

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

**ESTRESSE INICIAL E CONDICIONAMENTO AO
BAIXO OXIGÊNIO NO ARMAZENAMENTO EM
ATMOSFERA CONTROLADA DE MAÇÃS ‘ROYAL
GALA’**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Vanderlei Both

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**ESTRESSE INICIAL E CONDICIONAMENTO AO BAIXO
OXIGÊNIO NO ARMAZENAMENTO EM ATMOSFERA
CONTROLADA DE MAÇÃS ‘ROYAL GALA’**

Vanderlei Both

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação
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
Mestre em Agronomia.

Orientador: Auri Brackmann

Santa Maria, RS, Brasil

2012

B749e Both, Vanderlei
Estresse inicial e condicionamento ao baixo oxigênio no armazenamento em atmosfera controlada de maçãs 'Royal Gala' / por Vanderlei Both. – 2012.
85 f. ; il. ; 30 cm

Orientador: Auri Brackmann
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, RS, 2012

1. Armazenamento 2. Respiração anaeróbica 3. Pós-colheita 4. Distúrbios fisiológicos I. Brackmann, Auri II. Título.

CDU 664.85

Ficha catalográfica elaborada por Cláudia Terezinha Branco Gallotti – CRB 10/1109
Biblioteca Central UFSM

©2012

Todos os direitos autorais reservados a Vanderlei Both. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ESTRESSE INICIAL E CONDICIONAMENTO AO BAIXO OXIGÊNIO
NO ARMAZENAMENTO EM ATMOSFERA CONTROLADA DE
MAÇÃS ‘ROYAL GALA’**

elaborada por
Vanderlei Both

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Agronomia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Auri Brackmann, Prof. Dr.
(Presidente/Orientador)

Cesar Valmor Rombaldi,
Prof. Dr. (UFPel)

Roger Wagner,
Prof. Dr. (UFSM)

Santa Maria, 24 de fevereiro de 2012.

Aos meus pais,

Maria Reinilda (*in memorium*) e Eugenio Both,

pela educação que me proporcionaram e
pelo exemplo de dedicação e perseverança.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À minha namorada Daiane pelo apoio, companheirismo e compreensão nos momentos em que estive distante.

Ao professor Dr. Auri Brackmann pela orientação deste trabalho e pela colaboração e ensinamentos que auxiliaram na minha formação acadêmica.

Aos colegas do Núcleo de Pesquisa em Pós-colheita: Anderson, Josuel, Elizandra, Rogério, Márcio, Thiago, Jorge, Fábio, Adriano, Deiverson, Diego e Wanderlei, pelo auxílio nos trabalhos e trocas de experiências.

À Dra. Cláudia Kaehler Sautter pelos ensinamentos durante a minha formação acadêmica.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia pela oportunidade de realizar este estudo.

À CAPES pela concessão da bolsa para execução deste trabalho e à FAPERGS pelo apoio financeiro durante minha iniciação científica.

A todos os familiares e amigos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

AGRADEÇO.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

ESTRESSE INICIAL E CONDICIONAMENTO AO BAIXO OXIGÊNIO NO ARMAZENAMENTO EM ATMOSFERA CONTROLADA DE MAÇÃS ‘ROYAL GALA’

AUTOR: Vanderlei Both
ORIENTADOR: Prof. Dr. Auri Brackmann
Santa Maria, 24 de fevereiro de 2012

O objetivo do presente trabalho foi avaliar métodos alternativos à atmosfera controlada convencional (AC) e dinâmica (ACD), na manutenção da qualidade de maçãs ‘Royal Gala’, em especial a ocorrência de distúrbios fisiológicos. Para tanto, avaliou-se o efeito do estresse inicial com baixo O₂ na manutenção da qualidade de maçãs armazenadas em condições ultrabaixas de oxigênio (menor que 0,8 kPa) e também o efeito do condicionamento ao baixo O₂, por meio da redução gradativa do oxigênio nas câmaras de armazenamento, além de comparação destas técnicas com a aplicação de 1-MCP. Foram instalados dois experimentos, um no ano de 2010 e outro em 2011. No primeiro, os tratamentos foram os seguintes: [1] AC com 1,2 kPa O₂ + 2,0 kPa CO₂; [2] 1,0 kPa O₂ + 2,0 kPa CO₂; [3] 0,8 kPa O₂ + 1,0 kPa CO₂; [4] 0,6 kPa O₂ + 1,0 kPa CO₂ e [5] 0,5 kPa O₂ + 1,0 kPa CO₂. Para cada condição de AC os frutos foram divididos em duas subamostras, sendo que uma recebeu aplicação de 1-MCP e outra não. Em seguida, os frutos foram novamente divididos em dois lotes, sendo que uma parte foi submetida a um estresse inicial por baixo O₂ (sete dias em 0,3 kPa) e a outra foi acondicionada nas minicâmaras de AC. Para o segundo experimento utilizou-se os seguintes tratamentos: [1] AC com 1,0 kPa O₂ e instalação imediata; [2] 1,0 kPa O₂ e condicionamento de sete dias; [3] 0,8 kPa O₂ e condicionamento de sete dias; [4] 0,7 kPa O₂ e condicionamento de sete dias; [5] 0,7 kPa O₂ e condicionamento de 14 dias; [6] 0,7 kPa O₂ e condicionamento de 28 dias; [7] 0,5 kPa O₂ e condicionamento de sete dias; [8] 0,5 kPa O₂ e condicionamento de 14 dias; [9] 0,5 kPa O₂ e condicionamento de 28 dias; [10] 0,7 kPa O₂ com condicionamento e estresse por baixo O₂; [11] 1,0 kPa O₂ com instalação imediata, mais 1-MCP e [12] ACD com fluorescência de clorofilas. Para todos os tratamentos a pressão parcial de CO₂ foi de 1,2 kPa. O estresse inicial por baixo O₂ aumenta a ocorrência de distúrbios fisiológicos, não sendo recomendada a sua utilização logo após a colheita, no entanto, após um período de adaptação dos frutos ao baixo O₂, mantém a qualidade durante o armazenamento em condições ultrabaixas de oxigênio. A redução gradativa de O₂ durante aproximadamente um mês, permite o armazenamento em condições ultrabaixas de O₂, com resultados superiores a ACD na manutenção na qualidade dos frutos. A aplicação de 1-MCP apresenta pouca eficiência quando as concentrações de O₂ nas câmaras de armazenamento são extremamente baixas, ou quando os frutos apresentam um estágio de maturação avançado.

Palavras chave: respiração anaeróbica; pós-colheita; distúrbios fisiológicos; etileno; etanol.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Graduate Program in Agronomy
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

INITIAL STRESS AND CONDITIONING TO LOW OXYGEN IN CONTROLLED ATMOSPHERE STORAGE OF 'ROYAL GALA' APPLES

AUTHOR: Vanderlei Both
ADVISER: Prof. Dr. Auri Brackmann
Santa Maria, February 24th, 2012

The aim of the present work was to evaluate alternative methods to conventional (CA) and dynamic controlled atmosphere (DCA), in order to maintain the quality of 'Royal Gala' apples, particularly the physical disorders occurrence. So, we evaluated the effect of initial low oxygen stress in maintaining the quality of 'Royal Gala' apples stored in ultralow oxygen conditions (less than 0.8 kPa) and also the effect of low oxygen conditioning through the gradual decreasing of oxygen in the storage chambers, and comparison of these techniques by applying 1-MCP. Two experiments were established, one in 2010 and another in 2011. At the first, the treatments were as follows: [1] CA with 1.2 kPa O₂ + 2.0 kPa CO₂; [2] 1.0 kPa O₂ + 2.0 kPa CO₂; [3] 0.8 kPa O₂ + 1.0 kPa CO₂; [4] 0.6 kPa O₂ + 1.0 kPa CO₂ e [5] 0.5 kPa O₂ + 1.0 kPa CO₂. For each CA treatment fruits were divided into two lots, one of them received 1-MCP application and another don't. Then the fruits of each were again divided into two lots, and a portion was subjected to an initial low oxygen stress (0.3 kPa for seven days) and the other was enclosed in CA chambers. For the second experiment were used the following treatments: [1] CA with 1.0 kPa O₂ immediately installed; [2] 1.0 kPa O₂ and conditioning for seven days; [3] 0.8 kPa O₂ and conditioning for seven days; [4] 0.7 kPa O₂ and conditioning for seven days; [5] 0.7 kPa O₂ and conditioning for 14 days; [6] 0.7 kPa O₂ and conditioning for 28 days; [7] 0.5 kPa O₂ and conditioning for seven days; [8] 0.5 kPa O₂ and conditioning for 14 days; [9] 0.5 kPa O₂ and conditioning for 28 days; [10] 0.7 kPa O₂ with conditioning and low oxygen stress; [11] 1.0 kPa O₂ immediately installed, plus 1-MCP and [12] DCA with chlorophyll fluorescence. For all treatments the partial pressure of CO₂ was 1.2 kPa. The initial low oxygen stress increases the occurrence of physiological disorders, and shouldn't recommended for use immediately after harvest, however, after one low O₂ adaptation period of the fruit, this procedure helps to maintaining quality during storage in ultralow oxygen conditions. The gradual reduction of O₂ for approximately one month, allows storage in ultralow oxygen conditions and maintaining fruit quality better than the DCA. 1-MCP application offers low efficiency when the O₂ concentration in the storage chambers are extremely low, or when the fruits presented an advanced maturity stage.

Key words: anaerobic respiration; postharvest; physiological disorders; ethylene; ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modo de ação do estresse por baixo O_2 e/ou alto CO_2 no metabolismo fermentativo dos frutos.....	25
--	----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Condições utilizadas para o armazenamento de maçãs 'Royal Gala'. Santa Maria, 2010.38
- Tabela 2 - Condições utilizadas para o condicionamento ao baixo O₂ e armazenamento de maçãs 'Royal Gala'. Santa Maria, 2011.40
- Tabela 3 - Ocorrência de podridões em maçã 'Royal Gala' após sete meses de armazenamento em atmosfera controlada, com ou sem aplicação de 1-MCP e com ou sem estresse inicial por baixo O₂, mais sete dias de exposição a 20°C.47
- Tabela 4 - Distúrbios fisiológicos em maçã 'Royal Gala' após sete meses de armazenamento em atmosfera controlada, com ou sem aplicação de 1-MCP e com ou sem estresse inicial por baixo O₂, mais sete dias de exposição a 20°C.48
- Tabela 5 - Porcentagem de frutos sadios de maçã 'Royal Gala' após sete meses de armazenamento em atmosfera controlada, com ou sem aplicação de 1-MCP e com ou sem estresse inicial por baixo O₂, mais sete dias de exposição a 20°C.50
- Tabela 6 - Firmeza de polpa de maçãs 'Royal Gala' após sete meses de armazenamento em atmosfera controlada, com ou sem aplicação de 1-MCP e com ou sem estresse inicial por baixo O₂, mais sete dias de exposição a 20°C.51
- Tabela 7 - Acidez e SST de maçã 'Royal Gala' após sete meses de armazenamento em atmosfera controlada, com ou sem aplicação de 1-MCP e com ou sem estresse inicial por baixo O₂, mais sete dias de exposição a 20°C.53
- Tabela 8 - Atividade da enzima ACC oxidase em maçãs 'Royal Gala' após sete meses de armazenamento em atmosfera controlada, com ou sem aplicação de 1-MCP e com ou sem estresse inicial por baixo O₂, mais sete dias de exposição a 20°C.54
- Tabela 9 - Produção de etileno em maçãs 'Royal Gala' após sete meses de armazenamento em atmosfera controlada, com ou sem aplicação de 1-MCP e com ou sem estresse inicial por baixo O₂, e após sete dias de exposição a 20°C.....55
- Tabela 10 - Respiração em maçãs 'Royal Gala' após sete meses de armazenamento em atmosfera controlada, com ou sem aplicação de 1-MCP e com ou sem estresse inicial por baixo O₂, e após sete dias de exposição a 20°C.....56
- Tabela 11 - Distúrbios fisiológicos de maçãs 'Royal Gala' após oito meses de armazenamento em atmosfera controlada e diferentes períodos de condicionamento ao baixo O₂, mais sete dias de exposição a 20 °C. Santa Maria, 2011.59

- Tabela 12 – Ocorrência de podridões e de frutos sadios e firmeza de polpa de maçãs ‘Royal Gala’ após oito meses de armazenamento em atmosfera controlada e diferentes períodos de condicionamento ao baixo O₂, mais sete dias de exposição a 20 °C. Santa Maria, 2011. 62
- Tabela 13 – Teor de sólidos solúveis, acidez e atividade da enzima ACC oxidase, de maçãs ‘Royal Gala’ após oito meses de armazenamento em atmosfera controlada e diferentes períodos de condicionamento ao baixo O₂, mais sete dias de exposição a 20 °C. Santa Maria, 2011. 64
- Tabela 14 – Produção de etileno em maçãs ‘Royal Gala’, durante seis dias de exposição a 20°C, após armazenamento durante oito meses em atmosfera controlada e diferentes períodos de condicionamento ao baixo O₂. Santa Maria, 2011. 66
- Tabela 15 – Respiração de maçãs ‘Royal Gala’, durante seis dias de exposição a 20°C, após armazenamento durante oito meses em atmosfera controlada e diferentes períodos de condicionamento ao baixo O₂. Santa Maria, 2011..... 67

LISTA DE ABREVIATURAS

1-MCP	1-metilciclopropeno
4-MP	4-metilpirazol
AC	Atmosfera controlada
ACC	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
ACC oxidase	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidase
ACC sintase	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintase
ACD	Atmosfera controlada dinâmica
ADH	Álcool desidrogenase
ADP	Adenosina difosfato
AR	Armazenamento refrigerado
ATP	Adenosina trifosfato
ATT	Enzima álcool acetil transferase
AVG	Aminoetoxivinilglicina
BO-ACO1	Gene para ACC oxidase em brócolis
C ₂ H ₄	Etileno
CAT	Catalase
CO ₂	Dióxido de carbono (gás carbônico)
DPA	Difenilamina
EIN 2	Proteína transmembrana
EIN 3	Fator de transcrição
ERF1	Promotores de genes para etileno
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FADH ₂	Flavina-adenina dinucleotídeo
FID	Flame ionization detector (detector por ionização em chama)
FIRM	Fluorescence Interactive Response Monitor
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ILOS	Initial low oxygen stress (estresse inicial por baixo oxigênio)
kg	Quilograma
kPa	Kilopascal
LDH	Lactato desidrogenase
LED	Light Emitting Diode
μL L ⁻¹	Microlitro por litro
m ³	Metro cúbico
MACC	Ácido 1-(malonilamino) ciclopropano-1-carboxílico
MdACO1	Gene para ACC oxidase em maçã
MdACS1	Gene para ACC sintase em maçã
MdERS1	Gene para receptores de etileno em maçã
MdETR1	Gene para receptores de etileno em maçã
meq	Miliequivalente
MES	(ácido 2 (N-morfolino) etanossulfônico)
MHO-ol	6-metil-5-hepten-2-ol
MHO-ona	6-metil-5-hepten-2-ona
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar

mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MTA	5'-metiltioadenosina
N	Newton
N ₂	Nitrogênio
nL L ⁻¹	Nanolitro por litro
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NaOH	Hidróxido de sódio
NPP	Núcleo de Pesquisa em Pós-colheita
O ₂	Oxigênio
°C	Temperatura em graus Celsius
PCA	Ponto de compensação anaeróbico
PDC	Enzima piruvato descarboxilase
PEP	Enzima Fosfoenolpiruvato
PFK	Enzima Fosfofrutoquinase
pH	Potencial hidrogeniônico
PME	Pectina Metilesterases
POX	Peroxidase
PpACO1	Gene para ACC oxidase em pêssego
PPO	Polifenoloxidase
PSA	Pressure Swing Adsorption
QR	Quociente respiratório
SAM	S-adenosilmetionina
SST	Sólidos Solúveis Totais
ULO	Ultralow oxygen (ultrabaixo oxigênio)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Maturação e amadurecimento dos frutos.....	16
2.2 A produção de etileno.....	16
2.2.1 Produtos da fermentação e a produção de etileno	19
2.2.2 Aplicação de 1-MCP	21
2.3 O processo respiratório	22
2.3.1 Respiração aeróbica.....	23
2.3.2 Respiração anaeróbica	24
2.4 Armazenamento de maçãs em AC	28
2.4.1 Estresse inicial por baixo oxigênio	29
2.4.1.1 Mudanças induzidas pelo estresse	31
2.4.2 Condicionamento ao baixo oxigênio	33
2.5 Efeitos adversos do armazenamento em baixo O₂ e aplicação de produtos de fermentação.....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 Colheita e seleção dos frutos.....	37
3.2 Descrição dos experimentos.....	37
3.2.1 Experimento I.....	37
3.2.2 Experimento II.....	39
3.3 Instalação de AC, monitoramento e correção dos gases	40
3.4 Instalação e monitoramento da ACD.....	41
3.5 Aplicação de 1-MCP.....	42
3.6 Variáveis analisadas	42
3.7 Análise estatística.....	44

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Experimento I	45
4.1.1 Estresse inicial por baixo oxigênio no armazenamento de maçãs ‘Royal Gala’	45
4.1.2 Conclusões.....	57
4.2 Experimento II.....	57
4.2.1 Condicionamento ao baixo oxigênio no armazenamento de maçãs ‘Royal Gala’	58
4.2.2 Conclusões.....	67
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

No Brasil são produzidos anualmente cerca de 1,1 milhões de toneladas de maçã (AGRIANUAL, 2010). Os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina são responsáveis por de mais de 95% desta produção. Praticamente a totalidade das maçãs produzidas são das cultivares ‘Gala’ e ‘Fuji’ e suas mutantes que apresentam excelente qualidade organoléptica, adaptam-se bem ao clima das regiões produtoras e têm bom potencial de conservação frigorífica. A colheita dessas cultivares concentra-se no período que vai do início de fevereiro até o final do mês de abril.

Os principais destinos das exportações brasileiras de maçã são os países europeus, sendo que os maiores volumes são exportados desde o início da safra até os meses de junho/julho, período em que os países importadores se encontram na entressafra. No entanto, o Brasil exporta apenas 10% da sua safra (AGRIANUAL, 2010), sendo que a grande parte da produção é destinada ao mercado interno. Dessa forma, é necessário que esta fruta seja adequadamente armazenada a fim de que seja ofertada durante o ano todo ao mercado consumidor e com a qualidade preservada.

A maçã é um fruto que possui um bom potencial de armazenamento, podendo ser conservada por até três meses sob armazenamento refrigerado (BRACKMANN; CERETTA, 1999). No entanto, este período não é suficiente para ofertar o produto durante o ano todo. Outra forma de armazenamento utilizada é a atmosfera controlada (AC), em que além do controle da temperatura e umidade relativa, envolve a redução da concentração do oxigênio e elevação do CO₂ na câmara de armazenamento. Esta técnica permite o armazenamento de maçãs por até nove meses (BRACKMANN et al., 2005b).

No entanto, o armazenamento prolongado em AC pode causar acentuada redução da acidez, amarelecimento dos frutos, além de perdas com podridões e distúrbios, fazendo com que sejam utilizadas algumas técnicas complementares, com o objetivo de reduzir os distúrbios fisiológicos e auxiliar na manutenção da qualidade de maçãs durante o armazenamento. Dentre elas podemos citar a aplicação de aminoetoxivinilglicina (AVG) a campo, antes da colheita, que além de retardar a colheita, inibe a síntese do fitohormônio etileno (PETRI et al., 2007; BRACKMANN et al., 2009), que é responsável por desencadear o processo de amadurecimento dos frutos climatéricos (YANG; HOFFMAN, 1984; KNEE et al., 1985). Outra técnica, a aplicação de 1-metilciclopropeno (1-MCP), que inibe a ação do

etileno por se ligar de forma irreversível aos receptores de etileno na membrana celular (SISLER; SEREK, 1997; BLANKENSHIP; DOLE, 2003) e a absorção do etileno do ambiente de armazenagem com a utilização de permanganato de potássio também auxiliam na preservação da qualidade dos frutos durante o armazenamento em AC.

Atualmente existe uma grande preocupação por parte dos consumidores com a aplicação de produtos químicos que podem ser potencialmente tóxicos, especialmente em produtos consumidos frescos. Desta forma, busca-se uma alternativa aos produtos citados anteriormente e que ajudem na preservação da qualidade de produtos hortícolas durante o armazenamento. O armazenamento em condições ultrabaixas de oxigênio (ULO – *Ultra Low Oxygen*) é uma técnica complementar à AC, no entanto, deve-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). Esse limite é variável de acordo com a espécie, cultivar, condições de cultivo e ano. Neste sentido foi desenvolvida a técnica da atmosfera controlada dinâmica (ACD), em que se faz o uso de alguns métodos para detecção deste limite mínimo de O₂ tolerável pelos frutos armazenados e, uma vez detectado o estresse pelo O₂ demasiado baixo, a concentração deste gás é aumentada a fim de que se mantenha o menor metabolismo possível sem causar danos. Para esse monitoramento, pode-se utilizar a fluorescência de clorofilas (DeELL et al., 1998; PRANGE et al., 2005), a detecção de etanol gerado pelo metabolismo anaeróbico dos frutos (VELTMAN et al., 2003b) ou o quociente respiratório (QR), que é a razão entre a produção de CO₂ e o consumo de O₂ pelo metabolismo respiratório dos frutos. Quanto maior a respiração anaeróbica, maior o QR.

Alguns destes métodos já estão sendo utilizados comercialmente, enquanto outros ainda estão em estudo, como é o caso do QR. A desvantagem desta técnica é a necessidade de equipamentos sofisticados e de pessoal especializado para manuseá-los. Desta forma, a proposta do presente trabalho é a investigação de outras técnicas que possam ser eficientes na conservação da qualidade de maçãs durante o armazenamento em AC, sem a necessidade de aplicação de produtos químicos e em que se possa utilizar a mesma estrutura que é usada para o armazenamento em AC convencional. Uma destas técnicas é o estresse inicial por baixo oxigênio (ILOS – *Initial Low Oxygen Stress*) seguido do armazenamento em baixo O₂, que além do controlar a escaldadura de algumas cultivares de maçãs suscetíveis (WANG; DILLEY, 2000; ZANELLA, 2003; VAN DER MERWE et al., 2003), substitui o uso do produto químico difenilamina (DPA) e ainda pode ser eficiente na manutenção de outros parâmetros de qualidade. Além disso, o condicionamento ao baixo O₂, pela redução gradativa deste gás nas câmaras de armazenagem, também pode proporcionar um mecanismo

adaptativo a condições de baixo oxigênio, permitindo o armazenamento em condições extremamente baixas de O₂, sem causar dano aos frutos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Maturação e amadurecimento dos frutos

Na fase final do desenvolvimento do fruto ocorre a maturação do mesmo, que envolve alterações bioquímicas e fisiológicas. Representa uma etapa intermediária entre o final do desenvolvimento e o início da senescência, sendo um processo normal e irreversível, porém pode ser retardado com o uso de meios adequados. Os frutos normalmente são colhidos neste estágio. A fase final da maturação é designada como amadurecimento, em que há predominância de processos degradativos, que culminam com a senescência (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Em frutos climatéricos, como a maçã, o amadurecimento é caracterizado por um incremento na taxa de respiração e biossíntese de etileno (LELIÉVRE et al., 1997). De acordo com estes autores, o forte incremento da produção de etileno (climatério) no início do amadurecimento é considerado como um controlador das mudanças de coloração, aroma, textura, flavour e outros atributos bioquímicos e fisiológicos.

O amadurecimento de frutos é um processo complexo que requer grande quantidade de energia. Saquet et al. (2000) monitoraram o nível de ATP e ADP durante o armazenamento de peras ‘Conference’ e maçãs ‘Jonagold’ e observaram que o máximo de ATP coincide com o pico do climatério respiratório.

2.2 A produção de etileno

O fitohormônio etileno desempenha um papel fundamental no processo de amadurecimento e senescência de frutos climatéricos, como a maçã (LELIÉVRE et al., 1997), em que normalmente ocorre um pico na taxa respiratória, após um drástico incremento na

síntese de etileno (YANG; HOFFMAN, 1984). Esta alta produção de etileno (pico climatérico) regula o processo de amadurecimento dos frutos pela indução da expressão de muitos genes relacionados com o amadurecimento, que são responsáveis pelo metabolismo da parede celular, degradação da clorofila, síntese de carotenoides e compostos voláteis e conversão de amido em açúcares (GRAY et al., 1992; ALEXANDER; GRIERSON, 2002). Os parâmetros de amadurecimento, como perda de firmeza de polpa (HAJI et al., 2003; HIWASA et al., 2003), mudanças na coloração da epiderme (FLORES et al., 2001) e produção de aromas são fortemente dependentes da produção de etileno (RUPASINGHE et al., 2000; ALEXANDER; GRIERSON, 2002; FLORES et al., 2002). Concentrações de etileno acima de $0,1 \mu\text{L L}^{-1}$ geralmente aceleram a senescência da maioria dos produtos após a colheita (KNEE et al., 1985), sendo que em frutos como o kiwi a concentração de $0,01 \mu\text{L L}^{-1}$ já é responsável por reduzir o tempo de armazenamento (RETAMALES; CAMPOS, 1997).

Dois sistemas para regulação do etileno são propostos para operar em frutos climatéricos. No sistema 1 o etileno é produzido em baixos níveis (nível basal) na planta durante os estádios de crescimento e desenvolvimento e é auto inibitória, estando presente também em frutos não-climatéricos. No sistema 2 ocorre produção de altos níveis de etileno, durante o amadurecimento de frutos climatéricos e senescência de algumas flores e é auto estimulatória (OETIKER; YANG, 1995).

A produção de etileno ocorre por uma via biossintética que foi primeiramente descrita em maçã por Adams e Yang (1977). Esta rota, denominada de ciclo de Yang, parte do aminoácido metionina, sendo que o composto S-adenosilmetionina (SAM) é o precursor da biossíntese do etileno (YANG; HOFFMAN, 1984). Aproximadamente 80% da metionina presente na célula é convertida em SAM pela enzima SAM-sintetase, com gasto de ATP no processo (RAVANEL et al., 1998). A respiração produz ATP necessário para o Ciclo de Yang. De acordo com Saquet et al. (2000), a máxima produção de ATP coincide com o pico do climatérico respiratório durante o armazenamento de maçãs e peras. O próximo passo no ciclo de Yang é a conversão de SAM a ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), catalisada pela enzima ACC sintase (YANG; HOFFMAN, 1984). Além de ACC, esta enzima também produz 5'-metiltioadenosina (MTA) nesta reação, que é então convertida em metionina, dando continuidade ao ciclo e preservando o grupamento metil para uma nova rodada de produção de etileno (BLEECKER; KENDE, 2000). Ao mesmo tempo o grupamento enxofre da metionina também é conservado. Graças ao processo de reciclagem, podem ser produzidos altos níveis de etileno com um *pool* constante de metionina. Finalmente, o ACC é oxidado pela enzima ACC oxidase para formar etileno, CO_2 e cianeto,

que é destoxificado para β -cianoalanina pela β -cianoalanina sintase a fim de evitar a toxidez por cianeto em altas taxas de síntese de etileno (WANG et al., 2002). O ACC também pode sofrer malonização, formando ácido 1-(malonilamino) ciclopropano-1-carboxílico (MACC) numa reação irreversível (YANG; HOFFMAN, 1984). A malonização do ACC pode contribuir para a regulação dos níveis de ACC no tecido e da taxa de síntese do etileno (LIU et al., 1985).

O etileno produzido pelas plantas é percebido por uma família de receptores, os receptores de etileno, semelhante a dois componentes de histidina quinase bacterianos e são reguladores negativos da transdução de sinal de etileno (BLEECKER, 1999; GUO; ECKER, 2004). Estes receptores pertencem a famílias multigene e sua expressão diferencial durante o amadurecimento também tem sido observado em vários frutos climatéricos (NATH et al., 2006). Na rota de sinalização, o etileno liga-se ao receptor na membrana do retículo endoplasmático (CHEN et al., 2002), por meio de um cofator cobre, inativando este complexo proteico e permitindo a ativação da proteína transmembrana *EIN2*. A ativação da *EIN2* aciona a família de fatores de transcrição *EIN3*, os quais induzem a expressão dos promotores de genes *ERF1*. A ativação desta cascata transcricional provoca alteração na expressão de vários genes-alvo. Também afeta os níveis de mRNA transcrito de vários genes, incluindo os que codificam a celulase, os relacionados com o amadurecimento e síntese de etileno (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A ACC sintase e ACC oxidase são as enzimas chaves na rota de produção de etileno (YANG; HOFFMAN, 1984). Estas enzimas são codificadas por famílias multigenes e uma expressão diferencial de seus membros é reportada durante o amadurecimento de frutos (ZAREMBINSKI; THEOLOGIS, 1994; BARRY et al., 2000). Em maçãs, ocorre a expressão de três genes (*MdACS1*, *MdACS2* e *MdACS3*) para a ACC sintase durante o armazenamento (DONG et al., 1991; ROSENFELD et al., 1996). Na cultivar Granny Smith foram detectados transcritos para *MdACS1* e *MdACS3* (ASIF et al., 2009), além da expressão de *MdACS3* observada em ‘Golden Delicious’ e ‘Fuji’ (SUNAKO et al., 1999). Para os receptores de etileno foram isolados seis genes: *MdETR1*, *MdETR1b*, *MdETR2*, *MdETR5*, *MdERS1* e *MdERS2* (CIN et al., 2005; TATSUKI; ENDO, 2006; WIERSMA et al., 2007). Durante o amadurecimento ocorre primeiramente um acúmulo de transcritos para *MdERS1*, seguido pela transcrição de *MdACS1*. Desta forma, quando ocorre uma mudança do sistema 1 para o sistema 2 de produção de etileno, no início do amadurecimento dos frutos, a expressão de genes para receptores de etileno *MdERS1* aumenta, afetando a rota de transdução de sinal e estimula a indução de genes responsivos ao etileno, incluindo genes da biossíntese de etileno

como o *MdACS1* que, por sua vez, afeta a produção de etileno durante o amadurecimento (ASIF et al., 2009).

Uma vez que o armazenamento em atmosfera controlada e o tratamento com 1-MCP significativamente retardam a maturação de maçãs por prolongar o tempo do pico climatérico de etileno, suspeita-se que esses tratamentos podem regular a biossíntese e percepção de etileno em nível de transcrição. Asif et al. (2009) sugerem que a expressão diferencial de *MdACS1* e *MdERS1* seriam os maiores reguladores do processo de amadurecimento de maçãs, sendo afetados por diferentes condições de armazenamento.

2.2.1 Produtos da fermentação e a produção de etileno

A exposição dos frutos aos produtos da fermentação – etanol e acetaldeído – pode tanto estimular, como inibir a produção de etileno, dependendo da concentração destes produtos no ambiente de armazenagem (BEAULIEU; SALTVEIT, 1997; BURDON et al., 1996). A presença de acetaldeído em baixas concentrações promove a síntese ou ativação da ACC oxidase, o que aumenta a conversão de ACC a etileno e acelera o amadurecimento. Em altas concentrações de acetaldeído, a ACC oxidase é desativada, seja em função da desnaturação provocada pelo acetaldeído ou pela indução de uma rota de inativação (BEAULIEU; SALTVEIT, 1997). Em polpa de manga altas doses de etanol (0,5 e 1%) e baixas doses de acetaldeído (0,1 e 0,5%) estimularam a produção de etileno (BURDON et al., 1996).

O efeito do acetaldeído no controle da produção de etileno é mais pronunciado que o do etanol. Após a adição de ACC, o precursor do etileno, em polpa de mangas, houve um forte incremento da produção de etileno, sendo que a aplicação de acetaldeído nas concentrações de 0,5 e 1% reduziu drasticamente a produção de etileno, enquanto que a aplicação de etanol teve um pequeno efeito (BURDON et al., 1996). Efeitos benéficos do acetaldeído também foram constatados na inibição do etileno em uvas tratadas com ACC (PESIS; MARINANSKY, 1992), no atraso do amadurecimento de bananas (HEWAGE et al., 1995) e na redução da produção de etileno em mangas (PRASAD et al., 1999), o que não ocorreu com a aplicação de etanol.

A enzima álcool desidrogenase (ADH) catalisa a interconversão entre etanol e acetaldeído. Em tecidos de tomate em que foi aplicado 4-metilpirazol (4-MP) juntamente com

acetaldeído, estes apresentaram um maior nível endógeno de acetaldeído e o amadurecimento foi inibido por mais tempo comparado aos tecidos que não receberam 4-MP (BEAULIEU et al., 1997). O 4-MP é um inibidor da enzima ADH e, neste caso, evitou a conversão do acetaldeído, aplicado nos frutos, a etanol. Dessa forma, os autores afirmam que o acetaldeído presente no tecido, resultante da conversão do etanol ou da aplicação do próprio acetaldeído, parece ser o fator determinante para a inibição do amadurecimento.

O acetaldeído possivelmente age diretamente sobre a enzima ACC oxidase, inibindo-a. Isso é devido à natureza eletrofílica do grupo carbonila presente na molécula, que é capaz de reagir com grupos nucleofílicos. Dessa forma, o acetaldeído é capaz de se ligar a grupos amino livres das proteínas e também a grupos sulfidril (LIEBER, 1988). Esta alta reatividade do acetaldeído explica a dificuldade deste composto em penetrar no interior da polpa de mangas, mesmo depois de descascadas (BURDON et al., 1996). Estes autores sugerem que curtos períodos de anaerobiose, proporcionados por ambientes de armazenagem com baixo O₂, sejam mais eficientes no controle do amadurecimento de frutos pela produção de etanol e acetaldeído no interior da polpa dos frutos, enquanto que a aplicação exógena destes compostos atinge apenas a parte externa da polpa, portanto o efeito é menor.

Em flores de corte, o efeito do acetaldeído no controle da síntese de etileno ocorre pela diminuição da atividade da enzima ACC sintase (PODD; VAN STADEN, 1999). Por outro lado, Pesis et al. (1998), adicionando ACC em partes da polpa de abacate, demonstraram que o acetaldeído reduz a produção de etileno pela inibição da atividade da enzima ACC oxidase. Asoda et al. (2009) demonstraram os mecanismos bioquímicos e moleculares da inibição da biossíntese de etileno em brócolis tratados com etanol. Estes autores constataram que a atividade da ACC sintase e ACC oxidase foram inibidas pelo etanol e isto se deve à supressão da transcrição dos genes *BO-ACO1*, *BO-ACO2* e *BO-ACSI*.

O etanol possui a capacidade de causar mudanças estruturais em membranas celulares, que resultam em um aumento da permeabilidade e desnaturação de proteínas associadas (SALTVEIT, 1989). Baseado nesta afirmação, este autor sugere que o etanol influencia na ação do etileno pela capacidade de se permear na bicamada lipídica da membrana plasmática, afetando ao arranjo estrutural e causando a desnaturação dos receptores de etileno. No entanto, as concentrações necessárias para provocar esse dano nas membranas, a fim de diminuir a produção de etileno, deveriam ser bem menores que as concentrações que provocariam extravasamento de íons.

2.2.2 Aplicação de 1-MCP

O composto volátil 1-metilciclopropeno (1-MCP) possui a capacidade de inibir a ação do etileno, ligando-se irreversivelmente aos receptores de etileno nas membranas das células, inibindo o estímulo fisiológico e a transdução de sinal (SISLER; SEREK, 1997) reduzindo, portanto, o amadurecimento de frutos climatéricos. A afinidade do 1-MCP com os receptores é aproximadamente 10 vezes maior que a do próprio etileno. Comparada com o etileno, o 1-MCP é ativo a concentrações muito menores. O uso de 1-MCP é uma ferramenta útil para aplicação comercial a fim de reduzir o processo de amadurecimento, manter a qualidade e estender a vida de prateleira de frutos, vegetais e espécies ornamentais (BLANKENSHIP; DOLE, 2003).

A aplicação de 1-MCP na dose de 625 nL L⁻¹ proporcionou maior firmeza de polpa, cor da epiderme mais verde e menor incidência de distúrbios fisiológicos, podridões e menores taxas respiratórias e de produção de etileno, demonstrando o forte efeito desse antagonista ao etileno sobre o controle do amadurecimento de maçãs ‘Gala’ (BRACKMANN et al., 2004). O armazenamento em AC pode prolongar o efeito do 1-MCP sobre as características físicas e sensoriais de maçãs e estas duas tecnologias geralmente são mais eficientes quando combinadas (WATKINS et al., 2000; BAI et al., 2005). Já Corrent et al. (2005), comprovaram que a aplicação de 1-MCP não proporcionou benefícios à maçã ‘Fuji’ armazenada em AC, sendo eficiente apenas em armazenamento refrigerado (AR). De acordo com Watkins et al. (2000), as respostas à aplicação do 1-MCP variam em função da espécie, cultivar, região e condição de armazenamento. Além disso, a temperatura e o tempo de exposição ao produto também afetam a eficiência do mesmo (DeELL et al., 2002).

Quando utilizado em combinação com baixa temperatura, o efeito do 1-MCP aumenta a vida útil de maçãs em comparação com o uso de 1-MCP em frutos conservados em temperatura mais elevada. Este resultado sugere que a taxa de formação de novos receptores de etileno é suprimida pela baixa temperatura, aumentando assim a eficiência do 1-MCP (ASIF et al., 2009).

Além de inibir a ação do etileno, o 1-MCP também influencia na síntese deste fitohormônio. A expressão gênica para receptores de etileno *MdERS1* em maçãs ‘Granny Smith’ foi afetada pela aplicação de 1-MCP e armazenamento em baixo O₂, enquanto que a expressão de *MdETRI* não foi afetada por estes tratamentos (ASIF et al., 2009). Por outro lado, a aplicação de 1-MCP não afetou a expressão do gene para a ACC oxidase (*MdACO1*)

em maçãs ‘Fuji’ e ‘Orin’ (TATSUKI et al., 2007) e ‘Granny Smith’ (ASIF et al., 2009), bem como o baixo O₂ também não teve efeito sobre esta última cultivar. Em outras cultivares o tratamento com 1-MCP também diminuiu a expressão de *MdERS1* (CIN et al., 2006; TATSUKI et al., 2007), *MdACS1* e *MdERS2*, suprimindo a produção de etileno (TATSUKI et al., 2007). Quando maçãs ‘Granny Smith’ que estavam produzindo etileno (após terem sido transferidas de 1 para 18 °C), foram tratadas com 1-MCP, a produção de etileno foi reduzida significativamente. Essa queda foi acompanhada pela diminuição da abundância de transcritos de *MdERS1* e *MdACS1*, indicando que a sua expressão é regulada pela flutuação dos níveis de etileno (ASIF et al., 2009). Tatsuki et al. (2007) observaram que a eficácia é dependente da produção de etileno dos frutos no momento da aplicação do produto, ou seja, quanto mais tarde a aplicação de 1-MCP após a colheita, menor foi a eficiência.

Apesar dos vários benefícios da aplicação de 1-MCP no armazenamento de maçãs, parece que a suscetibilidade a algumas desordens podem aumentar pelo tratamento com 1-MCP, apesar de poucos trabalhos destas respostas terem sido publicados (WATKINS, 2006). Foi observada maior ocorrência de injúria externa por alto CO₂ em frutos tratados com 1-MCP, comparada aos não tratados (DeELL et al., 2003; ZANELLA, 2003; WATKINS; NOCK, 2004). Além disso, também foram observadas manchas marrons na superfície de maçãs ‘Granny Smith’ tratadas com 1-MCP, que na sequência mudaram para manchas necróticas escuras com formato arredondado de 2 a 4 mm de diâmetro (ZANELLA et al., 2005). Entretanto estes autores sugerem que este efeito fitotóxico do 1-MCP possa estar relacionado com o clima extremamente quente e seco durante a fase vegetativa e colheita dos frutos daquela safra.

2.3 O processo respiratório

Por meio da respiração ocorre a oxidação de compostos orgânicos, formando água e CO₂, com produção de energia química. Após a colheita dos frutos, a respiração torna-se o principal processo fisiológico. A energia química liberada pela respiração é utilizada para dar continuidade aos processos de síntese necessários à sobrevivência, como a organização celular, permeabilidade de membranas e transporte de metabólitos para os tecidos, a fim de manter as funções vitais das células (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Por outro lado, a fim de preservar a qualidade dos frutos por um período maior, a respiração deve ser mantida em

uma taxa mínima. De acordo com KADER (1986), a deterioração pós-colheita de frutos e vegetais é causada por vários fatores em conjunto, incluindo mudanças bioquímicas associadas com o metabolismo respiratório.

2.3.1 Respiração aeróbica

A respiração aeróbica consiste na oxidação de reservas orgânicas a moléculas simples, incluindo CO_2 e água, com produção de energia. Neste processo são utilizados carboidratos, lipídeos e ácidos orgânicos, consumindo O_2 , em uma série de reações enzimáticas. Glicólise, ciclo de Krebs e o sistema de transporte de elétrons (fosforilação oxidativa) são as rotas metabólicas da respiração aeróbica (FONSECA et al., 2002; TAIZ; ZEIGER, 2009).

A glicólise é a primeira etapa da respiração, sendo a principal via de degradação dos carboidratos. Ocorre no citoplasma, onde um mol de glicose fosforilada com seis átomos de carbono é cindido em duas moléculas de piruvato com três átomos de carbono (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

O ciclo de Krebs ou ciclo do ácido tricarboxílico constitui o segundo estágio da respiração e ocorre na matriz mitocondrial. Para que este ocorra é necessário a presença de piruvato gerado na glicólise. O piruvato entra na mitocôndria, importado direto do citosol ou é sintetizado pela ação da enzima NAD-málica mitocondrial, a partir do malato, que é proveniente do fosfoenolpiruvato (PEP) citosólico (SWEETLOVE et al., 2010). Na mitocôndria este composto é oxidado via o complexo piruvato desidrogenase para formar Acetil Coenzima A (Aceti-CoA). Neste processo ocorre um acoplamento do sítio ativo, pela enzima 2-oxo ácido desidrogenase, para catalisar a descarboxilação do piruvato, a esterificação de aldeídos para CoA pela acetiltransferase e a redução do NAD^+ para NADH pela lipoamida desidrogenase (MILLAR et al., 2011). A enzima citrato sintase catalisa a condensação do oxaloacetato e Acetil-CoA para formar citrato e CoA. O citrato é isomerizado a isocitrato pela aconitase. As duas reações seguintes são descarboxilações oxidativas, cada uma liberando um NADH e um CO_2 , produzindo succinil-CoA que é oxidado a oxaloacetato, permitindo a continuação do ciclo (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A maioria das reações que ocorrem no ciclo de Krebs podem ser contornadas por reações do citosol, sendo que apenas aquelas catalisadas pela citrato sintase e succinato desidrogenase são exclusivas da mitocôndria. Há, portanto, grandes evidências de que em

muitos tecidos o ciclo de Krebs não opera como um ciclo completo, mas ocorrem interações metabólicas com o citosol mediadas por um grande número de transportadores na membrana interna, que ocorrem em situações específicas como, por exemplo, em tecidos sob anóxia (SWEETLOVE et al., 2010).

A fosforilação oxidativa é o terceiro estágio da respiração aeróbica. Nesta etapa ocorre a oxidação dos NADH e FADH₂ produzidos na glicólise e ciclo de Krebs, sendo que os elétrons passam pela cadeia de transporte de elétrons, na membrana mitocondrial interna, reduzindo o O₂ e formando um gradiente eletroquímico de H⁺. Essa energia é convertida em ATP pela ATP-sintase, localizada na membrana interna, a partir do fluxo de prótons de volta para a matriz mitocondrial, ao longo de seu gradiente eletroquímico (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A oxidação completa de uma molécula de sacarose produz aproximadamente 60 ATPs. Neste processo uma parte da energia é perdida na forma de calor para o ambiente externo, sendo que aproximadamente 52% da energia livre padrão disponível para a completa oxidação da sacarose, é armazenada na forma de ATP pela respiração aeróbica. Já no metabolismo fermentativo o rendimento é de aproximadamente 4% (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Apesar de necessária para produção de energia, a respiração é o fator que mais contribui para as perdas pós-colheita de produtos perecíveis. O padrão respiratório pós-colheita de produtos frescos depende da temperatura de armazenamento e da composição gasosa (O₂, CO₂ e etileno). A diminuição da atividade enzimática pela diminuição da temperatura, baixo O₂ e alto CO₂ reduz a taxa de utilização de substratos (carboidratos, ácidos orgânicos e outras reservas) e aumenta a vida pós-colheita de frutos além da expectativa (KADER, 1986; SALTVEIT, 2004).

2.3.2 Respiração anaeróbica

Nas condições de armazenamento em que a concentração de oxigênio é limitada ou ausente, ocorre o processo de fermentação ou respiração anaeróbica (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Nesta situação a rota glicolítica é usada como a maior fonte de produção de energia, ao invés do ciclo Krebs (KENNEDY et al., 1992). O metabolismo fermentativo inclui duas rotas. Em uma delas o piruvato é descarboxilado para formar acetaldeído, catalizado pela enzima piruvato descarboxilase (PDC). A outra enzima, álcool desidrogenase (ADH), converte o acetaldeído em etanol, usando o NADH gerado na glicólise. Enquanto que

para muitas plantas o etanol é o produto final da fermentação, em alguns tecidos uma parte do etanol reage com a acetil coenzima A para produzir etil acetato, catalisado pela enzima álcool acetiltransferase (ATT). Na outra rota, o piruvato é reduzido a lactato, usando NADH, catalisado pela enzima lactato desidrogenase (LDH) (KE et al., 1993) (Figura 1).

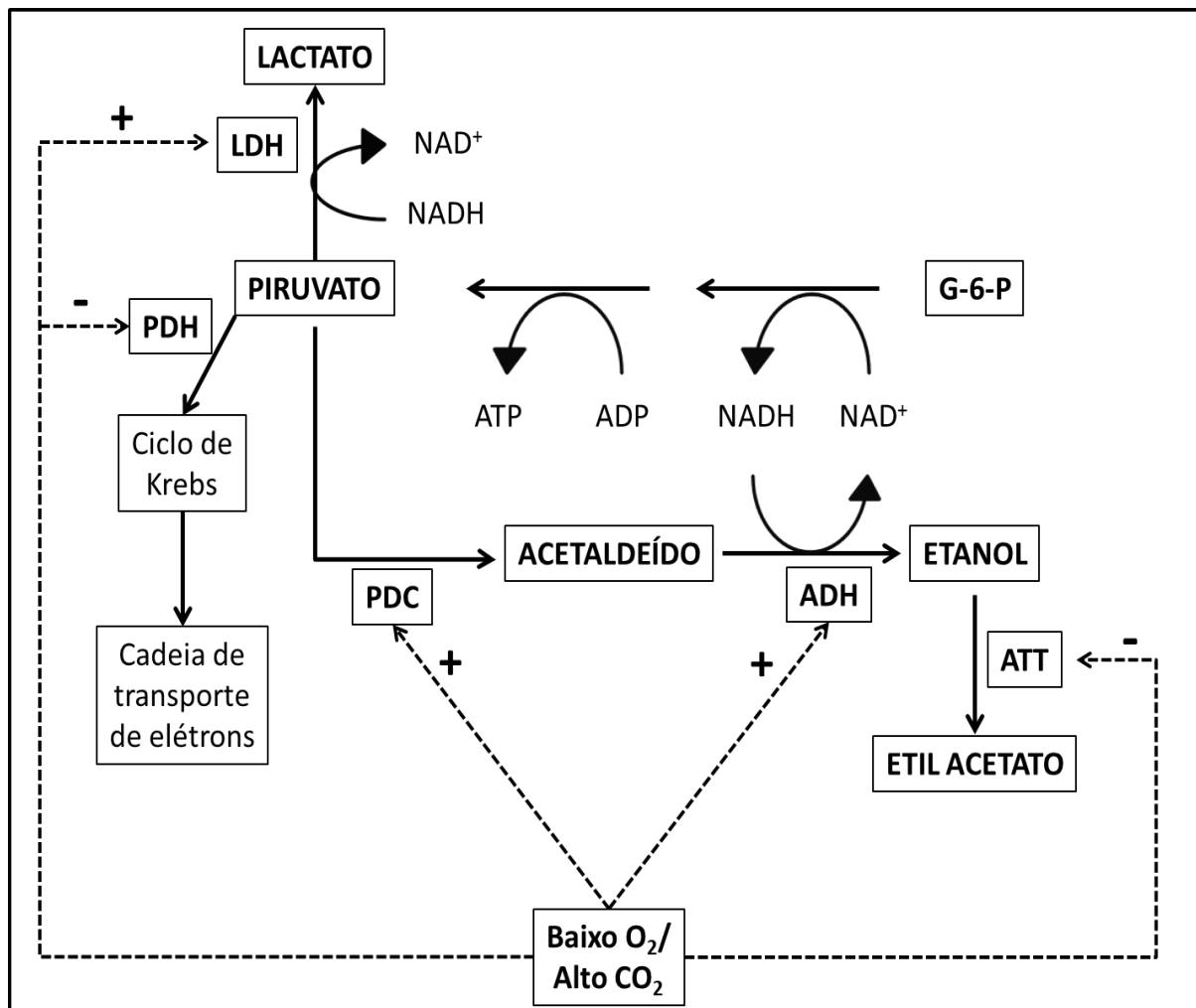


Figura 1 - Modo de ação do estresse por baixo O_2 e/ou alto CO_2 no metabolismo fermentativo dos frutos. Símbolos e abreviaturas: (-) = redução ou inibição; (+) = aumento ou ativação; ATT = álcool acetiltransferase; ADH = álcool desidrogenase; G-6-P = glicose-6-fosfato; LDH = lactato desidrogenase; PDC = piruvato descarboxilase; PDH = piruvato desidrogenase. Adaptado de KE et al. (1993).

A ativação da fermentação serve tanto para oxidar NADH na ausência de O_2 , como para evitar o acúmulo de piruvato, uma vez que há um aumento na produção deste composto

devido à ativação da glicólise e inibição do ciclo de Krebs (ZABALZA et al., 2009). É importante a oxidação do NADH a NAD^+ e o consumo do piruvato quando a cadeia de transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa estão inibidas, a fim de que a glicólise possa prosseguir. Isso possibilita a produção de ATP através da fosforilação em nível de substrato, que permite que os tecidos das plantas sobrevivam (KE et al., 1993; CHERVIN et al., 1996).

A fermentação alcoólica parece ser induzida principalmente por uma queda no status de energia do tecido e não por uma baixa concentração de oxigênio, indicando que a detecção do estado de energia é um componente importante para otimizar o metabolismo das plantas às mudanças na disponibilidade de oxigênio (ZABALZA et al., 2009). Para economizar energia a planta diminui o consumo de oxigênio pela respiração, que pode ajudar a adiar ou até mesmo impedir os tecidos de ficarem em anóxia. Foi observada uma diminuição do fluxo da glicólise, do consumo de oxigênio através da respiração e uma queda no nível de energia do adenilato (relação ATP/ADP), em resposta ao baixo oxigênio interno (GEIGENBERG et al., 2000; BOLOGA et al., 2003).

À medida que a concentração de O_2 vai diminuindo, a eficiência da produção de ATP por oxigênio consumido pela respiração aumenta. Dependendo da combinação específica dos doadores de elétrons e oxidase terminal, o montante de ATP que é produzido pela redução de um mol de oxigênio pode variar significativamente. Em condições normais de O_2 , ocorre uma maior atividade da oxidase alternativa, sendo observada uma diminuição na produção de ATP em até 60%, uma vez que os complexos III e IV da membrana mitocondrial interna não são utilizadas para bombear prótons para o espaço intermembrana (RASMUSSEN et al., 2008). Nesta situação (normóxia) a oxidase alternativa é ativada para minimizar a produção de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria (SKUTNIK; RYCHTER, 2009). Com a diminuição da concentração de O_2 a relação entre a atividade da citocromo c oxidase para a oxidase alternativa aumenta e isto acontece basicamente pela diminuição da atividade da oxidase alternativa, enquanto que a citocromo c oxidase praticamente não é alterada (GUPTA et al., 2009). Este mecanismo é utilizado para aumentar a eficiência do uso de O_2 quando a sua disponibilidade é limitada, a fim de produzir ATP via fosforilação oxidativa.

Em células de plantas a falta de oxigênio provoca o acúmulo de lactato, alanina e etanol (PERATA; ALPI, 1993; RICARD et al., 1994). O lactato é acumulado apenas nos estágios iniciais, pois a enzima lactato desidrogenase tem um pH ótimo acima de 7,0, de modo que sua atividade será fortemente inibida com a acidificação do citoplasma, favorecendo o fluxo de carbono para acetaldeído em vez de lactato (CHERVIN et al., 1996). O acetaldeído é um produto tóxico para as células. Dessa forma, a indução da ADH, ao

mesmo tempo da PDC, é provavelmente uma importante forma de prevenir o acúmulo de acetaldeído durante anóxia, permitindo que este seja reduzido a etanol. A presença de acetaldeído está associada com muitas desordens fisiológicas pós-colheita, relacionadas com a temperatura, níveis baixos de O₂ e alto de CO₂ no ambiente de armazenagem (SMAGULA; BRAMLAGE, 1977). Seu efeito tóxico é considerado maior que o do acúmulo de etanol (CHERVIN et al., 1996). A indução da atividade da ADH é uma das mais importantes mudanças adaptativas durante o baixo O₂ (PERATA; ALPI, 1993; RICARD et al., 1994). Mutantes de milho que não apresentam atividade de ADH, não conseguem sobreviver em condições de anóxia (KENNEDY et al, 1992).

No entanto, a mudança na atividade da ADH e PDC nem sempre estão correlacionadas com a concentração final de seus produtos correspondentes (etanol e acetaldeído) (IMAHORI et al., 2002; KE et al., 1994). Roberts et al. (1989) constataram que a taxa de produção de etanol em raízes de milho sob hipóxia estava correlacionada com a atividade da ADH quando o nível da enzima se encontrava bastante baixo, mas em altos níveis a produção de etanol foi independente de sua atividade. De acordo com Xia e Saglio (1992) a atividade da ADH não é o fator limitante para o acúmulo de etanol em alguns tecidos de plantas. Também em abacates o tratamento com baixo O₂ (0,0 a 5,0 kPa) não resultou em aumento da atividade da ADH. Tanto o tempo de exposição como o estágio de desenvolvimento dos frutos não alteraram este padrão (LOULAKAKIS et al., 2006).

Por outro lado, ocorre uma indução e aumento da intensidade de novas isoenzimas de ADH e acúmulo de suas espécies de mRNAs em condições de baixo O₂ (LOULAKAKIS et al., 2006). Resultado semelhante já havia sido constatado por Nanos et al. (1992), que observaram que o aumento da atividade da ADH em peras ‘Bartlett’ ocorreu basicamente devido à indução de uma isoenzima de ADH. Frutos que apresentavam dois diferentes estádios de maturação mostraram potenciais semelhantes para induzir isoenzimas de ADH e correspondentes mRNAs em baixo O₂. Contudo, frutos em amadurecimento apresentam maior indução da ADH comparados aos pré-climatéricos, o que pode ser atribuído ao fato de que a ADH é regulada pelo etileno (VAN DER STRAETEN et al., 1991; TESNIERE et al., 2004), sugerindo que abacates maduros possuem maior potencial de expressar isoenzimas de ADH que aqueles imaturos (LOULAKAKIS et al., 2006).

Em maçãs, o aumento da expressão gênica para enzima ADH (*MdADH*) significa que os frutos armazenados em baixo O₂ são sensíveis à condições de hipóxia. *MdADH* pode ser analisada para verificar se as maçãs são sensíveis ao baixo O₂, pois a ADH é tratada como um marcador para condições de hipóxia (ASIF et al., 2009).

2.4 Armazenamento de maçãs em AC

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 taxa respiratória dos frutos (YAMASHITA, 1994; BRACKMANN et al., 2008a) e a produção de etileno (LAU, 1985; GORNY; KADER, 1994), mantendo a qualidade dos mesmos. O seu uso com maçãs foi primeiramente reportado no ano de 1927, por Kidd e West (MATHOOKO, 1996).

Entretanto, mesmo com a utilização de AC podem ocorrer danos nos frutos quando armazenados por um período prolongado, em função da presença de etileno no ambiente de armazenamento. Neste sentido, busca-se técnicas complementares à AC que ajudem a manter a qualidade e prolongar o armazenamento. Dentre estas, estão a aplicação de 1-MCP que se liga aos receptores de etileno, inibindo o estímulo fisiológico e a transdução de sinal, reduzindo o amadurecimento de produtos hortícolas (SISLER; SEREK, 1997; BLANKENSHIP; DOLE, 2003). A aplicação pré-colheita de AVG também é eficiente na retenção da qualidade pós-armazenagem (STEFFENS et al., 2005). Outra técnica utilizada é a associação da absorção de etileno ao armazenamento em AC, que é eficiente na manutenção da qualidade físico-química, na diminuição da ocorrência de podridões e distúrbios fisiológicos de maçãs 'Royal Gala' (BRACKMANN et al., 2000), na redução da atividade das enzimas poligalacturonase e pectinametilsterase, retardando a degradação de substâncias pécnicas da parede celular e, com isso, reduzindo a perda de firmeza (LIMA et al., 2000).

No entanto, estas técnicas complementares ao armazenamento em AC são baseadas no uso de compostos químicos que poderiam trazer algum prejuízo à saúde do consumidor. Com uma preocupação crescente pelo consumo de alimentos sem contaminantes, faz-se necessário o uso de técnicas de armazenamento que trabalhem mais detalhadamente o manejo das concentrações gasosas do ambiente de armazenagem sem aplicação de compostos químicos. Uma técnica recente é a atmosfera controlada dinâmica (ACD), em que as concentrações de O_2 variam durante a armazenagem, conforme necessidade do fruto armazenado. Quando iniciar a fermentação devido às baixas pressões parciais de oxigênio, é injetado 0,2 a 0,3 kPa de O_2 no ambiente da câmara e, desta forma, a respiração anaeróbica é reduzida, não

permitindo a ocorrência de dano ao fruto (GASSER et al., 2006; WATKINS, 2008). DeLong et al (2007) afirmam que esta tecnologia mantém maior qualidade dos frutos, comparado ao armazenamento em atmosfera controlada tradicional e, ainda, pode ser uma opção de uso em um sistema de produção orgânico, por não usar compostos químicos. Gasser et al. (2008), avaliando as cultivares de maçã ‘Golden Delicious’, ‘Maigold’, ‘Elstar’ e ‘Braeburn’, observaram maior firmeza de polpa e menor ocorrência de distúrbios fisiológicos em frutos armazenados em ACD, comparados aos armazenados em AC convencional.

Apesar dos benefícios da ACD, esta técnica tem como inconveniente o uso de equipamentos sofisticados que são necessários para o acompanhamento do estresse nos frutos, como um quite para detecção da fluorescência de clorofila ou a evolução de etanol. Além disso, há a necessidade de profissionais especializados para o acompanhamento desta nova técnica. Outra técnica que pode ser adotada, utilizando a mesma estrutura que é empregada para AC convencional, é a atmosfera controlada com pressões parciais ultrabaixas de oxigênio (ULO – *Ultra Low Oxygen*) seguido de um estresse por baixo O₂ nos primeiros dias de armazenamento (ILOS – *Inicial Low Oxygen Stress*) ou o condicionamento dos frutos ao armazenamento em ULO, pela redução gradativa do oxigênio do ambiente de armazenamento. Estas duas técnicas estão explicadas detalhadamente a seguir.

2.4.1 Estresse inicial por baixo oxigênio

O estresse inicial por baixo oxigênio (ILOS – do inglês *Initial Low Oxygen Stress*) é uma técnica complementar ao armazenamento em AC, que visa aumentar o período de armazenamento de frutos climatéricos, mantendo a qualidade dos mesmos. Consiste em manter os frutos, durante o período inicial de armazenamento, em concentrações extremamente baixas de O₂ (menor que 0,4 kPa). O grande benefício do armazenamento em ILOS seguido do armazenamento em AC com ultrabaixo oxigênio (ULO) está relacionado ao controle da escaldadura em cultivares de maçãs suscetíveis a este distúrbio, como a ‘Red Delicious’ e ‘Granny Smith’ (MATTÈ et al., 2005; VAN DER MERWE et al., 2003; WANG; DILLEY, 2000). Zanella (2003) verificou total ausência de escaldadura na maçã ‘Granny Smith’ tanto no armazenamento em AC com 0,7 kPa de O₂ mais 0,7 kPa de CO₂ (ULO) como no armazenamento com ILOS (0,4 kPa de O₂ por 14 dias) seguido pelo armazenamento em 1,0 kPa de O₂ e 1,0 kPa de CO₂. De acordo com este autor, ao contrário do tratamento em

ILOS, apesar da eficiência do controle da escaldadura, é preciso ter cuidado ao recomendar a aplicação comercial do tratamento em ULO em função do nível extremamente baixo de O₂, próximo do ponto de compensação anaeróbico. Portanto, só deveria ser usadas com segurança com o uso de dispositivos que sinalizem o estresse de O₂ em frutas, como sensores de etanol (VERSCHOOR et al., 2001 *apud* ZANELLA, 2003) ou de fluorescência de clorofila (PRANGE et al., 2001 *apud* ZANELLA, 2003). Por outro lado, na maçã ‘Starkrimson Delicious’ não houve controle da escaldadura com armazenamento em ILOS, durante 10 dias com 0,04 kPa de O₂, seguido do armazenamento em 0,7 ou 1,5 kPa de O₂ (LAU, 1997).

A escaldadura é caracterizada por áreas escurecidas na epiderme dos frutos e seu aparecimento está relacionado com o armazenamento em baixa temperatura e é dependente da cultivar, estágio de maturação e condições climáticas (INGLE; D’SOUZA, 1989). A presença de etileno no ambiente de armazenamento estimula a formação de α -farneseno (WATKINS et al., 1993) e a sua oxidação a trienos conjugados (HUELIN; COGGIOLA, 1970) e 6-metil-5-hepten-2-ona (MHO-ona) (SONG; BEAUDRY, 1996) é responsável pelo surgimento da escaldadura na epiderme dos frutos. Este último é convertido em 6-metil-5-hepten-2-ol (MHO-ol) em maçãs pré-tratadas com baixo oxigênio antes do armazenamento refrigerado, diminuindo a ocorrência de escaldadura em maçãs ‘Granny Smith’ (PESIS et al., 2010). A conversão de MHO-ona no álcool MHO-ol está relacionada com a indução da enzima ADH nos tratamentos com baixo O₂, resultando em menor ocorrência de escaldadura nestes frutos. O estresse com baixo O₂ induz a atividade de ADH em maçãs (DIXON; HEWETT, 2001; SAQUET; STREIF, 2008). Dessa forma, a relação entre MHO-ona e MHO-ol pode ser usada como um índice para avaliar a severidade da escaldadura.

O tratamento pós-colheita com o antioxidante difenilamina (DPA) é eficiente no controle da escaldadura, no entanto está se buscando novas alternativas para o controle da escaldadura, em função da crescente preocupação de ambientalistas, produtores, embaladores e consumidores com o uso deste tratamento químico (ZANELLA, 2003). Neste sentido, foram realizados trabalhos que constataram o benefício da aplicação de etanol no controle da escaldadura (SCOTT et al., 1995; GHAMRAMANI; SCOTT, 1998b). Assim, o controle da escaldadura com o uso de ILOS, provavelmente esteja relacionado ao incremento da produção de etanol endógeno dos frutos. Um período de estresse por baixo O₂ (<0,01%) de oito a dez dias controlou completamente a escaldadura superficial em maçãs Granny Smith, sem causar injúrias ou off-flavour nos frutos (GHAMRAMANI; SCOTT, 1998a). Estes mesmos autores sugerem que o efeito benéfico do tratamento por baixo O₂ possa estar relacionado com a produção de etanol destes frutos que foi maior quanto maior o tempo de estresse.

Após um período de estresse por baixo O_2 , a concentração de etanol vai diminuindo nos frutos armazenados em atmosfera refrigerada. GHAHRAMANI; SCOTT (1998b) verificaram que a concentração de etanol que era de 2,0 a 2,5 $mg mL^{-1}$ de suco da fruta após um período de oito a dez dias de estresse, caiu para valores próximos de 0,5 $mg mL^{-1}$ após 16 semanas de armazenamento a 0 °C.

Além do efeito benéfico no controle da escaldadura, a exposição de maçãs a condição de ILOS também traz benefícios a outros parâmetros de qualidade. Mattè et al. (2005) fizeram uma avaliação, em nível comercial, do armazenamento de maçãs ‘Red Delicious’ em ILOS seguido do armazenamento em ultrabaixo O_2 e constataram que houve efeito benéfico na manutenção da acidez e firmeza de polpa dos frutos submetidos a estes tratamentos. Da mesma forma, para as cultivares ‘Granny Smith’ e ‘Law Rome’ o tratamento com ILOS (0,25 ou 0,5 kPa de O_2 durante duas semanas) resultou em maior retenção da firmeza de polpa quando seguido do armazenamento em AC com 1,5 kPa de O_2 (WANG; DILLEY, 2000). De acordo com estes autores, o nível e a duração de ILOS, bem como a temperatura e o subsequente regime de O_2 durante o armazenamento em AC são importantes fatores que determinam a eficácia do ILOS, uma vez que foi constatado excelente retenção da firmeza de polpa em frutos armazenados em 1,5 kPa de O_2 após tratamento com ILOS, o que não aconteceu quando estes frutos permaneceram em 3,0 kPa de O_2 após o estresse por baixo O_2 .

O tratamento com estresse inicial com baixo O_2 , por meio de um fluxo de N_2 por 10 dias, antes do armazenamento por quatro meses na temperatura de 0 °C, manteve a firmeza de polpa de maçãs ‘Granny Smith’ de forma similar à aplicação de 1-MCP (PESIS et al., 2010). Tanto nos frutos que receberam 1-MCP, quanto naqueles expostos ao baixo O_2 , foi verificado um incremento na expressão gênica da enzima pectinametilesterase (PME), especialmente da *MdPME4*, o que pode explicar a maior firmeza de polpa nestes frutos. A atividade da enzima PME está associada à manutenção da firmeza de polpa, uma vez que foi constatada a diminuição da atividade da PME durante o amadurecimento e amolecimento de maçãs ‘Mondial Gala’ (GOULAO et al., 2007).

2.4.1.1 Mudanças induzidas pelo estresse

O estresse por baixo O_2 induz mudanças fisiológicas, bioquímicas e moleculares nos tecidos das plantas que são partes do mecanismo adaptativo a esse estresse (DREW, 1997). As

mudanças moleculares envolvem uma reprogramação da expressão gênica que consiste na indução da transcrição (KLOK et al., 2002) e tradução seletiva de mRNAs para proteínas anaeróbicas (FUKAO; BAILEY-SERRES, 2004). Em raízes de milho sob condição de hipóxia (3 kPa de O₂), Chang et al. (2000) constataram a supressão da síntese da maioria das proteínas aeróbicas e indução da síntese de proteínas anaeróbicas como a ADH, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, PDC, enolase, entre outras.

A condição de anaerobiose durante o armazenamento pode ser induzida pela modificação da atmosfera, mas também ocorrem naturalmente durante o amadurecimento em partes internas da polpa (LARA et al., 2011). ILOS induz a produção de etanol endógeno em maçãs (WANG; DILLEY, 2000) e pêssago (POLENTA et al., 2005). De acordo com Nanos et al. (1992), peras expostas a uma atmosfera com baixo oxigênio acumulam altos níveis de etanol e acetaldeído, no entanto esta concentração retorna à condição normal após a exposição ao ar, enquanto que a atividade das enzimas ADH e PDC permanecem altas. Aparentemente a alta atividade destas enzimas, induzidas por um tratamento de anaerobiose, produz uma espécie de “estágio de tolerância” que ajuda a destoxificar o etanol e acetaldeído normalmente produzidos durante o amadurecimento (POLENTA et al., 2005).

A presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) está diretamente relacionada com a senescência de frutas e hortaliças, e desta forma, com perdas na pós-colheita (HODGES et al., 2004). De acordo com Sabban-Amin et al. (2011) um período de anóxia em maçãs antes do armazenamento em baixa temperatura é responsável pela diminuição de EROs, estando correlacionado com a menor ocorrência de escaldadura superficial. Na avaliação da expressão gênica das enzimas antioxidantes, os autores verificaram que a expressão da catalase (CAT) aumentou nos tratamentos com baixo O₂ e aplicação de etanol, a fim de absorver H₂O₂. Existe uma correlação entre alta atividade de enzimas antioxidantes, como a CAT e peroxidase (POX), e a resistência dos frutos à escaldadura (RAO et al., 1998). Por outro lado, a enzima polifenoloxidase (PPO) é responsável pelo escurecimento dos tecidos e está associada com o desenvolvimento de escaldadura em maçãs (PESIS et al., 2007). Em maçãs ‘Granny Smith’ expostas ao baixo O₂ no início do armazenamento (10 dias em 0,5 kPa de O₂), foi constatada uma baixa expressão gênica para a uma enzima PPO, que pode estar associado ao menor dano por escaldadura na epiderme dos frutos (SABBAN-AMIN et al., 2011). Além disso, os produtos da fermentação (etanol e acetaldeído), produzidos durante a exposição ao baixo O₂, possuem alta capacidade para absorção de EROs (CHANJIRAKUL et al., 2007).

A resposta de plantas a condições de hipóxia e anóxia envolvem um mecanismo adaptativo que permite a sobrevivência em condições de estresse por baixo O₂ por vários dias

(GEIGENBERGER, 2003). O baixo oxigênio, além do seu efeito inibitório na biossíntese e ação do etileno, exerce o seu efeito no prolongamento do armazenamento de frutas por induzir numerosos genes e proteínas que possivelmente participam da adaptação dos frutos ao baixo O_2 (LOULAKAKIS et al., 2006). No entanto, ainda não estão totalmente elucidados os mecanismos envolvidos no estresse por baixo O_2 . Mais pesquisas sobre o mecanismo de tolerância fornecerão uma melhor compreensão para otimizar os aspectos tecnológicos dos tratamentos com anóxica (POLENTA et al., 2005).

2.4.2 Condicionamento ao baixo oxigênio

O armazenamento em condições ultrabaixas de oxigênio (ULO, do inglês *Ultra Low Oxygen*) é uma técnica complementar à AC, que visa minimizar perdas durante o período de pós-colheita. Para a manutenção da qualidade pós-colheita dos frutos em ULO, as concentrações de oxigênio devem ser mantidas um pouco acima do ponto de compensação anaeróbica, em que há o início da respiração anaeróbica. Isso possibilita a menor perda de ácidos ou açúcares no processo de respiração, porém sem ocorrer perdas por incidência de distúrbios fisiológicos (GRAN; BEAUDRY, 1993; YEARSLEY et al., 1996). O armazenamento em ULO é responsável por um atraso generalizado no amadurecimento, em função da diminuição da produção de etileno (ORTIZ et al., 2011). Entretanto, o armazenamento em condições extremamente baixas de O_2 muitas vezes leva à supressão parcial de compostos voláteis relacionados com o aroma dos frutos, causando efeito prejudicial sobre a qualidade dos mesmos. O armazenamento por um longo período em ULO, seguido de cinco dias de vida de prateleira, mostrou baixa emissão de aromas voláteis em maçã ‘Golden Delicious’ (LÓPEZ et al., 1999). Mesmo padrão foi observado em maçãs ‘Fuji’ e ‘Mondial Gala’ (ECHEVERRIA et al., 2002; GRAELL et al., 2008). Além disso, o armazenamento em ULO também aumenta o risco de desordens por baixo O_2 , como o escurecimento interno em peras (LARRIGAUDIERE et al., 1998; PEDRESCHI et al., 2009).

A literatura é escassa com relação à adaptação dos frutos ao armazenamento em condições ultrabaixas de oxigênio. O sucesso na adaptação dos frutos a essa condição é maior se a exposição inicial dos frutos ocorrer em uma atmosfera em que os tecidos detectem como pobre em O_2 , mas em que a respiração produza energia suficiente para suprir estas mudanças adaptativas (CHERVIN et al., 1996). De acordo com estes autores, os frutos bem adaptados

podem estar mais protegidos contra o estresse por anaerobiose. Neste sentido, Lévesque et al. (2006) realizaram um trabalho em que avaliaram a diminuição gradativa da pressão parcial de O_2 (de 3,0 até 0,7 kPa), comparado ao armazenamento inicial em ULO com posterior aumento do O_2 ou o armazenamento em condições estáticas de gases, no armazenamento de maçãs 'Mc Intosh'. Além disso, também avaliaram diferentes concentrações de CO_2 e temperatura. Estes autores verificaram que a não adaptação dos frutos ao baixo O_2 foi responsável pela maior incidência de injúrias por baixo O_2 , uma vez que este dano foi maior nos frutos armazenados em ULO com aumento sequencial do O_2 , enquanto que no tratamento em que houve diminuição gradativa deste gás na câmara não foi verificado este tipo de dano nos frutos. Outro resultado interessante constatado neste trabalho está relacionado à manutenção da firmeza de polpa de maçãs 'Mc Intosh' com o decréscimo gradativo da pressão parcial de O_2 de 3,0 para 0,7 kPa, durante o armazenamento.

Hennecke et al. (2008) observaram um efeito benéfico da redução gradual de O_2 (de 1,2 kPa até 0,4-0,6 kPa) durante o armazenamento de maçãs 'Elstar', 'Holsteiner Cox' e 'Boskoop'. Este procedimento proporcionou melhoria da qualidade dos frutos comparados com aqueles que permaneceram durante todo o período armazenados em AC estática (1,4 kPa de O_2). Estes autores verificaram menor perda da firmeza da polpa, menor ocorrência de áreas escurecidas na epiderme, bem como menor produção de etileno dos frutos com redução gradual de O_2 e armazenamento em ULO.

Em um experimento realizado com raízes de plântulas de trigo, Mustroph e Albrecht (2007) observaram que a exposição das raízes durante quatro dias a condições de baixo O_2 (hipóxia), antes de submetê-las a ausência de O_2 (anóxia), resultou em considerável aumento da atividade de enzimas fermentativas e glicolíticas. A atividade da PDC e ADH aumentaram 14,5 e 10,6 vezes, respectivamente. A atividade da LDH aumentou em apenas 60%, no entanto, raízes pré-tratadas com hipóxia excretaram lactato mais rapidamente que aquelas que não receberam este tratamento. O maior efluxo de lactato resulta em maior estabilidade do pH citoplasmático, que representa uma das estratégias para prolongar a tolerância ao baixo O_2 (KENNEDY et al., 1992). Ainda a atividade da aldolase e da enolase foi de 3,4 e 2,2 vezes maior em raízes que receberam pré-tratamento com hipóxia comparada com aquelas sem tratamento, enquanto que a atividade da fosfofrutoquinase (PFK) não mudou significativamente (MUSTROPH; ALBRECHT, 2007).

Também foi observado que o ponto de compensação anaeróbico mudou para menores concentrações de O_2 durante um curto tempo de exposição de peras 'Bartlett' ao baixo O_2 (fluxo de N_2), sinalizando um rápido ajuste metabólico pelos frutos (BOERSIG et al., 1988).

Com esta constatação estes autores sugeriram futuras análises com a finalidade de evidenciar um possível aumento da tolerância dos frutos ao baixo O_2 via um período de condicionamento ao baixo oxigênio.

2.5 Efeitos adversos do armazenamento em baixo O_2 e aplicação de produtos de fermentação

A diminuição da pressão parcial de oxigênio provoca uma redução na respiração, até a concentração deste gás atingir o valor denominado de ponto de compensação anaeróbico (PCA), que é a concentração de O_2 em que a produção de CO_2 é mínima (BOERSIG et al., 1988), também chamado de limite mínimo de oxigênio (GRAN; BEAUDRY, 1993). O armazenamento em ambientes com baixo oxigênio por um período maior que o tolerável provoca danos nos frutos como o amadurecimento anormal, escurecimento de polpa, além do aumento da produção de etanol e acetaldeído (KADER, 1986). Em pequenas quantidades estes metabólitos apresentam um efeito benéfico nos frutos, enquanto que em grandes quantidades também apresentam efeitos negativos como o desenvolvimento de *off-flavours* (PESIS, 2005).

Além da produção de etanol e acetaldeído em resposta ao armazenamento em condições extremamente baixas de O_2 e/ou altas de CO_2 , estes compostos também podem ser aplicados aos frutos com benefícios na preservação da qualidade (SCOTT et al., 1995; GHAMAMANI; SCOTT, 1998b; PESIS, 2005). No entanto foi observado que a aplicação de altas doses de acetaldeído em maçãs (710 mg 100 g⁻¹ de maçã) resultou em escurecimento da epiderme e perda de firmeza da polpa de maçãs ‘Granny Smith’ e ‘Jonagored’ (VIDRIH et al., 1999). Em maçãs ‘Royal Gala’ a aplicação de 0,5 mL de etanol kg⁻¹ de fruto mês⁻¹ também resultou em dano ao tecido (alta incidência de degenerescência de polpa e polpa farinácea) e consequente aumento da produção de etileno e CO_2 (WEBER, 2010). De acordo com este autor, isso se deve possivelmente a dose muito alta e ao tempo excessivo de exposição dos frutos ao etanol.

Os motivos que levam ao aumento da desordem nos tecidos em função do aumento da fermentação podem 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 O_2 , em comparação com o

armazenamento refrigerado, apresentaram um decréscimo de cinco vezes na relação ATP/ADP (NANOS; KADER, 1993). 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 concentração e produção de ATP. Estes autores sugerem que o início deste distúrbio seja uma consequência do dano causado nas membranas ocasionado pela combinação da ação de radicais livres de oxigênio e a falta de energia para manutenção. Esta combinação causaria a descompartimentalização das estruturas intracelulares e o aparecimento de pigmentos escurecidos.

O desenvolvimento de injúrias por baixo O₂ é dependente do tempo de exposição à condição anaeróbica (FALLIK et al., 2003). Contudo, quando se retorna às condições aeróbicas, a maioria das plantas, quando não extremamente injuriadas, é capaz de reciclar os metabólitos formados, prevenindo do aparecimento de injúrias. Um estresse por baixo O₂, utilizado em nível sub-letal, é capaz de prevenir o desenvolvimento de desordens fisiológicas em frutos (PESIS et al., 1993) e atrasar o processo de amadurecimento (TONUTTI et al., 1997; BONGHI et al., 1999).

Com o avanço no estágio de maturação dos frutos, ocorre um decréscimo do coeficiente de difusão de O₂. O decréscimo neste coeficiente de difusão muda o PCA e a curva de resposta do CO₂ para maiores concentrações de O₂, uma vez que uma determinada concentração externa deste gás corresponde a uma menor concentração em nível celular (BOERSIG et al., 1988). Na prática isso significa que será necessário aumentar progressivamente a concentração de O₂ para minimizar a respiração anaeróbica durante o armazenamento em AC, a fim de diminuir o dano pelo baixo O₂, na medida em que aumenta a idade fisiológica dos frutos, tornando-se menos permeáveis para o oxigênio. Para a maçã 'Gala', contrariamente, foi observado que pressões parciais de O₂ abaixo de 0,8 kPa são mais prejudiciais no início que no final do armazenamento (CERETTA et al., 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos com armazenamento de maçãs da cultivar Royal Gala, nos anos de 2010 e 2011.

3.1 Colheita e seleção dos frutos

Os frutos, provenientes de um pomar comercial localizado no município de Vacaria-RS, foram colhidos na plena safra, em que a empresa realiza a colheita, desta forma representando exatamente as condições de maturação que são utilizadas em nível comercial.

Após a colheita foi realizada uma pré-seleção dos frutos, eliminando-se aqueles com diâmetro muito pequeno ou aqueles excessivamente grandes, de forma que as amostras foram constituídas com frutos de tamanho médio de aproximadamente 160 gramas. Em seguida, os frutos foram transportados para o Núcleo de Pesquisa em pós-colheita (NPP), em Santa Maria, onde foram instalados os experimentos.

Para a formação das unidades experimentais os frutos foram coletados de forma aleatória das caixas usadas para o transporte, sendo que nesta etapa novamente foram retirados os frutos que apresentaram danos mecânicos em função do transporte ou colheita, lesões causadas por insetos, podridões ou que estavam excessivamente maduros.

3.2 Descrição dos experimentos

3.2.1 Experimento I

O primeiro experimento foi realizado no ano de 2010, com o objetivo de avaliar o efeito da aplicação de um estresse inicial por baixo O_2 , na manutenção da qualidade das maçãs durante o armazenamento. A colheita foi realizada no dia 12 de fevereiro, momento em que os frutos apresentavam firmeza de polpa de 68,6 Newtons, índice iodo-amido 8,53 (escala de 1 a 10), acidez de 4,17 meq 100 mL^{-1} , 10,7 °Brix de sólidos solúveis totais (SST), atividade

da enzima ACC oxidase $67,8 \text{ nL C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, atividade respiratória de $9,78 \text{ mL CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e produção de etileno de $0,408 \text{ } \mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Tabela 1 - Condições utilizadas para o armazenamento de maçãs 'Royal Gala'. Santa Maria, 2010.

Pressão parcial de $\text{O}_2 + \text{CO}_2$ (kPa)	Aplicação de 1-MCP	Estresse inicial por baixo O_2
1,2 + 2,0	Sim	Sim
1,2 + 2,0	Sim	Não
1,2 + 2,0	Não	Sim
1,2 + 2,0	Não	Não
1,0 + 2,0	Sim	Sim
1,0 + 2,0	Sim	Não
1,0 + 2,0	Não	Sim
1,0 + 2,0	Não	Não
0,8 + 1,0	Sim	Sim
0,8 + 1,0	Sim	Não
0,8 + 1,0	Não	Sim
0,8 + 1,0	Não	Não
0,6 + 1,0	Sim	Sim
0,6 + 1,0	Sim	Não
0,6 + 1,0	Não	Sim
0,6 + 1,0	Não	Não
0,5 + 1,0	Sim	Sim
0,5 + 1,0	Sim	Não
0,5 + 1,0	Não	Sim
0,5 + 1,0	Não	Não

Neste experimento foram avaliados 20 tratamentos, distribuídos de acordo com a tabela 1. Primeiramente foi aplicado 1-MCP nos frutos de 10 tratamentos, durante 24 horas. Após este período, cinco destes tratamentos, juntamente com outros cinco tratamentos, em que não foi aplicado 1-MCP, foram colocados em minicâmaras para aplicação de estresse inicial nos frutos. Os frutos destes 10 tratamentos permaneceram durante uma semana em um ambiente com $0,3 \text{ kPa}$ de O_2 e $1,0 \text{ kPa}$ CO_2 . Os frutos dos outros 10 tratamentos foram acondicionados em minicâmaras com as diferentes concentrações de gases pré-determinadas para cada tratamento. Após uma semana de estresse inicial por baixo O_2 , esses frutos foram acondicionados com os demais, dentro das minicâmaras, de acordo com a concentração de gases prevista para cada tratamento.

Os frutos ficaram armazenados durante sete meses nestas condições de AC. Após este período, as minicâmaras foram abertas e os frutos foram retirados e permaneceram expostos por um período de sete dias a 20 °C, em condição normóxica, antes das análises de qualidade, a fim de simular o período de vida de prateleira.

3.2.2 Experimento II

No experimento conduzido no ano de 2011, as maçãs foram armazenadas em condições ultrabaixas de O₂ com diminuição gradativa deste gás no ambiente de armazenamento, até atingir a concentração desejada para cada tratamento. A colheita dos frutos foi realizada no dia 19 de fevereiro. Na colheita, os frutos apresentavam firmeza de polpa de 79,7 Newtons, índice iodo-amido 6,25 (escala de 1 a 10), acidez de 4,35 meq 100 mL⁻¹, 11,2 °Brix de sólidos solúveis totais (SST), atividade da enzima ACC oxidase 16,1 nL C₂H₄ g⁻¹ h⁻¹, atividade respiratória de 5,89 mL CO₂ kg⁻¹ h⁻¹ e produção de etileno de 0,309 µL C₂H₄ kg⁻¹ h⁻¹.

No primeiro dia de armazenamento dos frutos, a pressão parcial de O₂ em todos os tratamentos foi reduzida até 5,0 kPa, com exceção de dois tratamento em que a pressão parcial de O₂ foi reduzida até 1,0 kPa (com e sem 1-MCP) e assim permaneceram até o final do armazenamento (instalação rápida da atmosfera controlada) e o tratamento com atmosfera controlada dinâmica (ACD) com fluorescência de clorofilas. Durante a primeira semana de armazenamento houve uma redução gradativa da pressão parcial de O₂ para os demais tratamentos até atingir 1,5 kPa, no sétimo dia. Deste dia em diante, a redução do nível de oxigênio nas câmaras ocorreu devido ao consumo de O₂ pela respiração dos frutos, de forma gradativa, até atingir as condições pré-determinadas para cada tratamento. Além da pressão parcial final de oxigênio, também houve variação no tempo (dias) até atingir as concentrações ultrabaixas de O₂, de acordo com a tabela 2.

Durante o período de condicionamento, os frutos de cada tratamento permaneceram em minicâmaras individuais, com volume de 0,08 m³. Após este período os tratamentos com a mesma concentração de O₂ foram armazenados em uma mesma minicâmara maior, com volume de 0,233 ou 0,400 m³. Durante todo o período de armazenamento a pressão parcial de CO₂ foi mantida em 1,2 kPa, para todos os tratamentos. Os frutos permaneceram armazenados durante oito meses em AC, mais sete dias a 20 °C, antes da análise de qualidade.

Tabela 2 - Condições utilizadas para o condicionamento ao baixo O₂ e armazenamento de maçãs 'Royal Gala'. Santa Maria, 2011.

Pressão parcial de O ₂ após o condicionamento (kPa)	Período para a redução do O ₂ de 5,0 para 1,5 kPa (dias)	Período para redução do O ₂ de 1,5 kPa até a pressão parcial desejada (dias)	Observação
1,0	-	Imediato	
1,0	7	7	
0,8	7	7	
0,7	7	7	
0,7	7	14	
0,7	7	28	
0,5	7	7	
0,5	7	14	
0,5	7	28	
0,7	7	34	Estresse por baixo O ₂ *
1,0	-	Imediato	Aplicação de 1-MCP
0,4	-	14	ACD (fluorescência)**

* Após o vigésimo dia de redução gradativa de O₂, os frutos permaneceram por um período de estresse por baixo O₂ (0,4 kPa) durante 14 dias, antes de retornar para uma atmosfera com 0,7 kPa de O₂.

** No primeiro dia a pressão parcial de O₂ foi reduzida até 2,0 kPa e, no 14º dia ocorreu o primeiro pico da fluorescência (0,12 kPa de O₂), seguido por mais 4 picos nos dias seguintes (mínimo de 0,06 e máximo de 0,31 kPa de O₂). Após permaneceu em 0,4 kPa de O₂, em média, até o final do período.

3.3 Instalação de AC, monitoramento e correção dos gases

Os frutos foram armazenados em diferentes minicâmaras, de acordo com a pressão parcial de gases para cada tratamento, de forma que o controle da atmosfera era feito no interior de cada minicâmara. As minicâmaras foram acondicionadas no interior de uma câmara frigorífica de 48 m³, na temperatura de 0,5 °C. A umidade relativa no interior das minicâmaras foi mantida em 96 ±1%. O controle da temperatura foi efetuado por meio de termostatos eletrônicos e acompanhado diariamente por meio de termômetros de bulbo de mercúrio com resolução de 0,2 °C, inseridos na polpa de frutos.

Para a instalação da atmosfera controlada, a pressão parcial desejada de O₂ foi obtida pela diluição deste gás nas minicâmaras por meio da varredura com nitrogênio, que foi proveniente de um gerador de N₂ que utiliza o princípio *Pressure Swing Adsorption* (PSA). No experimento com condicionamento ao baixo O₂ (experimento II) a varredura com N₂ foi

realizada até atingir a pressão parcial de 5,0 kPa, sendo que o restante do O₂ foi consumido gradativamente pelo processo respiratório dos frutos, até atingir a concentração pré-estabelecida para cada tratamento. A pressão parcial de CO₂ em cada tratamento foi obtida pela injeção deste gás nas minicâmaras, proveniente de cilindros de alta pressão. Durante o armazenamento, devido ao processo respiratório dos frutos, houve consumo de O₂ e produção de CO₂. Dessa forma, quando a pressão parcial de oxigênio estava abaixo daquela desejada, era injetado ar atmosférico no interior da minicâmara até atingir a concentração ideal. O CO₂ em excesso foi absorvido, no primeiro ano, pela circulação do ar da minicâmara por uma solução de hidróxido de sódio (40%). No segundo ano de experimento, o ar das minicâmaras foi circulado por um absorvedor contendo hidróxido de cálcio (cal hidratada), de forma que o CO₂ reagisse com a cal, diminuindo a concentração nas minicâmaras. Buscou-se este novo sistema para aumentar a eficiência da absorção do CO₂ e diminuir a entrada de O₂ nas minicâmaras.

O monitoramento dos gases foi realizado diariamente, com o auxílio de um analisador de gases (O₂/CO₂) da marca Siemens, modelo Ultramat 23, sendo corrigido sempre que necessário. Este analisador utiliza o sistema de componentes ativos ao infravermelho para determinar o CO₂, na faixa de 0,0 a 100,0%, com bandas de absorção entre 2 e 9 micromilímetros na faixa de infravermelho. O oxigênio é determinado por meio de uma célula eletroquímica de medição, na faixa de 0,00 a 25,00%.

3.4 Instalação e monitoramento da ACD

Os frutos armazenados em ACD foram colocados no interior de uma minicâmara com capacidade de 0,233 m³, onde também foram inseridos dois quites para monitoramento da ACD, da marca HarvestWatchTM, produzidas pela empresa Satlantic, do Canadá. O quite é formado por uma caixa plástica onde é inserida uma amostra de seis maçãs e conta com um sensor de fluorescência de clorofilas, conhecido como FIRM (*Fluorescence Interactive Response Monitor*). O sensor emite uma luz de baixa potência, por meio de quatro lâmpadas LED (*Light Emitting Diode*), a fim de estimular o fotossistema da amostra. 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 em que a saída é exibida em

formato de gráfico. Quanto maior for o estresse em que os frutos se encontram (em função do baixo O_2 , por exemplo), maior será a emissão de fluorescência e maior será o pico no gráfico.

No dia do armazenamento, a pressão parcial de O_2 foi reduzida até 2,0 kPa, sendo que deste dia em diante, em função do consumo pelo processo respiratório, esta pressão parcial foi diminuindo até atingir, no 14º dia, 0,12 kPa e registrar o primeiro pico de fluorescência no gráfico. Deste dia em diante, ocorreram mais quatro picos, um por dia, sendo que após registrado o pico, a pressão parcial de O_2 era aumentada de 0,2 a 0,3 kPa, sendo consumido pelo processo respiratório até o dia seguinte. No momento do pico de fluorescência, a pressão parcial de O_2 era de 0,06 kPa. Após este estresse nos frutos, o oxigênio foi mantido em média, em 0,4 kPa até o final do armazenamento. A pressão parcial de CO_2 foi de 1,2 kPa durante todo o período.

3.5 Aplicação de 1-MCP

Para a aplicação do 1-MCP utilizou-se o produto SmartFresh[®] na formulação pó (0,43% ingrediente ativo). A concentração utilizada para ambos os experimentos foi de 625 nL L⁻¹, calculada em função do volume da minicâmara em que foi aplicado o produto e da concentração do mesmo. A aplicação foi efetuada no início do armazenamento e os frutos ficaram expostos ao produto durante 24 horas, na temperatura de 0,5 °C. Para tanto, o produto foi solubilizado em 20 mL de água destilada, dentro de um frasco de vidro, tampado com um septo de borracha e agitado até completa dissolução. Em seguida, foi transferido para uma placa de Petri, no interior de uma minicâmara em que estavam os frutos, que foi imediatamente fechada de forma hermética.

Após 24 horas, o ar da minicâmara foi circulado com ar externo a fim de retirar algum resíduo do produto e, em seguida, a minicâmara foi aberta e os frutos retirados e armazenados com os demais, de acordo com cada condição de AC pré-estabelecida.

3.6 Variáveis analisadas

Após o armazenamento, na saída dos frutos da câmara frigorífica, foi verificada a ocorrência de podridões e rachaduras nos frutos. Durante o período de sete dias em que permaneceram expostos à temperatura de 20 °C foram realizadas análises de respiração e etileno e, no sétimo dia, foram realizadas as demais análises, descritas abaixo:

a) Incidência de podridões: foram avaliadas pela contagem dos frutos que apresentaram lesões com diâmetro superior a 5 mm, características de ataque de patógenos, sendo os resultados expressos em porcentagem de frutos podres.

b) Degenerescência senescente: avaliada por meio de cortes transversais na região equatorial dos frutos, em que foi realizada uma avaliação visual do escurecimento da polpa, característica do sintoma, sendo expressa em porcentagem de frutos com sintomas do distúrbio.

c) Polpa farinácea: determinada pela quantificação visual dos frutos que apresentaram sintomas do distúrbio (polpa seca e sem suculência). Os resultados foram expressos em porcentagem de frutos com o distúrbio.

d) Rachaduras: análise visual externa dos frutos que apresentavam algum sintoma de rachadura, sendo expresso em porcentagem de frutos afetados.

e) Frutos sadios: contabilizado pelo total de frutos de cada repetição que não apresentavam nenhum dos danos citados acima, estando aptos para a comercialização e expressos em porcentagem de frutos.

f) Firmeza da polpa: após a retirada de parte da epiderme, os frutos foram perfurados em lados opostos, na região equatorial, com um penetrômetro da marca Effegi, com ponteira de 11 mm, sendo que os valores foram expressos em Newton (N).

g) Teor de sólidos solúveis totais (SST): foram retiradas fatias de cerca de 1 cm de espessura da região equatorial dos frutos, que foram trituradas em uma centrífuga de frutas Juicer e, a partir do suco, foi determinado o SST por refratometria e os valores foram expressos em °Brix;

h) Acidez titulável: determinada pela titulação, com NaOH 0,1N, de uma solução contendo 10 mL de suco dos frutos, diluídos em 100 mL de água deionizada, até atingir pH 8,1. O pH foi determinado por um medidor marca Digimed[®]. Os valores foram expressos em meq 100 mL⁻¹.

i) Produção de etileno: foi determinada com a utilização de aproximadamente 1500g de frutos, colocados em recipientes de vidro com volume de 5000 mL, fechados hermeticamente até atingir o limite mínimo de detecção do cromatógrafo. Para a análise da produção de etileno foram injetadas duas amostras de 1 mL de ar de cada recipiente

(headspace), em um cromatógrafo a gás, marca Varian® modelo Star 3400CX, equipado com um detector por ionização em chama (FID) e coluna Porapak N80/100 de dois metros de comprimento. A temperatura da coluna, injetor e detector foi de 90, 140 e 200 °C, respectivamente. A concentração de etileno foi calculada por um software, a partir da integração da área do pico de etileno gerado no cromatograma, sendo os resultados expressos em ppm (partes por milhão). Estes resultados foram comparados com um padrão de etileno conhecido, que foi injetado no cromatógrafo durante as análises. A produção de etileno foi calculada em função da concentração deste gás presente no recipiente no momento da determinação, da massa dos frutos, do volume do espaço livre no recipiente e do tempo de fechamento, sendo expresso em $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

j) Respiração: determinada em função da quantidade de CO_2 produzido. O ar do mesmo recipiente utilizado para a determinação do etileno foi circulado através de um analisador eletrônico de CO_2 , marca Agri-Datalog. A partir da concentração de CO_2 , do espaço livre do recipiente, do peso do fruto e do tempo de fechamento, foi calculada a respiração em $\text{mL CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

k) Atividade da ACC oxidase: de acordo com a metodologia proposta por Bufler (1986), foram retiradas algumas amostras de epiderme da região equatorial dos frutos de cada unidade experimental, totalizando 3g. Estas foram imediatamente incubadas numa solução contendo 0,1 mM de ACC 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 foram adicionados 2% de CO_2 . Decorridos mais 30 minutos, a concentração de etileno presente nas seringas foi determinada, como descrito acima (tópico i), no entanto, levando em consideração para o cálculo, o volume de 50 mL da seringa, o peso exato da epiderme dos frutos e o tempo em que ficaram em contato com o CO_2 . Os dados foram expressos em $\text{nL C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

l) Sabor estranho nos frutos: determinada por um painel sensorial composto por sete pessoas não treinadas, que provaram um pedaço de, pelo menos, cinco frutos distintos de cada tratamento. Os painelistas então relataram a presença ou não de sabor alcoólico nos pedaços provados.

3.7 Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos segundo o delineamento inteiramente casualizado, no esquema bifatorial para o ano de 2010 e unifatorial no ano de 2011. Cada tratamento foi constituído de quatro repetições contendo 25 frutos.

Antes da análise de variância (ANOVA), os dados foram testados quanto à normalidade e homocedasticidade da variância, pelos testes de Lilliefors e Bartlett, respectivamente. Aqueles que não apresentaram distribuição normal, foram transformados pela fórmula $\text{arc.sen}((x + 0,5)/100)^{0,5}$ e os dados cujos erros se apresentavam heterocedásticos foram transformados pela fórmula $\log_{10}(x + 1,0)$ antes de serem submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste Tukey (ano de 2010) e Scott-Knott (2011) em nível de 5% de probabilidade de erro.

Para a realização das análises estatísticas foram utilizados os pacotes estatísticos SOC (Software Científico: NTIA/EMBRAPA) e SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento I

4.1.1 Estresse inicial por baixo oxigênio no armazenamento de maçãs ‘Royal Gala’

Como mencionado no tópico material e métodos, no ano de 2010 os frutos apresentaram índice iodo amido de 8,53 (escala de 1-10), significando que estavam em avançado estágio de maturação na colheita. No entanto, cabe ressaltar que os frutos foram colhidos para este experimento na plena colheita, em que as empresas utilizavam os frutos nas mesmas condições para o armazenamento, representando, portanto, a condição real daquele ano. O ano de 2010 foi caracterizado por ser bastante chuvoso durante o ciclo de frutificação da macieira, em consequência a incidência de radiação solar também foi menor, comprometendo os parâmetros de qualidade dos frutos no momento da colheita, a exemplo do teor de SST e firmeza de polpa que apresentaram valores mais baixos na colheita, comparado com os valores geralmente observados para esta cultivar. O efeito da menor radiação solar

sobre a qualidade de maçã foi reportado por Amarante et al. (2011). Estes autores realizaram um experimento com tela antigranizo e verificaram que plantas cobertas acumulavam 18,4% menos radiação fotossinteticamente ativa sobre o dossel durante o dia, comparadas com aquelas descobertas. Este fato resultou em menor firmeza de polpa, SST e aumento de índice iodo-amido nos frutos da cultivar Gala no momento da colheita.

Após sete meses de armazenamento não foi verificada diferença entre as condições de AC, bem como para a aplicação de 1-MCP ou estresse inicial, na ocorrência de podridões nos frutos. No entanto, após um período de sete dias de exposição dos frutos à temperatura de 20 °C, a condição de 1,0 kPa O₂ + 2,0 kPa CO₂ foi a que proporcionou a menor ocorrência de podridões, no entanto apenas diferiu estatisticamente da condição de 0,5 kPa O₂ + 1,0 kPa CO₂, que apresentou 25% de frutos com podridões, em média (Tabela 3). Com relação à aplicação de estresse inicial por baixo O₂ (ILOS), os frutos que estavam nesta condição e não receberam 1-MCP apresentaram a maior ocorrência de podridão, não diferindo estatisticamente para aqueles que receberam ILOS e aplicação de 1-MCP. As menores porcentagens de frutos com podridões foram observadas naqueles que não receberam ILOS. Em tomates o desenvolvimento de podridões foi reduzido com a exposição dos frutos a uma condição de anóxia durante 24 horas, mas aumentou quando esta condição foi mantida durante 48 horas (FALLIK et al., 2003). De acordo com Veltman et al. (2003a), em uma condição de hipóxia (considerada como uma pressão parcial de 0,5 kPa de O₂ pelos autores) ainda ocorre a formação de radicais livres pelo oxigênio, que causam danos às membranas (o que não acontece em condições de anóxia). Nesta condição, de acordo com estes autores, o montante de energia disponível é muito baixo para manter a integridade das membranas e gerar compostos antioxidantes para conter estes radicais livres. Possivelmente então, a condição de estresse inicial e subsequente armazenamento em condições baixas de O₂, utilizadas no presente trabalho, tenha sido uma condição extrema para o armazenamento dos frutos, o que diminuiu o suprimento de energia, propiciando a degradação das membranas celulares e contribuindo para a infecção de fungos e desenvolvimento de podridões. De acordo com Saquet et al. (2003), uma das respostas das células das plantas ao armazenamento em O₂ muito baixo é a indução da rota fermentativa e a consequente redução dos níveis de ATP. Pode ainda ter contribuído para a menor disponibilidade de energia, o baixo teor de SST no momento da colheita (10,7 °Brix), que limita o fornecimento de açúcares para a glicólise e a produção de ATP em nível de substrato (KE et al., 1993), que é a principal fonte de energia nestas condições (KADER, 1986), especialmente durante o período de ILOS.

Tabela 3 - Ocorrência de podridões em maçã ‘Royal Gala’ após sete meses de armazenamento em atmosfera controlada, com ou sem aplicação de 1-MCP e com ou sem estresse inicial por baixo O₂, mais sete dias de exposição a 20 °C.

(O ₂ + CO ₂)	Sem 1-MCP		Com 1-MCP		Média
	Sem estresse	Com estresse	Sem estresse	Com estresse	
———— Saída da câmara (%) ————					
1,2+2,0	4,04	12,21	5,08	13,00	8,58 a
1,0+2,0	4,00	7,04	7,00	9,00	6,76 a
0,8+1,0	8,00	9,96	3,96	10,00	7,98 a
0,6+1,0	6,00	8,00	7,29	9,17	7,61 a
0,5+1,0	10,09	12,13	12,80	16,00	12,76 a
Média	6,43 A	9,87 A	7,23 A	11,43 A	
———— Sete dias a 20 °C (%) ————					
1,2+2,0	16,13	27,33	13,25	20,00	19,2 ab
1,0+2,0	7,96	24,17	13,00	23,00	17,0 b
0,8+1,0	19,00	22,09	15,85	16,04	18,2 ab
0,6+1,0	18,00	25,00	16,67	20,25	20,0 ab
0,5+1,0	25,43	26,17	25,14	25,00	25,4 a
Média	17,3 B	24,9 A	16,8 B	20,9 AB	

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Na avaliação da ocorrência de degenerescência senescente, não foi observada diferença estatística entre os frutos armazenados nas diferentes condições de AC, sob estresse inicial ou aplicação de 1-MCP, na avaliação aos sete dias a temperatura a 20 °C (Tabela 4). A presença de etileno na câmara de armazenamento acelera a senescência e proporciona maior ocorrência de degenerescência nos frutos. Dessa forma, a aplicação de 1-MCP pode reduzir a incidência de degenerescência senescente (WATKINS et al., 2000; DELONG et al., 2004). No presente trabalho, não se obteve resultado similar com a aplicação de 1-MCP, no entanto pode-se observar que os demais tratamentos também foram bastante eficientes no controle do etileno, resultando em valores extremamente baixos e não havendo diferença entre eles após seis dias de exposição a 20 °C (Tabela 8). Com relação à aplicação de estresse inicial por baixo O₂, Wang e Dilley (2000) observaram em maçã ‘Granny Smith’ alta incidência de escurecimento interno em AC com 3,0 kPa de O₂, que diminuiu pela metade com a aplicação de ILOS e posterior armazenamento em 3,0 kPa de O₂ e foi controlada completamente com

ILOS e 1,5 kPa de O₂. Possivelmente, não se observou esta diferença no presente trabalho, em função de que as pressões parciais de O₂ utilizadas serem mais próximas entre si e menores (abaixo de 1,2 kPa) que aquelas utilizadas pelos autores citados acima.

As diferentes condições de AC testadas neste experimento não influenciaram a ocorrência de polpa farinácea dos frutos. Por outro lado, a aplicação de estresse inicial por baixo O₂, possivelmente foi uma condição extrema, pois se observa um valor significativamente maior de polpa farinácea nos frutos dos tratamentos com estresse, principalmente para os frutos que não receberam tratamento com 1-MCP. Para os frutos com 1-MCP e aplicação de ILOS, também se observa um alto valor deste distúrbio, porém sem diferir significativamente das duas condições sem estresse (com e sem 1-MCP) (Tabela 4).

Tabela 4 - Distúrbios fisiológicos em maçã ‘Royal Gala’ após sete meses de armazenamento em atmosfera controlada, com ou sem aplicação de 1-MCP e com ou sem estresse inicial por baixo O₂, mais sete dias de exposição a 20°C.

(O ₂ + CO ₂)	Sem 1-MCP		Com 1-MCP		Média
	Sem estresse	Com estresse	Sem estresse	Com estresse	
———— Degenerescência senescente (%) ————					
1,2+2,0	16,7	25,3	19,6	22,9	21,1 a
1,0+2,0	20,8	22,6	18,3	27,0	22,2 a
0,8+1,0	13,3	22,3	17,8	14,8	17,1 a
0,6+1,0	16,3	20,3	17,9	18,8	18,3 a
0,5+1,0	17,6	21,4	11,0	24,8	18,7 a
Média	16,9 A	22,4 A	16,9 A	21,6 A	
———— Polpa farinácea (%) ————					
1,2+2,0	16,7	29,6	23,7	24,0	23,5 a
1,0+2,0	23,7	28,8	20,4	31,0	26,0 a
0,8+1,0	18,4	27,1	17,8	17,1	20,1 a
0,6+1,0	14,2	23,4	18,9	17,8	18,6 a
0,5+1,0	18,6	26,6	14,3	23,6	20,8 a
Média	18,3 B	27,1 A	19,0 B	22,7 AB	

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

A ocorrência de polpa farinácea está relacionada com a força relativa que mantém a estrutura da parede celular em comparação com a força de ligação da lamela média. Quando a

força de ligação que mantém unida uma célula à outra é menor que a força que mantém a integridade da parede celular de células individuais, ocorre a separação das células e estas células intactas dão a sensação de textura farinhenta. Isto ocorre porque as moléculas de protopectina (pectina insolúvel) são transformadas em pectinas solúveis na lamela média, diminuindo a força de coesão entre as células (DE SMEDT et al., 1998; PRASANNA et al., 2007). Este distúrbio geralmente está associado com o avanço do amadurecimento dos frutos, sendo que a forma de armazenamento exerce grande influência. O armazenamento de maçãs em atmosfera refrigerada (AR) provoca o desenvolvimento mais rápido e em maior porcentagem de frutos com este distúrbio, comparado com AC ou armazenamento em condições de ultrabaixo O₂ (BRACKMANN et al., 2005a). No entanto, no presente trabalho foi constatado que nas condições de estresse inicial a ocorrência de polpa farinácea foi maior, provavelmente sendo uma condição excessiva de baixo oxigênio, que pode ter induzido a fermentação dos frutos, com grande produção de etanol e acetaldeído que, de alguma forma, induziram a maior ocorrência deste distúrbio nestes frutos. De acordo com WEBER (2010), a aplicação de 0,5mL de etanol kg⁻¹ de fruto mês⁻¹ nas câmaras de armazenamento de maçãs, aumentou a ocorrência de polpa farinácea, comparado com AC, aplicação de 1-MCP ou absorção de etileno.

A maior porcentagem de frutos sadios foi verificada nas duas condições sem estresse inicial por baixo O₂, no entanto, não diferiram significativamente da condição com estresse e aplicação de 1-MCP (Tabela 5). Fica evidente, a partir destes resultados, que tanto a aplicação de 1-MCP, como o estresse inicial por baixo O₂ não foram eficientes em diminuir a ocorrência de distúrbios fisiológicos e podridões nos frutos e, em consequência disso, a porcentagem de frutos sadios foi menor nos tratamentos com estresse inicial por baixo O₂.

De acordo com Saquet et al. (2000), o baixo nível de energia e o dano nas estruturas celulares associado ao aumento dos produtos da fermentação e permeabilidade de membrana estão relacionadas com o desenvolvimento de desordens fisiológicas em peras armazenadas em baixo O₂ e alto CO₂. A presença de etanol e acetaldeído em altas concentrações aumentam a permeabilidade das membranas celulares, causando danos à bicamada lipídica, estando diretamente relacionada com a ocorrência de desordens (PODD; VAN STADEN, 1998). Associado ao estresse inicial por baixo O₂, outro fator que pode ter contribuído para a maior ocorrência de danos nos frutos em ILOS e a menor porcentagem de frutos sadios, verificado no presente trabalho, é o fato de estarem em estágio de maturação avançado na colheita. Estes resultados concordam com Lau (1997) que observou que ILOS não traz benefícios ao

armazenamento de maçã ‘Starkrimson Delicious’ e observou um aumento de desordens com frutos colhidos com valores mais elevados de índice iodo-amido (maturação avançada).

Tabela 5 - Porcentagem de frutos sadios de maçã ‘Royal Gala’ após sete meses de armazenamento em atmosfera controlada, com ou sem aplicação de 1-MCP e com ou sem estresse inicial por baixo O₂, mais sete dias de exposição a 20 °C.

(O ₂ + CO ₂)	Sem 1-MCP		Com 1-MCP		Média
	Sem estresse	Com estresse	Sem estresse	Com estresse	
	———— Frutos sadios (%) ————				
1,2+2,0	69,8	61,2	67,1	68,7	66,7 a
1,0+2,0	71,3	64,0	71,5	59,0	66,4 a
0,8+1,0	71,4	60,9	74,2	76,5	70,7 a
0,6+1,0	71,5	64,5	71,7	70,8	69,6 a
0,5+1,0	61,6	57,0	68,2	63,7	62,6 a
Média	69,1 A	61,5 B	70,5 A	67,7 AB	67,2

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

A firmeza de polpa é um dos atributos que mais é considerado pelos consumidores de maçãs. De acordo com Goulao et al. (2007), maçãs preferencialmente precisam ter firmeza de polpa de 65 N para serem aceitas pelo mercado. Apesar da baixa firmeza de polpa na colheita (68,8 N), todas as condições de armazenamento do presente trabalho foram eficientes em manter a firmeza acima deste limite (Tabela 6). Considerando as diferentes condições de AC, o armazenamento em 0,6 kPa O₂ + 1,0 kPa CO₂ proporcionou a menor perda de firmeza nos frutos, no entanto, diferindo significativamente apenas da condição com 1,0 kPa O₂ + 2,0 kPa CO₂. Por outro lado, a aplicação de 1-MCP e o estresse inicial por baixo O₂ não influenciaram na perda da firmeza de polpa.

A literatura traz dados conflitantes com relação ao efeito do estresse inicial por baixo O₂ sobre a firmeza de polpa. Para a cultivar Granny Smith, a aplicação de ILOS seguido do armazenamento em AC com 1,5 kPa de O₂ resultou em excelente retenção da firmeza, enquanto que no armazenamento em 3,0 kPa de O₂ após ILOS não foi observado o mesmo comportamento (WANG; DILLEY, 2000). Para a maçã ‘Red Delicious’ também foi observado que a aplicação de ILOS antes do armazenamento em pressões parciais ultrabaixas de O₂ (0,9 a 1,0 kPa de O₂), manteve a firmeza de polpa mais elevada comparado ao

armazenamento sem ILOS (MATTE et al., 2005). Zanella (2003) observou que o armazenamento com ILOS não influenciou negativamente a firmeza de polpa de maçãs ‘Granny Smith’. Contrariamente, Lau (1997) verificou que ILOS seguido do armazenamento em 0,7 ou 1,5 kPa de O₂ não foi eficiente na manutenção da firmeza de maçãs ‘Starkrimson Delicious’, sendo que quanto mais avançado a maturação na colheita, ocorreu uma maior perda de firmeza pelos frutos que receberam ILOS, comparado com aqueles que foram armazenados em AC apenas. Desta forma, o estágio de maturação mais avançado dos frutos utilizados no presente trabalho, pode ser uma das causas de não se verificar um efeito do estresse inicial sobre a manutenção da firmeza.

Tabela 6 - Firmeza de polpa de maçãs ‘Royal Gala’ após sete meses de armazenamento em atmosfera controlada, com ou sem aplicação de 1-MCP e com ou sem estresse inicial por baixo O₂, mais sete dias de exposição a 20 °C.

(O ₂ + CO ₂)	Sem 1-MCP		Com 1-MCP		Média
	Sem estresse	Com estresse	Sem estresse	Com estresse	
	———— Firmeza de polpa (N) ————				
1,2+2,0	69,6	65,4	70,6	66,5	68,0 ab
1,0+2,0	67,6	64,8	68,7	65,0	66,5 b
0,8+1,0	68,6	68,2	68,0	70,0	68,7 ab
0,6+1,0	69,9	68,8	69,8	69,2	69,4 a
0,5+1,0	69,8	68,0	69,6	67,4	68,7 ab
Média	69,1 A	67,0 A	69,3 A	67,6 A	68,3

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Na avaliação da acidez, apesar da análise de variância evidenciar interação entre os fatores 1-MCP e estresse inicial com condição de AC, no teste de separação de médias não se observa grandes diferenças entre os tratamentos (Tabela 7). Para as diferentes condições de estresse inicial e 1-MCP, não se observa diferença entre as condições de AC, enquanto que, dentro de cada condição de AC, apenas aquela com 1,2 kPa de O₂ + 2,0 kPa de CO₂ evidencia alguma diferença entre os diferentes tratamentos. Nesta condição, a aplicação de 1-MCP e sem estresse inicial proporcionou maior manutenção da acidez, no entanto diferindo significativamente apenas da condição sem 1-MCP e com estresse. Este fato evidencia um

pequeno efeito benéfico do 1-MCP sobre a manutenção da acidez, especialmente em condições de armazenamento com O_2 mais alto, perdendo este efeito à medida que a concentração de O_2 vai diminuindo. Ao contrário de Mattè et al. (2005), que observaram maior conteúdo de ácido málico em frutos armazenados em ILOS seguido de ultrabaixo O_2 , no presente trabalho não foi evidenciado benefícios da aplicação de estresse inicial por baixo O_2 sobre a manutenção da acidez. Resultado semelhante foi constatado por Zanella (2003), que observou maior acidez em frutos tratados com 1-MCP, sendo que o armazenamento com ILOS não afetou este parâmetro. A aplicação de 1-MCP atrasa a degradação dos ácidos orgânicos resultando em maiores níveis de acidez titulável, especialmente após um período de vida de prateleira dos frutos (ZANELLA et al., 2005).

Na análise dos teores de SST, apesar da análise estatística evidenciar diferença entre os tratamentos, esta é muito pequena, provavelmente não sendo detectada quando consumidos os frutos (Tabela 7). Isto se deve à baixa variabilidade entre as repetições, proporcionando um baixo coeficiente de variação ($CV = 0,62\%$) e evidenciando diferença estatística mesmo com valores bem próximos. De uma maneira geral, o que se pode perceber é que a aplicação de ILOS não teve um efeito sobre o conteúdo de SST, enquanto que em condições de AC com maior pressão parcial de O_2 , os frutos que não foram tratados com 1-MCP apresentam maiores níveis, especialmente aqueles com estresse inicial. Por outro lado, nas menores concentrações de O_2 , o teor de SST foi maior nos frutos que receberam 1-MCP. De acordo com Blankenship e Dole (2003), são observados na literatura, resultados contraditórios quanto ao teor de SST em maçãs tratadas com o 1-MCP e isso se deve ao uso de diferentes cultivares e outras condições experimentais. Watkins et al. (2000) constataram que maçãs ‘McIntosh’ e ‘Law Rome’ tratadas com 1-MCP apresentaram menores teores de SST, enquanto que ‘Delicious’ e ‘Empire’ apresentaram maior SST que frutos não tratados. Estes autores também observaram diferenças entre frutos tratados com 1-MCP e armazenados em AC ou AR, portanto, a concentração de O_2 presente na câmara de armazenamento influencia na ação do 1-MCP.

De acordo com Imahori et al. (2005), existe uma relação entre o conteúdo de SST e o etanol no surgimento de *off-flavour*. Altas concentrações de etanol no ambiente de armazenamento, em função de fermentação que ocorre em baixas concentrações de O_2 , quando associadas a altos níveis de SST causam *off-flavour*. Provavelmente a interação do SST com o etanol proporcionam um *flavour* ou odor mascarado, no entanto estes autores não sabem se isto ocorre em função de um componente específico do SST, ou não. Desta forma, o conteúdo de SST é importante para determinar o nível de etanol que afeta o *flavour* ou odor.

No presente trabalho não foi observado gosto ou aroma estranho nos frutos, mesmo nos tratamentos com menores concentrações de O₂ ou estresse inicial por baixo oxigênio. Pode ter contribuído para isso os baixos valores de SST dos frutos, tanto na colheita como após o armazenamento.

Tabela 7 - Acidez e SST de maçã ‘Royal Gala’ após sete meses de armazenamento em atmosfera controlada, com ou sem aplicação de 1-MCP e com ou sem estresse inicial por baixo O₂, mais sete dias de exposição a 20 °C.

(O ₂ + CO ₂)	Sem 1-MCP		Com 1-MCP		Média
	Sem estresse	Com estresse	Sem estresse	Com estresse	
————— Acidez (mEq 100mL ⁻¹) —————					
1,2+2,0	3,78 ABa	3,48 Ba	3,90 Aa	3,62 ABa	3,69
1,0+2,0	3,58 Aa	3,72 Aa	3,60 Aa	3,70 Aa	3,65
0,8+1,0	3,68 Aa	3,62 Aa	3,68 Aa	3,92 Aa	3,73
0,6+1,0	3,82 Aa	3,70 Aa	3,62 Aa	3,75 Aa	3,73
0,5+1,0	3,62 Aa	3,58 Aa	3,75 Aa	3,70 Aa	3,66
Média	3,70	3,62	3,71	3,74	
————— SST (°Brix) —————					
1,2+2,0	11,45 Bb	11,70 Aa	11,35 Bc	11,50 Bbc	11,50
1,0+2,0	11,65 Aa	11,58 Aab	11,63 Ab	11,28 Bd	11,53
0,8+1,0	11,48 Bab	11,75 Aa	11,40 Bc	11,45 Bcd	11,52
0,6+1,0	11,65 Aa	11,38 Bc	11,53 ABbc	11,65 Ab	11,55
0,5+1,0	11,33 Bb	11,40 Bbc	11,85 Aa	11,85 Aa	11,61
Média	11,51	11,56	11,55	11,55	

†Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Na avaliação da atividade da enzima ACC oxidase não houve interação entre os fatores, no entanto, na média dos tratamentos, o armazenamento em menores concentrações de O₂ e CO₂ proporciona significativa diminuição da atividade desta enzima (Tabela 8). Na rota de produção de etileno, a conversão de ACC (Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) em etileno requer, além da enzima ACC oxidase, a presença de O₂ (YANG; HOFFMAN, 1984). Portanto, as baixas concentrações de O₂ utilizadas no presente trabalho limitaram a disponibilidade de oxigênio, diminuindo a atividade desta enzima. Além disso, o baixo O₂

pode interferir na expressão gênica da enzima ACC oxidase. Lara et al. (2011) verificaram baixos níveis de *PpACOI* em pêssego que estiveram sob anóxia durante 72 horas.

A aplicação de estresse inicial não influenciou a atividade da enzima ACC oxidase, enquanto que a aplicação de 1-MCP nos frutos diminuiu a atividade da mesma. Este resultado está de acordo com alguns autores que constataram a diminuição da atividade desta enzima com a aplicação de 1-MCP (BRACKMANN et al., 2009; WATKINS, 2006).

Tabela 8 - Atividade da enzima ACC oxidase em maçãs ‘Royal Gala’ após sete meses de armazenamento em atmosfera controlada, com ou sem aplicação de 1-MCP e com ou sem estresse inicial por baixo O₂, mais sete dias de exposição a 20 °C.

(O ₂ + CO ₂)	Sem 1-MCP		Com 1-MCP		Média
	Sem estresse	Com estresse	Sem estresse	Com estresse	
——— Atividade da ACC oxidase (nL C ₂ H ₄ g ⁻¹ h ⁻¹) ———					
1,2+2,0	32,3	53,0	20,9	26,5	33,2 ab
1,0+2,0	40,2	39,6	25,9	41,3	35,6 a
0,8+1,0	29,3	35,9	17,5	23,1	26,4 bc
0,6+1,0	28,9	25,5	12,7	19,4	22,2 c
0,5+1,0	34,0	21,8	19,3	23,7	24,0 c
Média	32,9 A	35,7 A	19,6 B	24,3 B	

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Na avaliação da produção de etileno, no momento da abertura das câmaras, houve interação entre os fatores AC e aplicação de 1-MCP e estresse inicial (Tabela 9). Novamente não se observa efeito da aplicação de estresse inicial por baixo O₂. A aplicação de 1-MCP reduziu a produção de etileno, mas este fato é observado principalmente em AC com 1,2 e 1,0 kPa O₂, associada a 2,0 kPa CO₂. Nas menores concentrações de O₂ não houve diferença entre a produção de etileno para frutos tratados ou não com 1-MCP. Quanto às diferentes condições de AC utilizadas, nos frutos que receberam 1-MCP não houve diferença entre os tratamentos, sendo que em todas as condições ocorreu baixa produção de etileno. Contrariamente, para os frutos sem 1-MCP, as menores concentrações de O₂, proporcionaram menor produção de etileno. Possivelmente, esta condição tenha proporcionado um início de processo fermentativo, com pequena produção de etanol e acetaldeído, inibindo a atividade das

enzimas ACC sintase e ACC oxidase (PESIS et al., 1998; PODD; VAN STADEN, 1999; ASODA et al., 2009), diminuindo a produção de etileno, em comparação com as condições de AC com concentrações maiores de O₂. Além disso, a enzima ACC oxidase necessita de O₂ para conversão de ACC a etileno (YANG; HOFFMAN, 1984). Este resultado evidencia que as baixas pressões parciais de O₂ durante o armazenamento são eficientes em inibir a produção de etileno de forma semelhante à aplicação de 1-MCP. Já na análise aos sete dias de exposição a 20 °C, não foi verificada diferença entre os tratamentos para a produção de etileno (Tabela 9).

Tabela 9 - Produção de etileno em maçãs ‘Royal Gala’ após sete meses de armazenamento em atmosfera controlada, com ou sem aplicação de 1-MCP e com ou sem estresse inicial por baixo O₂, e após sete dias de exposição a 20 °C.

(O ₂ + CO ₂)	Sem 1-MCP		Com 1-MCP		Média
	Sem estresse	Com estresse	Sem estresse	Com estresse	
———— Saída da câmara (µL C ₂ H ₄ kg ⁻¹ h ⁻¹) ————					
1,2+2,0	0,140 ABbc	0,184 Aa	0,076 BCa	0,063 Ca	0,166
1,0+2,0	0,261 Aa	0,166 Bab	0,048 Ca	0,100 BCa	0,144
0,8+1,0	0,177 Ab	0,107 Bbc	0,053 Ba	0,068 Ba	0,101
0,6+1,0	0,061 Ad	0,054 Ac	0,037 Aa	0,041 Aa	0,048
0,5+1,0	0,077 Acd	0,068 Ac	0,050 Aa	0,063 Aa	0,064
Média	0,143	0,166	0,053	0,067	
———— Sete dias a 20 °C (µL C ₂ H ₄ kg ⁻¹ h ⁻¹) ————					
1,2+2,0	0,093	0,061	0,065	0,093	0,078 a
1,0+2,0	0,071	0,061	0,082	0,064	0,070 a
0,8+1,0	0,082	0,050	0,055	0,055	0,060 a
0,6+1,0	0,062	0,050	0,046	0,048	0,052 a
0,5+1,0	0,059	0,050	0,074	0,055	0,061 a
Média	0,073 A	0,054 A	0,066 A	0,063 A	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

A respiração dos frutos foi menor para aqueles que receberam 1-MCP, sem estresse inicial e permaneceram armazenados na condição de 1,2 kPa O₂ + 2,0 kPa CO₂, na análise realizada no dia da abertura das câmaras. Entretanto, não houve diferença significativa para

aqueles com 1-MCP mais estresse e sem 1-MCP e sem estresse, considerando esta mesma condição de AC (Tabela 10).

Tabela 10 - Respiração em maçãs ‘Royal Gala’ após sete meses de armazenamento em atmosfera controlada, com ou sem aplicação de 1-MCP e com ou sem estresse inicial por baixo O₂, e após sete dias de exposição a 20 °C.

(O ₂ + CO ₂)	Sem 1-MCP		Com 1-MCP		Média
	Sem estresse	Com estresse	Sem estresse	Com estresse	
———— Saída da câmara (mL CO ₂ kg ⁻¹ h ⁻¹) ————					
1,2+2,0	3,29 ABab	3,45 Aa	1,93 Bb	2,85 ABab	2,88
1,0+2,0	3,64 Aa	3,25 Aa	2,99 Aa	3,84 Aa	3,43
0,8+1,0	3,56 Aa	2,98 Aa	3,19 Aa	3,11 Aa	3,21
0,6+1,0	3,08 Aa	3,00 Aa	2,71 Aa	3,37 Aa	3,04
0,5+1,0	3,34 Aa	2,65 Aa	3,34 Aa	3,44 Aa	3,19
Média	3,38	3,07	2,83	3,32	
———— Sete dias a 20 °C (mL CO ₂ kg ⁻¹ h ⁻¹) ————					
1,2+2,0	3,67 Aa	4,39 Aa	3,57 Aab	3,41 Ab	3,76
1,0+2,0	4,11 Aba	3,56 Bb	3,82 Ba	4,49 Aa	4,00
0,8+1,0	3,59 Aa	3,53 Ab	3,29 Aab	3,25 Ab	3,41
0,6+1,0	3,47 Aba	3,71 Ab	3,06 Bb	2,97 Bb	3,30
0,5+1,0	3,59 Aa	3,25 Ab	3,57 Aab	3,32 Ab	3,43
Média	3,69	3,69	3,46	3,49	

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

O fato dos frutos sem 1-MCP e com estresse, bem como as demais condições de AC com concentrações de O₂ menores terem produzido mais CO₂ na abertura das câmaras, pode estar relacionado à menor concentração de O₂ no interior destes frutos ou a maior atividade de algumas enzimas do processo fermentativo, o que ainda permitiu a continuidade da respiração anaeróbica até o momento desta análise, com aumento da produção de CO₂. Este padrão é alterado com a exposição dos frutos durante seis dias a 20 °C e concentração de O₂ ambiente (normóxica). Nesta avaliação ocorre interação entre os fatores, no entanto, não há uma definição clara sobre uma condição que tenha proporcionado menor respiração aos frutos. De uma forma geral, menores pressões parciais de O₂ diminuem a respiração e, avaliando dentro de cada condição de AC, apenas em 0,6 kPa O₂ + 1,0 kPa CO₂ é possível observar uma menor

respiração dos frutos com aplicação de 1-MCP. De acordo com Zabalza et al. (2009), existe mais que um mecanismo regulatório para descrever a atividade respiratória em função da concentração de O_2 , bem como, as diferentes oxidases terminais da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria possuem diferentes mecanismos regulatórios para ajustar a sua atividade à concentração de oxigênio interna. Este fato pode explicar, em parte, os diferentes padrões de respiração encontrados na análise do presente trabalho.

A partir da análise dos dados pode-se perceber que a aplicação de estresse inicial não trouxe os benefícios esperados e relatados em alguns trabalhos na literatura. Pode ter contribuído para isso, o avançado estágio de maturação dos frutos no momento da colheita ou a condição de AC subsequente, com pressões parciais baixas e muito próximas de O_2 , que não permitiram evidenciar as diferenças, entre outros fatores. O tempo de duração de ILOS, bem como a temperatura e a concentração de O_2 durante o posterior armazenamento em AC, são importantes fatores que determinam a eficácia do tratamento (WANG; DILLEY, 2000). A colheita em estágio de maturação mais avançado também afeta a qualidade dos frutos que recebem estresse inicial por baixo O_2 (LAU, 1997).

4.1.2 Conclusões

O estresse inicial por baixo oxigênio não é mais eficiente que as condições de AC convencional em manter a qualidade de maçãs 'Royal Gala', inclusive aumentando a ocorrência de distúrbios fisiológicos e podridões nos frutos após o armazenamento.

As condições de AC testadas no presente trabalho não apresentaram grandes diferenças na manutenção da qualidade dos frutos, com exceção da condição de 0,5 kPa de O_2 + 1,0 kPa de CO_2 em que a ocorrência de podridões foi maior, não sendo viável a sua utilização.

Apesar de manter menor a atividade da enzima ACC oxidase, a aplicação de 1-MCP não melhorou a preservação da qualidade dos frutos armazenados nas condições de AC testadas no presente trabalho, sugerindo que no armazenamento em ultrabaixo O_2 a aplicação deste composto não traz vantagens.

4.2 Experimento II

4.2.1 Condicionamento ao baixo oxigênio no armazenamento de maçãs ‘Royal Gala’

Neste experimento foram utilizadas diferentes pressões parciais de O₂ e períodos (dias) de diminuição gradativa deste gás, até atingir a concentração desejada (condicionamento), além da avaliação da instalação de AC imediata, bem como a comparação destas condições com o armazenamento em atmosfera controlada dinâmica (ACD). Na tabela 11 são apresentados os resultados dos distúrbios fisiológicos que ocorreram nos frutos, após um período de oito meses de armazenamento mais sete dias de exposição a 20 °C. São apresentadas a porcentagem total de frutos com cada distúrbio, além da porcentagem de frutos em que o distúrbio era facilmente identificado quando o fruto foi cortado (alta severidade de degenerescência ou polpa farinácea).

Na avaliação da degenerescência de polpa, os tratamentos que menos apresentavam frutos com este distúrbio bem visível (alta severidade de degenerescência) foram aqueles com instalação imediata de AC com 1,0 kPa de O₂ independente da aplicação ou não de 1-MCP, 0,8 kPa de O₂ com sete dias de condicionamento e o armazenamento em 0,7 kPa de O₂ após redução gradativa deste gás seguido por um estresse por baixo oxigênio durante 14 dias (0,4 kPa de O₂) (Tabela 11). Para o controle total de frutos com este distúrbio, os melhores tratamentos são aqueles descritos acima, com exceção do armazenamento em 0,8 kPa de O₂ com condicionamento de sete dias. Isto significa que o armazenamento nesta condição acarreta alta porcentagem de frutos com o distúrbio, no entanto este não está tão avançado como nos frutos dos demais tratamentos. A utilização de ACD, pelo método de fluorescência de clorofilas, não foi eficiente para reduzir a ocorrência de degenerescência nos frutos.

Cabe ressaltar que a instalação imediata de AC utilizada no presente trabalho (1,0 kPa de O₂ no dia da instalação) é obtida apenas em condições experimentais, sendo impraticável em condições comerciais. No entanto foi utilizada para verificar a importância da instalação o mais rápido possível de AC em condições de O₂ mais altas (1,0 kPa), pela necessidade da redução imediata do metabolismo do fruto nestas condições. Verifica-se nesta condição menor ocorrência de degenerescência de polpa, independente da aplicação de 1-MCP, no entanto, não diferindo estatisticamente do armazenamento em 0,7 kPa de O₂ após um período de condicionamento ao baixo O₂ por 20 dias, mais 14 dias de estresse (0,4 kPa). Esta última é uma condição praticável em nível comercial, sendo uma boa alternativa para o

armazenamento de maçãs. Possivelmente nesta condição tenha ocorrido uma adaptação dos frutos a uma condição ultrabaixa de O₂, que juntamente com um período de estresse por baixo oxigênio, tenha resultado em menor ocorrência de degenerescência.

Tabela 11 - Distúrbios fisiológicos de maçãs ‘Royal Gala’ após oito meses de armazenamento em atmosfera controlada e diferentes períodos de condicionamento ao baixo O₂, mais sete dias de exposição a 20 °C. Santa Maria, 2011.

Condição de armazenamento *	Degenerescência (%)		Polpa farinácea (%)	
	Alta		Alta	
	severidade ****	Total	severidade	Total
1,0 kPa O ₂ imediato	5,1 b **	11,3 b	9,4 b	30,1 a
1,0 kPa O ₂ em 7 dias	14,2 a	19,4 a	18,6 a	35,1 a
0,8 kPa O ₂ em 7 dias	2,0 b	16,9 a	11,1 b	34,9 a
0,7 kPa O ₂ em 7 dias	7,1 a	24,2 a	18,1 a	31,3 a
0,7 kPa O ₂ em 14 dias	14,2 a	22,8 a	18,4 a	36,7 a
0,7 kPa O ₂ em 28 dias	7,3 a	18,7 a	13,5 a	30,0 a
0,5 kPa O ₂ em 7 dias	9,6 a	19,1 a	15,2 a	27,8 a
0,5 kPa O ₂ em 14 dias	7,8 a	20,9 a	10,0 b	29,5 a
0,5 kPa O ₂ em 28 dias	9,6 a	21,8 a	8,3 b	22,8 b
0,7 kPa O ₂ com estresse ***	5,3 b	11,7 b	8,4 b	22,3 b
1,0 kPa O ₂ imed. + 1-MCP	5,1 b	12,7 b	5,8 b	16,9 b
ACD Fluorescência	9,91 a	18,8 a	13,9 a	34,6 a
CV (%)	32,3	18,5	23,2	14,7

* A pressão parcial de CO₂ em todas as câmaras foi de 1,2 kPa.

** Valores seguidos pela mesma letra, na vertical, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro.

*** Estes frutos foram submetidos a uma redução gradativa do O₂ até atingir 0,4 kPa, permanecendo nesta condição durante 14 dias, sendo que em seguida a pressão parcial de O₂ foi elevada até 0,7 kPa, permanecendo assim até o final do armazenamento.

**** Nestes frutos os distúrbios já estavam em um estágio mais avançado, sendo facilmente identificado.

De acordo com El-Mir et al. (2001), um período de adaptação à hipóxia (3,0 kPa de O₂ por 24 horas) aumenta a tolerância de frutos de abacate ao armazenamento em ULO (0,25 ou 1,0 kPa de O₂). Em raízes de *Arabidopsis thaliana* foi comprovado um aumento na transcrição de genes envolvidos na fermentação alcoólica e láctica com o decréscimo de O₂ até 5%, podendo ser interpretado como uma pré-adaptação que leva à continuação da produção de energia durante o período subsequente de anóxia (KLOK et al., 2002). Lévesque et al.

(2006) também observaram que o armazenamento em AC com diminuição gradativa de O₂ e CO₂ evitou a formação de escurecimento interno em maçãs 'Mc Intosh', o que não aconteceu nas outras condições de AC. Para maçã 'Gala', Ceretta et al. (2010) constataram maior ocorrência de degenerescência quando baixas pressões parciais de O₂ foram aplicadas no período inicial de armazenamento, comparado à mesma concentração no período final. De acordo com Wright et al. (2010), uma mudança mais gradual na taxa metabólica reduz o estresse associado com a mudança induzida pelo baixo O₂, devido a uma resposta de adaptação desconhecida.

Dentre os distúrbios fisiológicos observados nas maçãs após oito meses de armazenamento mais sete dias de exposição a 20 °C, a ocorrência de polpa farinácea foi a mais expressiva, pela maior porcentagem dos frutos com este distúrbio. A menor ocorrência de sintomas bem visíveis (alta severidade de polpa farinácea) foi observada nos frutos com o armazenamento imediato em 1,0 °C, com ou sem 1-MCP, em AC com 0,8 kPa de O₂ com sete dias de condicionamento, AC com 0,5 kPa de O₂ com 14 ou 28 dias de condicionamento e AC com 0,7 kPa de O₂ com 20 dias de condicionamento mais 14 dias de estresse por baixo O₂ (Tabela 11). Na análise do total de frutos com este distúrbio, observa-se que a aplicação de 1-MCP diminuiu a ocorrência no armazenamento em 1,0 kPa de O₂ imediato e que o armazenamento em 0,5 kPa de O₂ com 28 dias de condicionamento ou 0,7 kPa de O₂ com 20 dias de condicionamento mais estresse por baixo O₂ também foram eficientes no controle deste distúrbio (Tabela 9). De acordo com Moshou et al. (2003), o armazenamento de maçãs em condições de baixo O₂ retardam o aparecimento de polpa farinácea. A polpa farinácea é caracterizada pela desorganização da textura durante o armazenamento inadequado, resultando em frutos amolecidos e com pouca suculência. Nestas condições a lamela média é desintegrada a ponto de haver separação das células em vez de ruptura das mesmas, quando uma força é aplicada sobre o fruto (REEVE, 1970). Neste sentido, a diminuição imediata de O₂ até a condição de ULO pode afetar de forma diferenciada as enzimas relacionadas com a degradação dos componentes da parede celular e da lamela média, fazendo com que aumente a ocorrência de polpa farinácea nesta condição. Os dados encontrados no presente trabalho comprovam que o armazenamento em ultrabaixo O₂ com um período de condicionamento, pode ser um método eficiente para diminuir a ocorrência de distúrbios no armazenamento de maçãs.

A ocorrência de podridões nos frutos após oito meses de armazenamento, mais sete dias a 20 °C, não foi afetada pelos tratamentos (Tabela 12). De acordo com Giehl et al. (2010) a diminuição da concentração de O₂ é eficiente na redução da ocorrência de podridões nos

frutos. Estes autores constataram que o armazenamento de maçã ‘Gala’ em AC com 1,0 kPa de O₂ + 2,5 kPa de CO₂ a 0,5 °C, reduziu a incidência de podridões, além de outros distúrbios. No entanto, se o oxigênio estiver em uma concentração muito baixa, esta condição pode ser prejudicial aos frutos, aumentando a podridão. Ceretta et al. (2010) observaram que a redução da pressão parcial de O₂ para níveis inferiores a 0,8 kPa por oito meses ininterruptos, provoca o aumento de podridões na maçã ‘Gala’, sendo que as baixas pressões parciais de O₂ são mais prejudiciais no início que no final do armazenamento. De acordo com Weber (2010), a aplicação de etanol e acetaldeído, dois produtos da fermentação, em maçã ‘Royal Gala’ aumentaram a ocorrência de podridões, possivelmente pela dose utilizada ter sido muito alta. No presente trabalho não se evidenciou diferença no surgimento de podridões nos frutos entre a condição de AC padrão (1,0 kPa) e o armazenamento em ULO, provavelmente por este período de pelo menos sete dias de condicionamento ao baixo O₂, de alguma forma ter adaptado os frutos a essa condição, prevenindo a ocorrência de podridões.

A maior porcentagem de frutos sadios foi observada com o armazenamento em 1,0 kPa de O₂ com instalação de AC imediata e aplicação de 1-MCP, não diferindo significativamente da condição de armazenamento em 0,5 kPa de O₂ com 28 dias de condicionamento (Tabela 12). Da primeira situação, pode-se perceber o benefício da aplicação de 1-MCP, especialmente em condições com O₂ mais elevadas. Na segunda situação percebe-se que o armazenamento em ULO pode ser benéfico, no entanto há a necessidade da diminuição gradativa do O₂ até atingir esta condição, concordando com Lévesque et al. (2006), que observaram melhor conservação da qualidade de maçãs ‘Stakrimson Delicious’ com diminuição gradual da pressão parcial de O₂ e CO₂ durante o armazenamento em ULO. A porcentagem de frutos sadios no armazenamento em ACD pelo método de fluorescência foi inferior às duas condições citadas acima, não diferindo das demais condições de armazenamento (Tabela 12). Este resultado discorda de dados da literatura que relatam maior preservação da qualidade dos frutos armazenados em ACD por este método (PRANGE et al., 2005; WATKINS, 2008; GASSER et al., 2010). Provavelmente a diminuição mais rápida do O₂ no início do armazenamento, seguida por uma pressão parcial bastante baixa de O₂ durante todo o período de armazenagem (0,4 kPa), podem ter influenciado para aumentar a ocorrência de distúrbios nos frutos em ACD e, conseqüentemente, diminuindo a porcentagem de frutos sadios.

O armazenamento em ACD com fluorescência de clorofilas foi eficiente em manter a firmeza de polpa dos frutos, concordando com outros autores (DeLONG et al., 2007; ZANELLA et al., 2005; WATKINS, 2008; GASSER et al., 2010). No entanto, esta condição

não diferiu do armazenamento em 0,5 kPa de O₂, independente do tempo de condicionamento, do armazenamento em 0,7 kPa de O₂ com condicionamento mais estresse por baixo oxigênio e do armazenamento imediato em 1,0 kPa de O₂, com ou sem 1-MCP (Tabela 12). Estes resultados evidenciam a necessidade da diminuição imediata de O₂ quando os frutos são armazenados em uma condição de 1,0 kPa de O₂, pois um período de sete dias de condicionamento, nesta condição, resultou em menor firmeza após o armazenamento.

Tabela 12 – Ocorrência de podridões e de frutos sadios e firmeza de polpa de maçãs ‘Royal Gala’ após oito meses de armazenamento em atmosfera controlada e diferentes períodos de condicionamento ao baixo O₂, mais sete dias de exposição a 20 °C. Santa Maria, 2011.

Condição de armazenamento *	Podridões (%)	Frutos sadios (%)	Firmeza de polpa (N)
1,0 kPa O ₂ imediato	4,0 a **	67,0 b	71,4 a
1,0 kPa O ₂ em 7 dias	9,0 a	62,0 b	66,3 b
0,8 kPa O ₂ em 7 dias	16,6 a	62,7 b	66,4 b
0,7 kPa O ₂ em 7 dias	12,0 a	62,0 b	64,1 b
0,7 kPa O ₂ em 14 dias	19,0 a	56,0 b	65,6 b
0,7 kPa O ₂ em 28 dias	9,6 a	63,0 b	67,4 b
0,5 kPa O ₂ em 7 dias	12,0 a	66,5 b	68,6 a
0,5 kPa O ₂ em 14 dias	13,5 a	65,8 b	68,8 a
0,5 kPa O ₂ em 28 dias	9,6 a	71,7 a	70,2 a
0,7 kPa O ₂ com estresse ***	16,0 a	68,0 b	68,7 a
1,0 kPa O ₂ imed. + 1-MCP	12,4 a	76,9 a	72,5 a
ACD Fluorescência	7,15 a	62,6 b	68,7 a
CV (%)	37,5	6,96	4,49

* A pressão parcial de CO₂ em todas as câmaras foi de 1,2 kPa.

** Valores seguidos pela mesma letra, na vertical, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro.

*** Estes frutos foram submetidos a uma redução gradativa do O₂ até atingir 0,4 kPa, permanecendo nesta condição durante 14 dias, sendo que em seguida a pressão parcial de O₂ foi elevada até 0,7 kPa, permanecendo assim até o final do armazenamento.

De acordo com Johnston et al. (2006), as maçãs das cultivares Cox’s Orange Pippin e Royal Gala apresentam uma curva de perda de firmeza trifásica durante o armazenamento refrigerado ou AC, sendo caracterizada por uma fase inicial de amolecimento lento, logo após a colheita, seguida por uma fase de amolecimento rápido e uma fase final de amolecimento

mais lento. Estes mesmos autores verificaram que um período inicial de armazenamento refrigerado antes de instalar as condições de AC (atraso) aumenta a perda de firmeza dos frutos, sendo este fato associado a maior produção de etileno. Isso pode explicar a menor firmeza dos frutos armazenados em AC com 1,0, 0,8 e 0,7 kPa de O₂ e com atraso na instalação (condicionamento), verificado no presente trabalho. No armazenamento em 0,5 kPa, independente do tempo de condicionamento, em 0,7 kPa de O₂ mais estresse por baixo oxigênio (0,4 kPa) e em ACD (média de 0,4 kPa de O₂), estas baixas pressões parciais de O₂ podem ter induzido a fermentação com alguma produção de etanol e acetaldeído, que podem ter contribuído para evitar a perda de firmeza. De acordo com Pesis (2005), a manutenção da firmeza como resultado da aplicação de etanol e acetaldeído, foi observada em várias frutas, como pêssego, nectarina, tomate, uva e abacate. O acetaldeído reduz a atividade de enzimas que degradam a parede celular, como as poligalacturonase (PG), em pêssego e nectarina (LURIE; PESIS, 1992), PG em tomate (PESIS; MARINANSKY, 1993) e PG, celulasas e β-galactosidases em abacate (PESIS et al., 1998). Contrariamente ao observado em 1,0 kPa de O₂, um período de condicionamento com posterior armazenamento em 0,5 kPa de O₂ não reduziu a firmeza de polpa dos frutos, indicando que em ULO não há a necessidade de rápida instalação de AC, sendo que um período de condicionamento pode mesmo ser benéfico para a manutenção da qualidade.

Com relação ao teor de SST houve pequena variação entre os tratamentos, sem evidenciar diferença estatística entre eles (Tabela 13). Este resultado está de acordo com Ceretta et al. (2010), que observaram valores similares de SST para a maçã ‘Gala’ independente da concentração de O₂ e CO₂ na câmara e se estas foram aplicadas por períodos diferentes, tanto no início quanto no final do armazenamento. De acordo com Brackmann (1990), os açúcares são substratos orgânicos que são utilizados na respiração apenas depois de acentuado consumo dos ácidos orgânicos, indicando que todas as condições de armazenamento utilizadas no presente trabalho propiciaram um baixo metabolismo aos frutos, de forma que não influenciassem no teor de SST.

Os menores níveis de acidez titulável foram observados nos frutos armazenados em 1,0 kPa de O₂ mais 1-MCP, 0,8 kPa de O₂ com 7 dias de condicionamento e 0,7 kPa de O₂ com 14 dias de condicionamento, além daqueles armazenados com o uso da técnica de ACD com fluorescência de clorofilas (Tabela 13). O ácido predominante em maçã é o ácido málico (WU et al., 2007), sendo que este é o substrato primário consumido pelo processo respiratório (PESIS et al., 2010), diminuindo durante o armazenamento quando as condições de armazenamento propiciam um maior metabolismo dos frutos. Neste sentido, as condições de

armazenamento com menor pressão parcial de O₂ deveriam manter maior a acidez dos frutos, o que foi observado no presente trabalho com o armazenamento em 0,5 kPa de O₂, sem no entanto diferir estatisticamente da maioria das outras condições. Resultado contraditório foi observado para os frutos armazenados em ACD, em que a pressão parcial de O₂ permaneceu em 0,4 kPa, após registrado o pico de fluorescência, até o final do armazenamento. Contudo, este resultado está de acordo com Franck et al. (2007), que relacionaram a ocorrência de escurecimento interno em peras com a diminuição da concentração de ácido málico no tecido afetado. O fato do uso de ACD com fluorescência de clorofilas ter causado maiores distúrbios nos frutos pode estar relacionado com a diminuição da acidez observada nos frutos deste tratamento.

Tabela 13 – Teor de sólidos solúveis, acidez e atividade da enzima ACC oxidase, de maçãs ‘Royal Gala’ após oito meses de armazenamento em atmosfera controlada e diferentes períodos de condicionamento ao baixo O₂, mais sete dias de exposição a 20 °C. Santa Maria, 2011.

Condição de armazenamento *	SST (°Brix)	Acidez Titulável (mEq 100 mL ⁻¹)	ACC oxidase (nL C ₂ H ₄ g ⁻¹ h ⁻¹)
1,0 kPa O ₂ imediato	11,75 a **	3,80 a	50,1 a
1,0 kPa O ₂ em 7 dias	11,75 a	3,82 a	49,8 a
0,8 kPa O ₂ em 7 dias	12,00 a	3,62 b	40,0 a
0,7 kPa O ₂ em 7 dias	11,75 a	3,82 a	40,5 a
0,7 kPa O ₂ em 14 dias	11,70 a	3,52 b	35,8 b
0,7 kPa O ₂ em 28 dias	11,80 a	3,85 a	46,2 a
0,5 kPa O ₂ em 7 dias	11,80 a	3,72 a	33,8 b
0,5 kPa O ₂ em 14 dias	11,65 a	3,95 a	26,1 c
0,5 kPa O ₂ em 28 dias	11,95 a	3,85 a	36,4 b
0,7 kPa O ₂ com estresse ***	11,70 a	3,77 a	34,0 b
1,0 kPa O ₂ imed. + 1-MCP	11,55 a	3,62 b	18,9 c
ACD Fluorescência	12,15 a	3,52 b	41,6 a
CV (%)	1,98	3,30	22,3

* A pressão parcial de CO₂ em todas as câmaras foi de 1,2 kPa.

** Valores seguidos pela mesma letra, na vertical, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro.

*** Estes frutos foram submetidos a uma redução gradativa do O₂ até atingir 0,4 kPa, permanecendo nesta condição durante 14 dias, sendo que em seguida a pressão parcial de O₂ foi elevada até 0,7 kPa, permanecendo assim até o final do armazenamento.

A menor atividade da enzima ACC oxidase ocorreu nos frutos que receberam 1-MCP, não diferindo significativamente dos frutos armazenados em 0,5 kPa de O₂ com 14 dias de condicionamento (Tabela 13). Fica claro o efeito do 1-MCP na redução da atividade desta enzima na condição de armazenamento com oxigênio mais elevado (1,0 kPa), concordando com Brackmann et al. (2008b), que constataram menor atividade da ACC oxidase em frutos com 1-MCP e armazenados em 1,2 kPa O₂ + 2,5 kPa CO₂, comparado com aqueles sem aplicação deste composto. Para os demais tratamentos sem 1-MCP, de uma maneira geral, houve diminuição da atividade da ACC oxidase com a diminuição da concentração de O₂ nas câmaras de armazenamento, sem interferência do tempo de condicionamento, exceto para os frutos armazenados em ACD com fluorescência de clorofilas, que apresentaram alta atividade da enzima. Os produtos da fermentação (etanol e acetaldeído) agem sobre a ACC oxidase, inibindo-a ou desnaturando-a (BEAULIEU; SALTVEIT, 1997; ASODA et al., 2009), sendo que nas condições com baixas concentrações de O₂ possivelmente houve a produção de pequenas quantidades destes compostos de forma a interferir na atividade desta enzima.

Na avaliação da produção de etileno, especialmente nos dois primeiros dias de exposição dos frutos a 20 °C, fica evidente a influência do baixo O₂ na inibição da produção de etileno, uma vez que quanto menor a concentração de O₂ durante o armazenamento, menor foi a produção de etileno pelos frutos (Tabela 14). Este fato pode ser explicado pela menor atividade da enzima ACC oxidase nestas condições, uma vez que esta enzima necessita de O₂ para conversão da ACC a etileno (YANG; HOFFMAN, 1984; YIP et al., 1988). Entretanto isto não aconteceu nos frutos armazenados em ACD, em que houve baixa produção de etileno durante os sete dias de exposição à temperatura ambiente, porém com alta atividade da ACC oxidase. Possivelmente os frutos expostos a uma menor concentração de O₂, nesta condição, tenham iniciado o processo fermentativo, com produção de etanol e acetaldeído. De acordo com Podd e Van Staden (1999), o efeito tóxico do acetaldeído ocorre sobre a atividade da ACC sintase, diminuindo a produção de etileno. Portanto, na análise da atividade da enzima ACC oxidase, com o fornecimento de ACC exógeno, ocorreu grande produção de etileno, evidenciando alta atividade desta enzima, ao passo que na avaliação da produção de etileno, esta foi baixa em função da inibição da conversão de SAM a ACC, na etapa anterior da rota de produção de etileno e catalisada pela ACC sintase. Os compostos resultantes do metabolismo anaeróbico (etanol e acetaldeído) possuem uma forte influência na inibição da produção de etileno em várias frutas (PESIS, 2005).

Tabela 14 – Produção de etileno em maçãs ‘Royal Gala’, durante seis dias de exposição a 20 °C, após armazenamento durante oito meses em atmosfera controlada e diferentes períodos de condicionamento ao baixo O₂. Santa Maria, 2011.

Condição de armazenamento *	Produção de etileno ($\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$)			
	Saída da câm.	2 dias a 20°C	4 dias a 20°C	6 dias a 20°C
1,0 kPa O ₂ imediato	1,596 a**	0,079 a	0,034 b	0,050 b
1,0 kPa O ₂ em 7 dias	1,640 a	0,112 a	0,064 a	0,115 a
0,8 kPa O ₂ em 7 dias	1,184 b	0,082 a	0,031 b	0,030 b
0,7 kPa O ₂ em 7 dias	0,567 c	0,088 a	0,024 b	0,024 b
0,7 kPa O ₂ em 14 dias	0,576 c	0,042 b	0,025 b	0,045 b
0,7 kPa O ₂ em 28 dias	0,420 d	0,040 b	0,026 b	0,036 b
0,5 kPa O ₂ em 7 dias	0,259 e	0,037 b	0,024 b	0,036 b
0,5 kPa O ₂ em 14 dias	0,244 e	0,036 b	0,035 b	0,035 b
0,5 kPa O ₂ em 28 dias	0,231 e	0,034 b	0,018 b	0,034 b
0,7 kPa O ₂ com estresse ***	0,425 d	0,047 b	0,029 b	0,068 b
1,0 kPa O ₂ imed. + 1-MCP	0,081 f	0,071 a	0,018 b	0,017 b
ACD Fluorescência	0,097 f	0,021 b	0,017 b	0,020 b
CV (%)	14,3	33,1	39,3	62,8

* A pressão parcial de CO₂ em todas as câmaras foi de 1,2 kPa.

** Valores seguidos pela mesma letra, na vertical, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro.

*** Estes frutos foram submetidos a uma redução gradativa do O₂ até atingir 0,4 kPa, permanecendo nesta condição durante 14 dias, sendo que em seguida a pressão parcial de O₂ foi elevada até 0,7 kPa, permanecendo assim até o final do armazenamento.

A respiração dos frutos apresentou um comportamento semelhante à produção de etileno, especialmente nos dois primeiros dias de avaliação, em que as maiores concentrações de oxigênio nas câmaras de armazenamento proporcionaram maior atividade respiratória (Tabela 15). Com relação ao condicionamento ao baixo O₂, não houve influência da diminuição gradativa deste gás no ambiente de armazenagem sobre a respiração, ao contrário do que foi observado por Gasser et al. (2003), que constataram que a produção de CO₂ em maçãs foi maior com um rápido decréscimo de oxigênio no ambiente de armazenagem, comparado com uma diminuição mais lenta deste gás na câmara. No entanto, o condicionamento no armazenamento em ULO deve ser melhor investigado para as cultivares produzidas no sul do Brasil, uma vez que os resultados do presente trabalho mostraram uma tendência de melhor preservação da qualidade dos frutos que tiveram períodos mais prolongados de condicionamento ao baixo O₂, principalmente aqueles armazenados em 0,5 kPa de O₂.

Tabela 15 – Respiração de maçãs ‘Royal Gala’, durante seis dias de exposição a 20 °C, após armazenamento durante oito meses em atmosfera controlada e diferentes períodos de condicionamento ao baixo O₂. Santa Maria, 2011.

Condição de armazenamento *	Respiração (mL CO ₂ kg ⁻¹ h ⁻¹)			
	Saída da câm.	2 dias a 20°C	4 dias a 20°C	6 dias a 20°C
1,0 kPa O ₂ imediato	5,75 a**	4,26 a	2,39 a	2,64 a
1,0 kPa O ₂ em 7 dias	5,86 a	4,25 a	2,77 a	2,91 a
0,8 kPa O ₂ em 7 dias	5,06 b	3,95 a	2,33 a	2,66 a
0,7 kPa O ₂ em 7 dias	5,04 b	3,91 a	2,97 a	2,63 a
0,7 kPa O ₂ em 14 dias	4,54 c	3,44 b	2,92 a	2,72 a
0,7 kPa O ₂ em 28 dias	4,34 c	3,80 a	2,60 a	2,59 a
0,5 kPa O ₂ em 7 dias	3,76 d	3,48 b	2,58 a	2,89 a
0,5 kPa O ₂ em 14 dias	4,58 c	3,90 a	2,88 a	2,81 a
0,5 kPa O ₂ em 28 dias	4,56 c	3,94 a	2,61 a	2,54 a
0,7 kPa O ₂ com estresse***	3,90 d	2,92 b	2,44 a	2,66 a
1,0 kPa O ₂ imed. + 1-MCP	3,63 d	3,04 b	2,90 a	2,66 a
ACD Fluorescência	3,93 d	3,28 b	2,56 a	2,94 a
CV (%)	12,4	16,3	15,4	12,9

* A pressão parcial de CO₂ em todas as câmaras foi de 1,2 kPa.

** Valores seguidos pela mesma letra, na vertical, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro.

*** Estes frutos foram submetidos a uma redução gradativa do O₂ até atingir 0,4 kPa, permanecendo nesta condição durante 14 dias, sendo que em seguida a pressão parcial de O₂ foi elevada até 0,7 kPa, permanecendo assim até o final do armazenamento.

4.2.2 Conclusões

O armazenamento com pressão parcial de O₂ de 0,5 kPa é eficiente na manutenção da qualidade de maçãs ‘Royal Gala’, apresentando melhores resultados quando o período de redução gradativa de O₂ (condicionamento) se estende até 28 dias a partir do início do armazenamento.

O armazenamento de maçãs durante 14 dias em uma condição de estresse por baixo oxigênio (0,4 kPa), após um período de condicionamento ao baixo O₂, auxilia na manutenção da qualidade dos frutos armazenados em ULO.

No armazenamento de maçãs em maiores pressões parciais de O_2 (1,0 kPa), a instalação de AC imediata é desejável, sendo que nesta condição específica de AC a aplicação de 1-MCP mantém menor a ocorrência de distúrbios e maior a porcentagem de frutos sadios.

As condições de armazenamento testadas no presente trabalho, de uma maneira geral, apresentaram resultados similares ou superiores à ACD com uso de florescência de clorofilas, sobre preservação de atributos de qualidade dos frutos, sugerindo que esta técnica necessita ser melhor investigada.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um estresse por baixo O_2 em maçãs ‘Royal Gala’ não é eficiente em manter a qualidade das mesmas quando aplicado imediatamente após a colheita, no entanto, após um período de condicionamento dos frutos ao baixo O_2 , pode proporcionar algum benefício na manutenção da qualidade durante o armazenamento em condições ultrabaixas de oxigênio.

A redução gradativa de O_2 no ambiente de armazenamento durante aproximadamente um mês, permite o armazenamento em condições ultrabaixas de O_2 , com bons resultados na manutenção na qualidade dos frutos.

A aplicação de 1-MCP apresenta pouca eficiência quando as concentrações de O_2 nas câmaras de armazenamento são extremamente baixas, ou quando os frutos apresentam um estágio de maturação avançado.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. O; YANG, S. F. Methionine metabolism in apple tissue: Implication of S-adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. **Plant Physiology**, v. 60, p. 892-896, 1977.

AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. Editora FNP, 2010. 520p.

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

AMARANTE, C. V. T.; STEFFENS, C. A.; ARGENTA, L. C. Yield and fruit quality of 'Gala' and 'Fuji' apple trees protected by white anti-hail net. **Scientia Horticulturae**, v. 129, p. 79-85, 2011.

ASIF, M. H; et al. Effect of low oxygen, temperature and 1-methylcyclopropene on the expression of genes regulating ethylene biosynthesis and perception during ripening in apples. **South African Journal of Botany**, v. 75, p. 137-144, 2009.

ASODA, T. et al. Effects of postharvest ethanol vapor treatment on ethylene responsiveness in broccoli. **Postharvest Biology and Technology**, v.52, p.216-220, 2009.

BAI, J. et al. Response of four apple cultivars to 1-methylcyclopropene treatment and controlled atmosphere storage. **Hort Science**, v.40, p.1534-1538, 2005.

BARRY, C. S.; LLOP-TOUS, M. I.; GRIERSON, D. The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. **Plant Physiology**, v. 123, p. 979-986, 2000.

BEAULIEU, J. C.; PEISER, G.; SALTVEIT, M. E. Acetaldehyde is a causal agent responsible for ethanol-induced ripening inhibition in tomato fruit. **Plant Physiology**, v. 113, p. 431-439, 1997.

BEAULIEU, J. C.; SALTVEIT, M. E. Inhibition or promotion of tomato fruit ripening by acetaldehyde and ethanol is concentration dependent and varies with initial fruit maturity. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v. 122, p. 392-398, 1997.

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

BLEECKER, A. B. Ethylene perception and signaling: an evolutionary perspective. **Trends in Plant Science**, v. 4, p. 269-274, 1999.

BLEECKER, A. B.; KENDE, H. Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 16, p. 1-18, 2000.

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

BOLOGA, K. L. et al. A bypass of sucrose synthase leads to low internal oxygen and impaired metabolic performance in growing potato tubers. **Plant Physiology**, v. 132, p. 2058-2072, 2003.

BONGHI, C. et al. Peach fruit ripening and quality in relation to picking time, and hypoxic and high CO₂ short-term postharvest treatments. **Postharvest Biology and Technology**, v. 16, p. 213-222, 1999.

BRACKMANN, A. **Einfluss von Lagerung unter Kontrollierter Atmosphäre (CA) und Ethylenbehandlungen auf verschiedene Merkmale der Fruchtreife unter besonderer Berücksichtigung der Aromabildung bei Äpfeln**. 1990. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Univesität Hohenheim, Alemanha, 1990.

BRACKMANN, A. et al. Armazenamento de maçã 'Royal Gala' sob diferentes concentrações de etileno. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 6, p. 39-41, 2000.

BRACKMANN, A. et al. Conseqüência da umidade relativa durante o armazenamento refrigerado e em atmosfera controlada na qualidade da maçã 'Gala'. **Ciência Rural**, v. 35, p. 1196-1200, 2005a.

BRACKMANN, A. et al. Manejo do etileno e sua relação com a maturação da maçãs 'Gala' armazenada em atmosfera controlada. **Bragantia**, v. 68, p. 519-525, 2009.

BRACKMANN, A. et al. Manutenção da qualidade pós-colheita de maçãs 'Royal Gala' e 'Galaxy' sob armazenamento em atmosfera controlada. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2478-2484, 2008a.

BRACKMANN, A. et al. Qualidade da maçã 'Gala' armazenada em atmosfera controlada associada à absorção e ao controle da síntese e ação do etileno. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2151-2156, 2008b.

BRACKMANN, A. et al. Qualidade da maçã 'Gala' armazenada em diferentes pressões parciais de O₂ e CO₂. **Revista da FZVA - Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 12, p. 98-105, 2005b.

BRACKMANN, A. et al. Qualidade da maçã cv. 'Gala' tratada com 1-metilciclopropeno. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1415-1420, 2004.

BRACKMANN, A; CERETTA, M. Efeito da redução nos níveis de etileno e da umidade relativa no armazenamento de maçã 'Gala' em atmosfera controlada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 2169-2174, 1999.

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.

BURDON, J. et al. Acetaldehyde inhibition of ethylene biosynthesis in mango fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 8, p. 153-161, 1996.

CANTERI, M.G. et al. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, n. 2, p. 18-24. 2001.

CERETTA M. et al. Tolerância da maçã 'Gala' a pressões parciais extremas de O₂ e CO₂ durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 35, p. 60-69, 2010.

CHANG, W. W. P. et al. Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry. **Plant Physiology**, v. 122, p. 295-317, 2000.

CHANJIRAKUL, K. et al. Natural volatile treatments increase free-radical scavenging capacity of strawberries and black-berries. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 1463-1472, 2007.

CHEN, Y. F. et al. Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of Arabidopsis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 19861-19866, 2002.

CHERVIN, C. H. et al. Could studies on cell response to low oxygen level provide improved options for fruit storage and disinfestation. **Postharvest Biology and Technology**, v. 7, p. 289-299, 1996.

CHITARRA, M. I. F; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita da frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.

CIN, V. D. et al. Ethylene biosynthesis and perception in apple fruitlet abscission (*Malus domestica* (L.) Borkh). **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 2995-3005, 2005.

CIN, V. D. et al. The ethylene biosynthetic and signal transduction pathways are differently affected by 1-MCP in apple and peach fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 42, p. 125-133, 2006.

CORRENT, A. R. et al. Efeito do 1-metilciclopropeno em maçãs 'Fuji' armazenadas em atmosfera refrigerada e atmosfera controlada. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 11, p. 91-94, 2005.

De SMEDT, V. et al. Microscopic observation of mealiness in apples: a quantitative approach. **Postharvest Biology and Technology**, v. 14, p. 151-158, 1998.

DeELL, J. R. et al. 1-Methylcyclopropene (1-MCP) increases CO₂ injury in apples. **Acta Horticulturae**, v. 600, p. 277-280, 2003.

DeELL, J. R. et al. Influence of temperature and duration of 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment on apple quality. **Postharvest Biology and Technology**, v. 24, p. 349-353, 2002.

DeELL, J. R.; PRANGE, R. K.; MURR, D. P. Chlorophyll fluorescence techniques to detect atmospheric stress in stored apples. **Acta Horticulturae**, v. 464, p. 127-131, 1998.

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.

DeLONG, J. M.; PRANGE, R. K.; HARRISON, P. A. The influence of 1-methylcyclopropene on 'Cortland' and 'Mc Intosh' apple quality following long-term storage. **HortScience**, v. 39, p. 1062-1065, 2004.

DIXON, J.; HEWETT, E. W. Exposure to hypoxia conditions alters volatile concentrations of apple cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 22-29, 2001.

DONG, J.G. et al. Cloning of a cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and expression of its mRNA in ripening apple fruit. **Planta**, v. 185, p. 38-45, 1991.

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.

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.

EL-MIR, M. et al. Hypoxic acclimation prevent mesocarp injury caused by subsequent exposure to extreme low oxygen atmospheres. **Postharvest Biology and technology**, v. 23, p. 215-226, 2001.

FALLIK, E. et al. A 24-h anoxia treatment reduces decay development while maintaining tomato fruit quality. **Postharvest Biology and Technology**, v. 29, p. 233-236, 2003.

FLORES, F. et al. Role of ethylene in the biosynthetic pathway of liphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe melons. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 201-206, 2002.

FLORES, F. et al. The use of ethylene-suppressed lines to assess differential sensitivity to ethylene of the various ripening pathways in Cantaloupe melons. **Physiologia Plantarum**, v. 113, p. 128-133, 2001.

FONSECA, S. C.; OLIVEIRA, F. A. R.; BRECHT, J. K. Modelling respiration rate of fresh fruits and vegetables for modified atmosphere packages: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 52, p. 99-119, 2002.

FRANCK, C. et al. Browning disorders in pear fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 43, p. 1-13, 2007.

FUKAO, T.; BAILEY-SERRES, J. Plant responses to hypoxia - is survival a balancing act? **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 449-456, 2004.

GASSER, F. et al. Aktuelle lagertechnische Themen. Schweiz. Z. **Obst-Weinbau**, v. 21, p. 12-13, 2006.

GASSER, F. et al. Control of the critical oxygen level during dynamic CA storage of apples by monitoring respiration as well as chlorophyll fluorescence. **Acta Horticulturae**, v. 796, p. 69-76, 2008.

GASSER, F. et al. Dynamic CA storage of apples: monitoring of the critical oxygen concentration and adjustment of optimum conditions during oxygen reduction. **Acta Horticulturae**, v. 876, p. 39-46, 2010.

GASSER, F. et al. Effects of decreasing oxygen levels in the storage atmosphere on the respiration of Idared apples. **Acta Horticulturae**, v. 600, p. 189-192, 2003.

GEIGENBERGER, P. et al. Metabolic activity decreases as an adaptative response to low internal oxygen in growing potato tubers. **Biological Chemistry**, v. 381, p. 723-740, 2000.

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, 1998a.

GHAHRAMANI, F.; SCOTT, K. J. The action of ethanol in controlling superficial scald of apples. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 49, p. 199-205, 1998b.

GIEHL, R. F. H. et al. Thidiazuron affects the quality of 'Gala' apples stored under controlled atmosphere. **Ciência Rural**, v. 40, p. 813-819, 2010.

GORNY, R.; KADER, A. A. The mode of CO₂ action on ACC oxidase and its role in inhibition of ethylene biosynthesis. **HortScience**, v. 29, p. 533, 1994.

GOULAO, L.F. et al. Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples. **Postharvest Biology Technology**, v. 43, p. 307-318, 2007.

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.

GRAY, J. et al. Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes. **Plant Molecular Biology**, v. 19, p. 69-87, 1992.

GUO, H.; ECKER, J. R. The ethylene signaling pathway: new insights. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 40-49, 2004.

GUPTA, K. J.; ZABALZA, A.; VAN DONGEN, J. T. Regulation of respiration when the oxygen availability changes. **Physiologia Plantarum**, v. 137, p. 383-391, 2009.

HAJI, T.; YAEGAKI, H.; YAMAGUCHI, M. Softening of stony hard peach by ethylene and the induction of endogenous ethylene by 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC). **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 72, p. 212-217, 2003.

HENNECKE, C.; KÖPCKE, D.; DIEREND, W. Dynamische Absenkung des Sauerstoffgehaltes bei der Lagerung von Äpfeln. **Erwerbs-Obstbau**, v. 50, p. 19-29, 2008.

HEWAGE, K. S.; WAINWRIGHT, H.; LUO, Y. Effect of ethanol and acetaldehyde on banana ripening. **The Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 70, p. 51-55, 1995.

HIWASA, K. et al. Ethylene is required for both the initiation and progression of softening in pear (*Pyrus communis* L.) fruit. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 771-779, 2003.

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

HUELIN, F. E.; COGGIOLA, I. M. Superficial scald, a functional disorder of stored apples. V. Oxidation of α -farnesene and its inhibition by diphenylamine. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 21, p. 44-48, 1970.

IMAHORI, Y. et al. Regulation of ethanolic fermentation in bell pepper fruit under low oxygen stress. **Postharvest Biology and Technology**, v. 25, p. 159-167, 2002.

IMAHORI, Y. et al. Relationship between low-oxygen injury and ethanol metabolism in various fruits and vegetables. **Acta Horticulturae**, v. 682, p. 1103-1108, 2005.

INGLE, I.; D'SOUZA, M. C. Physiology and control of superficial scald of apples: a review. **HortScience**, v. 24, p. 28-31, 1989.

JOHNSTON, J. W.; HEWETT, E. W.; HERTOOG, M. L. A. T. M. Characterization of 'Royal Gala' and 'Cox's Orange Pippin' apple (*Malus domestica*) softening during controlled atmosphere storage. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 34, p. 73-83, 2006.

KADER, A. A. Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. **Food Technology**, v. 40, p. 99-104, 1986.

KE, D. et al. Ethanolic fermentation of 'Bartlett' pears as influenced by ripening stage and atmospheric composition. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v. 119, p. 976-982, 1994.

KE, D.; MATEO, M.; KADER, A. A. Regulation of fermentative metabolism in fruits and vegetables by controlled atmospheres. In: INTERNETIONAL CONTROLLED ATMOSPHERE RESEARCH CONFERENCE, 6., 1993, Ithaca. **Proceeding...** Cornell University, Ithaca, NY, 1993. p. 63-77.

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.

KENNEDY, R. A.; RUMPHO, M. E.; FOX, T. C. Anaerobic metabolism in plants. **Plant Physiology**, v. 100, p. 1-6, 1992.

KLOK, E. J. et al. Expression profile analysis of the low-oxygen response in Arabidopsis root cultures. **Plant Cell**, v. 14, p. 2481-2494, 2002.

KNEE, M.; PROCTOR, F. J.; DOVER, C. J. The technology of ethylene control: use and removal in post-harvest handling of horticultural commodities. **Annals of Applied Biology**, v. 107, p. 581-595, 1985.

LARA, M.V. et al. Peach (*Prunus persica*) fruit response to anoxia: reversible ripening delay and biochemical changes. **Plant Cell Physiology**, v. 52, p. 392-403, 2011.

LARRIGAUDIERE, C.; LENTHERIC, I.; VENDRELL, M. Relationship between enzymatic browning and internal disorders in controlled atmosphere stored pears. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 78, p. 232-236, 1998.

LAU, O. L. Initial low oxygen stress offers no scald control benefits to 'Starkrimson Delicious' apples in 0.7 kPa O₂ storage. **Hort Science**, v. 32, p. 1239-1241, 1997.

LAU, O. L. Storage procedures, low oxygen and low carbon dioxide atmospheres on storage quality of 'Golden Delicious' apples. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v. 110, p. 541-547, 1985.

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

LÉVESQUE, P. G.; DeELL, J. R.; MURR, D. P. Sequential controlled atmosphere storage for 'Mc Intosh' apples. **HortScience**, v. 41, p. 1322-1324, 2006.

LIEBER, C. S. Metabolic effects of acetaldehyde. **Biochemical Society Transactions**, v. 16, p. 241-247, 1988.

LIMA, L.C. et al. Perda de firmeza de polpa de maçãs (*Malus domestica*, Borkh) 'Royal Gala' armazenadas sob refrigeração e atmosfera controlada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 22, p. 26-31, 2000.

LIU, Y.; HOFFMAN, N. E.; YANG, S. F. Promotion by ethylene of the capability to convert ethylene in preclimacteric tomato and cantaloupe fruits. **Plant Physiology**, v. 77, p. 407-411, 1985.

LÓPEZ, M.L. et al. Effect of different CA conditions on aroma and quality of 'Golden Delicious' apples. **Journal of Food Quality**, v. 22, p. 583-597, 1999.

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.

MATHOOKO, F. M. Regulation of respiratory metabolism in fruits and vegetables by carbon dioxide. **Postharvest Biology and Technology**, v. 9, p. 247-264, 1996.

MATTÈ, P. et al. ILOS + ULO as a practical technology for apple scald prevention. **Acta Horticulturae**, v. 682, p. 1543-1550, 2005.

MILLAR, A.H. et al. Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 62, p. 79-104, 2011.

MOSHOU, D. et al. Apple mealiness detection using fluorescence and self-organising maps. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 40, p. 103-114, 2003.

MUSTROPH, A.; ALBRECHT, G. Fermentation metabolism in roots of wheat seedlings after hypoxic pre-treatment in different anoxic incubation systems. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 394-407, 2007.

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.

NANOS, G. D.; ROMANI, R. J.; KADER, A. A. Metabolic and other responses of 'Bartlett' pear fruit and suspension-cultured 'Passe Crassane' pear fruit cells held in 0,25% O₂. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v. 117, p. 934-940, 1992.

NATH, P. et al. Role of ethylene in fruit ripening In: KHAN, N.A. (Ed.). **Ethylene Action in Plants**. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlog, 2006. p. 151-176.

OETIKER, J. H.; YANG, S. F. The role of ethylene in fruit ripening. **Acta Horticulturae**, v. 398, p. 167-178, 1995.

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, p. 1072-1079, 2011.

PEDRESCHI, R. et al. Metabolic profiling of 'Conference' pears under low oxygen stress. **Postharvest Biology and Technology**, v. 51, p. 123-130, 2009.

PERATA, P.; ALPI, A. Plant responses to anaerobiosis. **Plant Science**, v. 93, p. 1-17, 1993.

PESIS, E. et al. A simple pretreatment with low O₂ to alleviate superficial scald in Granny Smith apples. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 1836-1844, 2007.

PESIS, E. et al. Reduction of chilling injury symptoms of stored avocado fruits by prestorage treatment with high nitrogen atmosphere. **Acta Horticulturae**, v. 343, p. 252-255, 1993.

PESIS, E. et al. Short anaerobiosis period prior to cold storage alleviates bitter pit and superficial scald in Granny Smith apples. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 2114-2123, 2010.

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.

PESIS, E.; MARINANSKY, R. Carbon dioxide and ethylene production by harvested grape berries in response to acetaldehyde and ethanol. **Journal of American Society of 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.

PETRI, J. L.; LEITE, G. B.; ARGENTA, L. C. Eficácia do tratamento de AVG no controle da queda e maturação dos frutos de maçã, cultivar Imperial Gala. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, p. 239-244, 2007.

PODD, L. A.; VAN STADEN, J. Is acetaldehyde the causal agent in the retardation of carnation flower senescence by ethanol? **Journal of Plant Physiology**, v. 154, p. 351-354, 1999.

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.

POLENTA, G.; BUDDE, C.; MURRAY, R. Effect of different pre-storage anoxic treatments on ethanol and acetaldehyde content in peaches. **Postharvest Biology and Technology**, v.38, p.247-253, 2005.

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

PRASAD, N. K.; SRIVASTAVA, G. C.; PANDEY, M. Studies on mango fruit ripening with reference to superoxide dismutase and polygalacturonase enzyme activities under different storage conditions. **Journal Plant Biology**, v. 26, p. 161-164, 1999.

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.

RAO, M. et al. Active oxygen species metabolism in 'White Angel' × 'Rome Beauty' apple selection resistant and susceptible to superficial scald. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v. 123, p. 299-304, 1998.

RASMUSSEN, A. G.; GEISLER, D. A.; MÖLLER I. M. The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria. **Mitochondrion**, v. 8, p. 47-60, 2008.

RAVANEL, S. et al. The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. In: PROCEEDING OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 95., 1998. **Proceeding...** Natl. Acad. Sci. USA 95. 1998, p.7805-7812.

REEVE, R. M. Relationships of histological structure to texture of fresh and processed fruits and vegetables. **Journal of Texture Studies**, v. 1, p. 247-284, 1970.

RETAMALES, J.; CAMPOS, R. Extremely low ethylene levels in ambient air are still critical for kiwifruit storage. **Acta Horticulturae**, v. 444, p. 573-578, 1997.

RICARD, B. et al. Plant metabolism under hypoxia and anoxia. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 32, p. 1-10, 1994.

ROBERTS, J. K. M. et al. Dependence of ethanolic fermentation, cytoplasmic pH regulation, and viability on the activity of alcohol dehydrogenase in hypoxic maize root tips. **Plant Physiology**, v. 89, p. 1275-1278, 1989.

ROSENFELD, C.L., KISS, E., HRAZDINA, G. MdACS-2 (accession no.U73815) and MdACS-3 (accession no. U73186) Two new 1-aminocyclo-propane-1-carboxylate synthases in ripening apple fruits. **Plant Physiology**, v. 112, p. 1735-1736, 1996.

RUPASINGHE, H. P. V. et al. Inhibitory effect of 1-MCP on ripening and superficial scald development in 'McIntosh' and 'Delicious' apples. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 75, p. 271-276, 2000.

SABBAN-AMIN, R. et al. 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. Effect of alcohols and their interaction with ethylene on the ripening of epidermal pericarp discs of tomato fruit. **Plant Physiology**, v. 90, p. 167-174, 1989.

SALTVEIT, M. E. Respiratory metabolism. In: The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Stocks. **Agriculture Handbook**, n. 66, 2004. Disponível em: <<http://usna.usda.gov/hb66/contents.htm>>. Acesso em: 25 jan. 2012.

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.

SAQUET, A. A.; STREIF, J.; BANGERTH, F. Energy metabolism and membrane lipid alterations in relation of brown heart development in 'Conference' pears during delayed controlled atmosphere storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 30, p. 123-132, 2003.

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 and Biotechnology**, v.75, p.243-249, 2000.

SCOTT, K. J.; YUEN, C. M. C.; GHAHRAMANI, F. Ethanol vapour-a new antiscald treatment for apple. **Postharvest Biology and Technology**, v. 6, p. 201-208, 1995.

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.

SKUTNIK, M.; RYCHTER, A. M. Differential response of antioxidant systems in leaves and roots of barley subjected to anoxia and post-anoxia. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 926-937, 2009.

SMAGULA, J. M.; BRAMLAGE, W. J. Acetaldehyde accumulation: Is it a cause of physiological deterioration of fruits? **Hort Science**, v. 12, p. 200-203, 1997.

SONG, J.; BEAUDRY, R. M. Rethinking apple scald: new hypothesis on the causal reason for development of scald in apples. **Hort Science**, v.31, p.605, 1996.

STEFFENS, C. A.; GIEHL, R. F. H.; BRACKMANN, A. Maçã 'Gala' armazenada em atmosfera controlada e tratada com aminoetoxivinilglicina e ethephon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 9, p. 837-843, 2005

SUNAKO, T. et al. An allele of the ripening specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene (ACS1) in apple fruit with a long storage life. **Plant Physiology**, v. 119, p. 1297-1303, 1999.

SWEETLOVE, L. J. et al. Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. **Trends in Plant Science**, v. 15, p. 462-470, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, 4. ed. Porto Alegre : Artmed, 2009. 848 p.

TATSUKI, M.; ENDO, A., Analyses of expression patterns of ethylene receptor genes in apple (*Malus domestica* Borkh.) fruits treated with or without 1-methylcyclopropene (1-MCP). **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 75, p. 481-487, 2006.

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.

TESNIERE, C. et al. Involvement of ethylene signaling in a non-climacteric fruit: new elements regarding the regulation of ADH expression in grapevine. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 2235-2240, 2004.

TONUTTI, P. et al. Ethylene evolution and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene expression during early development and ripening in peach fruit. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v. 122, p. 642-647, 1997.

VAN DER MERVE, J. A.; COMBRINK, J. C.; CALITZ, F. J. Effect of controlled atmosphere storage after initial low oxygen stress treatment on superficial scald development on South African grown Granny smith and Topred apples. **Acta Horticulturae**, v. 600, p. 261-263, 2003.

VAN DER STRAETEN, D. et al. Tomato alcohol dehydrogenase: Expression during fruit ripening and under hypoxic conditions. **FEBS Letters**, v. 295, p. 39-42, 1991.

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.

WANG, K. L.-C.; LI, H.; ECKER, J. R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **The Plant Cell**, p.s131-s151, Supplement 2002.

WANG, Z.; DILLEY, D. R. Initial low oxygen stress controls superficial scald of apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 18, p. 201-213, 2000.

WATKINS, C. B.; NOCK, F. SmartFresh™ (1-MCP) - the good and bad as we head into the 2004 season. **New York Fruit Quarterly**, v. 12, p. 3-8, 2004.

WATKINS, C. B. Dynamic Controlled Atmosphere Storage – A New Technology for the New York Storage Industry? **New York Fruit Quarterly**, v. 16, p. 23-26, 2008.

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

WATKINS, C. B.; BARDEN, C. L.; BRAMLAGE, W. J. Relationships between α -farnesene, ethylene production and superficial scald development of apples. **Acta Horticulturae**, v. 343, p. 155-160, 1993.

WATKINS, C. B.; NOCK, J. F.; WHITAKER, B. D. Responses of early, mid and late season apple cultivars to postharvest application of 1-methylcyclopropene (1-MCP) under air and controlled atmosphere storage conditions. **Postharvest Biology and Technology**, v. 19, p. 17-32, 2000.

WEBER, A. **Aplicação de produtos da fermentação e ultrabaixo oxigênio para conservação de maçãs 'Royal Gala'**. 2010. 89f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

WIERSMA, P.A. et al. Survey of the expression of genes for ethylene synthesis and perception during maturation and ripening of 'Sunrise' and 'Golden Delicious' apple fruit. **Postharvest Biology Technology**, v. 44, p. 204-211, 2007.

WRIGHT, H. et al. 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.

WU, J. et al. Chemical compositional characterization of some apple cultivars. **Food Chemistry**, v. 103, p. 88-93, 2007.

XIA, J. H.; SAGLIO, P. H. Lactic acid efflux as a mechanism of hypoxic acclimation of maize root tips to anoxia. **Plant Physiology**, v. 100, p. 40-46, 1992.

YAMASHITA, I. Development of CA storage facilities for vegetables. **Japan Agricultural Research Quarterly- JARQ**, v. 28, p. 185-194, 1994.

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.

YEARSLEY, C. W. et al. Determination of lower oxygen limits for apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 8, p. 95-109, 1996.

YIP, W. K.; JIAO, X. Z.; YANG, S. F. Dependence of in vivo ethylene production rate on 1-aminocyclopropane -1-carboxylic acid content and oxygen concentration. **Plant Physiology**, v. 88, p. 553-558, 1988.

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. Control of apple superficial scald and ripening - a comparison between 1-methylcyclopropene and diphenylamine postharvest treatments, initial low oxygen stress and ultralow oxygen storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 27, p. 69-78, 2003.

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.

ZAREMBINSKI, T. I.; THEOLOGIS, A. Ethylene biosynthesis and action: a case of conservation. **Plant Molecular Biology**, v. 26, p. 1579-1597, 1994.