

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

**AMADURECIMENTO DE CAQUI 'FUYU' EM  
FUNÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO FRIO, ATMOSFERA  
CONTROLADA E 1-MCP**

---

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Josuel Alfredo Vilela Pinto**

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**AMADURECIMENTO DE CAQUI 'FUYU' EM FUNÇÃO DA  
EXPOSIÇÃO AO FRIO, ATMOSFERA CONTROLADA  
E 1-MCP**

---

**Por**

**Josuel Alfredo Vilela Pinto**

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

**Orientador: Prof. Dr. Auri Brackmann**

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**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

**AMADURECIMENTO DE CAQUI 'FUYU' EM FUNÇÃO DA  
EXPOSIÇÃO AO FRIO, ATMOSFERA CONTROLADA E 1-MCP**

elaborada por

**Josuel Alfredo Vilela Pinto**

como requisito para a obtenção do grau de  
**Mestre em Agronomia**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

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

---

**Adriano Arriel Saquet, Dr. (CEFET)**

---

**Cristiano André Steffens, Dr. (UDESC)**

Santa Maria, 20 de fevereiro de 2009

A minha noiva,

**Vanessa Duarte da Silva.**

DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe Anita Fátima Prá e ao meu pai Jesus Vilela Pinto (*in memorium*) pela vida, pelo exemplo de trabalho, perseverança e principalmente lealdade.

Ao professor, orientador e amigo Auri Brackmann.

Ao meu país, República Federativa do Brasil, que tenho muito orgulho.

A todos aqueles que trabalharam no Núcleo de Pesquisa em Pós-Colheita durante a minha graduação e pós-graduação.

À Universidade Federal de Santa Maria, intermediária do povo brasileiro, pela oportunidade de realizar minha Graduação e meu Mestrado de forma gratuita.

A FAPERGS e CNPq pelo apoio financeiro durante a graduação e Mestrado respectivamente.

**OBRIGADO.**

## RESUMO

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

### AMADURECIMENTO DE CAQUI 'FUYU' EM FUNÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO FRIO, ATMOSFERA CONTROLADA E 1-MCP

AUTOR: Josuel Alfredo Vilela Pinto

ORIENTADOR: Prof. Dr. Auri Brackmann

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 20 de fevereiro de 2009

Objetivando compreender o processo de amadurecimento do caqui 'Fuyu' e prolongar o armazenamento foram conduzidos experimentos para avaliar o efeito do período de exposição à baixa temperatura, atmosfera controlada e aplicação de inibidor da ação do etileno em dois momentos, no início e no final do armazenamento, sobre o amolecimento, analisados visualmente. No primeiro experimento avaliou-se: [1] 3 dias na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$ ; [2] 6 dias na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$ ; [3] 9 dias na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$ ; [4] 6 dias na temperatura de  $10^{\circ}\text{C}$ ; [5] 9 dias na temperatura de  $10^{\circ}\text{C}$ ; [6] 15 dias na temperatura de  $10^{\circ}\text{C}$ ; [7] 9 dias na temperatura de  $15^{\circ}\text{C}$  e [8] 15 dias na temperatura de  $15^{\circ}\text{C}$ . No segundo experimento, os tratamentos foram originados da combinação de temperaturas ( $-0,5$ ;  $10$ ;  $12,5$ ;  $15$  e  $17,5^{\circ}\text{C}$ ) com e sem aplicação de 1-metilciclopropeno (1-MCP), antes do armazenamento. As análises laboratoriais foram realizadas após 1 e 2 meses de armazenamento. No terceiro experimento, na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$  foram avaliados os seguintes tratamentos: [1] AR; [2] aplicação de 1ppm de 1-MCP durante 24h e posterior AR; [3] AR e posterior aplicação de 1ppm de 1-MCP durante 24h; [4] atmosfera controlada (AC) com  $1,0\text{kPa}$  de  $\text{O}_2$  +  $8,0\text{kPa}$  de  $\text{CO}_2$ ; [5] aplicação de 1ppm de 1-MCP 24h e posterior armazenamento em AC; [6] armazenamento em AC e posterior aplicação de 1ppm de 1-MCP. As análises laboratoriais foram realizadas após 2 meses nos frutos armazenados em AR e após 4 meses nos frutos armazenados em AC. Segundo os resultados dos experimentos, o período de 9 dias na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$  não fornece frio suficiente para estimular o processo de maturação do caqui, não alterando a produção de etileno, a respiração e o amolecimento dos frutos em relação a  $15^{\circ}\text{C}$ . O armazenamento de caqui por um mês na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$  é suficiente para estimular o processo de maturação, com 100% dos frutos amolecidos aos 6 dias de exposição a  $20^{\circ}\text{C}$ . Já, o armazenamento por dois meses na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$  torna 100% dos frutos amolecidos aos 4 dias de exposição a  $20^{\circ}\text{C}$ . As temperaturas de  $10$ ;  $12,5$  e  $15^{\circ}\text{C}$  ocasionam amolecimento dos frutos durante o armazenamento, o que indica que essas temperaturas por longo período de tempo também são eficientes no desbloqueio da maturação. O amolecimento tem relação com a ação do etileno e, mais provavelmente, com o seu receptor. A aplicação de 1-MCP, antes ou após o armazenamento, bloqueia o processo de maturação, mesmo em frutos expostos ao frio de  $-0,5^{\circ}\text{C}$ , evitando o amolecimento do caqui após exposição a  $20^{\circ}\text{C}$ . A atmosfera controlada retardou o amolecimento, sendo que a condição de AC de  $1,0\text{kPa}$  de  $\text{O}_2$  +  $8,0\text{kPa}$  de  $\text{CO}_2$  com aplicação de 1-MCP foi a condição mais eficiente no controle da maturação, mas ocorreu alta incidência de podridão após 4 meses de armazenamento.

Palavras-chave: *Diospyros kaki* Thumb.; armazenamento; 1-metilciclopropeno; amolecimento

## ABSTRACT

Master's Dissertation  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### RIPENING OF 'FUYU' PERSIMMON A FUNCTION OF EXPOSURE TO COLD, CONTROLLED ATMOSPHERE AND 1-MCP

AUTHOR: Josuel Alfredo Vilela Pinto  
ADVISER: Prof. Dr. Auri Brackmann  
Santa Maria, february 20<sup>th</sup>, 2009

Aiming to understand the mechanism of ripening of the 'Fuyu' persimmon and extend the storage period, experiments were performed to evaluate the effect of the period of exposure to low temperature, controlled atmosphere and inhibitor the ethylene action in the beginning or in the end of storage period on the incidence of softening. In the first experiment following treatments were evaluated: [1] 3 days at -0.5°C; [2] 6 days at -0.5°C; [3] 9 days at -0.5°C; [4] 6 days at 10°C; [5] 9 days at 10°C; [6] 15 days at 10°C; [7] 9 days at 15°C and [8] 15 days at 15°C. In the second experiment treatments were obtained by combining the temperature (-0.5; 10; 12.5; 15 e 17.5°C) with and without application of 1-methylcyclopropene (1-MCP), before storage. The laboratory tests were performed after 1 and 2 months storage. In the third experiment at -0.5°C were evaluated the treatments: [1] cold storage (CS), [2] application of 1ppm of 1-MCP and subsequent CS, [3] CS and subsequent application of 1-MCP, [4] controlled atmosphere (CA) with 1.0kPa O<sub>2</sub> + 8.0kPa CO<sub>2</sub>, [5] application of 1-MCP and subsequent storage in CA, [6] CA storage and subsequent application of 1-MCP. The laboratory tests were performed after 2 months in fruits storage in CS and after 4 months in fruits storage in CA. According to the results of the experiments the period of 9 days at -0.5°C does not provide sufficient cooling to stimulate the maturation process of persimmon, do not altering the production of ethylene, respiration and softening of the fruit when compared with 15°C. The storage of 'Fuyu' persimmon for one month at -0.5°C is sufficient to stimulate the maturation process, with 100% fruit softened after 6 days at 20°C. Already, storage for two months at -0.5°C accelerates the maturation process and leaving 100% fruit soft after 4 days at 20°C. At the temperatures of 10, 12.5 and 15°C occurred softening of fruit during storage, showing that these temperatures for long periods, are also efficient in the unlock process of maturation. The softening is related with the ethylene action and probably with its receptor. The application of 1-MCP before or after storage block the maturation process even in fruit exposed at -0.5°C, not occurring softening after exposure at 20°C. Controlled atmosphere delayed the softening. CA condition with 1.0kPa O<sub>2</sub> + 8.0kPa CO<sub>2</sub> with application of 1-MCP was the most efficient treatment to control the maturation, but occurred high incidence of decay after 4 months storage of 'Fuyu' persimmon.

Key words: *Diospyros kaki* Thumb.; storage; 1-methylcyclopropene; softening

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Ciclo de Yang e a rota de biossíntese do etileno.....	21
FIGURA 2: Modelo de sinalização do etileno em Arabidopsis.....	27
FIGURA 3: Mecanismo de ligação do etileno em seu sítio receptor (A) e ligação do 1-MCP no sítio receptor do etileno (B).....	28
FIGURA 4: Amolecimento (A) e Produção de etileno (B) em caqui 'Fuyu' após dois meses de armazenamento refrigerado na temperatura de -0,5°C mais seis dias de exposição a 20°C. Santa Maria, RS. 2007.....	63
FIGURA 5: Respiração (A) e atividade da ACC oxidase (B) em caqui 'Fuyu' após dois meses de armazenamento refrigerado na temperatura de -0,5°C mais seis dias de exposição a 20°C. Santa Maria, RS. 2007.....	64
FIGURA 6: Podridão (A) e escurecimento da casca (B) em caqui 'Fuyu' após dois meses de armazenamento refrigerado na temperatura de -0,5°C mais seis dias de exposição a 20°C. Santa Maria, RS. 2007.....	65
FIGURA 7: Firmeza de polpa (A), Acidez Titulável (B) e Sólidos Solúveis Totais (C) em caqui 'Fuyu' após dois meses de armazenamento refrigerado na temperatura de -0,5°C mais seis dias de exposição a 20°C. Santa Maria, RS. 2007.....	65
FIGURA 8: Amolecimento (A) e Produção de etileno (B) em caqui 'Fuyu' após quatro meses de armazenamento em atmosfera controlada (1,0kPa de O <sub>2</sub> mais 8,0kPa de CO <sub>2</sub> ) na temperatura de -0,5°C mais seis dias de exposição a 20°C. Santa Maria, RS. 2007.....	67
FIGURA 9: Respiração (A) e atividade da ACC oxidase (B) em caqui 'Fuyu' após quatro meses de armazenamento em atmosfera controlada (1,0kPa de O <sub>2</sub> mais 8,0kPa de CO <sub>2</sub> ) na temperatura de -0,5°C mais seis dias de exposição a 20°C. Santa Maria, RS. 2007 .....	68



FIGURA 10: Podridão (A) e escurecimento da casca (B) em caqui ‘Fuyu’ após quatro meses de armazenamento em atmosfera controlada (1,0kPa de O<sub>2</sub> mais 8,0kPa de CO<sub>2</sub>) na temperatura de -0,5°C mais seis dias de exposição a 20°C. Santa Maria, RS. 2007..... 68

FIGURA 11: Firmeza de polpa (A), Acidez Titulável (B) e Sólidos Solúveis Totais (C) em caqui ‘Fuyu’ após quatro meses de armazenamento em atmosfera controlada (1,0kPa de O<sub>2</sub> mais 8,0kPa de CO<sub>2</sub>) na temperatura de -0,5°C mais seis dias de exposição a 20°C. Santa Maria, RS. 2007..... 69

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Número de dias a 20°C para ocorrer amolecimento em caqui ‘Fuyu’ após o armazenamento refrigerado. Santa Maria, RS. 2006.....	50
TABELA 2- Respiração ( $\text{mlCO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) em caqui ‘Fuyu’ após o armazenamento e durante a exposição a 20°C. Santa Maria, RS. 2006.....	52
TABELA 3- Etileno ( $\mu\text{LC}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) em caqui ‘Fuyu’ após o armazenamento e durante a exposição a 20°C. Santa Maria, RS. 2006.....	52
TABELA 4- Índice de amolecimento (0-3) em caqui ‘Fuyu’ após um mês de armazenamento refrigerado. Santa Maria, RS. 2007.....	54
TABELA 5- Produção de etileno ( $\mu\text{LC}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) em caqui ‘Fuyu’ após um mês de armazenamento refrigerado. Santa Maria, RS. 2007.....	55
TABELA 6- Respiração ( $\text{mlCO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) em caqui ‘Fuyu’ após um mês de armazenamento refrigerado. Santa Maria, RS. 2007.....	55
TABELA 7- Porcentagem de podridão em caqui ‘Fuyu’ após um mês de armazenamento refrigerado. Santa Maria, RS, 2007.....	56
TABELA 8- Índice de escurecimento (0-4) em caqui ‘Fuyu’ após um mês de armazenamento refrigerado. Santa Maria, RS. 2007.....	57
TABELA 9- Índice de amolecimento (0-3) em caqui ‘Fuyu’ após dois meses de armazenamento refrigerado. Santa Maria, RS. 2007.....	58
TABELA 10- Produção de etileno ( $\mu\text{LC}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) em caqui ‘Fuyu’ após dois meses de armazenamento refrigerado. Santa Maria, RS, 2007.....	59
TABELA 11- Respiração ( $\text{mlCO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) em caqui ‘Fuyu’ após dois meses de armazenamento refrigerado. Santa Maria, RS, 2007.....	60

TABELA 12- Porcentagem de podridão em caqui 'Fuyu' após dois meses de armazenamento refrigerado. Santa Maria, RS, 2007..... 61

TABELA 13- Índice de escurecimento (0-4) em caqui 'Fuyu' após um mês de armazenamento refrigerado. Santa Maria, RS, 2007..... 61

## LISTA DE SIGLAS

1-ECP	1- etilciclopropeno
1-MCP	1-metilciclopropeno
1-PCP	1-propilciclopropeno
AC	Atmosfera Controlada
ACC	Ácido 1- aminociclopropano-1-carboxílico
AdoMet	S-adenosilmetionina
AdoMet-sintetase	Metionina Adenosiltransferase
AR	Armazenamento Refrigerado
ATP	Adenosina Trifosfato
AVG	Aminoetoxivinilglicina
DMS	Diferença Mínima Sigificativa
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EGases	Endo-1,4- $\beta$ -Glucanase
EIN2	Proteína Transmenbrana
EIN3	Fatores de Trancrição
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ETR1, ETR2, ETS2 e EIN4	Receptores de etileno de Arabidopsis
ETR1	Etileno Resistente 1
HGA	Homogalacturonanos
IDH	Isocitrato Desidrogenase
MACC	Ácido 1-(malonilamino)Ciclopropano-1-Carboxílico
MES	Ácido 2(N-morfolino)etanossulfônico
MTA	5'-metiltioadenosina
MTR	5'-metiltioribose
PFK	Fosfrutoquinases ATP-dependentes
PFP	Fosfrutoquinases PPi- dependentes
PG	Poligalacturonases
PME	Pectina Metilesterases
PPO	Polifenol Oxidase
PSA	Pressure Swing Adsorption
RG-I	Ramnogalacturonano I
RNA	Ácido Ribonucléico

SAM

S-adenosilmetionina

SST

Sólidos Solúveis Totais

TCA

Ácidos Tricarboxílicos

XET

Xiloglucano Endotransglicosilase

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 DESENVOLVIMENTO DO CAQUI.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 ELONGAÇÃO E MATURAÇÃO CELULAR.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3 AMADURECIMENTO.....</b>	<b>19</b>
2.3.1 <i>Etileno.....</i>	19
2.3.1.1 <i>Biossíntese de etileno .....</i>	20
2.3.1.2 <i>Inibição da síntese de etileno .....</i>	24
2.3.1.3 <i>Modo de ação celular e molecular do etileno .....</i>	24
2.3.2 <i>Fisiologia das alterações da firmeza de polpa.....</i>	30
2.3.2.1 <i>Firmeza de polpa de frutos e alterações da firmeza durante o amadurecimento .....</i>	30
2.3.2.2 <i>Parede celular: Breve revisão sobre estrutura e função.....</i>	31
2.3.2.2.1 <i>Composição .....</i>	31
2.3.2.2.2 <i>Interações entre os polímeros .....</i>	31
2.3.2.3 <i>Metabolismo da parede celular durante o amadurecimento.....</i>	32
2.3.2.3.1 <i>Alterações na parede celular durante o amadurecimento .....</i>	32
2.3.2.3.2 <i>Enzimas que atuam sobre a rede celulose-xiloglucana .....</i>	32
2.3.2.3.3 <i>Enzimas que atuam sobre a rede de pectinas.....</i>	33
2.3.3 <i>Processo respiratório .....</i>	35
2.3.4 <i>Acidez .....</i>	37
2.3.5 <i>Sólidos solúveis totais (SST).....</i>	37
<b>2.4 FORMAS DE ARMAZENAMENTO.....</b>	<b>38</b>
2.4.1 <i>Armazenamento em ambiente refrigerado (AR).....</i>	38
2.4.2 <i>Armazenamento em ambiente refrigerado e com atmosfera controlada (AC).....</i>	39
2.4.2.1 <i>Implicação no sistema respiratório.....</i>	40
2.4.2.2 <i>Implicação na síntese e ação do etileno.....</i>	41
2.4.3 <i>Distúrbio fisiológico devido o armazenamento refrigerado .....</i>	42
2.4.3.1 <i>Escurecimento da casca .....</i>	42
2.4.3.2 <i>Amolecimento .....</i>	43

<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
<b>3.1 MATERIAL VEGETAL E PREPARO DAS AMOSTRAS</b> .....	<b>44</b>
<b>3.2 DESCRIÇÃO DOS EXPERIMENTOS</b> .....	<b>45</b>
3.2.1 <i>Experimento I</i> .....	45
3.2.2 <i>Experimento II</i> .....	45
3.2.3 <i>Experimento III</i> .....	45
<b>3.3 MANUTENÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO</b> .....	<b>46</b>
<b>3.4 PARÂMETROS AVALIADOS</b> .....	<b>47</b>
<b>3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b> .....	<b>48</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>4.1 EXPERIMENTO I</b> .....	<b>49</b>
4.1.1 <i>Influência da temperatura e do período de armazenamento sobre o amolecimento de caquis 'Fuyu'</i> .....	49
4.1.2 <i>Conclusões</i> .....	51
<b>4.2 EXPERIMENTO II</b> .....	<b>53</b>
4.2.1 <i>Ação do etileno, em diferentes temperaturas, após um mês de armazenamento refrigerado, em caqui 'Fuyu'</i> .....	53
4.2.2 <i>Ação do etileno, em diferentes temperaturas, após dois meses de armazenamento refrigerado, em caqui 'Fuyu'</i> .....	57
4.2.3 <i>Conclusões</i> .....	62
<b>4.3 EXPERIMENTO III</b> .....	<b>62</b>
4.3.1 <i>A ação do etileno, antes e após o armazenamento refrigerada por dois meses, na ocorrência do amolecimento em caquis 'Fuyu'</i> .....	62
4.3.2 <i>A ação do etileno, antes e após o armazenamento em atmosfera controlada por quatro meses, na ocorrência do amolecimento em caquis 'Fuyu'</i> .....	66
4.3.3 <i>Conclusões</i> .....	70
<b>5 BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>70</b>

# 1 INTRODUÇÃO

O Rio Grande do Sul é o segundo maior produtor brasileiro de caqui. A produção gaúcha baseia-se em duas cultivares: Fuyu e Quioto. A cultivar Fuyu é originária do Japão, onde ainda é a principal variedade em exploração. Seus frutos são grandes, globoso-achatados, com polpa amarela-avermelhada não taninosa, sem sementes, pois frutifica bem partenocarpicamente. Produz apenas flores femininas que, se polinizadas por outra variedade, produzirá sementes. Sua colheita vai do final de março a fins de maio (Martins; Pereira,1989).

Durante o período de colheita, das 15.000 toneladas de caqui (EMATER/RS), no Rio Grande do Sul, ocorre uma oferta do produto acima da capacidade de consumo do mercado. Em função disso, torna-se necessário o armazenamento refrigerado (AR) ou atmosfera controlada (AC), para a manutenção da qualidade do caqui, e ainda, permitir uma logística de venda para o mercado interno ou exportação. No entanto, mesmo utilizando AC ou AR ocorrem grandes perdas devido o amolecimento do fruto, deixando-os com sabor e aroma pouco pronunciados e ausência de suculência (polpa geleificada).

Na fase de maturação fisiológica, os frutos adquirem a capacidade de produção autocatalítica de etileno, o qual está associado ao processo de amadurecimento (Burg ; Burg, 1962). Esta função de promover o amadurecimento, induz o amolecimento, que é indesejável quando se quer armazenar caquis por longos períodos e tem comprometido a expansão da cultura do caquizeiro. Conforme Donazzolo (2001), o caqui 'Fuyu', após 3 meses de armazenamento na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$ , apresenta intenso metabolismo quando exposto à  $20^{\circ}\text{C}$ , acarretando o rápido amolecimento. Dessa forma, o controle do metabolismo é a chave para controlar o amadurecimento e prolongar o período de armazenamento dos frutos.

A cultivar Fuyu é suscetível à ocorrência do amolecimento, principalmente após um período a  $-0,5^{\circ}\text{C}$  e exposição por dois dias a  $20^{\circ}\text{C}$ . O aparecimento desse distúrbio fisiológico tem sido associado a enzimas mediadoras da hidrólise e da degradação da parede celular. A hemicelulose e a pectina podem ser modificadas e quebradas por uma variedade de enzimas encontradas naturalmente na parede da célula. Glucanases e enzimas afins podem hidrolisar a estrutura básica de hemiceluloses. Xilosidases e enzimas relacionadas podem remover as ramificações laterais da estrutura básica de xiloglucano. Transglicosilases podem cortar e ligar hemiceluloses. Essas mudanças enzimáticas podem alterar as propriedades físicas da parede, acarretando em altos níveis de pectina metil esterase, que hidrolisa os ésteres de metil de pectinases. Essa hidrólise torna a pectina mais suscetível à hidrólise subsequente por



pectinas e enzimas afins, formando os pectatos de cálcio. Nos pectatos de cálcio, fica retida a água presente no citoplasma formando o aspecto gelatinoso do dano pelo frio.

A condição pouco investigada é o controle do amolecimento durante a comercialização. Em algumas situações, observa-se um elevado grau de ocorrência do dano após a exposição dos frutos à temperatura ambiente. Assim, a armazenagem durante 3 a 4 meses sob refrigeração e/ou atmosfera controlada somente é rentável quando consegue-se pelo menos 5 dias de exposição a 20°C (NAKANO et al., 2003).

A utilização de armazenamento refrigerado ou atmosfera controlada e a aplicação de inibidores da síntese e ação do etileno diminuem a velocidade do amolecimento durante o armazenamento, por atuarem sobre a atividade das pectinases e precursores do etileno (ARGENTA, 2006). Entretanto, o efeito dessas técnicas sobre um possível controle do amadurecimento caracterizado pelo amolecimento após a exposição a 20°C, ainda não foi avaliado. Da mesma forma, existem poucos trabalhos avaliando a produção de etileno e perda de firmeza, fatores reconhecidamente afetados em condições de baixas temperaturas e relacionados diretamente ao desenvolvimento do amolecimento, durante diferentes períodos de exposição à temperatura ambiente. O estudo desses aspectos pode ser importante para a avaliação do potencial de armazenamento do caqui 'Fuyu', estabelecendo-se os períodos máximos de armazenamento, de forma a minimizar as perdas em pós-colheita.

Assim, as **hipóteses** dos trabalhos foram: 1) a exposição ao frio desbloqueia o sistema de inibição do processo de amadurecimento? 2) o dano por frio varia com a temperatura e o tempo de armazenamento? 3) há um atraso no amadurecimento e, conseqüentemente, no amolecimento com atmosfera controlada e aplicação de inibidor da ação do etileno? 4) ocorre sinergismo da atmosfera controlada e inibidor da ação do etileno no atraso do amadurecimento? 5) ao controlar o amolecimento é possível armazenar caqui 'Fuyu' por longos períodos?

Diante disso, os **objetivos** dos trabalhos foram: 1) Analisar a ocorrência e o desenvolvimento do amolecimento em caquis 'Fuyu', avaliando as temperaturas de ocorrência desse distúrbio fisiológico, durante a exposição dos frutos à temperatura ambiente, depois do armazenamento sob baixa temperatura por diferentes períodos; 2) Observar o efeito da atmosfera controlada e do inibidor da ação do etileno sobre a incidência do amolecimento; 3) Avaliar o efeito da atmosfera controlada e de inibidores da ação do etileno sobre a atividade da enzima formadora do etileno.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Desenvolvimento do caqui

De acordo com Mowat ; George (1994), o crescimento do fruto do caquizeiro (*Diospyros kaki* Thumb) exibe uma curva do tipo sigmoidal duplo, estando subdividida em dois estágios de intensa atividade, os estágios I e III, intercalada por um estágio de pouca atividade, o estágio II. O Estágio I está associado aos processos de divisão e diferenciação celular com duração média de 60 a 100 dias. O significado do estágio II, cuja duração varia de 20 a 40 dias, é ainda incerto e parece refletir fatores de influência genética, fisiológica e ambiental, responsáveis pela finalização do estágio I e início do estágio III. Durante o estágio III, cuja duração varia de 40 a 50 dias, ocorrem os processos de **elongação** e **maturação** celular.

### 2.2 Elongação e maturação celular

O processo de divisão celular ocorre até que o fruto seja completamente formado, nessa fase o número total de células é estabelecido. Assim, para que o fruto aumente de tamanho é necessário que as células comecem uma **elongação**. Na fase de elongação, o fruto é suprido basicamente por carboidratos via floema. Após a etapa de elongação, começa o processo de **maturação** celular.

A etapa de maturação fisiológica celular, em caqui, se caracteriza por diversas modificações metabólicas. As principais modificações metabólicas na célula são: a) conversão do amido em açúcar; b) produção de compostos voláteis; c) alteração na síntese de carotenóides e d) atuação de enzimas capazes de degradar a parede celular. Essas modificações em nível celular são observadas em frutos com cor, flavor e textura adequadas ao consumo e nessa fase que ocorre a colheita (KRAMMES, 2007).

O caqui é um fruto climatérico e sua maturação ocorre em duas fases distintas. A primeira fase é denominada de maturação fisiológica (“maturation”), em que o fruto continua o processo de maturação após destacado da planta e, normalmente, é o ponto apropriado para se fazer à colheita. A segunda fase é chamada de maturação de consumo ou **amadurecimento** (“ripening”) e nessa etapa que completa a maturação, tornando o fruto apto ao consumo.

## 2.3 Amadurecimento

O processo de amadurecimento deixa o fruto mais atrativo e palatável, através de mudanças complexas que são controlados geneticamente. No amadurecimento ocorrem reações de síntese e degradação, sendo a energia liberada é utilizada para várias atividades fisiológicas e para a manutenção da integridade celular. A energia é suprida por alguns processos degradativos, particularmente a hidrólise do amido. Devido a esse papel, o amadurecimento tem chamado muita atenção da comunidade científica nos últimos anos. Os estudos têm sido focados principalmente no metabolismo do hormônio gasoso **etileno** e da **parede celular**.

### 2.3.1 Etileno

O hormônio gasoso etileno tem um importante papel na regulação do amadurecimento e senescência. Os frutos são classificados em climatérico e não-climatérico baseado no comportamento da respiração e produção de etileno durante a maturação e amadurecimento (BIALE; YONG, 1964). Frutos do caquizeiro são classificados como climatéricos apesar de produzir pouco etileno, mas, aumenta significativamente durante o amadurecimento e também tem a produção autocatalítica induzida pela aplicação exógena de etileno. Embora, diferentes de outros frutos climatéricos, a produção de etileno em caqui é substancialmente maior em frutos colhidos em estágios jovens (NAKANO et al., 2003). O etileno pode ser produzido em quase todas as partes dos vegetais superiores. Sendo a mais simples olefina conhecida (seu peso molecular é 28), apresentando-se mais leve que o ar sob condições fisiológicas. Este fitohormônio é facilmente liberado dos tecidos e se difunde como gás através dos espaços intercelulares para o exterior do tecido. É inflamável e rapidamente sofre oxidação, podendo ser oxidado a óxido de etileno e ser hidrolisado a etileno glicol. Em muitos tecidos vegetais, o etileno pode ser completamente oxidado a CO<sub>2</sub>. A concentração do etileno de 1μL/L na fase gasosa, a 25°C, corresponde à concentração de 4,4 x 10<sup>-9</sup>M do etileno na água.

### 2.3.1.1 *Biossíntese de etileno*

Os estudos do etileno foram iniciados por Kidd e West na década de 20. Já, nos anos 80 os pesquisadores Yang e Hoffman comprovaram a rota de biossíntese do etileno tendo como precursor inicial a metionina. Hoje, a rota de biossíntese do etileno é conhecida com riqueza de detalhes, com identificação e isolamento das enzimas-chave. A obtenção desses conhecimentos tem possibilitado a caracterização genética e a análise em nível molecular, dos acontecimentos do amadurecimento, vindo a somar para o entendimento da complexidade desse processo (amadurecimento). Com o progresso da biologia molecular, o amadurecimento vem sendo considerado um evento geneticamente programado que envolve a regulação da expressão de genes específicos.

Os tecidos vegetais convertem o 1-[<sup>14</sup>C] metionina em [<sup>14</sup>C] etileno sendo derivado dos carbonos 3 e 4 da metionina. A L-metionina é convertida a S-adenosilmetionina (AdoMet ou SAM). A molécula do AdoMet é cindida em duas partes. O primeiro grupo CH<sub>3</sub>S é reciclado e regenera a L-metionina pelo ciclo de Yang, sem tal reciclagem, a quantidade de enxofre reduzido iria limitar a disponibilidade de metionina e a síntese do etileno. O segundo grupo é convertido a Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), o qual na presença de oxigênio forma o etileno. Assim, o suprimento de ACC limita a síntese de etileno.

As enzimas que catalisam as reações na biossíntese de etileno são a AdoMet sintetase (Metionina adenosiltransferase ou ATP:metionina S-adenosiltransferase ou SAM-sintetase, EC 2.5.1.6), S-adenosil-L-metionina metiltioadenosina-liase (ACC sintase, EC 4.4.1.14) e 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC oxidase, EC 1.4.3) (Figura 1). A ACC sintase é a enzima limitante para a biossíntese do etileno nos tecidos vegetais e, em conjunto com a ACC oxidase, contribui para a regulação da biossíntese do etileno no amadurecimento de fruto.

As etapas de biossíntese de etileno estão ilustradas na Figura 1. Inicialmente ocorre a conversão da metionina à S-adenosil metionina (SAM), mas, apenas quando tem a presença de ATP e Mg<sup>+</sup>, esse passo foi descrito por Yang; Hoffman (1984) e confirmada por Lelièvre et al. (1997). Yang; Hoffman (1984), após diversas pesquisas, constataram que o teor de SAM nos tecidos se mantinha constante, apesar de inibir ou estimular a produção de ACC. O SAM tem outra função que é ser um precursor da biossíntese de poliaminas espermidina e espermina através da sua descarboxilação (TABOR; TABOR, 1984) e fornecimento do radical metil (RAVANEL et al, 1998).

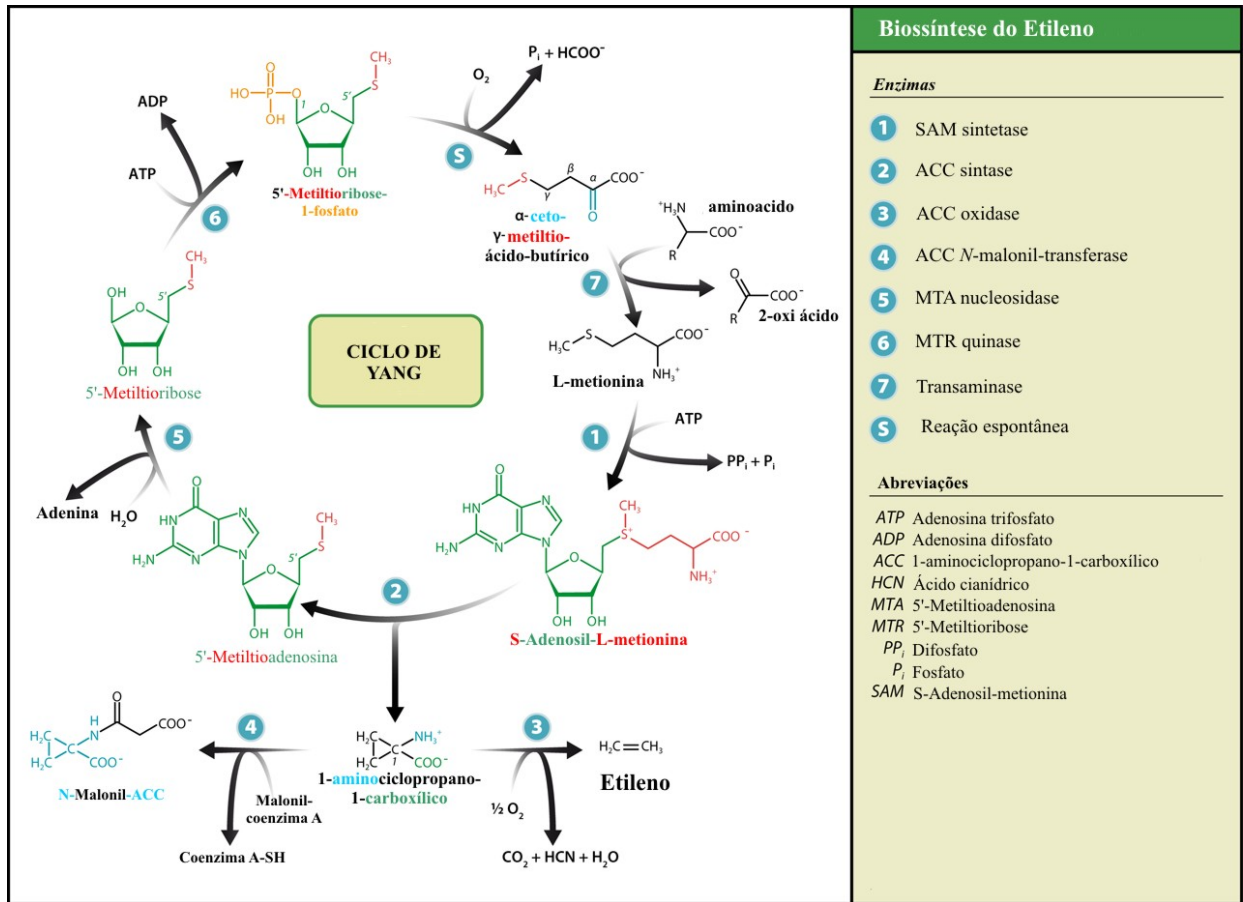


FIGURA 1: Ciclo de Yang e a rota de biossíntese de etileno. Adaptado Bleecker ; Kende (2000).

Após a formação da SAM, a enzima citosólica ACC sintase que utiliza apenas SAM como substrato e a converte em ACC, essa reação ocorre em pH ótimo de 8,5. Ao mesmo tempo em que é produzido o ACC a ação da ACC sintase sobre a SAM produz também 5'-metiltioadenosina (MTA) (MIYAZAKI; YANG, 1987), mas, este não fica acumulado nos tecidos, pois, rapidamente é hidrolisado pela enzima 5'-metiltioribose (MTR) (YU et al., 1979). Decorrida a formação da ACC, a próxima etapa depende da ACC oxidase para formar o etileno, CO<sub>2</sub>, cianeto (HCN) e água (YANG; HOFFMAN, 1984; KENDE, 1993). O ACC pode ser transformado, em um processo de malonização, a ácido 1-(malonilamino)ciclopropano-1-carboxílico (MAcc) numa reação irreversível (YANG; HOFFMAN, 1984). O processo de malonização do ACC pode estar envolvido com a autoinibição da biossíntese do etileno, e contribuir para a regulação dos níveis de ACC no tecido e na taxa de síntese do etileno (LIU et al., 1985).

**ACC sintase** - A obtenção da ACC é uma etapa crucial e aparentemente limitante na rota de biossíntese do etileno (YANG; HOFFMAN, 1984), pois, é induzida por vários

estímulos e regula a produção de etileno no decorrer do desenvolvimento do fruto (KENDE, 1993). Para formar ACC, o composto SAM é convertido, pela ação da ACC sintase. Essa enzima tem um  $K_m$  estimado entre  $13\mu\text{M}$  e  $20\mu\text{M}$  (BOLLER et al., 1979; KENDE, 1989) e pertence a um grupo de enzimas que dependem do co-fator piridoxal-5'-fosfato (BOLLER et al., 1979; YU et al., 1979). Assim, a atividade da ACC sintase pode ser muito afetada por inibidores de enzimas dependentes de piridoxal (YANG; HOFFMAN, 1984). Todos os estudos realizados com ACC sintase têm encontrado várias isoformas. Assim, a ACC sintase era cogitada como monomérica ou heteromérica, ou seja, com uma ou várias isoformas (KENDE, 1993), no entanto, White et al. (1994) afirmaram que a ACC sintase é uma proteína homodimérica, sendo o sítio ativo localizado, numa fissura entre os dois domínios (superior e inferior) que a compõe (CAPITANI, 1999). Mas, a ACC sintase na forma ativa é um dímero (TARUN; THEOLOGIS, 1998). Kende (1993) constatou e identificou vários genes que codificam a enzima ACC sintase em diferentes espécies vegetais. Os diversos genes de ACC sintase na mesma espécie vegetal são expressados e regulados de acordo com o estímulo e o estágio de desenvolvimento (KENDE, 1989; VAN DER STRAETEN et al., 1990; KENDE, 1993; LLOP-TOUS et al., 2000) e também o tipo de tecido que as células estão formando (HUANG et al., 1991), sendo que a expressão destes genes pode ser regulada em nível de transcrição e em nível de pós-transcrição (FELIX et al., 1991). Em caqui, Nakano et al. (2003), identificaram uma família multigênica que codifica três genes de ACC sintase (ACC sintase 1, ACC sintase 2 e ACC sintase 3), onde cada membro é regulado de forma diferente, ou por ação do desenvolvimento ou pelo etileno, auxinas e os estresses externos (frio, injúria,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  e etc.). Assim, o controle da biossíntese do etileno tem que levar em conta, como ACC sintase é ativada ou inibida. Os processos dependentes de ATP e/ou fosforilação, afetam a inibição ou degradação da ACC sintase (SPANU et al., 1990).

**ACC oxidase** – Decorrido a síntese da ACC, o próximo passo é sua oxidação para formar etileno (Figura 1). A enzima responsável pela catalização do processo de oxidação da ACC para etileno é a ACC oxidase, a qual, antigamente foi chamada de enzima formadora do etileno (EFE) (YANG; HOFFMAN, 1984; KENDE, 1993). A enzima ACC oxidase apresenta-se na forma monomérica (DONG et al., 1992), tem um  $K_m$  de  $60\mu\text{M}$  para ACC (SMITH et al., 1992) e sua máxima atividade é em pH entre 6,5 e 7,5 (SMITH et al., 1992). Com progresso das pesquisas, Yip et al. (1988) constataram que o  $\text{O}_2$  é um co-substrato da enzima ACC oxidase. Anos após, Kende (1993) afirmou, após diversos estudos, que a ACC oxidase depende de cofatores entre os quais  $\text{Fe}^{2+}$  e ascorbato. Peiser et al. (1984) conseguiram demonstrar que a ACC oxidase produz cianeto (HCN) e  $\text{CO}_2$  além do etileno. Embasados na

afirmação de Peiser et al. (1984), Dong (1992) formou a estequiometria da obtenção do etileno através da transformação da ACC pela ACC oxidase. Resumidamente a estequiometria apresenta: uma molécula de etileno ( $C_2H_4$ ), uma de dióxido de carbono ( $CO_2$ ), uma de cianeto (HCN), dehidroascorbato e duas moléculas de água ( $H_2O$ ). Além dos compostos formados pela ação da ACC oxidase, necessita-se saber a localização em nível celular desta enzima. Uma resposta definitiva da localização da ACC oxidase em nível celular ainda não existe. No entanto, vários experimentos têm sido realizados para entender a exata localização da ACC oxidase. O conhecimento atual da localização celular da ACC oxidase, provém, em grande parte dos trabalhos realizados por Bouzayen et al. (1989) e Rombaldi et al. (1994). Estes autores identificaram atividade da ACC oxidase na parede celular e também no citosol. Mas, Dong et al. (1992) conseguiram extrair ACC oxidase na forma solúvel, indicando ser uma enzima presente no citosol. Outra característica da ACC oxidase é que sua seqüência de aminoácidos que formam a proteína apresenta caráter hidrofóbico, indicando, de certa forma, estar associada à membrana plasmática (KENDE, 1993). Em nível molecular, Kende (1993) encontrou vários clones de possíveis genes que codificam a ACC oxidase. Em caqui, Nakano et al. (2003) estudaram dois fragmentos de DNA citoplasmático para a ACC oxidase e constataram que a regulação dessa enzima ocorre na transcrição.

**Reciclagem do enxofre: Ciclo de Yang** – O grupo  $CH_3S$ -adenosina da metionina é reciclado, processo descrito pelo ciclo de Yang (Figura 1). Sem tal reciclagem, a quantidade de enxofre reduzida iria limitar a disponibilidade de metionina e a síntese de etileno. A ciclagem da metionina inicia quando a S-adenosilmetionina recebe a ação da ACC sintase e forma ACC e 5'-metiltioadenosina (MTA) (Figura 1). A MTA é catalizada pela MTA nucleosidase ocasionando a liberação de uma molécula de adenina e formando 5'-metiotioribose (MTR). MTR tem a ação da MTR quinase mais ATP formando a 5'-metiltioribose-1-fosfato. O composto 5'-metiltioribose-1-fosfato através de uma reação espontânea com oxigênio libera  $Pi+HCOO^-$  e forma  $\alpha$ -ceto- $\gamma$ -metiltio-ácido-butírico. Esta substância tem a ação de uma transaminase onde o aminoácido recebe o radical enxofrado culminando na formação de 2-oxi ácido e por fim L-metionina.

**Malonização da ACC** – A conjugação da ACC através do processo da malonização é considerado um passo fundamental na manutenção dos níveis de ACC livre nos tecidos (YANG; HOFFMAN et al., 1982; Liu et al., 1985). A manutenção dos níveis de ACC livre nos tecidos, ocorre pela transformação da ACC num composto capaz de ser armazenado no vacúolo e incapaz de retornar a ACC em condições biológicas normais (BOUZAYEN et al., 1989). O processo de transformação da ACC inicia com sua conjugação a uma molécula de

malonil-Coa através da enzima ACC N-maloniltransferase, formando o ácido 1-(malonilamino)ciclopropano-1-carboxílico (MACC) (KNEE, 1985). O composto MACC é que vai ser armazenado no vacúolo e assim regular o conteúdo de ACC e também a produção de etileno. Mansour et al. (1986) encontraram dados interessantes em maçãs onde 40% da ACC sintetizada na região da epiderme pode ser transformada em MACC. Alguns autores como Liu et al. (1985) e Bufler; Streif (1986) encontraram estimulação na enzima responsável pela malonização (ACC N-maloniltransferase) com a exposição ao etileno durante o processo de amadurecimento.

#### *2.3.1.2 Inibição da síntese de etileno*

A etapa fundamental da produção de etileno é a obtenção da ACC a partir do composto SAM (Figura 1). Para ocorrer formação da ACC o composto SAM sofre a ação da ACC sintase. Como a ACC sintase é uma enzima dependente do co-fator piridoxal-S'-fosfato, uma das formas de inibir sua ação seria utilizando substâncias que inibem enzimas dependentes de piridoxal fosfato (LIEBERMAN et al., 1975). Muitas moléculas foram testadas e indicadas como inibidoras de enzimas dependentes de piridoxal fosfato, entre todas, o ácido [S]-trans-2-amino-4-[2-aminoetoxi]-3-butenóico ( $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH=CH-CH(NH}_2\text{)-COOH}$ ), mais conhecido como AVG (aminoetoxivinilglicina), obteve maior eficiência. A AVG é um aminoácido não-protéico que pode ser produzido naturalmente por fermentação, sendo comercializado com o nome de Retain<sup>®</sup>. A AVG é um potente inibidor da síntese do etileno em vários tecidos vegetais, retardando, assim, o processo de maturação. Inibe também de forma competitiva e irreversível a ACC sintase, porém, a magnitude da eficiência do inibidor depende da aplicação, a qual deve ser realizada antes do início da síntese autocatalítica de etileno.

#### *2.3.1.3 Modo de ação celular e molecular do etileno*

Apesar da ampla faixa de efeitos do etileno no desenvolvimento, supõe-se que as principais etapas de sua ação sejam semelhantes em todos os casos: todas elas envolvem a ligação ao **receptor**, seguida pela ativação de uma ou mais rotas de **transdução de sinal**, induzindo uma resposta celular (TAIZ; ZEIGER, 1998).

**Receptores** – os receptores de etileno estão relacionados ao sistema de dois componentes da histidina quinase de bactéria. O primeiro mutante etileno-insensível foi o etr1



(etileno – resistente 1). O mutante *etr1* foi identificado em uma triagem de mutantes que bloqueiam a resposta de plântulas de *Arabidopsis* ao etileno. A seqüência de aminoácidos da porção carboxiterminal do *etr1* é semelhante ao sistema de componentes da histidina quinase de bactérias para perceberem vários estímulos ambientais, como estímulos quimiossensor, disponibilidade de fosfato e osmolaridade. Assim como no *etr1*, outros receptores também se ligam ao etileno, sendo que mutações por substituição (missense) nos genes que codificam essas proteínas, análogas à mutação *etr1* original, mas permite que o receptor funcione normalmente como um regulador da rota de resposta ao etileno na ausência de etileno.

Todas as proteínas que formam os diferentes receptores compartilham pelo menos dois domínios: 1) o domínio amino-terminal atravessa a membrana pelo menos 3 vezes e possui o sítio de ligação do etileno. O etileno pode rapidamente acessar esse sítio devido à sua hidrofobicidade; 2) a porção intermediária dos receptores de etileno possui um domínio catalítico de histidina quinase (TAIZ; ZEIGER, 1998).

Recentes estudos, de diversos cientistas, indicam que o *etr1* está localizado no retículo endoplasmático, e não na membrana plasmática como inicialmente era suposto. A ligação de alta afinidade do etileno ao seu receptor necessita de cobre como co-fator. Mesmo antes da identificação de seu receptor, os cientistas presumiam que o etileno iria se ligar ao seu receptor via um metal de transição como co-fator, principalmente cobre ou zinco.

**Sinalização de etileno** – receptores de etileno não ligados são reguladores negativos na rota de resposta. Na maioria das espécies vegetais, os receptores de etileno são codificados por famílias multigênicas. A interrupção direcionada (inativação completa) dos cinco receptores de etileno de *Arabidopsis* (*etr1*, *etr2*, *ers1*, *ers2* e *ein4*) revelou que eles são funcionalmente reduntantes. Isso significa que a interrupção de qualquer gene que codifica separadamente umas dessas proteínas não tem efeito, mas uma planta com interrupções em todos os cinco genes para receptor exibe um fenótipo de resposta constitutiva do etileno. A observação de que as respostas ao etileno, como a resposta tríplice, tornam-se constitutivas quando os receptores estão interrompidos, o que indica que os receptores estão normalmente “ligados” (isto é, no estado ativo) na ausência de etileno e que a função do receptor sem o seu ligante (etileno) é desligar a rota de sinalização que leva à resposta. A ligação do etileno desliga os receptores, permitindo que a rota de resposta prossiga. Ao contrário do esperado, o modelo para receptores de etileno, no qual eles são reguladores negativos de uma rota de sinalização é distinto do mecanismo da maioria dos receptores animal, os quais, após ligarem a seus ligantes, funcionam como reguladores positivos das suas respectivas rotas de transdução de sinal. Em contraste com os receptores interrompidos, aqueles com mutações

por substituições no sítio de ligação do etileno (como ocorre no mutante original *etr1*) são incapazes de se ligarem ao etileno, mas continuam ativos como reguladores negativos da rota de resposta ao etileno. Tais mutações resultam em uma planta que expressa um subgrupo de receptores que não possa mais ser desligado pelo etileno, conferindo, assim um fenótipo dominante etileno-insensível. Mesmo que os receptores normais possam ser desligados pelo etileno, os receptores mutantes continuam a sinalizar para a célula a supressão das respostas ao etileno, estando ele presente ou não (TAIZ; ZEIGER, 1998).

**Modelo de sinalização de etileno** – A proteína RAN1 é necessária para ligar o cofator cobre no receptor de etileno. Na ausência do etileno, a ETR1 e outros receptores de etileno ativam a atividade quinase da CTR1, a qual induz uma repressão da rota de resposta do etileno, possivelmente através de uma cascata MAP quinase (Figura 2).

A ligação de etileno ao dímero ETR1 resulta na sua inativação, que, por sua vez, inativa a CTR1. A inativação da CTR1 permite a ativação da proteína transmembrana EIN2. A ativação da EIN2 aciona a família EIN3 de fatores de transcrição, os quais induzem a expressão do ERF1. A ativação dessa cascata transcricional leva a mudanças em larga escala da expressão gênica, que provocam **alterações nas funções celulares** (Figura 2).

**Inibidores da ação do etileno** – são substâncias que se ligam aos receptores nos sítios específicos das células, bloqueando a ação do etileno. Entre as substâncias pesquisadas, os ciclopropenos têm-se mostrado mais eficiente como antagonista do etileno. Os ciclopropenos são olefinas altamente efetivas e se mantêm ligados por longos espaços de tempo, podendo ser valiosos como marcadores potenciais para o sítio receptor celular do etileno, bem como para controlar suas respostas fisiológicas. Uma grande vantagem no seu uso é o fato de terem difusão lenta para fora dos tecidos, ao contrário do que ocorre com o etileno. Muitos ciclopropenos foram testados, entre todos o 1-metilciclopropeno (1-MCP) mostrou-se o mais promissor no controle do amadurecimento de frutas, hortaliças e flores, pelo seu potencial como bloqueador do etileno. O efeito inibitório do 1-MCP ocorre pelo fato de ele ligar-se, de forma irreversível, ao sítio receptor do etileno, inibindo, assim, o seu estímulo fisiológico (Figura 3). O bloqueio da ligação do etileno no sítio receptor ocorre porque o 1-MCP tem a habilidade de se ligar no mesmo sítio, de modo semelhante ao encaixe de uma chave na fechadura, porém, sendo incapaz de abri-lá, isto é, não promove as respostas fisiológicas desencadeadas pelo etileno. O seu efeito protetor prolonga-se por um bom período e depois o tecido recupera sua sensibilidade ao etileno, amadurecendo normalmente. Moléculas análogas ao 1-MCP, como o 1-etilciclopropeno (1-ECP) e 1-propilciclopropeno (1-PCP), são capazes de inibir a ligação do etileno (FENG et al., 2004).

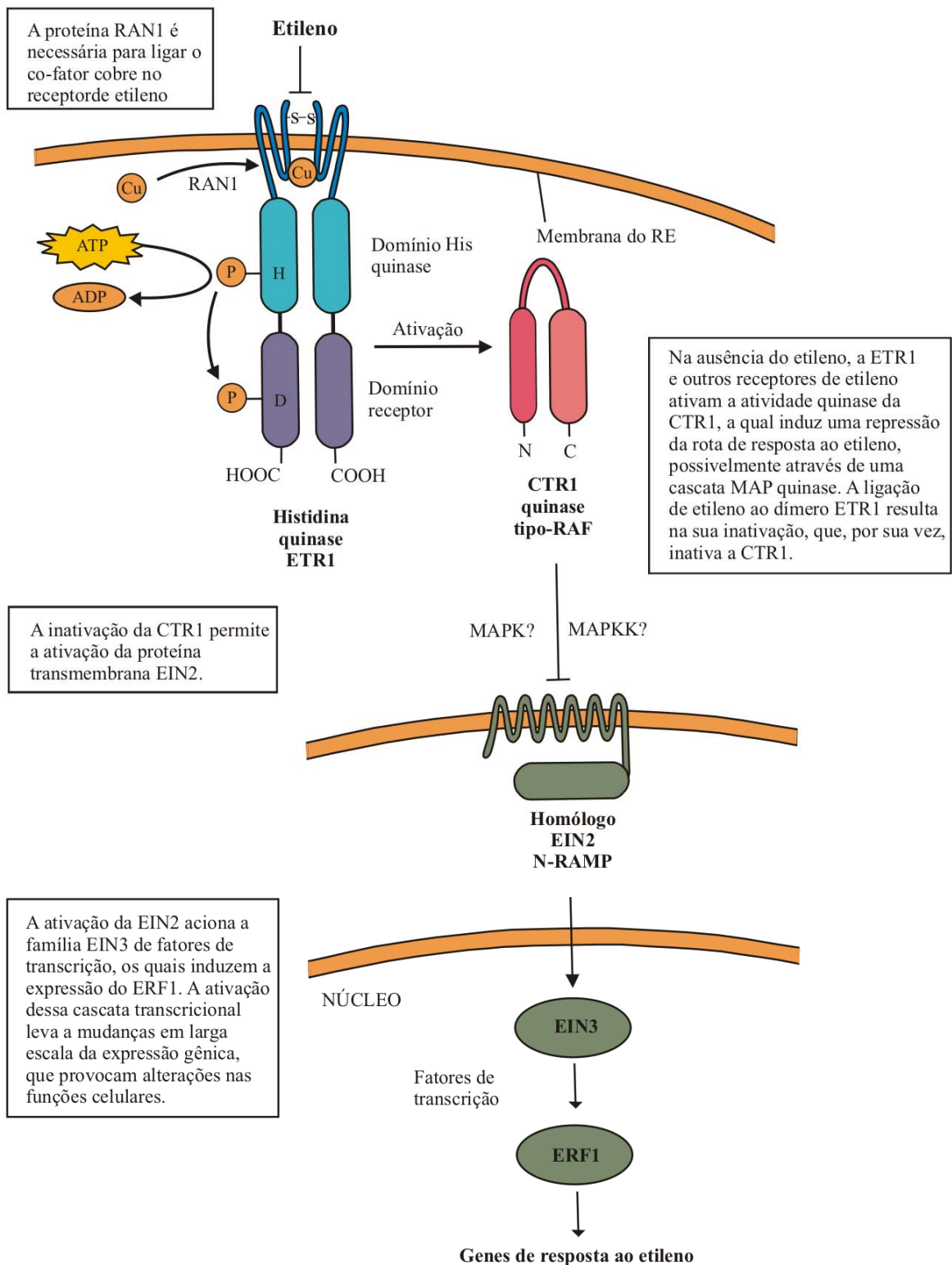


Figura 2: Modelo de sinalização de etileno em *Arabidopsis*. O etileno liga-se ao receptor ETR1, que é uma proteína integral da membrana do retículo endoplasmático. O receptor é um dímero unido por pontes de dissulfeto. O etileno liga-se ao domínio transmembrana, por meio de um co-fator cobre, o qual é ligado ao receptor de etileno pela proteína RAN1. Adaptado Taiz; Zeiger (1998).

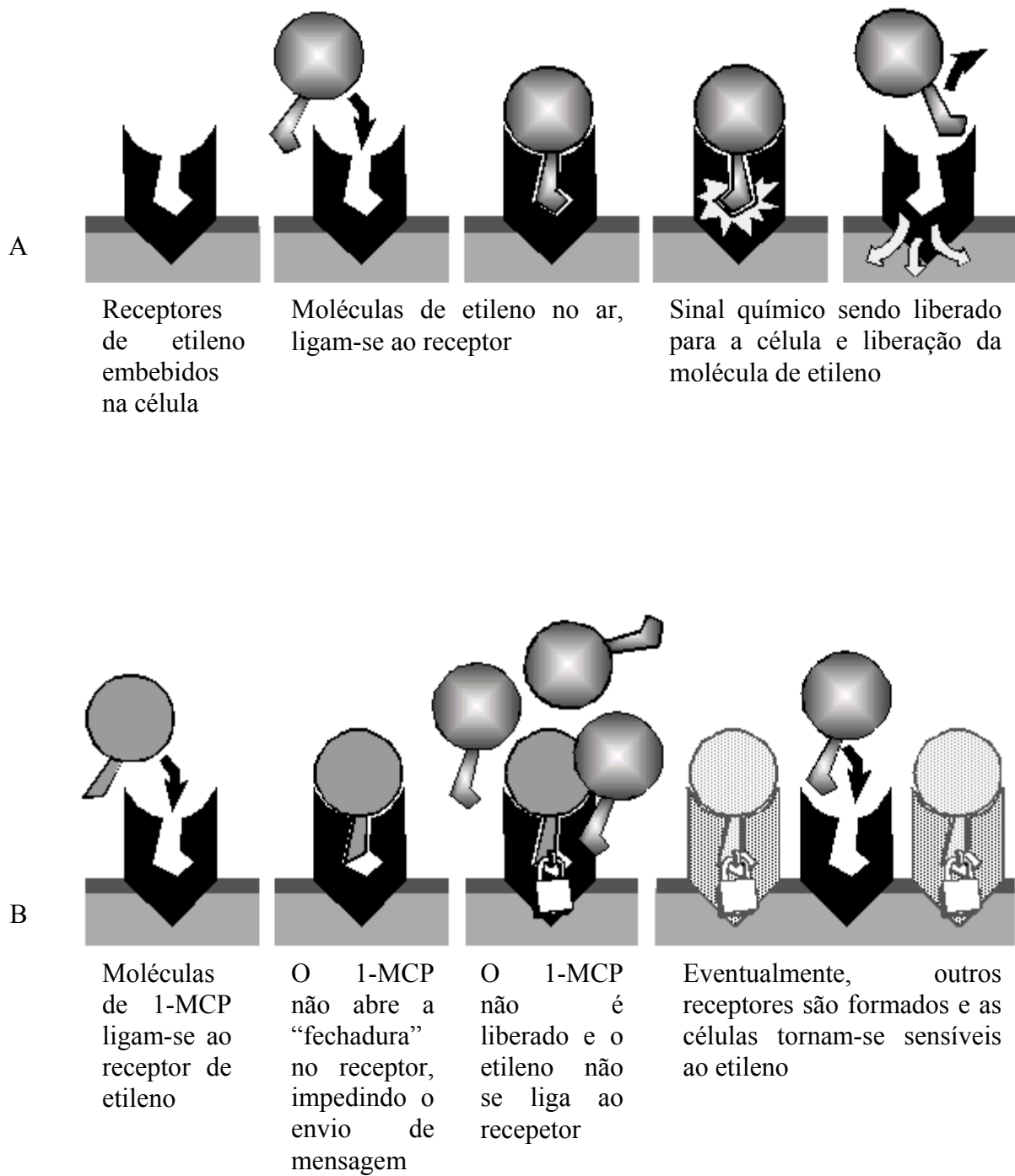


Figura 3: Mecanismo de ligação do etileno em seu sítio receptor (A) e ligação do 1-MCP no sítio receptor de etileno (B). Fonte: Bower, citado por Blankenship (2001).

**Etileno no amadurecimento** – Quando o etileno se liga a molécula receptora, promove ativação de um comando para o amadurecimento e ocasiona: degradação da clorofila, amido, açúcares, ácidos e pectinas; a síntese de pigmentos, produtos voláteis e ácido abscísico e polimeriza fenóis. Quando o etileno se liga à proteína receptora estimula a síntese de enzimas específicas, sendo que muitas são secretadas pelas células e transformam a composição da parede celular. O amadurecimento é controlado pelo etileno, pois é responsável pela estimulação de genes que codificam para proteínas que transformam a composição dos tecidos. Mas, o etileno não coordena todas as vias de amadurecimento já que existem vias dependentes e independentes do etileno. Essa afirmação é confirmada com estudos em frutos mutantes transgênicos (TAIZ; ZEIGER, 1998).

O etileno é tido como indutor do climatérico respiratório, pois, mesmo em frutos que o produzem em concentrações muito baixas, essas são suficientes para elevar a taxa respiratória no climatério. A concentração de etileno aumenta de forma drástica nesse período, podendo o aumento anteceder ou não a elevação da taxa respiratória. Esse comportamento gera controvérsias quanto ao fato de ser ou não o etileno o iniciador do climatério, ou seja, se a sua produção endógena é ou não o sinal para desencadear as mudanças bioquímicas e fisiológicas que ocorrem nessa fase.

O grande aumento na produção de etileno no início do amadurecimento dos frutos climatéricos é considerado como o fator iniciador das modificações na cor, no aroma, na textura e no “flavor”, bem como de outros atributos bioquímicos e fisiológicos. Nos frutos não-climatéricos, o amadurecimento é considerado como um evento que independe do etileno, porém, pouco se conhece sobre os mecanismos reguladores das transformações bioquímicas. Assim, para compreender o amadurecimento de frutos climatéricos, precisamos abordar a regulação da síntese de etileno durante essa fase.

Durante o amadurecimento de frutos climatéricos, são encontrados baixos níveis de ACC antes do incremento da síntese de etileno e da respiração (HOFFMAN; YANG, 1980). Embora o conteúdo de ACC é baixo antes do climatério (ou período pré-climatérico), os tecidos, nesta fase, são capazes de produzir SAM a partir da metionina, indicando que falta a capacidade de converter SAM a ACC, isto é, a atividade da enzima ACC sintase é baixa (ADANS; YANG, 1979). Nos estádios iniciais da maturação, quando há pouca liberação de etileno, não é constatada atividade da ACC sintase (INABA, 1993), mas ocorre um aumento na atividade desta enzima paralelo ao conteúdo de ACC e à produção de etileno no início do amadurecimento (HOFFMAN; YANG, 1980; KENDE, 1989). Após o climatério (ou período pós-climatérico), há uma queda no conteúdo de ACC e, mais tarde, um novo incremento

(HARTMANN et al., 1987), enquanto que a produção de etileno declina e permanece baixa, possivelmente, porque a capacidade de converter ACC à etileno é prejudicada em frutos super-maduros (HOFFMAN; YANG, 1980; YANG; HOFFMAN, 1984).

No entanto, sabendo que a falta de ACC é o fator limitante na produção de etileno na fase pré-climatérica, os pesquisadores Yang; Hoffman (1984), adicionaram ACC aos tecidos de maçã e verificaram um incremento de apenas cinco vezes na produção de etileno, enquanto, após o climatérico o aumento pode ser de centenas de vezes.

Dessa forma, McMurchie et al. (1972) sugeriram a existência de dois sistemas diferentes regulando a produção de etileno durante o amadurecimento de frutos. Foi atribuído ao sistema I, que opera em frutos climatéricos e não climatéricos, bem como nos tecidos vegetativos, a responsabilidade da produção baixa, mas constante, de etileno, já, o sistema II, seria responsável pelo aumento na síntese de etileno (produção autocatalítica) característico somente de frutos climatéricos. Conforme McGlasson (1985), cada sistema possui receptores de etileno diferentes um do outro, sendo que, os receptores do sistema I regulam a síntese de etileno em frutos climatéricos imaturos e em frutos não climatéricos, enquanto que os receptores de ambos os sistemas regulam a síntese do etileno em frutos climatéricos maduros. Além disso, o sistema II mais o etileno proporcionam a ativação de enzimas responsáveis pela alteração na **parede celular e perda de firmeza de polpa** (YANG, 1987).

### 2.3.2 Fisiologia das alterações da firmeza de polpa

#### 2.3.2.1 *Firmeza de polpa de frutos e suas alterações durante o amadurecimento*

A firmeza de polpa é um importante fator de qualidade em frutos para o consumo ao natural, pois indica a tolerância do fruto ao transporte e manuseio durante a colheita e comercialização. Contudo, o mecanismo pelo qual os frutos amolecem não é completamente entendido. Tem sido sugerido que decréscimos na firmeza de polpa durante o amadurecimento de frutos são devido a alterações nas características dos polissacarídeos da lamela média da parede celular, cujos principais componentes são as substâncias pécticas (BATISSE et al., 1994). Estas são as principais responsáveis pelas mudanças da firmeza de polpa. A firmeza do fruto também depende da espessura da casca, textura da polpa e estrutura locular dos frutos (MABBETT, 1989). Desta forma, a perda progressiva de firmeza durante a maturação de caqui tem sido atribuída à redução na espessura das paredes celulares e da força

coesiva que as mantém unidas, pela decomposição de protopectinas, celulosas, hemicelulosas e amido (FISHER; BENNETT, 1991).

### *2.3.2.2 Parede celular*

A parede celular atua como uma barreira à difusão, limitando o tamanho de macromoléculas que podem alcançar a membrana plasmática a partir do exterior, além de ser a principal barreira estrutural à invasão de patógenos.

#### *2.3.2.2.1 Composição da parede celular*

De acordo com Carpita; Gibeaut (1993), a parede celular, é composta de microfibrilas de celulose inseridas em uma matriz de polissacarídeos. Esses mesmos autores afirmam que as **microfibrilas** são rígidas e inextensíveis, unidas através de redes coesivas de **hemicelulose**, **pectinas** e **glicoproteínas** estruturais. As **microfibrilas** de celulose são constituídas por glucanos individuais que estão firmemente alinhados e ligados entre si, formando uma fita altamente ordenada (cristalina), que exclui a água e é relativamente inacessível ao ataque enzimático. As **hemicelulosas** são polissacarídeos flexíveis que caracteristicamente ligam-se à superfície da celulose. Elas podem formar correntes que reúnem microfibrilas de celulose em uma rede coesa ou podem funcionar como um revestimento deslizante para impedir o contato direto entre microfibrilas. As **pectinas** formam uma fase gel hidratada na qual está implantada a rede celulose-hemicelulose. Elas atuam como preenchimento hidrofílico, impedindo a agregação e o colapso da rede de celulose. Elas estabelecem também a porosidade da parede celular para as macromoléculas.

#### *2.3.2.2.2 Interações entre os polímeros*

Brummell; Harpster (2001) afirmam que a ligação entre as microfibrilas de celulose e a hemicelulose é realizada através de pontes de hidrogênio. Em decorrência da ligação entre a microfibrila e a hemicelulose formam espaços remanescentes e são preenchidos por pectinas altamente hidratadas, que também formam uma rede, mantida por ligações éster entre as moléculas de pectina e por inter-ligações mediadas por  $\text{Ca}^{2+}$  entre homogalacturonanos

desmetilesterificados. Thompson; Fry (2000) afirmam que a estrutura da parede celular é unida por ligações covalentes entre moléculas de xiloglucano e pectinas.

### *2.3.2.3 Metabolismo da parede celular durante o amadurecimento*

O amaciamento dos tecidos é uma das principais transformações no amadurecimento de frutos carnosos, e com influência acentuada tanto na qualidade como no período de conservação, tendo relação direta com a transformação química dos componentes da parede celular.

#### *2.3.2.3.1 Alterações na parede celular durante o amadurecimento*

As hemiceluloses e as pectinas podem ser modificadas e quebradas por uma variedade de enzimas encontradas naturalmente na parede da célula. O processo tem sido estudado detalhadamente durante o amolecimento por ser o resultado da degradação da parede celular. Glucanases e enzimas afins podem hidrolisar a estrutura básica de hemiceluloses. Xilosidases e enzimas relacionadas podem cortar e ligar hemiceluloses. Essas mudanças enzimáticas podem alterar as propriedades físicas da parede, por exemplo, pela mudança da viscosidade da matriz ou da alteração da tendência das hemiceluloses de se introduzirem na celulose (TAIZ; ZEIGER, 1998).

RNAs mensageiros para a expansina são expressos durante o amadurecimento de tomate, sugerindo que eles exercem um papel na degradação de parede (ROSE et al., 1997). De modo semelhante, frutos em amolecimento expressam altos níveis de pectina metil esterase, que hidrolisa os ésteres de metil de pectinas. Essa hidrólise torna a pectina mais suscetível à hidrólise subsequente por pectinases e enzimas afins, cuja presença, assim como a de enzimas afins na parede da célula, indica que as paredes são capazes de modificação significativa durante o amadurecimento (TAIZ; ZEIGER, 1998).

#### *2.3.2.3.2 Enzimas que atuam sobre a rede celulose-xiloglucana*

### **Expansina**

As expansinas são proteínas capazes de afrouxar a parede celular, pois promovem o rompimento das ligações não-covalentes presentes na interface celulose-hemicelulose



(COSGROVE, 1998). Essas proteínas têm sido detectadas em vários frutos, como tomates (ROSE et al., 1997), morangos (CIVELLO et al., 1999) e pêssegos (HAYAMA et al., 2003). Segundo Hayana et al (2003), três genes, que codificam para expansinas em pêssegos (*PpExp1-3*), são expressos especificamente nos frutos, dos quais, *os PpExp1 e PpExp3* são expressos especialmente durante o amadurecimento. Além disso, esses mesmos autores indicam que enzimas hidrolíticas, como as PGs, podem atuar cooperativamente com as expansinas, reduzindo a firmeza da polpa dos frutos. A expressão das expansinas relacionadas ao amadurecimento de frutos é regulada pelo etileno (ROSE et al., 1997).

### **Endo-1,4-β-Glucanase**

Os glucanos da matriz das paredes celulares sofrem despolimerização considerável durante o processo de amadurecimento, o que contribui significativamente para a redução da firmeza dos frutos (MACLACHLAN; BRADY, 1994). As EGases (Endo-1,4-β-Glucanase; EC 3.2.1.4) hidrolisam as ligações internas de cadeias adjacentes de glucanos, sendo seus substratos, provavelmente xiloglucanos, regiões periféricas e integrais da celulose não cristalina e glucomananos (BRUMMELL; HARPSTER, 2001).

### **Xiloglucano endotransglicosilase**

A XET (Xiloglucano endotransglicosilase) faz a clivagem das ligações internas das estruturas fundamentais dos xiloglucanos e transfere a terminação redutora formada para a posição C-4 de uma glicose de outro xiloglucano (BRUMMELL; HARPSTER, 2001). Essas enzimas podem ser divididas em dois grupos: as que possuem atividade hidrolase e as que não possuem. Em maçã e quivi, a atividade dessa enzima é alta durante a expansão dos frutos, decresce durante a maturação e aumenta novamente no amadurecimento (PERCY et al., 1996). Esse padrão de atividade é resultante da expressão de diversos genes. Possivelmente, em frutos climatéricos, a expressão dos genes que codificam para a XET, durante o amadurecimento, é regulada pelo etileno (BRUMMELL; HARPSTER, 2001).

#### *2.3.2.3.3 Enzimas que atuam sobre a rede de pectinas*

### **Poligalacturonase**

As poligalacturonases (PGs; poli(1→4-α-D-galacturonídeo) glicanohidrolases) são enzimas que catalisam a clivagem das ligações α-(1→4), sendo de dois tipos, as que atuam de

forma *exo*- e de forma *endo*- (BRUMMELL; HARPSTER, 2001). As *exo*-PGs (EC 3.2.1.67) removem unidades simples de ácido galacturônico somente das terminações não-redutoras dos HGAs (Homogalacturonanos), enquanto as *endo*-PGs (EC 3.2.1.15) clivam esse polímero de maneira aleatória (BRUMMELL; HARPSTER, 2001). Como os HGAs são secretados na parede celular numa forma altamente metilesterificada, para tornarem-se os substratos das PGs, eles devem ser desmetilesterificados (Jarvis, 1984; Carpita ; Gibeaut, 1993). Interessantemente, as pectato liases catalisam uma clivagem similar das ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) entre os ácidos *D*-galacturônicos, porém por meio de reações de  $\beta$ -eliminação (FISCHER; BENNETT, 1991).

As PGs são expressas a partir de grandes famílias multigênicas, porém, durante o amadurecimento, apenas poucos genes são expressos nos frutos (DELLA PENNA et al., 1986). O etileno está envolvido com a regulação desse processo em vários frutos (SITRIT; BENNETT, 1998; ZANUZO, 2004). A tradução das PGs envolve várias etapas, que correspondem a extensivas alterações pós-traducionais. A primeira corresponde à retirada dos 24 aminoácidos da seqüência sinalizadora, que guia o polipeptídeo recém traduzido para o sistema de endomembranas do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi, onde ele será processado e, finalmente, secretado para a parede celular (FISCHER; BENNETT, 1991). Mais tarde, são suprimidos os 47 aminoácidos da pró-seqüência amino-terminal e 13 da terminação carboxílica. Duas proteínas maduras, PG2A e PG2B, são formadas, diferindo somente em relação à intensidade das glicosilações que sofreram, apresentando 43 e 45kDa, respectivamente. Além disso, uma terceira PG, a PG1 também tem sido identificada (BRUMMELL; HARPSTER, 2001). Essa isoforma apresenta um elevado peso molecular, consistindo de uma ou, possivelmente, duas PG2A ou PG2B combinadas com uma glicoproteína de 38kDa, conhecida como subunidade  $\beta$  ou conversora de PG.

### **Pectina esterase**

Durante o crescimento celular, os HGAs são secretados nas paredes celulares com um elevado grau de metilesterificação, sendo progressivamente desmetilesterificados. Esse processo é concomitante com o aumento da atividade das pectina metilesterases (PME; EC 3.1.1.11), enzimas que hidrolisam o grupamento metiléster da posição C-6 dos resíduos de HGAs das pectinas, formando pectinas com menor grau de metilação e metanol (FISCHER; BENNETT, 1991; BRUMMELL; HARPSTER, 2001). Como as PGs são mais eficientes na degradação de pectinas desmetilesterificadas (KOCH; NEVINS, 1989), a ação das PMEs

determina, em parte, quais pectinas são suscetíveis ao ataque das PGs. A atividade das PMEs é detectada durante todas as fases do desenvolvimento dos frutos, sendo que picos de atividade são observados quando os frutos são ainda pequenos e imaturos e logo no início do processo de amadurecimento (HARRIMAN et al., 1991). No entanto, esses picos são alcançados após um declínio considerável na acumulação de mRNAs para PME. Em tomate, poucos genes codificam para a PME (HARRIMAN et al., 1991), sendo que as proteínas sofrem alterações pós-traducionais, como a retirada da seqüência sinalizadora e de uma grande região amino-terminal (GAFFE et al., 1994).

O etileno, aparentemente, não regula a expressão da PME (ALEXANDER; GRIERSON, 2002). No entanto, a expressão de *LeRab11a*, que codifica uma proteína putativamente relacionada ao tráfego de hidrolases para as paredes celulares, possivelmente é regulada pelo etileno (LU et al., 2001). A firmeza da polpa de frutos de plantas antisense para esse gene não decresceu durante o amadurecimento, sendo acompanhado por níveis reduzidos das enzimas PME e PG (LU et al., 2001). Dessa forma, o etileno pode afetar indiretamente a atividade da PME por estimular um maior ou menor tráfego dessa enzima do complexo de Golgi às paredes celulares.

### **$\beta$ -galactosidase**

A maior parte da galactose, presente nas paredes celulares, está nas cadeias laterais do RG-I (Ramnogalacturonano I) (CARPITA; GIBEAUT, 1993). As *exo*- $\beta$ -D-galactosidases removem as terminações não-redutoras das  $\beta$ -D-galactosidases (BRUMMELL; HARPSTER, 2001), sendo responsáveis por uma das principais alterações que ocorrem nas paredes celulares: a perda de resíduos galactosil (GROSS; SAMS, 1984). Em tomate existem três isoformas de  $\beta$ -galactosidase, sendo nomeadas de I, II e III. Enquanto as formas I e III apresentam alta atividade nos frutos imaturos, a atividade da forma II aumenta drasticamente durante o amadurecimento (CAREY et al., 1995). Pelo menos sete genes codificam para  $\beta$ -galactosidases (SMITH; GROSS, 2000), sendo o gene *TBG4* altamente expresso durante o amadurecimento e, provavelmente, responsivo ao etileno (BRUMMELL; HARPSTER, 2001).

#### 2.3.3 Processo respiratório

A atividade respiratória é um evento primordial, e, durante a fase pós-colheita de frutos, é o responsável pela produção de energia para a manutenção básica do metabolismo vegetal.

A respiração é um processo de oxidação de compostos orgânicos, principalmente ácidos orgânicos e carboidratos, os quais são fontes de produção de água, dióxido de carbono e energia química. Essa energia é indispensável para a obtenção de novos compostos e manutenção do metabolismo do fruto em pós-colheita.

A energia química liberada na respiração é utilizada na manutenção dos processos de síntese necessários para a sobrevivência do fruto, principalmente na manutenção da organização celular, permeabilidade da membrana e na translocação de metabólitos para o tecido. Assim, a maquinaria celular consegue manter a produção de enzimas e outras substâncias essenciais para o processo de amadurecimento.

No processo de respiração, a energia química pode ser obtida em condições aeróbicas ou anaeróbicas. Na respiração aeróbica, onde o oxigênio não é limitante, o processo ocorre em três etapas distintas através de diferentes vias metabólicas: 1º) Hidrólise de polissacarídeos de reserva, com produção de açúcares simples; 2º) oxidação dos açúcares simples a ácido pirúvico (glicólise) e 3º) transformação aeróbica do ácido pirúvico em outros ácidos orgânicos, com liberação de dióxido de carbono, água e energia (ciclo de Krebs ou dos ácidos tricarboxílicos-TCA). Já, na respiração anaeróbica, em que a concentração de oxigênio é limitante ou ausente, ocorre o processo de fermentação, por meio do qual o ácido pirúvico é convertido a dióxido de carbono e acetaldeído e este, posteriormente, é reduzido a etanol.

A atividade respiratória, em caqui, apresenta um aumento rápido e acentuado, com o amadurecimento. Os autores Duque et al. (1999) afirmam que o aumento rápido e transitório na atividade respiratória corresponde à maturação comercial de frutos. Muitos trabalhos tentam explicar qual é o 'marca passo' para o aumento da respiração no climatérico, mas, parece estar relacionado com o aumento da fase glicolítica e na atividade das enzimas fosfofrutoquinase (MERTENS et al., 1987).

A função fundamental do aumento drástico da respiração ainda é desconhecido. Uma hipótese levantada por Tucker (1993) é que o aumento da respiração seria para suprir a necessidade de ATP durante o amadurecimento. Mas, sabe-se que a necessidade por ATP durante o amadurecimento é muito inferior à produzida durante o climatérico. Além disso, os frutos não-climatéricos são capazes de amadurecer sem apresentar um aumento significativo na atividade respiratória.

A relação entre o climatério respiratório e o aumento drástico na síntese de etileno, durante o amadurecimento, ainda não foi devidamente elucidada (LELIÈVRE et al., 1997). Todavia, possivelmente, o etileno seja responsável por estimular a rota alternativa de transporte de elétrons resistente ao cianeto (SOLOMOS, 1977). Essa rota parece desempenhar

um papel importante durante a respiração climatérica (SOLOMOS, 1977), podendo atuar como um mecanismo de proteção contra o cianeto produzido durante o climatério do etileno (YANG; HOFFMAN, 1984; KENDE, 1993). A rota alternativa auxilia na proteção contra as espécies reativas de oxigênio (ERO), que podem ser formadas se a cadeia transportadora de elétrons é reduzida em excesso (MILLAR; DAY, 1997). O acúmulo de mRNAs e da proteína oxidase alternativa (AOX), a oxidase terminal na cadeia alternativa de transporte de elétrons, ocorre de maneira mais pronunciada durante o amadurecimento de mangas (CRUZ-HERNÁNDEZ; GÓMEZ-LIM, 1995).

#### 2.3.4 Acidez

Corresponde aos ácidos orgânicos que tem de um a três carboxilas (COOH) e são os grandes responsáveis pela característica acídica, pois liberam  $H^+$ . Assim, esses ácidos podem ser encontrados na forma livre ou como sais, ésteres e glicosídeos e com isso ser cristalizados em oxalato de cálcio ou bitartarato de potássio. A síntese dos ácidos podem ser de açúcares ou através de oxidações, descarboxilações ou carboxilações de outros ácidos orgânicos na via dos ácidos tricarboxílicos.

Após a colheita e durante o armazenamento, a concentração dos ácidos orgânicos normamente declina em decorrência de sua utilização como substrato na respiração ou da sua transformação em açúcares. As transformações variam de acordo com o tipo de tecido, cultivar grau de maturação, condições de armazenamento, etc. Têm papel importante nas características de sabor (acidez) e do aroma, uma vez que alguns ácidos são voláteis.

Os açúcares e os ácidos orgânicos são utilizados como substrato respiratório para o fornecimento de carbono e para a produção de energia nas diferentes fases do ciclo vital dos produtos vegetais, encontrando-se em concentrações relativamente elevadas apenas em alguns tecidos. Na realidade, como intermediários metabólicos, encontram-se em pequenas quantidades no citoplasma, pois se acumulam no vacúolo, onde representam uma fonte disponível de energia armazenada.

#### 2.2.4.5 Sólidos solúveis totais (SST)

Os SST são basicamente formados por carboidratos. Os carboidratos são os componentes mais abundantes nas células vegetais, tendo papel primordial como substância

de reserva energética e também como função estrutural. Esses compostos podem ser encontrados como açúcares simples ou altamente polimerizados.

Durante o amadurecimento os carboidratos podem aumentar, em função da hidrólise do amido, que é uma substância de reserva. No entanto, Rhodes (1980) afirma que os carboidratos servem como fonte de energia e são consumidos pelo processo respiratório durante a fase de amadurecimento.

Para ocorrer à hidrólise do amido, as enzimas amilases têm que aumentar sua atividade. Young et al. (1975) afirmam que a hidrólise do amido ocorre depois do climatério e após 2 a 4 meses de armazenamento, dependendo da espécie, é totalmente degradado. A identificação das amilases foi realizada por Latché et al. (1975) ao demonstrarem que a atividade da  $\alpha$ -amilase aumentou no período climatérico ao mesmo tempo que o amido desapareceu.

A relação entre degradação do amido e etileno é pouco estudada, mas, sabe-se que o etileno não influencia na degradação do amido. No entanto, o teor de SST é constituído de ácidos orgânicos e algumas substâncias pécticas provenientes da parede celular. Assim, degradação na parede celular por enzimas específicas, pode interferir nos níveis de SST dos frutos, após longos períodos de armazenamento.

## **2.4 Formas de armazenamento**

Os produtos perecíveis, como o caqui, precisam ser armazenados para contrabalancear a oferta do produto com a capacidade de consumo do mercado. Em função disso, no caso do caqui, muitas pesquisas tem sido realizadas como intuito de aumentar o período de armazenamento. As pesquisas básicas começaram com controle da temperatura e, com o progresso da ciência e da tecnologia, outras formas de armazenamento têm sido estudadas. A mais recente tecnologia utilizada é o princípio da atmosfera controlada associada a inibidores da ação do etileno.

### **2.4.1 Armazenamento em ambiente refrigerado (AR)**

O método da refrigeração é considerado o mais econômico para prolongar o período de armazenamento de frutos. As outras tecnologias como controle da atmosfera, uso de ceras,

inibidores da ação do etileno e absorvedores de etileno são complementos do abaixamento da temperatura.

A refrigeração é o principal método de conservação utilizado pelos produtores para a conservação de frutos (TAVARES, 2003). A velocidade das reações metabólicas nos frutos é diretamente proporcional à elevação da temperatura, dentro da faixa fisiológica de maturação, sendo que o uso de temperatura baixa diminui essa atividade. Com a redução da taxa metabólica, ocorre diminuição das perdas em aroma, sabor, textura e cor. No caso dos frutos climatéricos, a diminuição da temperatura atrasa o pico climatérico e, além disso, diminui sua intensidade. Com isso, reduz o consumo de suas reservas retardando a respiração e o amadurecimento dos frutos, prolongando a vida pós-colheita. No entanto, a exposição do caqui 'Fuyu' em temperaturas inadequadas, proporciona algumas reações de desequilíbrio no metabolismo normal dos frutos. Essas reações são ativadas, levando ao colapso das células e acarretando na manifestação de distúrbios fisiológicos (WILLS et al., 1981).

Diante dos problemas com a temperatura em caqui 'Fuyu', diversos trabalhos foram realizados com a intenção de determinar a temperatura ideal de armazenamento. Brackmann et al. (2006), armazenaram caqui 'Fuyu' em 0, 5, 10, 15 e 20°C, e verificaram que a 5°C os frutos desenvolveram dano pelo frio e não tinham condições de consumo. Recomendaram o armazenamento a 10°C quando se deseja um rápido amadurecimento e comercialização e 0°C para armazenamento em longos períodos. Mas, a temperatura de 0°C também tem sido propensa ao surgimento de distúrbios fisiológicos após 6 semanas de armazenamento (WOOLF et al., 1997). Porém, somente o controle da temperatura não é suficiente para prolongar a vida pós-colheita, sendo necessário à utilização de métodos integrados.

#### 2.4.2 Armazenamento em ambiente refrigerado e com atmosfera controlada (AC)

A atmosfera controlada (AC) consiste na integração de um ambiente refrigerado com a redução da concentração de O<sub>2</sub> e aumento da concentração de CO<sub>2</sub>. A exposição dos caquis em condições de baixa concentração de O<sub>2</sub> e alta concentração de CO<sub>2</sub> acarreta em mudanças no metabolismo normal da respiração, etileno, aroma, carotenóides e atributos organolépticos. Mas, Mathooko (1996) afirma que é difícil distinguir exatamente quais eventos metabólicos são afetados pelas baixas concentrações de O<sub>2</sub> e altas concentrações de CO<sub>2</sub>.

#### 2.4.2.1 Implicação no sistema respiratório

De maneira geral, a redução da concentração de  $O_2$  e aumento na concentração de  $CO_2$  diminuem o processo respiratório. A AC influencia não apenas na taxa respiratória, mas, também em outros mecanismos metabólicos dos frutos. No entanto, os frutos desenvolvem-se em atmosfera rica em  $O_2$  e com baixos níveis de  $CO_2$ , mas essa atmosfera é separada da atmosfera interna do fruto pela cutícula e ceras epicuticulares que cobrem a epiderme e que, na maioria dos casos, constituem uma barreira efetiva contra as trocas de gases, interferindo na respiração.

O órgão vegetal enquanto está na planta mantém um equilíbrio dinâmico com o ambiente no qual se desenvolveu. No entanto, após a colheita, esse equilíbrio é modificado, devido ao decréscimo na concentração do oxigênio e aumento na concentração de dióxido de carbono decorrentes da respiração, o que altera a concentração desses gases dentro dos tecidos.

**Baixa concentração de oxigênio** – A exposição de caqui ‘Fuyu’ a baixas concentrações de  $O_2$  acarreta em modificações no metabolismo primário. No metabolismo primário está a redução da atividade respiratória, onde pode ser comprovada na redução do consumo dos ácidos e açúcares tendo um reflexo no metabolismo global. No entanto, o teor de  $O_2$  não pode ser muito reduzido, pois, chegando ao limite mínimo ou ponto de extinção, inicia a respiração anaeróbica, com acúmulo de acetaldeído e álcool etílico (LIU et al. 2004). Assim, permanecendo por longos períodos na condição anaeróbica as células começam a produzir e acumular materiais tóxicos, que prejudicam a vida e a qualidade do fruto.

**Alta concentração de dióxido de carbono** – Muitos processos fisiológicos e bioquímicos são afetados pela elevação do  $CO_2$ , com ou sem diminuição da concentração de  $O_2$ . Os mecanismos precisos da ação das altas concentrações de  $CO_2$  não foram totalmente elucidados. Mas o  $CO_2$  inibe a atividade da isocitrato desidrogenase (IDH) (LIU et al., 2004), enzima que catalisa a conversão de isocitrato a 2-oxoglutarato. Além do mais, em maçãs, o alto  $CO_2$  afetou a conversão de succinato a malato e esse a piruvato. A exposição de frutos a elevados níveis de  $CO_2$  pode também resultar na inibição de algumas enzimas da via glicolítica. Nesse sentido, observou-se uma redução significativa na respiração de pêras expostas ao alto  $CO_2$  devido à inibição da síntese e/ou da atividade das fosfofrutoquinases ATP-dependentes (PFK) e das fosfofrutoquinases  $PP_1$ -dependentes (PFP) (KERBEL et al., 1988).



#### 2.4.2.2 Implicação na síntese e ação do etileno

A AC tem a capacidade de retardar o início da produção autocatalítica de etileno durante o armazenamento de maçãs (LAU et al., 1984) e diminuir a quantidade de etileno produzido (BUFLER; STREIF, 1986).

**Baixa concentração de oxigênio** – Segundo Kader (1986), concentrações de O<sub>2</sub> abaixo de 8kPa reduzem a produção de etileno, sendo que o efeito incrementa-se a medida que o nível de O<sub>2</sub> decresce, devido ao fato do O<sub>2</sub> ser um substrato da ACC oxidase. Assim, Yang (1985) observou que sob condições de 1,5kPa de O<sub>2</sub> a conversão de ACC a etileno é inibida resultando na acumulação de ACC nos tecidos, pois passos anteriores da rota ocorrem na ausência de O<sub>2</sub>.

**Altas concentrações de dióxido de carbono** – Uma teoria inicialmente levantada por Burg; Burg (1967), afirmava que o CO<sub>2</sub> competia pelo sítio de ligação do etileno, inibindo sua biossíntese e ação. Mas, novas pesquisas conseguiram demonstrar que o CO<sub>2</sub> atua antes da formação do ACC em etileno (MATHOOKO et al., 2001). Assim, níveis elevados de CO<sub>2</sub> (5-20kPa) inibem a produção de etileno em frutos climatéricos devido a inibição da atividade da ACC sintase e da ACC oxidase (DE WILD et al., 2005). O CO<sub>2</sub> deve atuar na inibição da síntese ou atividade da ACC sintase. Entretanto, Mathooko (1996) afirma que o CO<sub>2</sub> deve estar presente continuamente para inibir a ACC sintase. Nakano et al. (2001) demonstrou que o CO<sub>2</sub> reduz a atividade da ACC sintase em caqui ‘Fuyu’. Já, o efeito do CO<sub>2</sub> na ACC oxidase foi descrita por Mathooko (1996). Esse autor afirma que a enzima ACC oxidase também pode ter sua atividade aumentada ou diminuída pelo CO<sub>2</sub>, dependendo do estímulo e da espécie. Dong et al. (1992) afirmam que o CO<sub>2</sub> atua reversivelmente ACC oxidase, e com isso, aumentando atividade dessa enzima. No efeito negativo, o CO<sub>2</sub> reduz a afinidade da ACC oxidase pelo seu substrato a ACC (MATHOOKO, 1996).

Diante dos benefícios da utilização do baixo O<sub>2</sub> e alto CO<sub>2</sub>, diversas pesquisas foram realizadas para encontrar a combinação ideal de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> para armazenar caqui ‘Fuyu’. Donazzolo (2001) e Neuwald (2004) afirmam que o armazenamento de caqui ‘Fuyu’ por até três meses, pode ser recomendado, se utilizar 0,5kPa de O<sub>2</sub> combinado com 5 a 10kPa de CO<sub>2</sub> na temperatura de -0,5°C, pois proporciona manutenção da firmeza de polpa, baixa incidência de escurecimento e podridão, além de coloração mais atrativa. No entanto, estes mesmo autores afirmam que ocorreu um rápido amolecimento após três dias de exposição à temperatura de 20°C. Dessa forma, pode-se concluir que ocorre desequilíbrio no metabolismo

do caqui 'Fuyu' mesmo armazenando em atmosfera controlada. Quando ocorre desequilíbrio no metabolismo da célula, o fruto manifesta distúrbios fisiológicos.

### 2.4.3 Distúrbio fisiológico devido o armazenamento refrigerado

Crisosto et al. (2003) afirmam que durante o armazenamento de caqui podem ocorrer diversos distúrbios fisiológicos. Os principais distúrbios são: escurecimento da casca e amolecimento. Esses dois distúrbios são responsáveis por grandes perdas em caquis armazenados.

#### 2.4.3.1 *Escurecimento da casca*

Distúrbios que se expressam como manchas escuras na casca podem apresentar diferenças no tamanho, relevo e posição na superfície do caqui. Lee et al. (1993) descreveu dois tipos de manchas na casca, que são: estrias ("blackning") e manchas escuras ("browning"). O caqui 'Fuyu' produzido no sul do Brasil apresenta, com maior frequência, a ocorrência de estrias.

As estrias tem sido identificados pela formação de pequenos pontos ou traços pretos (<2mm) alinhados na superfície (casca) dos frutos, formando feixes de linhas pontilhadas ou tracejadas ("estrias"). Normalmente, a ocorrência de estrias em caqui 'Fuyu' trata-se de um distúrbio fisiológico associado a condições pré-colheita, principalmente relacionados ao microclima (alta umidade relativa do ar, temperatura, frequência de serração e precipitação) e ao manejo do pomar (área foliar e manejo da vegetação nas linhas e entre linhas) (BURMEISTER et al., 1997). Não existem, na literatura, pesquisas relacionando a ocorrência de estrias e a fitotoxidez por substância química aplicada na pré-colheita, porém não se pode descarta essa probabilidade.

As causas do escurecimento em nível bioquímico ainda não são totalmente conhecidas. Mas, sabe-se que a quantidade de compostos fenólicos presentes nos frutos e a atividade da polifenol oxidase são determinantes no potencial de escurecimento dos frutos (KADER; CHORDAS, 1984). Assim, o escurecimento ocorre em função da reduzida permeabilidade das membranas plasmáticas, ocorrendo o encontro das polifenol oxidases com os substratos (LURIE; CRISOSTO, 2005).

No entanto, algumas formas de controle do escurecimento têm sido estudadas. O tratamento com antioxidantes e o uso de atmosfera controlada contribuem para a redução da

incidência do escurecimento (LEE et al., 1993). A utilização de antioxidantes como 2000ppm de difenilamina ou 2500ppm de etoxiquim reduziu a incidência de escurecimento, sendo possível que um processo de oxidação esteja envolvido (BURMEISTER et al., 1997). Já, o uso de atmosfera controlada, com a redução da concentração de O<sub>2</sub> de 21 para 4 a 6 kPa, diminuiu a afinidade da polifenol oxidase pelo seu substrato (PARK, 1997) e reduziu a oxidação de fenóis (BEN-ARIE; ZUTKHI, 1992).

#### 2.4.3.2 Amolecimento

O desenvolvimento de distúrbios, associado às alterações da textura da polpa, é o principal fator que limita o potencial de armazenamento refrigerado de caqui 'Fuyu'. Os principais sintomas desses distúrbios são: rápido e severo amolecimento da polpa, sem desenvolvimento de cor avermelhada e sabor, típicos da cultivar, aparência gelatinosa e perda da suculência e, em casos mais severos, formação de um gel firme. A textura gel firme caracteriza-se pela consistência "emborrachada" da polpa e perda da crocância e suculência. Sargent et al. (1993) afirmam que o amolecimento, aumenta com o tempo de armazenagem, atingindo o máximo quando os frutos são mantidos sob temperatura de 3 a 8°C. O amolecimento normalmente ocorre após a transferência dos frutos para a temperatura ambiente.

Em nível bioquímico supõe-se que o amolecimento ocorra devido a uma dramática mudança nas propriedades físico-químicas da parede celular, com a perda de polímeros de hemicelulose (GRANT et al., 1992) e de pectinas, com a subsequente falta de sua degradação, (WOOLF et al., 1997). Já, Nakano et al. (2003) afirmam que o amolecimento em caqui 'Saijo', é devido a um colapso interno das células. Esse colapso é devido à hidrólise imprópria das paredes celulares, causada por um desequilíbrio na atividade das enzimas pécticas durante o amadurecimento subsequente ao armazenamento a frio (BEN-ARIE; LAVEE, 1971). Essas modificações indesejáveis resultam na solubilização das pectinas, redução na remoção das cadeias laterais de galactanas e acúmulo de pectinas insolúveis, de elevado peso molecular, nas paredes celulares (BEN-ARIE; LAVEE, 1971; OBENLAND et al., 2003). Parte desses efeitos é atribuída à redução na atividade da poligalacturonase e ao aumento da atividade da pectinametilesterase (BEN-ARIE; LAVEE, 1971; BEN-ARIE; SONEGO, 1980). Os pectatos formam um gel na presença de água, resultando em perda da suculência (OBENLAND et al., 2003; BRUMMELL et al., 2004).

Fundamentado nas reações bioquímicas que ocorrem durante o processo de formação do amolecimento, vários estudos foram realizados para fornecer diversas técnicas que reduzam a sua ocorrência. Collins; Tisdell (1996) estudaram armazenamento de caqui 'Suruga' em altas temperaturas e observaram uma redução na incidência de amolecimento. Essa redução é devido a mudanças na atividade das enzimas que degradam a parede celular (BURMEISTER et al., 1997) ou diminuição da liberação de polímeros da parede celular (WOOLF et al., 1997). Já, Ben-Arie; Zutkhi (1992) e Burmeister et al. (1997) conseguiram reduzir o amolecimento com utilização de atmosfera controlada ou com atmosfera modificada. Estudos recentes demonstraram que o tratamento pós-colheita com inibidor da ação do etileno (1-MCP) reduz efetivamente o amolecimento da polpa em caqui 'Fuyu' (ARGENTA et al., 2002).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Foram conduzidos três experimentos no Núcleo de Pesquisa em Pós-Colheita do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), durante os anos de 2006 e 2007. O experimento I foi realizado no ano de 2006 e os experimentos II e III no ano de 2007.

#### **3.1 Material vegetal e preparo das amostras**

O material vegetal utilizado nos experimentos foi o caqui 'Fuyu', proveniente de um pomar comercial de Farroupilha, RS. Os caquis 'Fuyu', no momento da colheita, apresentavam-se no ano de 2006, produção de etileno menor que  $0,01\mu\text{l kg}^{-1}\text{hora}^{-1}$  e respiração menor que  $4\text{ ml CO}_2\text{ kg}^{-1}\text{hora}^{-1}$ , acidez de 1,1 meq/100mL, SST de 16,8 °Brix. Já, no ano de 2007 os frutos também tiveram produção de etileno menor que  $0,01\mu\text{l kg}^{-1}\text{hora}^{-1}$  e respiração menor que  $4\text{ ml CO}_2\text{ kg}^{-1}\text{hora}^{-1}$ , acidez de 0,99 meq/100mL e SST de 17,9 °Brix.

Antes da instalação dos experimentos foi efetuada seleção dos frutos, sendo descartados aqueles que apresentaram danos mecânicos, lesões causadas por insetos, podridões ou excessivamente maduros. As amostras experimentais foram homogeneizadas.

Em todos os experimentos, as amostras experimentais tinham 15 frutos e foram armazenadas em minicâmaras experimentais herméticas, com volume de 0,180 ou 0,232m<sup>3</sup>.

As minicâmaras foram acondicionadas no interior de uma câmara frigorífica de 48 m<sup>3</sup>, nas temperaturas de -0,5°C, 10°C, 12,5°C, 15°C e 17,5°C. A umidade relativa, no interior das minicâmaras, foi mantida em 95±1%. O controle da temperatura foi efetuado por meio de termostatos eletrônicos e determinada diariamente por meio de termômetros de bulbo de mercúrio com precisão de 0,1°C, inseridos na polpa de frutos.

## **3.2 Descrição dos experimentos**

### **3.2.1 Experimento I**

No primeiro experimento foram avaliadas oito condições de armazenamento: [1] 3 dias na temperatura de -0,5°C; [2] 6 dias na temperatura de -0,5°C; [3] 9 dias na temperatura de -0,5°C; [4] 6 dias na temperatura de 10°C; [5] 9 dias na temperatura de 10°C; [6] 15 dias na temperatura de 10°C; [7] 9 dias na temperatura de 15°C e [8] 15 dias na temperatura de 15°C. Os frutos foram analisados após exposição a 20°C, sendo avaliados diariamente até que 100% dos frutos apresentassem a consistência mole.

### **3.2.2 Experimento II**

No segundo experimento, os tratamentos foram originados de frutos sem e com aplicação de 1ppm de 1-metilciclopropeno (1-MCP) durante 24h, antes do armazenamento, nas condições: [1] armazenamento refrigerado (AR) na temperatura de -0,5°C; [2] AR na temperatura de 10°C; [3] AR na temperatura de 12,5°C; [4] AR na temperatura de 15°C e [5] AR na temperatura de 17,5°C. As análises laboratoriais foram realizadas após 1 e 2 meses de armazenamento, na saída dos frutos da câmara e após 2, 4 e 6 dias de exposição a 20°C. A exposição a 20°C tem por objetivo simular o período de comercialização.

### **3.2.3 Experimento III**

No terceiro experimento, foram avaliados os seguintes tratamentos (todos na temperatura de -0,5°C): [1] armazenamento refrigerado (AR); [2] aplicação de 1ppm de 1-MCP durante 24h e posterior armazenamento em AR; [3] armazenamento em AR e posterior aplicação de 1ppm de 1-MCP durante 24h; [4] atmosfera controlada (AC) com 1,0kPa de O<sub>2</sub>

+ 8,0kPa de CO<sub>2</sub>; [5] aplicação de 1ppm de 1-MCP durante 24h e posterior armazenamento em AC com 1,0kPa de O<sub>2</sub> + 8,0kPa de CO<sub>2</sub>; [6] armazenamento em AC com 1,0kPa de O<sub>2</sub> + 8,0kPa de CO<sub>2</sub> e posterior aplicação de 1ppm de 1-MCP durante 24h. As análises laboratoriais foram realizadas após 2 meses nos frutos armazenados em AR e após 4 meses nos frutos armazenados em AC, na saída dos frutos da câmara, e após 2, 4 e 6 dias a 20°C.

### 3.3 Manutenção das condições de armazenamento

As pressões parciais de O<sub>2</sub> foram obtidas por diluição, através de injeção de N<sub>2</sub> nas minicâmaras. O nitrogênio foi obtido por um equipamento gerador, que funciona pelo princípio “Pressure Swing Adsorption” (PSA), onde a passagem do ar por uma coluna de carvão ativado produz uma composição gasosa com cerca de 0,3kPa de O<sub>2</sub> e 99,7kPa de N<sub>2</sub>. As pressões parciais de CO<sub>2</sub> foram estabelecidas pela injeção desse gás, proveniente de cilindros de alta pressão, nas minicâmaras experimentais. As minicâmaras de AC foram conectadas a um controlador automático de gases da marca Kronenberger-Climasul<sup>®</sup>. O analisador efetuou a determinação e a correção das pressões parciais de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> das minicâmaras diversas vezes ao dia.

A aplicação do 1-MCP foi realizada no início do armazenamento ou na saída da câmara, dependendo do tratamento (ver experimentos), durante 24 horas na temperatura de armazenamento. Como fonte de 1-MCP foi utilizado o produto SmartFresh<sup>®</sup> (Rohm & Hass Co.) na formulação pó (0,14% do ingrediente ativo). A quantidade de produto, necessário para se obter a concentração desejada foi calculada em função do volume da minicâmara e da concentração do ingrediente ativo presente no produto comercial. Essa quantidade foi, então, colocada em frascos de vidro de 10mL, fechados hermeticamente com septos de borracha. Após a adição de água destilada e deionizada à temperatura ambiente, os frascos foram agitados vigorosamente, até o produto dissolver completamente. Os frascos foram colocados no interior das minicâmaras, onde previamente já estarão acondicionados os frutos. Finalmente, os frascos foram abertos e liberado a solução para placas de Petri, sendo as minicâmaras fechadas imediatamente, permanecendo assim durante 24 horas. A composição gasosa das minicâmaras foi renovada completamente depois de encerrado o período de tratamento, eliminando da câmara frigorífica o resíduo do produto.

### 3.4 Parâmetros avaliados

Nas análises laboratoriais foram avaliados os seguintes parâmetros:

- a) Atividade da ACC oxidase:** Foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Bufler (1986). Foram retiradas algumas amostras de casca da região equatorial dos frutos de cada unidade experimental, totalizando 3g. Estas, foram imediatamente incubadas numa solução contendo 0,1mM de ACC em 10mM do tampão MES (ácido 2 (N-morfolino) etanossulfônico) em pH 6,0. Após 30 minutos, as amostras foram acondicionadas em seringas herméticas de 50ml, nas quais foi adicionado 1mL de CO<sub>2</sub>. Depois de 30 minutos, a concentração de etileno presente nas seringas foi determinada, sendo os dados expressos em  $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .
- b) Produção de etileno:** Foi determinada a partir da composição gasosa formada após cerca de 2 horas em um recipiente hermético, com 5L de volume, contendo aproximadamente 1000g de frutos. Amostras de 1mL dessa composição foram injetadas em um cromatógrafo a gás, marca Varian<sup>®</sup>, modelo Star 3400CX equipado com coluna Poropak-N e detector de ionização de chama (FID), com temperaturas de 90, 120 e 200°C, nos compartimentos de injeção, da coluna e do detector, respectivamente. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ;
- c) Respiração:** Foi determinada com o auxílio de um analisador de CO<sub>2</sub> de fluxo contínuo, marca Agridatalog<sup>®</sup>, pelo qual foi circulada a composição gasosa dos recipientes, após a amostragem para a produção de etileno. Resultados foram expressos em  $\text{mL CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ;
- d) Firmeza da polpa:** Foi avaliada em dois lados opostos dos frutos, onde previamente foi retirada a epiderme. Para a determinação foi utilizado um penetrômetro manual com ponteira de 7,9mm (5/16”), sendo os valores expressos em Newton (N);
- e) Teor de sólidos solúveis totais (SST):** Foi obtido por refratometria a partir do suco extraído de cada amostra de 15 frutos. Os valores foram expressos em °Brix;
- f) Acidez titulável:** Foi determinada pela titulação, com NaOH 0,1N, de uma solução contendo 10mL de suco diluídos em 100mL de água destilada, até atingir pH 8,1. O pH foi determinado por um medidor de pH marca Digimed<sup>®</sup>. Os valores foram expressos em  $\text{meq } 100\text{mL}^{-1}$ ;

**g) Incidência de podridões:** Foi avaliada pela contagem dos frutos que apresentaram lesões com diâmetro superior a 5mm, características de ataque por fungos ou bactérias. Os resultados foram expressos em percentagem de frutos podres;

**h) Escurecimento da casca (análise subjetiva):** Foi determinado através dos seguintes índices: 0 = sem presença de escurecimento da casca; 1 = até 10% da superfície da casca escurecida; 2 = >10 a 20% da superfície da casca do fruto escurecida; 3 = >20% a 30% da superfície escurecida; e 4 = >30% da superfície da casca escurecida. O índice médio foi calculado através da soma dos produtos do número de frutos pelo seu respectivo nível de escurecimento, dividido pelo número total de frutos da amostra.

**i) Índice de amolecimento (análise subjetiva):** Foi determinado através dos seguintes índices: 0 = sem ocorrência de amolecimento; 1 = início e <10% do fruto amolecido; 2 = >10 a 50% do fruto amolecido; 3 = 100% do fruto amolecido. O índice médio foi calculado através da soma dos produtos do número de frutos pelo seu respectivo nível de amolecimento, dividido pelo número total de frutos da amostra.

### 3.5 Análises estatísticas

Em todos os experimentos, os dados foram analisados segundo o delineamento inteiramente casualizado. Cada tratamento foi constituído de quatro repetições, contendo 15 frutos, para cada avaliação.

Os dados expressos em percentagem foram transformados pela fórmula  $\arcseno(x + 0,5 / 100)^{1/2}$ , para serem submetidos com os demais à análise da variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey e Diferença Mínima Significativa (DMS).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Experimento I

#### 4.1.1 Influência da temperatura e do período de armazenamento sobre o amolecimento de caquis ‘Fuyu’

Foi observado que os frutos submetidos à temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$ , independente do número de dias armazenado, iniciam e atingem 100% do fruto amolecido alguns dias depois, comparando com os demais frutos sujeitos aos outros tratamentos (Tabela 1). Interessantemente, somando o período de armazenamento com o período para início, 50% e 100% do fruto amolecido, quase todos os tratamentos se equivalem. Desta maneira, fica claro a morte celular programada, que ocorre sob controle genético, em que processos de identificação bioquímica, molecular e física ocorrem de forma relativamente ordenada. Entretanto, deve ser ponderado que a metodologia utilizada na avaliação do amolecimento não garante que estes resultados representem à morte celular e, talvez, a determinação do conteúdo de ATP seja mais eficiente para relacionar a morte celular com o amolecimento.

Além disso, deve-se resaltar que o bloqueio do amadurecimento não é rompido com nove dias de exposição a  $-0,5^{\circ}\text{C}$ , pois, com aproximadamente 37 dias de exposição a  $20^{\circ}\text{C}$  (Tabela 1), o caqui atingiu 100% de amolecimento. O fato dos frutos armazenados em alta e baixa temperatura terem o período equivalente na ocorrência de 100% de amolecimento pode ser resultado do pouco tempo de exposição ao frio que, possivelmente, não foi suficiente para satisfazer totalmente a exigência de frio para estimular os processos de amadurecimento. Porém, a exposição dos frutos por nove dias a  $10^{\circ}\text{C}$ , ocasionou o amolecimento mais rápido, quando comparado a  $10^{\circ}\text{C}$  por um mesmo período (Tabela 1).

No entanto, nenhum trabalho foi encontrado, na literatura, com estudos em caqui ‘Fuyu’ e exposição em diferentes períodos e temperaturas. Mas, Seibert et al. (2000) afirmam que as pêras européias necessitam de um período de tempo em temperatura baixa, com posterior exposição à temperatura ambiente, para completar o amadurecimento, caracterizado por perda da firmeza dos tecidos. Segundo esses mesmos autores, a diminuição da firmeza da polpa é devido, basicamente, à dissociação das paredes celulares, com diminuição no grau de polimerização de ácidos urônicos que geralmente é acompanhado de aumento nos teores de pectinas solúveis.

**TABELA 1: Número de dias a 20°C para ocorrer amolecimento em caqui ‘Fuyu’ após o armazenamento refrigerado. Santa Maria, RS, 2006.**

Tratamentos		Porcentagem do fruto amolecido		
Dias de armazenamento	Temperatura (°C)	<i>Início</i>	<i>50%</i>	<i>100%</i>
		<i>Número de dias a 20°C</i>		
3	-0,5	6,50 a*	25,0 ab	41,0 a
6	-0,5	7,50 a	28,0 a	36,7 b
9	-0,5	6,50 a	27,2 ab	35,5 bc
6	10	6,50 a	19,0 c	32,0 d
9	10	4,25 ab	20,0 c	31,7 d
15	10	0,25 b	17,2 c	29,0 e
9	15	4,75 ab	24,2 b	34,7 c
15	15	0,25 b	17,2 c	28,7 e
C.V. (%)		6,74	9,75	2,57

\*Mesma letra na coluna não difere entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A respiração dos frutos mostrou um comportamento intrigante. Os frutos submetidos à temperatura de -0,5°C apresentaram alta respiração na saída da câmara e que, com o tempo, foi reduzindo (Tabela 2). Já, os demais frutos submetidos aos outros tratamentos apresentaram o pico de respiração aos 24 e 28 dias de exposição a 20°C. Muitos estudos afirmam que a baixa temperatura afeta as enzimas e, por isso, possivelmente a respiração (CRISOSTO et al., 2003). Assim, a taxa respiratória aumenta de 2 a 2,5 vezes a cada aumento de 10°C. Provavelmente, a alta respiração dos frutos submetidos à baixa temperatura ocorreu devido a uma resposta ao estresse. O estresse pode ser caracterizado pela alta respiração, que ocorre devido a uma rota alternativa resistente ao cianureto que é um meio de oxidação de substratos que se encontra em nível elevado, com baixa produção de energia (SOLOMOS, 1977).

A produção de etileno, pelos frutos, teve um comportamento ainda mais interessante. Frutos submetidos à temperatura de -0,5°C tiveram o pico de produção de etileno aos 8, 16 e 28 dias de exposição a 20°C quando armazenados durante 3, 6 e 9 dias, respectivamente (Tabela 3). Já, os frutos acondicionados nos demais tratamentos tiveram o pico de produção do etileno aos 28 dias de exposição a 20°C.

Fica evidente na respiração, que o caqui ‘Fuyu’ apresenta um sinal de estresse a baixas temperaturas, porém, a produção de etileno não acompanha a respiração. Aparentemente, a produção de etileno, tem seu pico programado.

De forma geral, precisaríamos entender quantos dias de exposição a -0,5°C são necessários para satisfazer as exigências de frio para estimular o amadurecimento. Além

disso, compreender em qual etapa da pós-colheita o processo de respiração e produção de etileno são respostas da ocorrência do acúmulo de frio, caracterizado pelo amolecimento. Para compreender essas dúvidas foram realizados os experimentos II e III.

#### 4.1.2 Conclusões

O período de 9 dias na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$  não fornece frio suficiente para estimular o processo de maturação do caqui, não alterando a produção de etileno e a respiração do fruto em relação a  $15^{\circ}\text{C}$ .

A temperatura de  $10^{\circ}\text{C}$  é mais eficiente para desencadear o processo de amadurecimento quando comparado com a temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$ .

**TABELA 2. Respiração (ml CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> hora<sup>-1</sup>) em caqui ‘Fuyu’ após o armazenamento e durante a exposição a 20°C. Santa Maria, RS, 2006.**

Tratamentos		Exposição a 20°C							
Dias de armazenamento	Temperatura (°C)	Saída	4 dias	8 dias	12 dias	16 dias	20 dias	24 dias	28 dias
3	-0,5	9,11 ab	6,32 a*	5,76 ab	4,65 b	4,55 b	5,02 b	5,91 cb	5,88 cd
6	-0,5	10,36 a	6,26 a	4,18 b	4,36 bc	4,50 b	4,80 b	5,01 c	7,44 bc
9	-0,5	8,71 ab	5,83 a	4,84 ab	3,38 d	4,19 b	4,17 b	5,94 bc	5,31 cd
6	10	8,30 ab	5,82 a	5,15 ab	4,29 bcd	5,46 b	7,28 a	7,99 bc	14,33 a
9	10	6,92 bc	5,89 a	6,31 a	3,50 cd	4,74 b	5,22 b	6,52 bc	4,62 d
15	10	6,76 bc	4,51 b	4,79 ab	6,13 a	8,36 a	7,48 a	20,74 a	6,00 cd
9	15	5,22 c	4,77 b	4,89 ab	3,98 bcd	4,76 b	4,28 b	5,02 c	5,08 cd
15	15	5,26 c	4,08 b	4,60 ab	5,56 a	4,99 b	6,98 a	9,68 b	9,60 b
C.V. (%)		22,17	10,09	22,28	13,29	31,05	15,49	30,73	22,47

\*Mesma letra na coluna não difere entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

**TABELA 3. Etileno (µl de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> kg<sup>-1</sup> hora<sup>-1</sup>) em caqui ‘Fuyu’ após o armazenamento e durante a exposição a 20°C. Santa Maria, RS, 2006.**

Tratamentos		Exposição a 20°C							
Dias de armazenamento	Temperatura (°C)	Saída	4 dias	8 dias	12 dias	16 dias	20 dias	24 dias	28 dias
3	-0,5	0,04 a*	0,02 b	0,16 a	0,07 a	0,02 b	0,06 b	0,05 c	0,06 c
6	-0,5	0,03 ab	0,05 a	0,02 b	0,02 ab	0,09 a	0,01 b	0,04 c	0,03 c
9	-0,5	0,02 b	0,01 b	0,04 ab	0,01 b	0,01 b	0,06 b	0,06 c	0,15 c
6	10	0,01 b	0,03 b	0,03 ab	0,07 a	0,08 a	0,03 b	0,07 c	0,12 c
9	10	0,01 b	0,02 b	0,07 ab	0,05 ab	0,04 b	0,08 b	0,08 c	0,43 b
15	10	0,01 b	0,02 b	0,06 ab	0,04 ab	0,09 a	0,09 b	0,40 b	0,88 a
9	15	0,01 b	0,01 b	0,04 ab	0,06 ab	0,03 b	0,05 b	0,03 c	0,17 c
15	15	0,02 b	0,02 b	0,06 ab	0,04 ab	0,09 a	0,28 a	0,77 a	0,87 a
C.V. (%)		63,36	56,85	59,52	76,38	51,07	66,46	40,59	36,88

\*Mesma letra na coluna não difere entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

## 4.2 Experimento II

### 4.2.1 Ação do etileno, em diferentes temperaturas, após um mês de armazenamento refrigerado, em caqui 'Fuyu'

Após um mês de armazenamento, na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$  ficou evidente que a exposição por este período, ocasiona rápido amolecimento (Tabela 4). Os frutos que ficaram na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$ , sem aplicação de 1-MCP, amoleceram mais rápido que os frutos na temperatura de  $17,5^{\circ}\text{C}$ , também sem aplicação de 1-MCP. Porém, quanto maior o tempo de exposição na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$ , mais rápido será o amolecimento (ARGENTA et al., 2002). Assim, a exposição durante um mês na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$  foi suficiente para romper o mecanismo da inibição do amadurecimento. O mecanismo pode estar relacionado com ativação de enzimas que degradam a parede celular.

Além disso, as temperaturas de 10; 12,5 e  $15^{\circ}\text{C}$  ocasionaram amolecimento mais intenso nos frutos de caqui 'Fuyu', do que quando armazenados na temperatura de  $17,5^{\circ}\text{C}$ , tanto em frutos com ou sem 1-MCP (Tabela 4). Assim, as temperaturas de 10; 12,5 e  $15^{\circ}\text{C}$  podem ser consideradas temperaturas críticas, para o caqui 'Fuyu', durante um mês de armazenamento. Resultados semelhantes foram encontrados por Crisosto et al. (2003), esses autores, afirmam que o caqui 'Fuyu' é suscetível ao dano por frio entre as temperaturas de 5 a  $15^{\circ}\text{C}$ , tendo um comportamento semelhante a uma parábola. Entretanto, os frutos armazenados na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$  mais aplicação de 1-MCP apresentaram menor índice de amolecimento na saída, 2, 4 e 6 dias de exposição a  $20^{\circ}\text{C}$ . Isso demonstra que, o amolecimento pode ter relação com a produção e/ou percepção do etileno pelos frutos.

A produção de etileno, na saída da câmara e aos seis dias de exposição a  $20^{\circ}\text{C}$ , foi maior em frutos submetidos ao tratamento na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$ , com ou sem aplicação de 1-MCP, diferindo estatisticamente dos demais (Tabela 5). Aos dois dias de exposição a  $20^{\circ}\text{C}$ , os frutos que estavam armazenados na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$ , com ou sem aplicação de 1-MCP, tiveram a maior produção de etileno (Tabela 5). Aos quatro dias de exposição a  $20^{\circ}\text{C}$ , os frutos que estavam armazenados na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$ , sem aplicação de 1-MCP, e na temperatura de  $12,5^{\circ}\text{C}$ , com aplicação de 1-MCP, tiveram a maior produção de etileno (Tabela 5). Já, os frutos que produziram pouco etileno, não identificado pela cromatografia gasosa, ocorreu, provavelmente, devido a perda da integridade das membranas das células dos frutos e a capacidade em manter a homeostase.

**TABELA 4. Índice de amolecimento (0-3)\*\* em caqui ‘Fuyu’ após um mês de armazenamento refrigerado. Santa Maria, RS, 2007.**

Tratamentos		Exposição a 20°C			
Temperatura (°C)	MCP (1ppm)	Saída	2 dias	4 dias	6 dias
-0,5	Não	0,02 c*	1,10 bc	1,83 b	2,48 a
10,0	Não	2,10 a	2,78 a	-	-
12,5	Não	0,99 b	2,71 a	-	-
15,0	Não	2,18 a	2,55 a	-	-
17,5	Não	0,57 bc	0,79 cd	0,81 cd	1,31 bc
-0,5	Sim	0,00 c	0,09 e	0,11 e	0,13 d
10,0	Sim	0,61 bc	1,56 b	2,65 a	-
12,5	Sim	0,57 bc	1,04 cd	1,39 bc	1,73 b
15,0	Sim	0,43 bc	1,11 bc	1,19 cd	1,51 b
17,5	Sim	0,42 bc	0,55 de	0,71 de	0,84 c
C. V. (%)		35,52	14,92	21,48	18,17

\* Mesma letra na coluna não difere entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade de erro.

\*\*0- Sem amolecimento; 1- Início a <10%; 2- >10 a 50% e 3- 100% de amolecimento.

No entanto, um comportamento interessante ocorreu nos frutos submetidos ao armazenamento na temperatura de -0,5°C, sem aplicação de 1-MCP, onde, o pico do etileno apresentou-se nitidamente aos 2 dias de exposição a 20°C, diferentemente dos frutos acondicionados na temperatura de -0,5°C, com aplicação de 1-MCP, em que, não foi constatado o pico característico de produção de etileno, durante os 6 dias de exposição a 20°C (Tabela 5).

A respiração, na saída da câmara, foi maior nos frutos submetidos ao armazenamento na temperatura de -0,5°C, com ou sem aplicação de 1-MCP (Tabela 6). Aos dois dias de exposição a 20°C, os frutos que estavam armazenados na temperatura de -0,5; 10 e 15°C, sem aplicação de 1-MCP, e na temperatura de -0,5°C, com aplicação de 1-MCP, tiveram a maior respiração (Tabela 6). Já, aos quatro e seis dias de exposição a 20°C os frutos que estavam armazenados na temperatura de -0,5°C, sem aplicação de 1-MCP, tiveram a maior respiração. Além disso, o pico respiratório ocorreu apenas nos frutos que estavam armazenados na temperatura de -0,5°C e sem aplicação de 1-MCP. Nesses frutos, o pico de respiração ocorreu aos quatro dias de exposição a 20°C.

**TABELA 5. Produção de etileno ( $\mu\text{L}$  de  $\text{C}_2\text{H}_4$   $\text{kg}^{-1}$   $\text{hora}^{-1}$ ) em caqui ‘Fuyu’ após um mês de armazenamento refrigerado. Santa Maria, RS, 2007.**

Tratamentos		Exposição a 20°C			
Temperatura (°C)	MCP (1ppm)	Saída	2 dias	4 dias	6 dias
-0,5	Não	0,26 a*	1,21 a	0,33 a	0,09 b
10,0	Não	0,00 c	0,00 b	-	-
12,5	Não	0,00 c	0,00 b	-	-
15,0	Não	0,00 c	0,00 b	-	-
17,5	Não	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,08 b
-0,5	Sim	0,22 b	0,14 b	0,00 b	0,20 a
10,0	Sim	0,00 c	0,07 b	0,00 b	-
12,5	Sim	0,00 c	0,14 b	0,43 a	0,00 d
15,0	Sim	0,00 c	0,09 b	0,00 b	0,00 d
17,5	Sim	0,00 c	0,04 b	0,00 b	0,06 c
C. V. (%)		15,93	59,45	39,62	20,18

\* Mesma letra na coluna não difere entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade de erro.

**TABELA 6. Respiração ( $\text{ml CO}_2$   $\text{kg}^{-1}$   $\text{hora}^{-1}$ ) em caqui ‘Fuyu’ após um mês de armazenamento refrigerado. Santa Maria, RS, 2007.**

Tratamentos		Exposição a 20°C			
Temperatura (°C)	MCP (1ppm)	Saída	2 dias	4 dias	6 dias
-0,5	Não	18,47 a*	11,85 a	13,59 a	10,69 a
10,0	Não	15,68 b	11,09 ab	-	-
12,5	Não	11,96 cd	9,43 bc	-	-
15,0	Não	13,65 bc	10,68 ab	-	-
17,5	Não	7,67 fg	5,67 d	8,02 c	6,74 cd
-0,5	Sim	19,22 a	10,30 ab	10,39 b	8,46 b
10,0	Sim	12,95 c	9,27 bc	10,91 b	-
12,5	Sim	10,53 de	7,62 cd	8,51 c	8,33 b
15,0	Sim	9,65 ef	6,58 d	8,30 c	8,05 bc
17,5	Sim	7,36 g	5,87 d	6,07 d	6,17 d
C. V. (%)		5,90	9,27	4,44	6,03

\* Mesma letra na coluna não difere entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade de erro.

Analisando de forma conjunta o índice de amolecimento, produção de etileno e respiração nos frutos armazenados na temperatura de  $-0,5^\circ\text{C}$ , sem aplicação de 1-MCP, nota-se uma seqüência de eventos muito interessante. A seqüência pode ser descrita como: 1º) aos dois dias de exposição a  $20^\circ\text{C}$  ocorre o pico de produção de etileno (Tabela 5); 2º) aos quatro dias de exposição a  $20^\circ\text{C}$  ocorre o pico de respiração (Tabela 6) e 3º) aos seis dias de exposição a  $20^\circ\text{C}$  os frutos estão, quase, 100% amolecidos (Tabela 4). Porém, intrigantemente, os frutos armazenados na temperatura de  $-0,5^\circ\text{C}$ , com aplicação de 1-MCP,

produziram etileno e respiraram, no entanto, não apresentaram pico climatérico e os frutos mantiveram a consistência firme durante os seis dias de exposição a 20°C. Apesar de produzir etileno, os receptores para esse fitohormônio, estavam bloqueados pelo 1-MCP e assim, provavelmente, não ativou as enzimas pectolíticas.

A ocorrência de podridão, na saída da câmara, foi menor nos frutos que estavam armazenados na temperatura de -0,5 e 12,5°C, sem aplicação de 1-MCP e na temperatura de -0,5 e 15°C, com aplicação de 1-MCP (Tabela 7). Aos dois, quatro e seis dias de exposição a 20°C os frutos que estavam armazenados na temperatura de -0,5°C, com e sem aplicação de 1-MCP, apresentaram menor incidência de podridão (Tabela 7). Eshel et al. (2002) afirmam que o armazenamento de caqui por curtos períodos, até um mês, não ocorre altas porcentagens de podridões. Porém, Gorini; Lestoni (1988) afirmam que longos períodos ocasionam alta incidência de podridão, podendo ocorrer perdas de até 100%.

**TABELA 7. Porcentagem de podridão em caqui ‘Fuyu’ após um mês de armazenamento refrigerado. Santa Maria, RS, 2007.**

Tratamentos		Exposição a 20°C			
Temperatura (°C)	MCP (1ppm)	Saída	2 dias	4 dias	6 dias
-0,5	Não	2,08 c*	4,17 bc	5,09 ab	6,09 a
10,0	Não	7,32 b	7,48 abc	-	-
12,5	Não	0,00 c	8,85 abc	-	-
15,0	Não	23,80 a	24,70 a	-	-
17,5	Não	7,32 b	14,10 ab	14,50 ab	19,00 a
-0,5	Sim	0,00 c	2,08 c	2,08 b	7,69 a
10,0	Sim	7,57 b	9,71 abc	10,80 ab	-
12,5	Sim	14,80 ab	17,40 a	19,00 a	21,30 a
15,0	Sim	0,00 c	3,57 c	5,46 ab	16,10 a
17,5	Sim	7,42 b	7,89 abc	14,50 ab	15,90 a
C. V. (%)		28,26	38,86	51,34	43,26

\* Mesma letra na coluna não difere entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade de erro.

A incidência de escurecimento nos frutos, na saída da câmara, foi pequena, inferior a 10% da superfície da epiderme (Tabela 8). No entanto, deve-se destacar a evolução do escurecimento nos frutos submetidos à temperatura de -0,5°C, com ou sem aplicação de 1-MCP. Nesses frutos, na saída da câmara, o escurecimento era inferior a 10%, porém, aos 4 e 6 dias de exposição a 20°C apresentavam uma epiderme com 10 a 20% de escurecimento (Tabela 8). Esse comportamento de evolução do escurecimento pode ser explicado pela temperatura, pois, a temperatura de -0,5°C reduz atividade de muitas enzimas, entre elas, a



polifenol oxidase (PPO). A polifenol oxidase (PPO) é a enzima responsável pelo escurecimento em caqui (PARK, 1997). Dessa forma, provavelmente, a polifenol oxidase (PPO) estava pouco ativa na saída da câmara, mas, quando os frutos foram expostos a 20°C a PPO tornou-se muito ativa, o que ocasionou alta incidência de escurecimento.

Contudo, teríamos que estudar a resposta do caqui 'Fuyu' por um período de dois meses em armazenamento refrigerado, assim, realizamos outro experimento para elucidar o período crítico de ocorrência do amolecimento.

**TABELA 8. Índice de escurecimento (0-4)\*\* em caqui 'Fuyu' após um mês de armazenamento refrigerado. Santa Maria, RS, 2007.**

Tratamentos		Exposição a 20°C			
Temperatura (°C)	MCP (1ppm)	Saída	2 dias	4 dias	6 dias
-0,5	Não	0,39 d*	1,69 a	2,15 ab	2,32 ab
10,0	Não	0,37 d	1,43 bc	-	-
12,5	Não	0,37 d	1,30 bc	-	-
15,0	Não	1,27 ab	1,52 b	-	-
17,5	Não	1,23 abc	1,43 bc	1,45 bc	1,92 ab
-0,5	Sim	0,58 d	2,39 a	2,64 a	2,70 a
10,0	Sim	1,33 a	1,62 b	1,71 bc	-
12,5	Sim	0,81 bcd	1,09 c	1,21 c	1,41 b
15,0	Sim	0,75 cd	1,32 bc	1,36 bc	1,59 b
17,5	Sim	0,78 bcd	1,49 bc	1,56 bc	1,65 b
C. V. (%)		27,33	11,68	20,66	20,97

\* Mesma letra na coluna não difere entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade de erro.

\*\*0- sem; 1- início e <10%; 2- >10 a 20%; 3- >20 a 30% e 4- >30% de escurecimento.

#### 4.2.2 Ação do etileno, em diferentes temperaturas, após dois meses de armazenamento refrigerado, em caqui 'Fuyu'

A ocorrência do amolecimento, na saída da câmara, não foi constatada nos frutos que estavam armazenados na temperatura de -0,5°C, com ou sem aplicação de 1-MCP (Tabela 9). Aos dois dias de exposição a 20°C, os frutos que foram submetidos ao armazenamento na temperatura de -0,5°C, com ou sem aplicação de 1-MCP, apresentaram a menor ocorrência de amolecimento (Tabela 9). Já, aos quatro e seis dias de exposição a 20°C, os frutos que estavam armazenados na temperatura de -0,5°C, com aplicação de 1-MCP, apresentaram o menor índice de amolecimento (Tabela 9). A temperatura de 17,5°C não desbloqueou o processo de amadurecimento mantendo-se mais firme que frutos expostos a 10; 12,5 e 15°C

durante os seis dias de exposição a 20°C (Tabela 9). Outro aspecto interessante foi a pouca atuação do 1-MCP nos frutos submetidos a altas temperaturas (10, 12,5 e 15°C), isso provavelmente foi devido à síntese de novos receptores do etileno.

Entretanto, o comportamento dos frutos que estavam armazenados na temperatura de -0,5°C, sem aplicação de 1-MCP, deve ser ressaltado. Esses frutos, na saída da câmara, apresentavam-se todos firmes, porém, com a exposição a 20°C perderam rapidamente a firmeza, caracterizado pelo amolecimento. O amolecimento foi de quase 100% aos 4 dias de exposição a 20°C (Tabela 9). Assim, armazenando caqui 'Fuyu' por um mês, na temperatura de -0,5°C, sem aplicação de 1-MCP, os frutos têm quase 100% de amolecimento aos 6 dias de exposição a 20°C (Tabela 4), e, armazenado por 2 meses na mesma condição, os frutos ficam totalmente sem firmeza aos 4 dias. Com isso, fica evidente que quanto maior o período de exposição na temperatura de -0,5°C, mais rápido será a perda de firmeza. Esses resultados estão de acordo com Argenta et al. (2002). Esses autores afirmam que quanto maior o tempo de exposição na temperatura de -0,5°C, mais rápido será o amolecimento.

Além disso, deve-se salientar que a única forma de armazenar caqui por dois meses, sem que ocorra rápido amolecimento quando exposto à temperatura de 20°C, é utilizando a temperatura de -0,5°C, com aplicação de 1-MCP. Ainda, os frutos submetidos à temperatura de 10; 12,5; 15 e 17,5°C, com ou sem aplicação de 1-MCP, tiveram rápida perda de firmeza (Tabela 9), assim, é impossível armazenar caqui 'Fuyu', nestas temperaturas, por dois meses.

**TABELA 9. Índice de amolecimento (0-3)\*\* em caqui 'Fuyu' após dois meses de armazenamento refrigerado. Santa Maria, RS, 2007.**

Tratamentos		Exposição a 20°C			
Temperatura (°C)	MCP (1ppm)	Saída	2 dias	4 dias	6 dias
-0,5	Não	0,00 c*	0,86 d	2,96 a	-
10,0	Não	3,00 a	-	-	-
12,5	Não	2,60 a	-	-	-
15,0	Não	3,00 a	-	-	-
17,5	Não	1,39 b	1,67 bc	2,34 ab	-
-0,5	Sim	0,00 c	0,03 e	0,11 d	0,36 b
10,0	Sim	1,63 b	2,18 ab	2,63 a	-
12,5	Sim	0,82 bc	1,54 bcd	1,63 bc	2,14 a
15,0	Sim	1,16 b	2,82 a	-	-
17,5	Sim	1,08 b	1,29 cd	1,44 c	1,88 a
C. V. (%)		24,15	23,22	17,77	33,81

\* Mesma letra na coluna não difere entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade de erro.

\*\*0- Sem amolecimento; 1- Início a <10%; 2- >10 a 50% e 3- 100% de amolecimento.

A produção de etileno, pelos frutos armazenados nas temperaturas de 10; 12,5 e 15°C, não foi determinada (Tabela 10), pois, os frutos estavam com o amolecimento muito avançado (Tabela 9). Na saída da câmara, a produção de etileno foi maior em frutos que estavam armazenados na temperatura de -0,5°C, sem aplicação de 1-MCP (Tabela 10). Aos dois dias de exposição a 20°C, os frutos submetidos nas temperaturas de -0,5°C, sem aplicação de 1-MCP, e 15°C, com aplicação de 1-MCP, produziram mais etileno (Tabela 10). Enquanto, aos quatro e seis dias de exposição a 20°C, os frutos acondicionados na temperatura de -0,5°C, com aplicação de 1-MCP, produziram mais etileno. Além disso, o comportamento da produção de etileno pelos frutos armazenados na temperatura de -0,5°C, sem aplicação de 1-MCP, deve ser mencionado. Esses frutos tiveram o pico de produção de etileno aos 2 dias de exposição a 20°C (Tabela 10). Já, os frutos que estavam na temperatura de -0,5°C, com aplicação de 1-MCP, e quando expostos durante seis dias na temperatura de 20°C não apresentaram um pico de produção de etileno, porém, tiveram um aumento na produção (Tabela 10).

**TABELA 10. Produção de etileno ( $\mu\text{L de C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ hora}^{-1}$ ) em caqui ‘Fuyu’ após dois meses de armazenamento refrigerado. Santa Maria, RS, 2007.**

Tratamentos		Exposição a 20°C			
Temperatura (°C)	MCP (1ppm)	Saída	2 dias	4 dias	6 dias
-0,5	Não	0,13 a*	0,29 a	0,19 a	-
10,0	Não	-	-	-	-
12,5	Não	-	-	-	-
15,0	Não	-	-	-	-
17,5	Não	0,00 c	0,13 bc	0,00 b	-
-0,5	Sim	0,07 b	0,13 bc	0,21 a	0,28 a
10,0	Sim	0,00 c	0,05 cd	0,00 b	-
12,5	Sim	0,00 c	0,11 c	0,00 b	0,20 a
15,0	Sim	0,00 c	0,22 ab	-	-
17,5	Sim	0,00 c	0,00 d	0,00 b	0,00 b
C. V. (%)		5,55	23,79	60,13	30,44

\* Mesma letra na coluna não difere entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade de erro.

A respiração, na saída câmara, aos dois e quatro dias de exposição a 20°C, foi maior pelos frutos que estavam armazenados na temperatura de -0,5°C, sem aplicação de 1-MCP (Tabela 11). Aos seis dias de exposição a 20°C a respiração foi maior nos frutos que estavam armazenados na temperatura de -0,5°C, com aplicação de 1-MCP. Além disso, o comportamento respiratório dos frutos durante a exposição a 20°C, após armazenamento na

temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$ , sem aplicação de 1-MCP, deve ser mencionado. Esses frutos, não tiveram pico respiratório durante a exposição a  $20^{\circ}\text{C}$ , após dois meses de armazenamento (Tabela 11), diferentemente, quando armazenados por um mês (Tabela 6). Já, os frutos que estavam armazenados na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$ , com aplicação de 1-MCP, tiveram o pico respiratório aos quatro dias de exposição a  $20^{\circ}\text{C}$ .

**TABELA 11. Respiração ( $\text{ml CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ hora}^{-1}$ ) em caqui 'Fuyu' após dois meses de armazenamento refrigerado. Santa Maria, RS, 2007.**

Tratamentos		Exposição a $20^{\circ}\text{C}$			
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	MCP (1ppm)	Saída	2 dias	4 dias	6 dias
-0,5	Não	16,42 a*	14,54 a	13,97 a	-
10,0	Não	-	-	-	-
12,5	Não	-	-	-	-
15,0	Não	-	-	-	-
17,5	Não	8,12 b	8,87 bc	8,79 bc	-
-0,5	Sim	12,86 ab	10,84 ab	11,44 ab	10,45 a
10,0	Sim	11,04 ab	8,94 bc	12,19 ab	-
12,5	Sim	10,35 b	9,85 bc	9,60 abc	8,42 a
15,0	Sim	8,34 b	7,70 bc	-	-
17,5	Sim	7,97 b	6,39 c	6,64 c	7,37 a
C. V. (%)		19,28	15,61	15,76	35,38

\* Mesma letra na coluna não difere entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade de erro.

Novamente, analisando o índice de amolecimento, produção de etileno e respiração nos frutos armazenados na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$ , sem aplicação de 1-MCP, nota-se uma seqüência de eventos. A seqüência pode ser descrita como: 1º) aos dois dias de exposição a  $20^{\circ}\text{C}$  ocorre o pico de produção de etileno pelos frutos (Tabela 10); 2º) o pico respiratório, pelos frutos, não ocorre durante a exposição a  $20^{\circ}\text{C}$  (Tabela 11) e 3º) aos quatro dias de exposição a  $20^{\circ}\text{C}$  os frutos estão, quase, 100% amolecidos (Tabela 9). No entanto, os frutos armazenados na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$ , com aplicação de 1-MCP, produziram etileno e tiveram pico respiratório (Tabelas 10 e 11) e os frutos mantiveram a consistência firme durante os seis dias de exposição a  $20^{\circ}\text{C}$ .

A ocorrência de podridão, na saída da câmara e aos dois dias de exposição a  $20^{\circ}\text{C}$ , foi menor nos frutos que estavam armazenados na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$ , com ou sem aplicação de 1-MCP (Tabela 12). Aos seis dias de exposição a  $20^{\circ}\text{C}$  os frutos que ficaram acondicionados na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$ , com aplicação de 1-MCP, apresentaram a menor ocorrência de podridão. Já, o índice de escurecimento, na saída da câmara, foi menor nos frutos armazenados na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$ , com ou sem aplicação de 1-MCP (Tabela 13).

Aos dois e quatro dias de exposição a 20°C os frutos que estavam armazenados na temperatura de -0,5°C, com ou sem aplicação de 1-MCP, tiveram rápido aumento no índice de escurecimento da epiderme (Tabela 13). Aos seis dias de exposição a 20°C os frutos que foram acondicionados na temperatura de -0,5°C, com aplicação de 1-MCP, tiveram a maior incidência de escurecimento da epiderme chegando ao índice de 2,33, onde o máximo é 4 (Tabela 13).

**TABELA 12. Porcentagem de podridão em caqui 'Fuyu' após dois meses de armazenamento refrigerado. Santa Maria, RS, 2007.**

Tratamentos		Exposição a 20°C			
Temperatura (°C)	MCP (1ppm)	Saída	2 dias	4 dias	6 dias
-0,5	Não	0,00 e*	0,00 c	0,00 d	-
10,0	Não	17,03 cd	-	-	-
12,5	Não	26,19 bc	-	-	-
15,0	Não	44,14 a	-	-	-
17,5	Não	33,33 ab	35,25 a	37,25 ab	-
-0,5	Sim	0,00 e	4,17 c	7,74 cd	11,90 b
10,0	Sim	16,49 cd	17,85 ab	24,23 ab	-
12,5	Sim	10,99 d	13,07 b	15,88 bc	18,40 ab
15,0	Sim	29,80 abc	33,77 a	-	-
17,5	Sim	32,14 ab	35,30 a	38,25 a	43,65 a
C. V. (%)		16,71	26,26	28,11	39,77

\* Mesma letra na coluna não difere entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade de erro.

**TABELA 13. Índice de escurecimento (0-4)\*\* em caqui 'Fuyu' após dois meses de armazenamento refrigerado. Santa Maria, RS, 2007.**

Tratamentos		Exposição a 20°C			
Temperatura (°C)	MCP (1ppm)	Saída	2 dias	4 dias	6 dias
-0,5	Não	0,75 bc*	1,88 ab	2,49 a	-
10,0	Não	1,57 a	-	-	-
12,5	Não	1,46 a	-	-	-
15,0	Não	1,24 ab	-	-	-
17,5	Não	1,52 a	1,91 ab	2,02 abc	-
-0,5	Sim	0,40 c	2,09 a	2,18 ab	2,33 a
10,0	Sim	1,40 a	1,43 ab	1,49 cd	-
12,5	Sim	1,11 ab	1,25 b	1,32 d	1,34 b
15,0	Sim	1,18 ab	1,49 ab	-	-
17,5	Sim	1,48 a	1,51 ab	1,59 bcd	1,68 b
C. V. (%)		17,34	20,94	14,69	11,96

\* Mesma letra na coluna não difere entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade de erro.

\*\*0- sem; 1- início e <10%; 2- >10 a 20%; 3- >20 a 30% e 4- >30% de escurecimento.

Além dos parâmetros apresentados, foi realizada acidez titulável e SST, tanto nos frutos que ficaram armazenados por um ou dois meses, porém, não houve diferença significativa entre os tratamentos (dados não apresentados).

#### 4.2.3 Conclusões

O armazenamento de caqui 'Fuyu' por um mês na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$  é suficiente para satisfazer totalmente a exigência de frio para estimular o processo de amadurecimento, com 100% dos frutos amolecidos aos 6 dias de exposição a  $20^{\circ}\text{C}$ . Já, o armazenamento por dois meses na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$  acelera o processo de amadurecimento e tornando 100% dos frutos amolecidos aos 4 dias de exposição a  $20^{\circ}\text{C}$ .

As temperaturas de 10; 12,5 e  $15^{\circ}\text{C}$  ocasionam amolecimento dos frutos durante o armazenamento, o que indica que essas temperaturas por longo período de tempo também são eficientes no desbloqueio do amadurecimento e a aplicação de 1-MCP, nessas temperaturas, não foi totalmente eficiente no controle do processo de amadurecimento do caqui 'Fuyu'. Além disso, o amolecimento tem relação com o etileno e mais provavelmente com o seu receptor.

A temperatura de  $17,5^{\circ}\text{C}$  não desbloqueou totalmente o processo de maturação, fazendo com que os frutos, na saída da câmara, se mantivessem mais firmes que os frutos a 10; 12,5 e  $15^{\circ}\text{C}$ . O caqui 'Fuyu' armazenado por dois meses em armazenamento refrigerado na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$  com aplicação de 1-MCP mantém a firmeza de polpa, mesmo aos 6 dias de exposição a  $20^{\circ}\text{C}$ . Aparentemente ocorre uma interação entre o frio ( $-0,5^{\circ}\text{C}$ ) e 1-MCP no processo de bloqueio do amadurecimento.

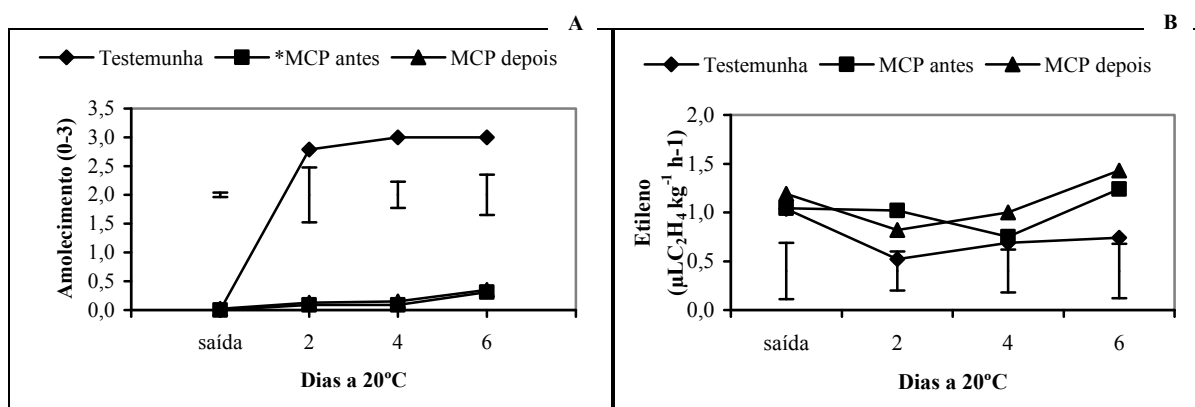
### 4.3 Experimento III

4.3.1 Ação do etileno, antes e após o armazenamento refrigerado por dois meses, na ocorrência do amolecimento em caquis 'Fuyu'

O amolecimento em caqui 'Fuyu', armazenado por dois meses em armazenamento refrigerado na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$  foi menor nos frutos que receberam aplicação de 1-MCP (Figura 4A). O amolecimento dos frutos, que não receberam aplicação de 1-MCP foi de 100% aos dois dias de exposição a  $20^{\circ}\text{C}$  (Figura 4A) e comprovado pela Figura 7A. A produção de

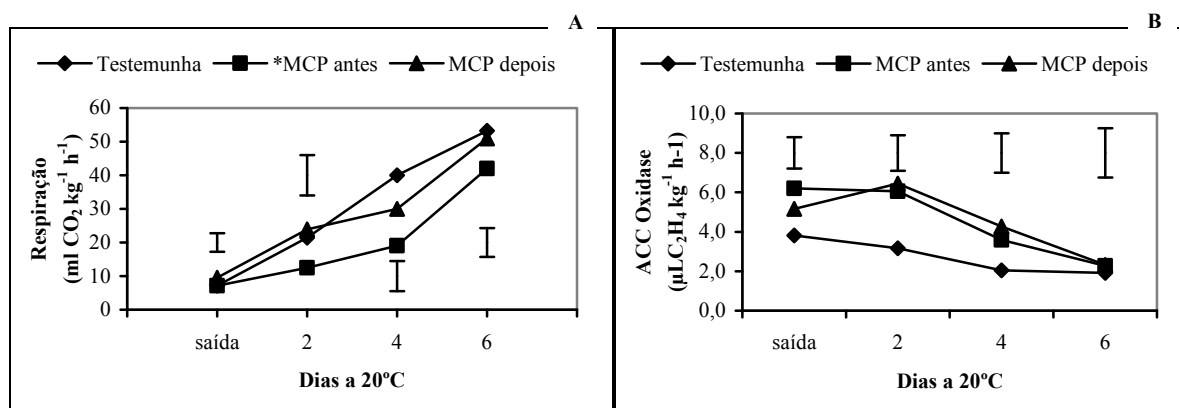
etileno pelos frutos que não foram tratados com 1-MCP foi maior na saída da câmara do que aos dois e quatro dias de exposição a 20°C. Aos seis dias de exposição a 20°C, os frutos que receberam aplicação de 1-MCP, antes ou após o armazenamento, produziram mais etileno que na saída da câmara, diferentemente dos frutos que não receberam aplicação de 1-MCP (Figura 4B). Mas, a produção de etileno pelos frutos de todos os tratamentos diminuiu aos dois dias, em relação à saída da câmara, e começou a aumentar a partir dos quatro dias de exposição a 20°C, sendo que, nas quatro avaliações não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 4B). Assim, a ação do 1-MCP, aplicado antes e depois do armazenamento, comprova que o amolecimento está vinculada à ação do etileno e não a sua síntese.

A manutenção da firmeza com aplicação de 1-MCP antes ou após o armazenamento também foi observado por Brackmann et al. (2003) em caqui ‘Kioto’. Esses resultados levantam a hipótese que poderá ser comprovada apenas com parâmetros bioquímicos, mas, provavelmente os receptores de etileno são os responsáveis em desencadear o processo de degradação da parede celular. Assim, o acúmulo de frio, superior a um mês (Tabela 4), deixaria as enzimas ativas e o receptor do etileno fornece o sinal para acontecer o processo de degradação da parede celular. Além disso, esse sistema frio-receptor-enzimas pode depender da presença de oxigênio e dióxido de carbono. Para compreender isso, realizamos um experimento com atmosfera controlada utilizando 1,0kPa de O<sub>2</sub> mais 8,0 kPa de CO<sub>2</sub>.



**Figura 4:** Amolecimento (A) e Produção de etileno (B) em caqui ‘Fuyu’ após dois meses de armazenamento refrigerado na temperatura de -0,5°C mais seis dias de exposição a 20°C. Santa Maria, RS. 2007. Barras verticais indicam Diferença Mínima Significativa (DMS<sub>0,05%</sub>) entre tratamentos. **Amolecimento (0-3):** 0- sem amolecimento; 1- início e <10%; 2- >10 a 50% e 3- 100% amolecido. \*MCP: Aplicado na concentração de 1ppm antes e depois do armazenamento.

A atividade da ACC oxidase dos frutos manteve-se estável da saída da câmara aos dois dias de exposição a 20°C, porém, aos quatro e seis dias de exposição a 20°C reduziu drasticamente (Figura 5B). Diferentemente da produção de etileno e atividade da ACC oxidase, a respiração dos frutos aumentou de forma constante, desde saída da câmara até aos seis dias de exposição a 20°C (Figura 5A).

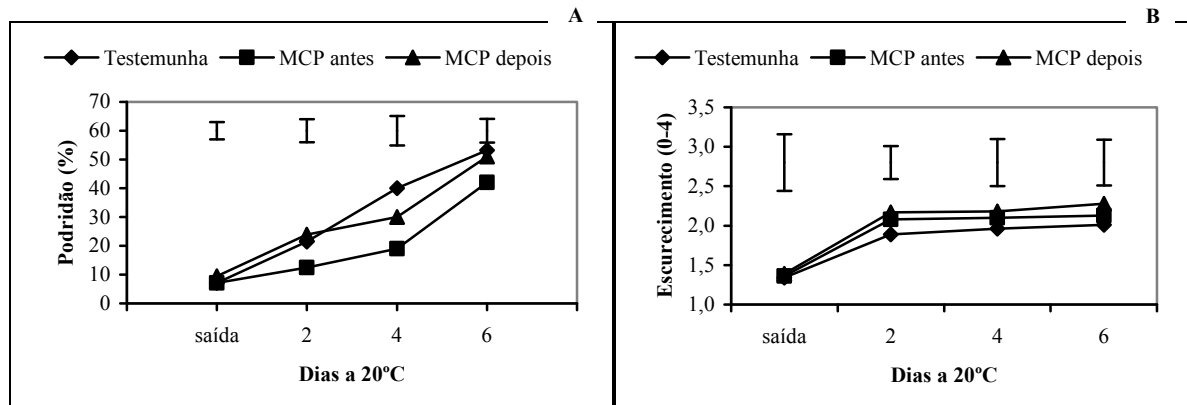


**Figura 5:** Respiração (A) e atividade da ACC oxidase (B) em caqui ‘Fuyu’ após dois meses de armazenamento refrigerado na temperatura de -0,5°C mais seis dias de exposição a 20°C. Santa Maria, RS. 2007. Barras verticais indicam Diferença Mínima Significativa (DMS<sub>0,05%</sub>) entre tratamentos. \*MCP: Aplicado na concentração de 1ppm antes e depois do armazenamento.

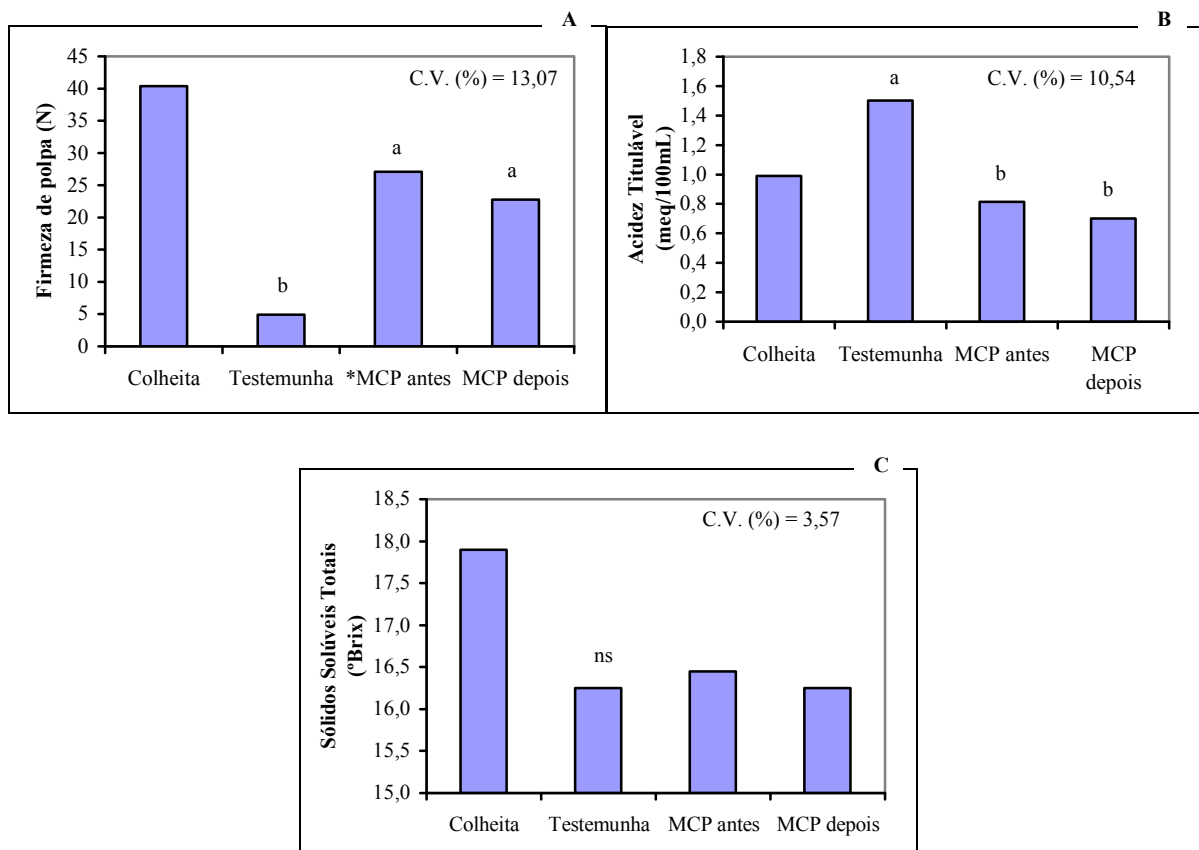
O índice de escurecimento da epiderme do caqui ‘Fuyu’, na saída da câmara, foi próximo a 1,5 e aos dois dias de exposição a 20°C estava em torno de 2 (Figura 6B), mantendo-se constante nessa faixa até os seis dias de exposição a 20°C. Esse resultado comprova que a ação do etileno não tem relação com o escurecimento da epiderme. Mas, em função da alta incidência de escurecimento, realizamos outro experimento em atmosfera controlada, com a intenção de controlar esse distúrbio. Ao contrário do escurecimento, a ocorrência de podridão nos frutos, na saída da câmara, foi menor que 10% (Figura 6A) e aos seis dias de exposição a 20°C era em torno de 40 a 50%.

Os sólidos solúveis totais dos frutos, não apresentaram diferença significativa em função dos tratamentos (Figura 7C). No entanto, a acidez titulável dos frutos foi maior naqueles armazenados sem aplicação de 1-MCP, tendo valor superior até mesmo da análise inicial, realizada após a colheita (Figura 7B). Porém, precisaríamos confirmar esse resultado antes de discutir e assim realizamos o próximo experimento.





**Figura 6:** Podridão (A) e escurecimento da casca (B) em caqui 'Fuyu' após dois meses de armazenamento refrigerado na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$  mais seis dias de exposição a  $20^{\circ}\text{C}$ . Santa Maria, RS. 2007. Barras verticais indicam Diferença Mínima Significativa ( $\text{DMS}_{0,05\%}$ ) entre tratamentos. **Escurecimento (0-4):** 0- sem escurecimento; 1- início e  $<10\%$ ; 2-  $>10\%$  a  $20\%$ ; 3-  $>20$  a  $30\%$  e 4-  $>30\%$  escurecimento.

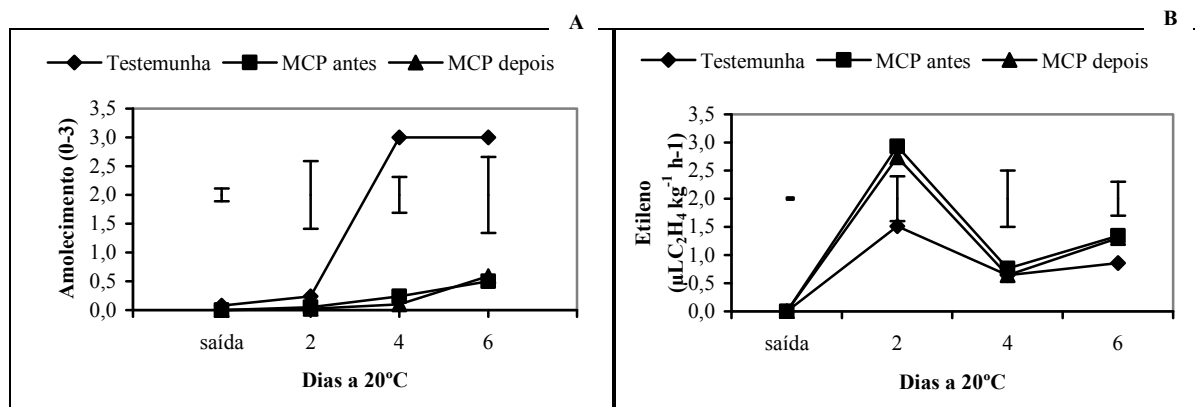


**Figura 7:** Firmeza de polpa (A), Acidez Titulável (B) e Sólidos Solúveis Totais (C) em caqui 'Fuyu' após dois meses de armazenamento refrigerado na temperatura de  $-0,5^{\circ}\text{C}$  mais seis dias de exposição a  $20^{\circ}\text{C}$ . Santa Maria, RS. 2007. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. ns – diferenças não significativas. \*MCP: aplicado na concentração de 1ppm antes e depois do armazenamento.

#### 4.3.2 Ação do etileno, antes e após o armazenamento de quatro meses em atmosfera controlada, na ocorrência do amolecimento em caquis ‘Fuyu’

O amolecimento dos frutos após quatro meses armazenados em atmosfera controlada, na saída da câmara e aos quatro dias de exposição a 20°C, foi próximo a zero (Figura 8A). No entanto, aos quatro dias de exposição a 20°C os frutos que não receberam aplicação de 1-MCP apresentavam-se 100% amolecidos (Figura 8A), diferentemente dos resultados obtidos utilizando armazenamento refrigerado, onde, nessas condições, os frutos com dois dias de exposição a 20°C apresentavam-se 100% amolecidos (Figura 4A). Com isso, o processo que desencadeia o amolecimento pode ser dependente do O<sub>2</sub>, possivelmente, em função das enzimas oxidases que atuam na degradação da parede celular. Já, os frutos que receberam aplicação de 1-MCP, antes ou após o armazenamento, apresentaram índice de amolecimento inferior a 0,5 no final de seis dias de exposição a 20°C (Figura 8A) e confirmado pela firmeza de polpa (Figura 11A). Esses resultados estão de acordo com Nakano et al. (2003) que afirmam que a exposição por longos períodos na temperatura de -0,5°C, o caqui perde a habilidade de amadurecimento e à retenção da firmeza, mesmo expostos em baixo oxigênio.

A produção de etileno pelos frutos, na saída da câmara, foi zero e teve o pico aos dois dias de exposição a 20°C (Figura 8B). Quando ocorreu o pico, os frutos que receberam aplicação de 1-MCP produziram mais etileno, diferindo estatisticamente dos demais frutos sem aplicação de 1-MCP (Figura 8B). A produção de etileno em frutos climatéricos pode ser reduzida com o uso de níveis elevados de CO<sub>2</sub> (5-20%), que inibem a atividade da ACC sintase e da ACC oxidase (MATHOOKO et al., 2001; DE WILD et al., 2005). No caso da ACC oxidase, o efeito do CO<sub>2</sub> sobre sua atividade depende da concentração usada. Essa enzima é ativada reversivelmente pela aplicação de CO<sub>2</sub> (DONG et al., 1992), possivelmente pela carbamilação de um resíduo específico de lisina (FERNÁNDEZ-MACULET et al., 1993). Existe, ainda, a possibilidade do CO<sub>2</sub> atuar diretamente sobre os lipídeos e proteínas de membranas, protegendo-as dos danos causados pelas baixas temperaturas (PURVIS, 1993). Considerando a hipótese da ACC oxidase ser uma enzima ligada às membranas celulares (RASSAMY et al., 1998), poderia-se atribuir à manutenção da integridade das membranas quando ocorre a retomada da atividade dessa enzima após o armazenamento.



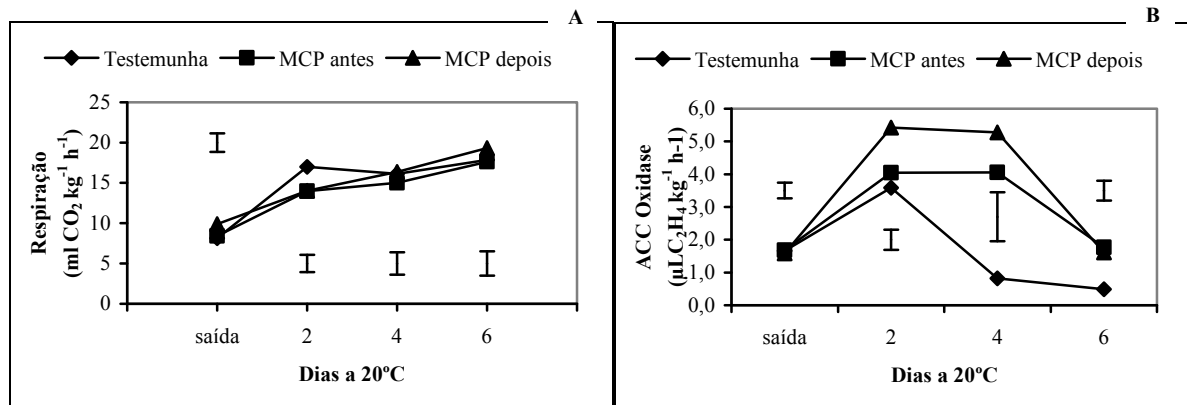
**Figura 8:** Amolecimento (A) e Produção de etileno (B) em caqui ‘Fuyu’ após quatro meses de armazenamento em atmosfera controlada (1,0kPa de O<sub>2</sub> mais 8,0kPa de CO<sub>2</sub>) na temperatura de -0,5°C mais seis dias de exposição a 20°C. Santa Maria, RS. 2007. Barras verticais indicam Diferença Mínima Significativa (DMS 0,05%) entre tratamentos. **Amolecimento (0-3):** 0- sem amolecimento; 1- início e <10%; 2- >10 a 50% e 3- 100% amolecido.

A atividade da ACC oxidase, nos frutos sem aplicação de 1-MCP, reduziu drasticamente aos 4 dias de exposição a 20°C, quando comparado com os 2 dias (Figura 9B). Já, os frutos que receberam 1-MCP tiveram sua queda de atividade somente aos 6 dias de exposição a 20°C (Figura 9B). Assim, a atividade da ACC oxidase demonstra que os frutos que receberam 1-MCP mantiveram a integridade da membrana e, por isso, não apresentaram o amolecimento.

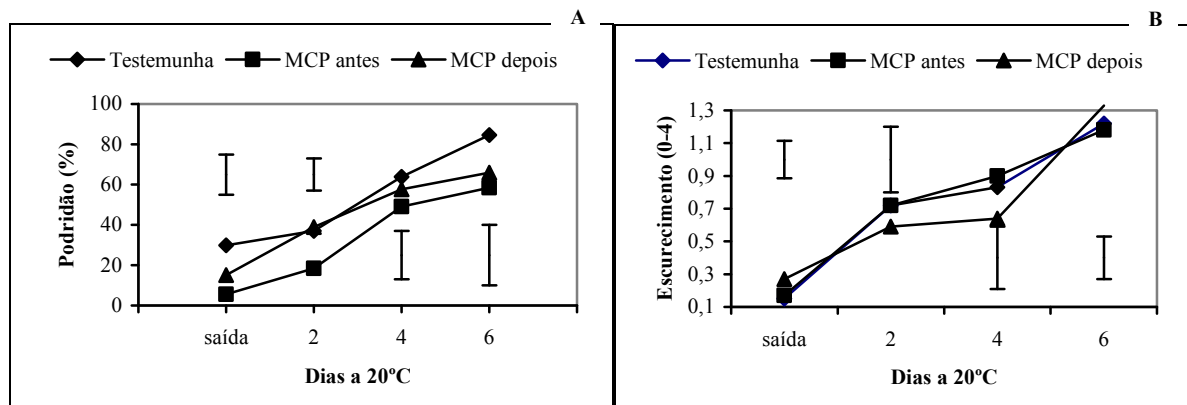
A produção de CO<sub>2</sub> não foi muito afetada pelas condições de armazenamento e pelo bloqueio da ação do etileno (Figura 9A). O 1-MCP, em geral, reduz ou atrasa a taxa respiratória (BLANKENSHIP; DOLE, 2003), apesar de não afetar o metabolismo dos carboidratos (GOLDING et al., 1998). No entanto, esse composto exerce pouco efeito sobre a produção de CO<sub>2</sub> em nectarinas (DONG et al., 2001) e damascos (DONG et al., 2002).

O índice de escurecimento, na saída da câmara, foi próximo a zero e aos seis dias de exposição a 20°C estava em torno de 1,2 (Figura 10B). Assim, a atmosfera controlada reduz a incidência de escurecimento, pois, com armazenamento refrigerado ocorreu elevado escurecimento (Figura 6B). A baixa incidência de escurecimento em atmosfera controlada é devido ao baixo oxigênio. O baixo oxigênio reduz a oxidação de polifenóis dos frutos (BEN-ARIE; ZUTKHI, 1992), pois, deixa a atividade da enzima polifenol oxidase próximo a zero (LEE et al., 1993). Porém ocorre a possibilidade das manchas escurecidas serem causadas pela ocorrência de fungos (*Alternaria alternata*), como observado por Ben-Arie; Zutkhi

(1992). Entretanto, as manchas escurecidas não apresentavam características evidentes de ataque de patógenos. Já, a incidência de podridão ao final dos seis dias de exposição a 20°C estava em torno de 60 a 65% (Figura 10A).



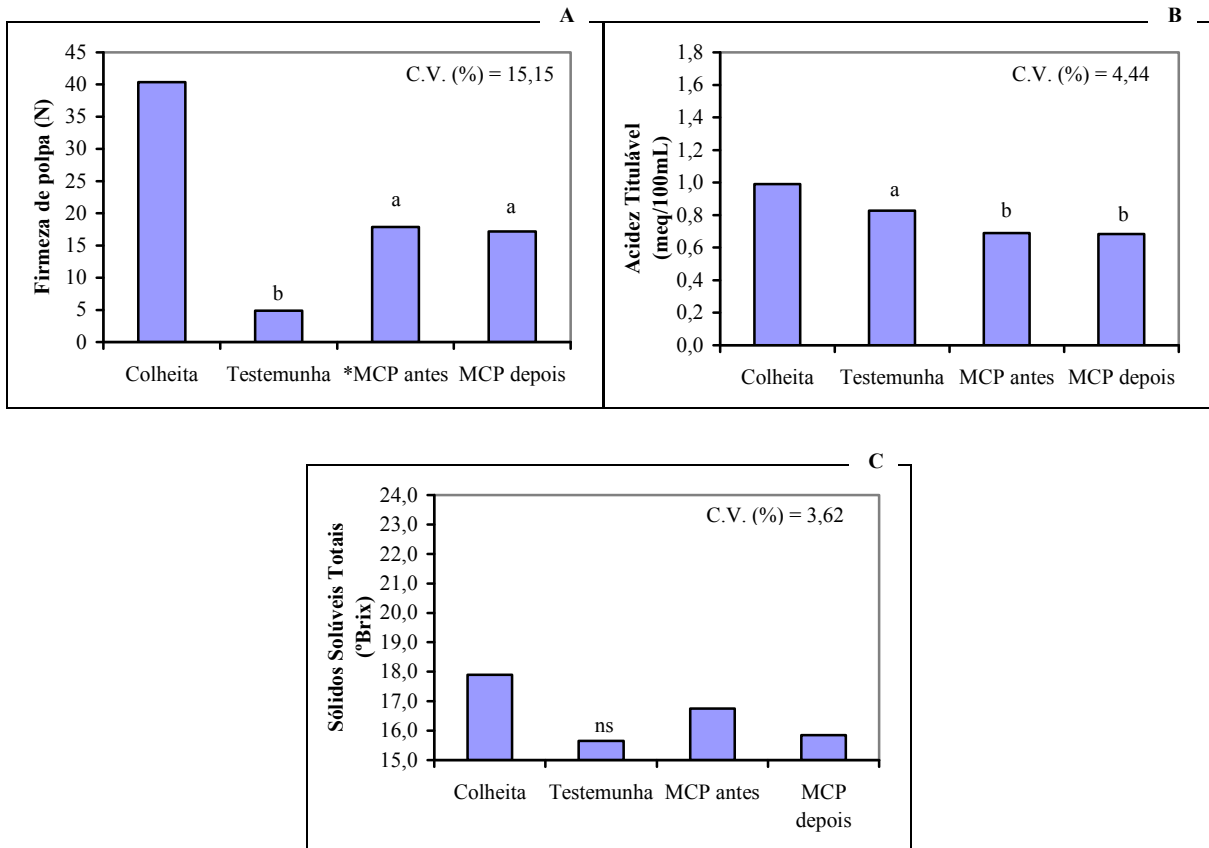
**Figura 9:** Respiração (A) e atividade da ACC oxidase (B) em caqui ‘Fuyu’ após quatro meses de armazenamento em atmosfera controlada (1,0kPa de O<sub>2</sub> mais 8,0kPa de CO<sub>2</sub>) na temperatura de -0,5°C mais seis dias de exposição a 20°C. Santa Maria, RS. 2007. Barras verticais indicam Diferença Mínima Significativa (DMS<sub>0,05%</sub>) entre tratamentos.



**Figura 10:** Podridão (A) e escurecimento da casca (B) em caqui ‘Fuyu’ após quatro meses de armazenamento em atmosfera controlada (1,0kPa de O<sub>2</sub> mais 8,0kPa de CO<sub>2</sub>) na temperatura de -0,5°C mais seis dias de exposição a 20°C. Santa Maria, RS. 2007. Barras verticais indicam Diferença Mínima Significativa (DMS<sub>0,05%</sub>) entre tratamentos. **Escurecimento (0-4):** 0- sem escurecimento; 1- início e <10%; 2- >10% a 20%; 3- >20 a 30% e 4- >30% escurecimento.

Os sólidos solúveis totais dos frutos não apresentaram diferença significativa em função dos tratamentos (Figura 11C). No entanto, a acidez titulável dos frutos foi maior naqueles armazenados sem aplicação de 1-MCP (Figura 11B). Essa acidez elevada pode ser

decorrente da degradação dos ácidos urônicos da parede celular e formação de ácidos, porém, devido à metodologia utilizada não podemos afirmar com exatidão.



**Figura 11:** Firmeza de polpa (A), Acidez Titulável (B) e Sólidos Solúveis Totais (C) em caqui ‘Fuyu’ após quatro meses de armazenamento em atmosfera controlada (1,0kPa de O<sub>2</sub> mais 8,0kPa de CO<sub>2</sub>) na temperatura de -0,5°C mais seis dias de exposição a 20°C. Santa Maria, RS. 2007. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. **ns** – diferenças não significativas. \***MCP**: aplicado na concentração de 1ppm antes e depois do armazenamento.

### 4.3.3 Conclusões

A aplicação de 1-MCP, tanto antes ou após o armazenamento, controla o processo de maturação, evitando o amolecimento do caqui 'Fuyu' após a exposição a 20°C.

Ocorre sinergismo positivo entre atmosfera controlada e a utilização de 1-MCP, no controle da maturação.

O 1-MCP associado à utilização de armazenamento a -0,5°C com 1,0kPa de O<sub>2</sub> + 8,0Pa de CO<sub>2</sub>, por 4 meses, controla a maturação, evita o amolecimento do caqui 'Fuyu', porém, após esse período ocorre alta incidência de podridão.

## 5 BIBLIOGRAFIA

ADAMS, D. O.; YANG, S. F. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropene-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.76, p.170-174, 1979.

ALEXANDER L; GRIERSON D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 377, p. 2039-2055, oct. 2002.

ARGENTA, L. C. Descrição dos principais distúrbios em caqui 'Fuyu' após a armazenagem refrigerada. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 19, n.3, p. 49-52, Nov. 2006.

ARGENTA, L. C. et al. Aumento da conservação da qualidade pós-colheita de caqui e quivi pelo uso de 1-MCP. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 5., 2002, Fraiburgo. **Anais**. Florianópolis: EPAGRI, 2002, p.170-174.

BATISSE, C.; FILS-LYCAON, B.; BURET, M. Pectin changes in ripening cherry fruit. **Journal of Food Science**, Chicago, v.59, n.2, p.389-393, 1994.

BEN-ARIE, R.; LAVEE, S. Pectic changes occurring in 'Elberta' peaches suffering from woolly breakdown. **Phytochemistry**, Oxford, v.10, n. 3, p.531-538, 1971.

BEN-ARIE, R.; SONEGO, L. Pectolytic enzyme activity involved in woolly breakdown of stored peaches. **Phytochemistry**, Oxford, v.19, n.12, p.2553-2555, 1980.

BEN-ARIE; ZUTKHI, Y. Extending the storage life of "Fuyu" persimmon by modified-atmosphere packaging. **HortScience**, Alexandria v.27, n.7, p.811 -813, 1992.

BIALE, J.; YONG, R. E. Growth, maturation and senescence in fruits. **Science**, Washington, v.146, n. 3646, p.880-888, nov. 1964.

BLANKENSHIP, S. M. Ethylene effects and the benefits of 1-MCP. **Perishables Handling Quarterly**, North Carolina, n.108, 4p, 2001.

BLANKENSHIP, S. M.; DOLE, J. M. 1-Methylcyclopropene: a review. **Postharvest biology and technology**, Amsterdam, v.28, n. 1, p.1-25, apr. 2003.

BLEECKER, A. B.; KENDE, H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. **Annual Review of Cell & Developmental Biology**, Palo Alto, v. 16, n. 1-8, 2000.

BOLLER, T.; HERNER, R. C.; KENDE, H. Assay for an enzymatic formation of an ethylene precursor, 1-aminocyclopropene-1-carboxylic acid. **Planta**, Berlin, v.145, p.293-303, 1979.

BOUZAYEN, M. et al. Carrier mediated uptake of 1-(malonylamino) cyclopropane 1-carboxylic acid in vacuoles isolated from *Catharanthus roseus* cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 91, p. 1317-1322, 1989.

BRACKMANN, A. et al. Aplicação de 1-MCP em caqui 'Quioto' armazenado sob refrigeração e atmosfera controlada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.1, p.42-44, abr. 2003.

BRACKMANN, A. et al. Temperatura para o armazenamento do caqui 'Fuyu'. **Revista da faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v.13, n.1, p.82-89, 2006.

BRUMMELL, D. A. et al. Cell wall metabolism during the development of chilling injury in cold-stored peach fruit: association of mealiness with arrested disassembly of cell wall pectins. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, n. 405, p.2041-2052, aug. 2004.

BRUMMELL, D. A.; HARPSTER, M. H. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, Amsterdam, v.47, n.1-2, p.311-340, sep. 2001.

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**, Rockville, v.80, p.539-543, 1986.

BUFLER, G.; STREIF, J. Ethylene biosynthesis of 'Golden Delicious' apples stored in different mixtures of carbon dioxide and oxygen. **Scientia Horticulturae**, v.30, p.177-185, 1986.

BURG, S. P.; BURG, E. A. Molecular requirements for the biological activity of ethylene. **Plant Physiology**, Rockville, v.42, p.144-152, 1967.

BURMEISTER, D. M. et al. Interaction of hot water treatments and controlled atmosphere storage on quality of 'Fuyu' persimmons. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 71-81, aug. 1997.

CAPITANI, G. Structure of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, a key enzyme in the biosynthesis of the plant hormone ethylene. **Journal of Molecular Biology**, v.294, n. 3, p.745-756, dec. 1999.

CAREY S. et al. Tomato exo-(1 → 4)-β-d-galactanase. Isolation, changes during ripening in normal and mutant tomato fruit, and characterization of a related clone, **Plant Physiology**, Rockville, v.108, n.3, p. 1099–1107, 1995.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, Gainesville, v.3, n. 1, p.1-30, jan. 1993.

CIVELLO, P. M. et al. An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. **Plant Physiology**, Rockville, v.121, p.1273-1279, dec. 1999.

COLLINS, R. J.; TISDELL, J. G. Predicting the storability of Suruga persimmons. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.7, n.4, p.351-357, mar. 1996.

COSGROVE, D. J. Cell wall loosening by expansins. **Plant Physiology**, Rockville, v.118, p.333-339, 1998.

CRISOSTO, C. H.; MITCHAM, E.J.; KADER, A.A. **Persimmons: recommendations for maintaining postharvest quality**. Disponível em: <<http://postharvest.ucdavis.edu/produce/storage.html>>. Acesso em 23 nov. 2003.

CRUZ-HERNÁNDEZ, A.; GÓMEZ-LIM. Alternative oxidase from mango (*Mangifera indica* L.) is differentially regulated during fruit ripening. **Planta**, Berlin, v.197, n.4, p.569-576, nov. 1995.

DE WILD, H. P. J. et al. The action site of carbon dioxide in relation to inhibition of ethylene production in tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.36, n.3, p.273-280, jun. 2005.

DELLA PENNA, D.; ALEXANDER, D. C.; BENNETT, A. B. Molecular cloning of tomato fruit polygalacturonase: analysis of polygalacturonase mRNA levels during ripening. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.83, n.17, p.6420-6424, sep. 1986.

DONAZZOLO, J. **Efeito da temperatura e CO<sub>2</sub> no armazenamento em atmosfera controlada sobre a qualidade de caqui cvs. Fuyu e Quioto**. 2001. 69f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

DONG L. et al. Ethylene involvement in the cold storage disorder of 'Flavortop' nectarine, **Postharvest Biology and Technology**. Amsterdam, v.23, n.2, p.105-115, nov. 2001.

DONG, J. G.; FERNÁNDEZ-MACULET, J.C.; YANG, S.F. Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from apple fruit. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.89, n. 21, p.9789-9793, nov. 1992.

DONG, L.; LURIE, S.; ZHOU, H. W. Effect of 1-methylcyclopropene on ripening of 'Canino' apricots and 'Royal Zee' plums. **Postharvest Biology and Technology**. Amsterdam, v.24, n.2, p.135-145, mar. 2002.



DUQUE, P.; BARREIRO, M. G.; ARRABAÇA, J. D. Respiratory metabolism during cold storage of apple fruit. I. Sucrose metabolism and glycolysis. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.107, n.1, p.14-23, sep. 1999.

ESHEL D. et al. Induction of peroxidase during infection of unripe persimmon fruit by *Alternaria alternata*: A possible quiescence mechanism. **Journal of Phytopathology**. Berlin, v. 150, n. 6, p. 357-362, jun. 2002.

FELIX, G. et al. Elicitor-induced ethylene biosynthesis in tomato cells. Characterization and use as a bioassay for elicitor action. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, p. 19-25, 1991.

FENG, X. et al. Control of ethylene activity in various plant systems by analogues of 1-methylcyclopropene. **Plant Growth Regulation**, New York, v.42, n. 1, p.29-38, jan. 2004.

FERNÁNDEZ-MACULET, J. C.; DONG, J. G.; YANG, S. F. Activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by carbon dioxide. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdam, v.193, n.3, p.1168-1173, jun.1993.

FISCHER, R. L.; BENNETT, A. B. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.42, p.675-703, jun. 1991.

GAFFE, J., TIEMAN, D. M., HANDA, A. K. Pectin Methylsterase isiforms in Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Tissues. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, n. 1, p. 199-203, 1994.

GOLDING, J. B. et al. Application of 1-MCP and propylene to identify ethylene-dependent ripening processes in mature banana fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.14, n.1, p.87-98, sep. 1998.

GORINI F. L.; TESTONI, A. Raccolta, conservazione e trasformazione dei frutti di kaki. **Annali dell'Istituto Sperimentale per la Valorizzazione Tecnologica dei Prodotti Agricoli**, Milano, v.19, p.249-258,1988.

GRANT, M. T.; MACRAE, E. A.; REDGWELL, R.J. Effect of chilling injury on physicochemical properties of persimmon cell walls. **Phytochemistry**, Oxford, v. 31, n. 11, p. 3739-3744, nov. 1992.

GROSS, K. C.; SAMS, C. E. Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. **Phytochemistry**, Oxford, v.23, n.11, p.2457-2461, oct. 1984.

HARRIMAN, R. W. et al. Molecular cloning of tomato pectin methylsterase gene and its expression in Rutgers, ripening inhibitor, nonripening, and Never Ripe tomato fruits. **Plant Physiology**, Rockville, v.97, p.80-87, 1991.

HARTMANN, C. J. R.; DROUET, A.; MORIN, F. Ethylene and ripening of apple, pear and cherry fruit. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 25, n. 4, p. 505-512, 1987.

HAYAMA, H. et al. Identification of a new expansin gene closely associated with peach fruit softening. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.29, n.1, p.1-10, jul. 2003.

HOFFMAN, N. E. ; YANG, S. F. Changes of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content in ripening fruits in relation to their ethylene production rates. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 105, n. 4, p. 492-495, 1980.

HUANG, P. L. *et al.* Two genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in zucchini (*Cucurbita pepo*) are clustered and similar but differentially regulated. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, Washington, v. 88, n. 16, p. 7021-7025, aug. 1991.

INABA, A. Recent studies on postharvest physiology and technology of horticultural crops in Japan. **Postharvest News and Information**, London, v. 4, n. 4, p. 101-114, 1993.

JARVIS, M. C. Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. **Plant Cell and Environment**, Logan, v.7, n.3, p.153-164, apr. 1984.

KADER, A. A. Biochemical and physiological basis for the effect of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. **Food Technology**, Chicago, v.40, n.5, p.99-105, 1986.

KADER, A. A.; CHORDAS. A. Evaluating the browning potential of peaches. **California Agriculture**, California, v.38, n.1, p.14-15, 1984.

KENDE, H. Enzymes of ethylene biosynthesis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 91, p. 1-4, 1989.

KENDE, H. Ethylene biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v.44, p.238-307, 1993.

KERBEL, E. L.; KADER, A.A.; ROMANI, R.J. Effect of elevated CO<sub>2</sub> concentrations on glycolysis in intact 'Bartlett' pear fruit. **Plant Physiology**, Rockville, v.86, p.1205-1209, 1988.

KIM, Y. S.; JEONG, S. B.; SON, D. S.; *et al.* Studies of the causal factors of skin browning during storage and its control in non-astringent persimmon. **Postharvest News and Information**, Wallingford, v. 3, n. 4, p.190, 1992.

KNEE, M. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid during apple fruit development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 36, n.4, p. 670-678, aug. 1985.

KOCH, J. L.; NEVINS, D. J. Tomato fruit cell wall. Use of purified tomato polygalacturonase and pectinmethylesterase to identify developmental changes in pectins. **Plant Physiology**, Rockville, v.91, p.816-822, 1989.

KRAMMES, J. G. *et al.* Estabelecimento de índices de maturação para o ponto de colheita de frutos de caqui 'Fuyu'. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 20, n.3, p. 62-66, Nov. 2007.

LATCHÉ, A. *et al.* Facteurs susceptibles de contrôler l'amylolyse chez la pomme et la poire. In: **FACTEURS ET RÉGULATION DE LA MATURATION DES FRUITS**, 1974, Paris : Colloques internationaux du Centre National de la Recherche Scientifique, n. 238, p. 299-307, 1975.

- LAU, O. L.; LIU, Y.; YANG, S. F. Influence of storage atmospheres and procedures on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid concentration in relation to flesh firmness in 'Golden Delicious' apple. **HortScience**, Alexandria, v. 19, n. 3, p. 425-426, 1984.
- LEE, S. K., SHIN, I. S., PARK, Y. M. Factors involved in skin browning of non-astringent 'Fuyu' persimmon. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 343, p. 300-303, 1993.
- LELIÈVRE, J. M. et al. Ethylene and fruit ripening. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.101, n. 4, p.727-739, dec. 1997.
- LIEBERMAN, M.; KUNUSHI, A. T.; OWENS, L. D. Specific inhibitors of ethylene production as retardants of the ripening process in fruits. In: **FACTEURS ET RÉGULATION DE LA MATURATION DES FRUITS**, 1974, Paris : Colloques internationaux du Centre National de la Scientifique, n. 238, p. 161-170, 1975.
- LIU, S. et al. Effects of CO<sub>2</sub> on respiratory metabolism in ripening banana fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.33, n.1, p.27-34, oct. 2004.
- 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**, Rockville, v. 77, p.407-411, 1985.
- LLOP-TOUS, M. I.; BARRY, C. S.; GRIERSON, D. Regulation of ethylene biosynthesis in response to pollination in tomato flowers. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, n. 3, p. 971-978, jul. 2000.
- LU, C. G. et al. Developmental abnormalities and reduced fruit softening in tomato plants expressing an antisense *Rab11* GTPase gene. **The Plant Cell**, Rockville, v.13, p.1819-1833, aug. 2001.
- LURIE, S.; CRISOSTO, C. H. Chilling injury in peach and nectarine. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.37, n.3, p.195-208, dec. 2005.
- MABBETT, T. H. Control of texture in tomatoes nears reality. **Agriculture international**, v.41, n.7, p.239-240, 1989.
- MACLACHLAN, G.; BRADY, C. Endo-1,4- $\beta$ -glucanase, xyloglucanase and xyloglucan endo-transglycosylase activities versus potential substrates in ripening tomatoes. **Plant Physiology**, Rockville, v.105, n. 3, p.965-974, 1994.
- MANSOUR, R, et al. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in ripening apple fruits. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 66, n. 3, p. 495-502, mar. 1986.
- MARTINS, F. P.; PEREIRA, F. M. **Cultura do caqui**. Jaboticabal: FUNEP, 1989. 71P.
- MATHOOKO, F. M. Regulation of ethylene biosynthesis in higher plants by carbon dioxide. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.7, n. 1-2, p.1-26, jan. 1996.

MATHOOKO, F. M. Regulation of genes encoding ethylene biosynthetic enzymes in peach (*Prunus persica* L.) fruit by carbon dioxide and 1-methylcyclopropene. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.21, n. 3, p.265-281, feb. 2001.

McGLASSON, W. B. Ethylene and fruit ripening. **HortScience**, Alexandria, v. 20, n. 1, p.51-54, 1985.

McMURCHIE, E. J.; McGLASSON, W. B.; EAKS, I. L. Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. **Nature**, London, v.237, p.235-236, 1972.

MERTENS, E. et al. Effect of ethylene treatment on the concentration of fructose-2,6-bisphosphate and on the activity of phosphofructokinase 2:fructose-2,6-bisphosphatase in banana. **European Journal of Biochemistry**, v.167, n.3, p.579-583, sep. 1987.

MILLAR, A. H.; DAY, D. A. Alternative solutions to radical problems. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v.2, n.8, p.289-290, aug. 1997.

MIYAZAKI, J. H.; YANG, S. F. The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.69, n. 2, p.366-370, feb. 1987.

MOWAT, A. D.; GEORGE, A. P. Persimmon. In: SCHAFFER, B.; ANDERSEN, P. C. (Ed.). **Handbook of environmental physiology of fruit crops: temperate crops**. Boca Raton: CRC Press, 1994. v. 1, cap.8, p.209-232.

NAKANO, R. et al. Ethylene biosynthesis in detached young persimmon fruit is initiated in calyx and modulated by water loss from fruit. **Plant Physiology**, Rockville, v.131, n.1, p.276-286, jan. 2003.

NAKANO, R. et al. Involvement of stress-induced ethylene biosynthesis in fruit softening of 'Saijo' persimmon fruit. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.601, p.219-226, 2001.

NEUWALD, D. A. **Armazenamento de caqui (*Diospyros kaki* L.) cultivar Fuyu em atmosfera controlada**. 2004. 66f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

OBENLAND, D. M.; CRISOSTO, C. H.; ROSE, J. K. C. Expansin protein levels decline with the development of mealiness in peaches. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.29, n.1, p.11-18, jul. 2003.

PARK, Y. S. Changes in fruit skin blackening, phenolic acids and ethanol production of non-astringent 'Fuyu' persimmon fruits during CA storage. In: INTERNATIONAL CONTROLLED ATMOSPHERE RESEARCH CONFERENCE, 7, 1997, Davis. **Proceedings...** Davis: University of California, p.170-176, v.3, 1997.

PEISER, G. D. *et al.* Formation of cyanide from carbon 1 of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid during its conversion to ethylene. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, Washington, v. 81, n. 10, p. 3059-3063, may 1984.

PERCY, A. E. et al. Xyloglucan endotransglycosylase activity during fruit development and ripening of apple and kiwifruit. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.96, n. 1, p.43-50, jan. 1996.

PURVIS, A. C. Effects of short-term CA storage on cell wall polysaccharides during subsequent ripening of peaches. In: THE SIXTH INTERNATIONAL CONTROLLED ATMOSPHERE RESEARCH CONFERENCE, 1993. New York. **Proceedings...**, Ithaca: Northeast Regional Agricultural Engineering, V. 1. p. 418-424, 1993.

RAMASSAMY, S. et al. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase of apple fruit is periplasmic. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.49, n.329, p.1909-1915, dec. 1998.

RAVANEL, S. et al. The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.95, n.13, p.7805-7812, jun. 1998.

RHODES, M. J. C. **The maturation and ripening of fruits**. In: THIMANN, K.V. (ed.). Senescence in Plants. Boca Raton : CRC Press, Florida, 1980. p. 157-205.

ROMBALDI, C. V. et al. Immunocytolocalization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase in tomato and apple fruit. **Planta**, Berlin, v.192, n. 4, p.453-460, feb. 1994.

ROSE, J. K. C.; LEE, H. H.; BENNETT, A. B. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.94, n. 11, p.5955-5960, may 1997.

SARGENT, S. A.; CROCKER, T. E.; ZOELLNER J. J. Storage characteristics of 'Fuyu' persimmons. **Proceedings Fla. State Horticultural Society**, Gainesville, n.106, p.131-134, 1993.

SEIBERT E. et al. efeito do ethephon e da frigoconservação na maturação de pêras cv. Packham's Triumph. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v.35, n.1, p. 55-62, jan. 2000.

SITRIT, Y.; BENNETT, A. B. 1998. Regulation of tomato fruit polygalacturonase mRNA accumulation by ethylene: a reexamination. **Plant Physiology**, Rockville, v.116, p.1145-1150, 1998.

SMITH, D. L.; GROSS, K. C. A family of at least seven  $\beta$ -galactosidase genes is expressed during tomato fruit development. **Plant Physiology**, Rockville, v.123, p.1173-1183, jul. 2000.

SMITH, J. J.; VERVERIDIS, P.; JOHN, P. Characterization of the ethylene-forming enzyme partially purified from melon. **Phytochemistry**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 1485-1494, may 1992.

SOLOMOS, T. Cyanide-resistant respiration in higher plants. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v.28, p.279-297, jun. 1977.

SPANU, P. et al. Inactivation of stress induced 1-aminocyclopropane carboxylate synthase in vivo differs from substrate-dependent inactivation in vitro. **Plant Physiology**, Rockville, v.93, p.1482-1485, 1990.

SPANU, P. et al. The apparent turnover of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato cells is regulated by protein phosphorylation and dephosphorylation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 106, n. 2, p. 529-535, 1994.

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**, Rockville, v. 119, p. 1297-1303, 1999.

TABOR, C. W. ; TABOR, H. Methionine adenosyltransferase (S-adenosylmethionine synthetase) and S-adenosylmethionine decarboxylase. **Advances in Enzymology**, v. 56, p. 251–282, 1984.

TAIZ L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 2<sup>nd</sup> ed. Redwood City : Benjamin/Cummings, 1998. 565p.

TARUN, A. S.; THEOLOGIS, A. Complementation analysis of mutants of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase reveals the enzyme is a dimer with shared active sites. **Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v.273, n. 20, p.12509-12514, may 1998.

TAVARES, S. **Maturação e conservação do Tangor de ‘Murcote’ (*Citrus reticulata* Blanco X *Citrus sinensis* Osbec) e da Lima Ácida (*Citrus latifolia* Tanaka), sob efeitos de bioreguladores**. 2003. 128f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade de São Paulo.

THOMPSON, J. E.; FRY, S. C. Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. **Planta**, Berlin, v.211, n. 6, p.275-286, nov. 2000.

TUCKER, G. A. Introduction. In: SEYMOUR, G. B.; TAYLOR, J. E.; TUCKER, G. A. **Biochemistry of fruit ripening**. London: Chapman ; Hall, 1993, Cap.1, p.3-43.

VAN DER STRAETEN, D. et al. Cloning and sequence of two different cDNAs encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, Washington, v. 87, n.12, p. 4859-4863, jun. 1990.

WHITE, M. F. et al. Expression of apple 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Escherichia coli*: kinetic characterization of wild-type and active-site mutant forms. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v.91, n. 26, p.12428-12432, dec. 1994.

WILLS, R. H. H. et al. **Postharvest**: introduction to the physiology and handling of fruit and vegetables. London : Granada, 1981. 162p.

WOOLF, A. B. et al. Reduction of chilling injury in the sweet persimmon ‘Fuyu’ during storage by dry air heat treatments. **Postharvest Biology Technology**, v.11, n.3, p.155–164, jul. 1997.

YANG, S. F. Biosynthesis and action of ethylene. **HortScience**, Alexandria, v. 20, n. 1, p. 41-45, 1985.

YANG, S. F. The role of ethylene and ethylene synthesis in fruit ripening. In: THOMSON, W.W.; NOTHNAGEL, E.A.; HUFFAKER, R.C. (ed.) **Plant Senescence: its biochemistry and Physiology**, Rockville : ASPP, 1987.

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

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 concentrations. **Plant Physiology**, Rockville, v. 88, p. 553-558, 1988.

YOUNG, R. E.; SALMINEN, S.; SORNSRIVICHAI, P. Enzyme regulation associated with ripening in banana fruit. In: **FACTEURS ET RÉGULATION DE LA MATURATION DES FRUITS**, 1974, Paris : Colloques internationaux du Centre National de la Recherche Scientifique, n. 238, 1975. p. 271-280.

YU, Y. B.; ADAMS, D. O.; YANG, S. F. 1-Aminocyclopropene-1-carboxylate synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.198, n.1, p.280-286, nov. 1979.

ZANUZO, M. R. **Etileno na transcrição de poligalacturonases em melões transformados geneticamente com o clone pAP4 antisense**. 2004. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindústria, Universidade Federal de Pelotas.