness; MP: membrane permeability; ACO: ACC oxidase activity; EtOH: Ethanol; AA: acetaldehyde; EtAC: Ethyl acetate; PDC: pyruvate decarboxylase; ADH: alcohol dehydrogenase; β -Gal: β -galactosidase activity; Et. 6d: Ethylene biosynthesis at 6 days in shelf life; Resp. 6d: respiration rate at 6 days in shelf life;

4.1.5 Discussion

4.1.5.1 DCA and ethanol application effect on fruit quality

It is well known that ethylene widely influence the fruit quality, specially, related to firmness loss by controlling the amount and activity of the pectin degrading enzymes

(TOIVONEN and BRUMMELL, 2008; Harb et al., 2012). According to Gwanpua et al. (2012), 'Braeburn' apples stored in CA conditions with 1.0kPa O₂ and 0.7kPa CO₂, the ethylene production was lower than those stored with higher oxygen levels, which resulted in lower synthesis of pectin degrading proteins, and so lower firmness loss. The firmness retention in apples stored at very low oxygen partial pressure (dynamic controlled atmosphere and lesser than 0.5kPa) which induced the fermentation pathway was not elucidated. Therefore, this study was conducted in order to bring up information about apple firmness behavior after storage in a very low oxygen concentration. The O₂ was dynamically controlled using the respiratory quotient in a completely new DCA methodology.

After eight months storage the decrease in the acidity and, specially, soluble solids of apples stored in DCA conditions (Table 1) showed that higher glycolysis rate occurred to supply energy for the cells due to the induction of the fermentation way which is far lesser efficient in ATP production than the oxidative respiration (HO et al., 2013). The increase in the fermentation way, shown in table 2 and 3, as a mean of acetaldehyde, ethanol and ethyl acetate production, as well as alcohol dehydrogenase activity, was always higher in DCA conditions specially for RQ2.0 DCA, in which the oxygen partial pressure was the lowest in the storage room, than in CA storage rooms. Thus, the reduced sugar content is a result as a way to feed the glycolysis and consequently the fermentation way to produce ATP in a substrate level. The soluble solids correlate negatively with the ethanol concentration (-0.53 with $P < 0.01$) (Table 7).

The increase in fermentation products resulted in a decrease in the ACC oxidase activity and, therefore, lower ethylene biosynthesis rate (Table 4), with little effect on respiration rate (Table 5), and lower ion leakage in the RQ DCA conditions (Table 6). Asoda et al. (2009) shown that ethanol vapor treatment on broccoli florets might suppress the activities of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase and ACC oxidase and the expression of *BO-ACO1*, *BO-ACO2*, and *BO-ACSI* suppressing ethylene responsiveness as well as ethylene biosynthesis. In addition, Liu et al. (2012) showed that exogenous ethanol treatments in oriental sweet melons stored at 24°C significantly reduced internal ethylene concentrations. Despite the effect on ethylene, Mori et al. (2009) suggests also that ethanol reduce substances and enzyme activities associated with the ascorbate-glutathione cycle, which in turn, reduce oxidative stress contribute to the suppression of senescence in ethanol vapor-treated broccoli.

To prove that the effect on the decrease in ethylene biosynthesis is due to the combined effect of low oxygen and ethanol concentration, and not only due the low O₂ effect, it was conducted a second experiment in which the 'Braeburn' apples were stored in air conditions

with ethanol application. In this experiment ethanol application until $500 \mu\text{L L}^{-1}$ caused a reduction in the ACC oxidase activity, ethylene production rate, respiration rate and membrane permeability, maintaining higher green ground color and reduced β -galactosidase activity (Figure 1 and 2). The flesh firmness was not affected in this experiment, probably because of the short time between ethanol application and quality evaluation.

The ethanol content correlated negatively with membrane permeability, ACC oxidase activity, and ethylene production rate (Table 7) resulting in low membrane damage and β -galactosidase activity, which is the main pectin degrading enzymes in apples (KITTEMANN et al. 2013). Avocado fruit treated with acetaldehyde inhibit the activity of polygalacturonase, endoglucanase and β -galactosidase, which resulted in lesser firmness loss (PESIS et al., 1998). Gene expression and activity of β -galactosidase and α -L-arabinofuranosidase are thought to be ethylene-dependent since the activity decreased with the decreased ethylene production (ORTIZ et al., 2011). In the DCA conditions, higher ethanol production decreased the ethylene biosynthesis (Table 7; $R=-0,65$), which in turn reduced the β -galactosidase activity (Table 7; $R=0,76$). Ortiz et al. (2011) also observed decreased β -galactosidase activity for ULO-stored 'Golden Reinders' apples. As in avocado reported by Pesis et al. (1998), the lower enzyme activity in 'Braeburn' apples stored in RQ1.5 DCA after long-term storage results in the higher flesh firmness maintenance. Lafer (2008) also reported lesser flesh softening in 'Braeburn' apples stored in DCA. This author found that the firmness in HW-DCA stored apples was comparable to CA plus 1-MCP treatments. The HW-DCA combined with 1-MCP maintained the firmness for about 100% and no firmness reduction was observed during storage.

The RQ2.0 DCA condition resulted in a high fermentation rate probably causing cell damage (Table 6). This result was also observed with $1000 \mu\text{L L}^{-1}$ ethanol application that caused flesh breakdown and induced the β -galactosidase activity again (Figure 2), which finally led to flesh softening (Table 6).

With the results shown and discussed in this work, it can be hypothesized that the ethanol production has a clear effect on the 'Braeburn' apple flesh firmness retention. In this case, the respiration quotient-based DCA effect on this quality maintenance is not only because the extreme oxygen level reduction, however, a combined effect of ethanol and oxygen starvation.

4.1.5.2 Storage temperature effect on fruit quality

The storage temperature had a significantly effect on the fruit quality maintenance. Generally, the recommendation for the storage temperature for 'Braeburn' apples in CA conditions ranged from 0.5 to 1.5°C (LAFER, 2008). However, in order to reduce the costs of electric energy in the storage chain, this work tested the 1°C, as a standard temperature, and compared them with 3°C. Few works were done with the objective to save energy in the apple storage chain. Most of them focused only the fruit quality and do not consider the energy cost during the fruit storage. According to Mattheis (2008), the reasons for use of low storage temperature are more likely associated with optimizing fruit quality, and to reduce the risk of storage disorders, rather than to achieve any potential energy saving. However, the energy cost are becoming increasing in last few years. Therefore, it is very important save energy in order to reduce storage costs and increase the sustainability of these systems.

The results showed that 'Braeburn' apples could be stored under 3°C even in CA storage rooms with no differences with the apples stored at 1°C. However, the apples stored in DCA condition, that mean, in very low oxygen levels, the 3°C storage temperature resulted in better fruit quality maintenance after eight months storage, showing a strong interaction between extremely low O₂ levels and higher temperature. According McCormick et al. (2010 and 2012) it was possible to save about 35% of energy if the storage temperature was increased from 1.5 to 4°C.

The better fruit quality maintenance in higher temperature associated with DCA conditions without 1-MCP application was surprising. The extremely low oxygen concentration in the DCA conditions raise the optimal temperature to 3°C instead of the commonly used 1°C. At 1°C, associated with the DCA conditions, the apples accumulated higher ethanol, acetaldehyde and ethyl acetate concentration than at 3°C (Table 2 and 3) which probably might cause higher cell damage and, therefore, firmness loss (Table 6).

4.1.6 Conclusion

'Braeburn' apples kept at respiratory quotient of 1.5 in a dynamic controlled atmosphere storage maintain higher flesh firmness after eight months storage plus seven days in shelf life at 20°C.

Storage temperature of 3°C cause lower cell damage maintaining higher flesh firmness and, therefore, it can be used to store 'Braeburn' apples in a safe temperature and also reduce energy for refrigeration.

Ethanol produced by the fruit or applied externally, had a high effect on the apple flesh firmness maintenance during and after storage.

4.1.7 Acknowledgements

We would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the Sandwich Doctorate fellowship, to Mrs. Vollmar, Slodczyk, Sonnentag, Stark and Wirsing for their grateful help in the labor analyses and for Competence Center for Fruit Production - Lake Constance in Germany (KOB) for the financial support for the development of this work.

4.1.8 References

ASODA, T.; TERAI, H.; KATO, M.; SUZUKI, Y. Effects of postharvest ethanol vapor treatment on ethylene responsiveness in broccoli. **Postharvest Biology and Technology**, v.52, p.216-220, 2009.

BOERSIG, M.R.; KADER, A.A.; ROMANI, R.J. Aerobic-anaerobic respiratory transition in pear fruit and cultured pear fruit cells. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.113, p.869-873, 1988.

BUFLER, G. Ethylene-promoted conversion of 1-aminocyclopropene-1-carboxylic acid to ethylene in peel of apple at various stages of fruit development. **Plant Physiology**, v.80, p.539-543, 1986.

ELGAR, J.H.; BURMEISTER, D.M.; WATKINS, C.B. Storage and handling effects on a CO₂-related internal browning disorder of 'Braeburn' apples. **HortScience**, v.33, p.719-722, 1998.

GASSER, F.; EPPLER, T.; NAUNHEIM, W.; GABIOUD, S.; NISING, A. B. Dynamic CA storage of apples: monitoring of the critical oxygen concentration and adjustment of optimum conditions during oxygen reduction. **Acta Horticulturae**, v796, p.69-76, 2010.

GWANPUA, S.G.; VERLINDEN, B.E.; HERTOOG, M.L.A.T.M.; BULENS, I.; VAN de POEL, B.; VAN IMPE, J.; NICOLAI, B.M.; GEERAERD, A.H. Kinetic modeling of firmness breakdown in 'Braeburn' apples stored under different controlled atmosphere conditions **Postharvest Biology and Technology**, v.67, p.68-74, 2012.

HARB, J.; GAPPER, N.E.; GIOVANNONI, J.J.; WATKINS, C.B. Molecular analysis of softening and ethylene synthesis and signaling pathways in a non-softening apple cultivar, 'Honeycrisp' and a rapidly softening cultivar, 'McIntosh'. **Postharvest Biology and Technology**, v.64, p.94-103, 2012.

HO, Q.T.; VERBOVEN, P.; VERLINDEN, B.E.; SCHENK, A.; NICOLAÏ, B.M. Controlled atmosphere storage may lead to local ATP deficiency in apple. **Postharvest Biology and Technology**, v.78, p.103-112, 2013.

KITTEMAN, D.; STREIF, J.; NEUWALD, D. A.; TREUTTER, D. Activity of cell wall degradation enzymes and changes of pectin structures in cell wall of two apple varieties with different softening characteristics. XI International Controlled and modified atmosphere Research Conference, **Abstract** , 2013.

KITTEMANN, D. **Untersuchungen zu Fruchtfleischfestigkeit und Zellwandabbau von Apfelfrüchten während der Lagerung unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses von Ethylen**. 2012. 242p. Ph.D Thesis. Technische Universität München, München, 2012.

LAFER, G. Storability and fruit quality of 'Braeburn' apples as affected by harvest date, 1-MCP treatment and different storage conditions. **Acta Horticulturae**, v.796, p.179-184, 2008.

LEE, J.; MATTHEIS, J.P.; RUDELL, D.R. Antioxidant treatment alters metabolism associated with internal browning in 'Braeburn' apples during controlled atmosphere storage. **Postharvest Biology and Technology**, v.68, p.32-42, 2012.

LIU, W. W.; QI, H.Y.; XU, B.H.; LI, Y.; TIAN, X.B.; JIANG, Y.Y.; XU, X.F.; LV, D.Q. Ethanol treatment inhibits internal ethylene concentrations and enhances ethyl ester production during storage of oriental sweet melons (*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino). **Postharvest Biology and Technology**, v.67, p.75-83, 2012.

LOULAKAKIS, C. A.; HASSAN, M.; GERASOPOULOS, D.; KANELIS, A.K. Effects of low oxygen on in vitro translation products of poly(A)⁺ RNA, cellulase and alcohol dehydrogenase expression in preclimacteric and ripening-initiated avocado fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.39, p.29-37, 2006.

MATTHEIS, J. P. How 1-methylcyclopropene has altered the Washington state apple industry. **HortScience**, v.43, p.99-101, 2008.

McCORMICK, R.; NEUWALD, D. A.; STREIF, J. A case study: Potential energy savings using 1-MCP with 'Gala' apples in commercial CA storage. **Acta Horticulturae**, v.877, p.323-326, 2010.

McCORMICK, R.J.; NEUWALD, D.A.; STREIF J. Commercial apple CA storage temperature regimes with 1-MCP (SmartFresh TM): Benefits and Risiks. **Acta Horticulturae**, v.934, p.263-270, 2012.

MORI, T.; TERAJ, H.; YAMAUCHI, N.; SUZUKI, Y. Effects of postharvest ethanol vapor treatment on the ascorbate–glutathione cycle in broccoli florets. **Postharvest Biology and Technology**, v.52, p.134-136, 2009.

NEUWALD, D.A.; KITTEMANN, D.; STREIF, J. Possible prediction of physiological storage disorders in 'Braeburn' apples comparing fruit of different orchards. **Acta Horticulturae**, v.796, p.211-216, 2008.

ORTIZ, A.; GRAELL, J.; LARA, I. Cell wall-modifying enzymes and firmness loss in ripening 'Golden Reinders' apples: A comparison between calcium dips and ULO storage. **Food Chemistry**, v.128, n.4, p.1072-1079, 2011.

PESIS, E. The role of the anaerobic metabolites, acetaldehyde and ethanol, in fruit ripening, enhancement of fruit quality and fruit deterioration. **Postharvest Biology and Technology**, v.37, p.1-19, 2005.

PESIS, E.; FAIMAN, D.; DORI, S. Postharvest effects of acetaldehyde vapour on ripening-related enzyme activity in avocado fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.13, p.245–253, 1998.

PRANGE, R. K.; DeLONG, J. M.; HARRISON, P.; McLEAN, S.; SCRUTTON, J.; CULLEN, J. Method and apparatus for monitoring a condition in chlorophyll containing matter. **U.S. Patent**, n.WO/2002/006795, 2007.

SAQUET, A. A.; STREIF, J. Fermentative metabolism in 'Jonagold' apples under controlled atmosphere storage. **European Journal of Horticultural Science**, v.73, p.43-46, 2008.

STREIF, J. Ripening management and postharvest fruit quality. **Acta Horticulturae**, v.858, p.121-130, 2010.

TOIVONEN, P.M.A.; BRUMMELL, D.A. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v.48, p.1–14, 2008.

5 ARTIGO 3

5.1 Armazenamento de maçãs ‘Royal Gala’ em atmosfera controlada dinâmica com uso de quociente respiratório associado ao 1-metilciclopropeno em diferentes temperaturas

Anderson Weber^{1*}; Auri Brackmann¹

¹ Postharvest Research Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, 1000, Brazil. * e-mail: anweba@gmail.com

5.1.1 Resumo

Maçãs não armazenadas em temperatura e condição atmosférica adequadas podem apresentar alta taxa metabólica que por sua vez pode resultar em perda mais rápida da qualidade pós-colheita. Uma técnica recente para armazenamento de maçãs é a atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pelo sistema HarvestWatchTM (ACD HW). O objetivo deste trabalho foi avaliar um novo sistema de ACD com monitoramento do quociente respiratório (ACD QR) e, comparar este, com a ACD HW e com a atmosfera controlada convencional (AC). Além disso, avaliar o efeito da associação de 1-metilciclopropeno (1-MCP) ou temperatura de 1,5°C à ACD QR sobre a qualidade de maçãs ‘Royal Gala’ e redução do consumo de energia elétrica. A pressão parcial de oxigênio foi controlada usando o sistema HarvestWatchTM ou o quociente respiratório (1,5 ou 2,0), associado ou não à aplicação de 1-MCP ou a temperatura de 1,5°C. Os dois métodos de ACD foram comparados entre si e com a AC convencional (1,2 kPa O₂ e 2,0kPa CO₂). Todas as frutas foram armazenadas por nove meses na temperatura de 1°C, com exceção das frutas armazenadas no ACD QR2/1,5°C que foram submetidas à 1,5°C. Após o armazenamento, as frutas ainda foram expostas por 7 dias a 20°C. A ACD HW manteve as maçãs com melhor qualidade que às armazenadas em AC após longo período de armazenagem, entretanto, a ACD QR1,5 resultou em maçãs com a maior firmeza após o armazenamento. A aplicação de 1-MCP associada ao armazenamento em ACD QR1,5 resultou em menor taxa respiratória e produção de compostos da fermentação e, conseqüentemente, manteve maior teor de sólidos solúveis após os nove meses de armazenamento e mais sete dias de exposição a 20°C, entretanto, sem efeito sobre a firmeza de polpa se comparado ao

tratamento sem aplicação de 1-MCP. O armazenamento na temperatura de 1,5°C não causou redução da qualidade das maçãs 'Royal Gala' em atmosfera controlada dinâmica com quociente respiratório 2,0 comparado ao armazenamento a 1,0°C. Sugere-se que a temperatura de 1,5°C seja também testada em maçãs armazenadas em ACD QR1,5.

Palavras-Chaves: etanol, aldeído acético, etileno, firmeza de polpa

5.1.2 Abstract

Apples that are not stored under properly temperature and controlled atmosphere (CA) may have a high metabolic rate during postharvest stage resulting in faster quality losses. One of the most recent technique for apple storage and already commercially used, is the dynamic controlled atmosphere (DCA) monitored with the HarvestWatch™ system (HW DCA). The aim of this work was to evaluate a novel method of DCA storage with the respiratory quotient (RQ DCA) monitoring and compare them with the well-established HW DCA system and CA, with or without 1-methylcyclopropene (1-MCP) application or in higher temperature (1.5°C) on the 'Royal Gala' apples quality and reduce electric energy consumption. The O₂ concentration during nine months of storage was controlled either using the respiratory quotient (RQ 1.5 and 2.0), with or without 1-MCP application or stored at 1.5°C on the one hand, or the chlorophyll fluorescence measurement, as commercially used, on the other hand. Both methods were compared with CA storage at 1.2 kPa O₂ and 2.0kPa CO₂. All fruit were stored at 1.0°C, excluding the fruits from the treatment that was stored at 1.5°C. After storage, the fruits were exposed to shelf life at 20° during seven days. Apples which were stored under HW DCA maintained better quality than those stored in CA after a long storage period, however, the RQ1.5 DCA results in apples with the highest flesh firmness after storage. The application of 1-MCP associated with RQ1.5 DCA storage resulted in lower respiratory rate and fermentation compounds production, which lead to a higher soluble solids content after nine months of storage and seven days at 20°C, however, no difference on the flesh firmness if compared with those without 1-MCP application. The temperature of 1.5°C did not result in apples with lesser quality than those stored at 1.0°C if stored QR2.0 DCA. It is suggested that 1.5°C temperature should also be tested in association with the RQ1.5 DCA.

Key-words: ethanol, acetaldehyde, ethylene, flesh firmness

5.1.3 Introdução

Maçãs ‘Royal Gala’ são armazenadas por sete a oito meses em atmosfera controlada (AC) com 1.2 kPa O₂ e 2.0 kPa CO₂ em 0,5 a 1°C (BRACKMANN et al., 2008; WEBER et al., 2011). Entretanto, as maçãs perdem firmeza da polpa durante o armazenamento e especialmente, durante o período de prateleira a 20°C. Durante o armazenamento em AC ocorrem distúrbios fisiológicos internos, como degenerescência de polpa e polpa farinácea, e externos, como escaldadura e rachadura de polpa. Para minimizar ou evitar estas alterações de qualidade das maçãs pesquisadores iniciaram o estudo da atmosfera controlada dinâmica.

As frutas são produtos vivos e, portanto, apresentam metabolismo diferenciado entre frutas de diferentes lotes, produzidas em locais diferentes, em anos com condições climáticas adversas, resultando em tamanho e concentração mineral diferente, constituição molecular e anatômica diferenciada, etc (LEE et al., 2012). Desta forma, estas frutas apresentam diferentes necessidades atmosféricas para ajustar seu metabolismo ao ponto de menor atividade metabólica. Portanto, estas variações nas frutas resultam em mudanças na constituição ideal de gases em AC para uma mesma cultivar, e mesmo, durante o período de armazenamento. Portanto, o conceito de atmosfera controlada dinâmica (ACD) foi desenvolvido para ajustar a pressão parcial de oxigênio durante todo período de armazenamento, para cada cultivar e para ano e local de produção, ou seja, o ajuste da pressão parcial de oxigênio de cada lote de maçãs armazenadas em cada câmara.

A ACD tem como princípio básico a redução da pressão parcial de oxigênio próximo ao limite mínimo, também chamado de ponto de compensação anaeróbico (PCA). Esta redução e variação é realizada pela medição da sensibilidade de cada lote ao baixo oxigênio.

O armazenamento abaixo da concentração crítica de oxigênio pode causar respiração anaeróbica excessiva que culmina com alta taxa de biossíntese de etanol, que por sua vez, pode resultar em danos às frutas (LEE et al., 2012). Desta forma, é necessário que este nível de oxigênio seja monitorado durante todo período de armazenamento. Prange et al. (2002, 2005) verificaram que a variação de oxigênio afeta a emissão de fluorescência de clorofila na epiderme de frutas. Desta forma, estes autores desenvolveram a atmosfera controlada dinâmica variando a pressão parcial de oxigênio pela medição da fluorescência de clorofila, sendo a tecnologia patenteada por Prange et al. (2007) com o nome de HarvestWatchTM. Esta tecnologia vem sendo utilizada de forma extensiva no armazenamento de maçãs nos principais países da Europa e, nos últimos anos, no Brasil, substituindo o armazenamento tradicional em atmosfera

controlada estática. O uso da atmosfera controlada dinâmica com monitoramento da fluorescência da clorofila mantém a qualidade e reduz a ocorrência de distúrbios fisiológicos em frutos armazenados (PRANGE et al., 2002; PRANGE et al., 2005; ZANELLA; CAZZANELLI, 2007). Entretanto, segundo Wright et al. (2010), a temperatura e o tempo para reduzir o O₂ em níveis críticos podem interferir na intensidade do pico de fluorescência e no limite mínimo de O₂, enquanto que o intervalo entre os escaneamentos pode interferir também na intensidade do pico. Outro fator que pode afetar o pico de emissão de fluorescência de clorofila é a variabilidade existente entre os frutos das amostras, que pode interferir no limite mínimo de O₂ detectado (WRIGHT et al., 2012).

Outro método para monitorar ACD, ainda não estudado, tampouco em uso comercial, é o controle do quociente respiratório (QR). O QR está associado ao ponto de compensação anaeróbica (PCA), ou seja, à concentração de O₂ em que a produção de CO₂ é mínima (BOERSIG et al., 1988). Desta forma, o QR identifica o ponto em que inicia a mudança da respiração aeróbica para a respiração anaeróbica e, portanto identifica o momento que a maçã está num nível crítico de produção de etanol, o qual poderá causar danos ao tecido (GASSER et al., 2010).

A temperatura de armazenamento é um dos fatores mais importantes no controle do amadurecimento de frutas durante a pós-colheita (STEFFENS et al., 2007). Entretanto, o ajuste na temperatura também requer ajuste na pressão parcial de oxigênio dentro da câmara de atmosfera controlada (WEBER et al., 2011). Segundo estes autores, aumentando a temperatura de 0,0°C para 1,0°C maior nível de oxigênio foi necessário para diminuir o dano por frio, manifestado na forma de escurecimento de polpa, em maçãs ‘Royal Gala’. Portanto, a condição atmosférica a qual as frutas são submetidas tem interação direta com a temperatura de armazenamento. A temperatura recomendada para o armazenamento de maçãs ‘Gala’ e mutantes produzidas no Brasil varia de 0,5°C (BRACKMANN et al., 2008) a 1°C (WEBER et al., 2011). Na Alemanha McCormick et al. (2012) armazenaram maçãs ‘Gala’ a 1,5°C ou 4°C associado com aplicação de 1-MCP, e verificaram que na última condição as maçãs apresentavam melhor acidez e firmeza de polpa durante 21 semanas de armazenamento. A elevação da temperatura em 2,5°C resultou em economia de 35% de energia durante a fase de armazenamento das maçãs. Entretanto, o efeito da temperatura mais elevada associada a condições de armazenamento em atmosfera controlada dinâmica, ou seja, em maçãs armazenadas sob pressão parcial de oxigênio variável e normalmente abaixo de 0,4 kPa, ainda não foi estudado.

O 1-metilciclopropeno (1-MCP) bloqueia a ação do etileno pela sua ligação ao sítio do receptor do etileno (SISLER; SEREK, 1997) que resulta também na redução da síntese de etileno (BLANKENSHIP; DOLE, 2003). Estes autores reportaram o efeito da aplicação de 1-MCP na manutenção da qualidade de frutas climatéricas, principalmente, quando aplicado até três dias após a colheita das frutas (WATKINS; NOCK, 2005). Em maçãs a aplicação de 1-MCP resulta em drástica redução da síntese de etileno, da respiração e da perda da firmeza, além de reduzir a perda de ácidos e açúcares pela redução no avanço do amadurecimento das frutas armazenadas em atmosfera refrigerada ou controlada (BLANKENSHIP; DOLE, 2003; BRACKMANN et al., 2009; WATKINS; NOCK, 2012). Entretanto, 1-MCP pode induzir a ocorrência de distúrbios fisiológicos como degenerescência de polpa (JUNG; WATKINS, 2011) e dano por alto CO₂ (ARGENTA et al., 2010). O efeito da aplicação de 1-MCP em maçãs armazenadas em pressões parciais de oxigênio extremamente baixas, como as usadas em ACD, ainda não foram estudadas.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar quocientes respiratórios para monitorar a atmosfera controlada dinâmica (DCA QR), e comparar esta condição com a atmosfera controlada dinâmica de uso comercial monitorado pelo sistema HarvestWatch™ (DCA HW) e a atmosfera controlada convencional (AC) para maçãs ‘Royal Gala’, que é uma das principais cultivares de maçã produzida no Brasil. Além disso, estudar o efeito da aplicação de 1-MCP ou associação da ACD QR em temperatura mais elevada, com o objetivo manter a qualidade da maçã e economizar energia.

5.1.4 Material e Métodos

5.1.4.1 Material vegetal e homogeneização das amostras

O experimento foi desenvolvido no Núcleo de Pesquisa em Pós-colheita da Universidade Federal de Santa Maria, RS. Para o experimento, maçãs da cultivar Royal Gala foram colhidos em um pomar comercial do município de Vacaria, RS em fevereiro de 2012.

Após a colheita as frutas foram selecionadas quanto à presença de defeitos ou danos e quanto à uniformidade de tamanho. Em seguida as unidades experimentais foram homogeneizadas e acondicionadas em minicâmaras experimentais de 233L para a aplicação dos tratamentos.

5.1.4.2 Experimento

Os tratamentos avaliados foram os seguintes: *a*) Atmosfera Controlada (AC) com 1.2 kPa O₂; *b*) Atmosfera controlada dinâmica (ACD) com monitoramento da fluorescência de clorofila pelo sistema HarvestWatch™ (ACD HW); *c*) ACD com o monitoramento do quociente respiratório em 1.5 (ACD QR 1,5); *d*) ACD QR 1,5 com aplicação 1-MCP; *e*) ACD QR 2,0; *e, f*) ACD QR 2,0 na temperatura de 1,5°C. Todas as frutas foram armazenadas na temperatura de 1,0°C (±0,2), com exceção das frutas do tratamento *f*. A pressão parcial de CO₂ para a condição de AC foi 2,0kPa e todas as condições de ACD foi 1,2kPa, conforme as recomendações da HarvestWatch (2013). As maçãs foram armazenadas por nove meses mais sete dias de exposição à temperatura de 20°C.

5.1.4.3 Controle da temperatura e umidade relativa do ar

A temperatura foi controlada com auxílio de termostatos eletrônicos e, além disso, monitorado por meio de termômetros de mercúrio, com resolução de 0,1°C, inseridos na polpa de uma maçã acondicionadas dentro das câmaras experimentais.

A umidade relativa do ar foi monitorada por meio de psicrômetros, com termômetros de mercúrio, colocados dentro da minicâmara e mantido em 94%±2%. Para alcançar a UR de 94% cloreto de cálcio (CaCl₂) foi utilizado para absorver parte da umidade da atmosfera da minicâmara. O CaCl₂ é altamente higroscópico e, portanto, pode ser utilizado para a redução do conteúdo de água da atmosfera. Aproximadamente 7,5 gramas de CaCl₂ por quilograma de maçã foram colocados dentro de um recipiente aberto que foi colocado dentro da minicâmara experimental.

5.1.4.4 Aplicação de 1-metilciclopropeno

O 1-metilciclopropeno (1-MCP) foi aplicado um dia após a colheita das frutas. As unidades experimentais foram acondicionadas em uma minicâmara experimental hermeticamente vedada de 233L na temperatura de 1,0°C. A solução contendo 1,0 µL L⁻¹ de 1-MCP foi despejado em uma placa de petri dentro da minicâmara e, em seguida, rapidamente fechada durante 24h. Durante este período um ventilador foi acionado para circular a atmosfera da minicâmara e proporcionar melhor evaporação do composto ativo. Após o período de

tratamento a minicâmara foi ventilada com auxílio de uma bomba de vácuo ventilando a atmosfera da minicâmara. Finalmente as unidades experimentais do tratamento com aplicação de 1-MCP (tratamento *d*) foram armazenadas junto com a condição sem aplicação de 1-MCP (tratamento *c*).

5.1.4.5 Instalação e controle da atmosfera

Inicialmente as maçãs foram armazenadas por cinco dias na temperatura de 5°C. Em seguida, a redução da pressão parcial de oxigênio foi realizada até 5kPa com injeção de nitrogênio. A temperatura foi reduzida para o nível de cada tratamento e a redução da pressão parcial de oxigênio, de 5kPa até o nível de cada tratamento, foi em decorrência do processo da respiração celular. Esta sequência de redução da temperatura e pressão parcial de oxigênio foi realizada para simular ao máximo as condições usadas em empresas armazenadoras de maçãs. O aumento da pressão parcial de CO₂ também foi alcançado pelo próprio processo respiratório das frutas até o nível desejado.

5.1.4.5.1 Câmaras de AC

Em função do processo respiratório, as frutas consomem oxigênio e produzem CO₂. Para monitorar e corrigir as pressões parciais de O₂ e CO₂ foi utilizado um analisador de gases da marca Siemens®. Quando o nível de O₂ estava abaixo do preestabelecido, ar atmosférico foi injetado na minicâmara. O CO₂ em excesso foi absorvido circulando a atmosfera da minicâmara através de um absorvedor contendo cal hidratada até a pressão parcial desejada.

5.1.4.5.2 Câmaras de ACD pelo sistema HarvestWatch™

Para o monitoramento da ACD pelo método da fluorescência de clorofilas, foram utilizados dois conjuntos de sensores por minicâmara, da marca HarvestWatch™, produzidas pela empresa Satlantic, do Canadá e controlado conforme Prange et al. (2007). Em cada conjunto, composto por uma caixa plástica perfurada contendo o sensor de fluorescência de clorofila e uma fonte de luz, foram colocadas seis frutas. Estas caixas foram colocadas dentro da mesma minicâmara em que as unidades experimentais contendo as maçãs foram inicialmente acondicionadas. A minicâmara foi hermeticamente selada e a tampa de acrílico coberta com plástico preto para inibir a entrada de luz ao sensor de fluorescência. A redução da temperatura

e da pressão parcial de oxigênio nos primeiros cinco dias foi realizada conforme mencionado acima. A partir do fechamento da minicâmara e a ativação e conexão dos sensores ao microprocessador, a menor pressão parcial de oxigênio foi determinada pela identificação do aparecimento do pico de emissão de fluorescência. Imediatamente a partir deste momento o oxigênio foi aumentado em 0,2kPa como um fator de segurança e evitar a fermentação das frutas. A emissão de fluorescência foi monitorada a cada uma hora de intervalo durante todo tempo de armazenamento.

5.1.4.5.3 Câmaras de ACD com medição do quociente respiratório

O princípio desta técnica é de que quando o QR é 1,0 a respiração anaeróbica é mínima, porém quando o QR é superior a esse valor a via anaeróbica foi induzida, indicando que a concentração de O₂ está baixa para o estado metabólico em que o fruto se encontra. A determinação do quociente respiratório (QR) foi feita pela razão entre o consumo de O₂ e produção de CO₂ em um período de 24 horas, pelo uso do seguinte equação: $QR = \frac{CO_2 \text{ produzido}}{O_2 \text{ consumido}}$. A partir do QR obtido a pressão parcial de oxigênio foi corrigida conforme o QR estipulado no tratamento. Quando o QR esteve acima daquele estipulado para um determinado tratamento o equilíbrio da respiração estava mais deslocado para a rota anaeróbica, em função da maior produção de CO₂ em relação ao consumo de O₂. Nesta situação, a pressão parcial de O₂ foi aumentada acima da pressão parcial em que a câmara estava antes da determinação do QR, a fim de reduzir a respiração anaeróbica. Se o QR estava abaixo do preestabelecido a pressão parcial de oxigênio foi reduzido para permitir maior taxa fermentativa.

5.1.4.6 Avaliações físicas e bioquímicas

Parâmetros avaliados:

a) Podridão; Polpa farinácea; Degenerescência de polpa: determinados pela contagem das maçãs com tal desordem a partir da avaliação visual subjetiva da presença ou ausência da desordem e expresso em porcentagem para cada unidade experimental.

b) Frutas sadias: determinadas pela contagem das maçãs que não apresentavam nenhuma lesão ou distúrbio externo ou interno e expresso em porcentagem para cada unidade experimental.

c) Acidez titulável: determinada em uma amostra de 10mL de suco das frutas, previamente extraídas de fatias transversais retiradas da região equatorial das maçãs e trituradas em uma centrífuga elétrica. Esta amostra foi diluída em 100mL de água destilada e titulada com solução de hidróxido de sódio 0,1N até pH 8,1. Os dados foram expressos em meq 100 mL⁻¹;

d) Sólidos solúveis totais (SST): determinados por refratometria, utilizando-se o suco extraído da amostra de frutos, com correção do efeito da temperatura (20°C), sendo expresso em °Brix.

e) Aldeído acético, etanol e acetato de etila conforme metodologia de Saquet; Streif (2008): uma amostra da porção equatorial das maçãs foi retirado e triturada em uma centrifuga marca Juicer, para extração de suco. Posteriormente 10mL deste suco foi acondicionado em frascos 'vial' de 20mL. O suco foi exposto um banho-maria a 70°C durante 30 minutos para proporcionar a evaporação dos compostos da fermentação para o *headspace* do frasco. Posteriormente, uma amostra de 0,1mL do ar do *headspace* foi injetado em um cromatógrafo a gás da marca Dani®, equipado com uma coluna capilar de 60m de comprimento (DN-WAX Dani®). A temperatura do injetor, forno e detector foram 140, 60 e 250°C, respectivamente. Os resultados foram expressos em $\mu\text{L L}^{-1}$.

f) Síntese de etileno: Uma sub-amostra de cada amostra foi acondicionada em recipientes de 5 litros que, posteriormente, foram fechados, hermeticamente, durante aproximadamente 2 horas, a 20°C. Após este período, utilizando uma seringa plástica de 1mL, foram coletadas duas amostras da atmosfera do espaço livre destes recipientes e injetadas em um cromatógrafo a gás, marca Varian, modelo 3400, equipado com uma coluna de aço inox 1/8" de 2,0 m de comprimento, preparada com Porapak N80/100 e um detector de ionização de chama. N₂ foi utilizado como gás de arraste. As temperaturas da câmara de injeção, coluna e detector foram 90, 140 e 200°C, respectivamente. Através da concentração de etileno, do peso dos frutos, do volume do espaço livre no recipiente e do tempo de fechamento, foi calculada a síntese de etileno em $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

g) Atividade da enzima ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) oxidase: foram retiradas amostras de epiderme da região equatorial das frutas de cada unidade experimental, totalizando 3 g. Estas foram imediatamente incubadas em uma solução contendo 0,1 mM de ACC (Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) em 10 mM do tampão MES (ácido 2 (N-morfolino) etanossulfônico) em pH 6,0. Após 30 minutos, as amostras foram acondicionadas em seringas herméticas de 50 mL, nas quais foi adicionado 1mL de CO₂. Depois de 30 minutos, a concentração de etileno presente nas seringas foi determinada (BUFLER,

1986). Dessa forma, quanto maior a produção de etileno, maior a atividade da enzima daquela amostra. Os dados foram expressos em $\eta\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

h) Respiração: determinada pela produção de CO_2 . O ar do mesmo recipiente que foi utilizado para determinação da síntese de etileno, foi circulado através de um analisador eletrônico de CO_2 , marca Schele, e por meio da concentração de CO_2 determinada no espaço livre do recipiente, do volume do espaço livre, do peso dos frutos e do tempo de fechamento, foi calculada a respiração em $\text{ml CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

i) Concentração de etileno e dióxido de carbono interno: Foram determinados a partir do ar extraído do espaço interno das maçãs. Para a extração foi utilizado um dissecador conectado a uma bomba de vácuo sendo admitida a pressão de sucção de 565 mm Hg. Quatro maçãs foram colocadas em um funil invertido dentro da água do dissecador. A saída do funil foi vedada com um septo de borracha. Após a aplicação do vácuo o ar do espaço intercelular foi acumulado dentro do funil. Deste ar foram coletadas duas amostras de 1mL para determinação de etileno conforme avaliação acima. Deste mesmo ar mais duas amostras foram coletadas e injetadas em um cromatógrafo a gás Dani[®], modelo Master GC, equipado com uma coluna capilar Carboxen[™] 1006 Plot de 30 metros de comprimento. A temperatura da coluna, do injetor e do detector foram 180, 90 e 230°C, respectivamente. Os resultados foram expressos em $\text{mL CO}_2 100\text{mL}^{-1}$;

j) Firmeza de polpa: foi determinada na região equatorial dos frutos, em dois lados opostos, onde previamente foi removida uma pequena porção da epiderme e após inserido a ponteira de um penetrômetro manual (Effegi Systems, Milan, Italy), com 11 mm de diâmetro. A firmeza foi expressa em Newton (N), em função da força de resistência da polpa à inserção da ponteira.

5.1.4.7 Análise estatística

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento com 50 frutas por unidade experimental, totalizando 200 frutas por tratamento. Os resultados obtidos foram submetidos à análise da variância em nível de 5% de probabilidade de erro. Os dados expressos em porcentagem foram transformados pela fórmula arco seno $(X+0,5/100)^{0,5}$. Antes da análise de variância todos os dados foram testados quanto à normalidade dos erros e homogeneidades das variâncias residuais pelos teste de Liliefors e Bartlet, respectivamente. Para a comparação de médias foi utilizado o teste de Tukey. Os softwares Sisvar e Action for Excel foram usados para rodar a análise estatística.

5.1.5 Resultados e Discussão

Maçãs ‘Royal Gala’ armazenadas em AC apresentaram alta taxa de biossíntese de etileno e taxa respiratória durante o período de exposição a 20°C, sendo sempre maior que as maçãs armazenadas em qualquer uma das condições de ACD testadas (Tabela 1). Além disso, durante o período de prateleira, as maçãs dos tratamentos AC e ACD FC apresentaram aumento na taxa de síntese de etileno até o sexto dia de avaliação. Este resultado não foi observado para as maçãs armazenadas em ACD QR, independentemente do nível de QR ou tratamento adicional (Tabela 1). Em todas as ACD QR a taxa de biossíntese de etileno foi baixa e constante durante os 6 dias de vida de prateleira avaliados. Segundo Watkins; Nock (2012), a baixa síntese de etileno das maçãs ‘McIntosh’ and ‘Empire’ durante o armazenamento e durante o período de exposição a 20°C é determinante na manutenção da firmeza de polpa e demais atributos de qualidade.

A atividade da ACC oxidase (Figura 1A) e a produção de etileno, tanto o liberado externamente (Tabela 1) quanto o conteúdo interno de etileno (Figura 1B), está inversamente relacionado (-0,52, -0,51 e -0,52, respectivamente, com $p < 0,01$ – *dados não apresentados*) à taxa de respiração anaeróbica determinada pela produção de etanol (Figura 4B). Este efeito tem sido observado por diversos autores em diferentes frutas quando o etanol foi aplicado externamente ou internamente na cavidade seminal (PESIS, 2005, LIU et al., 2012) ou quando as frutas foram armazenadas em baixa pressão parcial de oxigênio (BOTONDI et al., 2012). O etanol reduz a produção de etileno agindo sobre a inibição da transcrição das enzimas ACC sintase e ACC oxidase (ASODA et al., 2009) que são responsáveis pela produção de etileno. Portanto, a redução da expressão destas enzimas resulta na redução da atividade da ACC oxidase e, desta forma, da síntese de etileno em maçãs armazenadas em ACD.

Assim como o baixo oxigênio durante o armazenamento, o 1-MCP é um composto que resulta em drástica redução da síntese de etileno. Este composto age ligando-se irreversivelmente aos receptores de etileno bloqueando sua ação, resultando na redução da síntese de etileno e seus efeitos sobre o amadurecimento de frutas climatéricas (BLANKENSHIP; DOLE, 2003). A aplicação de 1-MCP reduziu a atividade da enzima ACC oxidase (Figura 1A) comparado com AC, entretanto, não resultou em redução da taxa de biossíntese de etileno liberado externamente (Tabela 1) ou, do conteúdo interno de etileno (Figura 1B), quando comparado às frutas armazenadas na mesma condição de ACD QR1,5 sem

aplicação de 1-MCP (Tabela 1). Portanto, o armazenamento de maçãs em ACD QR1,5 induziu a redução da biossíntese de etileno a níveis próximos a zero, provavelmente, pelo efeito do etanol (PESIS, 2005) e, desta forma, o efeito da aplicação de 1-MCP não fica evidente.

Tabela 1- Taxa de biossíntese de etileno e taxa respiratória de maçãs ‘Royal Gala’ armazenadas por nove meses em diferentes condições de AC e ACD e expostas durante seis dias a 20°C.

	Taxa de biossíntese de etileno ($\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$)			
	Dias a 20°C			
	Saída	2	4	6
A. I.		0,38		
AC**	2,88 aD*	8,76 aC	13,17 aB	22,48 aA
HW	0,52 bC	0,91 bBC	1,00 bB	2,96 bA
QR1,5	0,13 cA	0,27 cA	0,30 cA	0,08 cA
QR1,5/MCP	0,03 cA	0,11 cA	0,10 cA	0,04 cA
QR2	0,09 cA	0,23 cA	0,19 cA	0,15 cA
QR2/1,5°C	0,15 cA	0,24 cA	0,12 cA	0,08 cA
C.V. (%)		20,92		
	Taxa respiratória ($\text{mL CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$)			
A. I.		7,77		
AC	6,90 aB	6,83 aB	7,93 aA	6,52 aB
HW	4,33 bB	5,00 bA	4,09 bB	3,99 bB
QR1,5	3,44 cdB	4,90 bA	4,31 bA	2,83 cB
QR1,5/MCP	2,78 dBC	3,56 cA	3,05 cAB	2,42 cC
QR2	3,93 bcB	5,02 bA	4,10 bB	4,03 bB
QR2/1,5°C	3,09 dB	3,93 cA	4,13 bA	2,72 cB
C.V. (%)		7,49		

*Tratamentos com médias não seguidas pela mesma letra minúscula na vertical (condições de atmosfera controlada) e maiúscula na horizontal (dias de exposição a 20°C) diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

** A. I.: Análise Inicial; AC: 1,2kPa O₂ e 2,0 kPa CO₂; HW: Atmosfera controlada dinâmica (ACD) pelo sistema HarvestWatch™; QR1,5: ACD com monitoramento do quociente respiratório em 1,5; QR1,5/MCP: idem ao anterior mais aplicação de 1-metilciclopropeno; QR2: ACD com monitoramento do quociente respiratório em 2,0; QR2/1,5°C: idem ao anterior porém armazenadas na temperatura de 1,5°C;

Apesar da inexistência de efeito do 1-MCP sobre a taxa de biossíntese de etileno, este composto resultou menor conteúdo de CO₂ interno aos 7 dias de exposição a 20°C (Figura 1C) e da taxa respiratória das maçãs armazenadas em ACD QR1,5 na saída e aos 4 dias de exposição a 20°C, entretanto, diferiu apenas aos 4 dias das frutas armazenadas em ACD QR2 na temperatura de 1,5°C (Tabela 1). A diminuição da taxa respiratória reduz diretamente o consumo de açúcares e, portanto, maior manutenção do teor de sólidos solúveis totais após a vida de prateleira (Figura 2B). A aplicação de 1-MCP reduziu a taxa respiratória anaeróbica

resultando em menor produção de aldeído acético e acetato de etila (Figura 4A e 4C) e, desta forma, auxiliando no menor consumo de açúcares na rota fermentativa.

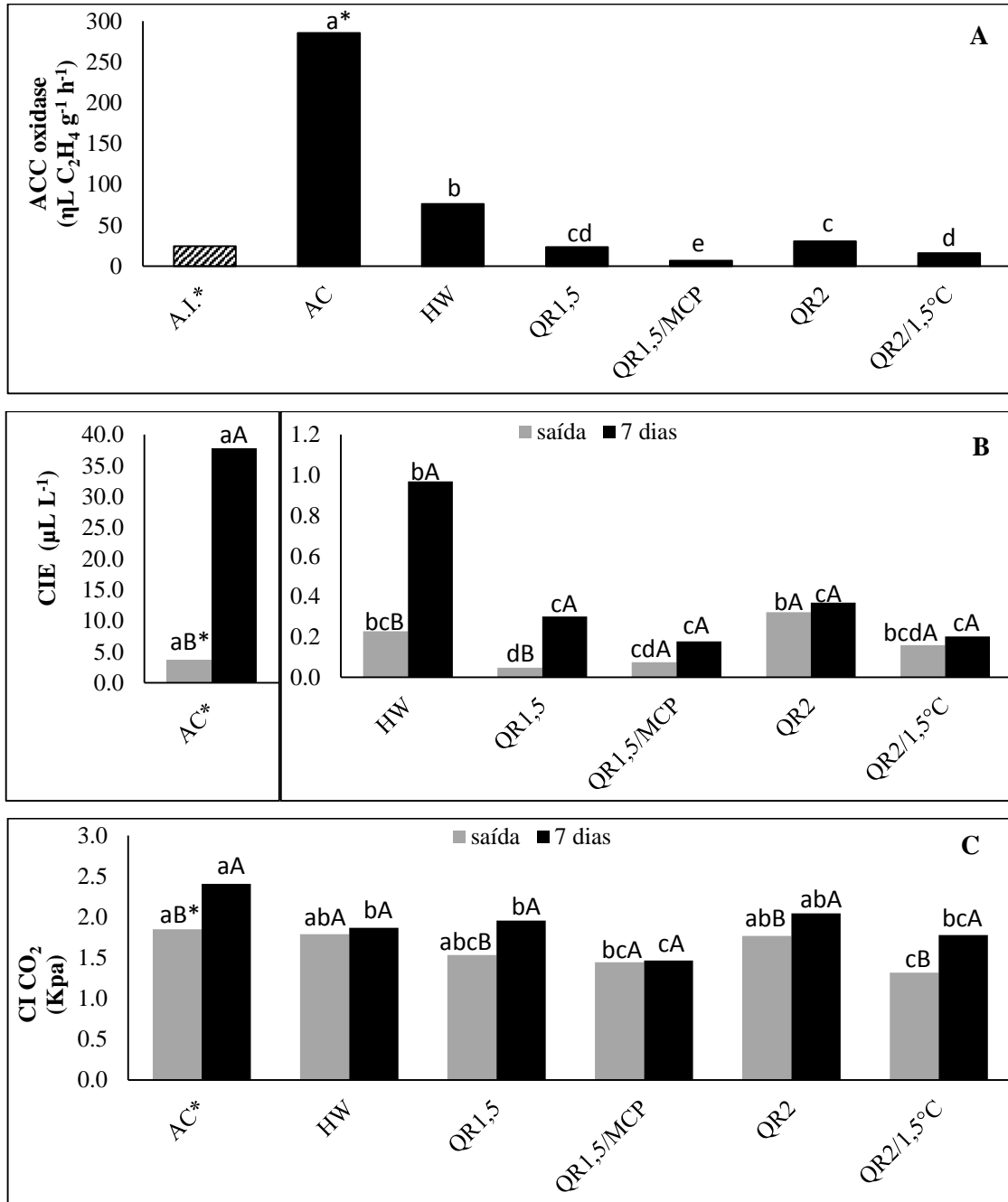


Figura 1 – Atividade da ACC oxidase (A), concentração interna de etileno (CIE) (B) e de CO₂ (CI CO₂) (C) de maçãs ‘Royal Gala’ após o armazenamento por nove meses em diferentes condições de AC e ACD mais sete dias a 20°C.

*Tratamentos com médias não seguidas pela mesma letra minúscula, na comparação entre tratamentos para cada tempo de avaliação, e maiúsculas, na comparação no tempo para cada tratamento, diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. **A.I.: Análise inicial; AC: 1,2kPa O₂ e 2,0 kPa CO₂; HW: Atmosfera controlada dinâmica (ACD) pelo sistema

HarvestWatch™; QR1,5: ACD com monitoramento do quociente respiratório em 1,5; QR1,5/MCP: idem ao anterior mais aplicação de 1-metilciclopropeno; QR2: ACD com monitoramento do quociente respiratório em 2,0; QR2/1,5°C: idem ao anterior porém armazenadas na temperatura de 1,5°C.

O efeito da aplicação de 1-MCP sobre a redução da taxa respiratória de frutas climatéricas armazenadas em AC já é bem conhecido (BLANKENSHIP; DOLE, 2003), entretanto, o efeito adicional à ACD ainda não havia sido reportado. As maçãs armazenadas em ACD QR1,5 com ou sem aplicação de 1-MCP mantiveram maior acidez titulável (Figura 2A). A aplicação de 1-MCP reduz a taxa respiratória (Tabela 1) diminuindo assim o consumo de ácidos e açúcares.

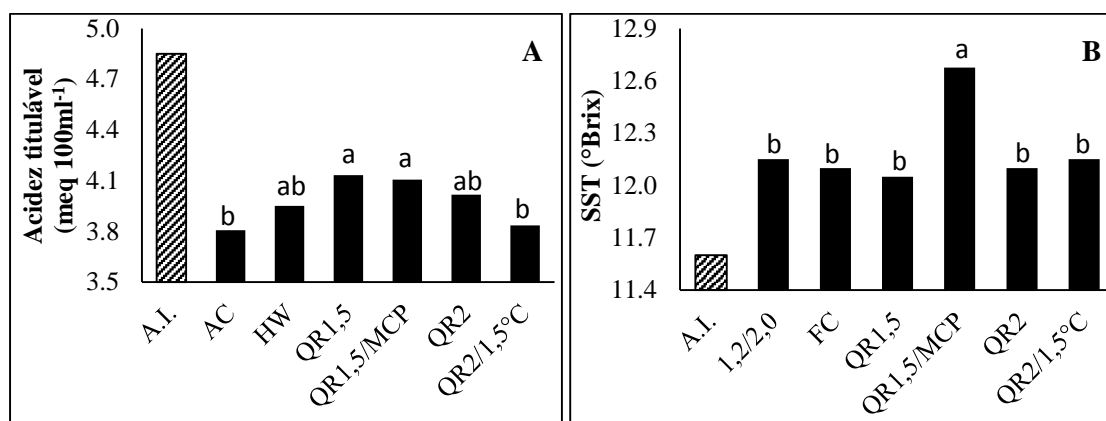


Figura 2 - Acidez titulável e sólidos solúveis totais (SST) de maçãs ‘Royal Gala’ após o armazenamento por nove meses em diferentes condições de AC e ACD mais sete dias a 20°C.

*Tratamentos com médias não seguidas pela mesma letra minúscula diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A redução na taxa respiratória e taxa de biossíntese de etileno tem efeito direto sobre a manutenção da firmeza de polpa (GIOVANNONI, 2007). Este fenômeno é resultante da ativação de enzimas associadas a degradação da parede celular primária e despolimerização de polímeros de xiloglucanos que, por sua vez, são ativadas pela presença de etileno (HARB et al., 2012). As maçãs ‘Royal Gala’ armazenadas em ACD QR1,5 permaneceram com alta firmeza de polpa após os nove meses de armazenamento mais 7 dias de exposição a 20°C, diminuindo neste período de armazenamento apenas 3 N da sua firmeza de polpa da colheita (Figura 3). O armazenamento em AC, cuja firmeza de polpa foi a menor entre os tratamentos avaliados, apresentou uma redução de 19 N na firmeza da polpa após o prolongado período de

armazenamento. Este resultado evidencia o efeito positivo da ACD QR1,5, principalmente, com a associação de 1-MCP, na manutenção do principal atributo de qualidade de maçãs em pós-colheita e está diretamente ligado a menor atividade da ACC oxidase, menor síntese de etileno e respiração celular. Segundo Gasser et al. (2008), a firmeza de polpa de maçãs ‘Golden Delicious’ foi mantida mais elevada com uso de ACD FC comparada a AC. Este resultado também foi observado neste trabalho com maçãs ‘Royal Gala’ (Figura 3).

O aumento da temperatura de armazenamento de 1 para 1,5°C não afetou negativamente a qualidade das maçãs após o armazenamento, apesar da maior produção de etanol e acetato de etila (Figura 4B e 4C). A firmeza de polpa permaneceu estatisticamente igual às frutas armazenadas em ACD QR2 na temperatura de 1°C (Figura 3). Este resultado indica que esta cultivar pode ser armazenada à 1,5°C se associado com ACD QR2 sem perda de qualidade após o armazenamento e, com isto, pode-se reduzir gastos com geração de frio.

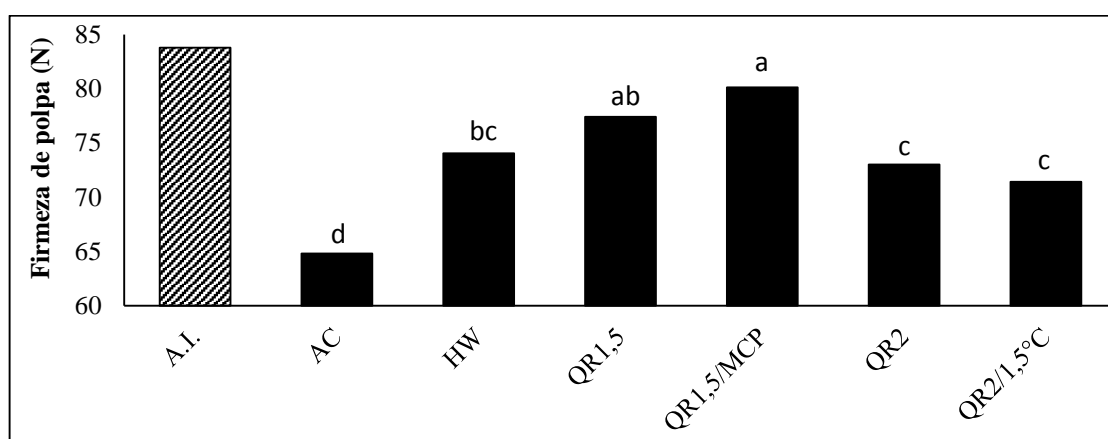


Figura 3 - Firmeza de polpa e análise de correlação entre produção de etanol e firmeza de polpa de maçãs ‘Royal Gala’ após o armazenamento por nove meses em diferentes condições de AC e ACD mais sete dias a 20°C.

*Tratamentos com médias não seguidas pela mesma letra minúscula diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Junto com a firmeza de polpa, os distúrbios fisiológicos externos e internos e as podridões pós-colheita são os principais parâmetros determinantes da qualidade maçãs. A maior inibição da infecção e progressão de podridões normalmente ocorre pela redução da temperatura (MORALES et al., 2010), porém, neste trabalho não foi verificado nenhum efeito da variação da temperatura em 0,5°C (Figura 5A). As maçãs ‘Royal Gala’ armazenadas em ACD QR1,5 com aplicação de 1-metilciclopropeno apresentaram maior porcentagem de frutas com podridões (Figura 5A) diferindo da condição sem aplicação deste composto. O efeito do

1-MCP sobre a ocorrência de podridões em pós-colheita é variável, entretanto, normalmente induz a ocorrência de podridão (BLANKENSHIP; DOLE, 2003). Em abacate, mamão, manga (HOFMAN et al., 2001) e citros (PORAT et al., 1999) a aplicação de 1-MCP causou aumento na ocorrência de podridões. O efeito do 1-MCP no aumento da incidência de podridões é causado pela inibição do sistema de defesa contra podridões induzido pelo etileno (LEVERENTZ et al., 2003). Em peras japonesas (ITAI et al., 2000) e em abacate (WANG et al., 2006) o 1-MCP reduziu a expressão de proteínas relacionadas a defesa da planta.

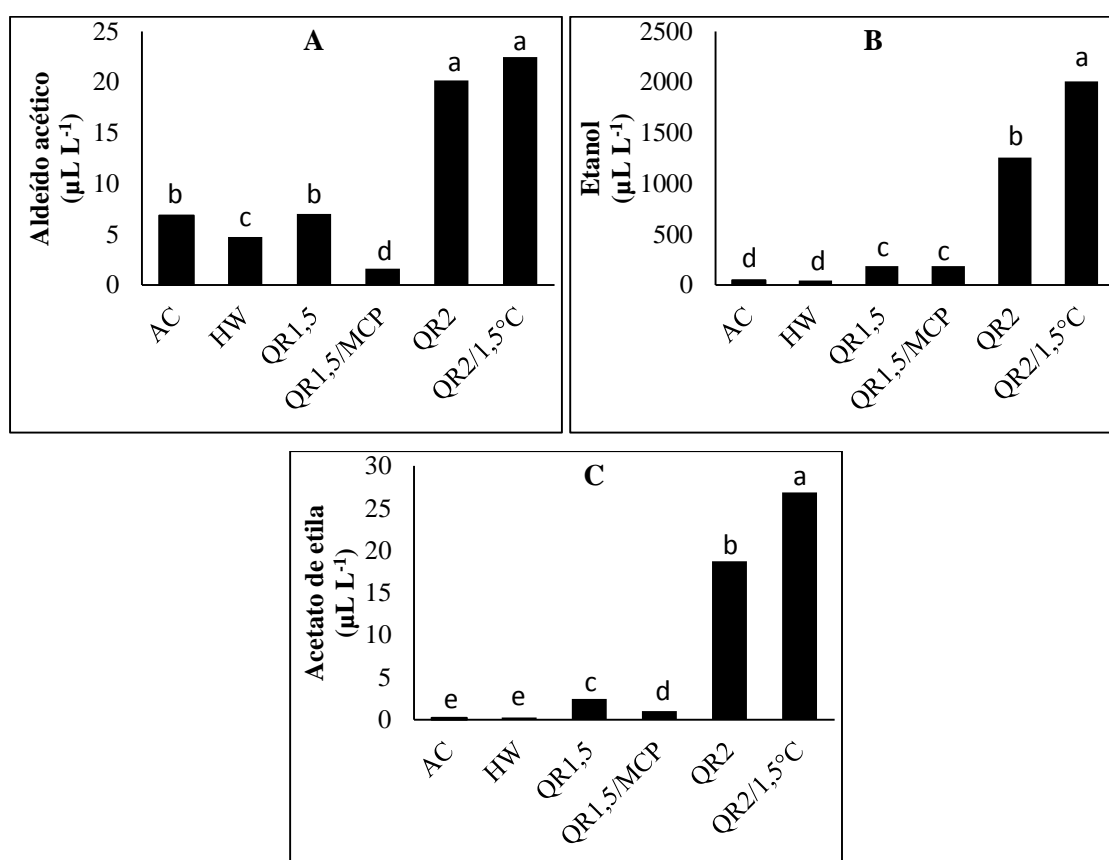


Figura 4- Produção de aldeído acético, etanol e acetato de etila de maçãs ‘Royal Gala’ após o armazenamento por nove meses em diferentes condições de AC e ACD mais sete dias a 20°C.

*Tratamentos com médias não seguidas pela mesma letra minúscula diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A redução da temperatura é a melhor forma de diminuir a velocidade do progresso de amadurecimento de frutas (STEFFENS et al., 2007), entretanto, há um limite mínimo de redução da temperatura para que não ocorram danos às membranas celulares por excesso de frio. Quando a temperatura for diminuída além do limite mínimo, distúrbios fisiológicos podem

ocorrer (WEBER et al., 2011). O armazenamento de maçãs ‘Royal Gala’ em ACD QR2 na temperatura de 1°C causou maior ocorrência de degenerescência de polpa após a exposição das frutas por 7 dias a 20°C, quando comparado à mesma condição de controle da atmosfera, porém, a 1,5°C (Figura 5B). Em maçãs ‘Royal Gala’ armazenadas em AC a temperatura de 1,0°C resultou em menor incidência de degenerescência de polpa após 8 meses de armazenamento quando comparado a 0 e 0,5°C (WEBER et al., 2011), entretanto, estes autores não avaliaram temperatura acima de 1°C. De acordo com Watkins; Liu (2010), a degenerescência de polpa provavelmente é causada pelo dano por baixa temperatura em maçãs ‘Empire’.

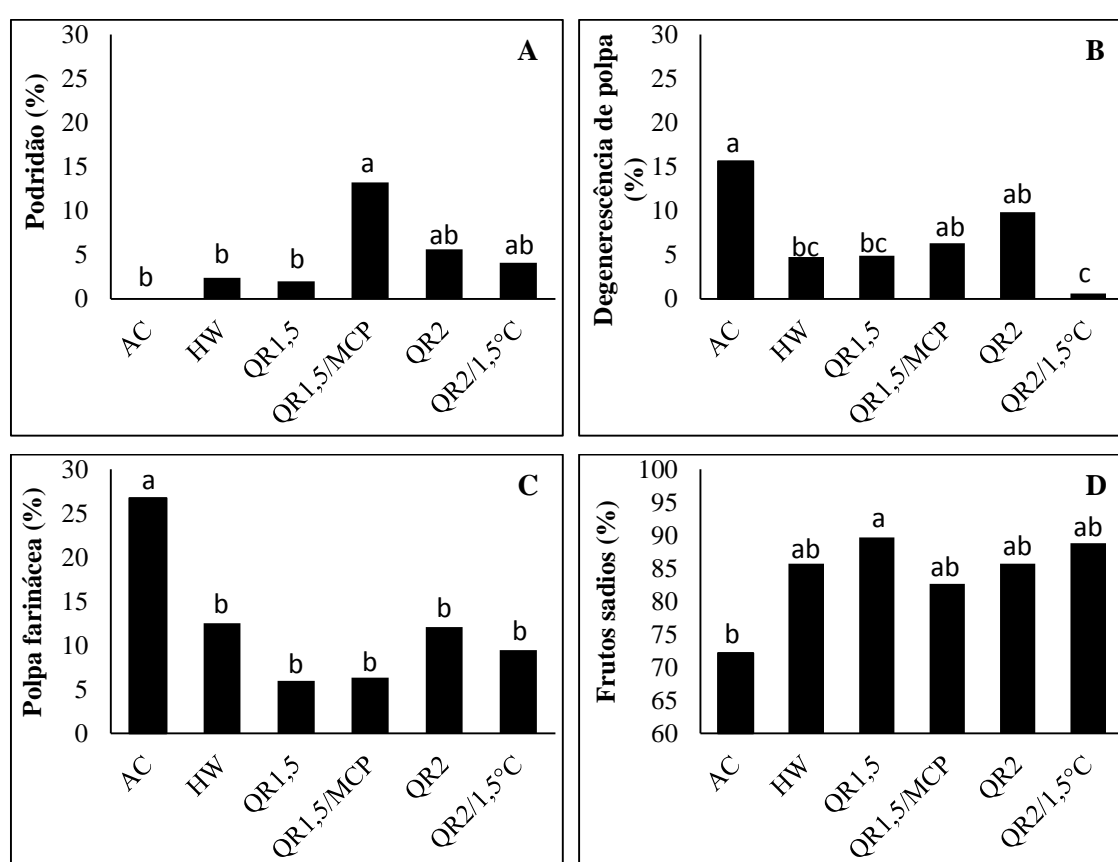


Figura 5 - Incidência de podridão (A), degenerescência de polpa (B), polpa farinácea (C) e porcentagem de frutas sadias (D) de maçãs ‘Royal Gala’ após o armazenamento por nove meses em diferentes condições de AC e ACD mais sete dias a 20°C.

*Tratamentos com médias não seguidas pela mesma letra minúscula diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

O armazenamento em ACD FC e ACD QR1,5 resultou em maçãs com menor incidência de degenerescência de polpa comparado à atmosfera controlada (AC) (Figura 5B). As frutas

armazenadas em AC também apresentaram maior ocorrência de polpa farinácea diferindo de todas as condições de ACD (Figura 5C). A polpa farinácea é caracterizada pela separação das células com a aplicação de uma força sobre a polpa da fruta e, normalmente, é associada com a perda de açúcares arabinose, por meio de hidrólise por enzimas, na parte péctica da lamela média (NARA et al., 2001; WEI et al., 2010, NOBILE et al., 2011). A taxa respiratória e biossíntese de etileno, produzidos em altas concentrações nas maçãs armazenadas em AC (Tabela 1), ativam as enzimas degradadoras de pectinas, resultando no aparecimento da sensação de polpa farinácea (NARA et al., 2001; NOBILE et al., 2011).

Frutas sem danos externos e internos apresentam maior valor de mercado. Entre os principais danos que ocorrem em maçãs têm-se as podridões e os distúrbios fisiológicos causados por condições inadequadas de armazenamento ou amadurecimento avançado. As maçãs armazenadas em AC apresentaram a menor percentagem de frutas sadias, diferindo das frutas armazenadas em ACD QR 1,5 (Figura 5D). Nessa condição de armazenamento 90% de frutas não apresentaram nenhum dano externo ou interno após nove meses de armazenamento e mais sete dias a 20°C. Alguns autores conferem ao metabolismo fermentativo, ou seja, a concentração de aldeído acético e etanol, o aparecimento de distúrbios fisiológicos na polpa de maçãs e peras (SMAGULA et al., 1968; MARLOW; LOESCHER, 1984, LEE et al., 2012). Entretanto, neste trabalho a alta taxa fermentativa das maçãs armazenadas em ACD QR2,0 a 1,5°C (Figura 4A, 4B e 4C), com produção de 22 $\mu\text{L L}^{-1}$ de aldeído acético, 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etanol e 26 $\mu\text{L L}^{-1}$ de acetato de etila, não resultou em aumento da incidência de distúrbios fisiológicos, apresentando inclusive, redução na incidência de degenerescência de polpa (Figura 5B).

5.1.6 Conclusão

A atmosfera controlada dinâmica monitorada através da fluorescência de clorofila mantém as maçãs com melhor qualidade que às armazenadas em atmosfera controlada convencional após longo período de armazenagem, entretanto, o monitoramento pelo quociente respiratório resulta em maçãs com a maior firmeza de polpa após o armazenamento.

O monitoramento do quociente respiratório e controle de oxigênio na câmara de armazenagem pelo nível 1,5 resultou em maçãs de melhor qualidade após os nove meses de armazenagem e mais sete dias de exposição a 20°C.

A aplicação de 1-metilciclopropeno associada ao armazenamento de maçãs 'Royal Gala' em atmosfera controlada dinâmica resulta em menor taxa respiratória e a produção de compostos da fermentação e, conseqüentemente, mantém maior teor de sólidos solúveis após os nove meses de armazenamento e mais sete dias de exposição a 20°C, entretanto, não tem efeito na manutenção da firmeza de polpa em ACD QR1,5.

A temperatura de 1,5°C pode ser utilizada para o armazenamento de maçãs 'Royal Gala' em atmosfera controlada dinâmica com quociente respiratório 2,0. Sugere-se que esta temperatura seja também testada associada ao quociente respiratório 1,5.

5.1.7 Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pelo apoio financeiro.

5.1.8 Referências

ARGENTA, L. C.; MATTHEIS, J. P.; FAN, X. Interactive effects of CA storage 1-methylcyclopropene and methyl jasmonate on quality of apple fruit. **Acta Horticulturae**, v.857, p.259-266, 2010.

ASODA, T.; TERAJ, H.; KATO, M.; SUZUKI, Y. Effects of postharvest ethanol vapor treatment on ethylene responsiveness in broccoli. **Postharvest Biology and Technology**, v.52, p.216-220, 2009.

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

BOERSIG, M. R.; KADER, A.A.; ROMANI, R.J. Aerobic-anaerobic respiratory transition in pear fruit and cultured pear fruit cells. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.113, p.869-873, 1988.

BOTONDI, R.; RUSSO, V.; MENCARELLI, F. Anaerobic metabolism during short and long-term storage of kiwifruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.64, p.83-90, 2012.

BRACKMANN, A.; WEBER, A.; PINTO, J. A. V.; NEUWALD, D. A.; STEFFENS, C. A. Manutenção da qualidade pós-colheita de maçãs 'Royal Gala' e 'Galaxy' sob armazenamento em atmosfera controlada. **Ciência Rural**, v.38, p.2478-2484, 2008.

BRACKMANN, A.; WEBER, A.; SESTARI, I.; PETERLE, M. E.; BOTH, V.; PAVANELLO E. P.; PINTO, J. A. V. Manejo do etileno e sua relação com a maturação de maçãs 'Gala' armazenadas em atmosfera controlada. **Bragantia**, v.68, p.519-525, 2009.

BUFLER, G. Ethylene-promoted conversion of 1-aminocyclopropene-1-carboxylic acid to ethylene in peel of apple at various stages of fruit development. **Plant Physiology**, v.80, p.539-543, 1986.

GASSER, F.; EPPLER, T.; NAUNHEIM, W.; GABIOUD, S.; HÖHN, E. Lagerung von Äpfeln unter dynamische kontrollierte Atmosphäre. **AGRARForschung**, v.15, p.98-103, 2008.

GASSER, F.; EPPLER, T.; NAUNHEIM, W.; GABIOUD, S.; NISING, A. B. Dynamic CA storage of apples: monitoring of the critical oxygen concentration and adjustment of optimum conditions during oxygen reduction. **Acta Horticulturae**, v.796, p.69-76, 2010.

GIOVANNONI, J. J. Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. **Current Opinion in Plant Biology**, v.10, p.283-289, 2007.

HARB, J.; GAPPER, N. E.; GIOVANNONI, J. J.; WATKINS, C. B. Molecular analysis of softening and ethylene synthesis and signaling pathways in a non-softening apple cultivar, 'Honeycrisp' and a rapidly softening cultivar, 'McIntosh'. **Postharvest Biology and Technology**, v.64, p.94-103, 2012.

HOFMAN, P. J.; JOBIN-DECOR, M.; MEIBURG, G. F.; MACNISH, A. J.; JOYCE, D. C. Ripening and quality responses of avocado, custard apple, mango and papaya fruit to 1-methylcyclopropene. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.41, p.567-572, 2001.

ITAI, A.; TANABE, F.; TAMURA, F.; TANAKA, T. Isolation of cDNA clones corresponding to genes expressed during fruit ripening in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai): involvement of the ethylene signal transduction pathway in their expression. **Journal of Experimental Botany**, v.51, p.1163-1166, 2000.

JUNG, S. K.; WATKINS, C. B. Involvement of ethylene in browning development of controlled atmosphere-stored 'Empire' apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.59, p.219-226, 2011.

LEE, J.; MATTHEIS, J. P.; RUDELL, D. R. Antioxidant treatment alters metabolism associated with internal browning in 'Braeburn' apples during controlled atmosphere storage. **Postharvest Biology and Technology**, v.68, p.32-42, 2012.

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

LIU, W. W.; QI, H. Y.; XU, B. H.; LI, Y.; TIAN, X. B.; JIANG, Y. Y.; XU, X. F.; LV, D. Q. Ethanol treatment inhibits internal ethylene concentrations and enhances ethyl ester production during storage of oriental sweet melons (*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino). **Postharvest Biology and Technology**, v.67, p.75-83, 2012.

MARLOW, G. C.; LOESCHER, W. H. Watercore. **Horticultural Reviews**, v.6, p.189-251, 1984.

McCORMICK, R.J.; NEUWALD, D.A.; STREIF J. Commercial apple CA storage temperature regimes with 1-MCP (SmartFresh TM): Benefits and Risiks. **Acta Horticulturae**, v.934, p.263-270, 2012.

MORALES, H.; MARÍN, S.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Influence of post-harvest technologies applied during cold storage of apples in *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation: A review. **Food Control**, v.21, p.953-962, 2010.

NARA, K; YOJI KATO, Y; MOTOMURA, Y. Involvement of terminalarabinose and -galactose pectic compounds in mealiness of apple fruit during storage. **Postharvest Biology and Technology**, v.22, p.141-150, 2001.

NOBILE, P.M.; WATTEBLED, F.; QUECINI, V.; GIRARDI, C.L.; LORMEAU, M.; LAURENS, F. Identification of a novel α -L-arabinofuranosidase gene associated with mealiness in apple. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p.4309-4321, 2011

PESIS, E. The role of the anaerobic metabolites, acetaldehyde and ethanol, in fruit ripening, enhancement of fruit quality and fruit deterioration. **Postharvest Biology and Technology**, v.37, p.1-19, 2005.

PORAT, R.; WEISS, B.; COHEN, L.; DAUS, A.; GOREN, R.; DROBY, S. Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene on the postharvest qualities of 'Shamouti' oranges. **Postharvest Biology and Technology**, v.15, p.155-163, 1999.

PRANGE, R. K.; DeLONG, J. M.; DANIELS-LAKE, B. J.; HARRISON, P. A. Innovation in controlled atmosphere technology. **Stewart Postharvest Review**, v.3, p.1-11, 2005.

PRANGE, R. K.; DeLONG, J. M.; HARRISON, P.; McLEAN, S.; SCRUTTON, J.; CULLEN, J. Method and apparatus for monitoring a condition in chlorophyll containing matter. **U.S. Patent**, n.WO/2002/006795, 2007.

PRANGE, R. K.; DeLONG, J. M.; LEYTE, J. C.; HARRISON, P. A. Oxygen concentration affects chlorophyll fluorescence in Chlorophyll-containing fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.24, p.201-205, 2002.

SAQUET, A. A.; STREIF, J. Fermentative metabolism in Jonagold apples under controlled atmosphere storage. **European Journal of Horticultural Science**, v.73, p.43-46, 2008.

SISLER, E. C.; SEREK, M. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. **Physiologia Plantarum**, v.100, p.577-582, 1997.

SMAGULA, J. M.; BRAMLAGE, W. J.; SOUTHWICK, R. A.; MARSH, H. V. J. Effects of watercore on respiration and mitochondrial activity in 'Richard Delicious' apples. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.93, p.753-761, 1968.

STEFFENS, C. A.; BRACKMANN, A.; Pinto, J. A. V.; EISERMANN, A. C. Taxa respiratória de frutas de clima temperado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.313-321, 2007.

WANG, X.; KOBILER, I.; LICHTER, A.; LEIKIN-FRENKEL, A.; PESIS, E.; PRUSKY, D. 1-MCP prevents ethylene-induced accumulation of antifungal diene in avocado fruit. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.67, p.261-267, 2006.

WATKINS, C. B.; NOCK, J.F. Effects of delays between harvest and 1-methylcyclopropene treatment, and temperature during treatment, on ripening of air-stored and controlled-atmosphere-stored apples. **HortScience**, v.40, p.2096-2101, 2005.

WATKINS, C. B.; LIU, F. W. Temperature and carbon dioxide interactions on quality of controlled atmosphere-stored 'Empire' apples. **HortScience**, v.45, p.1708-1712, 2010.

WATKINS, C. B.; NOCK, J. F. Rapid 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment and delayed controlled atmosphere storage of apples. **Postharvest Biology and Technology**, v.69, p.24-31, 2012.

WEBER A.; BRACKMANN, A.; ANESE, R. O.; BOTH, V.; PAVANELLO, E. P. 'Royal Gala' apple quality stored under ultralow oxygen concentration and low temperature conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.1597-1602, 2011.

WEI, J.; MA, F.; SHI, S.; QI, X.; ZHU, X.; YUAN, J. Changes and postharvest regulation of activity and gene expression of enzymes related to cell wall degradation in ripening apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.56, p.147-154, 2010.

WRIGHT, A. H.; DeLONG, J. M.; GUNAWARDENA, A. H. L. A. N.; PRANGE, R. K. Dynamic controlled atmosphere (DCA): Does fluorescence reflect physiology in storage? **Postharvest Biology and Technology**, v.64, p.19-30, 2012.

WRIGHT, A. H.; DeLONG, J. M.; HARRISON, P. A.; GUNAWARDENA, A. H. L. A. N.; PRANGE, R. K. The effect of temperature and other factors on chlorophyll a fluorescence and the lower oxygen limit in apples (*Malus domestica*). **Postharvest Biology and Technology**, v.55, p.21-28, 2010.

ZANELLA, A.; CAZZANELLI, P. DCA-Lagerung hat sich bewährt. **Apfel Aktuell: Lagerung**, sn, p.16-17, 2007.

6 ARTIGO 4

6.1 Dynamic controlled atmosphere by respiratory quotient and chlorophyll fluorescence and its interaction with 1-methylcyclopropene on 'Fuji Suprema' apples quality

Anderson Weber^a, Fabio Rodrigo Thewes^a, Auri Brackmann

^aDepartment of Plant Science, Postharvest Research Center, Federal University of Santa Maria, Roraima Avenue 1000, Camobi, Santa Maria 97105-900, RS, Brazil.

6.1.1 Abstract

The objective of the present work was to evaluate the efficiency of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on the new dynamic controlled atmosphere by respiratory quotient (RQ DCA) and compare them to the static controlled atmosphere (CA) and dynamic controlled atmosphere by chlorophyll fluorescence (HW DCA) on postharvest quality of 'Fuji Suprema' apples. The treatments tested were: [1] Controlled atmosphere (CA) with 1.0 kPa O₂ + <0.1 kPa CO₂; [2] DCA with chlorophyll fluorescence measurement (HarvestWatchTM DCA); [3] DCA with respiratory quotient (RQ) 1.5 and [4] DCA with RQ 2.0. The fruits from each condition were treated either with or without 1-MCP. On the present study, was verified a significant interaction between storage conditions and 1-MCP application for ACC oxidase enzyme activity. Fruit treated with 1-MCP before storage under RQ1.5 and RQ2.0 DCA produced lower concentration of acetaldehyde, ethanol and ethyl acetate in relation with fruits without 1-MCP. In all storage conditions, 1-MCP application maintained higher flesh firmness, with the exception of fruits stored under RQ2.0 DCA. The new RQ DCA is an efficient method to detect the LOL of 'Fuji Suprema' apples, allows the induction of anaerobic metabolism at safety levels and could be a promising DCA storage method. RQ1.5 DCA is the most indicated for 'Fuji Suprema' apples storage. Its application induced acetaldehyde, ethanol and ethyl acetate production, which reduced ethylene production and respiration rate, however did not increase physiological disorders. 1-MCP application kept higher flesh firmness and reduced the

anaerobic metabolism, however decreased fruit quality due to the cavities incidence, therefore not recommended for 'Fuji Suprema' apples stored in DCA conditions. 1-MCP application did not showed benefits on quality maintenance on 'Fuji Suprema' apples stored under RQ2.0 DCA.

Keywords: *Malus domestica*, anaerobic respiration, acetaldehyde, ethanol, ethyl acetate, cavities.

6.1.2 Introduction

During the last few years the consumers demanding apples with high postharvest quality. However, this high quality is not reached by long term storage under controlled atmosphere, especially because the incidences of physiological disorders and flesh softening (LAFER, 2008). Thus, is necessary developing new technologies that allow store the fruits during long term without significant losses and so offer high quality product throughout all the year. A possible technique for long term storage is the O₂ reduction as low as fruit metabolism tolerates.

The O₂ reduction to extremely low levels needs a methodology to monitor the lowest oxygen limit (LOL). Nowadays, there are three methods that allow monitor the LOL during the storage: a method based on chlorophyll fluorescence (DeELL et al., 1999; PRANGE et al., 2007), on the anaerobic respiration products (Veltman et al., 2003) and on the respiratory quotient (GASSER et al., 2008; WRIGHT et al., 2012). However, at the present in the market only is used the method based on chlorophyll fluorescence. This method needs high cost apparatuses to monitor the LOL during apple storage and becoming difficult to storers access this technology.

Early researches investigate the effect of dynamic controlled atmosphere, monitored by chlorophyll fluorescence (HarvestWatchTM DCA - HW DCA), and detected higher flesh firmness in relation fruit stored in standard controlled atmosphere (LAFER et al., 2008; ZANELLA et al., 2008). Besides the benefits on fruit firmness maintenance, the uses of HW DCA can decreases the physiological disorders due the low oxygen level employed in this storage type (LAFER, 2008). In HW DCA, the oxygen level is gradually reduced up to the detection on an increase in chlorophyll fluorescence. After that, the O₂ level is seated at 0.2 kPa

above the point when the chlorophyll fluorescence spikes (ZANELLA et al., 2005), in other words, this methodology applies a controlled initial low oxygen stress (ILOs). However, for 'Royal Gala' and 'Fuji' apples produced in Brazil, the ILOs decrease fruit quality after storage (BRACKMANN et al., 2012; BRACKMANN et al., 2013). Thus, the DCA storage, based on chlorophyll fluorescence, need experiments to confirm its effect on apples, especially 'Fuji' apples.

During the last years a new method based on the respiratory quotient was develop to storage apple fruit (RQ DCA). This new DCA storage technique allows monitor the metabolic stage of the fruits throughout the storage and so change de O₂ level according fruit Metabolism, as soon as respiratory breakpoint allows detect the LOL (GASSER et al., 2008; Wright et al., 2012). Besides the profit of monitoring the metabolic stage of fruit, this methodology allows the induction of anaerobic metabolism at safety levels, by storing the fruits at higher than 1.0 respiratory quotient. The main reason of inducing anaerobic metabolism is the ethanol production, as soon as its production or application reduces internal ethylene concentration in melons (LIU et al., 2012) and slow the softening, darkness and acid loss of sweet cherry fruits (BAI et al., 2011).

As well as the new DCA storage method, its combination with 1-methylcyclopropene (1-MCP) application is not be well studied still now. 1-MCP application blinds the ethylene receptors inhibiting the ethylene action and, consequently, fruit ripening (BLANKENSHIP; DOLE, 2003; MA et al., 2006). The profits of 1-MCP application are well known yet, especially when apples are stored in normal CA (ZANELLA et al., 2008; FAWBUSH et al., 2009; BULENS et al., 2012). However, in low oxygen levels, such as employed in DCA storage, the 1-MCP effect is not clear yet. In 'Gala' apples (ZANELLA et al., 2008; BRACKMANN et al., 2013) and 'Fuji' apples (BRACKMANN et al., 2012), the 1-MCP application, on apples stored under ultralow oxygen (ULO) (<1.0 kPa), did not improve the fruit quality.

In this context, the objective of the present work was to research the behavior of the oxygen partial pressure during the nine months of QR DCA storage; and evaluate the efficiency of 1-MCP application on the new RQ DCA and compare them with the static CA and HW DCA on postharvest quality of 'Fuji Suprema' apples.

6.1.3 Material and Methods

6.1.3.1 Fruit source and sample homogenization

Fruits used in the experiment were harvested in commercial orchard located in the county of São Joaquim, Santa Catarina, Brazil, at optimum commercial harvest period for 'Fuji Suprema' apples. At harvest fruit showed a 6.9 starch index.

Immediately after harvest, fruits were transported to the Postharvest Research Center, of the Federal University of Santa Maria, RS, Brazil. Immediately after the transportation, the fruits were submitted to selection to eliminated fruits with any type of lesion. Thereafter, the experimental samples, with 22 fruits each, were homogenized and stored into an experimental CA chambers with a volume of 233 liters.

6.1.3.2 1-methylcyclopropene application

In order to the 1-MCP application fruit were stowed into a chamber with 233 liters. Thereafter, a solution containing 1-MCP was done ($1.0 \mu\text{L L}^{-1}$). Immediately after, the solution was put into Petry disks located in the chamber and thereafter the chamber was hermetically closed during 24 hours. During this time the air contained in the chamber was ventilated with a fan. Next this period, the air enclosed in the chamber was withdrawn with a vacuum pump and the fruit were removed from the 1-MCP application chamber and stored together with the fruits without 1-MCP.

6.1.3.3 Storage conditions

All fruits were stored during 30 days under cold storage conditions in order to avoid physiological disorders occurrence, due the high percentage of fruits with water core. After this period the follow treatments were applied: [1] Controlled atmosphere (CA) with $1.0 \text{ kPa O}_2 + <0.1 \text{ kPa CO}_2$; [2] DCA with chlorophyll fluorescence measurement (HarvestWatchTM DCA) according methodology proposed by Zanella et al. (2008); [3] DCA with respiratory quotient (RQ) 1.5 and [4] DCA with respiratory quotient (RQ) 2.0. The RQ was measured daily during the storage period. All fruits from each conditions were treated either with or without 1-MCP. The storage temperature was $-0.5 \text{ }^\circ\text{C} (\pm 0.1)$, with relative humidity seated at $94\% (\pm 1.0)$ and the CO_2 was 0.8 kPa for the DCA stored apple.

6.1.3.4 Quality evaluation

After nine months of storage, physic, chemical and biochemical parameters were evaluated: a) ACC oxidase enzyme activity: carried out according methodology proposed by Bufler (1986); b) Acetaldehyde; c) Ethanol and d) Ethyl acetate: obtained according Saquet; Streif (2008) by the stowage of 10mL of juice in vial flasks with 20mL size, obtained from the 22 fruits of each repetition. After, the flasks were warmed up to 70°C for 30 min and 1 mL of headspace gas was injected into a Dani[®] gas chromatograph equipped with a 60 meters length capillary column (DN-WAX). The temperatures of the column, the injector and the detector were 60, 180 and 250°C respectively. The results were expressed in $\mu\text{L L}^{-1}$; e) internal ethylene concentration (IEC): determined according methodology proposed by Mannapperuma et al. (1991), where the internal air from the fruit was withdrew, with a 565 mm Hg suction pressure. The vacuum pump removed air from the container filled with water in which a fruit was submerged. An inverted funnel, with a septum in its thinner end, covered the fruit, allowing the air removed from it to be accumulated. Samples of this air were injected into a Varian gas chromatograph Star CX 3400 model, (Varian, Palo Alto, CA, USA), equipped with a flame ionization detector (FID) and a Porapak N80/100 column. The temperatures of the column, the injector and the detector were 90, 140 and 200°C respectively. Results were expressed in $\mu\text{L L}^{-1}$ of C_2H_4 ; f) internal carbon dioxide concentration (ICO_2): samples of the same air extracted from the fruits used to IEC, were injected into a Dani[®] gas chromatograph, model Master GC, equipped with a 30 meters length capillary column Carboxen[™] 1006 Plot, for determination the ICO_2 . The temperatures of the column, the injector and the detector were 180, 90 and 230°C respectively. Results were expressed in $\text{mL } 100\text{mL}^{-1}$ of ICO_2 ; g) Ethylene production: determined through the storing of approximately 1.5 kg of fruits in a container with a volume of 5 liters, that was hermetically sealed for approximately one hour after which two aliquots of each container were drawn and injected into the same chromatograph to determinate ethylene. Results expressed in $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$; h) respiration rate: obtained from the same container of ethylene production analysis, using the same Dani[®] chromatograph to determinate ICO_2 . Data expressed in $\text{mL CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$; i) flesh firmness: determined with the aid of a penetrometer equipped with an 11mm probe model FT 327 (Effegi Systems, Milan, Italy) and expressed in Newton (N). j) decay incidence; k) flesh breakdown; l) mealiness; m) cavities; n) healthy fruits; and o) pulp crack: determined by counting the fruits that showed such disorder or quality. Data was presented in percentage; p) titratable acidity: evaluated by the titration with 0.1N NaOH of a solution with 10mL of juice diluted in 100mL of distilled water, until pH 8.1,

data was expressed in $\text{mEq } 100 \text{ mL}^{-1}$ and q) soluble solids: evaluated by refractometry of a sample of 1mL of juice, results expressed in °Brix.

6.1.3.5 Statistical analysis

The data were tested about its normality and errors homogeneities by the Lilliefors and Bartlett test, respectively. Data expressed in percentage was transformed by the formula $\arcsin \sqrt{x/100}$. Thereafter, an analysis of variance (ANOVA) was carried out for all the parameters evaluated. When the ANOVA was significant, the parameters were compared by Tukey's test, at 5% of probability of error. The experiment was conducted in a completely randomized design, with a two-way factorial arrangement (2×4). Pearson's correlation matrix was calculated in order to correlate the parameters evaluated in the study.

6.1.4 Results and discussion

During the storage period, the respiratory quotient was daily measured and the results are summarized in the figure 1. The respiratory quotient and the oxygen level from the RQ1.5 DCA and RQ2.0 DCA are also presented on this figure. On the two RQ DCA storage rooms the O_2 level must be changed along the storage period to maintain the same respiratory quotient, showing that the new DCA method is very efficient to detect LOL during storage. Another remarked fact is that the oxygen level decreased during storage, ranging from 0.58 until 0.10 kPa under RQ1.5 DCA and 0.58 until 0.09 kPa under RQ2.0 DCA (Figure 1). These results suggest that 'Fuji Suprema' apple do not tolerate initial low oxygen, but allow low oxygen level on the second half forwards of storage. In turn, these results explain the negatively effect of ILOs application in 'Fuji' apples (BRACKMANN et al. 2012). Thus, the results indicated that 'Fuji Suprema' apples need a conditioning to the low oxygen levels during the storage period and do not tolerate a dramatically reduction, such as ILOs and HW-DCA. In avocado fruit, a previous study suggest that under low oxygen the fruit inducing genes and proteins which possible participate on fruit adaptation to low oxygen (LOULAKAKIS et al., 2006). Perhaps, the fruit need a time to express these genes and so do not tolerate to low oxygen on the onset of storage.

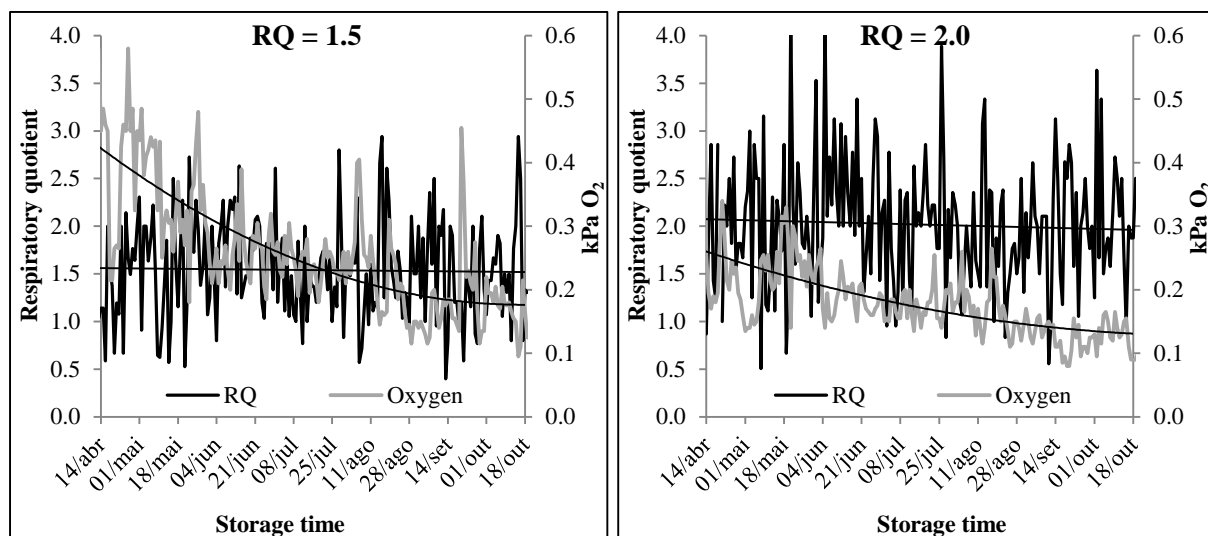


Figure 1 - Variation of respiratory quotient and oxygen level of 'Fuji Suprema' apples during storage under RQ1.5 DCA (A) and RQ2.0 DCA (B). Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, 2013.

The last step in the ethylene biosynthesis is the conversion of ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) to ethylene. This conversion is catalyzed by the ACC oxidase, therefore it is important to reduce the activity of this enzyme. On the present study, was verified a significant interaction between storage conditions and 1-MCP application (Table 1). Fruit with 1-MCP application showed the lowest ACC oxidase enzyme activity in all storage conditions. Possibly, the lower ACC oxidase enzyme activity on fruit treated with 1-MCP has relation with the lower *MdACO1* gene expression, which were decreased by 1-MCP application in 'Fuji' and 'Golden Delicious' apples (WAKASA et al., 2006; TATSUKI et al., 2007). Other researches also verified lower ACC oxidase in fruit treated with 1-MCP (BRACKMANN et al., 2012; BRACKMANN et al., 2013). Comparing the storage conditions in fruits which were treated with 1-MCP, there was not verified significant difference (Table 1), however, in fruit without 1-MCP, standard CA stored fruits showed the highest ACC oxidase enzyme activity, RQ1.5 DCA an intermediary and HW DCA and RQ2.0 DCA the lowest enzyme activity (Table 1). Perhaps, the lower ACC oxidase activity by fruits stored in DCA is a result of the higher ethanol production (Table 3). Some previously studies verified that the exogenous ethanol application reduced significantly the expression of *MC-ACO1*, *MC-ACO2* and *MC-ACO3* in sweet melons during storage (Jin et al., 2013) and *BO-ACO1* and *BO-ACO2* in broccoli (ASODA et al., 2009), occurring a reduction in the activity of this enzyme.

Table 1 – ACC oxidase enzyme activity, internal ethylene concentration (IEC) and ethylene production of ‘Fuji Suprema’ apples stored under controlled atmosphere (CA) and dynamic controlled atmosphere (DCA) by respiratory quotient (RQ DCA) and chlorophyll fluorescence (HW DCA) during 9 months plus 7 days of shelf life. Santa Maria, 2013.

Treatments	ACC oxidase enzyme (nL C ₂ H ₄ g ⁻¹ h ⁻¹)		Mean	IEC (μL L ⁻¹)		Mean
	With ^a 1-MCP	Without 1-MCP		With 1-MCP	Without 1-MCP	
At harvest		14.1			-	
CA	1.9Ba ^b	177.8Aa	89.8	0.2Ba	24.1Aa	12.2
HW DCA	1.1Ba	114.2Ac	57.7	0.1Ba	2.5Ad	1.3
RQ 1.5 DCA	1.3Ba	133.0Ab	67.2	0.1Ba	5.6Ac	2.8
RQ 2.0 DCA	1.0Ba	104.8Ac	52.9	0.1Ba	9.1Ab	4.6
Mean	1.3	132.5	-	0.1	10.3	-
	Ethylene production (μL C ₂ H ₄ kg ⁻¹ h ⁻¹)					
	Chamber opening			Seven days shelf life		
At harvest	0.13			0.13		
CA	0.02Ba ^b	5.36Aa	2.69	0.21Ba	8.84Aa	4.53
HW DCA	0.02Ba	0.84Ab	0.43	0.21Ba	2.11Ab	1.16
RQ 1.5 DCA	0.02Ba	0.75Ab	0.38	0.42Ba	3.31Ab	1.87
RQ 2.0 DCA	0.00Ba	0.53Ab	0.27	0.23Aa	1.07Ac	0.65
Mean	0.015	1.87	-	0.27	3.84	-

^a 1-methylcyclopropene application before fruit storage (1 μL L⁻¹).

^b Means followed by equals letters, uppercase in the line and lowercase in the columns, do not differ by Tukey's test at 5% of error probability.

Regarding to IEC, an interaction between 1-MCP and DCA storage conditions occur (Table 1). Again, fruits with 1-MCP application, exhibited the lowest IEC. The lower IEC had relation with the lower ACC oxidase enzyme activity in fruit treated with 1-MCP, once this enzyme catalyzes the last stage of ethylene biosynthesis (YANG; HOFFMANN, 1984). Comparing the storage condition, in fruit with 1-MCP application, there was not observed difference. However, for fruits without 1-MCP, the fruit stored in standard CA showed the highest IEC (Table 1). Once more, the higher IEC on this treatment can be attributed to the higher ACC oxidase activity, due to the reason that these two parameters have a positive *Pearson* correlation (Table 5). However, this result can be assigned to the high anaerobic respiration products (Table 3). Additional researches found that ethanol vapor application reduced the internal ethylene concentration on sweet melons (Jin et al., 2013) and its injection in the seed cavity was more effective to reduce the IEC in relation to sweet melon fruit treated with ethanol vapor (Liu et al., 2012), presenting that when the ethanol is inside the flesh its benefits on ethylene reduction is more expressive.

Ethylene production starts a succession of fruit ripening events, thus its reduction as low as possible maintains higher fruit quality after storage (BLANKENSHIP; DOLE, 2003; WATKINS, 2006). Soon after chamber opening and seven days of shelf life there was a significant interaction between the factors for ethylene production (Table 1). Fruit with 1-MCP application showed the lowest ethylene production in all treatment at chamber opening, but after seven days of shelf life the 1-MCP did not reduce the ethylene production on fruit stored under RQ2.0 DCA (Table 1). Probably, this is a result of the higher ethanol, acetaldehyde and ethyl acetate production by fruits submitted to RQ2.0 DCA (Table 3), which among them, the acetaldehyde has higher effect on ethylene suppression than the other anaerobic respiration products (PESIS, 2005). On 'Fuji' apples submitted to an initial low oxygen stress and afterward stored under ULO CA, the 1-MCP also did not reduce ethylene production and not brought benefits on quality maintenance (BRACKMANN et al., 2012). The effect of the anaerobic products can be on the ACC synthase and ACC oxidase enzyme activity, especially on the expression of genes related to these enzymes (ASODA et al., 2009; JIN et al., 2013).

Either at opening of chambers or 7 days of shelf life there was a significant interaction between the factors for respiration rate (Table 2). At chamber opening there was no significant difference between the CA and DCA storage condition, either with or without 1-MCP, but fruit treated with 1-MCP exhibited lower respiration rate in all storage condition, with the exception HW DCA (Table 2). This is a result of the lower ICO_2 , IEC and ethylene production, as soon as these parameters have a high and positive *Pearson* correlation (Table 5). Another research also assigns that the respiration is an ethylene dependent process (PRE-AYMARD et al., 2003). After 7 days of shelf life, independently of CA or DCA storage condition, 1-MCP application reduced the respiration rate. This result, combined with the lower ethanol, acetaldehyde and ethyl acetate (Table 3), demonstrate that the 1-MCP reduces the aerobic and also the anaerobic respiration throughout the storage. Some previously researches suggest that 1-MCP application reduced the climacteric peak and so the respiration rate (WATKINS, 2006).

The ICO_2 can induce some physiological disorders (flesh breakdown, mealiness and cavities), specially in susceptible apples cultivars (CASTRO et al., 2007 and 2008). However, on the present study the ICO_2 did not show a correlation with the cavities (Table 5) and it was not observed flesh breakdown and mealiness. Fruit with 1-MCP exhibited lower or the same ICO_2 in relation to fruit without 1-MCP and never higher ICO_2 (Table 2). Regarding to fruits with 1-MCP, RQ1.5 and RQ2.0 DCA showed the lowest ICO_2 in relation to the standard CA storage. Nevertheless, in fruits without 1-MCP all the DCA methods showed lower ICO_2 in relation standard CA (Table 2). Perhaps, the lower ICO_2 in fruits stored under DCA conditions

maintained higher cell wall integrity, indicated by the higher flesh firmness (Table 3) and the inverse *Pearson* correlation between these two parameters (Table 5), once researches proven that the CO₂ diffusion throughout the flesh occurs in the pores surround the cell (SCHOTSMANS et al., 2004).

Table 2 – Respiration rate, internal dioxide carbon concentration (ICO₂) and titratable acidity of ‘Fuji Suprema’ apples stored under controlled atmosphere (CA) and dynamic controlled atmosphere (DCA) by respiratory quotient (RQ DCA) and chlorophyll fluorescence (HW DCA) during 9 moths. Santa Maria, 2013.

Treatments	Respiration rate (mL CO ₂ kg ⁻¹ h ⁻¹)					
	Chamber opening			Seven days shelf life		
	Witha 1-MCP	Without 1-MCP	Mean	With 1-MCP	Without 1-MCP	Mean
At harvest			4.95			
CA	3.7Ba	5.1Aa	4.4	4.9Ba	11.1Aa	8.0
HW DCA	4.1Aa	4.5Aa	4.3	4.5Ba	7.7Ab	6.1
RQ 1.5 DCA	3.5Ba	5.2Aa	4.4	4.9Ba	8.4Ab	6.7
RQ 2.0 DCA	3.5Ba	4.9Aa	4.2	4.0Ba	5.2Ac	4.6
Mean	3.7	4.9	-	4.6	8.1	-
	ICO ₂ (mL 100mL ⁻¹)			Titratable acidity (mEq 100mL ⁻¹)		
At harvest		-			5.1	
CA	3.2Ba	9.4Aa	6.3	3.7Aab	2.9Bb	3.3
HW DCA	1.9Aab	2.6Ab	2.2	4.0Aa	3.2Ba	3.6
RQ 1.5 DCA	1.3Bb	2.6Ab	1.9	4.0Aa	3.1Bab	3.5
RQ 2.0 DCA	1.6Ab	2.4Ab	2.0	3.5Ab	3.4Aa	3.4
Mean	2	4.2	-	3.8	3.2	-

^a 1-methylcyclopropene application before fruit storage (1 µL L⁻¹).

^b Means followed by equals letters, uppercase in the line and lowercase in the columns, do not differ by Tukey's test at 5% of error probability.

The acetaldehyde, ethanol and ethyl acetate are anaerobic metabolites produced by apples even under aerobic conditions (PESIS, 2005). However, these anaerobic metabolism products are more important when the apples are stored under ULO or DCA. There was a significant interaction for the three anaerobic metabolites (Table 3). Fruit treated with 1-MCP and after stored under RQ1.5 and RQ2.0 DCA presented lower acetaldehyde, ethanol and ethyl acetate in relation fruit without 1-MCP. Again is proven that the 1-MCP decrease significantly the anaerobic metabolism of fruits stored under RQ DCA. Another research also verified lower acetaldehyde, ethanol and ethyl acetate on fruits treated with 1-MCP before CA storage (LEE

et al., 2012). Some studies attribute the occurrence of physiological disorders, such as flesh breakdown, mealiness and cavities, to the production of anaerobic metabolites (PESIS, 2005; Lee et al. 2012), but these authors did not explain at what concentration anaerobic metabolites cause damage to the fruit cells. On the present study the ethanol production was very high in fruits stored under RQ2.0 DCA, specially without 1-MCP (Table 3), nevertheless, it was not observed any symptom of flesh breakdown or mealiness. Perhaps, the absence of these physiological disorders is a result to the higher anaerobic metabolites, once recently studies with sweet melons (JIN et al., 2013) and sweet cherries (BAI et al., 2012) verified high post storage quality when fruits were treated with ethanol vapor.

The acetaldehyde is more effective on the reduction of ethylene synthesis than ethanol and ethyl acetate (PESIS, 2005). However, the acetaldehyde is more toxic to the fruit tissue and can cause damage. In reason of that the acetaldehyde is transformed in ethanol by the enzyme alcohol dehydrogenase (ADH) and acetyl coenzyme A by the enzyme aldehyde dehydrogenase (ALDH) (PESIS, 2005; LEE et al., 2012). The ethanol is after converted in ethyl acetate and ethyl 2-methylbutyrate (LEE et al., 2012) and other ethyl esters. On the table 3 it was observed that there is a high ethanol concentration and low of acetaldehyde and ethyl acetate in all treatments. This result suggests that was an unbalance between the two enzymes cited previously.

Contrasting the different storage conditions with 1-MCP, the RQ2.0 DCA condition, resulted in higher acetaldehyde, ethanol and ethyl acetate production (Table 3). The same table shows that fruit stored under HW DCA and RQ1.5 DCA showed a similar anaerobic metabolism; and fruit stored in standard CA showed the lowest anaerobic metabolism, according the ethanol concentration. However, fruits stored without 1-MCP under HW DCA, did not present higher anaerobic metabolites production, exhibiting that this storage method did not reduce the oxygen level below the aerobic compensation point (ACP). Probably, 'Fuji Suprema' apples change the metabolism from aerobic to anaerobic under O_2 levels below to 0.4 kPa, explaining the low anaerobic products on fruit stored under HW DCA. A recent study show that on 'Honeycrisp' and 'Delicious' apples the ACP occurs on 0.8 kPa O_2 at harvest and after three months of storage the ACP reduced until 0.5 kPa O_2 (WRIGHT et al., 2012). This finding demonstrate that on the onset of storage fruit stored under HW DCA probably stayed under anaerobic metabolism, but after a time of storage (3 up to 4 months) the apples change their metabolism to aerobic respiration due to the ACP reduction. The reduction in ACP can be observed in apples stored under RQ DCA (Figure 1). Perhaps, the reduction in the ACP is a result of the expression of genes related to the adaptation of fruit to low oxygen

(LOULAKAKIS et al., 2006) and this expression can need some time, explaining the ACP reduction during storage.

Table 3 – Ethanol acetaldehyde, ethyl acetate and flesh firmness of ‘Fuji Suprema’ apples stored under controlled atmosphere (CA) and dynamic controlled atmosphere (DCA) by respiratory quotient (RQ DCA) and chlorophyll fluorescence (HW DCA) during 9 moths plus 7 days of shelf life. Santa Maria, 2013.

Treatments	Ethanol ($\mu\text{L L}^{-1}$)		Mean	Acetaldehyde ($\mu\text{L L}^{-1}$)		Mean
	With ^a 1-MCP	Without 1-MCP		With 1-MCP	Without 1-MCP	
At harvest	-	-	-	-	-	-
CA	95.0Ac ^b	87.3Ac	91.2	2.4Ab	3.0Ac	2.7
HW DCA	136.2Ab	100.6Bc	118.4	2.0Bb	3.6Ac	2.8
RQ 1.5 DCA	139.3Bb	347.0Ab	243.2	2.7Bb	11.2Ab	7.0
RQ 2.0 DCA	276.6Ba	2419.6Aa	1348.1	13.0Ba	30.1Aa	21.6
Mean	161.8	738.6	-	5.0	12.0	-
	Ethyl acetate ($\mu\text{L L}^{-1}$)		Mean	Flesh firmness (N)		Mean
At harvest	-	-	-	89.6	-	-
CA	0.7Ab	0.8Ac	0.7	83.3Ab	76.0Bb	79.6
HW DCA	1.0Ab	0.5Bc	0.7	86.3Aab	80.2Ba	83.3
RQ 1.5 DCA	0.9Bb	4.4Ab	2.7	87.0Aa	82.7Ba	84.8
RQ 2.0 DCA	4.9Ba	13.4Aa	9.1	84.8Aab	82.9Aa	83.9
Mean	1.9	4.8	-	85.4	80.5	-

^a 1-methylcyclopropene application before fruit storage ($1 \mu\text{L L}^{-1}$).

^b Means followed by equals letters, uppercase in the line and lowercase in the columns, do not differ by Tukey's test at 5% of error probability.

One of the main quality attributes of apples is the flesh firmness. There is a significant interaction between 1-MCP application and storage conditions for flesh firmness (Table 3). In all the storage condition the 1-MCP application maintains higher flesh firmness, with the exception fruit stored under RQ2.0 DCA (Table 3). This result shows that 1-MCP application does not have any advantage for the RQ2.0 DCA. Probably, the absence of effect is a result of the extremely low oxygen level employed on this treatment, once other studies also observed no benefits on fruit treated with 1-MCP and stored under HW DCA (ZANELLA et al., 2008) and ULO (BRACKMANN et al., 2012 and 2013). On fruits treated with 1-MCP, the storage under RQ1.5 DCA, maintain the flesh firmness higher than fruit stored under standard CA, however not differing from RQ2.0 DCA and HW DCA. On the other hand, on fruit without 1-MCP, all the DCA techniques maintain higher flesh firmness in relation CA storage. The higher flesh firmness on these treatments is a result of the lower IEC, ICO_2 , ethylene production and

respiration rate, due to the inverse *Pearson* correlation between these parameters (Table 5). A lower IEC and ethylene production culminated in lower cell wall enzyme activity, as soon as ethylene is necessary to initialize these enzymes activity (NISHIYAMA et al., 2007; PRASANNA et al., 2007; GOULAO; OLIVEIRA, 2008; PAYASI et al., 2009).

Table 4 – Decay incidence, cavities, healthy fruits and soluble solids of ‘Fuji Suprema’ apples stored under controlled atmosphere (CA) and dynamic controlled atmosphere (DCA) by respiratory quotient (RQ DCA) and chlorophyll fluorescence (HW DCA) during 9 moths plus 7 days of shelf life. Santa Maria, 2013.

Treatments	Decay incidence (%)			Mean	Cavities (%)		Mean
	With ^a 1-MCP	Without 1-MCP			With 1-MCP	Without 1-MCP	
At harvest	-	-	-	-	-	-	-
CA	10.1	10.7	10.4a	1.3	0.0	0.6a	
HW DCA	11.0	7.6	9.3a	4.8	0.0	2.4a	
RQ 1.5 DCA	14.2	7.5	10.9a	2.6	0.0	1.3a	
RQ 2.0 DCA	10.0	7.4	8.7a	2.5	0.0	1.3a	
Mean	11.3A ^b	8.3A	-	2.8A	0.0B	-	
	Healthy fruits (%)			Mean	Soluble solids (°Brix)		Mean
At harvest	-	-	-	-	13.2	-	-
CA	89.9	89.3	89.6a	14.0	14.2	14.1a	
HW DCA	84.2	91.1	87.6a	14.1	14.2	14.1a	
RQ 1.5 DCA	84.5	91.3	87.9a	14.1	13.8	13.9a	
RQ 2.0 DCA	86.3	92.6	89.4a	13.9	13.8	13.8a	
Mean	86.2B	91.0A	-	14.0A	14.0A	-	

^a 1-methylcyclopropene application before fruit storage (1 µL L⁻¹).

^b Means followed by equals letters, uppercase in the line and lowercase in the columns, do not differ by Tukey's test at 5% of error probability.

Regarding the titratable acidity, also was verified significant interaction between the factors tested (Table 2). Fruit treated with 1-MCP showed higher organic acid concentration in all the storage conditions, with the exception fruit stored under RQ2.0 DCA. The lower organic acidity consumption in fruit treated with 1-MCP is a result of lower IEC, ethylene production and respiration rate (Table 5). The higher titratable acidity in fruit treated with 1-MCP is a result of lower Krebs cycle, once organic acids are used as substrate of this cycle (STEFFENS et al., 2007; Taiz and Zeiger, 2010). In the other hand, the absence of 1-MCP effect under RQ2.0 DCA is a result of the extremely low oxygen employed throughout the storage, as soon as studies with ‘Royal Gala’ (BRACKMANN et al., 2010) and ‘Fuji’ apples (BRACKMANN et

al., 2012) also not found benefits in organic acid maintenance. Matching the different storage conditions with 1-MCP, lower acid content was detected on fruit stored under RQ2.0 DCA in relation RQ1.5 and HW DCA. However, on fruit without 1-MCP, higher titratable acidity was observed on RQ2.0 and HW DCA in relation standard CA (Table 2). This result is in agreement with Lafer (2008) who also found higher titratable acidity in ‘Braeburn’ apples stored under HW DCA.

Table 5 – Pearson correlation between ethylene production (Eth.), respiration rate (Resp.), internal ethylene concentration (IEC), internal dioxide carbon concentration (ICO₂), titratable acidity (TA), healthy fruits (H.fr.), cavities (Cav.), flesh firmness (Firm.), ACC oxidase enzyme activity (ACC), ethanol (EtOH), acetaldehyde (AA) and ethyl acetate (EtAC) of ‘Fuji Suprema’ apples stored under controlled atmosphere and dynamic controlled atmosphere (DCA) by respiratory quotient and chlorophyll fluorescence during 9 months plus 7 days of shelf life. Santa Maria, 2013.

Corr.	Eth.	Resp.	IEC	ICO ₂	TA	H.fr.	Cav.	Firm.	ACC	EtOH	AA	EtAC
Eth.	1											
Resp.	0.95	1										
IEC	0.93	0.82	1									
ICO ₂	0.93	0.82	0.92	1								
TA	-0.79	-0.83	-0.75	ns	1							
H.fr.	ns	ns	ns	ns	ns	1						
Cav.	ns	ns	ns	ns	ns	-0.91	1					
Firm.	-0.88	-0.88	-0.87	-0.87	0.88	ns	0.75	1				
ACC	0.84	0.89	0.81	ns	-0.82	ns	-0.83	-0.86	1			
EtOH	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1		
AA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.94	1	
EtAC	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.95	0.99	1

ns: No significant *pearson* correlation between the variables ($p < 0.05$).

1-MCP and storage conditions did not affect the decay incidence and the soluble solids content (Table 4). In relation to physiological disorders, only cavities were observed (Table 4). However, do not occur interaction between the factor tested and no significant difference between the DCA storage conditions. Nevertheless, the comparison of fruits with and without 1-MCP shows that 1-MCP application increase significantly the cavities incidence, independently of the storage condition adopted. Perhaps, the higher incidence of this physiological disorder is a result of insufficient energy supply to maintain the cell compartmentalization, resulting in cell damage, once there are a lower aerobic and anaerobic

respiration on fruit treated with 1-MCP (Tables 2 and 3). The lower respiration could be result in low energy production (ATP and NADH) and result in loss of cell integrity (PEDRESCHI et al., 2009; HO et al., 2013). For 'Braeburn' apples, the storage under HW DCA combined with 1-MCP application resulted in fruit with higher cavities incidence in relation fruits without 1-MCP (LAFER, 2008). Some previously studies suggest that 1-MCP increase the CO₂ damage in apples (ARGENTA et al., 2010; JUNG; WATKINS, 2011).

In relation to healthy fruit percentage, there was not observed significant interaction between the factors tested (Table 4). Comparing the main effect of the storage condition also was not identified significant difference. However, when we compare fruit with and without 1-MCP, higher healthy fruit percentage was observed on fruit without 1-MCP. The higher healthy fruit is a result of absence on cavities incidence on fruits without 1-MCP. The inverse relation between healthy fruits and cavities incidence is proved by the negative *Pearson's* correlation (Table 5). The amount of healthy fruits is a very important parameter for the storer companies, once health fruit loss results in marked quality loss. A noteworthy fact is that even fruit with 1-MCP application, which suppose reduced fruit internal quality, results in high level of healthy fruit if compared to other works with 'Fuji' and 'Royal Gala' apples (BRACKMANN et al., 2012 and, 2013).

6.1.5 Conclusions

The new RQ DCA is an efficient method to detect the LOL of 'Fuji Suprema' apples, and therefore, allows the induction of anaerobic metabolism at safety levels and could be a good DCA storage method.

To maintain the same RQ throughout the storage oxygen level must be changed and there is a reduction on its levels.

RQ1.5 DCA is the most indicate for 'Fuji Suprema' apples storage, however, RQ2.0 DCA did not differ from QR1.5 DCA.

1-MCP application preserves higher flesh firmness and reduces the anaerobic metabolism, however decrease internal fruit quality by the cavities occurrence.

The 1-MCP application did not brings benefits on quality maintenance on apples stored under RQ2.0 DCA.

6.1.6 References

ARGENTA, L.C., MATTHEIS, J.P., FAN, X. Interactive effects of CA storage 1-methylcyclopropene and methyl jasmonate on quality of apple fruit. **Acta Horticulturae**, v.857, p.259–266, 2010.

ASODA, T., TERAJ, H., KATO, M., SUZUKI, Y. Effects of postharvest ethanol vapor treatment on ethylene responsiveness in broccoli. **Postharvest Biology and Technology**, v.52, p.216-220, 2009.

BAI, J., PLOTTO, A., SPOTTS, R., RATTANAPANONE, N. Ethanol vapor and saprophytic yeast treatments reduce decay and maintain quality of intact and fresh-cut sweet cherries. **Postharvest Biology and Technology**, v.62, p.204-212, 2011.

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

BRACKMANN, A., ANESE, R.O., PINTO, J.AV., BOTH, V., VENTURI, T.L., SCHORR, M.R.W. Aplicação de 1-metilciclopropeno e absorção de etileno em maçãs cultivar ‘Royal Gala’ colhida tardiamente. **Ciência Rural**, v.40, p.2074-2080, 2010.

BRACKMANN, A., ANESE, R.O., WEBER, A., BOTH, V., GASPERIN, A.R., PAVANELLO, E.P. Efeito do estresse inicial por baixo O₂ combinado com 1-metilciclopropeno na conservação de maçãs ‘Royal Gala’ armazenadas com ultrabaixo O₂. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, p.1185-1194, 2013.

BRACKMANN, A., GASPERIN, A. R., BOTH, V.; PAVANELLO, E. P., SCHORR, M. R. W., ANESE, R. O. Aplicação de 1-metilciclopropeno, estresse inicial com baixo oxigênio e armazenamento em ultrabaixo oxigênio na qualidade de maçã ‘Fuji’. **Ciência Rural**, v.42, p.1386-1391, 2012.

BUFLER, G. Ethylene-promoted conversion of 1-aminocyclopropene-1-carboxylic acid to ethylene in peel of apple at various stages of fruit development. **Plant Physiology**, v.80, p.539-543, 1986.

BULENS, I., VAN DE POEL, B., HERTOOG, M.L.A.T.M., DE PROFT, M.P., GEERAERD, A.H., NICOLAI, B.M. Influence of harvest time and 1-MCP application on postharvest ripening and ethylene biosynthesis of ‘Jonagold’ apple. **Postharvest Biology and Technology**, v.72, p.11-19, 2012.

CASTRO, E., BARRETT, D.M., JOBLING, J., MITCHAM, E.J. Biochemical factors associated with a CO₂-induced flesh browning disorder of Pink Lady apples. **Postharvest Biology and Technology**, v.48, p.182-191, 2008.

CASTRO, E., BIASI, B., MITCHAM, E., TUSTIN, S., TANNER, D., JOBLING, J. Carbon dioxide-induced flesh browning in Pink Lady apples. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.132, p.713–719, 2007.

DeELL, J.R., Van KOOTEN, O., PRANGE, K.R. and MURR, D.P. Applications of chlorophyll fluorescence techniques in post-harvest physiology. **Horticultural Reviews**, v.23, p.69-107, 1999.

Fawbush, F., Nock, J.F., Watkins, C.B. Antioxidant contents and activity of 1-methylcyclopropene (1-MCP)-treated 'Empire' apples in air and controlled atmosphere storage. **Postharvest Biology and Technology**, v.52, p.30-37, 2009.

GASSER, F., EPPLER, T., NAUNHEIM, W., GABIOUD, S., NISING, A. B. Dynamic CA storage of apples: monitoring of the critical oxygen concentration and adjustment of optimum conditions during oxygen reduction. **Acta Horticulturae**, v.796, p.69-76, 2008.

GOULAO, L.F., OLIVEIRA, C.M. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. **Food Science and Technology**, v.19, p.4-25, 2008.

HO, Q.T., VERBOVEN, P., VERLINDEN, B.E., SCHENK, A., NICOLAÏ, B. M. Controlled atmosphere storage may lead to local ATP deficiency in apples. **Postharvest Biology and Technology**, v.78, p.103-112, 2013.

JIN, Y.Z., LV, D.Q., LIU, W.W., QI, H.Y., BAI, X.H. Ethanol vapor treatment maintains postharvest storage quality and inhibits ethylene biosynthesis during storage of oriental sweet melons. **Postharvest Biology and Technology**, v.86, p.372-380, 2013.

JUNG, S.K., WATKINS, C.B. Involvement of ethylene in browning development of controlled atmosphere-stored 'Empire' apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.59, p.219–226, 2011.

LAFER, G. Storability and fruit quality of 'Braeburn' apples as affected by harvest date, 1-MCP treatment and different storage conditions. **Acta Horticulturae**, v.796, p.179-184, 2008.

LEE, J., RUDELL, D.R., DAVIES, P.J., WATKINS, C.B. Metabolic change in 1-methylcyclopropene (1-MCP)-treated 'Empire' apple fruit during storage. **Metabolomics**, v.8, p.742-753, 2012.

LIU, W.W., QI, H.Y., XU, B.H., LI, Y., TIAN, X.B., JIANG, Y.Y., XU, X.F., LV, D.Q. Ethanol treatment inhibits internal ethylene concentration and enhances ethyl ester production during storage of oriental sweet melons (*Cucumis melo* var. *Makuwa* Makino). **Postharvest Biology and Technology**, v.67, p.75-83, 2012.

LOULAKAKIS, C.A., HASSAN, M., GERASOPOULOS, D., KANELIS, A.K. Effect of low oxygen on in vitro translation products of poly(A)⁺ RNA, cellulase and alcohol dehydrogenase expression in preclimacteric and ripening-initiated avocado fruit **Postharvest Biology and Technology**, v.39, p.29-37, 2006.

MA, B., CUI, M., SUN, H., TAKADA, K., MORI, H., KAMADA, H., EZURA, H. Subcellular localization and membrane topology of the melon ethylene receptor *CmERS1*. **Plant Physiology**, v.141, p.587-597, 2006.

MANNAPPERUMA, J.D., SINGH, R.P., MONTERO, M.E. Simultaneous gas diffusion and chemical reaction in foods stored in modified atmosphere. **Journal of Food Engineering**, v.14, p.167-183, 1991.

NISHIYAMA, K., GUI, M., ROSE, J.K.C., KUBO, Y., BENNETT, K.A.B., LU, W., KATO, K., KOICHIRO, U., RYOHEI, N., AKITSUGU, I., MONDHER, B., ALAIN, L., JEAN-CLAUDE, P., BENNETT, A.B. Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in charentais melon. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.1281-1290, 2007.

PAYASI, A. MISHRA, N.N., CHAVES, A.L.S., SINGH, R. Biochemistry of fruit softening: an overview. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, v.15, p.103-113, 2009.

PEDRESCHI, R., FRANCK, C., LAMMERTYN, J., ERBAN, A., KOPKA, J., HERTOOG, M., VERLINDEN, B., NICOLAÏ, B. Metabolic profile of 'Conference' pears under low oxygen stress. **Postharvest Biology and Technology**, v.51, p.123-130, 2009.

PESIS, E. The role of the anaerobic metabolites, acetaldehyde and ethanol, in fruit ripening, enhancement of fruit quality and fruit deterioration. **Postharvest Biology and Technology**, v.37, p.1-19, 2005.

PRANGE, R.K., DeLONG, J.M., HARRISON, P., McLEAN, S., SCRUTTON, J., CULLEN, J. Method and apparatus for monitoring a condition in chlorophyll containing matter. **U.S. Patent**, n.WO/2002/006795, 2007.

PRASANNA, V., PRABHA, T.N., THARANATHAN, R.N. Fruit ripening phenomena - an overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.47, p.1-19, 2007.

PRE-AYMARD, C., WEKSLER, A., LURIE, S. Responses of 'Anna', a rapidly ripening summer apple, to 1-methylcyclopropene. **Postharvest Biology and Technology**, v.27, p.163-170, 2003.

SAQUET, A.A., STREIF J. Fermentative metabolism in 'Jonagold' apples under controlled atmosphere storage. **European Journal of Horticultural Science**, v.73, p.43-46, 2008.

SCHOTSMANS, W., VERLINDEN, B.E., LAMMERTYN, J., NICOLAI, B.M. The relationship between gas transport properties and the histology of apple. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.84, p.1131-1140, 2004.

STEFFENS, C.A., BRACKMANN, A., PINTO, J.A.V., EISERMANN, A.C. Taxa respiratória de frutas de clima temperado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.313-321, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant Physiology*. 5.ed. Massachusetts : Sinauer, 2010. 782p.

TATSUKI, M., ENDO, A., OHKAWA, H. Influence of time from harvest to 1-MCP treatment on apple fruit quality and expression of genes for ethylene biosynthesis enzymes and ethylene receptors. **Postharvest Biology and Technology**, v.43, p.28-35, 2007.

VELTMAN, R.H., VERSCHOOR, J.A., RUIJSCH Van DUGTEREN, J.H. Dynamic control system (DCS) for apples (*Malus domestica* Borkh. cv. 'Elstar'): optimal quality through storage based on products response. **Postharvest Biology and Technology**, v.27, p.79-86, 2003.

WAKASA, Y., KUDO, H., ISHIKAWA, R., AKADA, S., SENDA, M., NIIZEKI, M., HARADA, T. Low expression of an endopolygalacturonase gene in apple fruit with long-term storage potential. **Postharvest Biology and Technology**, v.39, p.193-198, 2006.

WATKINS, C.B. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruit and vegetables. **Biotechnology Advances**, v.24, p.389-409, 2006.

WRIGHT, A.H., DeLONG, J.M., GUNAWARDENA, A.H.L.A.N., PRANGE, R.K. Dynamic controlled atmosphere (DCA): Does fluorescence reflect physiology in storage? **Postharvest Biology and Technology**, v.64, p.19-30, 2012.

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

ZANELLA, A., CAZZANELLI, P., PANARESE, A., COSER, M., CECCHINEL, M. and ROSSI, O. Fruit fluorescence response to low oxygen stress: Modern storage technologies compared to 1-MCP treatment of apple. **Acta Horticulturae**, v.682, p.1535-1542, 2005.

ZANELLA, A., CAZZANELLI, P., ROSSI, O. Dynamic Controlled Atmosphere (DCA) Storage by the Means of Chlorophyll Fluorescence Response for Firmness Retention in Apple. **Acta Horticulturae**, v.796, p.77-82, 2008.

7 DISCUSSÃO

A atmosfera controlada dinâmica estudada e desenvolvida nesta tese de doutorado surgiu a partir de quatro princípios e conhecimentos prévios descobertos durante o desenvolvimento de outras pesquisas, sendo eles: 1) observação de que o armazenamento de maçãs ‘Royal Gala’ em atmosfera controlada convencional com pressões parciais ultrabaixas de oxigênio (abaixo de 1 kPa) resulta em danos às maçãs (WEBER et al., 2011), porém, a aplicação de etanol em maçãs armazenadas em AC (1,2kPa O₂ e 2,0 kPa CO₂) resultou em uma significativa alteração do metabolismo que culminou com maior retenção da firmeza de polpa (WEBER, 2010); 2) a qualidade das maçãs após o prolongado período de armazenamento em atmosfera controlada convencional era bastante inferior a do momento de colheita das frutas, ocorrendo uma redução de 10 a 20 N na sua firmeza de polpa e com apenas 60% de frutas totalmente sadias no final do armazenamento (WEBER et al., 2011; 2013a; BRACKMANN et al., 2012a). Estes valores indicam que, mesmo com o uso da melhor combinação de AC, ainda ocorrem muitas perdas durante sete ou oito meses de armazenamento; 3) a detecção do limite mínimo de oxigênio na atmosfera controlada dinâmica utilizada comercialmente (HarvestWatchTM) induz a um estresse inicial por baixo oxigênio. Brackmann et al. (2012a; 2013) verificaram que o estresse inicial por baixo oxigênio nas maçãs ‘Fuji’ e ‘Royal Gala’ não resultou em maior retenção da qualidade quando comparado à atmosfera controlada estática e, além disso, induziu maior porcentagem de distúrbios fisiológicos; e 4) a atmosfera controlada dinâmica desenvolvida para reduzir estas perdas apresenta elevação de custos de aquisição de equipamento para as empresas armazenadoras de maçãs.

Levando em consideração as evidências apontadas acima iniciou-se a condução de experimentos objetivando induzir a produção de etanol pela própria fruta, com uso de pressões parciais de oxigênio extremamente baixas (abaixo de 0,5kPa) controladas de forma dinâmica, sem a indução de um estresse inicial, porém, sempre objetivando atingir o limite mínimo de oxigênio tolerado pela fruta. Para conhecer o limite mínimo de oxigênio que a maçã pode tolerar, foram testados inicialmente diferentes quocientes respiratórios (2, 4, 6 e 8), ou seja, permitindo alta produção de CO₂ para cada O₂ produzido no mesmo intervalo de tempo. Para os quocientes acima de 4 (alta taxa fermentativa) as maçãs apresentaram maior incidência de distúrbios fisiológicos, redução na firmeza de polpa e, além disso, sabor alcoólico na polpa. Portanto, no segundo ano de experimentos reduziu-se consideravelmente o QR usando 1,5, 2 e

4, objetivando diminuir a taxa fermentativa. A partir desse momento observou-se que o QR1,5 apresentou o melhor ajuste e que taxa fermentativa acima do QR2 já resultava em danos às células das maçãs.

As três cultivares de maçãs, 'Royal Gala', 'Fuji Suprema' e 'Braeburn', não apresentaram muita variação quanto ao melhor QR para controlar a ACD, sendo que, o melhor QR foi o mais baixo testado, ou seja, o QR1,5. Entretanto, nos resultados obtidos no experimento com as maçãs 'Fuji Suprema', foi observado que além do QR1,5, pode-se usar o QR2,0, sem induzir qualquer dano às frutas devidos ao baixo oxigênio ou ao excesso de etanol. Este experimento deverá ser repetido para comprovar a maior tolerância da maçã 'Fuji Suprema' com QR mais elevados e, conseqüentemente, maior taxa fermentativa.

A ocorrência de distúrbios fisiológicos em maçãs 'Fuji' se manifesta, principalmente, como escurecimento da polpa em decorrência da excessiva redução da temperatura (BRACKMANN et al., 2011) ou como danos à epiderme devido às altas pressões parciais de CO₂ (ARGENTA et al., 2002). Entretanto, a redução da pressão parcial de oxigênio normalmente não induz a ocorrência de distúrbios. Brackmann et al. (2012a) observaram que a redução do oxigênio para até 0,6kPa, associado ou não ao estresse inicial com 0,2kPa por duas semanas, não resultou em indução de degenerescência em maçãs 'Fuji'. A maçã 'Fuji Suprema' parece ser mais tolerante à redução da pressão parcial de oxigênio e, portanto, permitir o armazenamento em ACD com QR2,0. Já as maçãs 'Braeburn' não toleraram o controle da ACD pelo QR2,0. As maçãs 'Royal Gala' apresentaram maiores diferenças em relação ao tratamento controle, ou seja, maior manutenção da qualidade, quando o controle da ACD foi com o QR1,5 (artigo 3 - 2º ano de condução de experimento) que com o QR2,0 (artigo 1 - 1º ano de condução de experimentos). Portanto, as cultivares Royal Gala e Braeburn não toleram altas taxas fermentativas.

Para estudar o efeito fisiológico da atmosfera controlada dinâmica monitorada pelo quociente respiratório sobre a manutenção da firmeza de polpa e redução de distúrbios fisiológicos, conduziu-se um experimento avaliando a aplicação de etanol (composto natural oriundo da fermentação) após o armazenamento das maçãs em atmosfera controlada convencional. Observou-se que o etanol tem efeito direto sobre a rota de síntese de etileno, mesmo em pressões parciais atmosféricas normóxicas de oxigênio (20,8kPa). Com a redução da síntese de etileno a atividade de enzimas dependentes da ativação por este fito-hormônio também foram reduzidas. Portanto, o efeito sobre a manutenção da firmeza de polpa e outros atributos de qualidade na atmosfera controlada dinâmica desenvolvida nesta tese, não é apenas

dependente diretamente do uso de baixas pressões parciais de oxigênio, mas também ao efeito associado do etanol na inibição da síntese e, conseqüentemente, da ação do etileno.

Weber et al. (2011; 2013c) e Brackmann et al. (2012b) verificaram que a pressão parcial de oxigênio usada no armazenamento em atmosfera controlada convencional sofre forte interação com a temperatura de armazenamento. Portanto, por utilizar pressões parciais de oxigênio extremamente baixas na ACD, testou-se o efeito da interação com a temperatura, ou seja, utilização de temperaturas de armazenamento mais altas que as convencionalmente utilizadas. Os resultados apontam que em condições dinâmicas de oxigênio a temperatura de armazenamento pode ser aumentada para 3°C em maçãs ‘Braeburn’ cultivadas na Alemanha, e para 1,5°C, em maçãs ‘Royal Gala’ cultivadas no Brasil. A elevação da temperatura não resultou em maior ocorrência de distúrbios fisiológicos ou perda de firmeza de polpa e, portanto, pode ser utilizada como forma de reduzir gasto de energia elétrica nos sistemas de armazenagem.

Segundo McCormick et al. (2010; 2012) e Streif et al. (2010) pode-se reduzir em até 35% o gasto de energia elétrica aumentando a temperatura de 1,5 para 4°C no armazenamento de maçãs ‘Gala’ na Alemanha. Com essa elevação da temperatura estes pesquisadores reduziram o custo de energia elétrica de € 1550,00 para € 1000,00 em uma câmara comercial de 200 toneladas de maçãs. Uma alternativa para possibilitar o aumento da temperatura de armazenamento é a sua associação com a aplicação de 1-metilciclopropeno. Os resultados dos experimentos indicam que em maçãs ‘Royal Gala’ a aplicação de 1-MCP, quando associado ao armazenamento em atmosfera controlada dinâmica, resultou em menor taxa respiratória aeróbica e anaeróbica e, conseqüentemente, manteve maior teor de sólidos solúveis, entretanto, não tem efeito na manutenção da firmeza de polpa em condições de ACD. Porém, a associação do 1-MCP com ACD e alta temperatura não foi testada.

A ACD pela medição da fluorescência de clorofilas resultou em maçãs com melhor qualidade que às maçãs armazenadas em AC convencional, entretanto, normalmente inferior àquelas armazenadas em ACD pelo método do quociente respiratório.

Após os ajustes do quociente respiratório mais adequado para controlar a ACD, foi desenvolvido em conjunto com uma empresa de automação de máquinas e processos (Valis Automação), um programa específico para controlar as câmaras experimentais e comerciais de atmosfera controlada dinâmica a partir do quociente respiratório.

8 CONCLUSÃO GERAL

A atmosfera controlada dinâmica monitorada pelo quociente respiratório acima de 2,0 resulta em danos aos tecidos e sabor alcoólico da polpa das maçãs, portanto, não indicada para monitorar a ACD.

O QR mais adequado para armazenagem de maçãs ‘Royal Gala’ e ‘Fuji Suprema’ foi de 1,5 a 2 e para maçãs ‘Braeburn’ de 1,5.

As maçãs armazenadas em ACD QR apresentaram menor incidência de distúrbios fisiológicos e maior firmeza de polpa devido a redução da síntese de etileno e taxa respiratória.

O etanol produzido pelas maçãs armazenadas em condições de hipóxia ou aplicado externamente age inibindo diretamente a rota de biossíntese de etileno e reduz o avanço do processo de amadurecimento.

A associação da aplicação de 1-metilciclopropeno ao armazenamento de maçãs ‘Royal Gala’ e ‘Fuji Suprema’ em ACD reduz a taxa respiratória e a produção de compostos da fermentação e, conseqüentemente, mantém maior os teores de sólidos solúveis e ácidos, entretanto, não apresenta efeito sobre a firmeza de polpa nas maçãs ‘Royal Gala’.

Maçãs ‘Royal Gala’, produzidas no Brasil, armazenadas na temperatura de 1,5°C e maçãs ‘Braeburn’, produzidas na Alemanha, a 3°C apresentaram menor ou igual incidência de distúrbios fisiológicos que as maçãs armazenadas em menor temperatura. Portanto, estas temperaturas associadas à ACD QR podem ser usadas para armazenar estas cultivares sem risco de redução da qualidade e, além disso, tem-se o ganho na economia de energia nos sistemas de geração de frio.

Finalizadas as etapas do proposto projeto de doutorado ainda restam alguns pontos que precisam ser aprimorados e testados, dentre eles:

- 1) avaliar e definir um quociente respiratório adequado para as diversas cultivares de maçãs, partindo de um QR com mínimo de fermentação, ou seja, a partir de QR 1,3 até um QR levemente acima do QR 1,5 testado nesta tese;

- 2) estudar o efeito de diferentes pressões parciais de CO₂ e a sua variação na atmosfera controlada dinâmica;

- 3) estudar as interações entre ACD, temperaturas mais elevadas (temperatura de 2 e 3°C) e a aplicação de 1-metilciclopropeno, ou seja, verificar se a aplicação de 1-MCP em

temperatura mais alta ainda tem efeito sobre a retenção do amadurecimento quando as maçãs forem armazenadas em atmosfera controlada dinâmica;

4) difundir a ACD QR para o armazenamento de maçãs em câmaras comerciais;

5) estudar o potencial desta nova tecnologia em outras espécies de frutas climatéricas, como pera, kiwi, caqui e pêsego.

9 REFERÊNCIAS

AGAPOMI, Associação Gaúcha dos Produtores de Maçã. Disponível em <http://www.agapomi.com.br/dadosestatisticos.php>. 2012. Acessado em 14 de setembro de 2013.

AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. [S.l.]: FNP, 2012. 497 p.

AMARANTE, C.V.T.; STEFFENS, C.A.; BLUM, L.E.B. Coloração do fruto, distúrbios fisiológicos e doenças em maçãs ‘Gala’ e ‘Fuji’ pulverizadas com aminoetoxivinilglicina. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.32, n.1, p.9-18, 2010a.

ARGENTA, L. C.; FAN, X.; MATTHEIS, J. P. Responses of Fuji apples to short and long duration exposure to high CO₂. **Postharvest Biology and Technology**, v.24, p.13-24, 2002.

ASODA, T.; TERAJ, H.; KATO, M.; SUZUKI, Y. Effects of postharvest ethanol vapor treatment on ethylene responsiveness in broccoli. **Postharvest Biology and Technology**, v.52, p.216-220, 2009.

BALLA, B.; HOLB, I. Effect of three storage methods on fruit decay and brown rot of apple. **International Journal of Horticultural Science**, v.13, n.3, p.55-57, 2007.

BENNOUN, P. The present model for chlororespiration. **Photosynthesis Research**, v.73, p.273-277, 2002.

BIZJAK, J.; SLATNAR, A.; STAMPAR, F.; VEBERIC, R. Changes in Quality and Biochemical Parameters in ‘Idared’ apples during Prolonged Shelf Life and 1-MCP treatment. **Food Science and Technology International**, v.18, p.569-577, 2012.

BOERSIG, M. R., KADER, A.A., ROMANI, R.J. Aerobic-anaerobic respiratory transition in pear fruit and cultured pear fruit cells. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.113, p.869-873, 1988.

BOTONDI, R.; RUSSO, V.; MENCARELLI, F. Anaerobic metabolism during short and long term storage of kiwifruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.64, p.83-90, 2012.

BRACKMANN, A.; CERETTA, M.; LÚCIO, A. D.; PINTO, J. A. V.; ANESE, R. O. Tolerância da maçã 'Fuji' a baixas temperaturas durante o armazenamento em atmosfera controlada. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, p.1489-1496, 2011.

BRACKMANN, A.; ANESE, R. O.; WEBER, A.; BOTH, V.; GASPERIN, A. R.; PAVANELLO, E. P.; Efeito do estresse inicial por baixo O₂ combinado com 1-metilciclopropeno na conservação de maçãs 'Royal Gala' armazenadas com ultrabaixo O₂. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, p.1185-1194, 2013.

BRACKMANN, A.; BOTH, V.; WEBER, A.; PAVANELLO, E. P.; SCHORR, M. R. W.; SANTOS, J. R. A. Variação da temperatura, oxigênio e CO₂ durante o armazenamento em atmosfera controlada de maçãs 'Royal Gala'. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, p.2247-2256, 2012b.

BRACKMANN, A.; GASPERIN, A. R.; BOTH, V.; PAVANELLO, E. P.; SCHORR, M. R. W.; ANESE, R. O. Aplicação de 1-metilciclopropeno, estresse inicial com baixo oxigênio e armazenamento em ultrabaixo oxigênio na qualidade de maçã 'Fuji'. **Ciência Rural**, v.42, p.1386-1391, 2012a.

BRACKMANN, A.; STEFFENS, C. A.; NEUWALD, D. A.; SESTARI, I. Armazenamento de maçã 'Gala' em atmosfera controlada com remoção de etileno. **Ciência Rural**, v.33, n.4, p.647-650, 2003.

BRACKMANN, A.; WEBER, A.; PAVANELLO, E. P.; BOTH, V.; SESTARI, I. Armazenamento em atmosfera controlada de maçãs mutantes da cultivar Gala. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.34, n.2, p.136-143, 2009a.

BRACKMANN, A.; WEBER, A.; PINTO, J. A. V.; NEUWALD, D. A.; STEFFENS, C. A. Manutenção da qualidade pós-colheita de maçãs 'Royal Gala' e 'Galaxy' sob armazenamento em atmosfera controlada. **Ciência Rural**, v.38, p.2478-2484, 2008.

BRACKMANN, A.; WEBER, A.; SESTARI, I.; PETERLE, M. E.; BOTH, V.; PAVANELLO, E. P.; PINTO, J. A. V. Manejo do etileno e sua relação com a maturação de maçãs 'Gala' armazenadas em atmosfera controlada. **Bragantia**, v.68, p.519-525, 2009b.

CARVALHO, J.M; MIRANDA, D.L. **As exportações brasileiras de frutas: um panorama atual**. Disponível na internet: <http://www.sober.org.br/palestra/13/1300.pdf>. Acessado em 13 jan 2011.

CHU, C. L. Effects of Storage Temperature, Storage Atmosphere, and Growing Region on Internal Browning Disorder of 'McIntosh' Apples. **HortTechnology**, v.9 p.75-78, 1999.

COHEN, E.; SHALOM, Y.; ROSENBERGER, I. Postharvest ethanol buildup and off-flavor in 'Murcott' tangerine fruits. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.115, p.775-778, 1990.

COHEN, E.; SHUALI, M.; SHALOM, Y. Effect of intermittent warming on the reduction of chilling injury of 'Villa Franca' lemon fruits stored at cold temperature. **Journal of Horticultural Science**, v.58, p.593-598, 1983.

COSGROVE, D.J. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, p.391-417, 1999.

De SOUSA, C. A. F.; SODEK, L. The metabolic response of plants to oxygen deficiency. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.14, p.83-94, 2002.

DeLL, J.R., VAN KOOTEN, O., PRANGE, K.P.; MURR, D.P. Applications of chlorophyll fluorescence techniques in postharvest physiology. **Horticultural Reviews**, v.23 p.69-107, 1999.

DeLL, J.R.; MURR, D. P.; WILEY, L.; PORTEOUS, M. D. 1-Methylcyclopropene (1-MCP) increases CO₂ injury in apples. **Acta Horticulturae**, v.600, p.277-80, 2003.

DeLONG, J. M.; LEYTE, J. C.; PRANGE, R.K.; HARRISON, P.A. A new technology that determines low-oxygen thresholds in controlled atmosphere-stored apples. **HortTechnology**, v.14, p.262-266, 2004.

DeLONG, J.M.; PRANGE, R.K.; HARRISON, P.A. Chlorophyll fluorescence-based low-o₂ ca storage of organic 'cortland' and 'delicious' apples. **Acta Horticulturae**, v.737, p. 31-37, 2007.

DORI, S. et al. Effect of anaerobioses on aspects of avocado fruit ripening. **Acta Horticulturae**, v.379, p.129-136, 1995.

DÖRR, A. C.; MARQUES, P. V. Exigências dos consumidores europeus em relação à maçã gaúcha, na visão dos exportadores. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, v.8, n.1, p.40-48, 2006.

DREW, M.C. Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.223-250, 1997.

DUARTE, J. H. S. Alternativas para a redução de custos nos pomares de macieiras - estratégias de sobrevivência na cultura. **Agapomi**, v.196, p.5, set. 2010.

E.P.A. (Environmental Protection Agency). **Federal Register**, v.67, p.796-748, 2002.

ECHEVERRIA, G.; GRAELL, J.; LÓPEZ, M. L. Effect of harvest date and storage conditions on quality and aroma production of 'Fuji' apples. **Food Science and Technology International**, v.8, p.351-360, 2002.

EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina). A cultura da macieira. Florianópolis : Palotti. 2006. 743p.

F.A.O (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS) Post-harvest losses aggravate hunger: Improved technology and training show success in reducing losses. Disponível em <http://www.fao.org/news/story/jp/item/36844/icode/> Acesso em 22 de setembro de 2013.

FAWBUSH, F.; NOCK, J. F.; WATKINS, C. B. External carbon dioxide injury and 1-methylcyclopropene. **Postharvest Biology and Technology**, v.48, p.92-98, 2008.

FIDLER, J.C. The metabolism of acetaldehyde by plant tissues. **Journal of Experimental Botany**, v.19, p.1-51, 1968.

GASSER, F.; EPPLER, T.; NAUNHEIM, W.; GABIOUD, S.; HOEHN, E. Control of the critical oxygen level during dynamic CA storage of apples by monitoring respiration as well as chlorophyll fluorescence. **Acta Horticulturae**, v. 796, 2008.

GASSER, F.; EPPLER, T.; NAUNHEIM, W.; GABIOUD, S.; NISING, A. B. Dynamic CA storage of apples: monitoring of the critical oxygen concentration and adjustment of optimum conditions during oxygen reduction. **Acta Horticulturae**, v. 796, p.69-76, 2010.

GEIGENBERGER, P. Response of plant metabolism to too little oxygen. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, p.247-256, 2003.

GHAHRAMANI, F.; SCOTT, K.J. Oxygen stress of 'Granny Smith' apples in relation to superficial scald, ethanol, α -farnesene and conjugated trienes. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.49, p.207-210, 1998.

GORNY, J.R.; KADER, A.A. Low oxygen and elevated carbon dioxide atmospheres inhibit ethylene biosynthesis in preclimacteric and climacteric apple fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.122, p.542-546, 1997.

GOUT, E.; BOISSON, A-M.; AUBERT, S.; DOUCE, R.; BLIGNY, R. Origin of the cytoplasmic pH changes during anaerobic stress in higher plant cells. Carbon-13 and phosphorous-31 nuclear magnetic resonance studies. **Plant Physiology**, v.125, p.912-925, 2001.

GOYETTE, B.; VIGNEAULT, C.; RAGHAVAN, V.; CHARLES, M.-T. Hyperbaric Treatment on Respiration Rate and Respiratory Quotient of Tomato. **Food Bioprocess Technology**, v.5, p.3066-3074, 2012.

GRAELL, J. et al. Quality and volatile emission changes of 'Mondial Gala' apples during preharvest period and posterior storage in air or controlled atmosphere. **Food Science and Technology International**, v. 14, p. 285-294, 2008.

GRAN, C.D.; BEAUDRY, R.M. Determination of the low oxygen limit for several commercial apple cultivars by respiratory quotient breakpoint. **Postharvest Biology and Technology**, v.3, p.259-267, 1993.

HIRAI, J.; HIRATA, N.; HORIUCHI, S. Effect of deification on hastening the maturity of the fig fruit. VI. Respiration and changes in concentrations of metabolic substances in the treated fruits with products in oxidative process of fatty acid such as acetaldehyde or ethylene. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v.37, p.20-29, 1968.

HODGES D. M. et al. Oxidative stress: importance for postharvest quality. **HortScience**, v.39, n.5, p.924-929, 2004.

HONG, S.-I.; KIM, D.-M. Influence of oxygen concentration and temperature on respiratory characteristics of fresh-cut green onion. **International Journal of Food Science and Technology**, v.36, p.283-289, 2001.

INABA, A. Studies on the internal feedback regulation of ethylene biosynthesis and signal transduction during fruit ripening, and the improvement of fruit quality. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v.76, p.1-12, 2007.

ISOLCELL, Dynamic Control Atmosphere (DCA) Disponível em: <http://www.isolcell.com/en/Isolcell-nitrogen-generators/dca.html> Acesso em 15 de setembro de 2013.

JAMIESON, L.E. et al. Effect of ethanol vapor treatments on lightbrown apple moth larval mortality and 'Braeburn' apple fruit characterization. **Postharvest Biology and Technology**, v.28, p.391-403, 2003.

JANES, H.W.; CHIN, C.; FRENKEL, C. Respiratory upsurge in blueberries and strawberries as influenced by ethylene and acetaldehyde. **Botanical Gazette**, v.139, p.50-52, 1978.

JIMÉNEZ, A. et al. Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. **Planta**, v.214, p.751-758, 2002.

JOHNSTON, J. W.; GUNASEELAN, K.; PIDAKALA, P.; WANG, M.; SCHAFFER, R. J. Co-ordination of early and late ripening events in apples is regulated through differential sensitivities to ethylene. **Journal of Experimental Botany**, v.60, n.9, p.2689-2699, 2009.

KADER, A.A. **Postharvest technology of horticultural crops**. 3rd ed. Oakland : University of California, 2002. 580p.

KE, D.; SALTVEIT, M. E. Carbon dioxide-induced brown stain development as related to phenolic metabolism in iceberg lettuce. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v. 114, p. 789-794, 1989.

KE, D.; YAHIA, E.; HESS, B.; ZHOU, L.; KADER, A. A. Regulation of fermentative metabolism in avocado fruit under oxygen and carbon dioxide stresses. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.120, p.481-490, 1995.

KRAMER, D.M.; AVENSON, T.J.; EDWARDS, G.E. Dynamic flexibility in the light reactions of photosynthesis governed by both electron and proton transfer reactions. **Trends in Plant Science**, v.9, p.349-357, 2004.

KWEON, H.-J.; KANG, I.-K.; KIM, M.-J.; LEE, J.; MOON, Y.-S.; CHOI, C.; CHOI, D. G.; WATKINS, C. B. Fruit maturity, controlled atmosphere delays and storage temperature affect fruit quality and incidence of storage disorders of 'Fuji' apples. **Scientia Horticulturae**, v.157, p.60-64, 2013.

LALLU, N.; BURDON, J. Experiences with recent postharvest technologies in kiwifruit. **Acta Horticulturae**, v.753, p.733-740, 2007.

LEE, J.; MATTHEIS, J. P.; RUDELL, D. R. Antioxidant treatment alters metabolism associated with internal browning in 'Braeburn' apples during controlled atmosphere storage. **Postharvest Biology and Technology**, v.68, p.32-42, 2012.

LELIÈVRE, J. M. et al. Ethylene and fruit ripening. **Physiologia Plantarum**, v.101, p.727-739, 1997.

LENHINGER, A. L. et al. **Princípios de bioquímica**. 5 ed., São Paulo: Sarvier, 2010. 1273p.

LIN, Z.; ZHONG, S.; GRIERSON, D. Darwin Review - Recent advances in ethylene research. **Journal of Experimental Botany**, v.60, p.3311-3336, 2009.

LIU, W. W.; QI, H. Y.; XU, B. H.; LI, Y.; TIAN, X. B.; JIANG, Y. Y.; Xu, X. F.; LV, D. Q. Ethanol treatment inhibits internal ethylene concentrations and enhances ethyl ester production during storage of oriental sweet melons (*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino). **Postharvest Biology and Technology**, v.67, p.75-83, 2012.

LOULAKAKIS, C.A. et al. Effects of low oxygen on in vitro translation products of poly(A)⁺ RNA, cellulase and alcohol dehydrogenase expression in preclimacteric and ripening-initiated avocado fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.39, p.29-37, 2006.

LURIE, S.; PESIS, E. Effect of acetaldehyde and anaerobiosis as postharvest treatments on the quality of peaches and nectarines. **Postharvest Biology and Technology**, v.1, p.317-326, 1992.

MANHART, W. **Apple cultivars for the 21st century**. New York : DK, 1995. 235p.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **Agronegócio Brasileiro: Uma Oportunidade de Investimentos**. Disponível na internet: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acessado em 13 jan 2011.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO/Secretaria de Relações Internacionais do Agronegócio). **Balança Comercial do Agronegócio – Agosto/2013**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2013/09/exportacoes-do-agronegocio-em-agosto-somaram-uss-10-bi> Acesso em 28 de setembro de 2013.

MARLOW, G. C.; LOESCHER, W. H. Watercore. **Horticultural Reviews**, v.6, p.189-251, 1984.

MARVIL, ILOS-Plus: Sistema intelligente di conservazione in ipo ossigeno. Disponível em: <http://www.marvil.it/Ilos-plus>. Acessado em 15 de setembro de 2013.

MATHEWS, C. K.; Van HOLDE, K. E. **Biochemistry**. 2nd ed., Menlo Park : The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1996. 1159 p.

MATTHEIS, J. P.; FAN, X. T.; ARGENTA, L. C. Interactive responses of Gala apple fruit volatile production to controlled atmosphere storage and chemical inhibition of ethylene action. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.4510-4516, 2005.

MATTHEIS, J. P. How 1-methylcyclopropene has altered the Washington state apple industry. **HortScience**, v.43, p.99-101, 2008.

MATTHEIS, J.; FELICETTI, D.; RUDELL, D. R. Pithy brown core in ‘d’Anjou’ pear (*Pyrus communis* L.) fruit developing during controlled atmosphere storage at pO₂ determined by monitoring chlorophyll fluorescence. **Postharvest Biology and Technology**, v.86, p.259-264, 2013.

McCORMICK, R.; NEUWALD, D. A.; STREIF, J. A case study: Potential energy savings using 1-MCP with ‘Gala’ apples in commercial CA storage. **Acta Horticulturae**, v.877, p.323-326, 2010.

McCORMICK, R.J.; NEUWALD, D.A.; STREIF J. Commercial apple CA storage temperature regimes with 1-MCP (SmartFresh™): Benefits and Risiks. **Acta Horticulturae**, v.934, p.263-270, 2012.

MORI, T. et al. Effects of postharvest ethanol vapor treatment on the ascorbate–glutathione cycle in broccoli florets. **Postharvest Biology and Technology**, v.52, p.134-136, 2009.

NANOS, G. D.; KADER, A. A. Low O₂-induced changes in pH and energy charge in pear fruit tissue. **Postharvest Biology and Technology**, v.3, p.285-291, 1993.

NORMAN, S.M. The role of volatiles in storage of citrus fruits. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, v.1, p.238-242, 1977.

NOVO, J. M.; IRIEL, A.; LAGORIO, M. G. Modelling chlorophyll fluorescence of kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*). **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.11, p.724-730, 2012.

PELTIER, G.; COURNAC, L. Chlororespiration. **Annual Review of Plant Biology**, v.53, p.523-550, 2002.

PEPPELENBOS, H. W.; OOSTERHAVEN, J. A theoretical approach on the role of fermentation in fruits and vegetables. **Acta Horticulturae**, v.464, 1998.

PESIS E.; FAIMAN, D.; DORI, S. Postharvest effects of acetaldehyde vapour on ripening-related enzyme activity in avocado fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.13, p.245-253, 1998.

PESIS, E. The role of the anaerobic metabolites, acetaldehyde and ethanol, in fruit ripening, enhancement of fruit quality and fruit deterioration. **Postharvest Biology and Technology**, v.37, p.1-19, 2005.

PESIS, E.; AVISSAR, I. The postharvest quality of orange fruits as affected by prestorage treatments with acetaldehyde vapors or anaerobic conditions. **Journal of Horticultural Science**, v.64, p.107-113, 1989.

PESIS, E.; MARINANSKY, R. Carbon dioxide and ethylene production in response to acetaldehyde and ethanol treatments in grapes. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.117, p.110-113, 1992.

PESIS, E.; MARINANSKY, R. Inhibition of tomato ripening by acetaldehyde vapour or anaerobic conditions prior to storage. **Journal of Plant Physiology**, v.142, p.717-721, 1993.

PINTO, E.; LENTHERIC, I.; VENDRELL, M.; LARRIGAUDIÈRE, C. Role of fermentative and antioxidant metabolisms in the induction of core browning in controlled-atmosphere stored pears. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.81, p.364-370, 2001.

PLAXTON, W. C. The organization and regulation of plant glycolysis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.47, p.185-214, 1996.

PLOTTO, A.; BAI, J.; NARCISO, J. A.; BRECHT, J. K.; BALDWIN, E. A. Ethanol vapor prior to processing extends fresh-cut mango storage by decreasing spoilage, but does not always delay ripening. **Postharvest Biology and Technology**, v.39, p.134-145, 2006.

PODD, L.A.; Van STADEN, J. The role of ethanol and acetaldehyde in flower senescence and fruit ripening – A review. **Plant Growth Regulation**, v.26, p.183-189, 1998.

PRANGE, R. K. DeLONG, J. M.; HARRISON, P. A. Oxygen concentration affects chlorophyll fluorescence in Chlorophyll-containing fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.24, p.201-205, 2002.

PRANGE, R. K. et al. Innovation in controlled atmosphere technology. **Stewart Postharvest Review**, v.3, n.9, p.1-11, 2005a.

PRANGE, R. K.; DeLONG, J. M.; HARRISON, P. A. Oxygen concentration affects chlorophyll fluorescence in Chlorophyll-containing fruit and vegetables. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.128, n.4, p.603-607, 2003.

PRANGE, R. K.; DeLONG, J. M.; HARRISON, P. A. Quality management through respiration control: Is there a relationship between lowest acceptable respiration, chlorophyll fluorescence and cytoplasmic acidosis? **Acta Horticulturae**, v.682, p.823-830, 2005b.

PRANGE, R. K.; SCHOUTEN, S. P.; Van KOOTEN, O. Chlorophyll fluorescence detects low oxygen stress in 'Elstar' apples. **Proceedings Seventh International Controlled Atmosphere Research Conference**, v.2, p.57-64, 1997.

PRANGE, R.; DELONG, J.; HARRISON, P.; MCLEAN, S.; SCRUTTON, J.; CULLEN, J. Method and apparatus for monitoring a condition in chlorophyll containing matter. **U.S. Patent**, n.WO/2002/006795, 2007.

PRE-AYMARD, C.; FALLIK E.; WEKSLER, A.; LURIE S. Sensory analysis and instrumental measurements of 'Anna' apples treated with 1-methylcyclopropene. **Postharvest Biology and Technology**, v.36, p.135-42, 2005.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. Lavras: Ed. UFLA. 2008. 464p.

RAYLE, D. L.; CLELAND, R. E. The acid-growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. **Plant Physiology**, v.99, p.1271-1274, 1992.

REENTZ, E. R. et al. **Anuário brasileiro da fruticultura**. Santa Cruz do Sul : Gazeta Santa Cruz, 2009. 128 p.

RITENOUR, M.A. et al. Ethanol effects on the ripening of climacteric fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.12, p.35-42, 1997.

ROBERTS, J. K. M. et al. Contribution of malate and amino acid metabolism to cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips studied using nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Plant Physiology**, v.98, n.2, p.480-487, 1992.

RUDELL, D. R.; BUCHANAN, D. A.; LEISSO, R. S.; WHITAKER, B. D.; MATTHEIS, J. P.; ZHU, Y.; VARANASI, V. Ripening, storage temperature, ethylene action, and oxidative stress alter apple peel phytosterol metabolism. **Phytochemistry**, v.72, p.1328-1340, 2011.

SABBAN-AMIN, R.; FEYGENBERG, O.; BELAUSOV, E.; PESIS, E. Low oxygen and 1-MCP pretreatments delay superficial scald development by reducing reactive oxygen species (ROS) accumulation in stored 'Granny Smith' apples. **Postharvest Biology and Technology**, v.62, p.295-304, 2011.

SALTVEIT, M.E.; MENCARELLI, F. Inhibition of ethylene synthesis and action in ripening tomato fruit by ethanol vapours. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.113, p.572-576, 1988.

SAQUET, A. A., STREIF, J. Respiração e produção de etileno de maçãs armazenadas em diversas concentrações de oxigênio. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.8, p.71-75, 2002.

SAQUET, A. A.; STREIF, J.; BANGERTH, F. Changes in ATP, ADP and pyridine nucleotide levels related to the incidence of physiological disorders in 'Conference' pears and 'Jonagold' apples during controlled atmosphere storage. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.75, p.243-249, 2000.

SCHOUTEN, S. P.; PRANGE, R. K.; VERSCHOOR, J.; LAMMERS, T. R.; OOSTERHAVEN, J. Improvement of Quality of 'Elstar' Apples by Dynamic Control of ULO conditions. **CA'97**. University of California, Davis, CA, USA, 1997.

SCOTT, K. J. et al. Ethanol vapour-a new antiscald treatment for apple. **Postharvest Biology and Technology**, v.6, p.201-208, 1995.

SISLER, E. C.; SEREK, M. Compounds interacting with the ethylene receptor in plants. **Plant Biology**, v.5, p.473-480, 2003.

SISLER, E. C.; SEREK, M. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: recent developments. **Physiologia Plantarum**, v.100, p.577-582, 1997.

SMAGULA, J.M.; BRAMLAGE, W.J.; SOUTHWICK, R.A.; MARSH, H.V. Effects of watercore on respiration and mitochondrial activity in 'Richard Delicious' apples. **Proceedings American Society of Horticultural Science**, v.93, p.753-761, 1968.

STEFFENS, C. A.; BRACKMANN, A.; Pinto, J. A. V.; EISERMANN, A. C. Taxa respiratória de frutas de clima temperado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.313-321, 2007.

STREIF, J. Ripening management and postharvest fruit quality. **Acta Horticulturae**, v.858, p.121-130, 2010.

SUZUKI, Y.; UJI, T.; TERAJ, H. Inhibition of senescence in broccoli florets with ethanol vapor from alcohol powder. **Postharvest Biology and Technology**, v.31, p.177-182, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant Physiology*. 5.ed. Massachusetts : Sinauer, 2010. 782p.

TOIVONEN, P. M. A.; DeELL, J. R. Chlorophyll fluorescence, fermentation product accumulation, and quality of stored broccolis in modified atmosphere packages and subsequent air storage. **Postharvest Biology and Technology**, v.23, p.61-69, 2001.

TOIVONEN, P. M. A.; LU, C. W. Studies on elevated temperature, short-term storage of 'Sunrise' Summer apples using 1-MCP to maintain quality. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.80, p.439-446, 2005.

TÓTH S. Z.; SCHANSKER, G.; STRASSER R. J. A non-invasive assay of the plastoquinone pool redox state based on the OJIP-transient. **Photosynthesis Research**, v.93, p.193-203, 2007.

UNECE (United Nation Economic Commission for Europe). List of 30 apple varieties that are most important in German production and international Trade. http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trade/agr/meetings/ge.01/INF/2006_i01_e_AppleVarietyList_DE.pdf. Acessado em 14 de setembro de 2013.

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

VELTMAN, R. H. et al. Internal browning in pear fruit (*Pyrus communis* L. cv Conference) may be a result of a limited availability of energy and antioxidants. **Postharvest Biology and Technology**, v. 28, p. 295-302, 2003a.

VELTMAN, R.H., VERSCHOOR, J.A., RUIJSCH Van DUGTEREN, J.H. Dynamic control system (DCS) for apples (*Malus domestica* Borkh. cv 'Elstar'): optimal quality through storage based on product response. **Postharvest Biology and Technology**, v.27, p.79-86, 2003b.

VIDRIH, R.; ZAVRTANIK, M.; HRIBAR, J. The influence of added acetaldehyde and ethanol on changes of aroma compounds in apples. **Acta Horticulturae**, v.485, p.383-388, 1999.

WATKINS, C. B.; LIU, F. W. Temperature and Carbon Dioxide Interactions on Quality of Controlled Atmosphere-stored 'Empire' Apples. **Hortscience**, v.45, p.1708-1712. 2010.

WATKINS, C. B.; NOCK, J. F. Rapid 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment and delayed controlled atmosphere storage of apples. **Postharvest Biology and Technology**, v.69, p.24-31, 2012.

WATKINS, C.B. Dynamic Controlled Atmosphere Storage – A New Technology for the New York Storage Industry? **New York Fruit Quarterly**, v.16, n.1, 2008.

WATKINS, C.B. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. **Biotechnology Advances**, v.24, p.389–409, 2006.

WEBER, A. **Aplicação de produtos da fermentação e ultrabaixo oxigênio para a conservação de maçãs 'Royal Gala'**. Santa Maria, RS : UFSM, 2010. 90p. Dissertação (Mestrado de Agronomia) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

WEBER, A.; BRACKMANN, A.; ANESE, R. O.; BOTH, V.; PAVANELLO, E. P. 'Royal Gala' apple quality stored under ultralow oxygen concentration and low temperature conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.26, p.1597-1602, 2011.

WEBER, A.; BRACKMANN, A.; ANESE, R. O.; BOTH, V.; PAVANELLO, E. P. Atmosfera controlada para o armazenamento da maçã 'Maxi Gala'. **Revista Ciência Agronômica**, v.44, p.294-301, 2013c.

WEBER, A.; NEUWALD, D. A.; BRACKMANN, A.; PAVANELLO, E. P.; LINKE JUNIOR, W. Ethanol reduces quality losses during postharvest of 'Braeburn' apples. In: Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 14, 2013, Poços de Caldas. **Anais...** p.543, 2013b.

WEBER, A.; THEWES, F. R.; SCHORR, M. R. W.; GASPERIN, A. R.; VENTURINI, T. L.; BRACKMANN, A.; 'Gala', 'Royal Gala' and 'Brookfield' apples stored under ultra-low oxygen and two temperatures. **Bioscience Journal**, in press, 2013a.

WRIGHT, A. H.; DeLONG, J. M.; GUNAWARDENA, A. H. L. A. N.; PRANGE, R. K. Dynamic controlled atmosphere (DCA): Does fluorescence reflect physiology in storage? **Postharvest Biology and Technology**, v.64, p.19-30, 2012.

WRIGHT, A. H.; DeLONG, J.; GUNAWARDENAB, A.H.L.A.N; PRANGE, R. K. The interrelationship between the lower oxygen limit, chlorophyll fluorescence and the xanthophyll cycle in plants. **Photosynthesis Resesarch**, v.107, p.223-235, 2011.

WRIGHT, H.; DeLONG, J.; HARRISON, P.A.; GUNAWARDENAB, A.H.L.A.N; PRANGE, R. K. The effect of temperature and other factors on chlorophyll a fluorescence and the lower oxygen limit in apples (*Malus domestica*). **Postharvest Biology and Technology**, v.55, p.21–28, 2010.

YAHIA, E.M.; RIVERA, M.; HERNANDEZ, O. Responses of papaya to short-term insecticidal oxygen atmosphere. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.117, p.96-99, 1992.

ZABALZA, A. et al. Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration. **Plant Physiology**, v.149, p.1087-1098, 2009.

ZANELLA, A. et al. Fruit fluorescence response to low oxygen stress: modern storage technologies compared to 1-mcp treatment of apple. **Acta Horticulturae**, v.682, p.1535-1542, 2005.

ZANELLA, A.; CAZZANELLI, P. DCA-Lagerun hat sich bewährt. **Apfel Aktuell: Lagerung**, sn, p.16-17, 2007.

ZANELLA, A.; CAZZANELLI, P.; ROGGI, O. Dynamic controlled atmosphere (DCA) storage by means of chlorophyll fluorescence response for firmness relation in apple. **Acta Horticulturae**, v.796, p.77-82, 2008.

ZHU, Q.; ZHANG, Z.; RAO, J.; HUBER, D. J.; LV, J.; HOU, Y.; SONG, K. Identification of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase genes (XTHs) and their expression in persimmon fruit as influenced by 1-methylcyclopropene and gibberellic acid during storage at ambient temperature. **Food Chemistry**, v.138, p.471-477, 2013.