

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

Lucas Mallmann Wendt

**VARIAÇÃO DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO EM
ATMOSFERA CONTROLADA DINÂMICA DE MAÇÃS ‘MAXI GALA’**

Santa Maria, RS
2021

Lucas Mallmann Wendt

**VARIAÇÃO DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO EM ATMOSFERA
CONTROLADA DINÂMICA DE MAÇÃS ‘MAXI GALA’**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Agronomia**.

Orientador: Prof. Dr. Auri Brackmann

Santa Maria, RS
2021

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

Wendt, Lucas Mallmann

VARIAÇÃO DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO EM ATMOSFERA
CONTROLADA DINÂMICA DE MAÇÃS 'MAXI GALA' / Lucas Mallmann
Wendt.- 2021.

99 p.; 30 cm

Orientador: Auri Brackmann

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Agronomia, RS, 2021

1. Malus domestica 2. Firmeza de polpa 3.
Degenerescência de polpa 4. Limite mínimo de oxigênio 5.
ACD-QR 1,3 I. Brackmann, Auri II. Título.


Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.


Lucas Mallmann Wendt


**VARIAÇÃO DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO EM ATMOSFERA
CONTROLADA DINÂMICA DE MAÇÃS 'MAXI GALA'**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Aprovado em 26 de abril de 2021:


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


Rogério de Oliveira Anese, Prof. Dr. (IFSC) – Videoconferência


Anderson Weber, Prof. Dr. (Unipampa) – Videoconferência

Santa Maria, 26 de abril de 2021

DEDICATÓRIA

*Dedico essa dissertação à minha família,
em especial aos meus pais Luiz Caye Wendt e Regina Mallmann Wendt pela educação, apoio
e exemplo de vida, bem como, aos meus irmãos Angela Mallmann Wendt e Leandro
Mallmann Wendt pelo companheirismo durante esse período.*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo exemplo de vida e por não hesitarem em momento algum no incentivo aos meus estudos;

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade de realizar este estudo;

À CAPES pelo financiamento de minha bolsa de estudos;

À COOPAGRO pela concessão das maçãs, objeto de pesquisa;

Ao professor Dr. Auri Brackmann, pela orientação e ensinamentos durante a minha Graduação e Pós-Graduação;

Ao Professor Dr. Vanderlei Both por compartilhar ideias e informações durante as discussões dos resultados;

Aos colegas de Pós-Graduação Erani Eliseu Schultz, Vagner Ludwig e Fábio Rodrigo Thewes por compartilhar ideias e informações as quais contribuições no tema estudado;

A todos os colegas da Pós-Graduação e iniciação científica do Núcleo de Pesquisa em Pós-colheita, pela ajuda na condução e análise dos experimentos;

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

MUITO OBRIGADO.

RESUMO

VARIAÇÃO DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO EM ATMOSFERA CONTROLADA DINÂMICA DE MAÇÃS ‘MAXI GALA’

AUTOR: Lucas Mallmann Wendt

ORIENTADOR: Auri Brackmann

O aumento na demanda por maçãs de qualidade durante o ano todo exige melhorias na tecnologia de armazenamento. O armazenamento em atmosfera controlada dinâmica (ACD) que utiliza níveis extremamente baixos de oxigênio vem sendo difundida em todo mundo, pois mantém a qualidade de maçãs armazenadas por longos períodos. A maior manutenção da qualidade é possível porque a ACD permite determinar o limite mínimo de oxigênio (LMO) tolerado pelas maçãs. Além da tecnologia para determinar o LMO, a temperatura é um dos fatores que mais afeta a qualidade dos frutos durante o armazenamento, pois influencia a velocidade das reações bioquímicas. Esta dissertação é composta por dois artigos científicos com os seguintes objetivos: [1] Avaliar o efeito de temperaturas mais elevadas (3,0 °C) e diferentes estratégias de variação da temperatura no armazenamento em ACD monitorada pelo quociente respiratório 1,3 (ACD-QR 1,3), comparando com diferentes temperaturas mantidas constantes em ACD-QR 1,3 e com o armazenamento em atmosfera controlada (AC) convencional com e sem aplicação de 1-metilciclopropeno (1-MCP); [2] verificar se temperatura baixas nos primeiros 30 dias ou durante 240 dias de armazenamento em ACD-QR 1,3, melhorar a manutenção da qualidade física e química, comparando com o armazenamento em AC e ACD monitorada pela fluorescência de clorofila (ACD-FC), com e sem aplicação de 1-MCP. Maçãs ‘Maxi Gala’ foram armazenadas por 9 meses em atmosfera controlada (AC), AC+1-metilciclopropeno (1-MCP), atmosfera controlada dinâmica monitorada pela fluorescência de clorofila (ACD-FC) com e sem 1-MCP e ACD-QR 1,3 em temperaturas constantes de 0,5, 2,0 e 3,0 °C e diferentes estratégias de variação da temperatura (0,5/30d+3,0/240d °C), (0,5/30d +2,0/240d °C), (2,0/30d +3,0/240d °C), (0,5/30d +2,0/30d +3,0/210d °C) e (2,0/30d +0,5/240d °C) e expostas por mais 7 e 14 dias à temperatura de 20 °C. O armazenamento de maçãs em ACD-QR 1,3 na temperatura constante de 2,0 °C resultou frutos com melhor qualidade nos parâmetros físico-química, após 7 e 14 dias a 20 °C. Após o armazenamento mais 14 dias a 20 °C, a ACD-QR 1,3 independente da temperatura, manteve a melhor qualidade físico-química em relação a AC convencional com ou sem aplicação de 1-MCP. A variação da temperatura com (0,5/30d+2,0/240d °C) e (2,0/30d +3,0/240d °C) resultaram maior firmeza de polpa e percentual de frutos sadios, devido à menor incidência de degenerescência de polpa e podridão. Além disso, as melhores estratégias de variar a temperatura em ACD-QR 1,3 é a utilização de temperatura baixa no final do armazenamento (2,0/30d+0,5/240d °C) ou temperaturas constantes de 2,0 °C, que resultam frutos com maior qualidade físico-química, após 7 e 14 dias a 20 °C. Frutos armazenados em ACD-FC com ou sem 1-MCP, apresentaram qualidades físico-químicas semelhantes aos armazenados em ACD-QR 1,3 independente da temperatura, após 14 dias a 20 °C. Frutos armazenados em AC convencional com e sem 1-MCP, após 7 e 14 dias a 20 °C, apresentaram menor firmeza de polpa e menor porcentagem de frutos sadios, decorrente da elevada incidência de podridão e degenerescência de polpa. Portanto, as melhores condições de armazenamento de maçãs por longos períodos, observado nos trabalhos desta dissertação, segue a seguinte ordem de prioridade: ACD-QR 1,3 na temperatura de 2,0 °C melhor que ACD-QR 1,3 nas temperaturas constantes de 0,5, 3,0 °C e com variação destas temperaturas, igual a ACD-FC com ou sem 1-MCP, melhor que AC e melhor que AC+1-MCP.

Palavras-chave: *Malus domestica*. Firmeza de polpa. Degenerescência de polpa. Limite mínimo de oxigênio. ACD-QR 1,3.

ABSTRACT

VARIATION OF STORAGE TEMPERATURE IN DYNAMIC CONTROLLED ATMOSPHERE OF 'MAXI GALA' APPLES

AUTHOR: Lucas Mallmann Wendt

ADVISOR: Auri Brackmann

The increase of demand for quality apples throughout the year requires improvements in storage technology. Dynamic controlled atmosphere (DCA) storage that uses extremely low oxygen levels has been widespread worldwide, as it maintains the quality of apple stored for long term. Greater quality maintenance is possible because DCA allows determine the lowest oxygen limit (LOL) tolerated by apples. In addition to the technology to determine the LOL, temperature is one of the factors that most affects fruits quality during storage, because it affects the speed of chemical and biochemical reactions. This dissertation is composed of two papers with the following objectives: [1] To evaluate the effect of higher temperatures (3.0 °C) and different strategies of temperature variation during DCA storage monitored by respiratory quotient 1.3 (DCA-RQ 1.3), comparing with different temperatures maintained constant in DCA-RQ 1.3 and with conventional controlled atmosphere (CA) storage with and without 1-methylcyclopropene (1-MCP) application; [2] Identify if low temperature in the first 30 days or during 240 days of storage in ACD-QR 1,3, improve the maintenance of physical and chemical quality, compared with CA and DCA storage monitored by chlorophyll fluorescence (DCA-CF), with and without 1-MCP application. 'Maxi Gala' apples were stored for 9 months in a controlled atmosphere (AC), AC+1-methylcyclopropene (1-MCP), dynamic controlled atmosphere monitored by chlorophyll fluorescence (ACD-FC) with and without 1-MCP application and ACD- QR 1.3 at constant temperatures of 0.5, 2.0 and 3.0 °C and temperature variation strategies (0.5/30d+3.0/240d °C), (0.5/30d+2.0/240d °C), (2.0/30d+3.0/240d °C), (0.5/30d+2.0/30d+3.0/210d °C) and (2.0/30d+0.5/240d °C) plus 7 and 14 days shelf life at 20 °C. The storage of apples in DCA-RQ 1.3 at 2.0 °C results in fruit with higher physical-chemical quality, after 7 and 14 at 20 °C. After storage for another 14 days at 20 °C, the DCA-RQ 1.3 regardless of temperature maintained better physical-chemical quality compared to conventional CA with or without 1-MCP application. Temperature variation with (0.5/30d+2.0/240d °C) and (2.0/30d+3.0/240d °C) resulted in high flesh firmness and healthy fruit, due to lower flesh breakdown and decay incidence. In addition, the best temperature variation strategy in DCA-RQ 1.3 is the use of low temperature at the end of storage (2.0/30d+0.5/240d °C) or constant temperatures of 2.0 °C, which resulted in fruit with higher physical-chemical quality, after 7 and 14 days at 20 °C. Fruit stored in DCA-CF with or without 1-MCP application, showed physical-chemical qualities similar to those stored in DCA-RQ 1.3 regardless of temperature, after 14 days at 20 °C. Fruit stored in conventional CA with and without 1-MCP, after 7 and 14 days at 20 °C, showed lower flesh firmness and healthy fruit percentage, due to the high flesh breakdown and decay incidence. Therefore, the best storage conditions of apples for long periods, observed in this dissertation, follows the following order: DCA-RQ 1.3 at 2.0 °C better than ACD-QR 1.3 at 0.5, 3.0 °C and with temperature variation equal to DCA-CF with or without 1-MCP better than CA better than CA+1-MCP.

Keywords: *Malus domestica*. Flesh firmness. Flesh breakdown. Lower oxygen limit. DCA-RQ 1.3.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 125

- Figure 1:** Variations in oxygen levels in controlled atmosphere (CA) and dynamic controlled atmosphere with quotient respiratory 1.3 (DCA-RQ1.3) during 9 months of storage. DCA-RQ 1.3 at 0.5 °C: Minimum pO₂: 0.12 kPa; Average pO₂: 0.21 kPa; DCA-RQ 1.3 at 2.0 °C: Minimum pO₂: 0.06 kPa; Average pO₂: 0.15 kPa; DCA-RQ 1.3 at 3.0 °C: Minimum pO₂: 0.12 kPa; Average pO₂: 0.19 kPa; DCA-RQ 1.3 (0.5/30d+3.0/240d °C): Minimum pO₂: 0.12 kPa; Average pO₂: 0.19 kPa; DCA-RQ 1.3 (0.5/30d+2.0/240d °C): Minimum pO₂: 0.06 kPa; Average pO₂: 0.15 kPa; DCA-RQ 1.3 (2.0/30d+3.0/240d °C): Minimum pO₂: 0.12 kPa; Average pO₂: 0.19 kPa; DCA-RQ 1.3 (0.5/30d+2.0/30d+3.0/210d °C): Minimum pO₂: 0.12 kPa; Average pO₂: 0.19 kPa.....30
- Figure 2:** (a) Scores (treatments) and (b) loadings (variables) plots showing the two main components of ‘Maxi Gala’ apples stored under controlled atmosphere (CA) with or without 1-MCP and dynamic controlled atmosphere monitored by quotient respiratory 1.3 (DCA-RQ1.3) at three temperature maintained constant and four strategies of temperature variation, during 9 months storage plus 7 and 14 days at 20 °C. IEC: internal ethylene concentration; Eth: Ethylene production at 1, 7 or 14 days at 20 °C; Resp: respiration at 1, 7 or 14 days at 20 °C; ACC: ACC oxidase activity.35
- Figure 3:** ACC oxidase activity (ACC Oxidase) and internal ethylene concentration (IEC) of ‘Maxi Gala’ apple stored under controlled atmosphere (CA) with or without 1-MCP and dynamic controlled atmosphere monitored by quotient respiratory 1.3 (DCA-RQ1.3) at three temperature maintained constant and four strategies of temperature variation, during 9 months storage plus 7 and 14 days at 20 °C. Bars with the same letter do not differ by the Scott-Knott test, at 5% probability of error.....37
- Figure 4:** Ethylene production and respiration of ‘Maxi Gala’ apple stored under controlled atmosphere (CA) with or without 1-MCP and dynamic controlled atmosphere monitored by quotient respiratory 1.3 (DCA-RQ1.3) at three temperature maintained constant and four strategies of temperature variation, during 9 months storage plus 7 and 14 days at 20 °C. Bars with the same letter do not differ by the Scott-Knott test, at 5% probability of error.39
- Figure 5:** Metabolites of anaerobic metabolism of ‘Maxi Gala’ apple stored under controlled atmosphere (CA) with or without 1-MCP and dynamic controlled atmosphere monitored by quotient respiratory 1.3 (DCA-RQ1.3) at three temperature maintained constant and four strategies of temperature variation, during 9 months storage plus 7 and 14 days at 20 °C. Bars with the same letter do not differ by the Scott-Knott test, at 5% probability of error.41
- Figure 6:** Flesh firmness (a), soluble solids (b) and acidity (c) of ‘Maxi Gala’ apple stored under controlled atmosphere (CA) with or without 1-MCP and dynamic controlled atmosphere monitored by quotient respiratory 1.3 (DCA-RQ1.3) at three temperature maintained constant and four strategies of temperature variation, during 9 months storage plus 7 and 14 days at 20 °C. Bars with the same letter do not differ by the Scott-Knott test, at 5% probability of error. ns: not significant.43
- Figure 7:** Decay (a), flesh breakdown (b), mealiness (c) and healthy fruit (d) of ‘Maxi Gala’ apple stored under controlled atmosphere (CA) with or without 1-MCP and dynamic controlled atmosphere monitored by quotient respiratory 1.3 (DCA-RQ1.3) at three temperature maintained constant and four strategies of temperature variation, during 9 months storage plus 7 and 14 days at 20 °C. Bars with the same letter do not differ by the Scott-Knott test, at 5% probability of error. nd: not detected.46

Supplementary Figure 1: Variation of storage temperature for each treatment during the storage period of ‘Maxi Gala’ apple in dynamic controlled atmosphere with quotient respiratory 1.3 (DCA-RQ1.3) and controlled atmosphere (CA).....55

ARTIGO 2 **56**

Figura 1 – Setpoint do oxigênio (O₂) durante 9 meses de armazenamento de maçãs ‘Maxi Gala’ em atmosfera controlada (AC), atmosfera controlada dinâmica monitorada pela fluorescência de clorofila (ACD-FC) e quociente respiratório 1,3 (ACD-QR 1,3) com diferentes estratégias de variação da temperatura.....62

Figura 2 – (a) tratamentos (escores) e (b) variáveis (loadings) mostrando os principais componentes de maçãs ‘Maxi Gala’ armazenadas em atmosfera controlada (AC), atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pela fluorescência de clorofila (ACD-FC) e pelo quociente respiratório 1,3 (ACD-QR 1,3) sob diferentes estratégias de variação da temperatura, após 9 meses mais 7 e 14 dias a 20 °C. E-1, E-5, E-9 e E-14 – Produção de etileno; R1, R-5, R-9 e R14 – taxa respiratória; Extra. – Extravasamento de eletrólitos. CEI – Concentração de etileno interno; ACC – Atividade da enzima ACC Oxidase; Deg. – Degenerescência de polpa; SS – Sólidos solúveis; Acetato. – Acetato de etila; Sad. – Frutos sadios.67

Figura 3 – Atividade da enzima ACC oxidase (a) e concentração de etileno interna (CEI) (b) de maçãs ‘Maxi Gala’ armazenadas em atmosfera controlada (AC), atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pela fluorescência de clorofila (ACD-FC) e pelo quociente respiratório 1,3 (ACD-QR 1,3) sob diferentes estratégias de variação da temperatura, após 9 meses mais 7 e 14 dias a 20 °C. Barras com a mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.69

Figura 4 - Produção de etileno (a, b, c e d) e taxa respiratória (e, f, g e h) de maçãs ‘Maxi Gala’ ao longo de 1, 5, 9 e 14 dias a 20 °C, após 9 meses de armazenamento em atmosfera controlada (AC), atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pela fluorescência de clorofila (ACD-FC) e pelo quociente respiratório 1,3 (ACD-QR 1,3) sob diferentes estratégias de variação da temperatura. Barras com a mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.70

Figura 5 - Produção de compostos da fermentação de maçãs ‘Maxi Gala’ armazenadas em atmosfera controlada (AC), atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pela fluorescência de clorofila (ACD-FC) e pelo quociente respiratório 1,3 (ACD-QR 1,3) sob diferentes estratégias de variação da temperatura, após 9 meses mais 7 e 14 dias a 20 °C. Barras com a mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.....72

Figura 6 - Firmeza de polpa (a), acidez titulável total (ATT), (b), sólidos solúveis (SS) (c) e extravasamento de eletrólitos (d) de maçãs ‘Maxi Gala’ armazenadas em atmosfera controlada (AC), atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pela fluorescência de clorofila (ACD-FC) e pelo quociente respiratório 1,3 (ACD-QR 1,3) sob diferentes estratégias de variação da temperatura, após 9 meses mais 7 e 14 dias a 20 °C. Barras com a mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. ns: não significativo.75

Figura 7 - Incidência de podridões (a), degenerescência de polpa (b), polpa farinácea (c) e frutos sadios (d) de maçãs ‘Maxi Gala’ armazenadas em atmosfera controlada (AC), atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pela fluorescência de clorofila (ACD-FC) e pelo quociente respiratório 1,3 (ACD-QR 1,3) sob diferentes estratégias de variação da temperatura, após 9 meses mais 7 e 14 dias a 20 °C. Barras com a mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.....78

Figura Suplementar 1 – Estratégias de variação da temperatura de armazenamento em cada tratamento ao longo do período de armazenamento de maçãs ‘Maxi Gala’ em atmosfera controlada (AC) e atmosfera controlada dinâmica monitorada pela fluorescência de clorofila (ACD-FC) e quociente respiratório 1,3 (ACD-QR 1,3).87

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	13
1.1 HIPÓTESES.....	16
1.2 OBJETIVOS	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 PRODUÇÃO E ARMAZENAMENTO DE MAÇÃS	17
2.2 ATMOSFERA CONTROLADA (AC).....	17
2.2.1 1-Metilciclopropeno (1-MCP)	19
2.3 ATMOSFERA CONTROLADA DINÂMICA (ACD).....	20
2.3.1 ACD monitorada pela fluorescência de clorofilas (ACD-FC)	20
2.3.2 ACD monitorada pelo quociente respiratório (ACD-QR)	22
2.4 TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO	23
3 CAPÍTULO 1	25
3.1 TEMPERATURE VARIATION DURING STORAGE × DYNAMIC CONTROLLED ATMOSPHERE: IMPACT ON THE OVERALL FRUIT QUALITY OF ‘MAXI GALA’ APPLES AFTER LONG-TERM STORAGE	25
3.1.1 Introduction	26
3.1.2 Materials and Methods	28
3.1.2.1 <i>Plant material and sample preparation</i>	28
3.1.2.2 <i>Temperature and relative humidity</i>	28
3.1.2.3 <i>1-Methylcyclopropane (1-MCP) treatment</i>	28
3.1.2.4 <i>Controlled atmosphere (CA) and dynamic controlled atmosphere (DCA) installation and monitoring</i>	29
3.1.2.5 <i>Physicochemical analyses</i>	31
3.1.2.5.1 <i>Flesh firmness</i>	31
3.1.2.5.2 <i>Soluble solids and acidity</i>	31
3.1.2.5.3 <i>Ethylene production, respiration rates, and internal ethylene concentrations (IEC)</i>	31
3.1.2.5.4 <i>Activity of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic oxidase (ACC oxidase)</i>	32
3.1.2.5.5 <i>Decay</i>	32
3.1.2.5.6 <i>Flesh breakdown and mealiness</i>	32
3.1.2.5.7 <i>Healthy fruit</i>	32
3.1.2.5.8 <i>Acetaldehyde, ethanol, and ethyl acetate</i>	32
3.1.2.6 <i>Statistical analyses</i>	33
3.1.3 Results and Discussion	34
3.1.3.1 <i>Principal component analysis</i>	34
3.1.3.2 <i>ACC oxidase activity, internal ethylene concentration (IEC), ethylene production, and respiratory rate</i>	36
3.1.3.3 <i>Metabolites of anaerobic metabolism</i>	39
3.1.3.4 <i>Flesh firmness, soluble solids, and acidity</i>	42
3.1.3.5 <i>Decay, flesh breakdown, mealiness, and healthy fruit</i>	44
3.1.4 Conclusions	47

3.1.5 Acknowledgements.....	48
3.1.6 References	48
4 CAPITULO 2	56
4.1 DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE VARIAÇÃO DA TEMPERATURA DURANTE LONGO PERÍODO DE ARMAZENAMENTO DE MAÇÃS ‘MAXI GALA’ ARMAZENADAS EM ATMOSFERA CONTROLADA DINÂMICA	56
4.1.1 Introdução.....	57
4.1.2 Material e Métodos	59
4.1.2.1 <i>Material vegetal, preparo das amostras e análise inicial.....</i>	59
4.1.2.2 <i>Temperatura e umidade relativa.....</i>	60
4.1.2.3 <i>Aplicação de 1-metilciclopropeno (1-MCP)</i>	60
4.1.2.4 <i>Instalação e manutenção da AC e ACD</i>	60
4.1.2.5 <i>Análises físico-químicas.....</i>	62
4.1.2.5.1 <i>Firmeza de polpa</i>	63
4.1.2.5.2 <i>Sólidos solúveis (SS) e acidez titulável (AT)</i>	63
4.1.2.5.3 <i>Extravasamento de eletrólitos</i>	63
4.1.2.5.4 <i>Produção de etileno, taxa respiratória e concentração interna de etileno.....</i>	63
4.1.2.5.5 <i>Atividade da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidase (ACC oxidase).....</i>	64
4.1.2.5.6 <i>Incidência de podridão</i>	64
4.1.2.5.7 <i>Degenerescência de polpa e polpa farinácea</i>	64
4.1.2.5.8 <i>Frutos sadios.....</i>	65
4.1.2.5.9 <i>Acetaldeído, etanol e acetato de etila.....</i>	65
4.1.2.6 <i>Análise estatística</i>	65
4.1.3 Resultados e Discussão.....	66
4.1.3.1 <i>Análise dos componentes principais</i>	66
4.1.3.2 <i>Atividade da enzima ACC oxidase (ACC oxidase), concentração de etileno interno (CEI), produção de etileno e taxa respiratória</i>	68
4.1.3.3 <i>Metabolismo anaeróbico</i>	71
4.1.3.4 <i>Firmeza de polpa, extravasamento de eletrólitos, sólidos solúveis totais e acidez titulável</i>	73
4.1.3.5 <i>Incidência de podridão, degenerescência de polpa e frutos sadios.....</i>	76
4.1.4 Conclusões.....	80
4.1.5 Referências.....	80
5 DISCUSSÃO GERAL	88
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A evolução das técnicas de cultivo associada à adoção de novas cultivares, principalmente as mutantes de cultivares tradicionais, com características físico químicas que agradam aos consumidores, tornam a maçã uma das frutas mais apreciadas no mundo (DAR et al., 2019). Dentre as cultivares mais produzidas no Brasil, destaca-se a cultivar ‘Gala’ e suas mutantes, representando cerca de 62% da produção de maçã no Brasil (KIST et al., 2019). Dentre as variedades de ‘Gala’, a ‘Maxi Gala’ apresenta uma participação crescente no mercado nacional, devido à renovação dos pomares (WEBER et al., 2013b). Entretanto, o uso de poucas cultivares resulta em um curto período de colheita dos frutos. Portanto, para que as empresas possam fornecer maçãs aos consumidores ao longo de todo o ano, é necessária a utilização de temperaturas e técnicas de armazenamento eficientes que mantenham a qualidade dos frutos e diminuam as perdas durante o armazenamento por um longo período.

A temperatura de armazenamento é um dos fatores que mais afeta a qualidade dos frutos durante o período de armazenamento, pois influencia diretamente a velocidade das reações químicas e bioquímicas nas células, principalmente, a respiração e a produção de etileno (ASIF et al., 2009; EKMAN; GOLDING; MCGLASSON, 2005), que estão correlacionadas com a manutenção da qualidade dos frutos armazenados. Pesquisas recomendam temperaturas entre 0,5 a 1,5 para as mutantes da ‘Gala’ (MAZZURANA et al., 2016; WEBER et al., 2013a), quando armazenadas em atmosfera controlada (AC) (1,2 kPa oxigênio (O₂)). No entanto, estudo recente encontrou redução considerável nas perdas de firmeza de polpa, incidência de degenerescência, rachaduras e podridões para as cultivares do grupo ‘Gala’ armazenadas em 1,2 kPa O₂ na temperatura de 2,0 °C (MAZZURANA et al., 2016). Wright et al. (2010) reportam que, com o aumento da temperatura, o limite mínimo de (LMO) tolerado pelos frutos aumenta em maçãs ‘Honeycrisp’, uma vez que, a solubilização do O₂ diminui com o aumento da temperatura de armazenamento. No armazenamento em atmosfera controlada dinâmica monitorada pelo quociente respiratório (ACD-QR), o LMO é monitorado constantemente, isso possibilitando que os frutos mantenham o metabolismo em seus níveis mais baixos mesmo em temperaturas mais elevadas. Estudos recentes verificaram baixa produção de etileno, taxa respiratória, menor incidência de distúrbios fisiológicos, maior firmeza de polpa, acidez titulável e porcentagem de frutos sadios, no armazenamento em ACD-QR 1,3 em temperaturas mais elevadas (2,0 a 2,5 °C) comparado a AC e atmosfera controlada dinâmica monitorada pela fluorescência de clorofila (ACD-FC) (ANESE et al., 2019; BOTH et al., 2018).

A técnica de armazenamento mais utilizada no Brasil é a AC (BOTH, 2015; BRACKMANN et al., 2012; WEBER et al., 2013b), na qual a pressão parcial do oxigênio (pO_2) é reduzida e a de CO_2 é aumentada, além do controle da temperatura e umidade relativa (LUMPKIN et al., 2014, 2015; MAZZURANA et al., 2016), reduzindo assim o metabolismo dos frutos e possibilitando o armazenamento por até nove meses (BRACKMANN et al., 2012; WEBER et al., 2013b). No entanto, este método de armazenamento mantém a concentração de O_2 muito acima do limite mínimo (LMO) tolerado pelos frutos. Uma redução maior poderia reduzir o metabolismo no seu nível mais baixo e, por consequência, manter qualidade superior dos frutos, reduzindo também perdas pela ocorrência de distúrbios fisiológicos, podridões e baixa firmeza de polpa (BOTH et al., 2017; THEWES et al., 2017a).

Com o objetivo de reduzir perdas em AC, é utilizado a aplicação de 1-metilciclopropeno (1-MCP), um fitorregulador que inibe a ação do etileno, através do bloqueio irreversível dos receptores de etileno, retardando o amadurecimento das frutas climatéricas (SALAS et al., 2011). Estudos relatam que o uso de 1-MCP resulta em benefícios na qualidade físico-química dos frutos (BOTH et al., 2018; SCHMIDT et al., 2020), entretanto, foram relatados problemas associados com a aplicação do 1-MCP em algumas cultivares de maçãs, como o aumento na incidência de distúrbios fisiológicos quando associados com altas concentrações de CO_2 e/ou temperaturas mais elevadas em maçãs ‘Empire’ (KOUSHESH SABA; WATKINS, 2020; LEE et al., 2012) e podridões em ‘Cripps Pink’ (DOS SANTOS et al., 2018).

Desde o início deste século, pesquisas estão sendo realizadas com o intuito de desenvolver novas tecnologias que detectam o LMO e, assim, permitir a utilização de pressões parciais extremamente baixas de oxigênio durante todo o armazenamento (WRIGHT et al., 2015). A atmosfera controlada dinâmica (ACD) permite monitorar o LMO tolerado pelos frutos possibilitando, assim, variar a pO_2 durante o período de armazenamento. Atualmente, os métodos comerciais para determinar o LMO, são pela produção de etanol (DEUCHANDE et al., 2016; VELTMAN; VERSCHOOR; VAN DUGTEREN, 2003) emissão de fluorescência de clorofilas (ACD-FC) (PRANGE et al., 2015; WRIGHT et al., 2012, 2010), determinação do quociente respiratório (ACD-QR) (BOTH, 2015; BOTH et al., 2017; BRACKMANN; WEBER; BOTH, 2015; GASSER et al., 2008; WEBER et al., 2015; WRIGHT et al., 2015) e recentemente pela produção de CO_2 dos frutos (THEWES et al., 2020a).

Maçãs armazenadas em ACD-QR, apresentaram maior manutenção da qualidade dos frutos após o armazenamento, comparado a ACD-FC (BRACKMANN, 2015; BESSEMANS et al., 2016; BOTH et al., 2018; THEWES et al., 2017b; WEBER et al., 2015), uma vez que a ACD-QR possibilita acompanhar e/ou induzir o metabolismo anaeróbico dos frutos de forma

eficiente, por meio do cálculo da relação entre a produção de CO₂ e o consumo de O₂ dos frutos (WEBER et al., 2015). Resultados utilizando ACD-QR, constataram que valores do QR entre 1,3 a 1,5, foram mais eficientes comparado a AC, na manutenção das características físico-químicas após o período de armazenamento de maçãs ‘Galaxy’ sob temperaturas mais elevadas (2,0 e 2,5 °C) (ANESE et al., 2019), ‘Granny Smith’ (BESSEMANS et al., 2016) e ‘Braeburn’ (SCHMIDT et al., 2020). De modo geral, o armazenamento em ACD-QR 1,3 resultam em frutos com qualidade físicas superiores (ANESE et al., 2019) enquanto o ACD-QR 1,5 resulta maior emissão de compostos orgânicos voláteis (BOTH et al., 2017; DONADEL et al., 2019).

Nas condições em que o QR está acima de 1,0, indicam indução do metabolismo anaeróbico, isso acarreta o aumento da concentração de etanol, acetaldeído e acetato de etila na polpa dos frutos, os quais tem a capacidade de suprimir a expressão de genes envolvidos na biossíntese de etileno, como *BO-ACO1*, *BO-ACO2* e *BO-ACSI* (ASODA et al., 2009). Estudos recentes reportam que o tratamento com vapor de etanol, suprime a produção de etileno em maçãs ‘Braeburn’ (WEBER et al., 2020), ‘Nicoter’ e ‘Elstar’ (THEWES et al., 2021), ameixas ‘Laetitia’ (NUNES et al., 2019) e melões (JIN et al., 2013), acarretando a manutenção de firmeza de polpa dos frutos (JI et al., 2019; NUNES et al., 2019). Assim, o armazenamento em ACD – QR induz os frutos a produzirem uma pequena quantidade de etanol, o qual pode ajudar na manutenção da qualidade, especialmente em estendidos períodos de vida de prateleira.

Assim, buscou-se, por meio desse estudo, a combinação de ACD-QR 1,3 com variação de temperatura nas primeiras semanas de armazenamento, uma vez que, durante o enchimento das câmaras e nas primeiras semanas de armazenamento, a pO₂ das câmaras encontram-se elevados, período no qual a pO₂ é reduzido gradativamente pela respiração dos frutos e pela injeção de N₂. Esse período pode ter a duração de 3 a 4 semanas, na qual a pO₂ da câmara está bem acima do LMO, o que permite alta atividade metabólica e o conseqüente consumo de reservas. Portanto, nas primeiras semanas podem ocorrer perdas de qualidade pela excessiva respiração, assim, o armazenamento em temperaturas mais baixas (0,5 °C) durante este período, poderia reduzir o metabolismo dos frutos evitando essas perdas de qualidade. Além disso, após o armazenamento, os frutos são processadas e percorrem longas distâncias até chegarem aos estabelecimentos comerciais, onde permanecem por vários dias até serem comercializadas. Portanto, avaliar os frutos após 14 dias de vida de prateleira a 20 °C, pode representar as condições de comercialização da maçã no mercado brasileiro.

1.1 HIPÓTESES

- 1) Temperatura baixa (0,5 °C) nos primeiros 30 dias do armazenamento, em ACD-QR 1,3, permite reduzir a atividade metabólica dos frutos e melhorar a manutenção da qualidade física e química de maçã 'Maxi Gala' em relação à utilização de temperatura constante (2,0 °C) e atmosfera controlada convencional (AC) com e sem 1-MCP;
- 2) Variação da temperatura em ACD-QR 1,3, com temperatura mais elevada (2,0 °C) nos primeiros 30 dias de armazenamento, permite maior atividade metabólica dos frutos e reduz a qualidade física e química de maçã 'Maxi Gala'.
- 3) Temperatura constante ou variável mais elevada (3,0 °C) no armazenamento em ACD-QR 1,3, reduz perdas de qualidade em relação a AC com e sem 1-MCP.

1.2 OBJETIVOS

- 1) Avaliar o efeito da temperatura baixa (0,5 °C) nos primeiros 30 dias de armazenamento em ACD-QR 1,3 sobre o metabolismo e conservação da qualidade física e química de maçãs 'Maxi Gala' em relação à utilização de temperatura constante e atmosfera controlada convencional (AC) com e sem 1-MCP após 9 meses de armazenamento mais 7 e 14 dias de vida de prateleira a 20 °C.
- 2) Verificar o efeito da variação da temperatura em ACD-QR 1,3 com temperatura mais elevadas (2,0 °C) nos primeiros 30 dias de armazenamento sobre o metabolismo e conservação da qualidade física e química de maçãs 'Maxi Gala' após 9 meses de armazenamento mais 7 e 14 dias de vida de prateleira a 20 °C.
- 3) Avaliar o efeito da temperatura constante ou variável mais elevada (3,0 °C) no armazenamento em ACD-QR 1,3 sobre o metabolismo e a manutenção da qualidade física e química de maçãs 'Maxi Gala' após 9 meses de armazenamento mais 7 e 14 dias de vida de prateleira a 20 °C;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO E ARMAZENAMENTO DE MAÇÃS

A maçã (*Malus x domestica* Borkh.) é a terceira frutífera mais produzida em todo o mundo, sendo que na safra de 2017, representou 10,2% do total da fruticultura mundial (FAOSTAT, 2017). No Brasil é a quinta mais produzida, com uma produção anual de 939 milhões de toneladas na safra 2019/2020 (AGAPOMI, 2019). Deste total, cerca de 97% da produção está concentrada nos estados de Santa Catarina (52,6) e Rio Grande do Sul (44,8) (KIST et al., 2019), sendo que, a maior parte pertence à cultivar Gala e suas mutantes ('Galaxy', 'Maxi Gala', 'Royal Gala' entre outras) que representam cerca de 62% de toda a produção (KIST et al., 2019). Dentre as mutantes, a 'Maxi Gala' apresenta uma participação crescente no mercado nacional, devido à renovação dos pomares (WEBER et al., 2013b), em função da preferência dos consumidores por cultivares com alta suculência e bom balanço entre ácidos e açúcares (THEWES et al., 2015a), além da intensa coloração vermelha da epiderme (BOTH et al., 2018; WEBER et al., 2013b).

A maçã é uma fruta do tipo climatérica, ou seja, que continuam o processo de amadurecimento no período da pós-colheita (SEPPÄ et al., 2013). Em função do tipo de fruta e do período de colheita, que compreende alguns meses do ano (fevereiro a abril), são necessárias técnicas de armazenamento eficientes para que se consiga ofertar ao mercado consumidor ao longo de todo o ano frutos de qualidade. Os estados de Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS) possuem a capacidade de armazenar 80 a 85% de suas produções. Atualmente, as empresas utilizam algumas técnicas para prolongar a vida de pós-colheita dos frutos, como as técnicas de atmosfera controlada (AC) e atmosfera controlada dinâmica (ACD), associando-as a utilização de temperaturas baixas e aplicação de 1-MCP (WEBER et al., 2013b; WRIGHT et al., 2012).

2.2 ATMOSFERA CONTROLADA (AC)

A AC é a técnica de armazenamento mais utilizada comercialmente para o armazenamento de maçãs, representando cerca de 70% dos frutos armazenados no Brasil (KIST et al., 2016). Neste método, a pressão parcial do O₂ (pO₂) é reduzida e a pressão parcial de CO₂ (pCO₂) é aumentada, além do controle da temperatura e umidade relativa (UR) (LUMPKIN et al., 2015; MAZZURANA et al., 2016). Essas alterações nas concentrações dos gases na atmosfera de armazenamento resultam em frutos com maior qualidade em comparação ao armazenamento

refrigerado (AR), no qual, é realizado apenas o controle da temperatura de armazenamento e UR (BRACKMANN et al., 2008).

Para cada cultivar de frutas e hortaliças há uma condição específica de gases que mantém uma melhor qualidade (CHITARRA; CHITARRA, 2005), além disso, a concentração ideal dos gases pode variar entre mutantes da mesma cultivar, como ocorre na ‘Gala’ e suas mutantes (BRACKMANN et al., 2009; WEBER et al., 2013b). De modo geral, o armazenamento em AC resulta em frutos com maior acidez e firmeza de polpa, além de baixa incidência de polpa farinácea e degenerescência de polpa, redução na taxa respiratória e produção de etileno (BRACKMANN et al., 2008; KITTEMANN; NEUWALD; STREIF, 2015; WEBER et al., 2011).

No armazenamento em AC, as pressões parciais dos gases recomendadas para a maçã ‘Gala’ e suas mutantes são entre 1,0 a 1,2 kPa de O₂ e entre 2,0 a 2,5 kPa de CO₂ (BRACKMANN et al., 2008, 2009; CORRÊA et al., 2010; WEBER et al., 2011). Esta alteração nas concentrações de O₂ no ambiente das câmaras, reduz a atividade metabólica dos frutos pela redução da taxa respiratória em função do O₂ ser o aceptor final na cadeia transportadora de elétrons (TAIZ; ZEIGER, 2013), podendo também agir de forma direta, através da redução na produção de etileno, hormônio responsável pelo amadurecimento dos frutos (LELIEVRE et al., 1997; YANG; HOFFMAN, 1984), uma vez que, a enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase (ACC oxidase) é dependente da presença de O₂ para converter o ácido aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) a etileno (BOOKER; DELONG, 2015). As altas concentrações de CO₂, utilizadas no ambiente das câmaras de AC, também atuam na redução do metabolismo dos frutos, inibindo várias enzimas da rota glicolítica e do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (LIU et al., 2004). Assim, o armazenamento em AC pode ser estendido por até 8 ou 9 meses (WEBER et al., 2013b), sendo necessário a importação de um baixo volume de maçãs para manter o fornecimento durante a entressafra.

As pO₂ e pCO₂ no armazenamento em AC, são baseados em estudos prévios, os quais definem uma condição de gases para cada cultivar e/ou mutante, sendo mantidas constante durante todo o período de armazenamento, não levando em consideração a estação de cultivo, local de produção e o tempo de armazenamento (TRAN et al., 2015). Assim, as concentrações dos gases são reguladas em níveis seguros, ou seja, ficando muito acima da pO₂ que reduz ao máximo o metabolismo dos frutos durante todo o período de armazenamento, conseqüentemente resulta em perdas na qualidade dos frutos ao final do armazenamento. No entanto, como a AC não leva em consideração o metabolismo dos frutos durante o armazenamento, resulta em taxa metabólica mais elevada do que em condições com pO₂ próximo do limite mínimo tolerado pelos

frutos (THEWES et al., 2017a), acarretando perdas significativas devido à alta incidência de polpa farinácea e degenerescência da polpa (HO et al., 2013; WEBER et al., 2011, 2013b), e alta incidência de podridões e perda na firmeza de polpa (THEWES et al., 2017c). Porém, com o objetivo de minimizar as perdas em AC, as empresas de armazenamento de maçãs, passaram utilizar a aplicação de 1-metilciclopropeno (1-MCP) combinado com a técnica de AC, o qual, inibe a ação do etileno.

2.2.1 1-Metilciclopropeno (1-MCP)

A aplicação de 1-MCP em maçãs armazenadas é uma tecnologia complementar ao armazenamento em AC, o qual, tem como principal objetivo prolongar o tempo de armazenamento e a vida de prateleira dos frutos (WATKINS, 2006). O 1-MCP, é um composto químico volátil que se liga irreversivelmente aos receptores de etileno na membrana das células, impedindo assim a ligação do etileno e bloqueando a ação catalítica do etileno e, conseqüentemente, retardando o amadurecimento dos frutos (WATKINS, 2006; YANG et al., 2016). Sisler; Serek (1997) reportam que a ligação do 1-MCP aos receptores de etileno ocorre de maneira competitiva com o etileno, porém a afinidade deste é 10 vezes maior que o próprio fitormônio. Além de inibir a ação do etileno, Tatsuki; Endo; Ohkawa (2007) reportam que o 1-MCP, também influencia na expressão de genes que codificam as enzimas ACC oxidase (*MdACO1*), ACC sintase (*MdACS1*), receptores de etileno (*MdERS1* e *MdERS2*) além da síntese de enzimas relacionadas à lipoxigenase (LOX) e de compostos voláteis (YANG et al., 2016). Assim, com a aplicação de 1-MCP ocorre um bloqueio de genes que codificam enzimas produtoras e receptoras de etileno, retardando a senescência dos frutos. Estudos reportam os efeitos benéficos da aplicação do 1-MCP em AC, como menor perda de firmeza em maçãs ‘McIntosh’, ‘Empire’ (NOCK; WATKINS, 2013), ‘Royal Gala’ (BRACKMANN et al., 2013), ‘Cripps Pink’, ‘Gala’, ‘Golden Delicious’ (ZANELLA; ROSSI, 2015) e ‘Braeburn’ (SCHMIDT et al., 2020; ZANELLA; ROSSI, 2015), menor taxa respiratória (NOCK; WATKINS, 2013; THEWES et al., 2018; WATKINS, 2006), maior manutenção da acidez (ARGENTA; MATTHEIS; FAN, 2010) além da menor incidência de polpa farinácea (BRACKMANN et al., 2014; THEWES et al., 2015b) e escaldadura superficial de maçãs ‘Cortland’ e ‘Delicious’ (LU et al., 2013).

No entanto, além dos efeitos benéficos, a aplicação do 1-MCP em alguns estudos aumentou a ocorrência de degenerescência de polpa em maçãs ‘Empire’ (KOUSHESH SABA; WATKINS, 2020) e aumento da incidência de podridões, independente do método de armazenamento (DOS

SANTOS et al., 2018), uma vez que, a aplicação do 1-MCP aumenta a susceptibilidade dos frutos ao ataque de fungos (BOTH et al., 2018; DOS SANTOS et al., 2018). Além disso, o 1-MCP suprime síntese de compostos voláteis importantes para o aroma das maçãs, que tem importância na comercialização, uma vez que o aroma é um atributo de qualidade. Trabalhos recentes tem demonstrado que a aplicação de 1-MCP diminui a síntese de compostos voláteis, especialmente ésteres (ANESE et al., 2020; THEWES et al., 2020b; YANG et al., 2016), resultando efeito negativo sobre o desenvolvimento do aroma (FAN; MATTHEIS, 1999). O efeito inibitório sobre a síntese de compostos voláteis deve-se à inibição de enzimas do metabolismo de lipídios, beta-oxidação e LOX, e atividade de algumas isoformas das enzimas álcool acetil transferase (ATT) e álcool desidrogenase (ADH) (YANG et al., 2016).

2.3 ATMOSFERA CONTROLADA DINÂMICA (ACD)

A ACD é uma nova forma de definir a pO_2 na câmara durante o período de armazenamento, levando em consideração o metabolismo dos frutos (THEWES et al., 2017b; WRIGHT et al., 2012). O princípio da ACD consiste em reduzir a pO_2 na câmara de armazenamento o mais próximo possível do LMO tolerado pelos frutos (THEWES et al., 2017c; ZANELLA et al., 2005), que é o mínimo de pO_2 tolerado pela fruta, em que não ocasiona danos decorrentes do metabolismo anaeróbico. Portanto, toda vez que for utilizado a ACD, é muito necessário a utilização de um método que estima o LMO, para evitar perdas durante o armazenamento, em função da excessiva produção de compostos voláteis do metabolismo anaeróbicos, que em concentração muito alta podem causar *off-flavours* (KÖPCKE, 2015; WRIGHT et al., 2015). O acompanhamento e monitoramento do LMO em tempo real durante todo o período de armazenamento em ACD pode ser realizado das seguintes formas: [1] baseado na determinação do etanol (DEUCHANDE et al., 2016; VELTMAN; VERSCHOOR; VAN DUGTEREN, 2003); [2] baseado na emissão da fluorescência de clorofilas em resposta as baixas pO_2 (PRANGE et al., 2015; WRIGHT et al., 2012, 2010); [3] baseado na determinação do quociente respiratório dos frutos (BOTH, 2015; WEBER, 2013; WEBER et al., 2015; WRIGHT et al., 2015) e [4] baseado na produção de CO_2 dos frutos (THEWES et al., 2020a).

2.3.1 ACD monitorada pela fluorescência de clorofilas (ACD-FC)

Este método foi o primeiro a ser utilizado comercialmente para monitorar o LMO e atualmente é o mais utilizado em todo o mundo. Tem como princípio a emissão de fluorescência pelas clorofilas presentes na epiderme dos frutos, isso ocorre em maior intensidade quando as

frutas/plantas se encontram em situações de estresse como secas, danos por herbicidas, excesso de luz e temperatura (TAIZ; ZEIGER, 2013), além de estresse por baixo oxigênio (PRANGE et al., 2007), fazendo com que a transferência de energia luminosa das clorofilas para os centros de reação seja interrompida (TAIZ; ZEIGER, 2013). Quando os frutos estão sob estresse por baixas pO_2 as clorofilas presentes na epiderme dos frutos emitem uma fluorescência quando recebem energia luminosa.

Na literatura são levantadas quatro hipóteses para explicar o mecanismo fisiológico que conecta o metabolismo respiratório, como a glicólise, o ciclo de Krebs, e as clorofilas. Uma delas é que, com a redução da pO_2 a níveis extremamente baixos, ocorre aumento na produção e acúmulo de acetaldeído, etanol, acetato de etila e lactato que, em altas concentrações, causam danos às membranas celulares e suas organelas, como os cloroplastos, danificando os centros de reação dos fotossistemas (FS), dificultando a transferência da energia luminosa e resultando no aumentando a dispersão de energia na forma de fluorescência (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Além disso, a acidose celular e de suas organelas, provocada pela condição de anaerobiose, é uma outra justificativa para o incremento na emissão da fluorescência (PRANGE et al., 2005). Uma outra explicação é que a menor respiração aeróbica diminui a produção de energia, ocorrendo perda de homeostase celular e acúmulo de compostos reduzidos (NADH) no citosol e na mitocôndria que podem ser transportados para o cloroplasto, onde é utilizado para reduzir o *pool* de plastoquinona (PQ), podendo frear o transporte da energia luminosa (elétrons). A PQ no estado altamente reduzido no cloroplasto é responsável pelo aumento no F_0 , que é uma estimativa da fluorescência mínima (F_0) da fluorescência de clorofila (WRIGHT et al., 2011, 2015). Além disso, a acidificação do estroma afeta o ciclo das xantofilas mais especificamente a zeaxantina (WRIGHT et al., 2011). Em condição de estresse ou excesso de luz a violaxantina de-epoxidase é ativada, aumentando a produção do intermediário anteroxantina e, por fim, a zeaxantina. Resultando em maior quantidade de zeaxantina do que violaxantina no ciclo das xantofilas. A zeaxantina é responsável pelo mecanismo não-fotoquímico da dissipação da excitação do sistema de antena do fotossistema II, que é a fluorescência de clorofilas (TAIZ; ZEIGER, 2013). Assim, o aumento no pico de fluorescência pode ser induzido diretamente pelo baixo O_2 , uma vez que a transformação de zeaxantina para anteraxantina, é necessária a presença de O_2 para atividade da enzima zeaxantina epoxidase do estroma dos cloroplastos.

No início do armazenamento o O_2 é reduzido até que ocorra a emissão de um pico de fluorescência. A partir deste momento o *setpoint* do O_2 é incrementado em 0,2 kPa, porém este nunca deve ser menor que 0,4 kPa, devendo ser mantido durante todo o período de armazenamento ou até o momento que outro pico de fluorescência seja detectado, quando o

setpoint do O₂ deve ser novamente aumentado (PRANGE et al., 2007; TRAN et al., 2015). Neste método os frutos não são mantidos próximo do LMO durante o armazenamento. Quando é detectada a fluorescência de clorofilas, os frutos estão sobre pO₂ estressantes, ou seja, abaixo do LMO e, posteriormente, permanecem em uma pO₂ mais elevada e estática durante o restante do armazenamento, não se tendo benefícios do baixo O₂.

A utilização da ACD-FC traz vantagens em relação à AC, tais como monitoramento do LMO, método não químico e não destrutivo, possível realizar medições rápidas e frequentes (PRANGE et al., 2013), além da possibilidade da redução das pressões parciais de O₂ a níveis extremamente baixos, que proporciona maior redução na taxa respiratória e produção de etileno, mantendo maior qualidade ao longo do armazenamento, em comparação aos frutos armazenados em AC (BOTH et al., 2017; THEWES et al., 2015a, 2017c). Diversos estudos comparam o armazenamento em ACD-FC à AC e *Ultra low oxygen* (ULO<0,7 kPa), sob a manutenção da qualidade dos frutos, resultando redução na ocorrência de distúrbios fisiológicos, produção de etileno e da qualidade geral comparado à AC (DEUCHANDE et al., 2016; KÖPCKE, 2015; TRAN et al., 2015; WRIGHT et al., 2015). No entanto, mesmo diante da eficiência deste método, o que dificulta o aumento de utilização da ACD-FC comercialmente no Brasil, é o alto custo dos sensores para medir a fluorescência. Por outro lado, estudo desenvolvido com maçãs ‘Royal Gala’ e ‘Galaxy’ não encontraram benefício na manutenção da qualidade utilizando ACD-FC quando comparado com o armazenar em ULO com 0,4 kPa O₂ (THEWES et al., 2015a).

2.3.2 ACD monitorada pelo quociente respiratório (ACD-QR)

Este método foi desenvolvido no Brasil em 2013 (WEBER, 2013), permite o monitoramento do LMO durante todo o armazenamento em ACD, e é baseado no monitoramento do metabolismo anaeróbico dos frutos pela quantificação do CO₂ produzido, e O₂ consumido ($QR = \Delta CO_2 / \Delta O_2$), determinado em um intervalo de 13 horas (WEBER et al., 2015). Segundo Thewes (2016), em condições normóxicas o QR tem um valor próximo de 1,0, podendo variar pouco abaixo ou acima, decorrente do tipo de substrato que está sendo utilizado na respiração. Goyette et al. (2012) afirmam que, quando o substrato utilizado são açúcares, o QR é igual a 1,0, já quando o QR for menor que 1,0 há maior consumo de lipídios (PATEL; KERNDT; BHARDWAJ, 2020) ou decorrente da solubilização de CO₂ no suco celular (DELELE et al., 2019). Assim, quando o QR for maior que 1,0 significa que a produção de CO₂ está excedendo o consumo de O₂. Isso demonstra que está ocorrendo o metabolismo anaeróbico e, conseqüentemente, produção e acúmulo de acetaldeído, etanol e acetato de etila, os quais em

baixas concentrações são benéficos na redução da produção e do efeito do etileno, hormônio que atua no amadurecimento e senescência de frutos (ASODA et al., 2009; JIN et al., 2013; WEBER et al., 2016, 2020). Devido a isso ocorre maior manutenção das características físico-químicas dos frutos, no entanto, de acordo com Wright et al. (2015), a indução demasiada do metabolismo fermentativo acumula acetaldeído, etanol e acetato de etila pode causar *off-flavours*.

Quando comparamos os métodos de monitoramento do LMO, encontramos muitos estudos realizados com o armazenamento em ACD-QR, os quais confirmam que esta técnica é eficiente na manutenção da qualidade dos frutos armazenados por longos períodos (8 a 9 meses) (BESSEMANS et al., 2016; BOTH et al., 2017; SCHMIDT et al., 2020; THEWES et al., 2017a, 2017c; WEBER et al., 2017, 2020). Estes estudos verificaram que frutos armazenados em ACD-QR quando comparadas à AC, apresentaram menor incidência de escaldadura superficial (BESSEMANS et al., 2016) e degenerescência de polpa, além de maior porcentagem de frutos sadios e manutenção da firmeza de polpa (BOTH et al., 2017; WEBER et al., 2019). Estudos também verificaram que o armazenamento em ACD-QR possibilita o armazenamento em temperatura mais elevada de maçãs ‘Gala’, permitindo elevar a temperatura de 1,0 °C até 2,5 °C, resultando em menor incidência de degenerescência de polpa (ANESE et al., 2019; BOTH et al., 2018).

2.4 TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO

As reações bioquímicas nas células são controladas pela temperatura de armazenamento, tais como, a respiração e a produção de etileno, reações estas que estão diretamente associadas à maturação e senescência dos frutos (ASIF et al., 2009; ERRAMPALLI; WAINMAN; DEELL, 2012). As temperaturas baixas também reduzem o desenvolvimento de fungos e outros patógenos, em consequência, reduzindo a incidência de podridão no armazenamento (KWEON et al., 2013). Portanto, de acordo Ekman; Golding; MCGlasson, (2005), a utilização de temperaturas baixas durante o armazenamento é o principal responsável pela redução do metabolismo dos frutos. Para maçãs mutantes da ‘Gala’ armazenadas em AC é recomendada a temperatura entre 0,5 e 1,0 °C (MAZZURANA et al., 2016; WEBER et al., 2013a), porém estudos recentes, recomendam temperaturas na faixa de 1,0 a 1,5 °C para maçãs ‘Royal Gala’ e ‘Maxi Gala’ (BOTH, 2015; WEBER et al., 2013b).

Estudos reportam que maçãs ‘Galaxy’ podem ser armazenadas a temperaturas mais altas (2,0 ou 2,5 °C) quando armazenadas em AC com aplicação de 1-MCP (ANESE et al., 2019; BOTH et al., 2018). Em maçãs ‘Golden Delicious’, ‘Jonagold’ e ‘Pinova’ foi possível aumentar

a temperatura de armazenamento em torno de 2,0 a 3,0 °C quando os frutos receberam a aplicação de 1-MCP (KITTEMANN; MCCORMICK; NEUWALD, 2015). Além disso, McCormick; Neuwald; Streif, (2010) e (2012), afirmam que é possível armazenar maçãs ‘Jonagold’ e ‘Gala’ até 4,0 °C em AC combinadas com aplicação de 1-MCP durante seis meses sem significativas perdas na qualidade, além disso, a elevação da temperatura de armazenamento permitiu a economia no consumo de energia elétrica de 26% em ‘Jonagold’ e 35% em ‘Gala’ no sistema de refrigeração da câmara. Além disso, o aumento da temperatura de 0,7 para 2,0 °C em maçãs ‘Gala’, resulta em frutos com menor incidência de degenerescência de polpa e maior firmeza de polpa, além da economia no consumo de energia elétrica de 21% na ventilação e 50% no resfriamento (MAZZURANA et al., 2016).

O acúmulo de etanol na polpa dos frutos armazenados em baixa pO_2 é dependente da temperatura de armazenamento (KE; RODRIGUEZ-SINOBAS; KADER, 1991), assim, a utilização de temperaturas maiores resulta na necessidade de aumentar as pO_2 no ambiente de armazenamento (WEBER et al., 2011). Portanto, o monitoramento do LMO durante o armazenamento é uma metodologia confiável para permitir o aumento da temperatura de armazenamento e reduzir as alterações bioquímicas nos frutos (KRUSE; RENNENBERG; ADAMS, 2011; STEFFENS et al., 2007). Utilizando a ACD-FC para monitorar o LMO de maçãs ‘Elstar’, ‘Jonagold’ e ‘Gloster’, Köpcke, (2015) obteve pO_2 de 0,6 kPa a 2,0 °C; 0,7 kPa a 3,5 °C e 0,8 kPa a 10 °C. Isso ocorre porque com o aumento da temperatura a solubilidade do O_2 diminui, causando um incremento no LMO conforme a temperatura aumenta (WRIGHT et al., 2010). Estudos avaliando o aumento da temperatura de armazenamento combinado com ACD-QR, verificaram que maçãs ‘Galaxy’ podem ser armazenadas nas temperaturas de 2,0 e 2,5 °C, com a vantagem de não necessitar a aplicação do 1-MCP (ANESE et al., 2019; BOTH et al., 2018).

Portanto, sabe-se que a ACD-QR mantém a qualidade dos frutos em temperaturas mais elevadas durante todo o período (ANESE et al., 2019; BOTH et al., 2018). Assim, buscou-se, avançar nas pesquisas com ACD-QR, avaliando a possibilidade de uma combinação de ACD-QR 1,3 com a utilização de temperatura baixa (0,5 °C) nas primeiras semanas de armazenamento, desta forma, o metabolismo dos frutos seria reduzido ao máximo para retardar o amadurecimento dos frutos, além de reduzir distúrbios fisiológicos (WRIGHT et al., 2015). Atualmente, ainda não se tem relatos na literatura do armazenamento de maçãs em ACD-QR com variação de temperatura ao longo do período de armazenamento.

3 CAPÍTULO 1

3.1 TEMPERATURE VARIATION DURING STORAGE × DYNAMIC CONTROLLED ATMOSPHERE: IMPACT ON THE OVERALL FRUIT QUALITY OF ‘MAXI GALA’ APPLES AFTER LONG-TERM STORAGE¹

ABSTRACT

The apple harvest is concentrated in a short period and requires storage techniques capable of maintaining fruit quality between harvesting periods. Therefore, the present study aimed to evaluate the effects of temperature variation strategies during storage period using a dynamic controlled atmosphere based on respiratory quotient (DCA-RQ) on the physicochemical qualities of ‘Maxi Gala’ apples after 9 months of storage plus 7 and 14 days at 20 °C. The apples were stored in a controlled atmosphere (CA), CA+1-methylcyclopropene (1-MCP) at 0.5 °C, and DCA-RQ 1.3 at three constant temperatures of [1] 0.5, [2] 2.0, and [3] 3.0 °C and four temperatures variation of [1] (0.5/30d+3.0/240d °C), [2] (0.5/30d+2.0/240d °C), [3] (2.0/30d+3.0/240d °C), and [4] (0.5/30d+2.0/30d+3.0/210d °C). After 9 months of storage plus 14 days at 20 °C, fruits stored in DCA-RQ at 0.5, 2.0, (0.5/30d+2.0/240d), and (2.0/30d+3.0/240d) °C maintained better quality compared to the other conditions. However, only DCA-RQ at 2.0 °C showed the best quality after 7 and 14 days at 20 °C. Fruit stored in DCA-RQ and kept for 14 days at 20 °C maintained better quality than CA and CA+1-MCP, while temperatures of 0.5, 2.0, (0.5/30d+2.0/240d), and (2.0/30d+3.0/240d) °C showed better flesh firmness and percentage of healthy fruit, with lower flesh breakdown and decay incidence. In conclusion, DCA-RQ 1.3 under constant temperature of 2.0 °C or with temperature increasing (2.0/30d+3.0/240d) during storage keeps fruit with better quality compared to those stored in CA+1-MCP treatment after 9 months of storage plus 7 and 14 days of shelf life.

Keywords: *Malus domestica*; Respiratory quotient (DCA – RQ); Anaerobic metabolism, Flesh firmness, Flesh breakdown, 1-MCP.

¹ Artigo formatado de acordo com as normas da revista Food Packaging and Shelf Life.

3.1.1 Introduction

Apples (*Malus domestica* Borkh.) are fruit which comprise a large number of cultivars, including 'Maxi Gala,' whose harvest window is concentrated in a short period of the year (January to March in Southern Brazil). As a climacteric fruit, it continues its process of ripening after the abscission of the plant. Physicochemical quality is reduced to short periods after harvest when inadequate temperatures and storage techniques are employed. Given the above, in order for apples to be supplied to consumers throughout the year, companies need efficient storage techniques to maintain fruit quality and reduce losses during and after storage for extended periods.

Currently, apples are mainly stored under a controlled atmosphere (CA) (Li et al., 2018), which enables storage for long periods, reaching 8 months (Brackmann et al., 2012; Weber et al., 2013). However, in CA the O₂ partial pressure (pO₂) adopted remains static and above the lower oxygen limit (LOL), for security purpose, because did not consider fruit metabolism variations as growing season, temperature, growth regulators applied, among other factors (Wright et al., 2015). Therefore, maintaining O₂ concentrations above the LOL tolerated by fruit is essential to inhibit negative physiological responses including flesh breakdown (Ho et al., 2013), decay, and reduced flesh firmness (Both et al., 2017). But this higher pO₂ does not ensure prolonged storage periods.

In this context, dynamic controlled atmosphere (DCA) is a useful method to define the lower O₂ concentrations in the chamber during storage by monitoring fruit metabolism (Bessemans et al., 2016; Weber et al., 2019); DCA maintains O₂ levels as close as possible to the LOL tolerated by the fruit (Thewes et al., 2020). The LOL can be determined in real-time during storage using ethanol determination (Deuchande et al., 2016), chlorophyll fluorescence (CF) (Wright et al., 2010), respiratory quotient (RQ) of fruit (Both et al., 2017; Thewes et al., 2017; Weber et al., 2017; Wright et al., 2015), and more recently by determining the apple CO₂ production (Thewes et al., 2020). Nonetheless, during storage chambers filling and at beginning of storage, O₂ levels remains above the desired to the reduce metabolism, in which the pO₂ is gradually reduced by fruit respiration or with N₂ flushing. This period can last from three to four weeks, with O₂ levels remaining well above the LOL, leading to high metabolic activity and fruit reserves consumption. Therefore, given that losses may occur due to the higher metabolic activity in this initial period that fruits adapt to low pO₂ levels, storage at lower temperatures (0.5 °C) could reduce fruit metabolism and avoid loss of quality.

Among different DCA techniques, DCA-RQ enables fruit metabolism to be monitored by the quotient between CO₂ production by fruit respiration and O₂ consumption (Weber et al., 2015). Moreover, this method allows that a little anaerobic metabolism would be induced during storage, with the production of safe levels of metabolites such as acetaldehyde, ethanol, and ethyl acetate (Thewes et al., 2018; Weber et al., 2017). Induction of anaerobic metabolism can help maintain fruit quality during storage, especially under higher storage temperatures (3.5–10 °C), in which ethylene production is increased (Köpcke, 2015). In addition, DCA-RQ storage is more efficient compared to CA in maintaining fruit quality during and after the storage of ‘Granny Smith’ (Bessemans et al., 2016) and ‘Galaxy’ apples (Both et al., 2018; Thewes et al., 2017).

Storage temperature greatly affects the speed of chemical and biochemical reactions in cells, especially respiration rate and ethylene production (Asif et al., 2009), which are correlated to stored fruit quality maintenance. As storage temperatures are reduced, lower respiration rate and ethylene production, and as consequence reduces biochemical changes in fruit were observed (Steffens et al., 2007). According to Brackmann et al. (2010), the temperature is the most important factor in fruit quality maintaining during the storage period, and researches had shown that recommended temperatures range from 0.5 to 1.5 °C for ‘Gala’ strains stored in CA (Both et al., 2017; Mazzurana et al., 2016). Nonetheless, storage temperatures also affect the LOL of the fruit (Gasser et al., 2010). According to Wright et al. (2010), the LOL of fruit may vary during the storage period. Hence, a method that reliably decreases the LOL may allow higher storage temperatures while maintaining low fruit metabolism. Storage under DCA-RQ 1.3 at higher temperatures (2.0-2.5 °C) resulted in lower ethylene production, respiratory rates, incidence of physiological disturbances, and higher flesh firmness, titratable acidity, and percentage of healthy fruit (Anese et al., 2019; Both et al., 2018). Anese et al. (2019) reported that ‘Galaxy’ apples could be stored under DCA-RQ 1.3 or 1.5 at 2.0 and 2.5 °C with the advantage of not requiring 1-MCP application.

After storage, fruits undergo processing (classification in packing house) and transportation for long distances until they reach commercial establishments, where they remain for more some days until consumers purchase. Thus, the shelf life extended up to 14 days can represent the conditions of the commercialization of apples in the Brazilian and worldwide market. In this context, the present study aimed to evaluate higher temperatures (3.0 °C) and temperature variation strategies during the storage period in DCA-RQ 1.3, on the physicochemical quality of ‘Maxi Gala’ apples after 9 months of storage plus 7 and 14 days shelf life periods, at 20 °C.

3.1.2 Materials and Methods

3.1.2.1 Plant material and sample preparation

'Maxi Gala' apples were acquired from a commercial orchard (28°30'44" S; 50°56'02" W; 971 m) in Vacaria, Rio Grande do Sul State (RS), southern Brazil. The fruit were harvested in February, on the peak of this cultivar harvest period. Soon after harvest, the fruits were transported to the Postharvest Research Center (NPP) of the Federal University of Santa Maria (RS), and fruits with mechanical damage and out-of-caliber (lower 100g) were discarded. The experimental units were then prepared, and each treatment consisted of eight replicates of 25 fruit each, totaling 200 fruit. Four replicates were evaluated at 7 days shelf life and the other four at 14 days, at 20 °C.

After preparing experimental units, three replicates of 20 fruit each were randomly separated to determine the initial quality and the stage of fruit maturation. In the initial analysis, the iodine-starch index was performed according to the methodology proposed by Streif (1984), with an index of 1 (all fruit with starch) to 10 (without starch), resulting in the index of 6.10. The soluble solids content was 12.0%, acidity 0.44 g malic acid 100 g⁻¹, respiratory rate 6.29 µg kg⁻¹ s⁻¹, ethylene production 0.39 ng kg⁻¹ s⁻¹, flesh firmness 84.8 N and ACC oxidase activity 15.4 ng kg⁻¹ s⁻¹.

3.1.2.2 Temperature and relative humidity

Immediately after sampling, the apples were put inside experimental steel chambers with a volume of 0.233 m³ (1 m x 0.58 m x 0.40 m) which were allocated inside cold rooms, at a temperature of 5 °C on the first day, and gradually reduced during the next 5 days, until the established storage temperatures (0.5, 2.0, or 3.0 °C). Rooms temperatures were controlled during the 9 months of storage using electronic thermostats and monitored daily using mercury thermometers (with a resolution of 0.1 °C) inserted in the pulp of the apples inside the cold rooms. The relative humidity inside the experimental chambers was monitored with psychrometers and adjusted with calcium chloride (10 g kg⁻¹ of fruit), which absorbed excess moisture, being maintained at an average of 94 ± 2.0%.

3.1.2.3 1-Methylcyclopropane (1-MCP) treatment

The 1-MCP (SmartFresh®, 0.14% of the active ingredient) was applied after the fruit reached 2.0 ± 0.1 °C. The fruits were then packed in a small chamber (0.4 m³), which was located inside a cold room. A 0.625 µL L⁻¹ solution of 1-MCP was prepared according to the manufacturer's instructions. The solution was then placed in a Petri dish and immediately

positioned inside the chamber that was hermetically sealed for 24 h. During this period, the air of the chamber was circulated with a ventilator in order to homogenize the 1-MCP. After 24 h, the fruits were removed from the chamber and stored in CA.

3.1.2.4 Controlled atmosphere (CA) and dynamic controlled atmosphere (DCA) installation and monitoring

Immediately after applying the 1-MCP and reaching the storage temperature, the fruits were placed in experimental chambers, which were allocated inside cold rooms, with pre-established temperatures and the experimental chambers were hermetically closed. The storage conditions were: [1] controlled atmosphere (CA) -1.2 kPa O_2 + 2.0 kPa CO_2 (stored at 0.5 °C for 270 days); [2] AC+1-MCP (stored at 0.5 °C for 270 days); [3] dynamic controlled atmosphere monitored by respiratory quotient 1.3 (DCA-RQ 1.3) at 0.5 °C (stored at 0.5 °C for 270 days); [4] DCA-RQ 1.3 at 2.0 °C (stored at 2.0 °C for 270 days); [5] DCA-RQ 1.3 at 3.0 °C (stored at 3.0 °C for 270 days); [6] DCA-RQ 1.3 at 0.5 and 3.0 °C (stored at 0.5 °C for 30 days and at 3.0 °C for 240 days); [7] DCA-RQ 1.3 at 0.5 and 2.0 °C (stored at 0.5 °C for 30 days and at 2.0 °C for 240 days); [8] DCA-RQ 1.3 at 2.0 and 3.0 °C (stored at 2.0 °C for 30 days and at 3.0 °C for 240 days); [9] DCA-RQ 1.3 at 0.5 , 2.0 and 3.0 °C (stored at 0.5 °C for 30 days followed by 2.0 °C for 30 days and 3.0 °C for 210 days). Storage conditions are shown in Supplementary figure 1.

The pO_2 in the CA and DCA chambers was reduced by flushing the experimental chambers with nitrogen (N_2), up to 5.0 kPa. N_2 was obtained from a gas generator, which uses the pressure swing adsorption (PSA) principle. Subsequently, there was a gradual O_2 reduction (1.0 kPa of O_2 day⁻¹) during 5 days due to fruit respiration until reaching the concentrations stipulated for each treatment. This gradual reduction aims to simulate the commercial procedures and allow to gradually adapt fruit to low O_2 concentrations and temperatures. The pCO_2 was obtained naturally by fruit respiration, and the excess was removed automatically by air circulation from the experimental chambers throughout an absorber with hydrated lime. The pO_2 and pCO_2 were monitored daily with a gas analyzer (Siemens, Ultramat model, Germany) and corrected by an automatic control system (Valis Automação TI, Lajeado, RS, Brazil). If too low, the O_2 was replaced by injecting atmospheric air into the experimental chambers until the desired set point. The LOL monitoring by the RQ method was initiated for the DCA conditions when pO_2 reached 0.5 kPa. Variations in oxygen levels are shown in Figure 1.

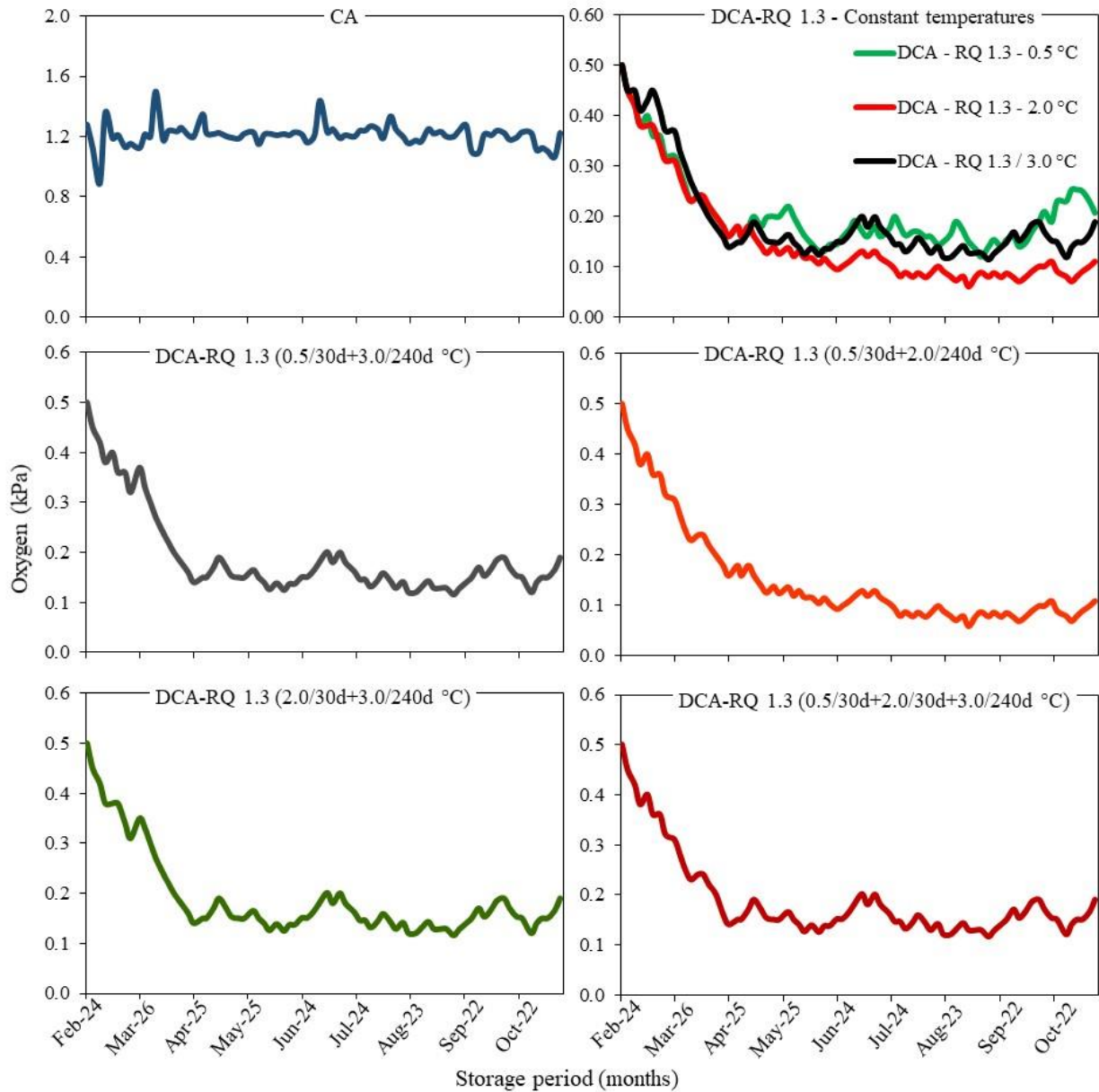


Figure 1: Variations in oxygen levels in controlled atmosphere (CA) and dynamic controlled atmosphere with quotient respiratory 1.3 (DCA-RQ1.3) during 9 months of storage. DCA-RQ 1.3 at 0.5 °C: Minimum pO₂: 0.12 kPa; Average pO₂: 0.21 kPa; DCA-RQ 1.3 at 2.0 °C: Minimum pO₂: 0.06 kPa; Average pO₂: 0.15 kPa; DCA-RQ 1.3 at 3.0 °C: Minimum pO₂: 0.12 kPa; Average pO₂: 0.19 kPa; DCA-RQ 1.3 (0.5/30d+3.0/240d °C): Minimum pO₂: 0.12 kPa; Average pO₂: 0.19 kPa; DCA-RQ 1.3 (0.5/30d+2.0/240d °C): Minimum pO₂: 0.06 kPa; Average pO₂: 0.15 kPa; DCA-RQ 1.3 (2.0/30d+3.0/240d °C): Minimum pO₂: 0.12 kPa; Average pO₂: 0.19 kPa; DCA-RQ 1.3 (0.5/30d+2.0/30d+3.0/210d °C): Minimum pO₂: 0.12 kPa; Average pO₂: 0.19 kPa.

To determine the LOL during storage, the RQ was determined twice a week according to proposed by Weber et al. (2015). The RQ was determined by the relation of carbon dioxide

(CO₂) production and O₂ determined in an interval of 13 h (QR= $\Delta\text{CO}_2/\Delta\text{O}_2$). The pO₂ adjusted according to the RQ value obtained then the RQ was equal to 1.3 ± 0.1 , pO₂ was maintained equal. With RQ below or above 1.3, pO₂ was reduced or increased, respectively, in order to maintain RQ equal to 1.3. The pCO₂ for all DCA conditions was 1.6 kPa. The CA conditions were maintained following the method proposed by Thewes et al. (2017a), in which the pO₂ was 1.2 kPa (± 0.2 kPa) and pCO₂ was 2.0 (± 0.2 kPa).

3.1.2.5 Physicochemical analyses

After 9 months of storage plus 7 and 14 days shelf life at 20 °C (± 1) and 80% (± 5) relative humidity, to simulate the commercial period, the following analyses were performed.

3.1.2.5.1 Flesh firmness

Flesh firmness was analyzed using a manual penetrometer equipped with an 11-mm tip. The tip was inserted on two sides of the equatorial region of the fruit, where the epidermis was previously removed. The results were expressed in Newton (N).

3.1.2.5.2 Soluble solids and acidity

Soluble solids were determined with a refractometer from the juice extracted from the fruit of each repetition using a juice centrifuge (Philips Walita). Three drops of juice were placed on the prism of the refractometer (Biobrix, Model 103, Curitiba, Brazil) to determine the soluble solids content. The results were expressed in percentage. The acidity was determined using 10 mL of the juice diluted in 100 mL of distilled water and titrated with a NaOH 0.1 N solution, until reaching pH 8.1, and results were expressed in g malic acid 100 g⁻¹.

3.1.2.5.3 Ethylene production, respiration rates, and internal ethylene concentrations (IEC)

Ethylene production was determined from approximately 1500 g of fruit of each replicate, placed inside a 5-L glass jar that was hermetically sealed for about one hour, at 20 °C. Two aliquots of 1 mL from air of the jar headspace were extracted and injected into a gas chromatograph (3400, Varian, Palo Alto, CA, USA) equipped with Poropak N80/100 column and flame ionization detector with a column, injector, and detector temperature of 90, 140, and 200 °C, respectively. The results were expressed in ng kg⁻¹s⁻¹.

The respiration rate was obtained by CO₂ accumulation within the same jars used to ethylene determination. A continuous flow gas analyzer (Isolcell Italy, Oxycarb model 6) allowed the air to flow throughout the jars and register the CO₂ concentration. The results were expressed in $\mu\text{g CO}_2 \text{ kg}^{-1}\text{h}^{-1}$.

The IEC was determined according to the method proposed by Mannapperuma, Singh, and Montero (1991). The internal air of the fruits was removed with the aid of a vacuum pump

at 565 mm Hg suction pressure and a closed container filled with water in which the fruit was submerged. An inverted funnel, with a septum in its thinner end, covered the fruit, allowing the air removed from it to be accumulated, and two samples of this air (1 mL each) were injected into the same chromatograph used to determine ethylene production. The results were expressed in $\mu\text{g L}^{-1}$ of air extracted from the fruit slices.

3.1.2.5.4 Activity of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic oxidase (ACC oxidase)

The ACC oxidase activity was determined according to the method developed by Bufler (1986), in which 3.0 g of the fruit epidermis extracted from the equatorial region were immersed for 30 min in a 0.1 mMol L^{-1} solution of ACC (aminocyclopropane-1-carboxylic acid) in 10 mMol L^{-1} of the MES buffer (ethanossulonic acid 2 (N-morfolion)) at pH 6.0. The samples were then put inside hermetically sealed 50 mL syringes and 2% of CO_2 was added. After 30 min, two aliquots 1 mL were removed from the syringe, and ethylene concentration was determined by gas chromatography (as described for ethylene). The data were expressed in $\text{ng C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

3.1.2.5.5 Decay

Decay incidence was determined after a shelf life of 7 and 14 days by counting the number of fruits that presented any rot symptoms in the epidermis (lesions diameter $>5 \text{ mm}$). Data were expressed as a percentage.

3.1.2.5.6 Flesh breakdown and mealiness

These disorders were determined by quantifying fruits that presented internal darkening (flesh breakdown) and/or mealy pulp (mealiness) after the cross-section of all fruit of each repetition, according to Brackmann et al. (2015). The results were expressed as a percentage.

3.1.2.5.7 Healthy fruit

Healthy fruit were obtained by the difference between the total fruit of each repetition (25 fruit) and the number of fruits without any symptoms of decay, flesh breakdown, and/or mealiness, as proposed by Brackmann et al. (2015). Results were expressed as percentage.

3.1.2.5.8 Acetaldehyde, ethanol, and ethyl acetate

Anaerobic metabolism compounds were determined from fruit samples previously cooled at $0 \text{ }^\circ\text{C}$ (pulp temperature). After cooling the pulp, horizontal slices (2-3 cm) of the equatorial region were removed and centrifuged at low temperatures to avoid enzymatic and chemical oxidation of the samples. Then, 15 mL of the juice was transferred to 20-mL vials and frozen at $-30 \pm 1.0 \text{ }^\circ\text{C}$ until analysis. At this time, each sample was taken from the temperature of $-30 \text{ }^\circ\text{C}$ and thawed at $0 \text{ }^\circ\text{C}$. Then, 2 mL of juice was mixed with 0.3 g of NaCl and $10 \mu\text{L}$ of 3-octanol used as a standard solution ($82.2 \mu\text{g mL}^{-1}$), placed in a 4-mL glass vial, and hermetically

sealed with a silicone cap coated with PTFE. The sample was submerged in a water bath at 35 °C for 5 min, followed by exposing the fiber (Supelco, 50/30 µm x 20 mm, covered with divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane polymers, previously preconditioned according to manufacturer's protocol) in the headspace of the sample for 60 min under constant agitation at 35 °C. The fiber was then thermally desorbed in a gas chromatograph (Dani Instruments Spa., Viale Brianza, Cologno Monzese, Italy) at 250 °C for 10 min in splitless mode. The compounds were separated with a non-polar fused silica capillary column, DN-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). The carrier gas flow (nitrogen) was 1.0 mL min⁻¹. To separate the compounds from the anaerobic metabolism, a temperature ramp was used: initial temperature of 35 °C maintained for 3 min, followed by temperature increase at a rate of 2 °C min⁻¹ to 80 °C, then at 5 °C min⁻¹ until 230 °C, and maintained at this temperature for 5 min. The temperature of the FID detector was 230 °C. Anaerobic metabolism compounds were identified and quantified according to the method of Both et al. (2014). The results were expressed in µg L⁻¹.

3.1.2.6 *Statistical analyses*

The experiment was conducted in a completely randomized design. The data were submitted to normality and homogeneity of error variance using the Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively. The data that did not present normality of the errors were transformed by the formula $\text{arc.sen}\sqrt{((x)+0.5)/100}$ and the variables whose variance were heteroscedastic were transformed by the formula $\log_{10}(x+1.0)$. The data were then submitted to analysis of variance (ANOVA) and, when significant ($p < 0.05$), the Scott-Knott test compared the means at 5% probability of error. Significant differences were submitted to principal component analysis (PCA) using The Unscrambler X software (version 9.7, CAMO A/S, Trondheim, Norway) to show an overview of the results. Before multivariate data analysis, the data matrix was self-scaled for each variable to obtain the same weight for all variables (mean = 0 and variance = 1).

3.1.3 Results and Discussion

3.1.3.1 *Principal component analysis*

The PCA shows an overview of the effects of treatments (Figure 2a) and the variables analyzed (Figure 2b). The two main components (PCI and PCII) explained 35.37 and 22.16% of the overall variation, respectively, both being effects of the treatments and physicochemical variables analyzed (Figures 2a and 2b). The PCI separated the fruit stored in CA with and without 1-MCP application and DCA-RQ 1.3 at (0.5/30d+3.0/240d) and (0.5/30d+2.0/30d+3.0/210d) °C from the fruit stored in the other conditions (Figure 2a). These storage conditions are related to the higher flesh breakdown incidence during the 14 days at 20 °C, higher internal ethylene concentration (IEC) at 7 days shelf life, increased ACC oxidase activity, and higher respiration rates during the 14 days at 20 °C (Figure 2b). The results showed that fruit stored in CA with and without 1-MCP application had higher metabolism during storage, since the higher ACC oxidase activity, respiration rates, and IEC are related to these conditions.

The PCII discriminate well the fruit stored in DCA-RQ 1.3 in higher temperatures (at 3.0 °C entirely storage period or after initial lower temperatures) from the other conditions (Figure 2a). These higher temperatures in DCA-RQ 1.3 were correlated with higher decay (7 d and 14 d at 20 °C) and higher ethyl acetate at 14 d at 20 °C (Figure 2b). However, fruit stored in DCA-RQ 1.3 at 0.5, 2.0, and (0.5/30d+2.0/240d) °C were correlated with higher ethylene production on the first day at 20 °C, greater flesh firmness on the 7th day and healthy fruit amount during the 14 days evaluation time, and ethanol (7 d) and acetaldehyde (14 d) (Figure 2b). Both et al. (2018) observed higher higher ethylene production, ACC oxidase activity, respiration rates, IEC and mealiness in ‘Galaxy’ apples stored in CA with and without 1-MCP application than DCA-RQ storage at 1.0, 1.5, and 2.0 °C.

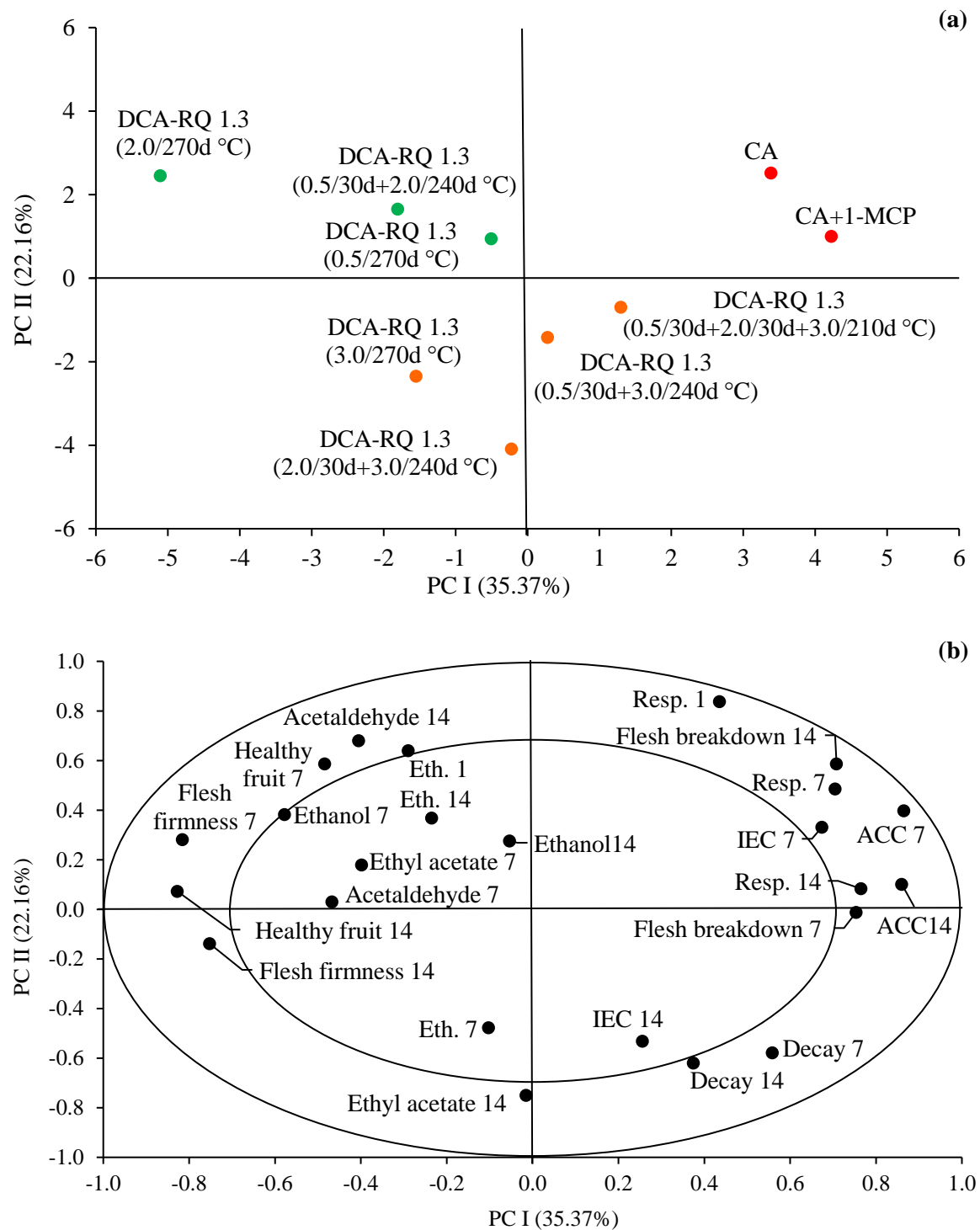


Figure 2: (a) Scores (treatments) and (b) loadings (variables) plots showing the two main components of ‘Maxi Gala’ apples stored under controlled atmosphere (CA) with or without 1-MCP and dynamic controlled atmosphere monitored by quotient respiratory 1.3 (DCA-RQ1.3) at three temperature maintained constant and four strategies of temperature variation, during 9 months storage plus 7 and 14 days at 20 °C. IEC: internal ethylene concentration; Eth: Ethylene production at 1, 7 or 14 days at 20 °C; Resp: respiration at 1, 7 or 14 days at 20 °C; ACC: ACC oxidase activity.

3.1.3.2 ACC oxidase activity, internal ethylene concentration (IEC), ethylene production, and respiratory rate

ACC oxidase is known for triggering ethylene production from the compound aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), and its activity was high after 7 days at 20 °C in fruit stored in CA with and without 1-MCP application and DCA-RQ 1.3 at 0.5 and (0.5/30d+2.0/30d+3.0/210d) °C (Figure 3a). Nonetheless, Thewes et al. (2015) demonstrated that 1-MCP application in ‘Royal Gala’ apples stored in CA at 0.5 °C had lower ACC oxidase activity after 6 days at 20 °C. Moreover, other authors have also reported that 1-MCP application reduces ACC oxidase activity regardless of the storage technique (Schmidt et al., 2020; Thewes et al., 2018; Weber et al., 2017). This trend was observed after 14 days at 20 °C, in which the enzyme activity was lower in CA+1-MCP compared to CA. At this time, fruit stored in CA and DCA-RQ 1.3 at (0.5/30d+2.0/30d+3.0/210d) °C had significantly higher ACC oxidase activity (Figure 3a). The high ACC oxidase activity in CA results from the high pO₂ used during the storage (Figure 1), given that ACC oxidase needs O₂ to convert ACC to ethylene (Booker & DeLong, 2015). Notably, 1-MCP application reduced ACC oxidase activity after 14 days at 20 °C compared to CA, although compared to DCA-RQ 1.3, 1-MCP application had no effects on reducing ACC oxidase activity (Figure 3a).

Furthermore, ACC oxidase was suppressed in fruit stored in DCA-RQ 1.3 at 2.0, 3.0, (0.5/30d+3.0/240d), (0.5/30d+2.0/240d), and (2.0/30d+3.0/240d) °C after 7 and 14 days at 20 °C. After 14 days at 20 °C, the condition in DCA-RQ 1.3 at 2.0 °C was more effective in kept the lowest ACC oxidase activity (Figures 3a). Beyond the direct effect of pO₂ in ACC oxidase activity, as the enzyme substrate, the lower pO₂ may reduce the gene expression of *MdACCO1*, as reported by Thewes, et al., (2020), in ‘Galaxy’ apples stored in extremely low pO₂ (DCA-CF and DCA-RQ 1.1 and 1.5) compared with CA. These findings corroborate other studies in the literature that reported lower ACC oxidase activity by reducing pO₂ levels (Anese et al., 2020; Schmidt et al., 2020; Weber et al., 2020).

After 7 days at 20 °C, the highest IEC in fruit was verified in CA and DCA-RQ 1.3 at (0.5/30d+2.0/30d+3.0/210d) °C followed by CA+1-MCP and DCA-RQ 1.3 at 0.5 °C. The lowest IEC was observed in DCA-RQ 1.3 at 3.0 and at (2.0/30d+3.0/240d) °C, compared to other conditions (Figure 3b). The higher IEC was related to the storage conditions in which the ACC oxidase activity was also high (Figure 3a). High IEC may indicate that the climacteric peak of the fruit has already occurred (Bender et al., 2000), suggesting a more advanced

ripening state of these fruit. According to Both et al. (2018), the storage of ‘Galaxy’ apples in CA at 1.0 and 1.5 °C led to higher IEC compared to DCA-RQ, corroborating the findings presented herein. After 14 days at 20 °C, the highest IEC was observed in fruit stored in DCA-RQ 1.3 at (0.5/30d+3.0/240d), (2.0/30d+3.0/240d), and (0.5/30d+2.0/30d+3.0/210d) °C, followed by CA (Figure 3b). However, storage in CA+1-MCP and DCA-RQ 1.3 at 0.5 and at 2.0 °C resulted in the lowest IEC followed by DCA-RQ 1.3 at 3.0 and (0.5/30d+2.0/240d) °C (Figure 3b). Furthermore, 1-MCP application in CA reduces IEC (Figures 3b) and ACC oxidase activity (14 days at 20 °C) (Figure 3a), but was not more effective than DCA-RQ 1.3, specially at 0.5 and 2.0 °C. Currently, the effects of applying 1-MCP in CA have been reported to reduce IEC and ACC oxidase activity (Both et al., 2014; Watkins & Nock, 2012).

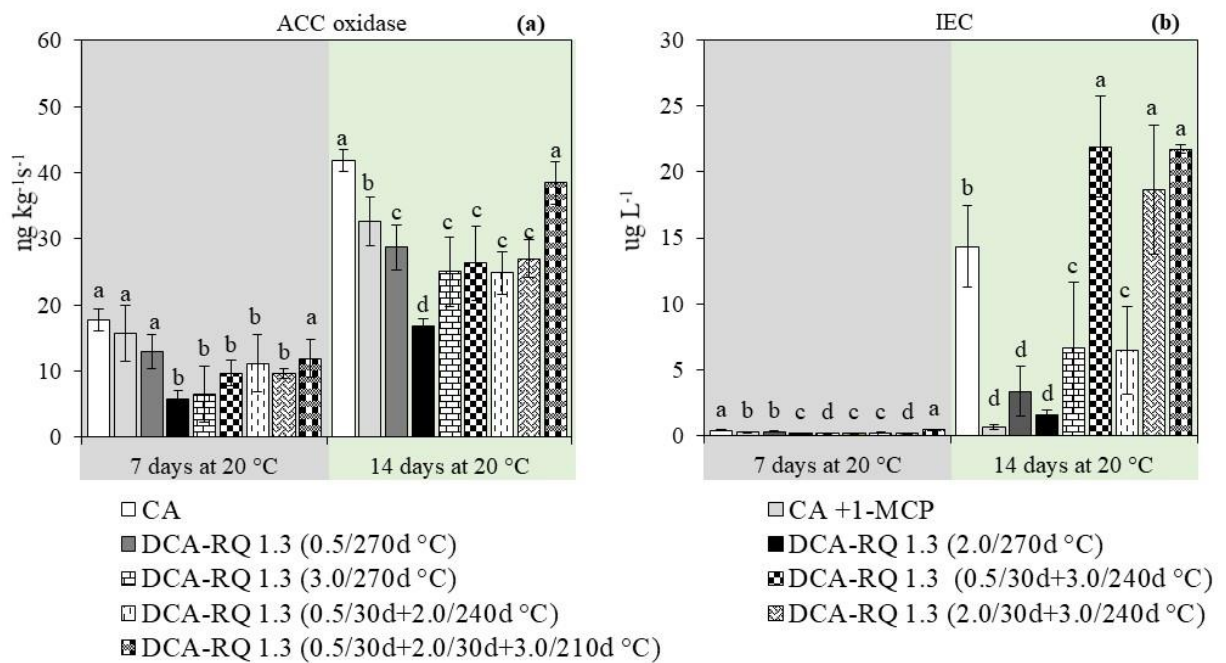


Figure 3: ACC oxidase activity (ACC Oxidase) and internal ethylene concentration (IEC) of ‘Maxi Gala’ apple stored under controlled atmosphere (CA) with or without 1-MCP and dynamic controlled atmosphere monitored by quotient respiratory 1.3 (DCA-RQ1.3) at three temperature maintained constant and four strategies of temperature variation, during 9 months storage plus 7 and 14 days at 20 °C. Bars with the same letter do not differ by the Scott-Knott test, at 5% probability of error.

After storage, the fruits presented different responses throughout shelf life at 20 °C, in relation to ethylene production. On the first day at 20 °C, fruits stored in DCA-RQ 1.3 at (0.5/30d+2.0/240d) °C showed the highest ethylene production (Figure 4a). Nevertheless, the most significant ethylene production was observed in DCA-RQ 1.3 at 3.0 °C after 7 days at 20

°C (Figure 4b). After 14 days at 20 °C, fruits stored in CA and DCA-RQ 1.3 at 0.5, 2.0, 3.0, and (0.5/30d+2.0/30d+3.0/210d) °C showed high ethylene production (Figure 4c). CA+1-MCP was effective in kept lower ethylene concentrations over the exposure period at 20 °C, but in CA without 1-MCP, ethylene production was only significantly higher on the 14th day at 20 °C (Figures 4a to 4c). A previous study also revealed that ‘Cripps Pink’ apples stored in CA had lower ethylene production after 7, 10, and 14 days at 20 °C compared to DCA-RQ (Klein et al., 2020). These authors attributed this result to the post-climacteric stage of the fruit stored in CA.

The low ethylene concentration in storage at DCA-RQ 1.3 at 2.0 °C for 7 days at 20 °C and in DCA-RQ 1.3 at (0.5/30d+3.0/240d) and (2.0/30d+3.0/240d) °C, over the entire evaluation period at 20 °C, can be explained by the low ACC oxidase activity (Figures 3a) caused by the low pO₂ in the chambers, which activated anaerobic metabolism and increased ethanol, acetaldehyde, and ethyl acetate concentrations (Figures 5a at 5c). Studies have reported that anaerobic metabolism compounds reduce the activity of enzymes that synthesize ethylene (ACC synthase and oxidase) (Jin et al., 2013), consequently reducing ethylene production (Liu et al., 2012; Weber et al., 2016). Recent studies have found that ethanol application decreases the production and action of ethylene (Jin et al., 2013; Thewes et al., 2021; Weber et al., 2016).

The respiration rate of fruit stored in CA with and without 1-MCP were high during the 14 days shelf life at 20 °C (Figures 4d at 4f). Nonetheless, DCA-RQ 1.3 at 0.5 and at (0.5/30d+2.0/240d) °C one day after chamber opening, and DCA-RQ 1.3 at (0.5/30d+2.0/30d+3.0/210d) °C at the 7th day shelf life resulted in respiration rates similar to those fruit in CA and CA+1-MCP (Figures 4d and 4f). The higher respiratory rates are probably due to the high IEC (Figure 3b) associated with an increased incidence of flesh breakdown (Figure 7b) found in these treatments, which was later confirmed by principal component analysis (PCA) in which both variables are correlated (Figure 2b). Weber et al. (2016) observed that fruit disorders are correlated to higher respiration rates in ‘Royal Gala’ apples. After 14 days at 20 °C, fruit that were stored in DCA-RQ at 3.0 at (0.5/30d+3.0/240d), and (0.5/30d+2.0/30d+3.0/210d) °C also resulted in high respiration rates (Figure 4f). This result can be explained by the high ethylene production (Figures 4a and 4c) and IEC (Figure 3b), respectively.

The high respiration rates observed in fruits in CA+1-MCP during the 14 days at 20 °C could not be associated with high ethylene production (Figures 4a at 4c) and IEC (Figure 3b), although the respiration of fruit stored in CA may be related to high IEC (Figures 3b). Therefore, these findings indicate that the climacteric peak of these fruits occurred during storage since, and in climacteric fruit, the ripening stage can be evaluated by determining

respiratory rates (Steffens et al., 2007) and high IEC (Bender et al., 2000). The low respiratory rates during the 1, 7 and 14 days at 20 °C in fruit stored in DCA-RQ at 2.0 and (2.0/30d+3.0/240d) °C showed that fruit metabolism was reduced. Consequently, fruit quality can be maintained (Both et al., 2014; Steffens et al., 2007), as confirmed by the PCA in which respiratory rates and fruit quality (flesh firmness and healthy fruit) had opposite responses (Figure 2b).

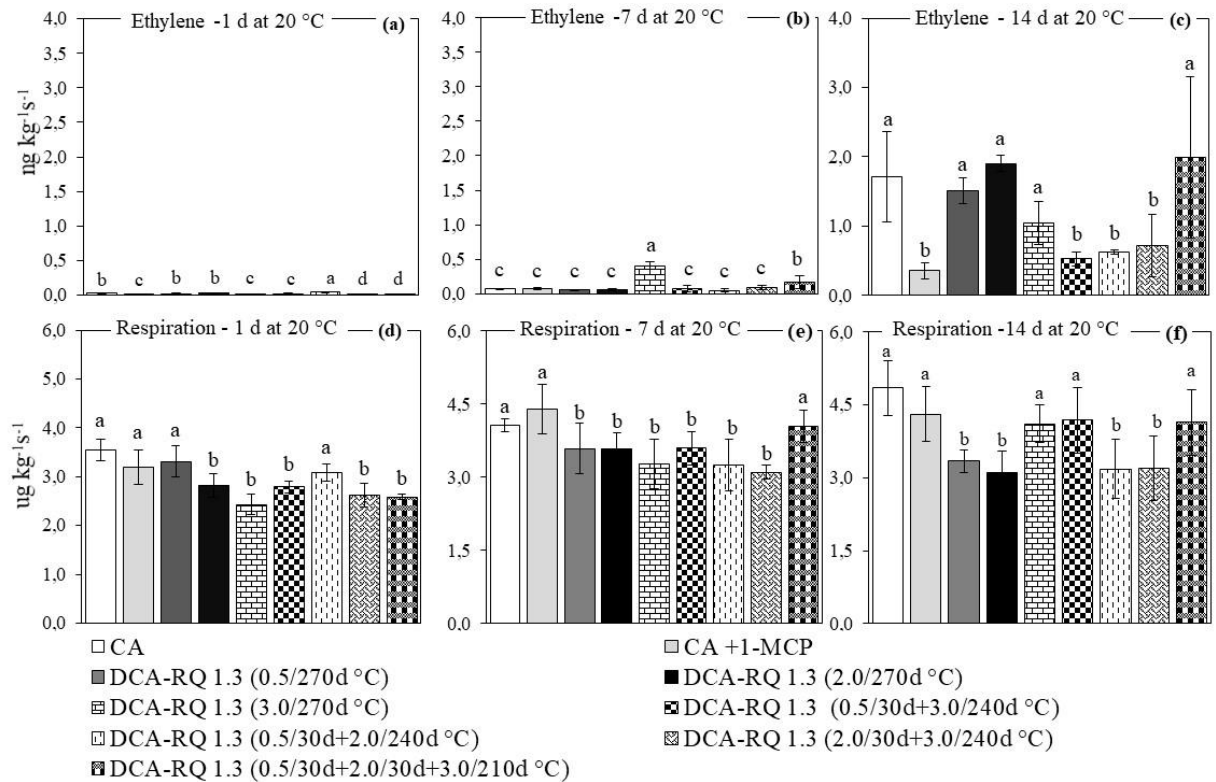


Figure 4: Ethylene production and respiration of ‘Maxi Gala’ apple stored under controlled atmosphere (CA) with or without 1-MCP and dynamic controlled atmosphere monitored by quotient respiratory 1.3 (DCA-RQ1.3) at three temperature maintained constant and four strategies of temperature variation, during 9 months storage plus 7 and 14 days at 20 °C. Bars with the same letter do not differ by the Scott-Knott test, at 5% probability of error.

3.1.3.3 Metabolites of anaerobic metabolism

The storage of fruit under hypoxia conditions (extremely low pO₂) results in anaerobic metabolism, with as accumulation of acetaldehyde, ethanol, and ethyl acetate (Pesis, 2005). These compounds, depending on the concentration may reduce ethylene synthesis and lead to benefits in maintaining fruit quality (Pesis 2005). Among the compounds of anaerobic

metabolism, acetaldehyde is the most harmful to fruit (Lee et al., 2012; Pesis, 2005). This compound originates from pyruvic acid by the pyruvate decarboxylase enzyme (PDC) activity (Pesis, 2005; Thewes et al., 2018), while ethanol is formed from acetaldehyde, which is converted to ethanol by alcohol dehydrogenase (ADH) (Lee et al., 2012; Pesis, 2005).

After 7 days shelf life at 20 °C, ‘Maxi Gala’ apples that were stored in DCA-RQ 1.3 at 2.0 °C and those with temperature variation, resulted in higher acetaldehyde concentrations. The lowest acetaldehyde concentrations were found in CA with and without 1-MCP application and in DCA-RQ 1.3 at 0.5 and at 3.0 °C (Figure 5a). After extended shelf life (14 days), high acetaldehyde concentrations were found in CA+1-MCP and DCA-RQ 1.3 at 0.5, at 2.0, and at (0.5/30d+2.0/240d) °C. The other storage conditions, reduced the concentration of this compound (Figure 5a). Regarding ethanol, fruit stored in DCA-RQ 1.3 at 2.0 and (0.5/30d+2.0/30d+3.0/210d) °C had the highest concentrations. However, after 14 days at 20 °C, the highest ethanol concentration was in CA+1-MCP and DCA-RQ 1.3 at (0.5/30d+2.0/240d) °C, but ethanol concentration was far below than at the 7th day shelf life, as can be observed in figure legend (Figure 5b). These high acetaldehyde and ethanol concentrations are due to the low oxygen concentrations used during storage (Figure 1), in which there was an average of 0.15 kPa, increasing anaerobic metabolism and resulting in greater acetaldehyde accumulation, which is converted to ethanol via ADH (Lee et al., 2012; Pesis, 2005).

After 14 days at 20 °C, application of 1-MCP in CA, increases the concentration of acetaldehyde and ethanol compared to CA. This result may indicate a reduced genic expression of the AAT enzyme by application of 1-MCP, due to the lower ethylene production observed in these treatments (Figure 4a at 4c), resulting in lower conversion of ethanol into esters such as ethyl acetate (Figure 5c). This enzyme is essential for the synthesis of volatile compounds of the apple (YANG et al., 2016). These authors verified that the application of 1-MCP in ‘Golden Delicious’ apples reduces the expression of the *MdAAT1* and *MdAAT2* genes. Another study also observed a reduction in *MdAAT1* gene expression in ‘Galaxy’ apples stored in CA+1-MCP compared to CA, after 6 months plus 7 days shelf life (Thewes et al., 2020).

Ethyl acetate is an important compound for the taste of apples. However, when produced in higher concentrations, it is associated to off-flavors (Wright et al., 2015). High ethanol concentrations in fruit pulp increase ethyl ester emission, including ethyl acetate (JIN et al., 2013). Ethyl acetate is formed from the combination of ethanol with acetic acid and catalyzed by AAT (DEFILIPPI; KADER; DANDEKAR, 2005). Ethyl acetate production after 7 days at 20 °C was higher in fruit stored in DCA-RQ 1.3 at 2.0 and at (0.5/30d+2.0/30d+3.0/210d) °C

(Figure 5c). This result shows that the precursor (ethanol) and/or enzyme (ATT) were not limiting for the formation of ethyl acetate, however, to the other conditions had limitation of the precursor (ethanol), due to the lower conversion of acetaldehyde to ethanol. After 14 days at 20 °C, fruit stored in DCA-RQ 1.3 at (2.0/30d+3.0/240d) °C had higher ethyl acetate concentrations compared to the other conditions (Figure 5c), which may be related to higher AAT activity, once this condition the IEC was also high (Figure 3b). Furthermore, AAT is essential in ethyl acetate formation and this enzyme activity is stimulated by ethylene (Defilippi et al., 2005).

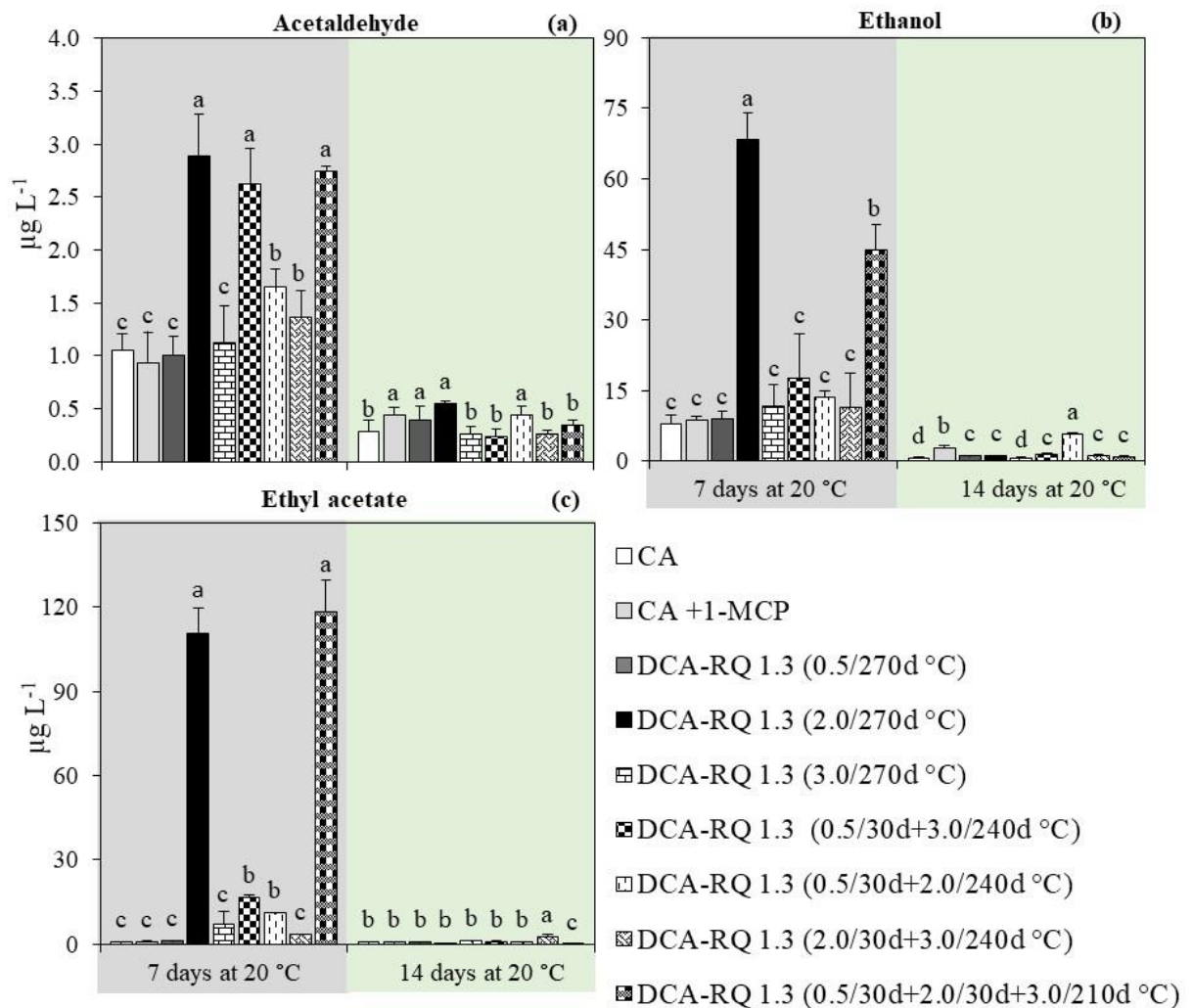


Figure 5: Metabolites of anaerobic metabolism of 'Maxi Gala' apple stored under controlled atmosphere (CA) with or without 1-MCP and dynamic controlled atmosphere monitored by quotient respiratory 1.3 (DCA-RQ1.3) at three temperature maintained constant and four strategies of temperature variation, during 9 months storage plus 7 and 14 days at 20 °C. Bars with the same letter do not differ by the Scott-Knott test, at 5% probability of error.

Analyzing the accumulation of acetaldehyde, ethanol and ethyl acetate together, is noteworthy that storage in ACD-QR 1.3 regardless of storage temperature, induces anaerobic metabolism during 9 months of storage plus 7 and 14 days at 20 °C. According to the results, that acetaldehyde, ethanol and ethyl acetate were far below the odor threshold (OTH). Studies found OTH values for acetaldehyde and ethanol of 120 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 100,000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectively (LEFFINGWELL; LEFFINGWELL, 1991) and for ethyl acetate of 13500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (LÓPEZ et al., 2007). Acetaldehyde and ethanol accumulation of low concentrations is desirable, once are able to reduce ACC oxidase enzyme activity (ASODA et al., 2009) and ethylene production (PESIS, 2005), preserving overall fruit quality. Contrarily, at high concentrations, becomes toxic to the cell wall causing its disruption. These results showed that the ACD-RQ 1.3, especially at 2.0 °C, is a safe technique for storing 'Maxi Gala' apples for 9 months plus 7 and 14 days at 20 °C.

3.1.3.4 *Flesh firmness, soluble solids, and acidity*

Flesh firmness is one of the most important quality attributes for consumers acceptance (Harker et al., 2008) and this research has the novelty of evaluate the best storage conditions that allow the firmness maintenance until 14 days shelf life. After 7 days at 20 °C, the greatest flesh firmness was observed in fruit stored in DCA-RQ 1.3 at 0.5, at 2.0, and at (0.5/30d+2.0/240d) °C. After 14 days at 20 °C, there was a reduction in flesh firmness of fruit from all storage conditions, however, DCA-RQ 1.3, irrespective of storage temperature, was able to maintain the highest flesh firmness, except for the temperature of (0.5/30d+2.0/30d+3.0/210d) °C, which did not differ from 1-MCP treated fruit. CA storage resulted in lowest flesh firmness after 14 days shelf life (Figures 6a).

The highest flesh firmness observed in the present study was related to low respiratory rates (Figure 4d at 4f) and ACC oxidase activity (Figures 3a). More notably, storage in DCA-RQ 1.3 at 0.5, 2.0, and (0.5/30d+2.0/240d) °C showed higher flesh firmness than CA with and without 1-MCP for 7 and also 14 days shelf life, at 20 °C. Storage in DCA-RQ induces the anaerobic metabolism of fruit at safe levels, resulting in acetaldehyde, ethanol, and ethyl acetate production (Both et al., 2018; Thewes et al., 2018; Weber et al., 2017). Given the above, the greater maintenance of flesh firmness in DCD-RQ is likely related to acetaldehyde and ethanol concentrations (Figures 5a and 5b). According to Pesis (2005), metabolites of anaerobic metabolisms, such as acetaldehyde and ethanol, decrease the activity of enzymes related to cell wall degradation/modification and reduce the production and action of ethylene in broccoli. Ethanol produced by the fruit metabolism or exogenous applied, significantly reduced softening

during and after storage of ‘Braeburn’ apples (Weber et al., 2020). Hence, the amount of ethylene produced in DCA stored fruit (Figures 4a at 4c) may not have been enough to activate the cell wall degrading enzymes and, consequently, kept greater flesh firmness of these fruit.

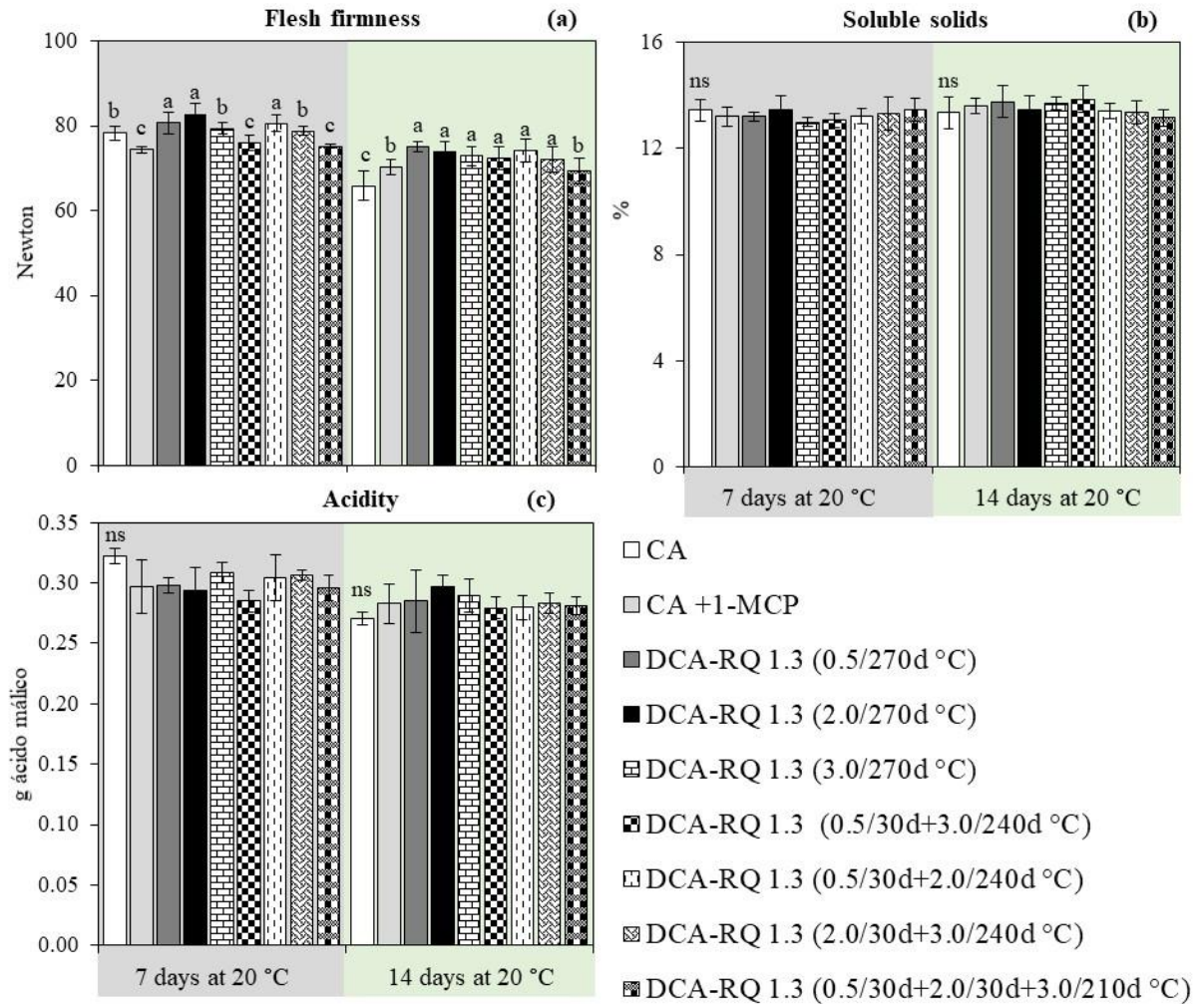


Figure 6: Flesh firmness (a), soluble solids (b) and acidity (c) of ‘Maxi Gala’ apple stored under controlled atmosphere (CA) with or without 1-MCP and dynamic controlled atmosphere monitored by quotient respiratory 1.3 (DCA-RQ1.3) at three temperature maintained constant and four strategies of temperature variation, during 9 months storage plus 7 and 14 days at 20 °C. Bars with the same letter do not differ by the Scott-Knott test, at 5% probability of error. ns: not significant.

An interesting result that deserves to be highlighted, was that fruits stored in CA with and without 1-MCP presented the lowest flesh firmness after 14 days at 20 °C compared to storage in DCA-RQ 1,3 at different temperatures (Figures 6a). In practical terms, the storers would have better quality fruits after storage in DCA-RQ 1.3 plus 7 and 14 days at 20 °C than

application of 1-MCP in CA. Moreover, the non-need to apply 1-MCP results in cost savings apple stored companies and also, is an important result for organic apples, since 1-MCP is not allowed in organic apples produced in Europe (Gabioud Rebeaud; Gasser Agroscope, 2015) thus, the DCA-QR 1.3 technique can be a great tool in both conventional or organic apples.

High acidity and soluble solids indicate low fruit metabolic rates because sugars and acids are precursors of respiration (Saltveit, 2019). Regarding these variables, there were no statistical differences between CA with and without 1-MCP and DCA-RQ, regardless of storage temperatures at 7 and 14 days at 20 °C (Figures 6b and 6c). These findings corroborate to the research of Weber et al. (2020) which did not found interactions between CA and DCA and storage temperature for these variables in 'Braeburn' apples.

3.1.3.5 *Decay, flesh breakdown, mealiness, and healthy fruit*

The incidence of decay during long-term storage is one of the main causes of fruit losses (Vilanova et al., 2014), and the decay occurrence is aggravated by the advanced maturation stage of fruit (Vilanova et al., 2012) and fruit with mechanical damage (Vilanova et al., 2014). The fruit stored in CA+1-MCP and DCA-RQ 1.3 at (0.5/30d+3.0/240d) and (0.5/30d+2.0/30d+3.0/210d) °C resulted in the highest decay at 7 days at 20 °C. However, the condition of DCA-RQ 1.3 at (0.5/30d+2.0/30d+3.0/210d) °C resulted in sharp increase of decay percentage after 14 days shelf life at 20 °C, with the highest amount of decayed fruit at this evaluation time, followed by CA+1-MCP and DCA-RQ 1.3 at 3.0, at (0.5/30d+3.0/240d) and at (2.0/30d+3.0/240d) °C. Nonetheless, there was less decay in fruit that were stored in DCA-RQ 1.3 at 0.5 and at (0.5/30d+2.0/240d) °C, after 14 days at 20 °C (Figures 7a), which may be due to the lower pO₂ used, associated with greater maintenance of flesh firmness (Figures 6a) confirmed by PCA (Figure 2b), where the variables are in opposite quadrants. According to Imahori et al. (2013), decay in bananas is inhibited in storage with low pO₂, even at 20 °C. Moreover, previous studies demonstrated that apples with greater flesh firmness after storage are less susceptible to decay (Anese et al., 2020; Both et al., 2018). In addition, acetaldehyde production by fruit in DCA may help control decay since acetaldehyde has fungicide and insecticide properties (Pesis, 2005).

1-MCP treatment was not effective on decay control, and contrarily, significantly increases decay incidence compared to fruit stored in CA without 1-MCP application, already at 7 d shelf life and also at 14 d (Figures 7a). This result may have likely occurred due to 1-MCP increasing fruit susceptibility to microorganism attacks associated with increased patulin accumulation in the fruit. In fact, this was recently confirmed by dos Santos et al. (2018), who

verified increased patulin accumulation in ‘Galaxy’ and ‘Fuji Kiku’ apples treated with 1-MCP, regardless of the storage method, in addition to increased susceptibility to decay (Both et al., 2018; dos Santos et al., 2018). 1-MCP treatment may reduce fruit defense mechanisms against pathogenic attacks and inhibition of ethylene action (Janisiewicz et al., 2003). Wang et al. (2020) found that ethylene plays an important role in the fruit defense mechanisms against pathogenic agents. In this context, the findings of the present study corroborate the aforementioned research in which 1-MCP application increased decay incidence in ‘Golden Delicious’ apples in CA (Janisiewicz et al., 2003).

Flesh breakdown is an internal disorder characterized by the occurrence of darkened spots on the fruit flesh. The darkening of the pulp is caused by the disintegration of the membrane, leading to the oxidation of phenolic compounds by the action of polyphenol oxidase (PPO) and peroxidases (POX) (Tomás-Barberán & Espín, 2001). According to Steffens et al. (2007), the main postharvest factors that affect the occurrence of this disorder are the partial pressures of CO₂ and O₂, advanced maturation, extremely high humidity, prolonged storage period, and temperatures. In the present research, the lowest incidence of flesh breakdown was observed in fruit stored in DCA-RQ 1.3 at the highest temperatures of 2.0, 3.0, and (2.0/30d+3.0/240d) °C for 7 and also 14 days at 20 °C (Figures 7b). Hence, these data confirm the results of a previous study in which ‘Galaxy’ apples stored in DCA-RQ had less flesh breakdown than CA (Anese et al., 2019).

After 7 days at 20 °C, fruit kept in CA+1-MCP and DCA-RQ 1.3 at (0.5/30d+2.0/30d+3.0/210d) °C showed a higher incidence of flesh breakdown. However, the highest percentages of flesh breakdown were verified in CA with and without 1-MCP after 14 days at 20 °C, being that in DCA-RQ 1.3 at 0.5, (0.5/30d+3.0/240d), and (0.5/30d+2.0/240d) °C resulted in intermediate flesh breakdown incidence compared to the other conditions (Figures 7b). Notably, 1-MCP application in CA caused the highest percentage of flesh breakdown after 7 and 14 days at 20 °C. This result may probably be due to increased PPO activity associated with low temperatures (0.5 °C), which was confirmed by previous papers that demonstrated greater enzyme activity during storage (Jung & Watkins, 2011) and 10 days shelf life (Koushesh Saba & Watkins, 2020) in fruit treated with 1-MCP compared to untreated fruit. In addition, this disorder is caused by low temperatures in ‘Empire’ apples stored for 8 months in CA (Watkins & Liu, 2010) and ‘Royal Gala’ apples stored under CA or ultralow oxygen (ULO) (Ludwig et al., 2020). Köpcke (2015) also observed an increased percentage of flesh breakdown in ‘Elstar’ apples treated with 1-MCP. Nonetheless, recent studies have shown beneficial effects of applying 1-MCP in CA and that the percentage of flesh breakdown reduced

with 1-MCP application in ‘Galaxy’ apples after 9 months of storage (Anese et al., 2019). The result of this research evidenced that CA stored fruit quality could not be retained during 14 d shelf life at 20 °C after prolonged storage, even with 1-MCP treatment, and that DCA-RQ 1.3 emerges as an alternative, even without 1-MCP application.

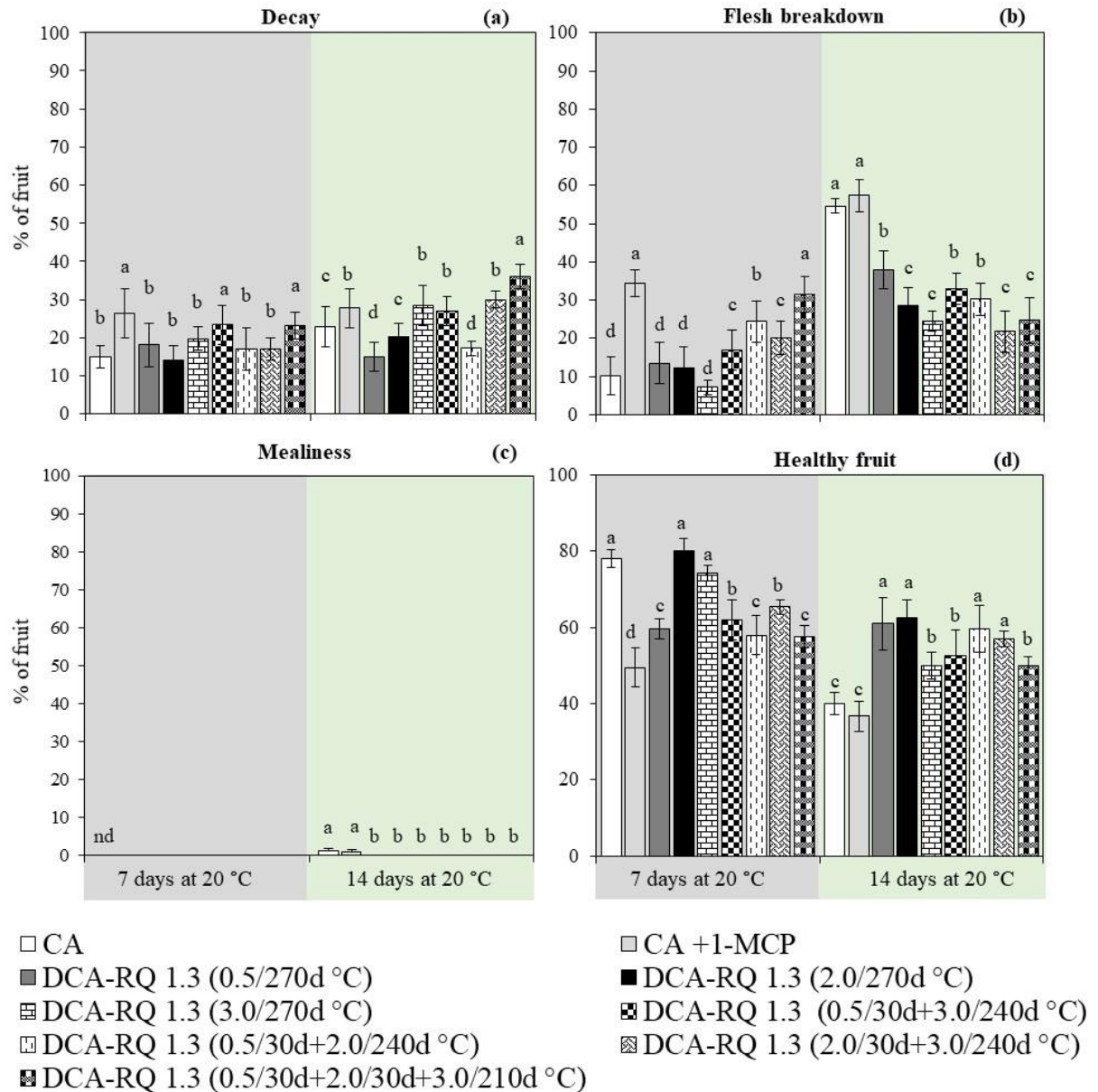


Figure 7: Decay (a), flesh breakdown (b), mealiness (c) and healthy fruit (d) of ‘Maxi Gala’ apple stored under controlled atmosphere (CA) with or without 1-MCP and dynamic controlled atmosphere monitored by quotient respiratory 1.3 (DCA-RQ1.3) at three temperature maintained constant and four strategies of temperature variation, during 9 months storage plus 7 and 14 days at 20 °C. Bars with the same letter do not differ by the Scott-Knott test, at 5% probability of error. nd: not detected.

Mealiness is a disorder characterized by the absence of succulence due to the middle lamella pectin degradation (Goulao et al., 2007). In ‘Gala’ apples, this disorder is widespread when stored in CA (Brackmann et al., 2008). In this study, mealiness incidence was low and only detected after 14 days in fruit stored in CA with and without 1-MCP (only around 1.0% of the fruit affected). In DCA-RQ 1.3, regardless of temperature variation, no incidence of mealiness was detected after 7 and also 14 days at 20 °C (Figures 7c).

After 7 days at 20 °C, fruit stored in CA and DCA-RQ 1.3 at 2.0 and 3.0 °C presented the highest percentages of healthy fruit. The lowest percentages of healthy fruits were noted in CA+1-MCP and DCA-RQ 1.3 at 0.5, (0.5/30d+2.0/240d), and (0.5/30d+2.0/30d+3.0/210d) °C. The application of 1-MCP in fruit kept in CA drastically reduced the healthy fruit percentage compared to the other conditions (Figure 7d) due to high decay incidence and flesh breakdown (Figures 7a and 7b). Furthermore, other findings include higher percentages of healthy ‘Royal Gala’ (Weber et al., 2015), ‘Galaxy’ (Anese et al., 2019), and ‘Nicoter’ (Weber et al., 2019) apples stored in DCA-RQ. After 14 days shelf life, fruit stored in DCA-RQ 1.3 at 0.5, 2.0, (0.5/30d+2.0/240d), and (2.0/30d+3.0/240d) °C had higher percentages of healthy fruits (Figure 7d). This high percentage of healthy fruit results from the lower incidence of decay observed in these treatments (Figure 7a) and was confirmed by PCA, in which both variables are correlated with these treatments (Figure 2). Nevertheless, fruits maintained in CA with and without 1-MCP showed the lowest percentages of healthy fruit after 7 and 14 days at 20 °C (Figures 7d) as a result of the high percentage of flesh breakdown (Figures 7b) and confirmed by the PCA, in which the variables are correlated with these treatments (Figure 2b).

3.1.4 Conclusions

‘Maxi Gala’ apples stored in a dynamic controlled atmosphere based on respiratory quotient 1.3 (DCA-RQ 1.3) at 0.5, at 2.0, at 0.5+2.0 and 2.0+3.0 °C, keeps fruit with better quality after 9 months of storage plus 14 days of shelf life at 20 °C.

DCA-RQ 1.3 under constant temperature of 2.0 °C or with temperature increasing (0.5/30d+2.0/240d and 2.0/30d+3.0/240d °C) during storage keeps fruit with better quality than those stored in lower temperature (0.5 °C) or in CA with and without 1-MCP at 0.5 °C, after 9 months of storage plus 7 and 14 days of shelf life. In addition, DCA-RQ method allows storage at a higher temperature (2.0 °C) than traditionally recommended for ‘Gala’ apples (0.5-1.5 °C). Nonetheless, further research is necessary to verify whether fruit quality is maintained in DCA-RQ 1.3 with temperature variation just below 3.0 °C and to determine the best temperature variation strategy (low temperature at the beginning or end of storage period).

DCA-RQ 1.3, irrespective of temperature variation, was more effective than CA+1-MCP treatment in ‘Maxi Gala’ apples storage during 9 months and prolonged shelf life at 20 °C. 1-MCP treatment increased fruit decay and physiological disorders incidence.

3.1.5 Acknowledgements

To Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), for financial support.

3.1.6 References

- Anese, R. de O., Brackmann, A., Wendt, L. M., Thewes, F. R., Schultz, E. E., Ludwig, V., & Berghetti, M. R. P. (2019). Interaction of 1-methylcyclopropene, temperature and dynamic controlled atmosphere by respiratory quotient on ‘Galaxy’ apples storage. *Food Packaging and Shelf Life*, 20, 100246. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.07.004>
- Anese, R. de O., Thewes, F. R., Brackmann, A., Schultz, E. E., Wagner, R., Klein, B., Berghetti, M. R. P., & Wendt, L. M. (2020). Growth regulators on quality traits and volatile organic compounds profile of ‘Royal Gala’ apple at harvest and after dynamic controlled atmosphere storage. *Postharvest Biology and Technology*, 164, 111158. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111158>
- Asif, M. H., Pathak, N., Solomos, T., & Trivedi, P. K. (2009). Effect of low oxygen, temperature and 1-methylcyclopropene on the expression of genes regulating ethylene biosynthesis and perception during ripening in apple. *South African Journal of Botany*, 75(1), 137–144. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2008.09.002>
- Bender, R. J., Brecht, J. K., Baldwin, E. A., & Malundo, T. M. M. (2000). Aroma Volatiles of Mature-green and Tree-ripe ‘Tommy Atkins’ Mangoes after Controlled Atmosphere vs. Air Storage. *HortScience*, 35(4), 684–686. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.35.4.684>
- Bessemans, N., Verboven, P., Verlinden, B. E., & Nicolai, B. M. (2016). A novel type of dynamic controlled atmosphere storage based on the respiratory quotient (RQ-DCA). *Postharvest Biology and Technology*, 115, 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.12.019>
- Booker, M. A., & DeLong, A. (2015). Producing the Ethylene Signal: Regulation and Diversification of Ethylene Biosynthetic Enzymes. *Plant Physiology*, 169(1), 42–50. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00672>

- Both, V., Brackmann, A., Thewes, F. R., Ferreira, D. D. F., & Wagner, R. (2014). Effect of storage under extremely low oxygen on the volatile composition of ‘Royal Gala’ apples. *Food Chemistry*, 156, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.094>
- Both, V., Brackmann, A., Thewes, F. R., Weber, A., Schultz, E. E., & Ludwig, V. (2018). The influence of temperature and 1-MCP on quality attributes of ‘Galaxy’ apples stored in controlled atmosphere and dynamic controlled atmosphere. *Food Packaging and Shelf Life*, 16, 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.03.010>
- Both, V., Thewes, F. R., Brackmann, A., de Oliveira Anese, R., de Freitas Ferreira, D., & Wagner, R. (2017). Effects of dynamic controlled atmosphere by respiratory quotient on some quality parameters and volatile profile of ‘Royal Gala’ apple after long-term storage. *Food Chemistry*, 215, 483–492. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.08.009>
- Brackmann, A., Gasperin, A. R. de, Both, V., Pavanello, E. P., Schorr, M. R. W., & Anese, R. de O. (2012). Aplicação de 1-metilciclopropeno, estresse inicial com baixo oxigênio e armazenamento em ultrabaixo oxigênio na qualidade de maçã Fuji. *Ciência Rural*, 42(8), 1386–1391. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782012000800009>
- Brackmann, A., Thewes, F. R., Anese, R. de O., Both, V., Linke Junior, W., & Schultz, E. E. (2015). Aminoethoxyvinylglycine: isolated and combined with other growth regulators on quality of ‘Brookfield’ apples after storage. *Scientia Agricola*, 72(3), 221–228. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0099>
- Brackmann, A., Weber, A., Giehl, R. F. H., Eisermann, A. C., Sautter, C. K., Gonçalves, E. D., & Antunes, L. E. C. (2010). Armazenamento de mirtilo “Bluegem” em atmosfera controlada e refrigerada com absorção e inibição do etileno. *Revista Ceres*, 57(1), 6–11. <https://doi.org/10.1590/s0034-737x2010000100002>
- Brackmann, A., Weber, A., Pinto, J. A. V., Neuwald, D. A., & Steffens, C. A. (2008). Manutenção da qualidade pós-colheita de maçãs “Royal Gala” e “Galaxy” sob armazenamento em atmosfera controlada. *Ciência Rural*, 38(9), 2478–2484. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000900010>
- Bufler, G. (1986). Ethylene-Promoted Conversion of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid to Ethylene in Peel of Apple at Various Stages of Fruit Development. *Plant Physiology*, 80(2), 539–543. <https://doi.org/10.1104/pp.80.2.539>
- Defilippi, B. G., Kader, A. A., & Dandekar, A. M. (2005). Apple aroma: alcohol acyltransferase, a rate limiting step for ester biosynthesis, is regulated by ethylene. *Plant Science*, 168(5), 1199–1210. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.12.018>

- Deuchande, T., Carvalho, S. M. P., Guterres, U., Fidalgo, F., Isidoro, N., Larrigaudière, C., & Vasconcelos, M. W. (2016). Dynamic controlled atmosphere for prevention of internal browning disorders in 'Rocha' pear. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 725–730. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.075>
- dos Santos, I. D., Pizzutti, I. R., Dias, J. V., Fontana, M. E. Z., Brackmann, A., Anese, R. O., Thewes, F. R., Marques, L. N., & Cardoso, C. D. (2018). Patulin accumulation in apples under dynamic controlled atmosphere storage. *Food Chemistry*, 255, 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.022>
- Gabioud Rebeaud, S., & Gasser Agroscope, F. (2015). Fruit quality as affected by 1-MCP treatment and DCA storage – A comparison of the two methods. *European Journal of Horticultural Science*, 80(1), 18–24. <https://doi.org/10.17660/eJHS.2015/80.1.3>
- Gasser, F., Eppler, T., Naunheim, W., Gabioud, S., & Bozzi Nising, A. (2010). Dynamic CA storage of apples: Monitoring of the critical oxygen Concentration and adjustment of optimum conditions during oxygen reduction. *Acta Horticulturae*, 876, 39–46. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.876.3>
- Goulao, L. F., Santos, J., de Sousa, I., & Oliveira, C. M. (2007). Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples. *Postharvest Biology and Technology*, 43(3), 307–318. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.10.002>
- Harker, F. R., Kupferman, E. M., Marin, A. B., Gunson, F. A., & Triggs, C. M. (2008). Eating quality standards for apples based on consumer preferences. *Postharvest Biology and Technology*, 50(1), 70–78. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2008.03.020>
- Ho, Q. T., Verboven, P., Verlinden, B. E., Schenk, A., & Nicolai, B. M. (2013). Controlled atmosphere storage may lead to local ATP deficiency in apple. *Postharvest Biology and Technology*, 78, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.12.014>
- Imahori, Y., Yamamoto, K., Tanaka, H., & Bai, J. (2013). Residual effects of low oxygen storage of mature green fruit on ripening processes and ester biosynthesis during ripening in bananas. *Postharvest Biology and Technology*, 77, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.11.004>
- Janisiewicz, W. J., Leverentz, B., Conway, W. S., Saftner, R. A., Reed, A. N., & Camp, M. J. (2003). Control of bitter rot and blue mold of apples by integrating heat and antagonist treatments on 1-MCP treated fruit stored under controlled atmosphere conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 29(2), 129–143. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(03\)00040-1](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(03)00040-1)
- Jin, Y. Z., Lv, D. Q., Liu, W. W., Qi, H. Y., & Bai, X. H. (2013). Ethanol vapor treatment maintains postharvest storage quality and inhibits internal ethylene biosynthesis during storage of oriental

- sweet melons. *Postharvest Biology and Technology*, 86, 372–380. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2013.07.019>
- Jung, S. K., & Watkins, C. B. (2011). Involvement of ethylene in browning development of controlled atmosphere-stored “Empire” apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 59(3), 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.08.019>
- Klein, B., Falk, R. B., Thewes, F. R., Anese, R. de O., Santos, I. D. dos, Ribeiro, S. R., Donadel, J. Z., Brackmann, A., Barin, J. S., Cichoski, A. J., & Wagner, R. (2020). Dynamic controlled atmosphere: Effects on the chemical composition of cuticular wax of ‘Cripps Pink’ apples after long-term storage. *Postharvest Biology and Technology*, 164, 111170. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111170>
- Köpcke, D. (2015). 1-methylcyclopropene (1-MCP) and dynamic controlled atmosphere (DCA) applications under elevated storage temperatures: Effects on fruit quality of ‘Elstar’, ‘Jonagold’ and ‘Gloster’ apple (*Malus domestica* Borkh.). *European Journal of Horticultural Science*, 80(1), 25–32. <https://doi.org/10.17660/eJHS.2015/80.1.4>
- Koushesh Saba, M., & Watkins, C. B. (2020). Flesh browning development of ‘Empire’ apple during a shelf life period after 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment and controlled atmosphere storage. *Scientia Horticulturae*, 261, 108938. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108938>
- Lee, J., Rudell, D. R., Davies, P. J., & Watkins, C. B. (2012). Metabolic changes in 1-methylcyclopropene (1-MCP)-treated “Empire” apple fruit during storage. *Metabolomics*, 8(4), 742–753. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0373-5>
- Li, M., Guo, J., Xu, C., Lei, Y., & Li, J. (2018). Identifying climatic factors and circulation indices related to apple yield variation in main production areas of China. *Global Ecology and Conservation*, 16, e00478. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2018.e00478>
- Liu, W. W., Qi, H. Y., Xu, B. H., Li, Y., Tian, X. Bin, Jiang, Y. Y., Xu, X. F., & Lv, D. Q. (2012). Ethanol treatment inhibits internal ethylene concentrations and enhances ethyl ester production during storage of oriental sweet melons (*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino). *Postharvest Biology and Technology*, 67, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.12.015>
- Ludwig, V., Thewes, F. R., Wendt, L. M., Berghetti, M. R. P., Schultz, E. E., Schmidt, S. F. P., & Brackmann, A. (2020). Extremely low-oxygen storage: aerobic, anaerobic metabolism and overall quality of apples at two temperatures. *Bragantia*, 79(3), 458–471. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20190496>

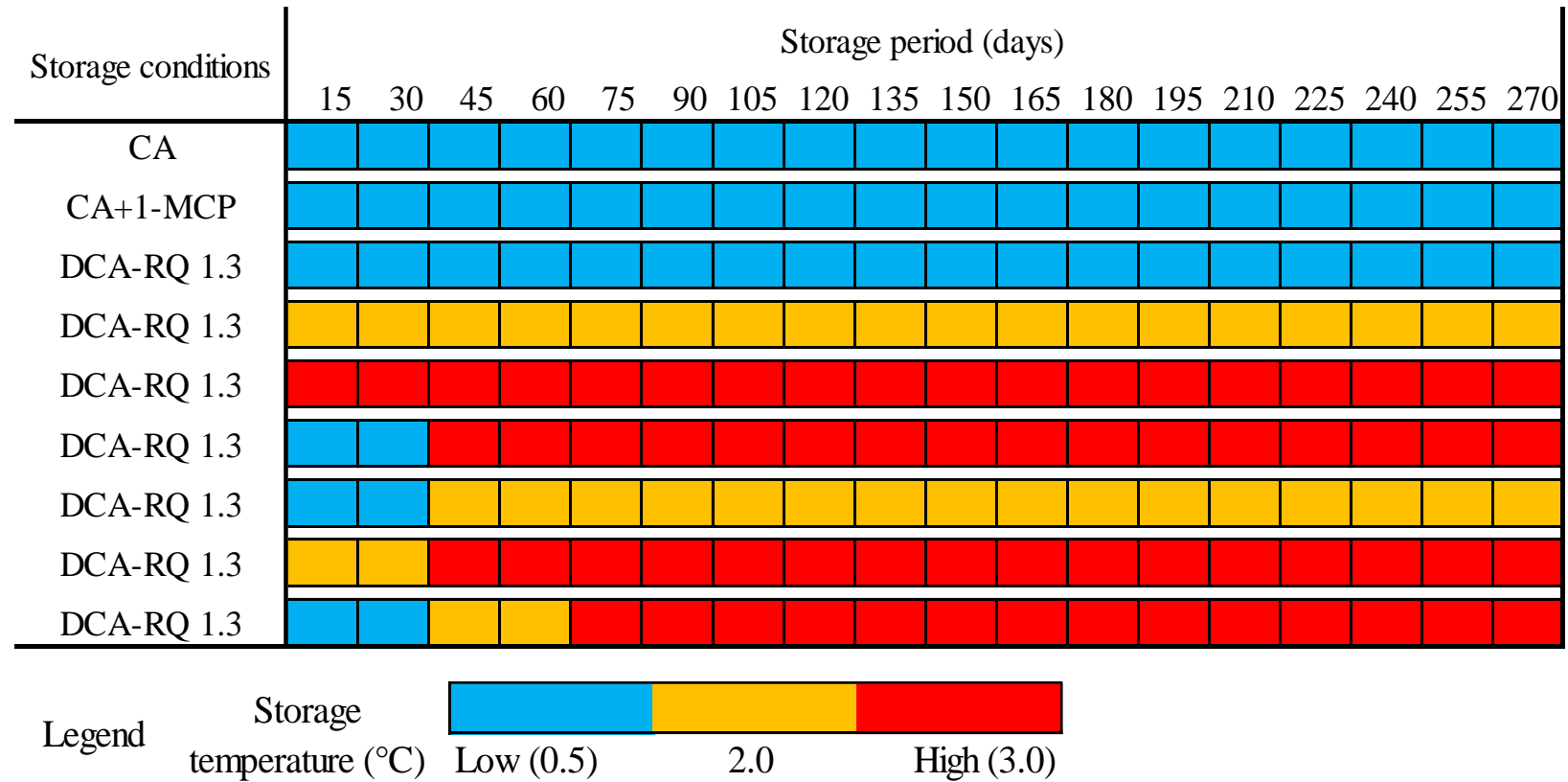
- Mannapperuma, J. D., Singh, R. P., & Montero, M. E. (1991). Simultaneous gas diffusion and chemical reaction in foods stored in modified atmospheres. *Journal of Food Engineering*, 14(3), 167–183. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(91\)90006-E](https://doi.org/10.1016/0260-8774(91)90006-E)
- Mazzurana, E. R., Argenta, L. C., Amarante, C. V. T. do, & Steffens, C. A. (2016). Potenciais benefícios do aumento da temperatura de armazenagem em atmosfera controlada de maçãs ‘Gala’ tratadas com 1-MCP. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 38(1), 43–52. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-237/14>
- Ortiz, A., Graell, J., & Lara, I. (2011). Cell wall-modifying enzymes and firmness loss in ripening “Golden Reinders” apples: A comparison between calcium dips and ULO storage. *Food Chemistry*, 128(4), 1072–1079. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.016>
- Pesis, E. (2005). The role of the anaerobic metabolites, acetaldehyde and ethanol, in fruit ripening, enhancement of fruit quality and fruit deterioration. *Postharvest Biology and Technology*, 37(1), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.03.001>
- Saltveit, M. E. (2019). Respiratory Metabolism. *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*, 73–91. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00004-X>
- Schmidt, S. F. P., Schultz, E. E., Ludwig, V., Berghetti, M. R. P., Thewes, F. R., Anese, R. de O., Both, V., & Brackmann, A. (2020). Volatile compounds and overall quality of ‘Braeburn’ apples after long-term storage: Interaction of innovative storage technologies and 1-MCP treatment. *Scientia Horticulturae*, 262, 109039. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109039>
- Steffens, C. A., Brackmann, A., Pinto, J. A. V., & Eisermann, A. C. (2007). Taxa respiratória de frutas de clima temperado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42(3), 313–321. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2007000300003>
- Thewes, F. R., Anese, R. O., Thewes, F. R., Ludwig, V., Klein, B., Wagner, R., Nora, F. R., Rombaldi, C. V., & Brackmann, A. (2020). Dynamic controlled atmosphere (DCA) and 1-MCP: Impact on volatile esters synthesis and overall quality of ‘Galaxy’ apples. *Food Packaging and Shelf Life*, 26, 100563. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100563>
- Thewes, F. R., Both, V., Brackmann, A., Ferreira, D. de F., & Wagner, R. (2015). 1-methylcyclopropene effects on volatile profile and quality of “Royal Gala” apples produced in Southern Brazil and stored in controlled atmosphere. *Ciência Rural*, 45(12), 2259–2266. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20141613>
- Thewes, F. R., Brackmann, A., Anese, R. de O., Ludwig, V., Schultz, E. E., dos Santos, L. F., & Wendt, L. M. (2017). Effect of dynamic controlled atmosphere monitored by respiratory quotient and 1-methylcyclopropene on the metabolism and quality of ‘Galaxy’ apple harvested

- at three maturity stages. *Food Chemistry*, 222, 84–93. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.12.009>
- Thewes, F. R., Brackmann, A., Both, V., Anese, R. de O., Schultz, E. E., Ludwig, V., Wendt, L. M., Berghetti, M. R. P., & Thewes, F. R. (2020). Dynamic controlled atmosphere based on carbon dioxide production (DCA – CD): Lower oxygen limit establishment, metabolism and overall quality of apples after long-term storage. *Postharvest Biology and Technology*, 168, 111285. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111285>
- Thewes, F. R., Brackmann, A., de Oliveira Anese, R., Bronzatto, E. S., Schultz, E. E., & Wagner, R. (2017). Dynamic controlled atmosphere storage suppresses metabolism and enhances volatile concentrations of ‘Galaxy’ apple harvested at three maturity stages. *Postharvest Biology and Technology*, 127, 1–13. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2017.01.002>
- Thewes, F. R., Brackmann, A., de Oliveira Anese, R., Ludwig, V., Schultz, E. E., & Berghetti, M. R. P. (2018). 1-methylcyclopropene suppresses anaerobic metabolism in apples stored under dynamic controlled atmosphere monitored by respiratory quotient. *Scientia Horticulturae*, 227, 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.09.028>
- Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(9), 853–876. <https://doi.org/10.1002/jsfa.885>
- Vilanova, L., Teixidó, N., Torres, R., Usall, J., & Viñas, I. (2012). The infection capacity of *P. expansum* and *P. digitatum* on apples and histochemical analysis of host response. *International Journal of Food Microbiology*, 157(3), 360–367. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.005>
- Vilanova, L., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., Buron-Moles, G., & Teixidó, N. (2014). Increasing maturity reduces wound response and lignification processes against *Penicillium expansum* (pathogen) and *Penicillium digitatum* (non-host pathogen) infection in apples. *Postharvest Biology and Technology*, 88, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.09.009>
- Watkins, C.B., & Liu, F. W. (2010). Temperature and Carbon Dioxide Interactions on Quality of Controlled Atmosphere-stored ‘Empire’ Apples. *HortScience*, 45(11), 1708–1712. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.11.1708>
- Watkins, Christopher B., & Nock, J. F. (2012). Rapid 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment and delayed controlled atmosphere storage of apples. *Postharvest Biology and Technology*, 69, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.02.010>
- Weber, A., Brackmann, A., Both, V., Pavanello, E. P., Anese, R. O., & Schorr, M. R. W. (2016). Ethanol reduces ripening of ‘Royal Gala’ apples stored in controlled atmosphere. *Anais Da*

Academia Brasileira de Ciencias, 88(1), 403–410. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620140181>

- Weber, A., Brackmann, A., Both, V., Pavanello, E. P., De Oliveira Anese, R., & Thewes, F. R. (2015). Respiratory quotient: Innovative method for monitoring ‘Royal Gala’ apple storage in a dynamic controlled atmosphere. *Scientia Agricola*, 72(1), 28–33. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2013-0429>
- Weber, A., Neuwald, D. A., Kitemann, D., Thewes, F. R., Both, V., & Brackmann, A. (2020). Influence of respiratory quotient dynamic controlled atmosphere (DCA – RQ) and ethanol application on softening of Braeburn apples. *Food Chemistry*, 303, 125346. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125346>
- Weber, A., Thewes, F. R., Anese, R. de O., Both, V., Pavanello, E. P., & Brackmann, A. (2017). Dynamic controlled atmosphere (DCA): interaction between DCA methods and 1-methylcyclopropene on ‘Fuji Suprema’ apple quality. *Food Chemistry*, 235, 136–144. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.05.047>
- Weber, A., Thewes, F. R., Sellwig, M., Brackmann, A., Wünsche, J. N., Kitemann, D., & Neuwald, D. A. (2019). Dynamic controlled atmosphere: Impact of elevated storage temperature on anaerobic metabolism and quality of ‘Nicoter’ apples. *Food Chemistry*, 298, 125017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125017>
- Wright, A. H., DeLong, J. M., Arul, J., & Prange, R. K. (2015). The trend toward lower oxygen levels during apple (*Malus × domestica* Borkh) storage. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 90(1), 1–13. <https://doi.org/10.1080/14620316.2015.11513146>
- Wright, H., DeLong, J., Harrison, P. A., Gunawardena, A. H. L. A. N., & Prange, R. (2010). The effect of temperature and other factors on chlorophyll a fluorescence and the lower oxygen limit in apples (*Malus domestica*). *Postharvest Biology and Technology*, 55(1), 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.07.011>

SUPPLEMENTARY MATERIAL



Supplementary Figure 1: Variation of storage temperature for each treatment during the storage period of ‘Maxi Gala’ apple in dynamic controlled atmosphere with quotient respiratory 1.3 (DCA-RQ1.3) and controlled atmosphere (CA).

4 CAPÍTULO 2

4.1 DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE VARIAÇÃO DA TEMPERATURA DURANTE LONGO PERÍODO DE ARMAZENAMENTO DE MAÇÃS ‘MAXI GALA’ ARMAZENADAS EM ATMOSFERA CONTROLADA DINÂMICA

RESUMO

A colheita das cultivares mutante da ‘Gala’ estão concentradas nos meses de janeiro a março, sendo necessário o armazenamento de grande parte da safra para regulação do mercado ao longo de todo o ano. Portanto, o objetivo é verificar qual a melhor estratégia de manejo da temperatura, durante o período de armazenamento em atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pela quociente respiratório 1,3 (ACD-QR 1,3) sobre a conservação da qualidade físico-química de maçãs ‘Maxi Gala’ após 9 meses de armazenamento mais 7 e 14 dias de vida de prateleira a 20 °C. Maçãs ‘Maxi Gala’ foram armazenadas em atmosfera controlada (AC), AC+1-metilciclopropeno (1-MCP), atmosfera controlada dinâmica monitorada pela fluorescência de clorofila (ACD-FC) com e sem 1-MCP e ACD-QR 1,3 em duas temperaturas constantes de [1] 0,5 e [2] 2,0 e duas estratégias de manejo da temperatura [1] (0,5/30d+2,0/240d) e [2] (2,0/30d+0,5/240d) °C. Após 9 meses de armazenamento mais 7 e 14 dias a 20 °C, frutos armazenados em ACD-QR 1,3 a 2,0 e (2,0/30d+0,5/240d) °C, resultaram em alta firmeza de polpa e porcentagem de frutos sadios, decorrente da baixa incidência de podridão e degenerescência de polpa, comparado à AC com e sem 1-MCP. Frutos armazenados em ACD-FC, com ou sem 1-MCP, resultaram em frutos com qualidades físico-químicas semelhantes aos armazenados em ACD-QR 1,3 independente da temperatura, aos 14 dias a 20 °C. Portanto, este estudo mostrou que as melhores estratégias do manejo da temperatura em ACD-QR 1,3 é a utilização de temperaturas baixas no final do armazenamento (2,0/30d+0,5/240d °C) ou temperatura constante de 2,0 °C ao longo de todo o período de armazenamento.

Palavras-chave: *Malus domestica*; pós-colheita, firmeza de polpa, distúrbios fisiológicos, ACD-QR 1,3.

4.1.1 Introdução

A maçã (*Malus x domestica* Borkh.) é uma fruta classificada como climatérica, isso significa que o processo de amadurecimento dos frutos continua após a colheita. Desta forma a conservação da qualidade físico-química fica reduzida a curtos períodos quando mantidos em temperatura e/ou técnica de armazenamento inadequadas. Além disso, a colheita das principais variedades produzidas no Brasil, dentre elas a ‘Maxi Gala’, mutante da ‘Gala’, é concentrada em um curto período do ano, entre os meses de janeiro a março. Assim, para que empresas do setor consigam fornecer maçãs aos consumidores ao longo de todo o ano, é necessário a utilização de temperaturas e técnicas de armazenamento adequadas a fim de manter a qualidade dos frutos e diminuir perdas durante e após o armazenamento por longo período. Em função disto, é importante o estudo de técnicas eficientes de armazenamento associado a diferentes temperaturas ao longo do período do armazenamento. Por outro lado, após o armazenamento, os frutos passam por processamento e são transportados a longas distâncias até chegar nas gôndolas dos supermercados, onde permanecem por mais alguns dias até serem comercializados. Esse processo pode levar até 14 dias ou mais, durante os quais os frutos permanecem sob temperaturas elevadas (em torno de 20 °C), intensificando o processo de amadurecimento.

O metabolismo dos frutos é afetado de acordo com a cultivar, estação de cultivo, temperatura, uso de reguladores de crescimento (WRIGHT et al., 2015), acarretando na alteração do limite mínimo de oxigênio (LMO) tolerado pelos frutos. Assim, o monitoramento do LMO tolerado pela fruta ao longo do período de armazenamento, é uma ferramenta confiável para manter baixa a velocidade das reações químicas e bioquímicas nas células e, por consequência, reduz as alterações bioquímicas nos frutos (KRUSE; RENNENBERG; ADAMS, 2011; STEFFENS et al., 2007). No entanto, nas primeiras semanas de armazenamento, a pressão parcial de oxigênio (pO_2) das câmaras é reduzida gradativamente pela respiração da fruta ou pela injeção de N_2 . Esse período pode ter a duração de 3 a 4 semanas, na qual o nível de oxigênio (O_2) da câmara está bem acima do LMO, o que permite alta atividade metabólica e consequente consumo de reservas. Portanto, nas primeiras semanas, período de adaptação dos frutos as baixas pO_2 , pode ocorrer perdas pela excessiva respiração, assim, o armazenamento em temperaturas mais baixas durante este período, poderia reduzir o metabolismo dos frutos evitando essas perdas de qualidade. Estudos relatam que a temperatura de armazenamento é um fator que afeta a velocidade das reações químicas e bioquímicas nas células (ASIF et al., 2009), e o fator mais importante na manutenção da qualidade dos frutos durante o período de

armazenamento (BRACKMANN et al., 2010), pois, as baixas temperaturas resultam na supressão da via respiratória e produção de etileno, causando redução das alterações bioquímicas nos frutos (KRUSE; RENNENBERG; ADAMS, 2011; STEFFENS et al., 2007).

Atualmente, a técnica de armazenamento mais empregada pelas empresas no Brasil e no mundo, é a atmosfera controlada (AC) (BRACKMANN et al., 2015; KITTEMANN; MCCORMICK; NEUWALD, 2015). Na AC, a pO_2 é reduzida, enquanto a pCO_2 é aumentada, para maçãs Gala para aproximadamente 1,2 kPa e 2,0 kPa, respectivamente, permanecendo constantes ao longo do armazenamento, além disso é feita a redução e controle da temperatura e aumento da umidade relativa (MAZZURANA et al., 2016). A AC mantém a qualidade dos frutos por longos períodos, podendo chegar até 8 meses (WEBER et al., 2013), no entanto, resulta em alta incidência de podridão e perda de firmeza de polpa (THEWES et al., 2017b), além de alta incidência de polpa farinácea e degenerescência da polpa (BRACKMANN et al., 2014; HO et al., 2013). Para reduzir as perdas em AC, é utilizado a aplicação de 1-metilciclopropeno (1-MCP), o qual, inibe a ação do etileno, através do bloqueio irreversível dos receptores de etileno, retardando o amadurecimento dos frutos (SALAS et al., 2011). Estudos relatam que o uso de 1-MCP resultou em benefícios na qualidade físico-química de maçãs ‘Galaxy’ (BOTH et al., 2018) e ‘Braeburn’ (SCHMIDT et al., 2020), entretanto, outros estudos verificaram aumento na incidência de distúrbios fisiológicos (KOUSHESH SABA; WATKINS, 2020) e incidência de podridão (DOS SANTOS et al., 2018).

Recentemente está sendo estudada e difundida a atmosfera controlada dinâmica (ACD), a qual, é uma nova forma de definir a pO_2 durante o período de armazenamento. Na ACD a pO_2 varia de acordo com a resposta dos frutos ao baixo O_2 , levando em consideração o metabolismo da fruta (BESSEMANS et al., 2016; WEBER et al., 2015, 2019; WRIGHT et al., 2012), mantendo assim as pO_2 próximo do LMO tolerado pelos frutos (THEWES et al., 2020a; ZANELLA et al., 2005). As principais formas para determinar o LMO e definir a pO_2 ao longo do armazenamento em ACD são baseadas na determinação do etanol (DEUCHANDE et al., 2016); fluorescência de clorofilas (FC) (PRANGE et al., 2007), quociente respiratório (QR) dos frutos (WEBER et al., 2015 e 2017; WRIGHT et al., 2015) e recentemente pela produção de CO_2 dos frutos (THEWES et al., 2020a).

A ACD-FC é amplamente utilizada em todo o mundo em câmaras comerciais de armazenamento (PRANGE et al., 2007), inicialmente os frutos são expostos a níveis decrescentes de oxigênio, até o momento em que ocorra um pico na fluorescência de clorofilas da epiderme dos frutos (pO_2 abaixo do LMO), como resposta há um estresse por baixo O_2 (PRANGE et al., 2007; WRIGHT et al., 2015). O armazenamento em ACD-FC resulta em

maior firmeza da polpa e acidez titulável, menor produção de etileno e degenerescência de polpa quando comparado com o armazenamento em AC (KÖPCKE, 2015; ZANELLA; ROSSI, 2015). Por outro lado, a técnica de ACD-QR é outra forma de determinar o LMO tolerado pelos frutos, a qual, baseia-se na razão entre CO₂ produzido e O₂ consumido pelos frutos, sendo ajustado a pO₂ conforme um valor predeterminado do QR (GASSER et al., 2010; WEBER et al., 2015). Estudos prévios propuseram que o valor do QR acima de 1,0 induz o metabolismo anaeróbico com produção de acetaldeído, etanol e acetato de etila, reduzindo a síntese de etileno (ANESE et al., 2019; BESSEMANS et al., 2016). Estes mesmos autores, verificaram que o armazenamento em ACD-QR foi mais eficiente em relação a AC com ou sem aplicação de 1-MCP na manutenção da qualidade físico-química durante e após o período de armazenamento.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar qual a melhor estratégia de variar a temperatura (temperatura baixa nos 30 dias início ou no final do armazenamento), durante o período de armazenamento em ACD-QR 1,3 sobre a qualidade físico-química de maçãs ‘Maxi Gala’ após 9 meses de armazenamento mais 7 e 14 dias de vida de prateleira a 20 °C.

4.1.2 Material e Métodos

4.1.2.1 Material vegetal, preparo das amostras e análise inicial

Maçãs da cultivar ‘Maxi Gala’ provenientes de pomares comerciais (28°30’44” S; 50°56’02” W; 971 m) localizada no município de Vacaria, RS, colhidas no mês de fevereiro, período em que ocorre o pico de colheita comercial dessa cultivar na safra de 2018/2019. Após a colheita, os frutos foram imediatamente transportados até o Núcleo de Pesquisas em Pós-colheita (NPP) na Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil, onde foi realizada a seleção, a fim de remover os frutos com danos mecânicos, defeituosos e pequenos (calibre maior de 165), posteriormente foi realizada a homogeneização das amostras experimentais. Cada tratamento foi composto por 8 repetições de 25 frutos, totalizando 200 frutos por tratamento, sendo que 4 repetições foram avaliadas após 7 e 4 após 14 dias a 20 °C.

Após o preparo das amostras, três repetições de 20 frutos cada foram separadas aleatoriamente para determinar a qualidade inicial e o estágio de maturação dos frutos. Na análise inicial, o índice de iodo-amido foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Streif (1984), resultando no índice de 6,10. O conteúdo de sólidos solúveis foi de 12,0%, acidez titulável de 0,44 g de ácido málico 100 g⁻¹, taxa respiratória 6,29 µg kg⁻¹ s⁻¹, produção de etileno 0,39 ng kg⁻¹ s⁻¹, firmeza de polpa 84,8 N e atividade da enzima ACC oxidase 15,4 ng kg⁻¹ s⁻¹.

4.1.2.2 *Temperatura e umidade relativa*

Imediatamente após a preparação das amostras, as maçãs foram acondicionadas em câmaras experimentais de aço galvanizado com volume de 0,233 m³ (1 m x 0,58 m x 0,40 m) alocadas em câmaras frigoríficas, as quais foram mantidas na temperatura de 5 °C no primeiro dia e esta foi gradualmente reduzida ao longo de 5 dias, até atingir as temperaturas de armazenamento estabelecida (0,5 e 2,0 °C). O controle das temperaturas ocorreu durante 9 meses de armazenamento com o auxílio de termostatos eletrônicos e monitorada diariamente com termostatos de bulbo de mercúrio (com resolução de 0,2 °C), inserido dentro da polpa de maçãs, alocadas no interior das câmaras frigoríficas. A umidade relativa no interior das minicâmaras foi monitorada manualmente com o auxílio de psicrômetros e ajustada com cloreto de cálcio (10 g kg⁻¹ de frutos) que absorveu o excesso de umidade, sendo mantida na média de 94% ± 2,0%.

4.1.2.3 *Aplicação de 1-metilciclopropeno (1-MCP)*

A aplicação de 1-MCP (SmartFresh[®], 0,14% de ingrediente ativo) foi realizada após os frutos atingirem a temperatura de 2,0 ± 0,1 °C. Em seguida, as amostras dos frutos foram alocadas em câmara experimental com volume de 0,233 m³ e uma solução de 0,625 µL L⁻¹ de 1-MCP foi preparada de acordo com as instruções do fabricante. A solução foi colocada em uma placa de Petri no interior da câmara experimental, a qual foi imediatamente fechada hermeticamente e realizou-se a homogeneização do ar da câmara com um ventilador. Após 24 h, os frutos foram removidos da câmara e armazenados sob AC e ACD-FC.

4.1.2.4 *Instalação e manutenção da AC e ACD*

Imediatamente após a aplicação do 1-MCP e atingir a temperatura de armazenamento, as câmaras experimentais foram hermeticamente vedadas. As condições de armazenamentos foram: [1] Atmosfera Controlada (AC)–1,2 kPa O₂+2,0 kPa CO₂ (armazenadas a 2,0 °C durante 270 dias); [2] AC+1-metilciclopropeno (1-MCP); [3] Atmosfera controlada dinâmica monitorada pela fluorescência de clorofila (ACD-FC) (armazenadas a 2,0 °C durante 270 dias); [4] ACD-FC+1-MCP; [5] Atmosfera controlada dinâmica monitorada pelo quociente respiratório 1,3 (ACD-QR 1,3) (0,5 °C) (armazenadas a 0,5 °C durante 270 dias); [6] ACD-QR 1,3 (2,0 °C) (armazenadas a 2,0 °C durante 270 dias); [7] ACD-QR 1,3 (0,5+2,0 °C) (armazenadas a 0,5 °C por 30 dias e a 2,0 °C por 240 dias) e [8] ACD-QR 1,3 (2,0+0,5 °C)

(armazenadas a 2,0 °C por 30 dias e a 0,5 °C por 240 dias). As condições de armazenamento são mostradas na Figura Suplementar 1.

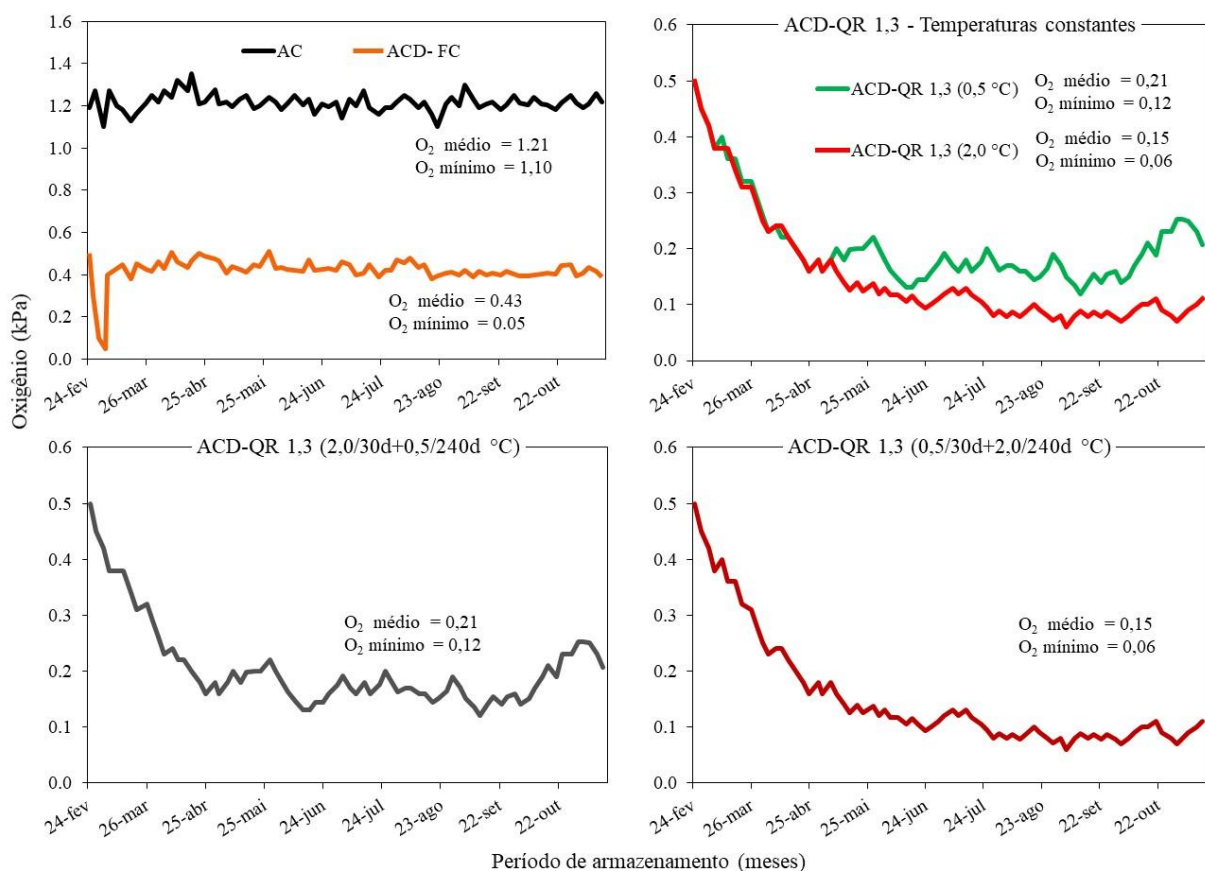
Para reduzir as pressões parciais de O₂ nas câmaras de AC e ACD foi injetado nitrogênio (N₂), proveniente de um gerador de N₂, que funciona com o princípio “pressure swing adsorption” (PSA), até o nível de 5,0 kPa. Posteriormente, ocorreu a redução de 1,0 kPa de O₂ dia⁻¹, durante cinco dias, proporcionada pela respiração dos frutos, até atingir 1,2 kPa para AC e 0,5 kPa para ACD-FC e ACD-QR 1,3, momento em que iniciou a determinação do LMO neste método de armazenamento. Esta redução gradual permite simular o comportamento de câmaras comerciais, visa a adaptação gradativa dos frutos a baixa concentração de O₂ e temperatura. A pressão parcial de dióxido de carbono (pCO₂) foi obtida pela respiração dos frutos. As pO₂ e pCO₂ foram monitoradas diariamente com analisador de gases (Siemens®, modelo Ultramat, Alemanha) e corrigido por um sistema de controle automático (Valis Automação TI®, Lajeado, RS, Brasil). Assim, o sistema automático comparou a pO₂ e pCO₂ com um *set point* definido, quando abaixo do *set point*, o O₂ foi repostado através da injeção de ar atmosférico nas minicâmaras e quando o CO₂ estava acima da concentração desejada, o excesso de CO₂ na câmara foi automaticamente absorvido pela circulação do ar das minicâmaras por um absorvedor de hidróxido de cálcio (cal hidratada).

Durante o período de armazenamento a pO₂ foi alterada de acordo com o metabolismo dos frutos nas condições de ACD e mantida constante para AC, conforme mostrado na Figura 1. O monitoramento do LOL durante o armazenamento em ACD-QR foi determinado conforme a metodologia proposta por Weber et al. (2015), o quociente respiratório (QR) foi determinado duas vezes por semana. O QR foi obtido pela razão entre a produção de CO₂ e o consumo de O₂ por um período de 14 horas ($QR = \Delta CO_2 / \Delta O_2$). A pO₂ foi alterado conforme o valor do QR obtido, quando o QR igual a 1,3, a pO₂ permaneceu a mesma, porém com QR abaixo ou acima de 1,3, a pO₂ foi reduzida ou aumentada, respectivamente, visando obter QR igual a 1,3. A pCO₂ para todas as condições de ACD foi de 1,6 kPa. As condições de AC, foram mantidas de acordo com a metodologia proposta por Thewes et al. (2017a), na qual a pO₂ foi de 1,2 kPa ($\pm 0,2$ kPa) e pCO₂ foi de 2,0 ($\pm 0,2$ kPa).

A ACD-FC foi monitorada de acordo com a metodologia desenvolvida por Prange et al. (2007). Uma amostra de seis frutos foi colocada em um recipiente plástico (18 cm x 27 cm x 25 cm) com sensores de fluorescência. O recipiente foi colocado com as amostras experimentais dentro de uma câmara experimental, a qual foi vedada e coberta com plástico de cor preta para manter os sensores na ausência de luz. Foi realizada a redução da pO₂ de forma gradativa pela respiração dos frutos, até que houvesse a emissão da fluorescência da clorofila. A partir do

registro do primeiro sinal de fluorescência, a pO_2 foi então elevada 0,2 kPa acima daquela estressante, nunca permanecendo abaixo de 0,4 kPa como fator de segurança. A fluorescência da clorofila foi monitorada a cada hora durante todo o período de armazenamento durante o experimento, com ponto de ajuste da pO_2 mínima de 0,05 kPa (durante a emissão da fluorescência da clorofila) e máximo de 0,5 kPa (Figura 1).

Figura 1 – *Setpoint* do oxigênio (O_2) durante 9 meses de armazenamento de maçãs ‘Maxi Gala’ em atmosfera controlada (AC), atmosfera controlada dinâmica monitorada pela fluorescência de clorofila (ACD-FC) e quociente respiratório 1,3 (ACD-QR 1,3) com diferentes estratégias de variação da temperatura.



Fonte: (Autor)

4.1.2.5 Análises físico-químicas

Após nove meses de armazenamento mais 7 e 14 dias de exposição dos frutos à temperatura de 20 °C (± 1) e umidade relativa de 80% (± 5), para simular o período de comercialização, foram realizadas as seguintes análises:

4.1.2.5.1 Firmeza de polpa

Realizada com auxílio de um penetrômetro manual (Effegi, modelo FT 327, Milão, Itália) equipado com uma ponteira de 11 mm de diâmetro. A ponteira foi inserida em dois lados opostos da região equatorial dos frutos, onde previamente a epiderme foi removida. Os resultados foram expressos em Newton (N).

4.1.2.5.2 Sólidos solúveis (SS) e acidez titulável (AT)

O SS foi determinado com refratômetro a partir do suco extraído dos frutos de cada amostra, com auxílio de uma centrífuga de suco (Philips Walita®). Três gotas de suco foram colocadas sobre o prisma do refratômetro (Biobrix, Model 103, Curitiba, Brasil) para a determinação do teor de SS. Os resultados foram expressos em %.

Para a determinação da AT, uma alíquota de 10 mL do suco foi diluída em 100 mL de água destilada e titulado com solução de NaOH 0,1 N até atingir pH 8,1. Os resultados foram expressos em g ácido málico 100 g⁻¹ de suco.

4.1.2.5.3 Extravasamento de eletrólitos

Determinação realizada de acordo com metodologia proposta por Gago et al. (2015) e adaptado por Thewes et al. (2017a). Foram retirados 10 discos da polpa de 10 frutos, com diâmetro de 7 mm e espessura de 5 mm. Os discos foram extraídos da região do córtex. Em seguida, os discos foram imersos em um tubo falcon com 25 mL de água destilada e deixadas durante uma hora, expostas a 20 ± 1 °C. Após foi determinada a condutividade elétrica da solução. Em seguida a amostra foi fervida durante 30 min e, posteriormente, resfriada até 20 °C. Logo em seguida, foi determinada novamente a condutividade da solução com auxílio de um medidor de condutividade (ASKO® modelo AK51). Os resultados foram expressos em porcentagem de extravasamento de eletrólitos.

4.1.2.5.4 Produção de etileno, taxa respiratória e concentração interna de etileno

A produção de etileno dos frutos foi determinada pelo acondicionamento de aproximadamente 1.500 g de frutos dentro de um recipiente hermeticamente vedado com volume de 5 L, mantidos por aproximadamente duas horas, na temperatura de 20 °C. Após, foram extraídas duas amostras de 1 mL do espaço livre dos recipientes e injetadas em um cromatógrafo a gás Varian® (modelo Star CX3400, Palo Alto, CA, USA), equipado com coluna Poropak N80/100 e detector de ionização de chama, com temperatura da coluna, do injetor e

do detector de 90°, 140° e 200 °C, respectivamente. Os resultados foram expressos em $\text{ng kg}^{-1}\text{s}^{-1}$.

A taxa respiratória foi determinada imediatamente após a determinação da produção de etileno, obtida pelo acúmulo de CO_2 dentro do mesmo frasco da determinação da produção de etileno, por meio de um analisador de gases de fluxo contínuo (Isolcell® Itália, modelo Oxycarb 6) e os resultados expressos em $\mu\text{g kg}^{-1}\text{s}^{-1}$.

A concentração interna de etileno foi determinada a partir da remoção do ar interno da fruta com uma bomba de vácuo com pressão de sucção de 565 mm Hg, conforme descrito por Mannapperuma; Singh; Montero, (1991), seguido da injeção de duas amostras de 1 mL desse ar, no mesmo cromatógrafo utilizado para determinação da produção de etileno. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$.

4.1.2.5.5 Atividade da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidase (ACC oxidase)

Determinada de acordo com a metodologia desenvolvida por Bufler (1986), na qual uma amostra de 3 g de epiderme, extraídas de 10 frutos, foi imersa durante 30 minutos em solução contendo $0,1 \text{ mMol L}^{-1}$ de ACC (Ácido aminociclopropano-1-carboxílico) em 10 mMol L^{-1} do tampão MES (ácido 2 (N-morfolino) etanossulfônico) em pH 6,0. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em seringas de 50 mL, onde foi adicionado 2% de CO_2 e vedadas durante 30 minutos. Após o período em condições herméticas, duas alíquotas de 1,0 mL foram retiradas da seringa e a concentração de etileno foi determinada por um cromatógrafo a gás Varian® (como descrito para o etileno). Os dados foram expressos em $\text{ng kg}^{-1}\text{s}^{-1}$ de etileno.

4.1.2.5.6 Incidência de podridão

A incidência de podridão foi determinada após a vida de prateleira de 7 e 14 dias, a partir da contagem do número de frutos que apresentarem algum tipo de infecção por fungos na epiderme, com lesão maior que 5 mm de diâmetro. Os dados foram expressos em porcentagem de frutos afetados.

4.1.2.5.7 Degenerescência de polpa e polpa farinácea

Distúrbios determinados pela quantificação dos frutos com quaisquer sinais de escurecimento interno (degenerescência de polpa) e/ou aspecto farináceo (polpa farinácea) após o corte transversal de todos os frutos de cada repetição, de acordo com Thewes et al. (2015). Os resultados foram expressos em porcentagem de frutos afetados.

4.1.2.5.8 Frutos sadios

Obtidos pela diferença entre o número total de frutos por repetição (25 frutos) e o número total de frutos com algum sintoma de podridão, polpa farinácea e/ou degenerescência de polpa, de acordo com Brackmann et al. (2015). Os resultados foram expressos em porcentagem de frutos.

4.1.2.5.9 Acetaldeído, etanol e acetato de etila

Os compostos do metabolismo anaeróbico foram determinados a partir de amostras de frutos que foram previamente resfriados a 0 °C (temperatura da polpa). Imediatamente após o resfriamento, fatias horizontais (2-3 cm) da região equatorial foram retiradas, e centrifugadas em baixa temperatura para evitar a oxidação enzimática e química das amostras. Em seguida, 15 mL do suco foi transferido para frascos 'vial' de 20 mL e congelado a $-30 \pm 1,0$ °C até o momento da análise. No momento da determinação dos compostos, cada amostra foi retirada da temperatura de -30 °C e descongeladas até a temperatura de 0 °C. Foram utilizados 2 mL de suco e misturados com 0,3 g de NaCl e 10 µL de uma solução padrão de 3-octanol ($82,2 \mu\text{g mL}^{-1}$), sendo colocadas em um 'vial' de vidro de 4 mL de volume, selado hermeticamente com uma tampa de silicone revestida com PTFE. A amostra foi submersa em banho-maria a 35 °C por 5 min. Após 5 min, a fibra (Supelco, 50/30 µm x 20 mm, com polímero de divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane) foi exposta no *headspace* da amostra durante 60 min sob agitação constante em 35 °C. Após 60 min, a fibra foi dessorvida termicamente em um cromatógrafo a gás da marca Dani[®] (Dani Instruments Spa., Viale Brianza, Cologno Monzese, Itália), a uma temperatura de 250 °C por 10 min, em um modo *splitless*. Os compostos foram separados em uma coluna capilar não polar de sílica fundida DN-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O fluxo do gás de arraste (nitrogênio) foi de 1,0 mL min⁻¹. Para a separação dos compostos do metabolismo anaeróbico foi utilizado uma rampa de temperatura: temperatura inicial de 35 °C mantida por 3 min, em seguida uma rampa de temperatura de 2 °C min⁻¹ até 80 °C, posteriormente, outra rampa de 5 °C min⁻¹ até 230 °C e mantida nesta temperatura por 5 min. A temperatura do detector FID foi de 230 °C. Os compostos da fermentação foram identificados e quantificados de acordo com a metodologia proposto por Both et al. (2014). Os resultados foram expressos em µg L⁻¹.

4.1.2.6 Análise estatística

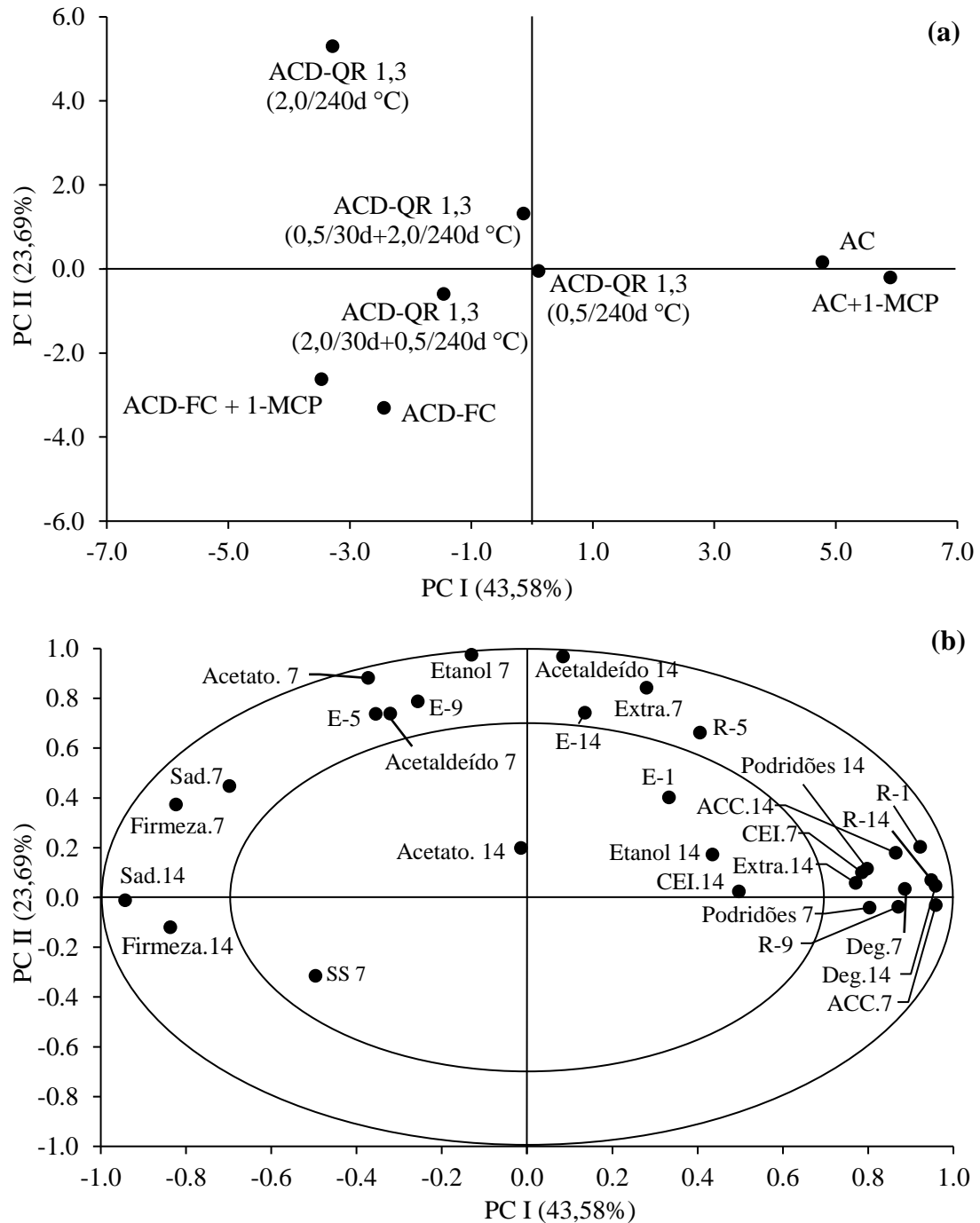
O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade dos erros, pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Os dados que não apresentaram normalidade dos erros foram transformados pela fórmula $\text{arc.sen}\sqrt{(x+0.5)/100}$ e as variáveis cujos erros se apresentarem heterocedásticos foram transformados pela fórmula $\log_{10}(x+1.0)$. Em seguida, foram submetidos à ANOVA e, quando significativos ($p < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro. Todos os dados que apresentaram diferença significativa, foram submetidos à análise de componentes principais, usando o software Unscrambler® X (versão 9.7, CAMO A/S, Trondheim, Noruega) para mostrar uma visão geral dos resultados. Antes da análise multivariada dos dados, a matriz de dados foi escalada automaticamente para cada variável para obter o mesmo peso para todas as variáveis (média = 0 e variância = 1).

4.1.3 Resultados e Discussão

4.1.3.1 *Análise dos componentes principais*

Para visualizar o efeito dos tratamentos nos parâmetros de qualidade, foi realizada uma análise de componentes principais (ACP) (Figura 2a e 2b). O ACP mostra uma visão geral do efeito dos tratamentos (Figura 2a) e das variáveis analisadas (Figura 2b). Os dois componentes principais (PCI e PCII) explicaram 43,58% e 23,69% da variação geral, respectivamente (Figura 2a e 2b). O PCI separou os frutos que foram armazenados em AC com e sem aplicação de 1-MCP e ACD-QR 1,3 na temperatura de 0,5 °C dos demais frutos (Figura 2a). Resultado correlacionado com maior incidência de degenerescência de polpa, percentual de podridões, concentração de etileno interno, atividade da enzima ACC oxidase e taxa respiratória durante os 14 dias a 20 °C (Figura 2b). Indicando que estes frutos apresentaram maior metabolismo durante o armazenamento, uma vez que, a alta atividade da ACC oxidase, taxa respiratória e concentração de etileno interno estão relacionados a estes frutos. Estudo anterior, verificou que maçãs ‘Galaxy’ colhidas em estágio de maturação maduro e sobre maduro, quando armazenadas em AC, apresentaram correlação com a alta atividade da ACC oxidase, produção de etileno, taxa respiratória, distúrbios fisiológicos e sólidos solúveis (THEWES et al., 2017a). Por outro lado, a maior porcentagem de frutos sadios e firmeza de polpa ao longo dos 14 dias a 20 °C, estão correlacionados com o armazenamento em ACD-FC com ou sem 1-MCP e ACD-QR 1,3 na temperatura de 2,0 °C e nas diferentes estratégias de manejo da temperatura (Figura 2b).

Figura 2 – (a) tratamentos (escores) e (b) variáveis (loadings) mostrando os principais componentes de maçãs ‘Maxi Gala’ armazenadas em atmosfera controlada (AC), atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pela fluorescência de clorofila (ACD-FC) e pelo quociente respiratório 1,3 (ACD-QR 1,3) sob diferentes estratégias de variação da temperatura, após 9 meses mais 7 e 14 dias a 20 °C. E-1, E-5, E-9 e E-14 – Produção de etileno; R1, R-5, R-9 e R14 – taxa respiratória; Extra. – Extravasamento de eletrólitos. CEI – Concentração de etileno interno; ACC – Atividade da enzima ACC Oxidase; Deg. – Degenerescência de polpa; SS – Sólidos solúveis; Acetato. – Acetato de etila; Sad. – Frutos sadios.



Fonte: (Autor)

O PC II mostrou a resposta oposta dos frutos armazenados em ACD-QR 1,3 na temperatura de 2,0 e (0,5/30d+2,0/240d) °C das demais condições (Figura 2a). Resultado relacionado com a maior concentração de acetaldeído, etanol e acetato de etila aos 7 dias a 20 °C e alta produção de etileno aos 5 e 9 dias após a abertura das câmaras (Figura 2b). Este resultado deve-se à pressão parcial de oxigênio (pO_2) extremamente baixa (média de 0,15 kPa) empregada ao longo da ACD-QR 1,3 na temperatura de 2,0 °C (Figura 1), que induziu o metabolismo anaeróbico. Resultado semelhante foi encontrado em maçãs ‘Galaxy’ (THEWES et al., 2017a), que verificaram que os metabólitos do metabolismo anaeróbico se relacionam ao armazenamento em ACD-QR.

4.1.3.2 *Atividade da enzima ACC oxidase (ACC oxidase), concentração de etileno interno (CEI), produção de etileno e taxa respiratória*

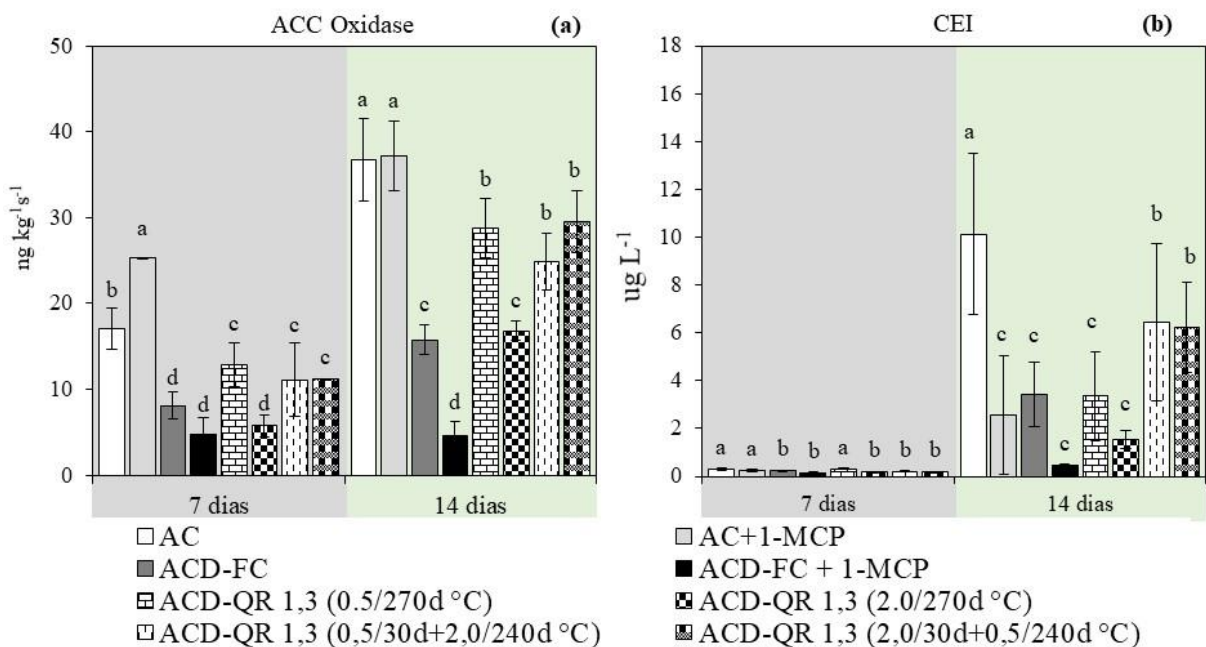
A ACC oxidase é a enzima responsável pela última etapa da biossíntese de etileno. Sua atividade foi baixa no armazenamento em ACD-FC com e sem 1-MCP e ACD-QR 1,3 na temperatura de 2,0 °C, aos 7 e 14 dias a 20 °C (Figura 3a), o que resultou em baixa CEI (Figura 3b). A baixa atividade da ACC oxidase nos frutos em ACD-FC com e sem aplicação de 1-MCP, também resultou em baixa produção de etileno ao longo dos 14 dias a 20 °C (Figura 4a a 4d), este resultado está associado à baixa pO_2 no armazenamento (0,4 kPa) (Figura 1).

As baixas pO_2 têm dois efeitos, o efeito direto na ACC oxidase, uma vez que a ACC oxidase é dependente da presença de O_2 para converter ACC a etileno (BOOKER; DELONG, 2015; YANG; HOFFMAN, 1984) e por induzir o metabolismo anaeróbico (Figura 4), no qual, seus produtos têm a capacidade de reduzir a expressão de genes envolvidos na biossíntese de etileno, como *BO-ACO1*, *BO-ACO2* e *BO-ACSI* (ASODA et al., 2009). Além disso, estudos com maçãs ‘Gala’ (THEWES et al., 2015), ‘Royal Gala’ (WEBER et al., 2016), brócolis (ASODA et al., 2009) e melões doces (JIN et al., 2013) verificaram que o etanol reduz a atividade da ACC oxidase. A baixa pO_2 , provavelmente, reduziu a expressão gênica de *MdACCO1*, conforme verificado em maçãs ‘Galaxy’ armazenadas em ACD-FC e ACD-QR 1,1 e 1,5, quando comparadas com aquelas armazenadas em AC (THEWES et al., 2020b).

Frutos armazenados em AC com ou sem 1-MCP resultaram em alta atividade da ACC oxidase, aos 7 e 14 dias a 20 °C (Figura 3a), o que resultou alta CEI, sendo que na avaliação aos 14 dias a aplicação de 1-MCP reduziu a CEI (Figura 3b). Alta atividade da ACC oxidase, verificada nestes frutos, é resultado da alta pO_2 durante o armazenamento (1,2 kPa) (Figura 1). Schmidt et al. (2020) e Thewes et al. (2020) verificaram alta atividade da ACC oxidase no

armazenamento em CA comparado com ACD-FC e ACD-QR. Fato notável, é que a aplicação de 1-MCP não reduziu a atividade da ACC oxidase aos 7 e 14 dias a 20 °C. A baixa atividade da ACC oxidase em frutos que recebem aplicação de 1-MCP é atribuída à redução na expressão dos genes *MdACO1* (THEWES et al., 2020b; YANG et al., 2013) e *MdACS1* (TATSUKI; ENDO; OHKAWA, 2007).

Figura 3 – Atividade da enzima ACC oxidase (a) e concentração de etileno interna (CEI) (b) de maçãs ‘Maxi Gala’ armazenadas em atmosfera controlada (AC), atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pela fluorescência de clorofila (ACD-FC) e pelo quociente respiratório 1,3 (ACD-QR 1,3) sob diferentes estratégias de variação da temperatura, após 9 meses mais 7 e 14 dias a 20 °C. Barras com a mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.

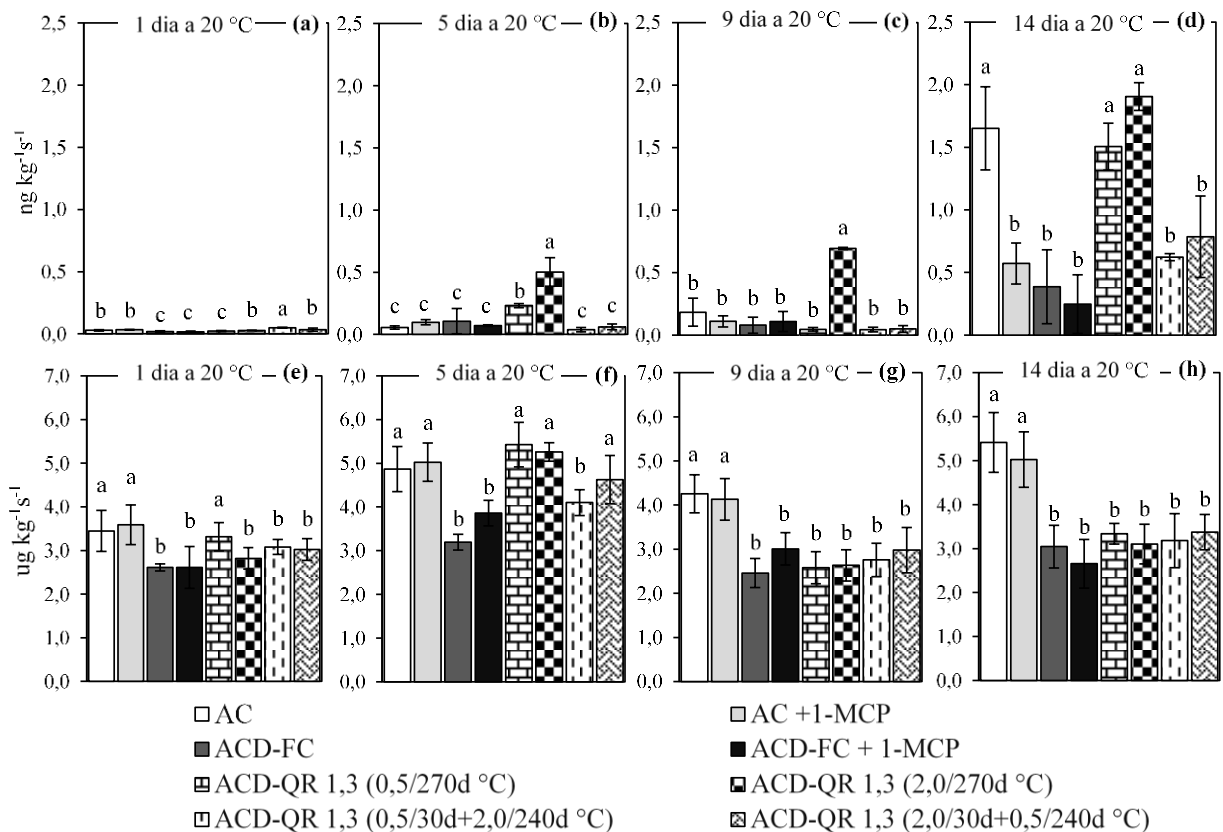


Fonte: (Autor)

Após o armazenamento, os frutos apresentaram respostas distintas ao longo do período de exposição a 20 °C em relação à produção de etileno. Um dia após a abertura das câmaras, a maior produção de etileno foi observada nos frutos armazenados em ACD-QR 1,3 na temperatura de (0,5/30d+2,0/240d) °C, porém, a partir do quinto dia os frutos armazenados sob ACD-QR 1,3 na temperatura 2,0 °C apresentaram elevada produção de etileno. Aos 14 dias a 20 °C, frutos em AC e ACD-QR 1,3 na temperatura de 0,5 °C, também apresentaram maior produção de etileno (Figura 4a a 4d). O armazenamento em ACD permite monitorar o LMO tolerado pelos frutos, possibilitando assim a utilização de pressões parciais ultrabaixas de oxigênio durante todo o armazenamento (WRIGHT et al., 2015), o que reduz o metabolismo

dos frutos e atrasa o pico climatérico e a senescência, em comparação com a AC (MDITSHWA; FAWOLE; OPARA, 2018). O período pós climatérico, caracteriza-se pelo decréscimo na produção de etileno e início da senescência, culminando com a morte do tecido (PAUL; PANDEY; SRIVASTAVA, 2012). Provavelmente, os frutos armazenados em AC (com e sem 1-MCP), já ultrapassaram o pico climatérico, decorrente das altas pO_2 durante o armazenamento (Figura 1). Estudos anteriores também verificaram que o armazenamento de maçãs ‘Cripps Pink’ em ACD-QR resulta em maior produção de etileno após 7 dias a 20 °C, em relação ao armazenamento em AC (KLEIN et al., 2020).

Figura 4 - Produção de etileno (a, b, c e d) e taxa respiratória (e, f, g e h) de maçãs ‘Maxi Gala’ ao longo de 1, 5, 9 e 14 dias a 20 °C, após 9 meses de armazenamento em atmosfera controlada (AC), atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pela fluorescência de clorofila (ACD-FC) e pelo quociente respiratório 1,3 (ACD-QR 1,3) sob diferentes estratégias de variação da temperatura. Barras com a mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.



Fonte: (Autor)

A menor produção de etileno geralmente foi simultânea a menor taxa respiratória para frutos armazenados em ACD-FC com e sem 1-MCP, nos 14 dias de avaliação. Frutos em ACD-

QR 1,3, nas temperaturas constantes ou com diferentes estratégias de manejo de temperatura, tiveram respostas distintas ao longo dos primeiros 5 dias a 20 °C, sendo que nas avaliações seguintes a taxa respiratória destes frutos diminuiu a níveis observados em ACD-FC (Figura 4e a 4h). Este resultado, sugere que o estresse por pO₂, próximo à anoxia, durante a determinação do QR e emissão da FC induza o metabolismo anaeróbico (etanol) que possui efeito na ação do etileno, o qual reduz o metabolismo dos frutos e, conseqüentemente, a sua qualidade pode ser mantida (BOTH et al., 2014). A taxa respiratória é um indicador do metabolismo dos frutos (STEFFENS et al., 2007), o que é confirmado pelo PCA, onde a taxa respiratória e qualidade dos frutos (firmeza de polpa e frutos sadios) se encontram em quadrantes opostos (Figura 2b). No entanto, no armazenamento em AC com ou sem 1-MCP, os frutos apresentaram uma maior taxa respiratória ao longo dos 14 dias a 20 °C, quando comparado com as demais condições (Figura 4e a 4h). Este resultado confirma que estes frutos se encontravam em estágio de amadurecimento avançado. Uma vez que, em frutos climatéricos, o estágio de amadurecimento pode ser avaliado a partir da determinação da taxa respiratória (STEFFENS et al., 2007).

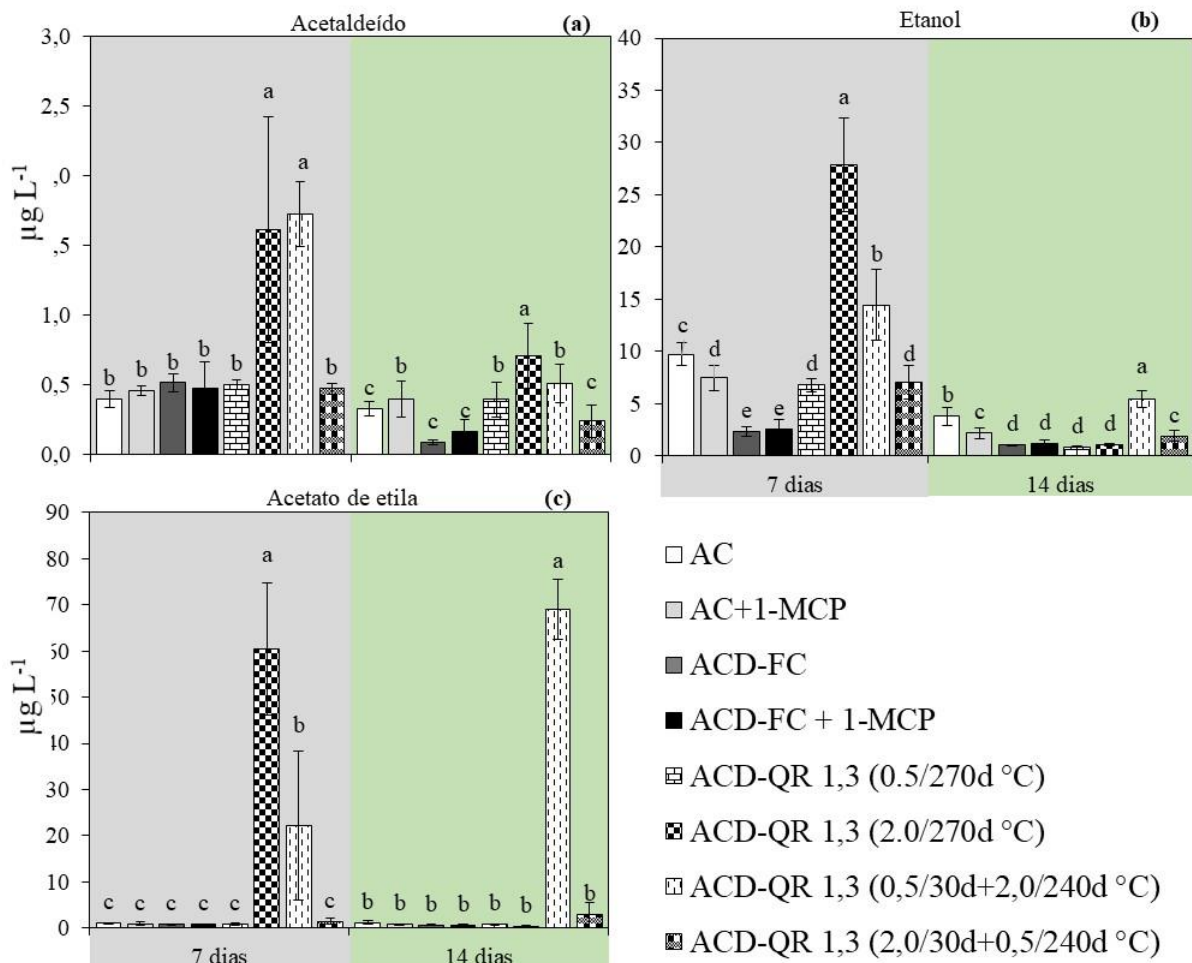
4.1.3.3 *Metabolismo anaeróbico*

O acetaldeído é formado pela ação da piruvato descarboxilase (PDC), que converte piruvato a acetaldeído (PESIS, 2005; THEWES et al., 2018). Na avaliação aos 7 e 14 dias a 20 °C, frutos armazenados em ACD-QR 1,3 na temperatura de 2,0 °C apresentaram maior concentração de acetaldeído, sendo que em ACD-QR 1,3 na temperatura de (0,5/30d+2,0/240d) °C também tiveram alta concentração de acetaldeído aos 7 dias (Figura 5a e 5b). A maior concentração de acetaldeído nas avaliações aos 7 e 14 dias, provavelmente, é decorrente da maior atividade da PDC, a qual foi afetada pela alta produção de etileno (Figura 4a a 4d), uma vez que estudos anteriores verificaram que a atividade da PDC é induzida pela concentração de etileno (HARB et al., 2011; THEWES et al., 2021). Weber et al. (2020) observaram resultados semelhantes em maçãs 'Braeburn' armazenadas em ACD-QR 1,5 e 2,0 na temperatura de 1,0 e 3,0 °C, onde a maior concentração de acetaldeído foi decorrente da maior atividade de PDC.

A maior concentração de etanol em ACD-QR 1,3 nas temperaturas de 2,0 °C, comparado aos demais tratamentos na avaliação aos 7 dias (Figura 5b), é explicada pela alta concentração de acetaldeído (Figura 5a), uma vez que este é rapidamente convertido pela álcool desidrogenase (ADH) a etanol (HARB et al., 2011; LEE et al., 2012; PESIS, 2005), porém, na temperatura de (0,5/30d+2,0/240d) °C na avaliação aos 7 dias, provavelmente, a atividade da enzima ADH foi reduzida, uma vez que a concentração de etanol foi reduzida, sendo que a concentração do seu precursor (acetaldeído) não foi limitante. Este fato causou acúmulo de

acetaldeído na polpa dos frutos, o qual é muito tóxico para as células (LEE et al., 2012; PESIS, 2005), causando danos ao tecido, o que pode ter sido a causa do aumento da ocorrência de distúrbios fisiológicos como degenerescência de polpa e podridões aos 7 dias a 20 °C (Figura 7b e 7a). Estudos recentes, constataram que maçãs ‘Galaxy’ (THEWES et al., 2020b) e ‘Braeburn’ (WEBER et al., 2020) armazenadas em ACD-QR, apresentaram alta expressão (*MdADHI*) e atividade da ADH, respectivamente. Na avaliação aos 14 dias, a maior concentração de etanol foi verificada em frutos armazenados em ACD-QR 1,3 na temperatura de (0,5/30d+2,0/240d) °C, comparado aos demais tratamentos (Figura 5b).

Figura 5 - Produção de compostos da fermentação de maçãs ‘Maxi Gala’ armazenadas em atmosfera controlada (AC), atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pela fluorescência de clorofila (ACD-FC) e pelo quociente respiratório 1,3 (ACD-QR 1,3) sob diferentes estratégias de variação da temperatura, após 9 meses mais 7 e 14 dias a 20 °C. Barras com a mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.



Fonte: (Autor)

O etanol é convertido em acetato de etila, a partir de uma reação de esterificação com ácido acético, catalisada pela enzima álcool acetiltransferase (AAT) (DEFILIPPI; KADER; DANDEKAR, 2005; LEE; RUDELL; WATKINS, 2014). Maior concentração de acetato de etila foi encontrada nos frutos armazenados em ACD-QR 1,3 nas temperaturas de 2,0 aos 7 dias a 20 °C e (0,5/30d+2,0/240d) °C aos 14 dias a 20 °C, quando comparado com as demais condições (Figura 5c). Este resultado, mostra que os precursores e a enzima ATT não foram limitantes para a formação de acetato de etila, porém, aos 7 dias, os frutos que foram mantidos na temperatura de (0,5/30d+2,0/240d) °C tiveram limitação do precursor (etanol), decorrente da menor conversão de acetaldeído para etanol. Estudos recente encontraram alta concentração de acetato de etila em frutos armazenados em concentrações de O₂ extremamente baixa (abaixo de 0,8 kPa) (BERGHETTI et al., 2020; LUDWIG et al., 2020). O acetato de etila tem grande importância para o sabor de maçãs, no entanto, quando em alta concentração é associado à formação de ‘*off-flavour*’ (WRIGHT et al., 2015). De acordo com López et al. (2007), a formação de *off-flavour* ocorre quando a concentração de acetato de etila na polpa da fruta atinge concentração acima de 13.500 ug kg⁻¹, portanto, neste estudo não ocorreu formação de *off-flavour*, sendo que os frutos mantidos em ACD-QR 1,3 nas temperaturas de 2,0 e (0,5/30d+2,0/240d) °C, apresentaram sabor característico desta cultivar.

4.1.3.4 *Firmeza de polpa, extravasamento de eletrólitos, sólidos solúveis totais e acidez titulável*

Uma das características de qualidade das maçãs levada em consideração pelos consumidores é a firmeza de polpa (HARKER et al., 2008). Neste estudo, frutos armazenados em ACD-FC+1-MCP e ACD-QR nas temperaturas constantes e nos diferentes manejos da temperatura, apresentaram maior firmeza de polpa, nas avaliações aos 7 e 14 dias, quando comparado a aqueles armazenados em AC (Figura 6a). Frutos em ACD-FC apresentaram maior firmeza de polpa apenas aos 14 dias a 20 °C, em relação aos frutos em AC com e sem 1-MCP (Figura 6a). A maior firmeza de polpa em frutos armazenados em ACD-FC com ou sem 1-MCP, está relacionada à baixa atividade da ACC oxidase, CEI (Figura 3a e 3b) e produção de etileno (Figura 4a a 4d), uma vez que o etileno aumenta a atividades de enzimas relacionada à degradação da parede celular, principalmente a β-galactosidase (ORTIZ; GRAELL; LARA, 2011; WEI et al., 2010). Em um estudo com maçãs ‘Galaxy’, frutos armazenados em ACD-FC e ACD-QR 1,1 e 1,5, apresentaram alta firmeza de polpa em comparação à AC após 9 meses

mais 7 dias a 20 °C (THEWES et al., 2020b), estando de acordo com os resultados do presente estudo.

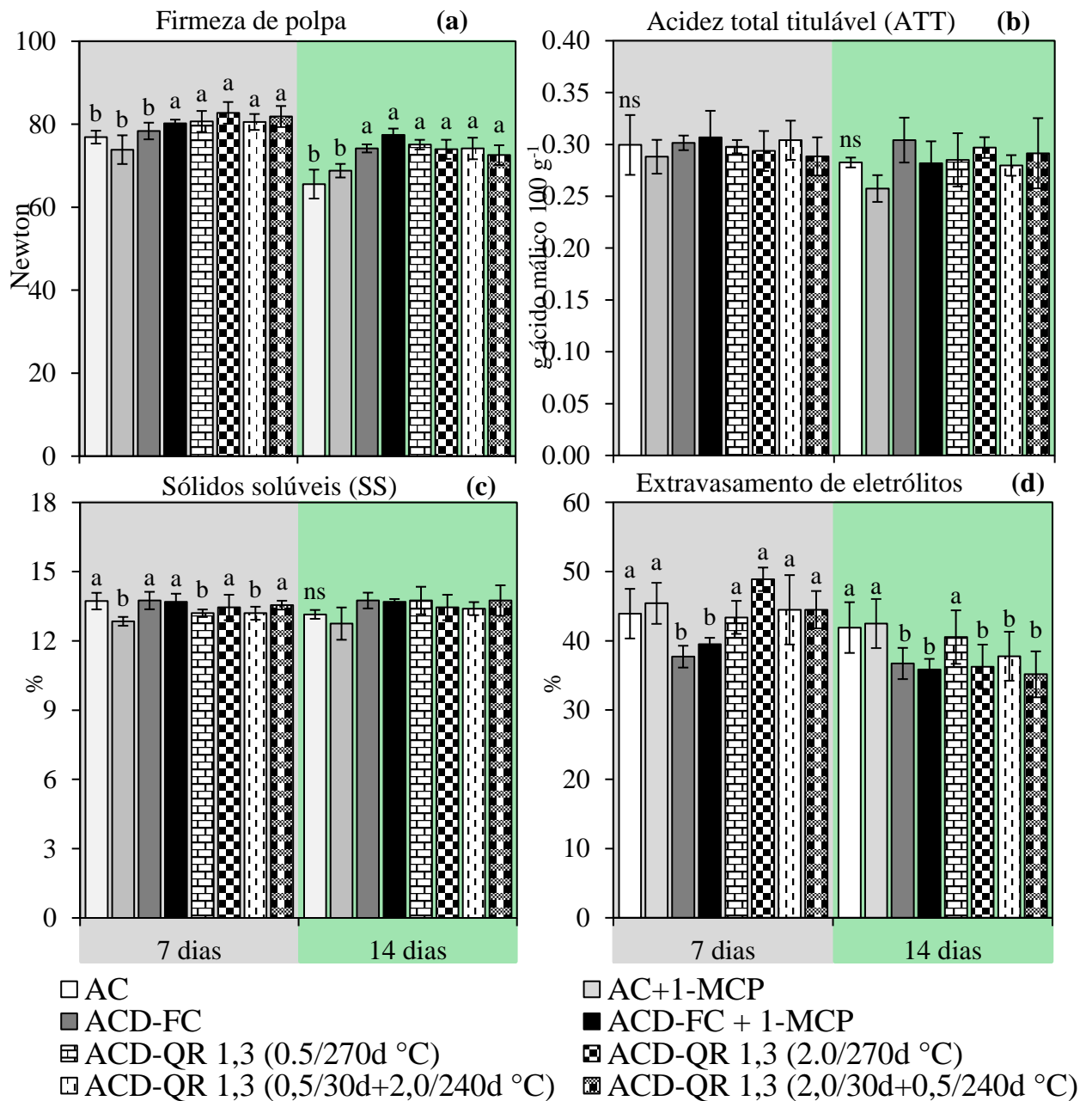
As pO_2 extremamente baixas empregadas durante o armazenamento em ACD-QR 1,3 (Figura 1) induziram o metabolismo anaeróbico dos frutos, acarretando uma produção de acetaldeído, etanol e acetato de etila (Figura 5). Portanto, a maior manutenção da firmeza em ACD-QR 1,3 provavelmente está relacionada com as concentrações de acetaldeído e etanol (Figura 5a e 5b). Estudos relatam que a atividade das enzimas β -galactosidase é reduzida na presença de etanol, pois, este composto reduz a produção de etileno (WEBER et al., 2020). Além disso, Thewes et al. (2021) verificaram que a aplicação de vapor de etanol (500 ppm) suprimiu a produção de etileno, mesmo quando combinado com etileno, durante 14 dias a 20 °C, demonstrando que o etanol inibe a ação do etileno. Portanto, a quantidade de etileno produzida pelos frutos (Figura 4a a 4d) pode não ter sido suficiente para ativar as enzimas que degradam a parede celular, sugerindo que o etanol inibiu a ação do etileno e, por consequência, manteve a maior firmeza dos frutos.

O presente trabalho constatou que a aplicação de 1-MCP em AC e ACD-FC não traz benefícios adicionais na manutenção da firmeza de polpa aos 7 e 14 dias a 20 °C, em relação ao armazenamento com pO_2 extremamente baixas, como as utilizadas em ACD-QR 1,3. Em termos práticos, isso resulta na redução de custos para as empresas armazenadoras de maçãs, em virtude do alto custo do 1-MCP. Além disso, é um resultado importante para maçãs orgânicas, uma vez que a aplicação deste composto não é permitida em maçãs orgânicas produzidas na Europa (GABIOUD REBEAUD & GASSER, 2015). Portanto, a técnica de ACD-QR 1,3 é uma ótima ferramenta, tanto para o armazenamento de maçãs de produção convencionais como orgânicas.

Acidez total titulável (ATT) e sólidos solúveis (SS) são atributos qualitativos que atribuem sabor aos frutos. Neste estudo a concentração de ATT não apresentou diferença entre as condições de armazenamento, aos 7 e 14 dias a 20 °C (Figura 6b). Anese et al. (2020) e Thewes et al. (2020) também verificaram que as diferentes condições de armazenamento com ou sem 1-MCP, não influenciaram a ATT de maçãs ‘Galaxy’ após 9 meses de armazenamento mais 7 dias a 20 °C. A concentração de SS foi menor nos frutos armazenados em AC com 1-MCP e ACD-QR 1,3 nas temperaturas de 0,5 e (0,5/30d+2,0/240d) °C, em relação às demais condições de armazenamento (Figura 6c). Baixa concentração de SS em ACD-QR, provavelmente, é resultado de maior glicólise para o fornecimento de energia as células, decorrente do metabolismo anaeróbico, o qual é menos eficiente na produção de ATP comparado com o metabolismo oxidativo (HO et al., 2013). Em maçãs ‘Braeburn’ a menor

concentração de SS foi observada em ACD, quando comparada a AC, após 8 meses de armazenamento mais 7 dias a 20 °C (WEBER et al., 2020). No entanto, outros estudos não encontraram diferença estatística na concentração de SS em maçãs ‘Royal Gala’ (BOTH et al., 2017) e ‘Galaxy’ (ANESE et al., 2020a; THEWES et al., 2017a, 2020b) armazenadas em AC ou ACD após 9 meses mais 7 dias a 20 °C.

Figura 6 - Firmeza de polpa (a), acidez titulável total (ATT), (b), sólidos solúveis (SS) (c) e extravasamento de eletrólitos (d) de maçãs ‘Maxi Gala’ armazenadas em atmosfera controlada (AC), atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pela fluorescência de clorofila (ACD-FC) e pelo quociente respiratório 1,3 (ACD-QR 1,3) sob diferentes estratégias de variação da temperatura, após 9 meses mais 7 e 14 dias a 20 °C. Barras com a mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. ns: não significativo.



Fonte: (Autor)

A integridade das membranas celular pode ser avaliada através do extravasamento de eletrólitos e, portanto, também o risco dos frutos desenvolverem distúrbios fisiológicos (WEBER et al., 2019). Após 7 dias a 20 °C, o maior extravasamento de eletrólitos foi observado em frutos armazenados em AC com e sem 1-MCP e ACD-QR 1,3 nas temperaturas constantes e nos diferentes manejos de temperatura, quando comparado aos armazenados em ACD-FC com ou sem 1-MCP, sendo que os frutos em AC com ou sem 1-MCP e ACD-QR 1,3 na temperatura de 0,5 °C, permaneceram com alto extravasamento de eletrólitos na avaliação aos 14 a 20 °C (Figura 6d). O alto extravasamento de eletrólitos pode ser explicado pelo alto metabolismo anaeróbico, uma vez que há perda da integridade da membrana pela alta concentração de acetaldeído, etanol e acetato de etila (SAQUET; STREIF; BANGERTH, 2000). Além disso, a alteração na composição dos lipídios da membrana modifica a permeabilidade da membrana, como destacado em nêsperas (ANTUNES; SFAKIOTAKIS, 2008) e em kiwi ‘Hayward’ (CAO et al., 2009), onde o elevado extravasamento de eletrólitos foi atribuído ao aumento da relação de ácidos graxos insaturados/saturados. Pesquisas anteriores compararam o armazenamento em ACD-QR e AC e não encontraram diferença no extravasamento de eletrólitos em maçãs ‘Galaxy’ (THEWES et al., 2017a), porém, em maçãs ‘Nicoter’ e ‘Elstar’ o armazenamento em ACD-QR resultou em menor extravasamento de eletrólitos (THEWES; BRACKMANN; NEUWALD, 2019; WEBER et al., 2019). Frutos em ACD-FC com e sem aplicação de 1-MCP, resultaram menor extravasamento de eletrólitos aos 7 e 14 dias a 20 °C (Figura 6d), indicando frutos com maior integridade das membranas celular, portanto têm menor risco de desenvolver distúrbios fisiológicos.

4.1.3.5 *Incidência de podridão, degenerescência de polpa e frutos sadios*

O armazenamento prolongado pode resultar em grande percentual de podridão, resultando em perdas econômicas significativas, sendo uma das principais causas de perdas de frutos durante o armazenamento (VILANOVA et al., 2014). Neste estudo, frutos armazenados em AC com e sem 1-MCP apresentaram alta incidência de podridão aos 14 dias a 20 °C, em relação aos frutos em ACD-FC e ACD-QR 1,3 nas temperaturas constantes ou nos diferentes manejos de temperatura (Figura 7a). Este resultado evidencia o efeito do armazenamento em ACDs, especialmente em ACD-RQ 1,3 independente da temperatura de armazenamento, sobre a redução da incidência de podridão em comparação à AC com ou sem 1-MCP, ao longo dos 14 dias a 20 °C. Provavelmente, a menor incidência de podridão é resultado das pO₂

extremamente baixas durante o armazenamento (Figura 1), associado à maior firmeza de polpa (Figura 6a). Estudos relacionam o controle da incidência de podridão no armazenamento de caqui 'Fuyu' (NEUWALD, 2004) e em bananas (IMAHORI et al., 2013) a baixa concentração de O₂. Além disso, trabalhos mais recentes atribuem a maior firmeza de polpa dos frutos, a menor suscetibilidade à incidência de podridão (ANESE et al., 2020b; JI et al., 2019).

Nas maçãs armazenadas em AC e ACD-FC, a aplicação de 1-MCP não apresentou efeito na redução da incidência de podridão aos 7 e 14 dias a 20 °C (Figura 7a). Estudos recentes verificaram o aumento no acúmulo de patulina em maçãs 'Galaxy' e 'Fuji Kiku' tratadas com 1-MCP, independentemente do método de armazenamento (DOS SANTOS et al., 2018). Estes autores atribuem este resultado ao aumento na susceptibilidade à incidência de podridões, decorrente da inibição de metabólitos relacionados aos mecanismos de defesa do vegetal (BOWER; BIASI; MITCHAM, 2003). Portanto, a aplicação de 1-MCP provavelmente causou efeitos semelhantes no presente estudo, resultando na alta incidência de podridão. Entretanto, há divergências na literatura quanto ao efeito do 1-MCP na ocorrência de podridões em maçãs, podendo ter efeito positivo, nulo ou negativo no controle de podridões conforme a cultivar e a condição de armazenamento (BOTH et al., 2018).

A degenerescência de polpa é um distúrbio fisiológico associado ao avançado amadurecimento dos frutos que ocorre durante o período de armazenamento. O escurecimento da polpa é resultado do extravasamento do conteúdo do vacúolo pelas membranas (tonoplasto), levando à oxidação dos compostos fenólicos no citosol das células pela ação da enzima polifenol oxidase (PPO) e de peroxidases (POX) (TOMÁS-BARBERÁN; ESPÍN, 2001). Foi observado menor percentual de degenerescência de polpa em frutos armazenados em ACD-FC com e sem 1-MCP e ACD-QR 1,3 nas temperaturas de 2,0 °C e (2,0/30d+0,5/240d) °C, aos 7 e 14 dias a 20 °C, quando comparado à AC com e sem 1-MCP (Figura 7b). Os principais fatores que afetam a ocorrência deste distúrbio incluem baixa temperatura, alta pCO₂ e baixa pO₂, UR muito alta, bem como o período prolongado de armazenamento (STEFFENS et al., 2007). Além disso, a incidência de degenerescência de polpa pode estar relacionada ao metabolismo anaeróbico, o qual, não fornece energia suficiente para suprir e reparar as membranas celulares (FAN et al., 2011). No entanto, neste estudo, o armazenamento em ACD-FC e ACD-QR não apresentaram alta incidência de degenerescência de polpa, comparado a AC com e sem 1-MCP, mostrando que as pO₂ utilizadas durante o armazenamento (Figura 1) não restringiram o fornecimento de energia para a manutenção da compartimentalização celular. Este resultado vai ao encontro aos resultados de estudos anteriores que verificaram baixa incidência de

frutos, decorrente da alta taxa respiratória (Figura 4e a 4h). Castro et al. (2007) relatam que alta incidência de degenerescência de polpa pode estar relacionada à senescência dos frutos. Estudos prévios encontraram alta incidência de degenerescência de polpa em maçãs armazenadas em AC (ANESE et al., 2019; THEWES et al., 2015), os quais atribuíram a alta degenerescência de polpa à alta produção de etileno e taxa respiratória. Porém, estudos anteriores atribuem a alta incidência de degenerescência de polpa em frutos tratados com 1-MCP à maior atividade da PPO durante o armazenamento de maçãs ‘Empire’ em AC (JUNG; WATKINS, 2011) e após 10 dias a 20 °C (KOUSHESH SABA; WATKINS, 2020). Estudo anterior também verificou aumento da incidência de degenerescência de polpa em maçãs ‘Elstar’ (KÖPCKE, 2015) e ‘Empire’ (LEE et al., 2012) quando tratadas com 1-MCP. A polpa farinácea é um distúrbio fisiológico muito comum em maçãs ‘Gala’, principalmente quando armazenadas durante longos períodos. Este distúrbio fisiológico está associado ao avançado amadurecimento dos frutos, causando perda de suculência, decorrente da transformação das moléculas de pectina insolúvel para solúveis na lamela média (GOULAO et al., 2007). Neste estudo, a incidência de polpa farinácea foi baixa, resultando em média 1,5% aos 7 dias e 3,95% aos 14 dias a 20 °C, nos frutos armazenados em AC com ou sem 1-MCP, sendo que em ACD-FC com ou sem 1-MCP e ACD-QR 1,3, independente da temperatura, não foi detectado incidência de polpa farinácea aos 7 e 14 dias a 20 °C (Figura 7c).

O armazenamento em ACD-QR 1,3 nas temperaturas de 2,0 e (2,0/30d+0,5/240d) °C resultaram na maior porcentagem de frutos sadios aos 7 dias a 20 °C, sendo que em AC com e sem 1-MCP houve baixa porcentagem de frutos sadios, aos 7 e 14 dias a 20 °C (Figura 7d). Frutos armazenados em ACD-FC com e sem 1-MCP apresentaram porcentagem de frutos sadios intermediária aos 7 dias a 20°C, porém aos 14 dias a 20 °C não foi verificada diferença estatística entre ACD-FC e ACD-QR 1,3, independente da temperatura de armazenamento (Figura 7d). A baixa porcentagem de frutos sadios está diretamente relacionada à alta porcentagem de incidência de podridão e degenerescência de polpa (Figura 7a e 7b), confirmado pelo PCA, onde ambas as variáveis estão correlacionadas com este tratamento (Figura 2). Este resultado vai ao encontro a um estudo prévio que encontrou maior porcentagem de frutos sadios em maçãs ‘Royal Gala’ armazenadas em ACD-QR 1,3 do que no armazenamento em AC e ACD-FC após 7 dias a 20 °C (ANESE et al., 2020b). Outros estudos também encontraram alta porcentagem de frutos sadios em maçãs ‘Galaxy’ (ANESE et al., 2019) e ‘Nicoter’ (WEBER et al., 2019) armazenadas em ACD-QR, quando comparado à AC.

4.1.4 Conclusões

Em maçãs ‘Maxi Gala’, as melhores estratégias do manejo da temperatura é a utilização de temperaturas baixas no final do armazenamento (2,0/30d+0,5/240d °C) ou temperatura constantes de 2,0 °C, para obter frutos com alta qualidades físico-químicas e alta porcentagem de frutos sadios após 9 meses de armazenamento em ACD-QR 1,3 mais 7 e 14 dias a 20 °C.

A ACD-QR 1,3 é eficiente na manutenção da qualidade físico-química dos frutos, comparado aos armazenados em AC e ACD-FC com ou sem 1-MCP aos 7 dias a 20 °C, além de permitir o uso de uma temperatura mais elevada (2,0 °C) que recomendado para maçãs do grupo ‘Gala’ (0,5 a 1,5 °C) para o armazenamento em AC tradicional.

O armazenamento em ACD-FC com ou sem 1-MCP mantém a qualidade físico-química de forma semelhante ao armazenamento em ACD-QR 1,3, independente da temperatura aos 14 dias a 20 °C. O tratamento com 1-MCP em AC aumenta a incidência de podridão, degenerescência de polpa, não mantem adequadamente a firmeza de polpa e diminui a porcentagem de frutos sadios após 9 meses de armazenamento mais 7 e 14 dias a 20 °C.

4.1.5 Referências

- ANESE, R. de O. et al. Interaction of 1-methylcyclopropene, temperature and dynamic controlled atmosphere by respiratory quotient on ‘Galaxy’ apples storage. *Food Packaging and Shelf Life*, v. 20, p. 100246, 2019.
- ANESE, R. de O. et al. Impact of dynamic controlled atmosphere storage and 1-methylcyclopropene treatment on quality and volatile organic compounds profile of ‘Galaxy’ apple. *Food Packaging and Shelf Life*, v. 23, p. 100443, 2020a.
- ANESE, R. de O. et al. Growth regulators on quality traits and volatile organic compounds profile of ‘Royal Gala’ apple at harvest and after dynamic controlled atmosphere storage. *Postharvest Biology and Technology*, v. 164, p. 111158, 2020b.
- ANTUNES, M. D. C.; SFAKIOTAKIS, E. M. Changes in fatty acid composition and electrolyte leakage of ‘Hayward’ kiwifruit during storage at different temperatures. *Food Chemistry*, v. 110, n. 4, p. 891–896, 2008.
- ASIF, M. H. et al. Effect of low oxygen, temperature and 1-methylcyclopropene on the expression of genes regulating ethylene biosynthesis and perception during ripening in apple. *South African Journal of Botany*, v. 75, n. 1, p. 137–144, 2009.
- ASODA, T. et al. Effects of postharvest ethanol vapor treatment on ethylene responsiveness in broccoli. *Postharvest Biology and Technology*, v. 52, n. 2, p. 216–220, 2009.
- BERGHETTI, M. R. P. et al. Extremely low oxygen partial pressures for the storage of ‘Royal Gala’ apple. *Bragantia*, v. 79, n. 1, p. 145–154, 2020.

BESSEMANS, N. et al. A novel type of dynamic controlled atmosphere storage based on the respiratory quotient (RQ-DCA). **Postharvest Biology and Technology**, v. 115, p. 91–102, 2016.

BOOKER, M. A.; DELONG, A. Producing the Ethylene Signal: Regulation and Diversification of Ethylene Biosynthetic Enzymes. **Plant Physiology**, v. 169, n. 1, p. 42–50, 2015.

BOTH, V. et al. Effect of storage under extremely low oxygen on the volatile composition of ‘Royal Gala’ apples. **Food Chemistry**, v. 156, p. 50–57, 2014.

BOTH, V. et al. Effects of dynamic controlled atmosphere by respiratory quotient on some quality parameters and volatile profile of ‘Royal Gala’ apple after long-term storage. **Food Chemistry**, v. 215, p. 483–492, 2017.

BOTH, V. et al. The influence of temperature and 1-MCP on quality attributes of ‘Galaxy’ apples stored in controlled atmosphere and dynamic controlled atmosphere. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 16, n. August 2017, p. 168–177, 2018.

BOWER, J. H.; BIASI, W. V.; MITCHAM, E. J. Effect of ethylene in the storage environment on quality of ‘Bartlett’ pears. **Postharvest Biology and Technology**, v. 28, n. 3, p. 371–379, 2003.

BRACKMANN, A. et al. Armazenamento de mirtilo ‘Bluegem’ em atmosfera controlada e refrigerada com absorção e inibição do etileno. **Revista Ceres**, v. 57, n. 1, p. 6–11, 2010.

BRACKMANN, A. et al. Effect of growth regulators on ‘Brookfield’ apple gas diffusion and metabolism under controlled atmosphere storage. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 49, n. 5, p. 323–329, 2014.

BRACKMANN, A. et al. Aminoethoxyvinylglycine: isolated and combined with other growth regulators on quality of ‘Brookfield’ apples after storage. **Scientia Agricola**, v. 72, n. 3, p. 221–228, 2015.

BUFLER, G. Ethylene-Promoted Conversion of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid to Ethylene in Peel of Apple at Various Stages of Fruit Development. **Plant Physiology**, v. 80, n. 2, p. 539–543, 1986.

CAO, S. et al. Effect of 1-Methylcyclopropene Treatment on Chilling Injury, Fatty Acid and Cell Wall Polysaccharide Composition in Loquat Fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8439–8443, 2009.

CASTRO, E. De et al. Carbon Dioxide-induced Flesh Browning in Pink Lady Apples. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 132, n. 5, p. 713–719, 2007.

DEFILIPPI, B. G.; KADER, A. A.; DANDEKAR, A. M. Apple aroma: alcohol acyltransferase, a rate limiting step for ester biosynthesis, is regulated by ethylene. **Plant Science**, v. 168, n. 5, p. 1199–1210, 2005.

- DEUCHANDE, T. et al. Dynamic controlled atmosphere for prevention of internal browning disorders in 'Rocha' pear. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 725–730, 2016.
- DOS SANTOS, I. D. et al. Patulin accumulation in apples under dynamic controlled atmosphere storage. **Food Chemistry**, v. 255, n. January, p. 275–281, 2018.
- FAN, L. et al. Fruit maturity affects the response of apples to heat stress. **Postharvest Biology and Technology**, v. 62, n. 1, p. 35–42, 2011.
- GABIOUD REBEAUD, S., & GASSER, F. Fruit quality as affected by 1-MCP treatment and DCA storage - a comparison of the two methods. **European Journal of Horticultural Science**, v. 80, p. 18–24, 2015.
- GAGO, C. M. L. et al. Effect of harvest date and 1-MCP (SmartFresh™) treatment on 'Golden Delicious' apple cold storage physiological disorders. **Postharvest Biology and Technology**, v. 110, p. 77–85, 2015.
- GASSER, F. et al. Dynamic CA storage of apples: Monitoring of the critical oxygen Concentration and adjustment of optimum conditions during oxygen reduction. **Acta Horticulturae**, v. 876, n. October 2010, p. 39–46, 2010.
- GOULAO, L. F. et al. Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 43, n. 3, p. 307–318, 2007.
- HARB, J. et al. Treatments that suppress ethylene production or ethylene action modify ADH and AAT gene expression and aroma-related enzyme activities in 'Delbarde Estivale' apple: consequences for the aroma profiles of fruit. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 86, n. 2, p. 182–188, 2011.
- HARKER, F. R. et al. Eating quality standards for apples based on consumer preferences. **Postharvest Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 70–78, 2008.
- HO, Q. T. et al. Controlled atmosphere storage may lead to local ATP deficiency in apple. **Postharvest Biology and Technology**, v. 78, p. 103–112, 2013.
- IMAHORI, Y. et al. Residual effects of low oxygen storage of mature green fruit on ripening processes and ester biosynthesis during ripening in bananas. **Postharvest Biology and Technology**, v. 77, p. 19–27, 2013.
- Jl, Y. et al. Effect of ethanol treatment on the quality and volatiles production of blueberries after harvest. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 14, p. 6296–6306, 2019.
- JIN, Y. Z. et al. Ethanol vapor treatment maintains postharvest storage quality and inhibits internal ethylene biosynthesis during storage of oriental sweet melons. **Postharvest Biology and Technology**, v. 86, p. 372–380, 2013.

- JUNG, S. K.; WATKINS, C. B. Involvement of ethylene in browning development of controlled atmosphere-stored 'Empire' apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 59, n. 3, p. 219–226, 2011.
- KITTEMANN, D.; MCCORMICK, R.; NEUWALD, D. A. Effect of high temperature and 1-MCP application or dynamic controlled atmosphere on energy savings during apple storage. **European Journal of Horticultural Science**, v. 1079, p. 409-414, 2015.
- KLEIN, B. et al. Dynamic controlled atmosphere: Effects on the chemical composition of cuticular wax of 'Cripps Pink' apples after long-term storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 164, p. 111170, 2020.
- KÖPCKE, D. 1-methylcyclopropene (1-MCP) and dynamic controlled atmosphere (DCA) applications under elevated storage temperatures: Effects on fruit quality of 'Elstar', 'Jonagold' and 'Gloster' apple (*Malus domestica* Borkh.). **European Journal of Horticultural Science**, v. 80, n. 1, p. 25–32, 2015.
- KOUSHESH SABA, M.; WATKINS, C. B. Flesh browning development of 'Empire' apple during a shelf life period after 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment and controlled atmosphere storage. **Scientia Horticulturae**, v. 261, p. 108938, 2020.
- KRUSE, J.; RENNENBERG, H.; ADAMS, M. A. Steps towards a mechanistic understanding of respiratory temperature responses. **New Phytologist**, v. 189, n. 3, p. 659–677, 2011.
- LEE, J. et al. Metabolic changes in 1-methylcyclopropene (1-MCP)-treated 'Empire' apple fruit during storage. **Metabolomics**, v. 8, n. 4, p. 742–753, 2012.
- LEE, J.; RUDELL, D. R.; WATKINS, C. B. Metabolic Changes in 1-Methylcyclopropene (1-MCP)-Treated 'Empire' Apple at Different Storage Temperatures. **Acta Horticulturae**, v. 1048, n. 1048, p. 113–119, 2014.
- LÓPEZ, M. L. et al. Volatile compounds, quality parameters and consumer acceptance of 'Pink Lady®' apples stored in different conditions. **Postharvest Biology and Technology**, v. 43, n. 1, p. 55–66, 2007.
- LUDWIG, V. et al. Extremely low-oxygen storage: aerobic, anaerobic metabolism and overall quality of apples at two temperatures. **Bragantia**, v. 79, n. 3, p. 458–471, 2020.
- MANNAPPERUMA, J. D.; SINGH, R. P.; MONTERO, M. E. Simultaneous gas diffusion and chemical reaction in foods stored in modified atmospheres. **Journal of Food Engineering**, v. 14, n. 3, p. 167–183, 1991.
- MAZZURANA, E. R. et al. Potenciais benefícios do aumento da temperatura de armazenagem em atmosfera controlada de maçãs 'Gala' tratadas com 1-MCP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 38, n. 1, p. 43–52, 2016.
- MDITSHWA, A.; FAWOLE, O. A.; OPARA, U. L. Recent developments on dynamic controlled atmosphere storage of apples –A review. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 16, p. 59–68, 2018.

NEUWALD, D. Armazenamento de caqui (*Diospyros kaki* L.) cultivar Fuyu em atmosfera controlada. 2004. 78 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria. 2004

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

PAUL, V.; PANDEY, R.; SRIVASTAVA, G. C. The fading distinctions between classical patterns of ripening in climacteric and non-climacteric fruit and the ubiquity of ethylene—An overview. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 1, p. 1–21, 2012.

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

PRANGE, R. et al. Method and apparatus for monitoring a condition in chlorophyll containing matter. U.S. Patent, n. WO/2002/006795. 2007.

SALAS, N. A. et al. Volatile production by ‘Golden Delicious’ apples is affected by preharvest application of aminoethoxyvinylglycine. **Scientia Horticulturae**, v. 130, n. 2, p. 436–444, 2011.

SAQUET, A. A.; STREIF, J.; BANGERTH, F. Changes in ATP, ADP and pyridine nucleotide levels related to the incidence of physiological disorders in “Conference” pears and “Jonagold” apples during controlled atmosphere storage. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 75, n. 2, p. 243–249, 2000.

SCHMIDT, S. F. P. et al. Volatile compounds and overall quality of ‘Braeburn’ apples after long-term storage: Interaction of innovative storage technologies and 1-MCP treatment. **Scientia Horticulturae**, v. 262, p. 109039, 2020.

STEFFENS, C. A. et al. Taxa respiratória de frutas de clima temperado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 3, p. 313–321, 2007.

STREIF, J. Jod-Stärke-Test zur Beurteilung der Fruchtreife bei Äpfeln. **Obst und Garten**, v. 8, p. 382–384, 1984.

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

THEWES, F. R. et al. Dynamic controlled atmosphere and ultralow oxygen storage on ‘Gala’ mutants quality maintenance. **Food Chemistry**, v. 188, p. 62–70, 2015.

THEWES, F. R. et al. Effect of dynamic controlled atmosphere monitored by respiratory quotient and 1-methylcyclopropene on the metabolism and quality of ‘Galaxy’ apple harvested at three maturity stages. **Food Chemistry**, v. 222, p. 84–93, 2017a.

THEWES, F. R. et al. The different impacts of dynamic controlled atmosphere and controlled atmosphere storage in the quality attributes of ‘Fuji Suprema’ apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 130, p. 7–20, 2017b.

THEWES, F. R. et al. 1-methylcyclopropene suppresses anaerobic metabolism in apples stored under dynamic controlled atmosphere monitored by respiratory quotient. **Scientia Horticulturae**, v. 227, p. 288–295, 2018.

THEWES, F. R. et al. Dynamic controlled atmosphere based on carbon dioxide production (DCA – CD): Lower oxygen limit establishment, metabolism and overall quality of apples after long-term storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 168, p. 111285, 2020a.

THEWES, F. R. et al. Dynamic controlled atmosphere (DCA) and 1-MCP: Impact on volatile esters synthesis and overall quality of ‘Galaxy’ apples. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 26, p. 100563, 2020b.

THEWES, F. R. et al. Ethanol vapor treatment inhibits apple ripening at room temperature even with the presence of ethylene. **Postharvest Biology and Technology**, v. 173, p. 111415, 2021.

THEWES, F. R.; BRACKMANN, A.; NEUWALD, D. A. Dynamics of sugars, anaerobic metabolism enzymes and metabolites in apples stored under dynamic controlled atmosphere. **Scientia Horticulturae**, v. 255, p. 145–152, 2019.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ESPÍN, J. C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 9, p. 853–876, 2001.

VILANOVA, L. et al. Increasing maturity reduces wound response and lignification processes against *Penicillium expansum* (pathogen) and *Penicillium digitatum* (non-host pathogen) infection in apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 88, p. 54–60, 2014.

WEBER, A. et al. Atmosfera controlada para o armazenamento da maçã “Maxi Gala”. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 2, p. 294–301, 2013.

WEBER, A. et al. Respiratory quotient: Innovative method for monitoring ‘Royal Gala’ apple storage in a dynamic controlled atmosphere. **Scientia Agricola**, v. 72, n. 1, p. 28–33, 2015.

WEBER, A. et al. Ethanol reduces ripening of ‘Royal Gala’ apples stored in controlled atmosphere. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 1, p. 403–410, 2016.

WEBER, A. et al. Dynamic controlled atmosphere (DCA): interaction between DCA methods and 1-methylcyclopropene on ‘Fuji Suprema’ apple quality. **Food Chemistry**, v. 235, p. 136–144, 2017.

WEBER, A. et al. Dynamic controlled atmosphere: Impact of elevated storage temperature on anaerobic metabolism and quality of ‘Nicoter’ apples. **Food Chemistry**, v. 298, p. 125017, 2019.

WEBER, A. et al. Influence of respiratory quotient dynamic controlled atmosphere (DCA – RQ) and ethanol application on softening of Braeburn apples. **Food Chemistry**, v. 303, p. 125346, 2020.

WEI, J. et al. Changes and postharvest regulation of activity and gene expression of enzymes related to cell wall degradation in ripening apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 56, n. 2, p. 147–154, 2010.

WRIGHT, A. H. et al. Dynamic controlled atmosphere (DCA): Does fluorescence reflect physiology in storage? **Postharvest Biology and Technology**, v. 64, n. 1, p. 19–30, 2012.

WRIGHT, A. H. et al. The trend toward lower oxygen levels during apple (*Malus×domestica* Borkh) storage. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 90, n. 1, p. 1–13, 2015.

WRIGHT, H. et al. The effect of temperature and other factors on chlorophyll a fluorescence and the lower oxygen limit in apples (*Malus domestica*). **Postharvest Biology and Technology**, v. 55, n. 1, p. 21–28, 2010.

YANG, S. F.; HOFFMAN, N. E. Ethylene Biosynthesis and its Regulation in Higher Plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, p. 155-189, 1984.

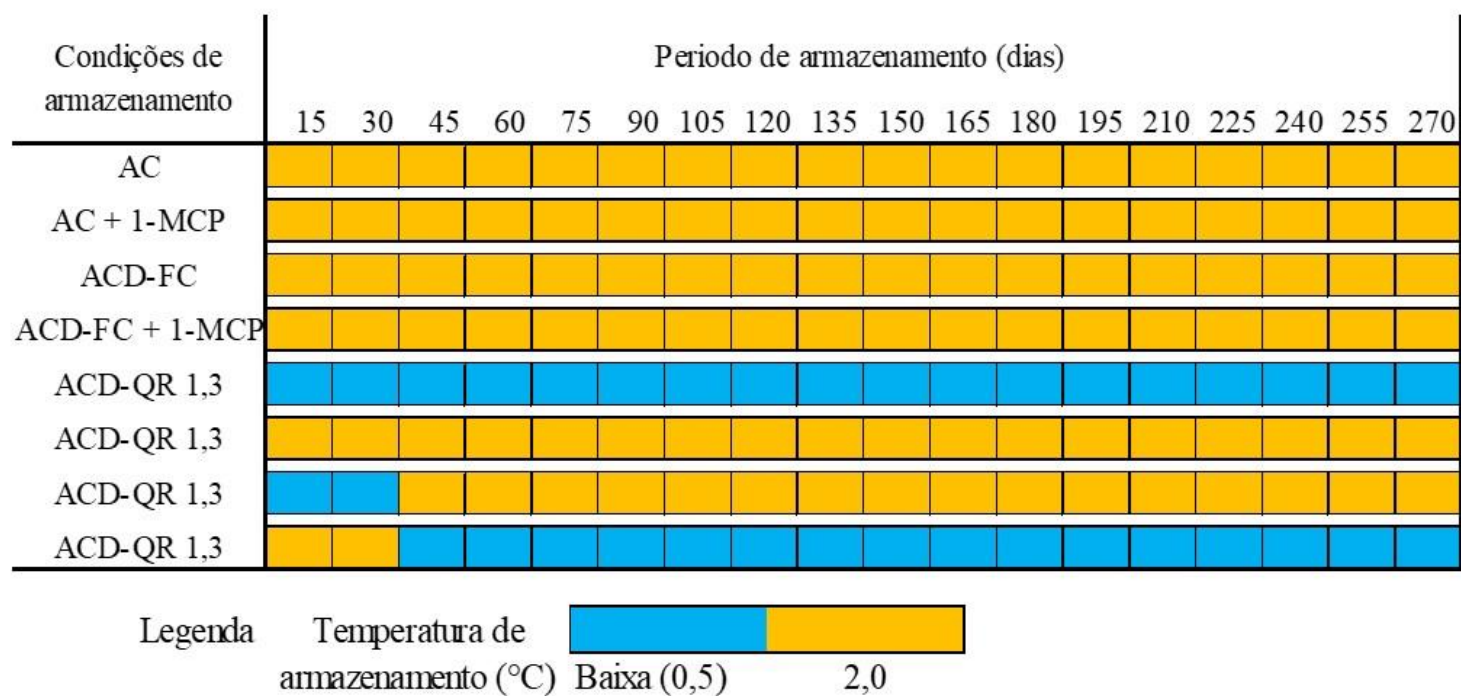
YANG, X. et al. Effect of ethylene and 1-MCP on expression of genes involved in ethylene biosynthesis and perception during ripening of apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 78, p. 55–66, 2013.

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

ZANELLA, A.; ROSSI, O. Post-harvest retention of apple fruit firmness by 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment or dynamic CA storage with chlorophyll fluorescence (DCA-CF). **European Journal of Horticultural Science**, v. 80, n. 1, p. 11–17, 2015.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura Suplementar 1 – Estratégias de variação da temperatura de armazenamento em cada tratamento ao longo do período de armazenamento de maçãs ‘Maxi Gala’ em atmosfera controlada (AC) e atmosfera controlada dinâmica monitorada pela fluorescência de clorofila (ACD-FC) e quociente respiratório 1,3 (ACD-QR 1,3).



Fonte: (Autor).

5 DISCUSSÃO GERAL

Para que as empresas do setor de armazenamento consigam fornecer maçãs de qualidade, é necessária a utilização de técnicas de armazenamento eficientes, que reduzem as perdas, principalmente aquelas causadas por podridões, distúrbios fisiológicos e perda de firmeza de polpa. Em função disso, buscou-se preencher algumas lacunas do conhecimento sobre o armazenamento em atmosfera controlada dinâmica monitorada pelo quociente respiratório (ACD-QR) com variação de temperatura, para otimização das condições de armazenamento ao longo de todo o período de armazenamento, auxiliando na redução das perdas de qualidade em pós-colheita.

Sabendo que o armazenamento em ACD-QR permite o armazenamento de maçãs ‘Galaxy’ em temperaturas mais altas (2,0 e 2,5 ° C) (ANESE et al., 2019; BOTH et al., 2018) e que o melhor nível de quociente respiratório (QR) para mutantes ‘Gala’ varia entre 1,3 e 1,5 (BOTH et al., 2017; WEBER et al., 2015), avaliamos o efeito de diferentes variações da temperatura durante o período de armazenamento em ACD-RQ 1,3. De acordo com o artigo 1, a ACD-QR 1,3 com variação da temperatura (0,5/30d+2,0/240d e 2,0/30d+3,0/240d °C) e temperaturas constantes de 0,5 e 2,0 °C, resultam em frutos com melhor qualidade em comparação aquelas armazenadas em atmosfera controlada convencional (AC) com ou sem 1-MCP, após 9 meses de armazenamento mais 14 dias de vida de prateleira. Este resultado é de suma importância, visto que confirma a eficiência de ACD-QR 1,3, tanto com variação da temperatura ou temperaturas constantes mais elevadas (2,0°C) do que as tradicionalmente recomendadas para maçãs do grupo ‘Gala’ (0,5 a 1,5 °C), corroborando com resultados encontrados por Both et al, (2018) e Anese et al, (2019), com a vantagem de não necessitar a aplicação de 1-MCP.

Outra vantagem do aumento da temperatura de armazenamento é o impacto no custo com o armazenamento, permitindo economia no consumo de energia elétrica. Estudos reportam que em maçãs ‘Jonagold’ e ‘Gala’, armazenadas em AC+1-MCP na temperatura de 4,0 °C, resulta economia no consumo de energia elétrica de 26% e 35%, comparado a frutos armazenados em AC a 1,5 °C (MCCORMICK; NEUWALD; STREIF, 2010, 2012). Em outro estudo, Mazzurana et al. (2016) verificaram que o aumento de 1,3 °C na temperatura, em maçãs ‘Gala’ armazenadas em AC, permite economia no consumo de energia elétrica de 21% na ventilação e 50% no resfriamento, além da redução das perdas de qualidade durante o armazenamento (menor incidência de degenerescência de polpa e alta firmeza de polpa). Portanto, as

temperaturas de 2,0 e 2,0+3,0 °C podem ser alternativas para reduzir o consumo de energia elétrica durante o armazenamento e, conseqüentemente, o custo de armazenagem.

No segundo artigo, foram avaliadas diferentes estratégias de variação da temperatura durante o período de armazenamento em ACD-QR 1,3. Verificou-se que a melhor estratégia de variar a temperatura em ACD-QR 1,3, é a utilização de temperaturas baixas no final do armazenamento (2,0/30d+0,5/240d °C), resultando em frutos com alta qualidades físico-químicas, sem diferir estatisticamente da temperatura constante de 2,0 °C, após 9 meses de armazenamento mais 7 e 14 dias a 20 °C, porém a redução da temperatura no final do período significaria um aumento do custo da energia elétrica. Além disso, em ACD-FC e ACD-QR resultaram em frutos com maior firmeza de polpa e baixa incidência de podridões e degenerescência de polpa resultando em alta porcentagem de frutos sadios, comparado aos armazenados em AC com ou sem 1-MCP aos 14 dias a 20 °C.

A eficiência na manutenção da qualidade físico-química dos frutos armazenados em ACD-QR 1,3 está relacionada às baixas pressões parciais de O₂ utilizadas durante o período de armazenamento, que atingiram valores médios entre 0,15 e 0,21 kPa O₂. Além, do efeito da variação das concentrações de O₂, o estresse por baixo O₂ no momento do cálculo do QR, induz o metabolismo anaeróbico em níveis seguros que causa redução do metabolismo dos frutos, sem causar danos decorrente do excessivo metabolismo anaeróbico. Os metabólitos do metabolismo anaeróbico, quando em baixas concentrações, são associados a manutenção da firmeza de polpa (JI et al., 2019; NUNES et al., 2019), uma vez que, estes compostos suprimem a produção de etileno em maçãs ‘Braeburn’ (WEBER et al., 2020), ‘Nicoter’ e ‘Elstar’ (THEWES et al., 2021) e ameixas ‘Laetitia’ (NUNES et al., 2019). No entanto, quando produzidos em altas concentrações, são associados a danos às membranas das células, resultando em distúrbios fisiológicos (SAQUET; STREIF, 2008) e formação de ‘*off-flavour*’ (KE; RODRIGUEZ-SINOBAS; KADER, 1991; WRIGHT et al., 2015). Entretanto, neste estudo não ocorreu formação de *off-flavour*, sugerindo que, frutos mantidos em ACD-QR 1,3 na temperatura de 2,0, também resultaram em maçãs com sabor característico desta cultivar.

A aplicação de 1-MCP em ACD-FC possui efeito na atividade da ACC oxidase apenas aos 14 dias a 20 °C, uma vez que a própria condição de armazenamento já reduz a atividade da enzima, devido à baixa pO₂ (0,4 kPa), pois a ACC oxidase é dependente da presença de O₂ para converter ACC a etileno (BOOKER; DELONG, 2015; YANG; HOFFMAN, 1984). Além disso, a ACD-FC resultou em baixa concentração dos compostos do metabolismo anaeróbico após o armazenamento mais 7 e 14 dias a 20 °C (Figura 5 – Artigo 2). Este resultado demonstra que a ACD-FC mantém as pressões parciais de O₂ acima do LMO tolerado pelos frutos, durante

a maior parte do armazenamento (após o pico de fluorescência das clorofilas), demonstrando que o LMO tolerado em maçãs 'Maxi Gala' está abaixo de 0,4 kPa.

A aplicação de 1-MCP em maçãs 'Maxi Gala' armazenadas em AC nas temperaturas de 0,5 °C (Artigo 1) e 2,0 °C (Artigo 2), não trouxe benefícios para manutenção da qualidade, com relação à firmeza de polpa, incidência de podridão e degenerescência de polpa, o que refletiu em menor percentual de frutos sadios, após 9 meses de armazenamento mais 7 e 14 dias a 20 °C. No entanto, estudos verificaram que a aplicação de 1-MCP reduziu a incidência de polpa farinácea (ANESE et al., 2019; BRACKMANN et al., 2014; WATKINS, 2006) e degenerescência de polpa (ANESE et al., 2019), porém, neste estudo o 1-MCP perdeu sua eficácia após 9 meses de armazenamento mais 7 e 14 dias a 20 °C. Este estudo também demonstrou que maçãs armazenadas em AC com ou sem 1-MCP, tanto na temperatura de 0,5 °C (Artigo 1) ou 2,0 °C (Artigo 2), estavam em um avançado estágio de maturação (pós-climatérico), constatado pela alta taxa respiratória. Demonstrando que a temperatura baixa (0,5 °C) causou danos por frio nas células, confirmado pelo alto percentual de degenerescência de polpa ao longo da vida de prateleira (Figura 7b – Artigo 1), acarretando no aumento da produção de etileno ao longo do armazenamento e, conseqüentemente, diminuindo a conservação dos frutos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Maçãs ‘Maxi Gala’ armazenadas em atmosfera controlada dinâmica baseado no quociente respiratório 1,3 (ACD-QR 1,3) sob temperaturas constantes (0,5 e 2,0 °C) ou com variação da temperatura (2,0/30d+3,0/240d e 2,0/30d+0,5/240d °C) durante o armazenamento mantém frutos com melhor qualidade em comparação com aquelas armazenadas em AC com e sem 1-MCP, após 9 meses de armazenamento mais 7 e 14 dias de vida de prateleira.

A aplicação de 1-MCP em AC e ACD-FC não traz benefícios adicionais na manutenção da qualidade físico-química após 9 meses de armazenamento mais 7 e 14 dias a 20 °C em relação ao armazenamento com pO₂ extremamente baixas, como as utilizadas em ACD-QR 1,3. Este resultado apresenta relevância prática na redução de custos de armazenamento, em virtude do alto custo do 1-MCP para as empresas. Além disso, a ACD-QR 1,3 pode ser uma técnica para armazenamento de maçãs orgânicas, uma vez que a aplicação de 1-MCP não é permitida. No entanto, esta técnica exige câmaras mais estanques, absorvedores de CO₂ eficientes e sensor de pressão, para evitar a entrada de O₂ nas câmaras.

Não é recomendado a aplicação de 1-MCP em maçãs ‘Maxi Gala’ armazenadas em AC a 0,5 e 2,0 °C por longos períodos e prolongada vida de prateleira, decorrente do aumento da incidência de podridões e degenerescência de polpa.

A ACD-FC, com ou sem 1-MCP, após 14 dias a 20 °C mantém qualidades físico-químicas semelhantes à ACD-QR 1,3 independente da temperatura. No entanto, aos 7 dias a 20 °C, a qualidade físico-química é comparada aos do armazenamento em atmosfera controlada (AC) convencional.

Levando em consideração a qualidade físico-química, as melhores condições para o armazenamento de maçãs ‘Maxi Gala’ por longos períodos mais 7 e 14 dias a 20 °C, observado nesta dissertação, sugere a seguinte ordem: ACD-QR 1,3 na temperatura de 2,0 °C melhor que ACD-QR 1,3 nas temperaturas constantes de 0,5, 3,0 °C e com manejo destas temperaturas igual a ACD-FC com ou sem 1-MCP melhor que AC melhor que AC+1-MCP.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAPOMI, Associação Gaúcha dos Produtores de Maçã, Disponível: www.agapomi.com.br. Acesso em: 13 jan. 20121.

ANESE, R. de O. et al. Interaction of 1-methylcyclopropene, temperature and dynamic controlled atmosphere by respiratory quotient on ‘Galaxy’ apples storage. **Food Packaging and Shelf Life**, [s. l.], v. 20, p. 100246, 2019.

ANESE, R. de O. et al. Impact of dynamic controlled atmosphere storage and 1-methylcyclopropene treatment on quality and volatile organic compounds profile of ‘Galaxy’ apple. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 23, p. 100443, 2020.

ARGENTA, L. C.; MATTHEIS, J. P.; FAN, X. Interactive effects of CA storage, 1-Methylcyclopropene and Methyl Jasmonate on quality of apple fruit. **Acta Horticulturae**, [s. l.], n. 857, p. 259–266, 2010.

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

ASODA, T. et al. Effects of postharvest ethanol vapor treatment on ethylene responsiveness in broccoli. **Postharvest Biology and Technology**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 216–220, 2009.

BESSEMANS, N. et al. A novel type of dynamic controlled atmosphere storage based on the respiratory quotient (RQ-DCA). **Postharvest Biology and Technology**, [s. l.], v. 115, p. 91–102, 2016.

BOOKER, M. A.; DELONG, A. Producing the Ethylene Signal: Regulation and Diversification of Ethylene Biosynthetic Enzymes. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 169, n. 1, p. 42–50, 2015.

BOTH, V. **Atmosfera controlada dinâmica monitorada pelo quociente respiratório: Efeito do manejo do etileno, temperatura e níveis de CO₂ sobre compostos voláteis e conservação de maçãs**. 2015. 170 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2015.

BOTH, V. et al. Effects of dynamic controlled atmosphere by respiratory quotient on some quality parameters and volatile profile of ‘Royal Gala’ apple after long-term storage. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 215, p. 483–492, 2017.

BOTH, V. et al. The influence of temperature and 1-MCP on quality attributes of ‘Galaxy’ apples stored in controlled atmosphere and dynamic controlled atmosphere. **Food Packaging and Shelf Life**, [s. l.], v. 16, p. 168–177, 2018.

BRACKMANN, A. et al. Manutenção da qualidade pós-colheita de maçãs ‘Royal Gala’ e ‘Galaxy’ sob armazenamento em atmosfera controlada. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 38, n. 9, p. 2478–2484, 2008.

BRACKMANN, A. et al. Armazenamento em atmosfera controlada de maçãs mutantes da cultivar Gala. **Revista Brasileira de Armazenamento**, [s. l.], v. 34, p. 136–143, 2009.

BRACKMANN, A. et al. Aplicação de 1-metilciclopropeno, estresse inicial com baixo oxigênio e armazenamento em ultrabaixo oxigênio na qualidade de maçã Fuji. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 42, n. 8, p. 1386–1391, 2012.

BRACKMANN, A. et al. Efeito do estresse inicial por baixo O₂ combinado com 1-metilciclopropeno na conservação de maçãs ‘Royal Gala’ armazenadas com ultrabaixo O₂. **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 34, n. 3, 2013.

BRACKMANN, A. et al. Effect of growth regulators on ‘Brookfield’ apple gas diffusion and metabolism under controlled atmosphere storage. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s. l.], v. 49, n. 5, p. 323–329, 2014.

BRACKMANN, A.; WEBER, A.; BOTH, V. CO₂ Partial Pressure for Respiratory Quotient and HarvestWatch™ Dynamic Controlled Atmosphere for ‘Galaxy’ Apples Storage. **Acta Horticulturae**, [s. l.], v. 1079, n. 1079, p. 435–440, 2015.

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

CORRÊA, T. R. et al. Qualidade de maçãs ‘Fuji’ armazenadas em atmosfera controlada e influência do clima na degenerescência da polpa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 531–538, 2010.

DAR, J. A. et al. Peel colour in apple (*Malus × domestica* Borkh.): An economic quality parameter in fruit market. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 244, n. July 2018, p. 50–60, 2019.

DELELE, M. A. et al. Spatial distribution of gas concentrations and RQ in a controlled atmosphere storage container with pear fruit in very low oxygen conditions. **Postharvest Biology and Technology**, [s. l.], v. 156, p. 110903, 2019.

DEUCHANDE, T. et al. Dynamic controlled atmosphere for prevention of internal browning disorders in ‘Rocha’ pear. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 65, p. 725–730, 2016.

DONADEL, J. Z. et al. Key volatile compounds of ‘Fuji Kiku’ apples as affected by the storage conditions and shelf life: Correlation between volatile emission by intact fruit and juice extracted from the fruit. **Food Research International**, [s. l.], v. 125, p. 108625, 2019.

DOS SANTOS, I. D. et al. Patulin accumulation in apples under dynamic controlled atmosphere storage. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 255, p. 275–281, 2018.

EKMAN, J.; GOLDING, J.; MCGLASSON, W. Innovation in cold storage technologies. **Stewart Postharvest Review**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 1–14, 2005.

- ERRAMPALLI, D.; WAINMAN, L. I.; DEELL, J. R. Reduced risk control options for apple postharvest diseases in Long-Term storages. **Acta Horticulturae**, [s. l.], n. 934, p. 313–318, 2012.
- FAN, X.; MATTHEIS, J. P. Impact of 1-Methylcyclopropene and Methyl Jasmonate on Apple Volatile Production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 47, n. 7, p. 2847–2853, 1999.
- FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics. 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#compare>>. Acesso em: 10 fev. 2021.
- GASSER, F. et al. Control of the critical oxygen level during dynamic CA storage of apples by monitoring respiration as well as chlorophyll fluorescence. **Acta Horticulturae**, [s. l.], v. 796, n. 796, p. 69–76, 2008.
- GASSER, F. et al. Dynamic CA storage of apples: Monitoring of the critical oxygen Concentration and adjustment of optimum conditions during oxygen reduction. **Acta Horticulturae**, [s. l.], v. 876, p. 39–46, 2010.
- GOYETTE, B. et al. Hyperbaric Treatment on Respiration Rate and Respiratory Quotient of Tomato. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 5, n. 8, p. 3066–3074, 2012.
- HO, Q. T. et al. Controlled atmosphere storage may lead to local ATP deficiency in apple. **Postharvest Biology and Technology**, [s. l.], v. 78, p. 103–112, 2013.
- JI, Y. et al. Effect of ethanol treatment on the quality and volatiles production of blueberries after harvest. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 99, n. 14, p. 6296–6306, 2019.
- JIN, Y. Z. et al. Ethanol vapor treatment maintains postharvest storage quality and inhibits internal ethylene biosynthesis during storage of oriental sweet melons. **Postharvest Biology and Technology**, [s. l.], v. 86, p. 372–380, 2013.
- JUNG, S. K.; WATKINS, C. B. Involvement of ethylene in browning development of controlled atmosphere-stored ‘Empire’ apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 219–226, 2011.
- KE, D.; RODRIGUEZ-SINOBAS, L.; KADER, A. A. Physiology and Prediction of Fruit Tolerance to Low-oxygen Atmospheres. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, [s. l.], v. 116, n. 2, p. 253–260, 1991.
- KIST, B. B. et al. Anuário brasileiro da maçã 2016. Santa Cruz do Sul, **Editora Gazeta Santa Cruz**, v.56, p. 64, 2016.
- KIST, B. B. Anuário brasileiro da maçã 2019. Santa Cruz do Sul, **Editora Gazeta Santa Cruz**, p. 56, 2019.
- KITTEMANN, D.; MCCORMICK, R.; NEUWALD, D. A. Effect of high temperature and 1-MCP application or dynamic controlled atmosphere on energy savings during apple storage. **European Journal of Horticultural Science**, [s. l.], v. 80, n. 1, p. 33–38, 2015.

KITTEMANN, D.; NEUWALD, D. A.; STREIF, J. Internal browning in ‘Kanzi[®]’ apples - Reasons and possibilities to reduce the disorder. **Acta Horticulturae**, [s. l.], v. 1079, n. 1079, p. 409–414, 2015.

KÖPCKE, D. 1-methylcyclopropene (1-MCP) and dynamic controlled atmosphere (DCA) applications under elevated storage temperatures: Effects on fruit quality of ‘Elstar’, ‘Jonagold’ and ‘Gloster’ apple (*Malus domestica* Borkh.). **European Journal of Horticultural Science**, [s. l.], v. 80, n. 1, p. 25–32, 2015.

KOUSHESH SABA, M.; WATKINS, C. B. Flesh browning development of ‘Empire’ apple during a shelf life period after 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment and controlled atmosphere storage. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 261, p. 108938, 2020.

KRUSE, J.; RENNENBERG, H.; ADAMS, M. A. Steps towards a mechanistic understanding of respiratory temperature responses. **New Phytologist**, [s. l.], v. 189, n. 3, p. 659–677, 2011.

KWEON, H.-J. et al. Fruit maturity, controlled atmosphere delays and storage temperature affect fruit quality and incidence of storage disorders of ‘Fuji’ apples. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 157, p. 60–64, 2013.

LEE, J. et al. Metabolic changes in 1-methylcyclopropene (1-MCP)-treated ‘Empire’ apple fruit during storage. **Metabolomics**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 742–753, 2012.

LELIEVRE, J.-M. et al. Ethylene and fruit ripening. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 101, n. 4, p. 727–739, 1997.

LIU, S. et al. Effects of CO₂ on respiratory metabolism in ripening banana fruit. **Postharvest Biology and Technology**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 27–34, 2004.

LU, X. et al. Effects of repeated 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatments on ripening and superficial scald of ‘Cortland’ and ‘Delicious’ apples. **Postharvest Biology and Technology**, [s. l.], v. 78, p. 48–54, 2013.

LUMPKIN, C. et al. ‘Scarlett Spur Red Delicious’ Apple Volatile Production Accompanying Physiological Disorder Development during Low pO₂ Controlled Atmosphere Storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 62, n. 7, p. 1741–1754, 2014.

LUMPKIN, C. et al. ‘Fuji’ apple (*Malus domestica* Borkh.) volatile production during high pCO₂ controlled atmosphere storage. **Postharvest Biology and Technology**, [s. l.], v. 100, p. 234–243, 2015.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 51, n. 345, p. 659–668, 2000.

MAZZURANA, E. R. et al. Potenciais benefícios do aumento da temperatura de armazenagem em atmosfera controlada de maçãs ‘Gala’ tratadas com 1-MCP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 43–52, 2016.

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

MCCORMICK, R.; NEUWALD, D. A.; STREIF, J. Commercial apple CA storage temperature regimes with 1-MCP (Smartfresh™): Benefits and risks. **Acta Horticulturae**, [s. l.], v. 934, n. 934, p. 263–270, 2012.

NOCK, J. F.; WATKINS, C. B. Repeated treatment of apple fruit with 1-methylcyclopropene (1-MCP) prior to controlled atmosphere storage. **Postharvest Biology and Technology**, [s. l.], v. 79, p. 73–79, 2013.

NUNES, F. R. et al. Ethanol vapor treatment of 'Laetitia' plums stored under modified atmosphere. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s. l.], v. 41, n. 5, 2019.

PATEL, H.; KERNDT, C. C.; BHARDWAJ, A. Physiology, Respiratory Quotient. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30285389>

PRANGE, R. et al. Method and apparatus for monitoring a condition in chlorophyll containing matter, **U.S. Patent, n. WO/2002/006795**, 2007.

PRANGE, R. K. et al. History, current situation and future prospects for dynamic controlled atmosphere (DCA) storage of fruits and vegetables, using chlorophyll fluorescence. **Acta Horticulturae**, [s. l.], n. 1012, p. 905–915, 2013.

PRANGE, R. K. et al. A review on the successful adoption of dynamic controlled-atmosphere (DCA) storage as a replacement for diphenylamine (DPA), the chemical used for control of superficial scald in apples and pears. **Acta Horticulturae**, [s. l.], n. 1071, p. 389–396, 2015.

PRANGE, R. K.; DELONG, J. M.; HARRISON, P. A. Quality management through respiration control: is there a relationship between lowest acceptable respiration, chlorophyll fluorescence and cytoplasmic acidosis? **Acta Horticulturae**, [s. l.], n. 682, p. 823–830, 2005.

SALAS, N. A. et al. Volatile production by 'Golden Delicious' apples is affected by preharvest application of aminoethoxyvinylglycine. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 130, n. 2, p. 436–444, 2011.

SAQUET, A. A.; STREIF, J. Fermentative metabolism in 'Jonagold' apples under controlled atmosphere storage. **European Journal of Horticultural Science**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 43–46, 2008.

SCHMIDT, S. F. P. et al. Volatile compounds and overall quality of 'Braeburn' apples after long-term storage: Interaction of innovative storage technologies and 1-MCP treatment. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 262, p. 109039, 2020.

SEPPÄ, L. et al. Flavour and texture changes in apple cultivars during storage. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 54, n. 2, p. 500–512, 2013.

SISLER, E. C.; SEREK, M. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 100, n. 3, p. 577–582, 1997.

STEFFENS, C. A. et al. Taxa respiratória de frutas de clima temperado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 313–321, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

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

THEWES, F. R. et al. Dynamic controlled atmosphere and ultralow oxygen storage on ‘Gala’ mutants quality maintenance. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 188, p. 62–70, 2015. a.

THEWES, F. R. et al. 1-methylcyclopropene effects on volatile profile and quality of ‘Royal Gala’ apples produced in Southern Brazil and stored in controlled atmosphere. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 45, n. 12, p. 2259–2266, 2015. b.

THEWES, F. R. et al. Dynamic controlled atmosphere and ultralow oxygen storage on ‘Gala’ mutants quality maintenance. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 188, p. 62–70, 2015. c.

THEWES, F. R. **Atmosfera controlada dinâmica monitorada pelo quociente respiratório e sua interação com estádios de maturação sobre a conservação da qualidade e o perfil volátil de maçãs ‘Galaxy’**. 2016. 129 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

THEWES, F. R. et al. Effect of dynamic controlled atmosphere monitored by respiratory quotient and 1-methylcyclopropene on the metabolism and quality of ‘Galaxy’ apple harvested at three maturity stages. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 222, p. 84–93, 2017. a.

THEWES, F. R. et al. Dynamic controlled atmosphere storage suppresses metabolism and enhances volatile concentrations of ‘Galaxy’ apple harvested at three maturity stages. **Postharvest Biology and Technology**, [s. l.], v. 127, p. 1–13, 2017. b.

THEWES, F. R. et al. The different impacts of dynamic controlled atmosphere and controlled atmosphere storage in the quality attributes of ‘Fuji Suprema’ apples. **Postharvest Biology and Technology**, [s. l.], v. 130, p. 7–20, 2017. c.

THEWES, F. R. et al. 1-methylcyclopropene suppresses anaerobic metabolism in apples stored under dynamic controlled atmosphere monitored by respiratory quotient. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 227, p. 288–295, 2018.

THEWES, F. R. et al. Dynamic controlled atmosphere based on carbon dioxide production (DCA – CD): Lower oxygen limit establishment, metabolism and overall quality of apples after long-term storage. **Postharvest Biology and Technology**, [s. l.], v. 168, p. 111285, 2020.

THEWES, F. R., et al. Dynamic controlled atmosphere (DCA) and 1-MCP: Impact on volatile esters synthesis and overall quality of ‘Galaxy’ apples. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 26, p. 100563, 2020.

THEWES, F. R. et al. Ethanol vapor treatment inhibits apple ripening at room temperature even with the presence of ethylene. **Postharvest Biology and Technology**, [s. l.], v. 173, p. 111415, 2021.

TRAN, D. T. et al. Monitoring of extremely low oxygen control atmosphere storage of ‘Greenstar’ apples using chlorophyll fluorescence. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 184, p. 18–22, 2015.

VELTMAN, R.; VERSCHOOR, J.; VAN DUGTEREN, J. H. R. Dynamic control system (DCS) for apples (*Malus domestica* Borkh. cv ‘Elstar’): optimal quality through storage based on product response. **Postharvest Biology and Technology**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 79–86, 2003.

WATKINS, C. B. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 389–409, 2006.

WEBER, A. et al. ‘Royal Gala’ apple quality stored under ultralow oxygen concentration and low temperature conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s. l.], v. 46, n. 12, p. 1597–1602, 2011.

WEBER, A. et al. Maçãs ‘Gala’, ‘Royal Gala’ e ‘Brookfield’ armazenadas em ultra baixo oxigênio e duas temperaturas. **Bioscience Journal**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 1887–1895, 2013. a.

WEBER, A. et al. Atmosfera controlada para o armazenamento da maçã “Maxi Gala”. **Revista Ciência Agronômica**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 294–301, 2013. b.

WEBER, A. et al. Respiratory quotient: Innovative method for monitoring ‘Royal Gala’ apple storage in a dynamic controlled atmosphere. **Scientia Agricola**, [s. l.], v. 72, n. 1, p. 28–33, 2015.

WEBER, A. et al. Ethanol reduces ripening of ‘Royal Gala’ apples stored in controlled atmosphere. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 88, n. 1, p. 403–410, 2016.

WEBER, A. et al. Dynamic controlled atmosphere (DCA): interaction between DCA methods and 1-methylcyclopropene on ‘Fuji Suprema’ apple quality. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 235, p. 136–144, 2017.

WEBER, A. et al. Dynamic controlled atmosphere: Impact of elevated storage temperature on anaerobic metabolism and quality of ‘Nicoter’ apples. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 298, p. 125017, 2019.

WEBER, A. et al. Influence of respiratory quotient dynamic controlled atmosphere (DCA – RQ) and ethanol application on softening of Braeburn apples. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 303, p. 125346, 2020.

WRIGHT, A. H. et al. The interrelationship between the lower oxygen limit, chlorophyll fluorescence and the xanthophyll cycle in plants. **Photosynthesis Research**, [s. l.], v. 107, n. 3, p. 223–235, 2011.

WRIGHT, A. H. et al. Dynamic controlled atmosphere (DCA): Does fluorescence reflect physiology in storage?. **Postharvest Biology and Technology**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. 19–30, 2012.

WRIGHT, A. H. et al. The trend toward lower oxygen levels during apple (*Malus×domestica* Borkh) storage. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 90, n. 1, p. 1–13, 2015.

WRIGHT, H. et al. The effect of temperature and other factors on chlorophyll a fluorescence and the lower oxygen limit in apples (*Malus domestica*). **Postharvest Biology and Technology**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 21–28, 2010.

YANG, S. F.; HOFFMAN, N. E. Ethylene Biosynthesis and its Regulation in Higher Plants. **Annual Review of Plant Physiology**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 155–189, 1984.

YANG, X. et al. Ethylene and 1-MCP regulate major volatile biosynthetic pathways in apple fruit. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 194, p. 325–336, 2016.

ZANELLA, A. et al. Fruit fluorescence response to low oxygen stress: Modern storage technologies compared to 1-MCP treatment of apple. **Acta Horticulturae**, [s. l.], n. 682, p. 1535–1542, 2005.

ZANELLA, A.; ROSSI, O. Post-harvest retention of apple fruit firmness by 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment or dynamic CA storage with chlorophyll fluorescence (DCA-CF). **European Journal of Horticultural Science**, [s. l.], v. 80, n. 1, p. 11–17, 2015.