



UFSM

Tese de Doutorado

**MÉTODOS E ATRIBUTOS FÍSICO-QUÍMICOS PARA PREVISÃO DA
DEGENERESCÊNCIA DA POLPA EM MAÇÃS ARMAZENADAS EM
ATMOSFERA CONTROLADA**

Daniel Alexandre Neuwald

PPGA

Santa Maria, RS, Brasil.

2008

**MÉTODOS E ATRIBUTOS FÍSICO-QUÍMICOS PARA PREVISÃO DA
DEGENERESCÊNCIA DA POLPA EM MAÇÃS ARMAZENADAS EM
ATMOSFERA CONTROLADA**

por

Daniel Alexandre Neuwald

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

PPGA

Santa Maria, RS, Brasil.

2008

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

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

**MÉTODOS E ATRIBUTOS FÍSICO-QUÍMICOS PARA PREVISÃO DA
DEGENERESCÊNCIA DA POLPA EM MAÇÃS ARMAZENADAS EM
ATMOSFERA CONTROLADA**

elaborada por
Daniel Alexandre Neuwald

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Agronomia

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Prof. Dr. Adriano Arriel Saquet (CEFET-SVS)
(Co-orientador)

Prof. Dr. Cristiano André Steffens (UDESC)

Prof. Dra. Zaida Ines Antonioli (UFSM)

Prof. Dr. Arno Bernardo Heldwein (UFSM)

Santa Maria, 28 de fevereiro de 2008.

Neuwald, Daniel Alexandre, 1978-

N498d

Métodos e atributos físico-químicos para previsão da degenerescência da polpa em maçãs armazenadas em atmosfera controlada / por Daniel Alexandre Neuwald ; orientador Auri Brackmann . - Santa Maria, 2008.

66 f. ; il.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, RS, 2008.

1. Agronomia 2. Qualidade de frutos 3. Pós-colheita 4. Distúrbios fisiológicos 5. Maçã I. Brackmann, Auri, orient. II. Título

CDU: 664.85

Ficha catalográfica elaborada por
Luiz Marchiotti Fernandes - CRB 10/1160
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

© 2008

Todos os direitos autorais reservados a Daniel Alexandre Neuwald. A reprodução de parte ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrita do autor.

Endereço: Rua Silva Jardim, n. 1416, Bairro Centro, Carazinho, RS, 99500-000 Fone 0xx54 3329 2832;; End Eletr: daneuwald@yahoo.com.br

DEDICATÓRIA

Dedico
à minha mãe
Marlene,
por todos ensinamentos, educação e carinho
aos meus irmãos
Dimar e Diogo
e meu afilhado
Diogo Fábio Neuwald Junior
Vocês que sempre me deram força
para seguir em busca de meus sonhos,
meu muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Muitas são as pessoas a quem devo os meus sinceros agradecimentos, por colaborarem de alguma forma na minha formação, mas algumas em especiais, eu não poderia deixar de agradecer e de mencionar seus nomes.

A Deus, pois a fé e força superior me foram fundamentais.

Aos meus familiares: minha mãe que partiu no decorrer do meu doutorado, mas que deixou seus ensinamentos, para que eu possa continuar a minha vida com decência e dignidade. Meus irmãos, afilhado e a Francine que me deram o carinho e compreensão quando mais precisei.

Ao meu orientador Prof. Dr. Auri Brackmann e, desta forma, estendo também para os professores da Universidade Federal de Santa Maria, e do Programa de Pós-graduação em Agronomia pela oportunidade da realização de minha formação até o doutoramento.

De forma especial agradeço ao Dr. Josef Streif e Prof. Dr. Adriano Arriel Saquet, que além de orientadores proporcionaram-me lições de vida em nossa convivência e isso será, muito importante no decorrer da minha atuação profissional.

A todos os amigos do Kompetenzzentrum Obstbau Bodensee pelo aprendizado e amizade.

A Frau Keller que foi meu anjo da guarda, não deixando que desistisse no meio do caminho. Talita Marino Vieira pela amizade e a todos que contribuíram com motivação e carinho como Volkshochschule e Gemeinsam Chor Taldorf, também não poderia deixar de agradecer ao Berasilien Zentrum.

Aos colegas e amigos do NPP em especial ao Ivan, Ricardo, Claudia, Cristiano, Mauricio, Joel, Marcelo, Josuel, Ana Cristina, Vanderlei, Elizandra que nunca mediram esforços na realização dos trabalhos.

Ao Beto e a Professora Neila pelas correções na versão entregue para banca.

Aos professores membros da banca examinadora, aos quais acreditei que poderiam contribuir na melhoria da minha tese, pela competência e pelo exemplo de pessoas que foram no decorrer de minha formação.

Ao povo brasileiro que representados pela FAPERGS, CNPq, CAPES foram as instituições que me proporcionaram chegar até aqui com fomento de bolsas de estudo.

A Professora Carla Rheinheimer pela revisão da versão definitiva da minha tese e por estar se tornando à pessoa especial em minha vida.

Enfim, agradeço a todos, que de alguma forma estiveram presentes e participaram na minha formação, compartilhando momentos alegres, outros nem tanto, às vezes, até mesmo de medo, mas que sempre foi um aprendizado.

RESUMO

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

MÉTODOS E ATRIBUTOS FÍSICO-QUÍMICOS PARA PREVISÃO DA DEGENERESCÊNCIA DA POLPA EM MAÇÃS ARMAZENADAS EM ATMOSFERA CONTROLADA

Autor: Daniel Alexandre Neuwald
Orientador: Auri Brackmann
Santa Maria, 28 de fevereiro de 2008.

O objetivo deste trabalho foi correlacionar à degenerescência da polpa das maçãs ‘Gala’, ‘Royal Gala’, ‘Fuji’ e ‘Braeburn’ após o armazenamento em atmosfera controlada (AC). O estudo foi realizado através da correlação com métodos preditivos e com atributos de qualidade e maturação dos frutos com a incidência real de degenerescência da polpa após o armazenamento em AC. Foram realizados experimentos com frutos de diferentes pomares, sendo executado em 2004 o primeiro experimento com a cultivar Fuji. Em 2005, os experimentos foram realizados com as cvs. Gala, Royal Gala, Fuji e Braeburn, avaliando frutos de 11 pomares em duas épocas de colheita. Os experimentos destes dois primeiros anos foram realizados no Núcleo de Pesquisa em Pós-colheitas da UFSM com frutos provenientes de pomares de Vacaria, RS. No período de 2006 e 2007 foram desenvolvidos experimentos em Ravensburg, na Alemanha, com a cv. Braeburn de sete pomares. Para isso, foram correlacionados a ocorrência de degenerescência da polpa após o armazenamento de seis meses em AC, com os testes preditivos e com atributos físico-químicos dos frutos analisados em duas épocas de colheita. Os testes preditivos avaliados foram: infiltração de Mg, aceleração da maturação com Ethephon e indução de estresse pelo alto CO₂. Avaliou-se no experimento de 2006/2007 a possibilidade de detectar o estresse no fruto causado por diferentes concentrações de CO₂ através da fluorescência de clorofila. Conforme os resultados, no ano de 2004 com a cv. Fuji, a percentagem de suco dos frutos foi capaz de prever a degenerescência da polpa, porém somente na condição de armazenamento de 2,0kPa CO₂, enquanto que os SST previu a ocorrência dessa desordem somente em frutos armazenados com baixo CO₂ (<0,5kPa). A fluorescência de clorofila foi capaz de detectar após colheita o estresse causado por pressões parciais de CO₂ nos frutos armazenados. Com essa metodologia foi possível prever a ocorrência de degenerescência, somente quando se realizou a colheita precocemente e com atraso na instalação da AC. A análise nutricional dos frutos, destacando o nível de K, foi o atributo que melhor previu a ocorrência de degenerescência da polpa durante o armazenamento em AC na cv. Braeburn. Alguns métodos preditivos e atributos avaliados na colheita foram capazes de prever a incidência de degenerescência da polpa nos frutos armazenados numa determinada condição de AC, porém em outra condição de armazenamento não se confirmou essa correlação. Isso significa que estes testes e atributos de qualidade não apresentam alta correlação com a ocorrência da degenerescência em maçãs armazenadas em qualquer situação.

Palavras-chaves: distúrbios fisiológicos, pós-colheita, qualidade de frutos.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Graduate Program in Agronomy
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

METHODS AND FRUIT QUALITY AND RIPENING PARAMETERS FOR PREDICTION OF FLESH BROWNING IN APPLES UNDER CONTROLLED ATMOSPHERE STORAGE

Author: Daniel Alexandre Neuwald
Adviser: Auri Brackmann
Santa Maria, February 28th, 2008.

The objectives of this work was to estimate the potential of flesh browning development in 'Gala', 'Royal Gala', 'Fuji' e 'Braeburn' apples after controlled atmosphere storage (CA). This study was realized through correlation of predictive methods and fruit quality and ripening parameters with the flesh browning occurrence after CA storage. Experiments were carried out with fruits from different orchards and years. In 2004, a first experiment was carried out with 'Fuji' apples from three orchards. In 2005, 'Gala', 'Royal Gala', 'Fuji' and 'Braeburn' apples were evaluated from 11 orchards using two picking dates. Theses experiments were carried out at the "Núcleo de Pesquisa em Pós-colheita" of Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil with fruits from Vacaria, RS, Brazil. In 2006 to 2007 experiments were carried out in Germany using 'Braeburn' apples from seven orchards. These methods the disorder occurrence after six months CA storage was correlated with the predictive methods, and with quality and ripening parameters. The predictive methods evaluated were: Mg infiltration, maturity acceleration with ethephon, and stress induction with high CO₂. It was also evaluated the capacity of chlorophyll-fluorescence to detect possible stress occurrence on fruits exposed to high CO₂ concentrations. Results show that in 'Fuji' fruit juice percentage were able to predict flesh browning, but only in high CO₂ (2.0 kPa) CA condition, while TSS level has been able to predict the occurrence of this disorder in fruits stored in low CO₂ (<0.5 kPa). The chlorophyll fluorescence was capable of detect stress in fruits caused by exposure to high CO₂ at harvest, and with this method it could be predicted the occurrence of physiological disorders in early harvested and with delay CA storage. By nutritional analysis of fruits, the level of K show high correlation with the occurrence of flesh browning after the CA storage of 'Braeburn' apple. Some predictive methods and quality parameters evaluated at harvest were able to predict flesh browning occurrence in apple stored, in certain storage conditions, but in other storage conditions there wasn't significant correlation between flesh browning and this predictive methods and quality parameters. These predictive methods and quality parameters do not show high correlation with flesh browning in all situations.

Key-words: physiological disorders, postharvest, fruit quality.

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	micro litro
ηL	nano litro
$^{\circ}\text{Brix}$	graus Brix
1-MCP	1-metil ciclopropeno
AC (CA)	atmosfera controlada (controlled atmosphere)
ACD (DCA)	atmosfera controlada dinâmica (dynamic controlled atmosphere)
BBD	degenerescência da polpa da 'Braeburn' ('Braeburn' browning disorder)
Ca	cálcio
CO_2	dióxido de carbono
Fm	fluorescência máxima (maximal fluorescence)
Fo	fluorescência mínima (minimal fluorescence)
$Fv/Fm = (Fm-Fo)/Fm$	rendimento quântico (quantum yield)
g	grama
h	hora
K	potássio
kg	quilograma
KOB	Kompetenzzentrum Obstbau Bodensee (instituto de pesquisa alemão)
kPa	quilo Pascal
L	litro
M	Molar
Mg	magnésio
ml	mililitro
mm	milímetro
N	Newton (unidade de firmeza de polpa)
N	Normal (concentração de solução química)
NIR	Near infrared
NPP	Núcleo de Pesquisa em Pós-colheita
O_2	oxigênio
P	fósforo
pH	potencial de hidrogênio
SCD(DCS)	sistema de controle dinâmico (dynamic controlled system)
SST (TSS)	sólidos solúveis totais (total soluble solid)
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria
UR	umidade relativa do ar

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
INTRODUÇÃO.....	1
1. REVISÃO DA LITERATURA	4
1.1. Armazenamento de maçãs e perdas.....	4
1.2. Caracterização de degenerescência da polpa.....	4
1.3. Causas da degenerescência da polpa.....	5
1.4. Métodos de previsão de ocorrência de degenerescência da polpa.....	11
CAPÍTULO 2	18
Previsão de degenerescência da polpa em maçã ‘Fuji’ armazenadas em atmosfera controlada	18
2.1. Introdução	19
2.2. Material e métodos	21
2.3. Resultados e discussão.....	22
2.4. Conclusões	25
2.5. Recomendação para pesquisas futuras.....	26
2.6. Agradecimentos.....	26
CAPÍTULO 3	27
Previsão de degenerescência da polpa em maçãs ‘Gala’, Royal Gala’, ‘Fuji’ e ‘Braeburn’ após o armazenamento em atmosfera controlada.....	27
3.1. Introdução	28
3.2. Material e métodos	30
3.3. Resultados e discussão.....	34
3.4. Conclusões	38
3.5. Recomendação para pesquisas futuras.....	39
3.6. Agradecimentos.....	39

CAPÍTULO 4	41
The chlorophyll fluorescence behaviour of ‘Braeburn’ apples under different CO ₂ stress treatments at-harvest	41
4.1. Introduction	41
4.2. Material and methods	42
4.3. Results and discussion	43
4.4. Acknowledgments	45
CAPÍTULO 5	46
Possible prediction of physiological storage disorders in ‘Braeburn’ apples comparing fruit of different orchards.....	46
5.1. Introduction	47
5.2. Material and methods	48
5.3. Results and discussion	49
5.5. Acknowledgments	50
CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
BIBLIOGRAFIA	55

INTRODUÇÃO

Desde o início da civilização, percebe-se que uma das preocupações da humanidade é na forma de armazenamento do seu próprio alimento. Durante a evolução da história, com um conhecimento empírico, o homem foi desenvolvendo diferentes formas de armazenar seus alimentos, e após anos, muitos desses conhecimentos foram se comprovando cientificamente. Por exemplo, alguns povos verificavam que vegetais armazenados em ambientes com menor temperatura se conservavam por um maior período de tempo, sendo que a refrigeração é a principal forma de se manter a qualidade de um produto vegetal durante o seu armazenamento.

Também se pode salientar que a interdisciplinaridade dos conhecimentos é primordial tanto para a ciência como para o desenvolvimento de pesquisas, como por exemplo, o emprego da matemática, química, física e de muitas outras ciências que permitem o avanço dos métodos de armazenamento. Nesse contexto, pode-se, citar uma importante descoberta realizada pela ciência na forma de armazenamento de alimentos, fato relatado pela primeira vez por volta de 1916, à atmosfera controlada (AC).

O emprego comercial, porém foi viabilizado algumas décadas depois. Essa forma de armazenamento visa reduzir o metabolismo do fruto, alterando as concentrações dos gases nas câmaras frigoríficas, baixando a pressão parcial de O_2 e aumentando CO_2 . Desta forma, reduz a respiração dos frutos e conseqüentemente mantém a qualidade dos frutos por maior tempo.

Um aperfeiçoamento da utilização da AC foi entre 1970 a 1990 quando se começou a estudar a eliminação do etileno do ambiente de armazenamento. Esse fito-hormônio induz o amadurecimento e senescência dos frutos. No final da década de 1990 começou o uso do 1-MCP, bloqueador da ação do etileno, o qual se liga aos receptores e impede que sejam ativados alguns genes que estimulam o amadurecimento dos frutos.

Nos últimos cinco anos, foi introduzido o emprego da AC acompanhada por sensores que permitem avaliar o nível metabólico em que se encontram os frutos, podendo os sensores serem para etanol, sendo denominado na literatura de DCS ('Dynamic Control System' = sistema de controle dinâmico). Para manutenção da qualidade dos frutos armazenados, faz-se necessário que as concentrações de gases (O_2 e/ou CO_2) fiquem próximas à compensação da respiração.

Quando a concentração de oxigênio baixar aos níveis críticos, o fruto busca na respiração anaeróbica o suprimento de energia necessária para a manutenção celular, e desta

forma, estimula a produção de etanol. Outra forma, de se avaliar o estresse nos frutos causados por níveis críticos das concentrações de gases da AC é através de sensores de fluorescência de clorofila, os quais permitem indiretamente avaliar o nível metabólico em que se encontram os frutos, método conhecido como DCA ('Dynamic Controlled Atmosphere' = atmosfera controlada dinâmica).

Existem inúmeros fatores que podem interagir, e que são responsáveis pela boa qualidade do fruto no final do armazenamento, sendo alguns de pré-colheita, como a sanidade do pomar, a nutrição mineral, a condição climática em que os frutos são produzidos, as cultivares, entre outros. Também há os fatores pós-colheita, como a temperatura, a umidade relativa do ar e as concentrações de gases da AC. No entanto, algumas vezes a qualidade externa dos frutos, e mesmo os atributos físico-químicos, apresentam-se satisfatórios, porém podem ocorrer alguns distúrbios fisiológicos, durante o armazenamento que prejudica a sua comercialização.

Dentre os distúrbios, destaca-se a degenerescência da polpa, que se caracteriza pelo escurecimento dos tecidos da polpa dos frutos, onde a possibilidade de ser detectado se dá somente no momento do consumo. Como é um sintoma interno, até o momento não existe uma forma de detectar o distúrbio na seleção e na classificação das maçãs. Diferentes métodos estão sendo desenvolvidos para tal finalidade, como o NIR ("Near infrared"), análise de ressonância magnética e acústica, entre outras formas não destrutivas, que poderão auxiliar na detecção do distúrbio na classificação dos frutos.

Considerando as condições que se tem hoje à disposição, pode-se minimizar a perda de qualidade que ocorre durante o armazenamento, através do desenvolvimento de métodos que possam classificar os frutos por sua suscetibilidade à degenerescência da polpa. Desta forma, os frutos suscetíveis a essa desordem fisiológica seriam direcionados para uma comercialização imediata e os que possuem menor suscetibilidade seriam direcionados ao armazenamento prolongado. Apesar dos avanços nos métodos não destrutivos, a utilização de métodos predictivos que avaliam a susceptibilidade deste distúrbio nos frutos, poderá auxiliar ainda mais no controle de perdas após o seu armazenamento.

As cultivares Gala, Royal Gala e Fuji possuem ótima aceitação pelos consumidores, além de serem as cultivares que perfazem em torno de 95% da produção brasileira. A degenerescência pode ocorrer em maior ou menor intensidade dependendo do ano e o cultivar de maçã. A cultivar Braeburn é a mais susceptível à degenerescência, quando procedente de climas frios como Alemanha, já nas condições do Brasil a 'Fuji' é a mais susceptível a essa desordem fisiológica, mesmo utilizando às condições ideais de armazenamento. A cultivar

Braeburn, apesar de não ter grande área de plantio no Brasil, possui destaque no cenário internacional pela suas características de firmeza de polpa, relação entre ácidos e açúcares, viabilizando, desta forma, a sua exportação.

Os objetivos desse trabalho foram correlacionar o desenvolvimento da degenerescência da polpa nas maçãs 'Gala', 'Royal Gala', 'Fuji' e 'Braeburn' após o seu armazenamento em AC, através de métodos predictivos para a ocorrência desse distúrbio e verificar a existência de correlação entre os atributos de qualidade e maturação dos frutos com a ocorrência de degenerescência da polpa após o armazenamento em AC.

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Armazenamento de maçãs e perdas

A atmosfera controlada (AC) traz inúmeros benefícios para a conservação de maçã ‘Gala’, ‘Fuji’ e ‘Braeburn’, permitindo um maior período de armazenamento, podendo ser superior a seis meses. A redução da pressão parcial de O₂ e aumento da pressão parcial de CO₂ retardam a senescência e mantêm a qualidade dos frutos (Volz et al., 1998). No armazenamento da maçã ‘Gala’ o uso da AC, associado à eliminação do etileno das câmaras durante o armazenamento, permite manter a qualidade dos frutos por um período ainda maior, chegando até nove meses (Brackmann et al., 2000 e 2003).

No entanto, mesmo com os avanços nos métodos de armazenamento, ainda ocorrem perdas pós-colheita, como a redução da firmeza de polpa, a perda de acidez, além da ocorrência de podridões e desordens fisiológicas. Uma das desordens fisiológicas mais frequentes em maçã é a degenerescência da polpa (Brackmann et al., 2001b). Essa desordem fisiológica pode atingir até 20% dos frutos armazenados caracterizando perda de qualidade, mesmo quando armazenados em condições ideais de AC (Brackmann et al., 1998; Ceretta, 2003).

Sendo a cv. Fuji a mais susceptível a esse distúrbio das maçãs produzidas no Brasil, a qual não tolera armazenamento sob pressões parciais de CO₂ acima de 0,5kPa (Brackmann et al., 2000; Brackmann et al., 2001; Brackmann et al., 2001b; Ceretta, 2003). Já a ‘Braeburn’ produzida no Brasil, ou em países de temperaturas mais altas tolera armazenamento com até 2,5kPa de CO₂, mas em locais frios como Alemanha chega a ser mais susceptível a degenerescência da polpa que a ‘Fuji’ (Streif, 2002; Ceretta, 2003).

1.2. Caracterização de degenerescência da polpa

Nas maçãs ‘Fuji’ e ‘Braeburn’ a degenerescência da polpa caracteriza-se por um escurecimento de coloração marrom intensa, que pode afetar a polpa do fruto e o miolo, podendo evoluir para a formação de cavernas (Medeiros, 1999). Já, nas cultivares Gala e Royal Gala ocorre principalmente a degenerescência senescente, onde o fruto apresenta uma

textura farinhenta, e geralmente, associada à perda de firmeza. Na ‘Gala’ essa desordem fisiológica ocorre com coloração menos intensa, do que nas maçãs ‘Fuji’ e ‘Braeburn’, porém em todas as cultivares esses distúrbios ocorrem durante o armazenamento (Saquet, 1997).

1.3. Causas da degenerescência da polpa

A sensibilidade das cultivares a degenerescência depende principalmente das pressões parcial de O₂ e CO₂ durante o armazenamento em atmosfera controlada. Entretanto, para maçã o uso de CO₂ elevado consiste em um alto risco de dano, quando comparado com outros tipos de frutos. Recomendações de pressões parciais de CO₂ geralmente não excedem a 5kPa (Kupferman, 1997), porém maçãs ‘Gala’, ‘Royal Gala’, ‘Fuji’ e ‘Braeburn’ apresentam distúrbios internos durante armazenamento em AC numa atmosfera com esta pressão parcial de CO₂ (Ceretta, 2003).

No Brasil, as recomendações da pressão parcial de O₂ são de 1 a 2kPa para diversas cultivares de maçãs e de CO₂ para ‘Gala’ e ‘Braeburn’ é de 2 a 3kPa (Brackmann et al., 1999; Brackmann et al., 2000, Brackmann et al., 2001; Brackmann et al., 2001b, Brackmann et al., 2003). A maçã ‘Braeburn’ produzida em locais frios, como na Alemanha, deve ser armazenada em baixo CO₂ (Streif, 2002), assim como a maçã ‘Fuji’ produzida no Brasil para evitar a degenerescência interna (Brackmann et al., 2001b).

O sintoma de escurecimento e, inclusive com a formação de cavernas na polpa, ocorre nos frutos armazenados em AC, sendo que, somente em casos muito severos, os sintomas são visíveis no exterior do fruto (Streif et al., 2001). Esse distúrbio ocorre de forma casualizada de ano para ano, sendo influenciado por diversos fatores da pré e pós-colheita (Lau, 1997; Curry, 1998).

Volz et al. (1998) afirmam que maçãs ‘Fuji’ produzidas na Califórnia são muito sensíveis ao CO₂ usado durante a sua conservação. No Brasil, também se observa que a mesma fruta, é uma cultivar que não tolera a presença deste gás, mesmo em condição de armazenamento refrigerado (AR). Nesse caso, conforme se mencionou, é necessário colocar grandes quantidades de cal hidratada no interior da câmara de AC para absorver o CO₂ produzido no processo respiratório (Brackmann & Chitarra 1998). Em condições de AC, diversos trabalhos demonstraram que a presença de CO₂, mesmo em concentrações baixas, é prejudicial.

Brackmann et al. (1998) constataram que 11,7% de degenerescência interna em maçãs ‘Fuji’ armazenada por oito meses sob 1,5kPa de O₂ e 0,5kPa de CO₂ e temperatura de 0,5°C.

A ocorrência de degenerescência tem sido observada mesmo quando os frutos foram armazenados sob pressões parciais muito baixas como 0,4kPa de CO₂ (Grant et al., 1996). Esta sensibilidade da 'Fuji' ao CO₂ tem sido maior quando armazenada logo após a colheita comparada com frutos com atraso na instalação da AC (Watkins et al., 1997). Ceretta et al. (2002) verificaram que frutos dessa cultivar têm diferente permeabilidade ao CO₂ em função da região climática que são produzidas e também da condição nutricional do pomar. Algumas cultivares de maçã podem apresentar variação na tolerância as pressões parciais de dióxido de carbono (Monning, 1983).

Os frutos afetados pelo excesso de CO₂ normalmente apresentam um aspecto externo normal e somente quando cortados apresentam regiões da polpa marrons, as quais podem estar distribuídas ao acaso ou podem formar uma zona escurecida entre o miolo e a casca. Uma vez iniciado este processo, a ocorrência pode aumentar rapidamente. Inicialmente o tecido afetado é firme e úmido, mas após algumas semanas de armazenamento torna-se seco e esponjoso formando pequenas cavidades na polpa, decorrente da morte de células por desidratação (Argenta et al., 1994; Brackmann & Saquet, 1995). O distúrbio não progride após o abaixamento das altas pressões parciais de CO₂, sendo a causa primária uma excessiva concentração deste gás no interior do fruto (Luchi & Luchi, 2001).

A ocorrência do dano, pelo acúmulo de CO₂ durante o armazenamento é atribuída ao aumento de ácido succínico, devido à inibição da enzima succinato desidrogenase (Frenkel & Petterson, 1973; Mooning, 1983). No entanto, alguns autores têm atribuído que tais danos são provocados por mecanismos que inibem a respiração, causando mudanças no metabolismo energético (Saquet et al., 2001).

A hipótese sugerida por Saquet et al. (2000 e 2001) é que o ATP deve estar envolvido no desenvolvimento de distúrbios fisiológicos internos. Isto porque a alta concentração de ATP e a baixa concentração de ADP nos frutos, com atraso da instalação da AC, tiveram como resultado a elevada respiração, promovendo um estresse no metabolismo energético no início do armazenamento. Assim, o alto CO₂, associado ou não com o baixo O₂, diminui a taxa respiratória, o que reduz a síntese de ATP e aumentando os produtos da respiração anaeróbica ou fermentação como etanol e acetaldeído (Saquet et al., 2000).

Provavelmente, a síntese de ATP torna-se baixa para a sustentação do metabolismo básico para a manutenção e função das membranas no início do armazenamento (Saquet et al., 2001). Indiretamente, este aumento de compostos, oriundos da fermentação, pode aumentar a permeabilidade da membrana mitocondrial, reduzindo ainda mais a produção de ATP. Assim,

os danos nas membranas, que são induzidas pela falta de ATP, apresentam correlação com o vazamento de íons na célula (Saquet et al., 2000).

Tais produtos da respiração anaeróbica, provavelmente, aumentam a permeabilidade da membrana do vacúolo, conduzindo ao extravasamento de íons, prótons, ácidos e fenóis para o citosol, provocando o escurecimento do tecido por oxidação, devido à reduzida síntese de ATP. Indiretamente os fenóis estão envolvidos no apoptose pelo aumento de ácido salicílico que inibe a catalase. Uma vez a catalase inibida não ocorre a destoxificação do peróxido de hidrogênio, que em níveis altos induz a resposta da hipersensibilidade e conseqüentemente morte celular (Cassells & Doyle, 2003; Mittler et al., 2004).

Este fato ocorre com o ataque de fungos ou outros agentes que causam estresse. Porém, Saquet et al. (2001) sugerem que novas investigações devem ser realizadas para se obter melhor entendimento do metabolismo dos ácidos graxos relacionados ao metabolismo energético em frutos mantidos em AC. Novas publicações feitas por Franck et al. (2007) e Streif (2008) concordam com a hipótese de Saquet et al. (2000 e 2001) para o surgimento do escurecimento da polpa.

O mecanismo de como o elevado CO₂ e baixos níveis de O₂ causam danos às células dos frutos ainda não está bem elucidado para a maçã (Volz et al., 1998; Xuan, 2003; Streif, 2008). Acredita-se que o estresse, induzido pelo baixo O₂ e alto CO₂, provoca a respiração anaeróbica, que aumenta o conteúdo de etanol, acetaldeído e outros produtos, inclusive a formação de radicais livres, o que afeta o metabolismo energético (Lidster, 1990; Saquet et al., 2000; Saquet, et al., 2001; Franck et al., 2007; Streif, 2008) e danifica as membranas das células dos frutos.

Essas, normalmente, são reparadas e protegidas por um sistema celular anti-oxidante, que inclui diversas enzimas como: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutaciona peroxidase (GPX), preoxidases, tioredoxina peroxidase, glutaciona redutase (GR), α -tocoferol, carotenóides oxidase alternativa (AOX), tendo grande importância no ciclo da vitamina C – glutamina ‘glutathione’, que restauram as membranas (Mittler, 2002; Mittler et al., 2004).

Com uma condição de estresse oxidativo ocorre o dano nas membranas e, dessa forma, aumenta a sua permeabilidade. Substâncias fenólicas, entre outras, que geralmente estão compartimentalizadas no vacúolo, com a perda da seletividade das membranas, podem migrar para o citosol onde são oxidadas por enzimas. Essa é uma hipótese da formação da coloração escurecida no tecido de peras, que possivelmente pode ser válida também para a degenerescência da polpa em maçãs (Saquet, 2001b; Franck et al., 2007).

O espaço intercelular da polpa de maçãs normalmente apresenta pressões parciais mais elevadas de CO₂ que o ar circundante (Bender, 1986). No caso, a degenerescência, provocada pelo acúmulo de CO₂ ou pela falta de O₂, pode ser devido à dificuldade de difusão destes gases na polpa do fruto (Watkins et al., 1997), gerando camadas com gradientes de pressões parciais de CO₂, os quais são maiores no interior do fruto e menores nas camadas mais próximas à epiderme, sendo observada uma relação inversa para o O₂.

Um aumento das concentrações de CO₂ exógeno pode conduzir a um acúmulo ainda maior na polpa, levando a um aumento na extensão dos danos (Watkins et al., 1997). Por outro lado, esse dano pode ocorrer pela redução nas concentrações de O₂ exógeno, pois estas proporcionam uma condição de níveis extremamente baixos desse gás nas células do interior dos frutos (Rabus, 2002; Franck et al., 2007; Streif, 2008). Diversos fatores podem influenciar na difusão do O₂ e CO₂ no tecido do fruto como o clima, tamanho do fruto, presença do distúrbio fisiológico como o pingo-de-mel, variedade e época de colheita (Gran & Beaudry, 1993; Park et al., 1993; Zhang & Bunn, 2000; Ceretta et al., 2002).

A ‘Fuji’ apresenta menor volume de espaço intercelular que a ‘Gala’, o que pode estar relacionado com a dificuldade de difusão do CO₂ na polpa desta cultivar. Isso também ocorre nas cvs. Delicious e Braeburn, que também são sensíveis a este gás (Rajapakse et al., 1990; Blanpied & Jozwiak 1993; Kupferman, 1997). A água que está no espaço entre as células reduz a permeabilidade aos gases, assim em maçãs ‘Fuji’ e ‘Braeburn’ as quais são bastante suculentas e apresentam alta densidade, uma das alternativas para reduzir a incidência do distúrbio seria forçar a perda de água nos frutos, de tal forma que a qualidade não fosse comprometida (Brackmann et al., 2008).

Esses mesmos autores afirmam que se aumenta a transpiração dos frutos baixando a umidade relativa, aumentando a temperatura e velocidade de circulação de ar na câmara frigorífica, desta forma, os frutos perdem água, conseqüentemente aumentam a permeabilidade da polpa aos gases. O rápido estabelecimento da AC aliado à diminuição da temperatura suprime, em muito, a transpiração em maçã, porém pode induzir a manifestação de degenerescência da polpa (Saquet et al., 2003).

A sensibilidade de cultivares de maçãs ao baixo O₂ e alto CO₂ tem relação com o volume de ar no tecido da polpa, ou seja, está correlacionada ao espaço intercelular dos frutos que regula as trocas gasosas (Baumann & Henze, 1983). O volume entre as células determina continuamente a resistência ao movimento interno de gases (Calbo & Sommer, 1987). Maçãs com muito pouco espaço intercelular, como a ‘Fuji’ e ‘Braeburn’, têm maior sensibilidade ao baixo O₂ e alto CO₂, em relação à maçã ‘Gala’, por exemplo. Já, cultivares com maior espaço

intercelular, no córtex, são as que melhor se adaptam ao armazenamento (Ruess & Stösser, 1993).

O alto CO₂ tem mostrado ser mais prejudicial no início do que no final do período de armazenamento (Brackmann et al., 1999). Isto pode estar relacionado com a suculência, como já mencionado anteriormente, pois no início do armazenamento dos frutos, os mesmos contêm mais água, o que manteria as células mais túrgidas e, portanto menor espaço intercelular, dificultando, assim a difusão do CO₂. Watkins et al. (1997) e Saquet et al. (2001) relatam que quando se procede à instalação rápida da AC surgem posteriormente maiores danos nos frutos.

No final do armazenamento, a perda de água já é maior, o que facilita a difusão do CO₂ e, conseqüentemente, menor sensibilidade do tecido. Essa difusão ocorre devido à respiração nas células, consumindo O₂ e produzindo CO₂, desta forma, reduz as concentrações de O₂ e aumenta de CO₂ no interior do fruto e, por diferença de concentração, o O₂ tende a permear para o interior do fruto e o CO₂ produzido migrará na polpa do fruto em direção ao exterior.

Brackmann et al. (1999) verificaram que a diminuição da UR de 97% para 75% propiciou menor incidência de degenerescência de polpa. Uma menor UR poderia representar mais espaço intercelular no fruto preenchido com ar e maior difusão de CO₂. Brackmann et al. (2008) verificaram que a perda de massa fresca induzida entre 1,6% e 3,2%, durante o armazenamento prolongado em atmosfera controlada, reduz a ocorrência de degenerescência senescente e de polpa farinácea, em maçãs 'Royal Gala', sem causar a perda da qualidade dos frutos como murchamento.

A suscetibilidade das maçãs 'Fuji' e 'Braeburn' à degenerescência da polpa pode estar relacionada à incidência de pingo-de-mel no fruto (Fan, 1992). O pingo-de-mel ("water core") é um distúrbio de pré-colheita muito freqüente nas referidas cultivares e caracteriza-se por apresentar áreas de aparência translúcida na polpa, devido ao encharcamento dos espaços intercelulares com suco rico em sorbitol (Marlow & Loescher, 1984; Bowen & Watkins, 1996), que é produzido na folha e translocado para os demais órgãos da macieira (EPAGRI, 2002) o pingo-de-mel tende a desaparecer durante o armazenamento das cultivares, quando a ocorrência não é muito intensa (Clarck et al., 1996).

O pingo-de-mel resulta da presença de sorbitol em virtude da deficiência enzimática para desdobrá-lo em glicose e frutose. O preenchimento dos espaços intercelulares pelo sorbitol na forma líquida, diminuindo ainda mais o potencial osmótico promove a retenção de água (Bowen & Watkins, 1997) e dificulta, assim, a difusão do CO₂ da polpa e, em conseqüência, pode ocorrer maior acúmulo de etanol e acetaldeído, que em altas

concentrações, são tóxicos aos tecidos e causam degenerescência da polpa durante o armazenamento.

Williams (1966) observou uma conversão prematura do amido em determinadas áreas específicas do fruto seguido de uma redução da pressão osmótica, que ocasiona o enchimento dos espaços intercelulares com líquido. Ocorre também incremento da absorção de água e do volume da célula. Assim, as células repletas de água entrariam em contato umas com as outras, dificultando a difusão do CO₂.

O cálcio também pode estar envolvido com a degenerescência da polpa, pois, segundo Jones & Lunt (1967) o “vazamento de células” é afetado pela concentração desse elemento nas células (Marlow & Loescher, 1984). Bangerth et al. (1972) afirmam que o desenvolvimento de degenerescência interna pode ser minimizado através da aplicação de cálcio, pois este componente reduz o “acúmulo de sorbitol”. O cálcio também pode ter influência, pois muitas das desordens fisiológicas que afetam os frutos estão relacionadas com o seu baixo conteúdo nos tecidos (Brackmann & Ribeiro, 1992) e com a variação do local do pomar, ocorre variação do teor de nutrientes.

O local de produção da maçã pode influenciar na predisposição aos distúrbios fisiológicos nos frutos tornando-os mais ou menos sensíveis (Volz et al., 1998b). Estes autores estudaram a sensibilidade da ‘Fuji’ oriunda de cinco diferentes pomares e constataram diferenças na extensão do escurecimento interno, produção de etanol, acetaldeído e etil acetato. Watkins et al. (1997) também constataram variação na incidência de desordens internas em maçãs oriundas de diferentes pomares.

As respostas de maçãs ao CO₂ variam muito entre as regiões produtoras (Meheriuk, 1989). Geralmente, maçãs produzidas em locais de clima mais quente são menos sensíveis ao CO₂, o que deve estar ligado à estrutura celular (Ceretta et al., 2002; Ceretta, 2003). Frutos de locais mais frios podem apresentar polpa mais compacta e ter maior dificuldade de difusão do CO₂, além de alterar o formato dos frutos, assim aumenta a sensibilidade a este gás. Essa variabilidade possivelmente é ocasionada pelas diferenças nas propriedades de difusão de gases através da polpa e pelas diferentes taxas de respiração dos frutos (Dadzie et al., 1993).

Segundo Watkins et al. (1997), na Nova Zelândia os produtores têm muitas perdas de maçã devido à degenerescência interna e estas são mais predominantes nas regiões mais frias. Ceretta et al. (2002) constataram evidências de menor difusão de CO₂ na polpa de maçãs, proveniente de regiões produtoras brasileiras de clima frio, em relação às regiões de clima mais quente.

1.4. Métodos de previsão de ocorrência de degenerescência da polpa

A viabilização do uso de métodos predictivos vai permitir prever, na colheita ou, de preferência, até antes desta operação, quais os pomares ou lotes de maçãs são mais susceptíveis a distúrbios fisiológicos durante o armazenamento. Com isso, pode-se optar por não armazenar este produto e sim comercializá-lo imediatamente após a sua colheita. Por outro lado, os frutos mais resistentes à manifestação desse dano podem ser armazenados, e dessa forma, reduzir as perdas de qualidade durante o período de armazenamento.

1.4.1. Infiltração de nutrientes

Existem algumas formas de induzir o aparecimento e até mesmo acelerar a manifestação dos distúrbios internos nas maçãs, como por exemplo 'bitter pit', métodos estes já utilizados comercialmente no Chile (Retamales et al., 2000; Amarante et al., 2005; Sestari, 2006). Altherr et al. (1995) observaram que a degenerescência da polpa da maçã tem correlação com os níveis dos nutrientes da polpa dos frutos, sendo que os elementos minerais que apresentaram correlação com a degenerescência foram Ca, K, P e Mg e suas relações, por exemplo, K/Ca ou (K+Mg)/Ca.

Um método utilizado para predição de 'bitter pit' é a infiltração com Mg (Retamales et al., 2000; Amarante et al., 2005; Sestari, 2006). Como a degenerescência da polpa também tem relação com o nível de cálcio no fruto, a infiltração de Mg poderia também ser um teste predictivo para prever na colheita ou de preferência antes desta operação, a susceptibilidade dos frutos à ocorrência de degenerescência durante o armazenamento.

Marschner (1997) afirma que a ocorrência de distúrbios fisiológicos está relacionada com o desequilíbrio nutricional, sendo muito influenciada pela deficiência de Ca (Luchi & Luchi, 2001). Neste sentido, Curry (2002 e 2003) verificou correlação na predição de distúrbios em maçã com infiltração a vácuo de elementos minerais que influenciam na absorção do Ca, como por exemplo, o Mg e K. O cálcio pode ser trocado por estes elementos na infiltração, devido às suas similaridades químicas, mas o Mg e K não terão as mesmas funções que o Ca na célula ou no tecido dos frutos, podendo predispor rapidamente os frutos aos distúrbios fisiológicos, servindo como métodos de predição.

1.4.2. Método da aceleração da maturação

A degenerescência da polpa manifesta-se com maior frequência durante o armazenamento em frutos de maturação avançada (Franck et al., 2007). Assim, a indução do amadurecimento da maçã pode ser uma possibilidade para predição da degenerescência interna nas maçãs. Esta metodologia já foi utilizada para predição de 'bitter pit' através do uso de etileno ou acetileno (Ferguson & Watkins, 1989; Sestari, 2006).

A indução da manifestação dos distúrbios fisiológicos nos frutos através da aceleração do amadurecimento pode ser realizada de várias formas já conhecidas, como o uso de temperaturas elevadas (acima de 20°C) e através de aplicação de ethephon. Neste caso, o ethephon será fonte de etileno, fito-hormônio responsável pela aceleração dos processos de amadurecimento dos frutos e senescência dos vegetais. Além disso, pode-se também induzir o amadurecimento dos frutos, colocando-os em ambientes herméticos com alta concentração de etileno (Eksteen et al., 1977; Sestari, 2006).

1.4.3. Fluorescência de clorofilas

Deell et al. (1998) e Prange et al. (2005) afirmam que é possível avaliar o estresse no tecido dos frutos através de fluorescência de clorofilas. Saquet & Streif (2002) verificaram correlação entre fluorescência de clorofilas com distúrbios internos nas peras. Além disso, imagens macroscópica de fluorescência de clorofila podem ser utilizadas para detectar danos nos tecidos como a ocorrência de 'bitter pit' e de escaldadura (Vandeven et al., 2002). A fluorescência de clorofila também já é utilizada no sistema de armazenamento 'Dynamic Controlled Atmosphere' (DCA), o qual serve para manter a qualidade dos frutos e reduzir a ocorrência de distúrbios fisiológicos em frutos armazenados (Toivonen & DeEll, 2001; Prange et al., 2002; Prange et al., 2003; Veltman et al., 2003; Prange et al., 2005; Zanella & Cazzanelli, 2007).

Esta técnica permite determinar indiretamente nos frutos quando as condições de oxigênio e dióxido de carbono da AC chegam a níveis críticos que podem causar dano às células e tecidos dos frutos. Essa forma de armazenamento em AC avalia o nível metabólico encontrado no fruto (Prange et al., 2005; 2005b). DCA leva vantagem em relação a outras técnicas que avaliam o etanol ou acetaldeído na atmosfera de armazenamento que são os produtos da respiração anaeróbica, possivelmente, pois o estresse na DCA pode ser detectado

em momento mais precoce. A avaliação da DCA avalia a fluorescência de clorofilas enquanto os outros métodos precisam medir os produtos oriundos da respiração anaeróbica onde, já pode estar ocorrendo dano nas células.

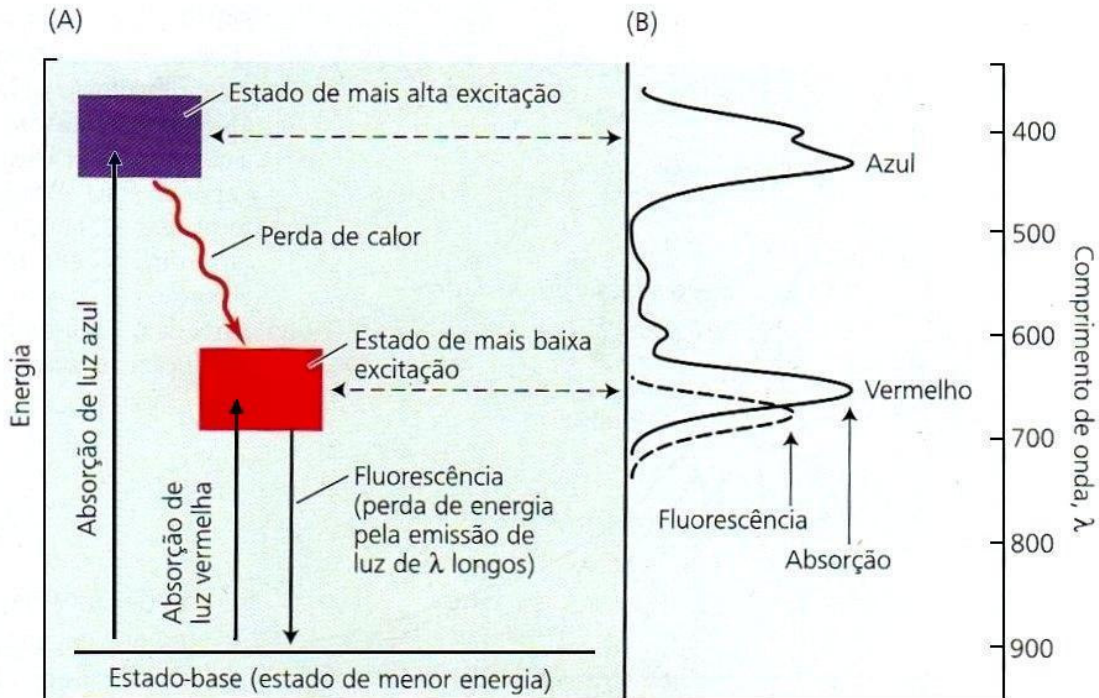


Figura 1.1. Absorção e emissão de luz pela clorofila. (A) Diagrama mostrando o nível energético. A absorção ou emissão de luz é indicada pelas linhas verticais que conectam o estado-base com os estados excitados dos elétrons. As bandas de absorção da clorofila no azul e no vermelho (que absorvem fótons azuis e vermelhos, respectivamente) correspondem às setas verticais para cima, significando que a energia absorvida pela luz provoca uma alteração na molécula do estado-base para um estado excitado. As setas que apontam para baixo indicam fluorescência, onde a molécula vai do estado de baixa excitação para o estado-base, enquanto re-emite energia na forma de fótons. (B) Espectros de absorção e fluorescência. A banda de absorção nos comprimentos de onda longos (vermelhos) da clorofila corresponde à luz que possui a energia necessária para causar a transição do estado-base para o primeiro estado de excitação. A banda de absorção nos comprimentos de onda curtos (azul) corresponde à transição para o estado de alta excitação (Taiz & Zeiger, 2004).

A fluorescência de clorofila é alterada conforme a situação em que se encontra o metabolismo celular. Esta alteração ocorre pela sensibilidade da clorofila aos diversos estresses e danos inclusive na pós-colheita (Schreiber et al., 1994; Saquet & Streif, 2002). A fotossíntese converte a energia luminosa em energia química (Taiz & Zeiger, 2004). Assim, para entender a alteração da fluorescência de clorofila é preciso compreender também o processo de fluorescência.

Para isso, a Figura 1.1 é ilustrado que a distribuição de elétrons na molécula excitada é de certa forma diferente da distribuição da molécula no estado-base (Taiz & Zeiger, 2004). Esses mesmo autores explicam que a absorção de luz azul excita a clorofila a um estado energético mais elevado que a luz vermelha, pois a luz azul fornece mais energia por fóton, devido ao menor comprimento de onda (Figura 1.1). No estado excitado, a clorofila é extremamente instável e rapidamente libera parte de sua energia ao meio como calor, entretanto em um estado de menor excitação no qual pode permanecer estável por alguns nano segundos.

A clorofila no estado de excitação possui quatro alternativas para liberar a energia disponível (Taiz & Zeiger, 2004): 1) a clorofila excitada pode re-emitir um fóton e, assim, retornar ao seu estado-base, o que se chama de fluorescência, sendo, no entanto, a re-emissão de ondas num comprimento de onda levemente maior, pois parte da energia é convertida em calor e a clorofila emite fluorescência na região vermelha do espectro (Figura 1.1). 2) a clorofila excitada converte a energia em calor; 3) ocorre transferência de energia para outra molécula; 4) ocorre processo fotoquímico, no qual a energia do estado excitado provoca a ocorrência de reações químicas.

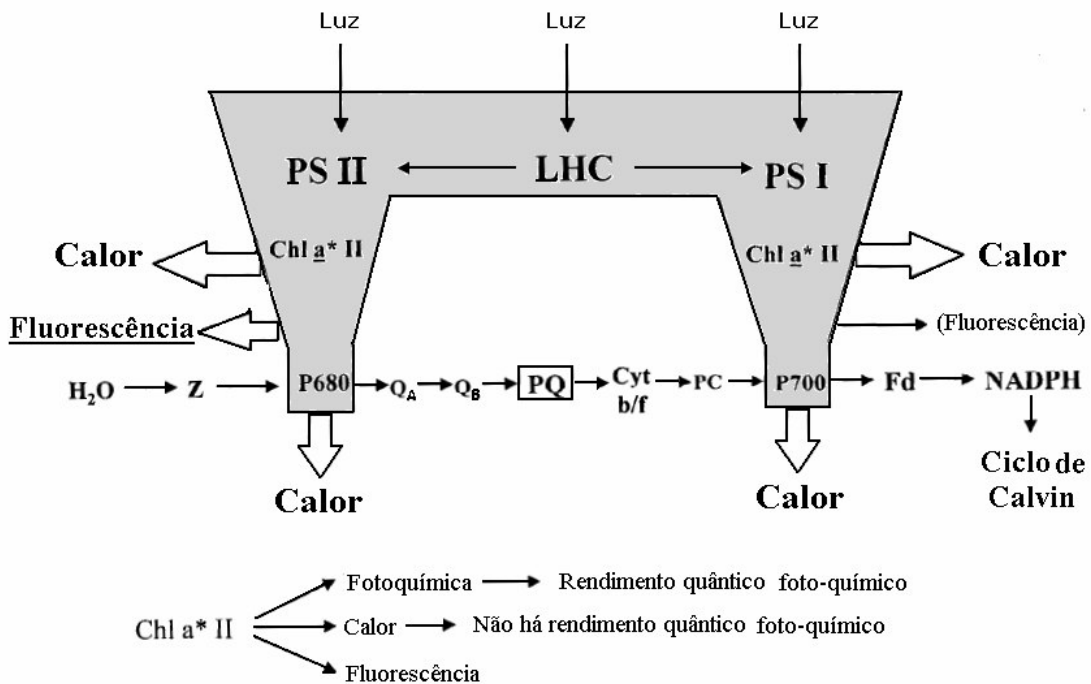


Figura 1.2. Ilustração esquemática de conversão da energia primária na fotossíntese e influência *in vivo* do rendimento da fluorescência de clorofila. A variação da fluorescência original se dá exclusivamente pelo fotosistema II (PSII). O

rendimento da fluorescência máxima é menor pela separação da carga fotoquímica e dissipação de calor (Schreiber et al., 1994 e Saquet & Streif, 2002).

Schreiber et al. (1994) e Saquet & Streif (2002) ilustram como a fluorescência de clorofila resulta da reação de desexcitação das moléculas de clorofilas excitadas (Figura 1.2). Em condições ideais a energia na fotossíntese é convertida em energia química, ou seja, na assimilação de carbono, na forma de açúcares nas plantas (Taiz & Zeiger, 2004). Porém, recentemente está se utilizando a fluorescência da clorofila para detectar estresse em frutos armazenados em pressões parcial muito baixo de oxigênio ou elevada pressão parcial de dióxido de carbono (Prange et al., 2005), e desta forma, pode-se ajustar o balanço desses gases na câmara fria para obter aumento do período de armazenamento e manter a qualidade dos frutos.

A justificativa mais plausível de como o estresse desses gases pode interferir na fluorescência de clorofila é pela acidose do citoplasma celular, que ocorre em condições que estimulam a respiração anaeróbica (Gout et al., 2001; Prange et al., 2005b). Gout et al. (2001) e Prange et al. (2005) mostram que a deficiência de oxigênio no tecido (anoxia) impõe a acidose do citoplasma, o que se correlaciona com a hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) e outros nucleotídeos trifosfatos (NTPs) como ácido fosfórico $ATP + H_2O \Rightarrow ADP + H_3PO_4$. Nesta reação também ocorre perda de H^+ do vacúolo, mas não há correlação com a mudança do pH citoplasmático e também com a hidrólise dos NTPs.

Prange et al. (2005) afirmam que se a célula volta à condição ideal para uma respiração aeróbica, o pH citoplasmático aumenta, porém o pH extracelular e do vacúolo diminui, ou seja, o estresse causado pelos níveis extremos de gases deve ser reversível se esse ainda não causou dano às células e/ou tecidos. Dessa forma, sugere que a acidose do citoplasma ocorre pela redução do transporte de H^+ do citoplasma para o vacúolo ou espaço extracelular. A acidificação da parede celular vegetal, após o retorno dos níveis de gases favoráveis a respiração aeróbica ('normoxia'), pode promover o amolecimento da parede celular, pois esta acidificação da parede celular é um processo normal no processo de crescimento celular (Rayle & Cleland, 1992; Cosgrove, 1997; Cosgrove, 1999). Desde então, a acidose citoplasmática vem sendo considerada também como um sinal da morte celular, cujos efeitos positivos ou negativos da AC pode ser melhor entendido com mais pesquisas sobre o efeito da AC na acidose citoplasmática (Prange et al., 2005).

Pode-se então levantar a hipótese de que as condições de estresse produzem radicais livres e substâncias que podem danificar a estruturas das células, e que normalmente estes

radicais livres são oxidados no ciclo da vitamina C e as estruturas reparadas, com necessidade de energia (Saquet et al., 2000; Franck et al., 2007). No entanto, com um estresse oxidativo, somado com a acidificação do citoplasma, ocorre possivelmente a ruptura das membranas e em algumas destas estão às clorofilas, que podem responder à análise de fluorescência de clorofilas (Taiz & Zeiger, 2004; Prange et al., 2005).

1.4.4. Exposição de frutos ao alto CO₂

Volz et al. (1998) conseguiram prever a sensibilidade das maçãs 'Fuji' à ocorrência de degenerescência através do curto estresse por alta pressão parcial de CO₂ (20 e 50kPa) na colheita durante três, cinco ou sete dias. Saquet et al. (2001) e Franck et al. (2007) afirmam que a ocorrência de degenerescência está relacionada ao metabolismo energético, além disso, os compostos oriundos da respiração anaeróbica também apresentam correlação com a ocorrência desse distúrbio (Volz et al., 1998b). A metodologia proposta por Volz et al. (1998) reduz de forma drástica o nível energético nos frutos e aumenta a produção de compostos da respiração anaeróbica, então os frutos que tem maior sensibilidade à manifestação de degenerescência, apresentariam o sintoma logo após a colheita. Assim sendo, os frutos dos pomares que apresentarem tal sensibilidade não devem ser armazenados, para evitar elevada ocorrência de degenerescência da polpa.

1.4.5. Relação da degenerescência com parâmetros de maturação e qualidade

Na literatura consultada existem poucos trabalhos que tentam correlacionar os atributos de maturação e qualidade dos frutos com a ocorrência de degenerescência da polpa ou outros distúrbios fisiológicos. No entanto, as características das maçãs que interferem a permeabilidade de gases devem interferir também na manifestação da degenerescência da polpa (Ceretta, 2003). Dessa forma, possivelmente firmeza de polpa e densidade poderá apresentar correlação com a manifestação da degenerescência da polpa (Altherr et al., 1995). Neuwald et al. (2005) encontraram boa correlação da ocorrência de degenerescência da polpa com índice de iodo-amido, sólidos solúveis totais, densidade dos frutos, teor de suco e permeabilidade da polpa ao ar.

Altherr et al. (1995) verificaram correlação da degenerescência da polpa em maçãs com diâmetro dos frutos e número de sementes. Sestari et al. (2007) estudando outro distúrbio fisiológico, o 'bitter pit', encontraram correlação com o índice de iodo-amido.

CAPÍTULO 2

Previsão de degenerescência da polpa em maçã ‘Fuji’ armazenadas em atmosfera controlada

RESUMO

Durante o armazenamento de maçã ‘Fuji’ ocorrem distúrbios fisiológicos, como escurecimento da polpa e até o surgimento de “cavernas”. Frutos com este distúrbio não podem ser identificados e eliminados durante o processo de seleção e classificação, mas somente é detectado no momento do consumo. O objetivo deste trabalho foi de correlacionar atributos de qualidade e maturação, no momento da colheita, com a ocorrência de degenerescência da polpa após o armazenamento em AC. Verificou-se também que, os frutos do mesmo pomar apresentam diferença na susceptibilidade à degenerescência quando se altera a condição de armazenamento. Os SST tiveram correlação com a degenerescência na condição de AC com baixo CO₂. Para a condição de AC com alto CO₂ houve correlação da ocorrência de desordens fisiológicas com teor de suco nos frutos.

PALAVRAS CHAVES: *Malus domestica*, escurecimento interno, qualidade dos frutos, atmosfera controlada, pós-colheita.

Prediction of flesh browning in ‘Fuji’ apple under controlled atmosphere storage

ABSTRACT

During storage of ‘Fuji’ apple occurred physiological disorders, as flesh browning, breakdown, core browning and cavity formation. Fruits with this disorder can not be identified and removed during the process of selection and classification but only were detected at the consumption. The objective of this work was to investigate forms to predicted before or at-harvest time which fruits have higher susceptibility to flesh browning. Results showed that fruit from the same orchard have difference in susceptibility to flesh browning. TSS had correlation when storage conditions are changed with physiological disorders in CA

condition with low CO₂. In CA condition with high CO₂, this was correlation of physiological disorders with juice in the fruits.

Key-words: *Malus domestica*, browning disorder, fruit quality, controlled atmosphere, post-harvest.

2.1. Introdução

A atmosfera controlada (AC) traz inúmeros benefícios para o armazenamento de maçã 'Fuji', permitindo um aumento no período de conservação que pode ser superior a seis meses. A redução da pressão parcial de O₂ e aumento da pressão parcial de CO₂ retardam a senescência e mantêm a qualidade dos frutos (Volz et al., 1998). Entretanto, para maçã 'Fuji', o uso de CO₂ no armazenamento comercial é limitado pelo risco de dano. De maneira geral, as recomendações de pressões parciais de CO₂ para maçãs não excedem a 5kPa (Kupferman, 1997).

A maçã 'Fuji', pode apresentar sérios problemas de distúrbios fisiológicos internos em AC com altos níveis de CO₂ (>1,0kPa) (Volz et al., 1998; Ceretta, 2003). No Brasil, também se observa que é uma cultivar não tolerante a presença deste gás, mesmo em condição de armazenamento refrigerado (AR). A ocorrência de degenerescência também tem sido observada mesmo em armazenamento com pressões parciais muito baixas, como 0,4kPa de CO₂ (Grant et al., 1996).

De acordo com Saquet (2003), a sensibilidade da maçã ao CO₂ tem sido maior quando a instalação da atmosfera é realizada logo após a colheita. Existem evidências de que a suscetibilidade ao CO₂ durante o armazenamento em AC está relacionada com a baixa permeabilidade da polpa aos gases (Ceretta, 2003). Este autor também afirma que frutos desta cultivar têm diferente permeabilidade ao CO₂ em função da região climática em que é produzida e também da condição nutricional do pomar.

Os frutos afetados pelo excesso de CO₂, normalmente, apresentam um aspecto externo normal e somente quando são cortados ao meio apresentam regiões da polpa marrons, as quais podem estar distribuídas ao acaso ou podem formar uma zona escurecida entre o carpelo e a epiderme (Brackmann & Saquet 1995). Segundo Luchi & Luchi (2001), o distúrbio não progride após a redução das altas pressões parciais de CO₂, sendo a causa primária uma excessiva concentração deste gás no interior do fruto.

O mecanismo de como o CO₂ causa dano às células dos frutos ainda não está bem elucidado em maçãs (Volz et al., 1998; Streif, 2008). Alguns autores têm atribuído que tais

danos são provocados por mecanismos que inibem a respiração, causando mudanças no metabolismo energético (Streif, 2008; Saquet et al., 2001; Saquet et al., 2000). O alto teor de CO₂, associado ou não com o baixo teor de O₂, diminui a taxa respiratória, o que reduz a síntese de ATP e aumenta os produtos da fermentação como etanol, acetaldeído e radicais livres (Saquet et al., 2000; Frank et al., 2007; Streif, 2008). É provável que a síntese de ATP torna-se insuficiente para a sustentação do metabolismo básico para a manutenção e função das membranas no início do armazenamento (Saquet et al., 2001).

Indiretamente este aumento de compostos, oriundos da fermentação, pode aumentar a permeabilidade da membrana mitocondrial, reduzindo ainda mais a produção de ATP, ocasionando danos à membrana e formando um efeito cascata que acaba com a manifestação das desordens fisiológicas. Estes produtos da respiração anaeróbica, provavelmente, aumentam a permeabilidade da membrana do vacúolo, conduzindo a um extravasamento de íons, prótons, ácidos e fenóis para o citosol, provocando o escurecimento do tecido por oxidação, devido à reduzida síntese de ATP.

Essa hipótese já foi proposta por Frank et al. (2007) para peras, e acredita-se que em maçãs possa ocorrer um processo semelhante. O alto teor de CO₂ durante o armazenamento em AC, provavelmente, é um fator chave, porém, seu efeito é modulado por alguns fatores conhecidos e outros ainda desconhecidos (Streif, 2008).

O acúmulo de CO₂ pode ser devido à dificuldade de difusão deste gás na polpa do fruto (Watkins et al., 1997), ocorrendo um gradiente com camadas de pressões parciais de CO₂ maiores no interior e menor nas camadas mais próximas à epiderme do fruto. Um aumento na concentração de CO₂ exógeno resultando em um menor gradiente de CO₂ com o ambiente externo e, portanto, em um menor fluxo de CO₂ para fora do fruto o que pode conduzir a um acúmulo ainda maior na polpa, levando a um aumento na extensão dos danos (Watkins et al., 1997).

Diversos fatores podem influenciar na difusão do CO₂ no tecido do fruto, como o tamanho do fruto, presença do distúrbio fisiológico “pingo-de-mel”, variedade, época de colheita e local de produção, espaço intercelular do tecido da polpa e difusividade dos gases (Kupferman, 1997; Volz et al., 1998; Ceretta et al., 2003; Streif, 2008). No momento em que estiverem elucidados quais os mecanismos que levam o surgimento do escurecimento da polpa da maçã, pode-se tornar mais fácil encontrar formas de prognose da referida desordem fisiológica.

Já existem algumas formas de induzir o aparecimento e até mesmo acelerar a manifestação dos distúrbios internos nas maçãs recém colhidas (Volz et al., 1998). Partindo-se

desse princípio, seria possível empregar essas técnicas para prever, no momento da colheita, ou de preferência, até antes desta operação, quais os pomares ou lotes de maçãs mais susceptíveis à degenerescência da polpa. Com isso seria possível optar por não armazenar este produto e sim comercializá-lo imediatamente após a sua colheita. Por outro lado, os frutos mais resistentes à manifestação desse distúrbio poderiam ser armazenados, e dessa forma, haveria menos perdas durante o período de armazenamento.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a correlação entre atributos de maturação e qualidade com a ocorrência de degenerescência da polpa e se frutos colhidos de diferentes pomares apresentam ou não o mesmo comportamento durante o armazenamento em AC, com relação à degenerescência da polpa.

2.2. Material e métodos

O experimento foi realizado no Núcleo de Pesquisa em Pós-colheita (NPP) do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), com frutos da cv. Fuji, oriundos de três pomares comerciais das regiões produtoras dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Após a colheita, os frutos foram transportados para Santa Maria, onde foram descartados aqueles com lesões e/ou fora da classe pré-estabelecido (135), ou seja, em uma caixa de 18 kg deve conter 135 frutos, e homogeneizado as amostras experimentais.

Em cada pomar foram colhidas nove amostras de 25 frutos, uma destas para ser avaliada quanto aos atributos físico-químicos. Além disso, oito amostras de 25 frutos foram armazenadas, para avaliação após oito meses de armazenamento em cada condição de AC e mais sete dias de exposição a 20°C.

O armazenamento da maçã 'Fuji' foi realizado na temperatura de -0,5°C, nas condições de atmosferas controladas de: [1] 1,2kPa de O₂ e <0,5kPa de CO₂ (baixo CO₂) e [2] 1,2kPa de O₂ e 2,0kPa de CO₂ (alto CO₂).

Foram efetuadas as seguintes análises:

a) Firmeza da polpa: na região equatorial do fruto, em dois lados opostos, foi removida uma pequena porção da epiderme e posteriormente, com auxílio de um penetrômetro com ponteira de 11mm de diâmetro, determinando a firmeza de polpa, expressa em Newton (N);

b) Teste do iodo-amido: realizado utilizando-se uma solução com 12g de iodo metálico e 24g de iodeto de potássio em um litro de água destilada. Após o corte na região equatorial

do fruto, aplicou-se a solução de iodo através da imersão da superfície cortada da região peduncular. A seguir, ao comparar o escurecimento causado pela reação do iodo com o amido, na região cortada, tendo como referência a tabela de fotografias com uma escala de 1 a 10, onde o índice 1 indica o teor máximo de amido e o índice 10 representa o amido totalmente hidrolisado.

c) Sólidos solúveis totais (SST): determinados por refratometria, utilizando-se suco extraído de uma amostra de frutos, sendo a leitura determinada em graus Brix ($^{\circ}$ Brix), com compensação do efeito da temperatura;

d) Teor de suco: obtido pela diferença do peso após a prensagem com 1500kgf de uma amostra de aproximadamente 20g da polpa do fruto durante 1 minuto, conforme metodologia descrita por Lunardi (2003).

e) Diâmetro dos frutos: medido com auxílio de um paquímetro na região equatorial do fruto, sendo considerado o maior valor de diâmetro do fruto. Os valores obtidos foram expressos em mm.

f) Densidade dos frutos: Os frutos foram colocados individualmente em recipientes com volume de 1.000ml. Após, foi completado o volume com água até 700ml. A densidade foi determinada pela relação da massa do fruto (g) dividido pela subtração do volume total que é 700ml com o volume de água gasto para completar 700ml Princípio de Arquimedes (Sestari, 2006).

g) Degenerescência da polpa: o escurecimento interno e o surgimento de cavernas na polpa, após o armazenamento, através de cinco cortes transversais formando camadas de aproximadamente 1cm. Estes cortes expuseram totalmente a polpa para a observação visual, sendo determinada a percentagem de frutos com sintomas do distúrbio.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo os resultados submetidos à análise da variância, desvio padrão e teste de correlação de Person. Os resultados dos atributos físico-químicos da análise inicial foram submetidos à análise de correlação com a ocorrência de degenerescência da polpa nos frutos armazenados em atmosfera controlada e exposição à vida de prateleira a 20°C. Para a ocorrência de degenerescência da polpa foi realizada a análise de variância e comparação pela mínima diferença significativa.

2.3. Resultados e discussão

Na condição de AC [1] após oito meses de armazenamento os frutos apresentaram 4, 7 e 30% de degenerescência da polpa para os pomares 1, 2 e 3, respectivamente (Figura 2.1). Já, para a condição de AC [2] também após oito meses a ocorrência dessa desordem fisiológica foi de 35, 22 e 25% respectivamente (Figura 2.1). Além disso, ocorreu mudança de comportamento na ocorrência de degenerescência entre pomares e condição de atmosfera controlada. Como pode ser observado os pomares 1 e 2 aumentaram a ocorrência desse distúrbio quando a condição de AC teve maior pressão parcial de CO₂, porém, isso não ocorreu para o pomar 3. Esse comportamento, provavelmente dificulta uma previsão da ocorrência de degenerescência da polpa de qualquer condição de AC, ou seja, frutos do mesmo pomar apresentam diferenças na susceptibilidade à degenerescência quando se altera a condição de armazenamento. Observou-se que correlacionando os atributos de qualidade e maturação na colheita com ambas as condições de atmosfera controlada juntas, não se obteve correlação (dados não mostrados), provavelmente pela mudança na ocorrência dessa desordem fisiológica que ocorre entre as condições de AC e pomares.

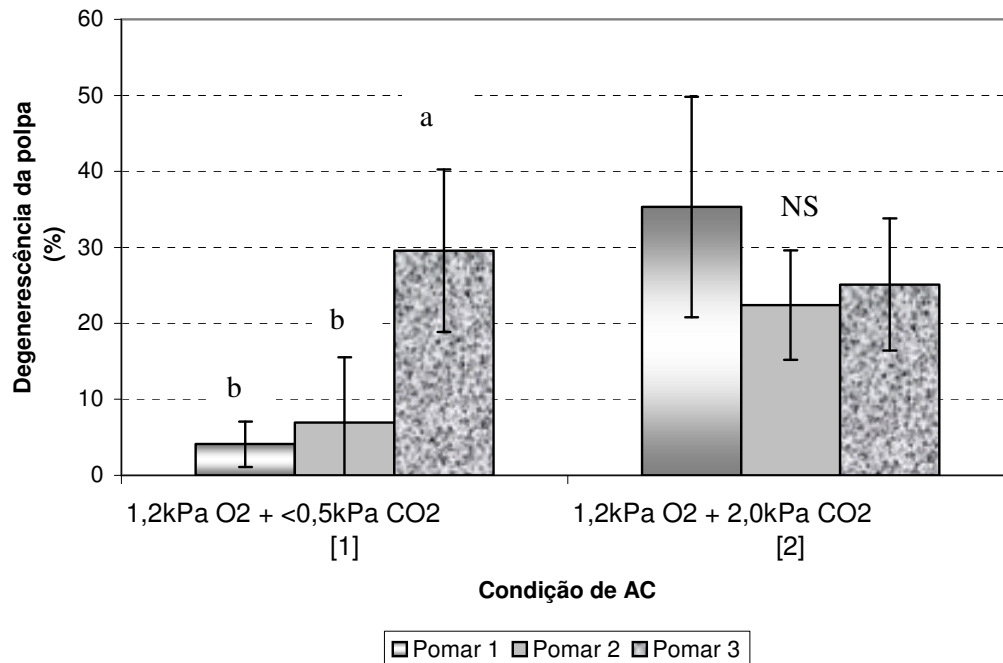


Figura 2.1: Percentagem de escurecimento da polpa na maçã ‘Fuji’, de três pomares, armazenada por oito meses em AC e mais sete dias a 20°C, Santa Maria, RS, 2004.

Ao proceder-se à análise de correlação entre a degenerescência da polpa e as demais variáveis (Tabela 2.1) foi possível verificar correlação positiva da incidência de degenerescência da polpa após o armazenamento, em AC com baixo CO₂, com o SST. Isso quer dizer que quando se tem maior conteúdo de SST, ou seja, possivelmente os frutos estejam num estágio mais avançado de maturação, vai ocorrer uma maior incidência de desordens fisiológicas.

Este resultado concorda com o obtido por Watkins et al. (1997) e Volz et al. (1998) ao afirmarem que em frutos com estágio mais avançado de maturação apresentam maior ocorrência de escurecimento da polpa, estando também parcialmente de acordo com Castro et al. (2007), que verificaram que, em alguns casos, em colheita tardia da cv. Pink Lady, ocorre aumento da ocorrência desta desordem fisiológica. Porém na condição de armazenamento com alto CO₂, provavelmente por ser esse o fator que desencadeia o processo de escurecimento da polpa, o SST, nessa condição de armazenamento, não apresentou correlação com a ocorrência da degenerescência.

Na análise de correlação para a condição de AC com alto CO₂ (Tabela 2.1), verificou-se correlação positiva com a percentagem de suco dos frutos. Esse atributo de qualidade deve estar interferindo na difusividade da polpa aos gases e, portanto, na trocas gasosas que ocorrem durante o processo de armazenamento e durante o período de prateleira “shelf life” desses frutos, principalmente quando se utiliza a AC para o armazenamento.

Essa dificuldade nas trocas gasosas pode gerar um acúmulo de CO₂ no tecido da polpa da maçã, o qual pode causar danos, e conseqüentemente, o escurecimento deste tecido (Watkins et al., 1997). Kupferman (1997), Ceretta et al. (2003) e Streif (2008) verificaram menor escurecimento quando o fruto apresentou mais espaço intercelular, facilitando as trocas gasosas e, assim, o CO₂ não acumula os níveis tóxicos no tecido. O teor de suco e a densidade, porém não apresentam correlação com a degenerescência quando os frutos foram armazenados em baixo CO₂.

Esse resultado permite inferir que provavelmente mesmo que o fruto apresente menor difusividade ao O₂ e ao CO₂, a manutenção de um gradiente de pressão parcial destes gases suficiente para as trocas gasosas em quantidade suficiente para evitar o estresse que desencadeia a degenerescência da polpa.

Essas correlações encontradas podem auxiliar numa triagem dos frutos provenientes de diferentes pomares. Desta forma, essa verificação da suscetibilidade dos frutos na colheita

poderia reduzir a perda de qualidade causada pela degenerescência da polpa. Sabendo quais pomares tem maior suscetibilidade a esta desordem, os frutos provenientes destas áreas poderiam ser rapidamente comercializados. Assim, evita-se o estresse causado nos frutos pelas condições extremas de AC (como o alto CO₂ e/ou baixo O₂ no tecido dos frutos), principalmente na instalação da AC que podem causar danos aos tecidos vegetais, durante o armazenamento em frutos sensíveis. Como estes são os primeiros resultados obtidos no Núcleo de Pesquisa em Pós-colheita da UFSM para previsão de distúrbios fisiológicos internos de maçã 'Fuji'. Estes resultados são preliminares e há necessidade de novos estudos para viabilizar o uso de variáveis de maturação e qualidade na previsão de distúrbios fisiológicos internos.

Tabela 2.1: Coeficientes de correlação (R²) de degenerescência da polpa de maçãs 'Fuji' de três pomares e duas condições de AC com diferentes atributos de qualidade após o armazenamento e mais sete dias a 20°C, com as variáveis avaliadas na colheita. Santa Maria, RS, 2004.

Parâmetros	1,2kPa O ₂ + <0,5kPa CO ₂	1,2kPa O ₂ + 2,0kPa CO ₂
Firmeza de polpa	0,18	-0,26
Índice de iodo-amido	0,06	-0,02
SST	0,77*	-0,06
Peso frutos (g)	0,34	-0,40
Diâmetro dos frutos (mm)	0,31	-0,42
Densidade	0,36	-0,73
% de suco dos frutos	-0,24	0,83*
Permeabilidade	0,33	-0,05

Significância do coeficiente de correlação (r²) a 5% de probabilidade de erro.

2.4. Conclusões

Há mudança na ocorrência de degenerescência da polpa entre pomares e condição de AC, o que dificulta uma previsão utilizando diferentes condições de AC. A correlação das avaliações iniciais com a ocorrência de desordens fisiológicas depende de cada condição de AC.

Os atributos que apresentam correlação significativa com a manifestação de degenerescência da polpa, após o armazenamento em AC e vida de prateleira, foram: SST e teor de suco na polpa dos frutos, porém essa correlação é verificada apenas na condição de armazenamento de baixo CO₂ SST ou de alto CO₂ teor de suco, porém essas afirmações devem ser confirmadas por um maior número de experimentos.

2.5. Recomendação para pesquisas futuras

Na tentativa de viabilizar o uso da previsão de ocorrência de distúrbios fisiológicos através da análise de parâmetros de maturação e qualidade no momento da colheita há necessidade de repetição do trabalho em diferentes anos e pomares.

Seria interessante que este experimento fosse repetido por vários anos, pois, a ocorrência da degenerescência da polpa é esporádica.

2.6. Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Brasilien-Zentrum pelo fomento e possibilidade da realização do intercâmbio internacional (doutorado-sanduíche) de Daniel Alexandre Neuwald, primeiro autor, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsas de estudo ao mesmo autor nos estudos realizados no Brasil.

CAPÍTULO 3

Previsão de degenerescência da polpa em maçãs ‘Gala’, ‘Royal Gala’, ‘Fuji’ e ‘Braeburn’ após o armazenamento em atmosfera controlada

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar formas de previsão da ocorrência de degenerescência da polpa das maçãs ‘Gala’, ‘Royal Gala’, ‘Fuji’ e ‘Braeburn’ após o armazenamento em atmosfera controlada (AC). Os frutos foram armazenados em AC e a degenerescência da polpa avaliada após seis meses e mais doze dias de exposição a 20°C. A degenerescência observada foi comparada com a ocorrência prevista por métodos predictivos e correlacionada com atributos de qualidade e maturação determinados no momento da colheita. Houve baixa ocorrência de degenerescência da polpa, durante o armazenamento em AC, nas cultivares Gala, Royal Gala e Fuji. Verificou-se correlação positiva de degenerescência da polpa, na cultivar Gala, com a densidade do fruto, porém, somente na colheita precoce. Para a cultivar ‘Fuji’ houve apenas correlação positiva e significativa da degenerescência da polpa com os SST, mas apenas na colheita tardia. A cultivar Braeburn apresentou correlação negativa da degenerescência da polpa com o índice de iodo-amido, mas apenas na colheita precoce.

Palavras-chaves: *Malus doméstica*, escurecimento interno, qualidade dos frutos, atmosfera controlada, pós-colheita.

Prediction of flesh browning of ‘Gala’, ‘Royal Gala’, ‘Fuji’ and ‘Braeburn’ apples after controlled atmosphere storage

Abstract

The aim of work was to evaluate the ways of prediction of flesh browning occurrence in ‘Gala’, ‘Royal Gala’, ‘Fuji’ and ‘Braeburn’ apples after controlled atmosphere storage (CA), these apples were stored in AC and flesh browning was evaluated after six months CA storage and 12 days exposure at 20°C. The occurrence of flesh browning was correlated with predictive methods and quality and ripening parameters evaluated at harvest. It was observed a low flesh browning occurrence during storage, in ‘Gala’, ‘Royal Gala’ and ‘Fuji’ apples. In ‘Gala’ apples was found correlation of flesh browning with fruit density, but only at early

harvest fruits. For 'Fuji' apples it was found significant correlation of flesh browning with TSS, but only in late harvest fruits. For 'Braeburn' apples it was found significant correlation of flesh browning with starch index, but only at early harvest fruits.

Key-words: *Malus domestica*, browning disorder, fruit quality, controlled atmosphere, post-harvest.

3.1. Introdução

A atmosfera controlada (AC) traz inúmeros benefícios para o armazenamento de maçãs 'Gala', 'Royal Gala', 'Fuji' e 'Braeburn' permitindo um maior período de conservação, que pode ser superior a seis meses (Brackmann et al., 2000 e 2003). A redução da pressão parcial de O₂ e aumento da pressão parcial de CO₂ retardam a senescência mantendo a qualidade dos frutos (Volz et al., 1998). Entretanto, para maçã a pressão parcial de CO₂ não pode ser muito elevada devido ao risco de dano, especialmente nas maçãs 'Fuji' e 'Braeburn'.

A recomendação, para frutos produzidos em locais frios como a Alemanha, para estas cultivares é de uma pressão parcial de CO₂ menor do que 1,5kPa, sendo os frutos mais sensíveis a esse gás no início do armazenamento (Streif, 2002). As maçãs 'Gala', 'Fuji' e 'Braeburn' apresentam problemas de distúrbios fisiológicos internos durante armazenamento em AC sob condições com 5kPa de CO₂ (Ceretta, 2003).

A recomendação do nível de CO₂ para 'Gala' e 'Braeburn' no Brasil é de 2 a 3kPa. Já para a cv. Fuji esse deve ser mantido o mais baixo possível, para evitar a degenerescência interna, com sintomas de escurecimento e formação de "cavernas" (Brackmann et al., 2001b). Mesmo assim, somente em casos muito severos os sintomas são visíveis no exterior do fruto (Streif et al., 2001). Esse distúrbio ocorre de forma casualizada de ano para ano, sendo influenciado por diversos fatores pré e pós-colheita (Lau, 1997; Curry, 1998).

O mecanismo de como o CO₂ causa dano às células dos frutos, ainda não está bem elucidado para as maçãs (Volz et al., 1998; Streif, 2008). Acredita-se que o estresse, induzido pelo baixo O₂ e alto CO₂, provoca a respiração anaeróbica, que aumenta o conteúdo de etanol, acetaldeído e outros produtos dessa respiração, inclusive a formação de radicais livres, o que pode alterar o metabolismo energético (Saquet et al., 2000; Saquet, 2001; Franck et al., 2007; Streif, 2008), danificando as membranas das células.

Essas, normalmente, são reparadas e protegidas por um sistema celular antioxidante, baseado no ciclo da vitamina C – glutamina (glutathione), porém, com uma condição de estresse oxidativo ocorre o dano nas membranas e, dessa forma, aumenta a permeabilidade destas. Substâncias fenólicas, entre outras, que geralmente estão compartmentalizadas nas células, por exemplo, no vacúolo podem migrar para o citosol, com a perda da seletividade das membranas, onde enzimas podem oxidá-las. Essa é uma hipótese que explica a formação da coloração escurecida no tecido de peras e, a qual possivelmente também pode ser válida para o escurecimento da polpa de maçãs (Franck et al., 2007).

Existem algumas formas de induzir o aparecimento e até mesmo acelerar a manifestação de alguns distúrbios fisiológicos em maçãs, como por exemplo, “bitter pit” (Retamales et al., 2000; Amarante et al., 2005; Sestari, 2006). Volz et al. (1998) encontraram correlação entre a degenerescência da polpa de ‘Fuji’ com um método que estimula o aparecimento deste distúrbio através da exposição desses frutos em atmosfera com alto CO₂ (20kPa) durante três, cinco ou sete dias. Altherr et al. (1995) observaram que a degenerescência da polpa da maçã tem correlação com os níveis dos nutrientes Ca, K, P e Mg e suas relações, por exemplo, K/Ca ou (K+Mg)/Ca da polpa dos frutos.

Um método utilizado para predição de “bitter pit” é a infiltração com Mg (Retamales et al., 2000; Amarante et al., 2005; Sestari, 2006). Como a degenerescência também tem relação com o nível de cálcio no fruto, a infiltração de Mg na colheita pode ser avaliada como um teste predictivo da susceptibilidade dos frutos à degenerescência da polpa durante o armazenamento em AC.

A degenerescência da polpa manifesta-se com maior frequência durante o armazenamento em frutos de maturação avançada (Franck et al., 2007). Assim, a indução do amadurecimento da maçã pode ser uma técnica com possibilidade para predição do distúrbio em maçãs após o armazenamento. Esta metodologia já foi utilizada para predição de ‘bitter pit’ através do uso de etileno ou acetileno (Ferguson & Watkins, 1989; Sestari, 2006). Além desses métodos, existe também a possibilidade de prever a degenerescência utilizando formas mais simples. Uma delas poderia ser uma simples regressão entre tamanho do fruto, pois Altherr et al. (1995) verificaram correlação da degenerescência da polpa em maçãs com diâmetro dos frutos e com o número de sementes.

Partindo-se desses princípios, poderiam ser empregadas algumas técnicas para prever, na colheita ou, preferencialmente antes desta operação, quais os pomares ou lotes de maçãs é mais susceptível a degenerescência da polpa durante o armazenamento. Assim, existe a

possibilidade de se optar por não armazenar um determinado lote e comercializá-lo imediatamente após a sua colheita. Por outro lado, os frutos mais resistentes à manifestação desse distúrbio poderiam ser armazenados, e dessa forma, reduzir as perdas durante o período de armazenamento.

As bases bioquímicas e fisiológicas, que explicam a manifestação de degenerescência em maçãs, ainda não são bem conhecidas (Brumeister & Roughan, 1997; Xuan, 2003; Streif, 2008). Assim, são muitas as dificuldades para se chegar a um método preciso de prognose do escurecimento da polpa.

O objetivo desse trabalho foi verificar se existe correlação entre a degenerescência da polpa das maçãs ‘Gala’, ‘Royal Gala’, ‘Fuji’, e ‘Braeburn’, após o armazenamento em atmosfera controlada com métodos predictivos atributos de qualidade e de maturação.

3.2. Material e métodos

O trabalho de pesquisa foi realizado no Núcleo de Pesquisa em Pós-colheita da Universidade Federal de Santa Maria (NPP/UFSM), no ano de 2005, com maçãs ‘Gala’, ‘Royal Gala’, ‘Fuji’ e ‘Braeburn’, provenientes de onze pomares comerciais de Vacaria, RS. Em cada pomar foram selecionadas de 70 a 100 plantas representativas, das quais foram coletados 6 frutos na altura mediana de cada planta. A primeira colheita foi realizada 20 dias antes da maturação comercial e a segunda no momento da colheita comercial, sendo que a ‘Royal Gala’ foi colhida apenas na segunda época.

Após a colheita e transporte ao NPP/UFSM, procedeu-se a seleção dos frutos, eliminando aqueles com danos mecânicos e podridões, e posteriormente, efetuou-se a homogeneização das amostras experimentais. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo cada tratamento constituído de quatro repetições e cada unidade experimental composta por 25 frutos.

Armazenamento dos frutos: Quatro amostras de 25 frutos de cada pomar foram armazenadas em AC por seis meses em mini-câmaras experimentais com capacidade de 185 litros, as quais foram conectadas por tubulações plásticas a um equipamento de controle automático das pressões parciais de O₂ e CO₂ marca Kronenberger Sistemtechnik. As pressões parciais de O₂, referentes a cada cultivar, foram obtidas pela injeção nas mini-

câmaras do gás nitrogênio proveniente de um gerador que utiliza o princípio “Pressure Swing Adsorption” (PSA). As pressões parciais de CO₂ foram obtidas mediante a injeção deste gás puro, proveniente de cilindros de alta pressão. O equipamento de controle automático realizava medições diárias das pressões parciais dos gases nas mini-câmaras e as controlava segundo níveis pré-estabelecidos para cada cultivar. As condições de armazenamento para as quatro cultivares foram:

- **‘Gala’ e ‘Royal Gala’:** 1,5kPa O₂ + 3,0kPa CO₂, com umidade relativa entre 95 a 97% na temperatura de +0,5°C;
- **‘Fuji’:** 1,2kPa O₂ + <0,5kPa CO₂, com umidade relativa entre 95 a 97% na temperatura de -0,5°C; e
- **‘Braeburn’:** 1,2kPa O₂ + 3,0kPa CO₂, com umidade relativa entre 95 a 97% na temperatura de +0,5°C.

A temperatura das câmaras frigoríficas foi controlada automaticamente por termostatos de alta precisão ($\pm 0,2^\circ\text{C}$), sendo monitorada diariamente através de termômetros com bulbo de mercúrio introduzidos na polpa de frutos.

Procedeu a avaliação da qualidade e maturação dos frutos após cada colheita através da análise das seguintes variáveis:

Síntese de etileno: Determinada para cada fruto individualmente, em recipientes com volume de 700ml, os quais foram fechados hermeticamente durante 2 horas. Para a análise da produção de etileno foram injetadas duas amostras de 1ml de gás de cada recipiente, em um cromatógrafo a gás, marca Varian, equipado com um detector de ionização por chama (FID) e coluna Porapak N80/100. A temperatura da coluna, injetor e detector foram de 90, 140 e 200°C, respectivamente. Calculou-se a síntese de etileno em $\mu\text{l C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ através da concentração desse fito-hormônio no recipiente ($\mu\text{l C}_2\text{H}_4 \text{ L}^{-1}$), da massa de frutos (kg), do volume do espaço livre no recipiente (L) e do tempo de fechamento (h).

Respiração: O ar do mesmo recipiente utilizado para a determinação do etileno foi circulado através de um analisador eletrônico de CO₂, marca Agri-datalog. A partir da concentração de CO₂, do espaço livre do recipiente, da massa dos frutos e do tempo de fechamento, foi calculada a respiração em $\text{mL CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Diâmetro de frutos: Obtido através da medição da secção transversal média de cada fruto, com auxílio de um paquímetro, sendo os valores expressos em milímetros (mm).

Peso de fruto: Determinado com o auxílio de balança digital, com resolução de um grama (g).

Densidade dos frutos: Os frutos foram colocados individualmente em recipientes com volume de 1.000ml. Após, foi completado o volume com água até 700ml. A densidade foi determinada pela relação da massa do fruto (g) dividido pela subtração do volume total que é 700ml com o volume de água gasto para completar 700ml Princípio de Arquimedes (Sestari, 2006).

Firmeza de polpa: Determinada na região equatorial do fruto em dois lados opostos, após a remoção de pequena porção da epiderme, com auxílio de um penetrômetro com ponteira de 11mm de diâmetro, , sendo os valores expressos em N.

Índice iodo-amido: Foi determinado pela reação do amido com uma solução contendo 12g de iodo metálico e 24g de iodeto de potássio em 1.000ml de água destilada. Comparou-se o escurecimento da metade peduncular dos frutos, tratados com a solução de iodo com os índices tabelados, onde o índice 01 indica o teor máximo de amido e o índice 10 representa o amido totalmente hidrolisado.

Sólidos solúveis totais (SST): Determinados por refratometria utilizando-se suco extraído das amostras de frutos, sendo a leitura determinada em °Brix, com correção do efeito da temperatura (20°C).

Acidez titulável: Quantificada em uma amostra de 10mL de suco, diluído em 100ml de água destilada e titulado com solução de hidróxido de sódio 0,1N até pH 8,1.

Suculência: Determinada através da prensagem de aproximadamente 20g de polpa de cada maçã, durante 1 minuto numa prensa pneumática desenvolvida no NPP/UFSM. Com uma força de 1.500kg foi extraído o suco de 20g da polpa colocada entre duas esponjas, que retinha o suco conforme metodologia descrita por Lunardi (2003). A quantidade de suco foi calculada pela diferença do peso inicial da amostra (20g) e o peso final (após a prensagem). A suculência foi expressa em percentagem de suco.

Degenerescência da polpa: Essa variável foi avaliada após 16 dias da aplicação dos testes predictivos no momento da colheita dos frutos e para os frutos armazenados. Essa avaliação foi realizada 12 dias depois da saída dos frutos das câmaras de armazenamento. Durante estes 12 dias os frutos foram expostos a 20°C ($\pm 0,3^\circ\text{C}$) e umidade relativa em torno de 85% ($\pm 5\%$). A degenerescência foi avaliada pelo escurecimento da polpa de cada fruto após o corte na região equatorial e expresso em percentagem de frutos afetados com este distúrbio.

Além dos atributos de maturação e qualidade, foram avaliados alguns métodos para indução rápida dos sintomas de degenerescência, como estresse com alto CO₂, infiltração de magnésio (método baseado no “status” nutricional do fruto) e aplicação de ethephon (indução

do amadurecimento). Os frutos dos métodos predictivos foram avaliados após 16 dias de exposição a 20°C ($\pm 0,3^\circ\text{C}$) e umidade relativa de 85% ($\pm 5\%$).

Estresse com alto CO₂: Utilizou-se a metodologia descrita por Volz et al. (1998) em que cada época de colheita tinha 12 repetições de 20 frutos, provenientes de cada um dos 11 pomares. Essas amostras foram acondicionadas em mini-câmaras de 250L. Injetou-se CO₂, a partir de cilindros de alta pressão, até que esse atingisse a pressão parcial de 20kPa deste gás. Assim, quatro repetições foram avaliadas, aos três, cinco e sete dias quanto à ocorrência de degenerescência da polpa.

Infiltração dos frutos com magnésio: Após a colheita, quatro amostras constituídas de 25 frutos cada, provenientes de cada um dos 11 pomares amostrados 20 dias antes da colheita comercial e na colheita comercial, foram imersas em um dessecador com capacidade de 2,5L, contendo uma solução de cloreto de magnésio 0,10M, mais 0,01% de surfactante (Tween-20) e 0,4M de sorbitol. A seguir foi aplicado vácuo de 200 ('Gala' e 'Royal Gala') ou 460mmHg ('Fuji' e 'Braeburn') com auxílio de uma bomba de vácuo por 3 minutos e 30 segundos ou 5 minutos e 30 segundos, respectivamente, conforme metodologia modificada descrita por Retamales & Valdes (1996).

Maturação acelerada: Quatro amostras constituídas de 25 frutos cada, provenientes de cada um dos 11 pomares amostrados 20 dias antes da colheita comercial e na colheita comercial, foram imersas em uma solução contendo 2.500 $\eta\text{L L}^{-1}$ de Ethephon (Ethrel[®]) mais espalhante adesivo Iharaguen[®] (0,01%) durante cinco minutos sob agitação, em seguida os frutos foram secados em ar e armazenados na câmara a 20°C, como já descrito.

Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância e comparados pela mínima diferença significativa. Foi feita a correlação dos métodos predictivos e dos parâmetros de maturação e qualidade determinados em duas épocas de colheita de diferentes pomares com a incidência de degenerescência no final do armazenamento em AC. Correlacionando com a ocorrência de degenerescência da polpa nos frutos após o armazenamento em AC, durante seis meses com os dados submetidos aos diferentes métodos predictivos e com os parâmetros físico-químicos na análise da colheita dos frutos foi possível determinar a capacidade predictiva de cada método e parâmetros de qualidade e maturação. A análise estatística foi realizada individualmente para cada cultivar com exceção das cvs. Gala e Royal Gala, que foram agrupadas antes da análise de correlação.

3.3. Resultados e discussão

Cultivares Gala e Royal Gala

Não houve diferença entre pomres quanto à incidência de degenerescência da polpa das maçãs ‘Gala’ e ‘Royal Gala’ e, além disso, a ocorrência deste distúrbio foi baixa nesse ano de 2005 (Figura 3.1).

Na análise de correlação dos atributos de qualidade avaliados na colheita e métodos predictivos com a ocorrência de degenerescência da polpa após o armazenamento, agrupando os resultados da primeira e segunda colheita (dados não mostrados), não se obteve coeficientes de correlação significativos, em todas as quatro cultivares avaliadas nesse trabalho. Nesse contexto, não foi encontrado nenhum atributo físico-químico do fruto ou teste predictivo que pudesse prever, em todas as situações, a ocorrência de degenerescência da polpa.

A baixa incidência de degenerescência da polpa durante esse ano, talvez possa ter influenciado no resultado. Como as causas deste distúrbio fisiológico em maçãs ainda não estão completamente elucidadas, e como a degenerescência da polpa não ocorre em todos os anos com a mesma frequência, alguns autores afirmam que a predição do distúrbio da maçã para um ano é válida somente para aquele ano o que vem a dificultar o desenvolvimento de métodos predictivos (Volz et al., 1998, Retamales et al., 2000, Fallahi et al., 2006, Streif, 2008). Porém, com repetições das avaliações durante vários anos, acredita-se que esse efeito “ano” possa ser incluído no modelo, ou até mesmo, encontrado uma forma para anulá-lo (Fallahi et al., 2006).

Considerando apenas a primeira colheita realizada 20 dias antes da maturação comercial (Tabela 3.1), verifica-se que houve correlação positiva da densidade na colheita com a ocorrência de degenerescência da polpa. O resultado está de acordo com algumas investigações sobre a causa de aparecimento do escurecimento da polpa em frutos, pois, a densidade pode influenciar na difusividade dos gases na polpa do fruto. A permeabilidade da polpa é considerada por Franck et al. (2007), um indutor desse distúrbio fisiológico em peras, pois, a alta densidade pode reduzir a permeabilidade da polpa aos gases, gerando um acúmulo de CO₂ no tecido, que pode causar danos, e conseqüentemente, o escurecimento deste tecido (Watkins et al., 1997). Kupferman (1997), Ceretta et al. (2003) e Streif (2008) verificaram menor escurecimento quando o fruto apresenta menor densidade, facilitando as trocas gasosas e, assim, o CO₂ não acumula os níveis tóxicos no tecido. Na segunda colheita não se obteve

coeficiente de correlação significativo entre atributos de qualidade e métodos predictivos com a degenerescência.

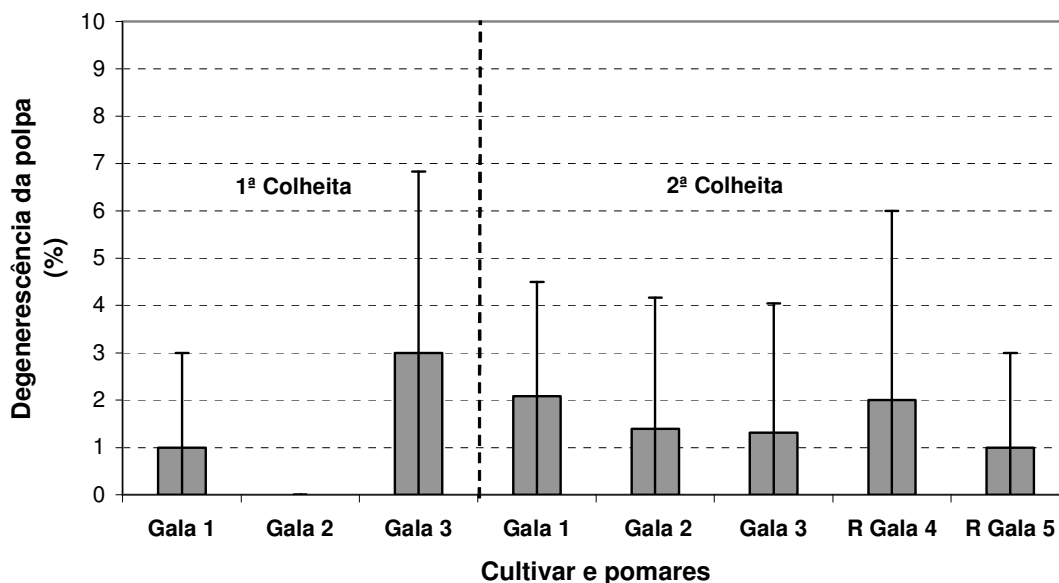


Figura 3.1: Incidência de degenerescência da polpa após seis meses de armazenamento das maçãs 'Gala' e 'Royal Gala' em atmosfera controlada e mais 12 dias a 20°C. Os valores das colunas representam a média do tratamento com a diferença mínima significativa. Santa Maria, RS, 2005.

Tabela 3.1: Índices de correlação (r^2) de degenerescência da polpa das maçãs 'Gala' e 'Royal Gala' dos diferentes pomares após seis meses de armazenamento em atmosfera controlada e mais 12 dias a 20°C, com testes predictivos e variáveis de qualidade avaliadas na colheita. Santa Maria, RS, 2005.

Parâmetros	1ª colheita	2ª colheita
Peso (g)	-0,45	0,09
Diâmetro do Fruto (mm)	-0,32	-0,02
Densidade	0,58*	0,02
Firmeza de polpa (N)	0,55	0,11
SST (°Brix)	0,46	-0,12
Índice de iodo amido	-0,15	-0,04
Produção de etileno	-0,27	-0,29
Respiração	0,31	-0,15
Suculência	-0,45	-0,16
Testes predictivos		
Controle 20°C	0,16	-0,04
Infiltração de Mg	-0,21	-0,23
Ethephon	- **	-0,14
CO ₂ três dias	-0,32	0,13
CO ₂ 20 dias	0,00	-0,13
CO ₂ 30 dias	-0,12	-0,09

Significância do coeficiente de correlação (r^2) a 5% de probabilidade de erro.

** No teste predictivo com Ethephon não houve ocorrência de degenerescência da polpa, por isso não foi possível obter coeficiente de correlação para esse parâmetro.

Cultivar Fuji

A ocorrência de degenerescência da polpa na maçã ‘Fuji’ não apresentou diferenças entre os pomares, além disso, a ocorrência deste distúrbio interno foi baixa ou nula em alguns pomares, nesse ano, assim como também ocorreu com as cultivares Gala e Royal Gala (Figura 3.2).

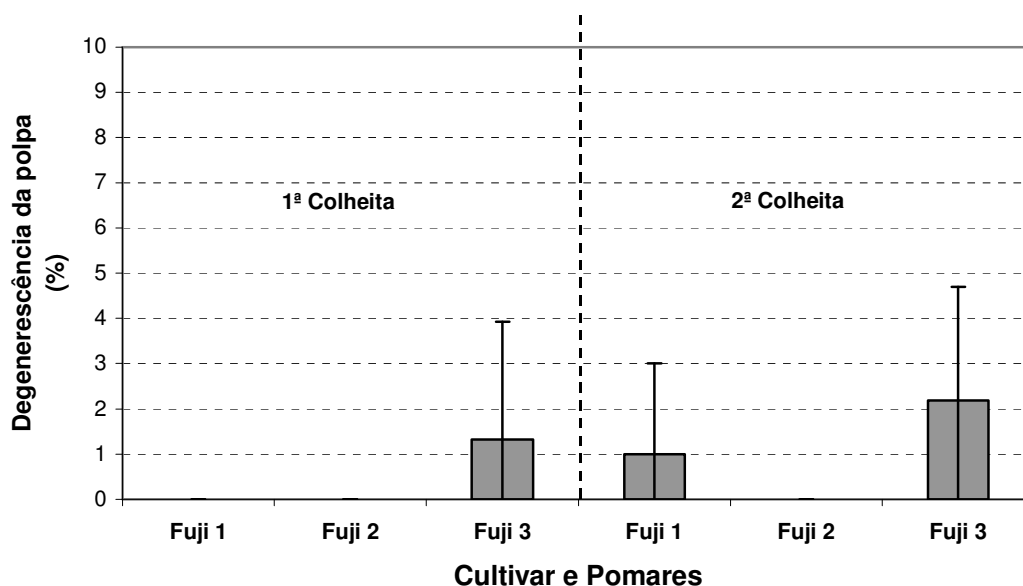


Figura 3.2: Incidência de degenerescência da polpa após seis meses de armazenamento da maçã ‘Fuji’ em atmosfera controlada e mais 12 dias a 20°C. Os valores das colunas representam a média do tratamento com a diferença mínima significativa. Santa Maria, RS, 2005.

Houve correlação de nenhum método predictivo ou parâmetro de qualidade na primeira colheita com a ocorrência de degenerescência da polpa (Tabela 3.2). Na segunda colheita houve correlação significativa de degenerescência da polpa apenas com o parâmetro SST. Para a maçã ‘Fuji’, o maior conteúdo de SST pode estar relacionado com frutos de estágio de maturação mais avançado de maturação. Frutos com maior estágio de maturação mais avançado, normalmente apresentam maior incidência do distúrbio (Franck et al., 2007).

Em trabalhos realizados em 2004 (resultados não publicados), encontrou-se resultado semelhante para essa cultivar. Este resultado também concorda com o obtido por Watkins et al., (1997) e Volz et al., (1998), que afirmam que frutos num estágio mais avançado de

maturação manifestam maior incidência de degenerescência da polpa. Castro et al. (2007) também verificaram que, em alguns casos, a colheita tardia da cv. Pink Lady aumenta a incidência desta desordem fisiológica.

Tabela 3.2: Índices de correlação (r^2) de degenerescência da polpa da maçã ‘Fuji’ de diferentes pomares após seis meses de armazenamento em atmosfera controlada e mais 12 dias a 20°C, com testes predictivos e as variáveis de qualidade avaliadas na colheita. Santa Maria, RS, 2005.

Parâmetros	1ª colheita	2ª colheita
Peso (g)	-0,13	-0,43
Diâmetro do Fruto (mm)	-0,13	-0,44
Densidade	-0,20	0,10
Firmeza de polpa (N)	-0,34	-0,10
SST (°Brix)	-0,26	0,57*
Índice de iodo amido	-0,21	0,18
Produção de etileno	-0,24	0,03
Respiração	-0,47	0,26
Suculência	-0,15	-0,12
Testes predictivos		
Controle 20°C	0,29	0,40
Infiltração de Mg	-0,07	-0,15
Ethephon	0,03	- **
CO ₂ três dias	-0,09	-0,26
CO ₂ cinco dias	-0,13	0,20
CO ₂ sete dias	-0,13	0,27

Significância do coeficiente de correlação (r^2) a 5% de probabilidade de erro.

** No teste predictivo com Ethephon não houve ocorrência de degenerescência da polpa, por isso não foi possível obter coeficiente de correlação para esse parâmetro.

Cultivar Braeburn

A cv. Braeburn apresentou maior ocorrência de degenerescência da polpa no pomar dois na primeira colheita que o pomar um na segunda colheita (Figura 3.3). Resultados semelhantes foram encontrados nos experimentos realizados na Alemanha (Neuwald et al., 2008) em que essa maior ocorrência de desordens fisiológicas internas, possivelmente pode ter ocorrido por que os frutos da primeira coleta de amostra foram colhidos num estágio de maturação muito precoce. Isso pode ser verificado através da maior firmeza de polpa (12,09kg cm⁻²) e menor índice de iodo-amido (1) na colheita desses frutos. Conseqüentemente, foi este pomar que apresentou a maior ocorrência de degenerescência da polpa, após o armazenamento.

Este resultado se confirma com a correlação significativa obtida na primeira colheita com o índice de iodo-amido (Tabela 3.3), sendo que esse coeficiente foi negativo, indicando que nesse caso, quanto menor o índice de iodo-amido, maior foi a incidência de degenerescência da polpa. Resultados semelhantes foram encontrados por Ribeiro et al. (2003) para escaldadura, distúrbio fisiológico que ocorre na epiderme do fruto. Esses autores verificaram ainda que peras colhidas precocemente são mais susceptíveis. Streif (2002) afirma que colheita precoce predispõe os frutos à escaldadura e escurecimento do miolo (“Kernhausbräune”) e, por outro lado, a colheita tardia predispõe os frutos ao escurecimento da polpa e degenerescência senescente. Estas afirmações concordam com os resultados obtidos neste trabalho de que a colheita realizada em um ótimo ponto de maturação pode proporcionar frutos com maior potencial de armazenamento sem manifestação de distúrbios fisiológicos.

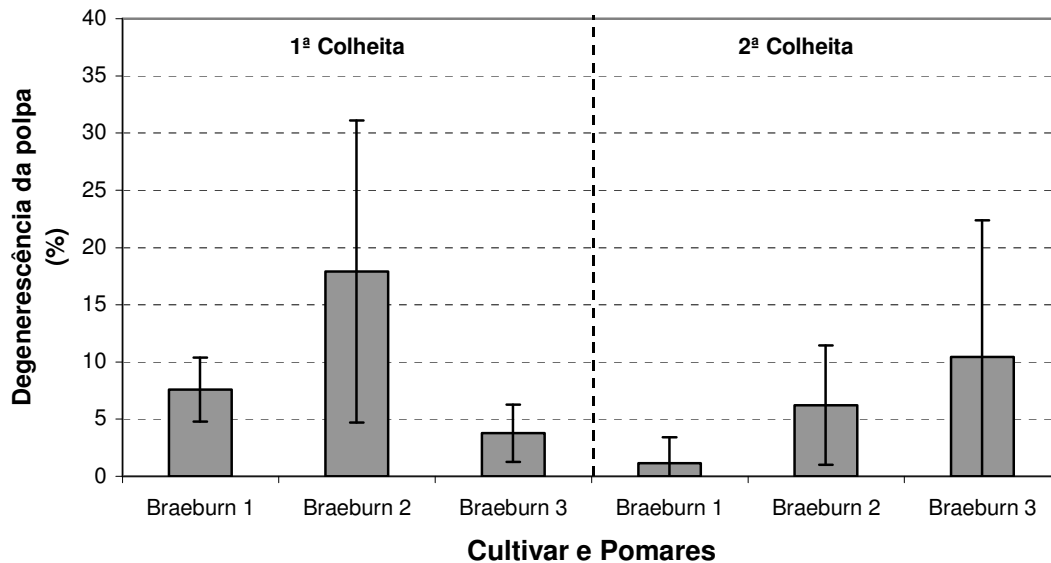


Figura 3.3: Incidência de degenerescência da polpa após seis meses de armazenamento da maçã ‘Braeburn’ em atmosfera controlada e mais 12 dias a 20°C. Os valores das colunas representam a média do tratamento com a diferença mínima significativa. Santa Maria, RS, 2005.

3.4. Conclusões

Na cv. Gala há correlação de degenerescência da polpa, com densidade do fruto, porém, somente na colheita dos frutos 20 dias antes da maturação comercial. Para a ‘Fuji’ há

correlação significativa da degenerescência da polpa apenas com SST, somente para a colheita dos frutos realizada na maturação comercial. Já para 'Braeburn', o índice de iodo-amido, apresenta correlação significativa com a degenerescência somente na colheita realizada 20 dias antes do ponto de maturação comercial.

Há baixa incidência do escurecimento de polpa, principalmente para as cultivares Gala, Royal Gala e Fuji, isso pode dificultar uma correlação dos testes predictivos e atributos de qualidade com a degenerescência da polpa.

Tabela 3.3: Índices de correlação (r^2) de degenerescência da polpa da maçã 'Braeburn' dos diferentes pomares após seis meses de armazenamento em atmosfera controlada e mais 12 dias a 20°C, com testes predictivos e as variáveis de qualidade avaliadas na colheita. Santa Maria, RS, 2005.

Parâmetros	1ª colheita	2ª colheita
Peso (g)	-0,21	0,04
Diâmetro do Fruto (mm)	-0,23	-0,24
Densidade	-0,39	-0,15
Firmeza de polpa (N)	0,38	0,12
SST (°Brix)	-0,23	0,47
Índice de iodo amido	-0,58*	0,42
Produção de etileno	-0,43	0,25
Respiração	-0,46	0,16
Suculência	0,47	-0,38
Testes predictivos		
Controle 20°C	0,20	0,07
Infiltração de Mg	0,31	0,11
Ethephon	-0,10	-0,24
CO ₂ três dias	-0,41	-0,36
CO ₂ cinco dias	-0,54	-0,05
CO ₂ sete dias	-0,54	-0,23

Significância do coeficiente de correlação (r^2) a 5% de probabilidade de erro.

3.5. Recomendação para pesquisas futuras

Para próximas pesquisas recomendam-se avaliar um número maior do que três pomares por cultivar, para aumentar o grau de significância das correlações.

3.6. Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Brasilien-Zentrum pelo fomento e possibilidade da realização do intercâmbio internacional

(doutorado-sanduíche) do Daniel Alexandre Neuwald, primeiro autor, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsas de estudo ao mesmo autor nos estudos realizados no Brasil.

CAPÍTULO 4

The chlorophyll fluorescence behaviour of ‘Braeburn’ apples under different CO₂ stress treatments at-harvest

Key words: prediction, browning disorder.

ABSTRACT

While researchers have an understanding of the biochemical and physiological basis for ‘Braeburn’ Browning Disorder (BBD). This is not yet sufficient to construct a reliable prediction method. This work explores chlorophyll fluorescence as a possible tool to predict the susceptibility of ‘Braeburn’ apples at the time of harvest for BBD. The chlorophyll fluorescence of ‘Braeburn’ apples from one orchard location was measured at-harvest, at one week and two weeks postharvest, before and after short term exposure to a range of different CO₂ stress treatments. The chlorophyll fluorescence F_v/F_m values showed changes with increasing CO₂ stress, but it was difficult to interpret these results and correlate the chlorophyll fluorescence values with possible changes in BBD susceptibility. We believe chlorophyll fluorescence needs further work to more fully evaluate its potential as a prediction tool for BBD.

4.1. Introduction

‘Braeburn’ apples are susceptible to an internal physiological browning disorder commonly referred to as ‘Braeburn’ Browning Disorder (BBD). BBD symptoms include cavity formation and internal tissue browning, but only in very severe cases do the symptoms appear visible on the outside of the fruit (Streif et al., 2001). This disorder is problematic in commercial storage practice when using Controlled Atmosphere (CA), where it can cause substantial fruit loss.

BBD occurrence varies markedly between different orchard lines (Elgar et al., 1999). The susceptibility to BBD is known to increase with increasing fruit maturity but to reduce with increasing fruit ripeness. The disorder is CO₂ related, where higher internal CO₂ concentrations in the fruit lead to a higher occurrence of the disorder (Watkins et al., 1997).

CA storage operators manage BBD risk by using an avoidance strategy, sorting fruit lines based on historical knowledge of disorder occurrence to use low risk storage regimes and to condition at-risk fruit intended for CA storage with a stand down period in regular air storage while taking care to avoid any build up of CO₂ in the storage atmosphere. This practice is referred to as delayed CA (Saquet et al., 2003).

Researchers have an understanding of the biochemical and physiological basis for BBD (Burmeister and Roughan, 1997, Xuan, 2003), but the disorder development appears too complex to allow for a reliable BBD prediction method.

Chlorophyll fluorescence can measure stress in fruit tissue (Prange et al., 2005). DeEll et al. (1995) measured chlorophyll fluorescence in fruit under low O₂ and high CO₂ stress conditions that preceded the expression of storage disorder symptoms, while Saquet and Streif (2002) measured the chlorophyll fluorescence of CA stored pears and correlated changes in chlorophyll fluorescence with the subsequent development of internal browning disorders. Storage operators now use chlorophyll fluorescence to monitor low O₂ stress in fruit, this is the basis for Dynamic Controlled Atmosphere (DCA) storage (Prange et al., 2005, Gasser et al., 2006).

Our work examines chlorophyll fluorescence in relation to the stress responses that occur when 'Braeburn' apples are exposed to a range of CO₂ conditions during the first 2 weeks of the ripening period immediately following harvest. We want to know if chlorophyll fluorescence can provide new information about 'Braeburn' fruit behaviour to allow better prediction of BBD.

4.2. Material and methods

Late harvest 'Braeburn' apples (23 October 2006, with starch pattern index 3.9 on a scale of 1 to 10) were sourced from the Fruit Research Station Kompetenzzentrum Obstbau Bodensee (KOB) in Ravensburg Southwest Germany. 15 fruit were randomly allocated into treatment groups (3 replicates of 5 fruit) and then repeatedly stress treated with either 0, 5, 10, 15, 20, 25, or 30 KPa CO₂ for 24 hours at 3 different intervals: at-harvest; at 1 week postharvest; and after 2 weeks postharvest. Between the CO₂ stress treatments all fruit were

kept in air at room temperature. Immediately prior and directly after each CO₂ stress treatment the chlorophyll fluorescence was measured at 20°C on both the shaded and sun exposed face of each apple using a PAM (Pulse Amplitude Modulation) fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany) equipped with a fiber optic probe (1cm dia.). The apples were adapted in darkness for 3 hours before each measurement and the chlorophyll fluorescence values Fo and Fm were determined with the fiber optic placed 1cm away from the fruit surface. Fo represents the minimal fluorescence measured in darkness and Fm the maximal fluorescence, while the parameter Fv/Fm (also referred to as the quantum yield) was calculated from the equation $Fv/Fm = (Fm - Fo) / Fm$.

4.3. Results and discussion

With increasing fruit ripeness there is a clear decrease the quantum yield in chlorophyll fluorescence as shown in fruit kept in ambient air, with an at-harvest Fv/Fm value of 0.70 decreasing to 0.63 after one week and 0.51 after two weeks postharvest (Fig. 4.1). This decrease in Fv/Fm appears similar to that reported by Song et al. (1997) with late harvest 'Starking Delicious' kept at 22°C in air where Fv/Fm decreased from an initial value 0.78 at-harvest to around 0.71 after 6 days.

At each of the respective stress treatments (at-harvest, one week postharvest, and two weeks postharvest) the chlorophyll fluorescence Fv/Fm value as measured directly after the CO₂ stress treatment clearly decreases as the CO₂ concentration is increased (dotted curves in Fig. 4.1).

At each CO₂ stress treatment the difference in chlorophyll fluorescence before and after stress treatment increases with increasing CO₂ concentration (Fig. 4.2).

After one week we observed no residual effect from the 'Braeburn' apples as a result of the first CO₂ stress treatment, because the before stress Fv/Fm measurements from all the CO₂ concentrations are similar (Fig. 4.1). However, this is not the case in the second week where the Fv/Fm values before stress measurements are different between CO₂ stress treatments, and the 'Braeburn' fruit previously exposed to higher CO₂ stress are changed in some way (Fig. 4.1).

Fruits' susceptibility to BBD changes markedly during the 2 or 3 week period immediately after harvest is the basis of delayed CA (Saquet, et al., 2003). These changes in BBD susceptibility occur in ambient air at 0°C and we believe they are likely to occur at a faster rate in air at ambient temperatures. However, there is little published information on

how BBD susceptibility changes during the period immediately after harvest at difference temperatures to allow us to correlate our chlorophyll fluorescence results with any possible changes in BBD susceptibility.

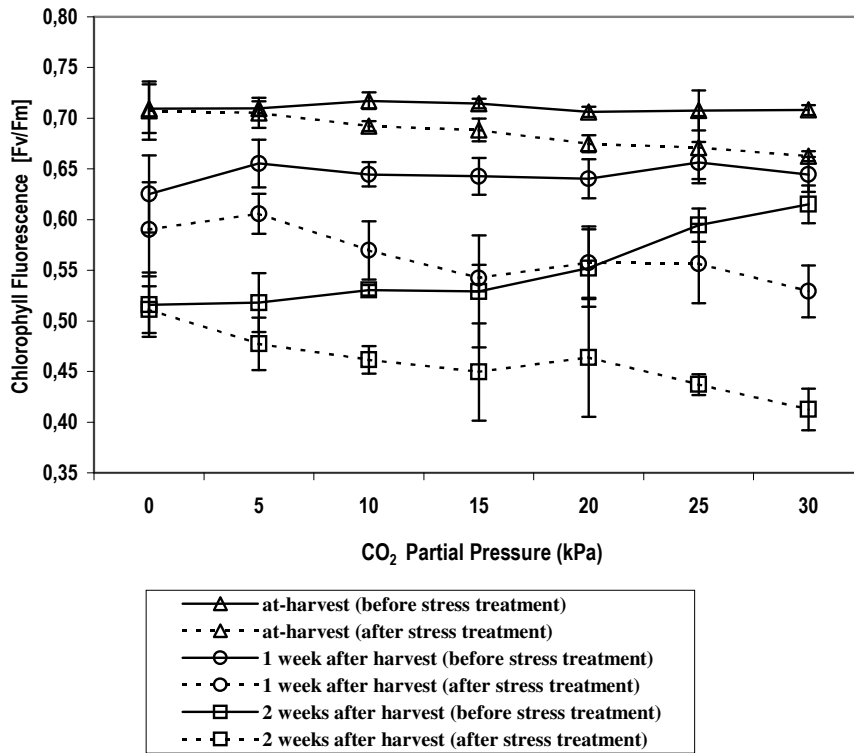


Figure 4.1: 'Braeburn' apple quantum yield of chlorophyll-fluorescence [Fv/Fm] before and after stress treatments with different CO₂ concentrations and treatment timings.

But we also know from other preliminary experiments (unpublished) we have recently undertaken at the KOB that the chlorophyll fluorescence behaviour of 'Braeburn' fruit from different orchards shows clear differences and that these differences appear consistent between different fruit samples taken at different times from the same orchard. This work together with our results presented here encourages us to continue working with chlorophyll fluorescence as a possible tool for predicting BBD.

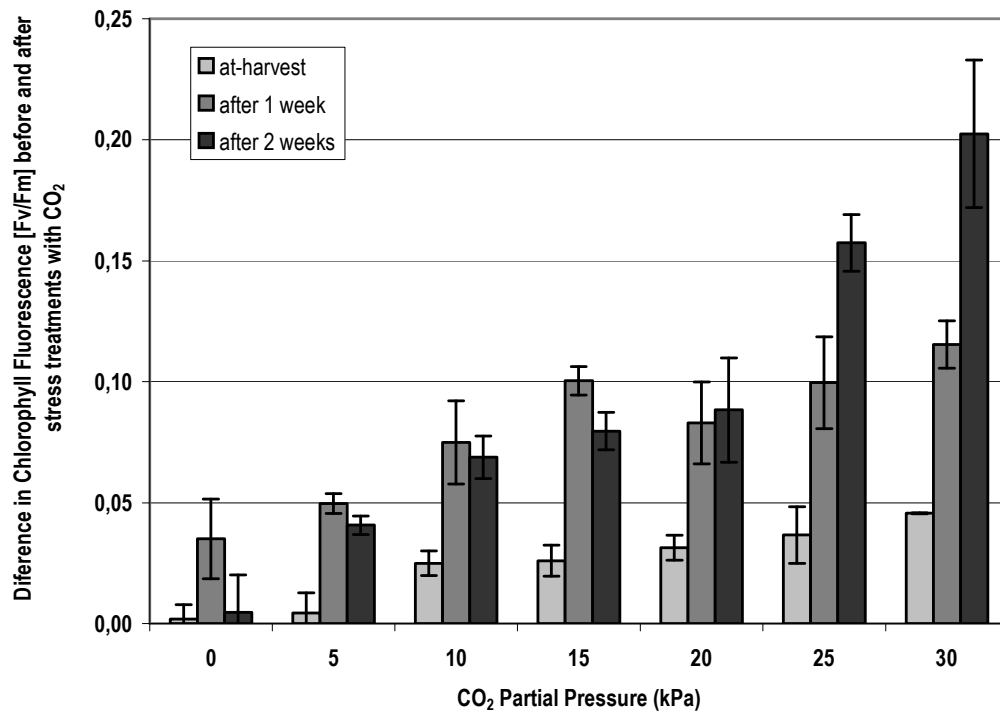


Figure 4.2: Difference in ‘Braeburn’ apple quantum yield of chlorophyll-fluorescence [Fv/Fm] before and after stress treatments with different CO₂ concentrations.

4.4. Acknowledgments

We acknowledge the international interchange of the Daniel Alexandre Neuwald, first author enabled by the FAPERGS (“Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul”, Brazil) and CNPq (“Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico”, Brazil) and the Brasilien-Zentrum, University Tübingen, Germany.

CAPÍTULO 5

Possible prediction of physiological storage disorders in 'Braeburn' apples comparing fruit of different orchards

Key words: *Malus domestica*, browning disorder, fruit quality, chlorophyll-fluorescence, mineral analyses, controlled atmosphere.

ABSTRACT

'Braeburn' apples frequently show physiological disorders during controlled atmosphere (CA) storage in which apples from different orchards or site conditions can vary considerably in their sensitivity. The aim of this research was to develop strategies to predict the occurrence of internal physiological disorders in 'Braeburn' apples and to investigate the possible reasons for differences in disorder sensitivity. Fruit from seven orchards were harvested at two picking dates and the chlorophyll fluorescence was measured before and after a stress treatment with high CO₂ concentrations (5 and 10 kPa CO₂ for 24 h). Thereafter fruit were stored at 1.5°C under CA conditions (1 kPa O₂ and 0.5 kPa CO₂) using either a rapid or delayed (delay of 10 and 24 days) establishment of CA conditions. Fruit were evaluated after two, four, and six months storage and the browning disorder occurrence related to the initial fluorescence readings. It was observed that delayed CA establishment reduced the occurrence of internal browning disorders in the apples. A positive relationship between the chlorophyll-fluorescence measurements with the simulation of CO₂ stress at-harvest and with the browning disorder occurrence during storage was found in some cases. Furthermore, it was observed that late harvested fruit showed a lower and the early harvested fruit with rapid CA establishment showed a higher occurrence of browning disorders and a good correlation between the disorder occurrence, respiration, and ethylene production at harvest. It was also observed, that mineral analyses (K, P and K/Ca ratio) showed a positive correlation with browning storage disorders.

5.1. Introduction

'Braeburn' apples are susceptible to an internal physiological browning disorder commonly referred to as 'Braeburn' Browning Disorder (BBD). BBD symptoms include cavity formation and internal tissue browning, but only in very severe cases do the symptoms appear visible on the outside of the fruit (Streif et al., 2001). This disorder is problematic in commercial storage practice when using controlled atmosphere (CA) where it can cause substantial fruit loss. BBD occurs randomly (from year to year) and is influenced by pre-harvest orchard factors (e.g. climate, harvest maturity, etc) and post-harvest factors such as storage temperature, and storage CO₂ and/or O₂ concentrations. (Lau, 1997; Curry, 1998).

BBD occurrence varies markedly between different orchard lines (Elgar et al., 1999). The susceptibility to BBD is known to increase with increasing fruit maturity but to reduce with time after harvest (Curry, 1998). The disorder is CO₂ and/or low O₂ related, where higher internal CO₂ and/or low O₂ concentrations in the fruit lead to a higher occurrence of the disorder (Watkins et al., 1997; Curry, 1998).

When stonefruit were stored in stress-inducing CO₂ and/or O₂ concentrations for a period longer than tolerable, abnormal ripening occurred, together with flesh browning and increases in ethanol and acetaldehyde content (Franck et al., 2007). CA storage operators manage BBD risk by using an avoidance strategy. They sort fruit lines based on historical knowledge of disorder occurrence to use low risk storage regimes and to condition at-risk fruit intended for CA storage with a stand down period in regular air storage while taking care to avoid any build up of CO₂ and/or lowering of O₂ in the storage atmosphere. This practice is referred to as delayed CA (Saquet et al., 2003).

Researchers have some understanding of the biochemical and physiological basis of BBD (Burmeister and Roughan, 1997, Xuan, 2003) but the disorder development appears too complex to allow for a reliable BBD prediction method.

Chlorophyll fluorescence can measure stress in fruit tissue (Prange et al., 2005). DeEll et al. (1995) measured chlorophyll fluorescence in fruit under low O₂ and high CO₂ stress conditions that preceded the expression of storage disorder symptoms, while Saquet and Streif (2002) measured the chlorophyll fluorescence of CA stored pears and correlated changes in chlorophyll fluorescence with the subsequent development of internal browning disorders. The most recent development in CA technology has been the use of chlorophyll fluorescence to monitor low O₂ stress in fruit, this is the basis for Dynamic Controlled Atmosphere (DCA) storage (Prange et al., 2005, Gasser et al., 2006).

The aim of this research was to develop strategies to predict the occurrence of internal physiological disorders in 'Braeburn' apples and to investigate the possible reasons for differences in disorder sensitivity of different orchard lines.

5.2. Material and methods

Fruit from seven orchards were sourced from the Bodensee apple growing region, South-Western Germany. Early harvest 'Braeburn' apples were picked on 10 October 2006, with starch pattern index 2.4 - 3.4 on a scale of 1-10 and firmness 9.0 - 10.7 kg/cm² and late harvest fruit on 23 October 2006, with starch pattern index 3.9 - 5.2 and firmness 8.9 - 10.0 kg/cm². Fruit were stored for 6 months at 1.5°C (± 0.5 °C) under CA-conditions (1kPa O₂ and 0.5 kPa CO₂) using either a rapid or delayed establishment of CA-conditions (delay of 10 and 24 days). For CA-storage, approximately 100 fruit per orchard per treatment were placed in 560-liter CA containers and the CO₂ and O₂ concentration were continually monitored by computer controlled gas analysers. Fruit were evaluated after two, four and six months of storage and the browning disorder occurrence was related to the initial fluorescence readings, mineral analysis (K, P, Mg and Ca), respiration and ethylene production. At harvest the chlorophyll fluorescence was measured before and after CO₂ stress as a possible predictive method. For the stress treatment high CO₂ concentrations of 5 and 10 kPa CO₂ for 24 h were used (Saquet and Streif, 2000; Neuwald et al., 2007). Three replicates of 5 fruit were randomly allocated into treatment groups and then repeatedly stress treated with 5 and 10 kPa CO₂ for 24 hours at-harvest. Immediately prior and directly after CO₂ stress treatment and after two, four and six months storage the chlorophyll fluorescence was measured at 20°C on both the shaded and sun exposed face of each apple using a PAM (Pulse Amplitude Modulation) fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany) equipped with a fiber optic probe (1cm Ø). The apples were adapted in darkness for 3 h before each measurement and the chlorophyll-fluorescence values Fo and Fm were determined with the fiber optic placed 1 cm away from the fruit surface. Fo represents the minimal fluorescence measured in darkness and Fm the maximal fluorescence, while the parameter Fv/Fm (also referred to as the quantum yield) was calculated from the equation $Fv/Fm = (Fm - Fo) / Fm$.

For respiration measurements (expressed as CO₂ release), 4 fruit from each treatment in 3 replicates were placed in gas tight jars at 20°C and continuously vented with air (Xuan and Streif, 2005). The CO₂ release was measured over a 10-day period for the at-harvest, and the two, four, and six months storage removals using an infrared CO₂-analyser (Hartmann and

Braun GMBh, Germany). For the ethylene analysis, headspace gas samples (1 ml) were taken from the glass jars which were previously closed for ethylene enrichment for 2 h and then injected into a GC (Varian, 2700 Series) equipped with an aluminium oxide column heated to 100°C and fitted with a FID-detector at 150°C.

For monitoring the physiological disorders, fruit were cut transversally through the equatorial region and scored for flesh browning and cavities. The disorders were scores by a scale from 1 to 10.

Statistical analysis: The at-harvest fluorescence measurements from all 7 orchard and harvest date combinations were used in a correlation analysis with physiological disorders indices and tested for significance (T test).

5.3. Results and discussion

Delayed CA storage reduced the occurrence of internal browning disorders in the apples (Fig. 5.1 A, B, C and D). In the late harvest fruit, the delayed CA treatment reduced (by approximately 20%) the internal browning disorders occurrence compared with immediate CA and this difference is much higher than that found at the early harvest. Saquet et al. (2003) also observed that delayed CA establishment reduces BBD risk. This result is probably an adaptation of the fruit to a gradual lowering in its metabolism, first with a reduction by temperature and then a further reduction through CA establishment. Fruit under delayed CA treatments experience two low amplitude stresses compared with fruit where both the temperature and CA establishment occur at same time, and so avoid cell damage and development of BBD. Fruit under immediate CA showed a greater occurrence of BBD. This level of stress resulted in greater damage to the fruit tissue, possibly from the shortage of O₂ and extreme restriction in the energy metabolism causing accumulation of ethanol, acetaldehyde and etil acetate (Ke et al., 1991; Saquet et al., 2003).

Late harvest and immediate CA-stored fruit showed a lower browning disorders occurrence than early harvest and immediate CA-stored apple during storage (Fig. 5.1 B and D). This unexpected result is in contrast with former harvest and storage experience (Saquet et al., 2003). Also other researchers have shown that late harvested 'Braeburn' are susceptible to a higher occurrence of BBD (Lau, 1997; Curry, 1998). The higher browning occurrence of early picked apples in our experiment may be only explained by specific climate influences of the growing season.

On the other hand these fruit (Fig. 5.1 B and D) showed a good correlation between post-storage disorder occurrence, and the respiration and ethylene production as measured at-harvest (Table 5.1). Similar correlations have also been found by East et al. (2005) working with internal browning disorders in Pink Lady apples.

A negative relationship between the chlorophyll-fluorescence measurements made at-harvest with the CO₂ stress and with the browning disorder occurrence post storage was found only in some cases. Volz et al. (1998) found a relationship between CO₂ stress at-harvest and flesh browning in ‘Fuji’ apples when working with stress applications of 20 and 50 kPa and 3, 5 and 7 days. In our experiment, however, a 24 h stress period may have been too short to get comparable results. Therefore in a current investigation we are working with longer stress periods of 3 days as used by Volz et al. (1998), with the objective to achieve one at-harvest measurement to predict BBD occurrence after storage.

The K/Ca ratio, K and P levels showed positive correlations with browning disorders (Table 5.1). K has the best correlation with BBD being a promising mineral element for mathematic models to predict BBD. K is responsible for the activation of some enzymes and is an antagonist of Ca, so K alone or as a K/Ca ratio is a possibility for BBD prediction (Taiz and Zeiger, 2004; Altherr et al., 1995). P can also be a good alternative for BBD prediction, as it is involved in energy metabolism that is possibly linked to the appearance of the BBD symptoms (Saquet and Streif, 2002). Milani and Hamedí (2005) also showed that some apple cultivars are sensitive to enzymatic browning, and use P and K as co-factors to activate certain enzymes, and this could be a way to predict BBD.

5.5. Acknowledgments

We acknowledge the international interchange of the first author enabled by the FAPERGS (“Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul”, Brazil) and CNPq (“Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico”, Brazil) and the Brasilien-Zentrum, University Tübingen, Germany

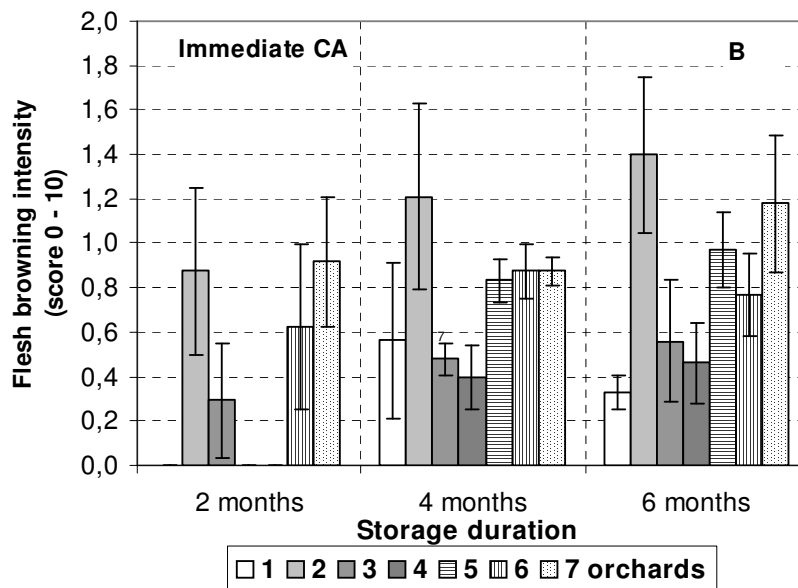
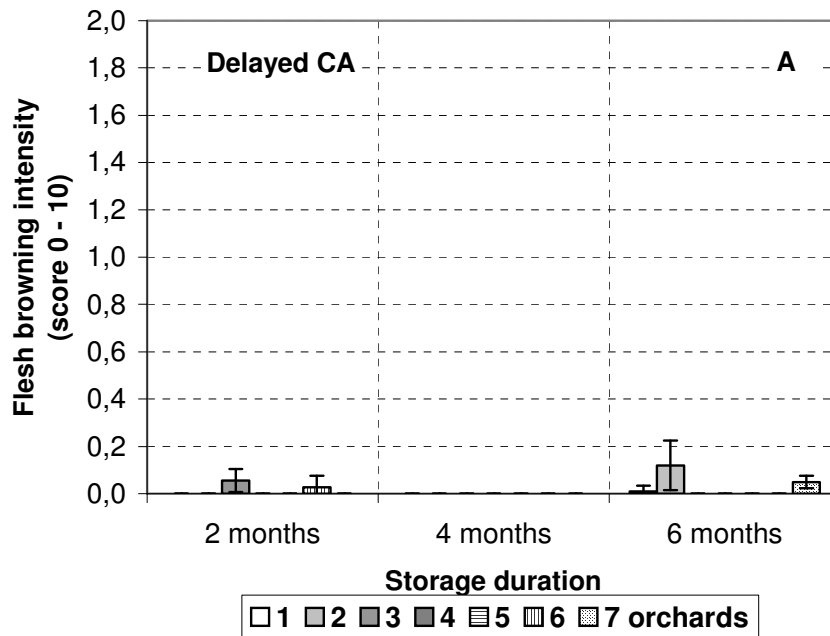


Figure 5.1: Flesh browning intensity score of 7 different orchards during 6 months storage (A) first harvest and delayed CA; (B) first harvest and immediate CA; (C) second harvest and delayed CA; and (D) second harvest and immediate CA of 'Braeburn' apples.

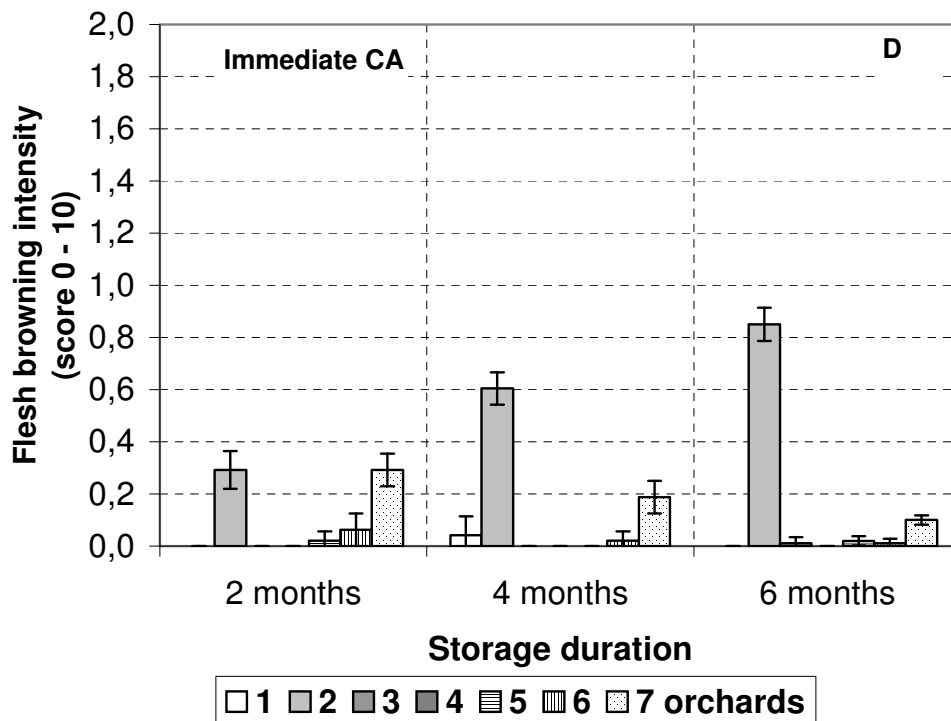
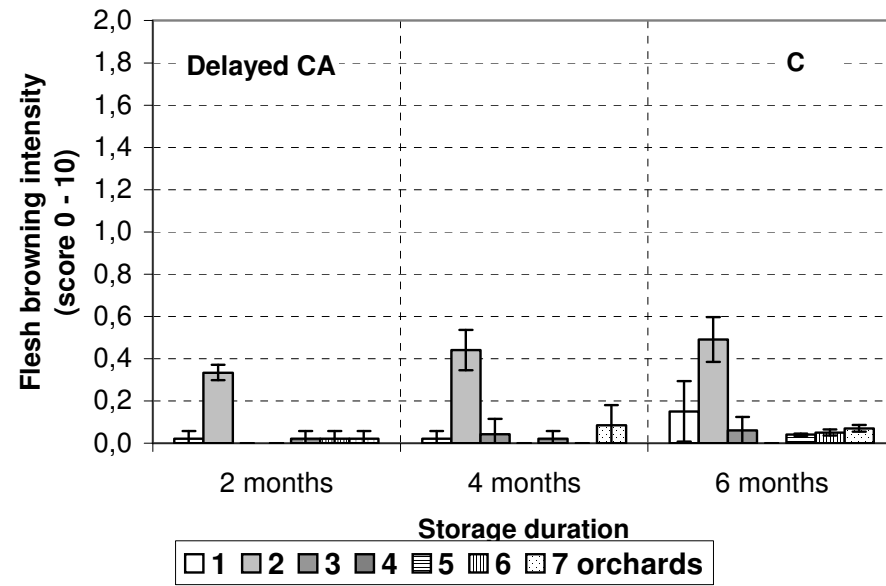


Figure 5.1: Flesh browning intensity score of 7 different orchards during 6 months storage (A) first harvest and delayed CA; (B) first harvest and immediate CA; (C) second harvest and delayed CA; and (D) second harvest and immediate CA of 'Braeburn' apples.

Table 5.1: Correlation coefficients (r^2) between some fruit parameters and browning disorders in 'Braeburn' apples of different harvest times and storage regimes. Ravensburg, Germany, 2007.

	Harvest 1		Harvest 2	
	delayed	Immediate	delayed	Immediate
Difference Fo	-0,89**	ns	ns	ns
K/Ca	0,84*	ns	ns	0,88*
K	0,83*	ns	0,82*	0,76*
P	ns	ns	ns	0,75*
Ethylene at day 1	ns	ns	0,90**	0,83*
Ethylene at day 10	-0,89**	ns	ns	ns
Respiration at day 9	0,81*	-0,75*	ns	ns
Respiration at day 10	-0,86*	-0,78*	ns	ns

ns Not significant; *0.01 < P < and = 0.05; ** P < and = 0,001

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a cv Fuji os parâmetros que apresentaram correlação significativa com a manifestação de degenerescência da polpa, após o armazenamento em AC e vida de prateleira são: teor de suco na polpa dos frutos (válido apenas para AC em alto CO₂) e SST (válido apenas para AC em baixo CO₂, na maturação comercial). Há necessidade de repetição do trabalho em diferentes anos e pomares para viabilizar o uso da previsão de ocorrência de distúrbios fisiológicos, através da análise de atributos de maturação e qualidade no momento da colheita. Ocorre interação da degenerescência da polpa dos diferentes pomares e condições de AC, o que dificulta uma previsão utilizando diferentes condições de AC. A correlação das avaliações iniciais com a incidência de desordens fisiológicas depende de cada condição de AC.

Para a cv. Gala, nas condições ideais de armazenamento em AC, ocorre correlação de degenerescência da polpa com densidade do fruto somente na colheita precoce.

Para 'Braeburn', nas condições ideais de armazenamento em AC, o índice de iodo-amido apresenta correlação significativa com a degenerescência somente na colheita precoce. A fluorescência de clorofila, após o estresse por alto CO₂ pode prever a ocorrência de degenerescência somente na colheita precoce e com atraso na instalação da AC. A análise nutricional dos frutos, destacando o nível de K, pode prever a ocorrência de degenerescência da polpa durante o armazenamento em AC. A colheita realizada no ponto ótimo de maturação proporciona maior potencial de armazenamento, mantendo a qualidade dos frutos sem incidência de degenerescência.

A ocorrência da degenerescência da polpa é esporádica, portanto estes experimentos devem ser repetidos para estabelecer um padrão metodológico.

BIBLIOGRAFIA

Altherr, K.; Bangerth, F.; Link, H.; Streif, J. **Prognose zum Lagerverhalten von Äpfeln, Abschlußbericht, Kompetenzzentrum Obstbau Bodensee**. Ravensburg : Universität Hohenheim – KOB. 1995. 37p.

Amarante, C. V. T.; Ernani, P. R.; Chaves, D. V. Fruit infiltration with magnesium is a feasible way to predict bitter pit susceptibility in Gala apples grown in Southern Brazil. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 682, p. 1271-1274, 2005.

Argenta, L. C.; Brackmann, A.; Mondardo, M. Qualidade pós-colheita de maçãs armazenadas sob diferentes temperaturas e concentrações de CO₂ e O₂. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.6, n.2, p.121-126, 1994.

Argenta, L. C. Fisiologia pós-colheita: Maturação, colheita e armazenamento dos frutos. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002. 743p. p. 691 – 732.

Argenta, L. C.; Fan, X.; Mattheis, J. Impact of watercore on gas permeance and incidence of internal disorders in ‘Fuji’ apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 24, n. 1, p. 113 – 122, 2002.

Bangerth, F.; Dilley, D. R.; Dewey, D. H. Effect of postharvest calcium treatments on internal breakdown and respiration of apple fruits. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.97, p.679-682, 1972.

Baumann, H.; Henze, J. Intercellular space volume of fruit. **Acta Horticulturae**, n.138, p.107-111, 1983.

Behr, H. **Kürräume für die Gaslagerung von Obst und Gemüse**. KWK aktuell (Berichte aus der Kälte-, Wärme-, Klima- und Regeltechnik), 1975. 151 p.

Bender, J. R. Colheita e armazenagem. In: **Manual da cultura da macieira**. Florianópolis, EMPASC, 1986. 562p. p.521-562.

Blanpied, G. D.; Jozwiak, Z. J. A study of some orchard and storage factors that influence the oxygen threshold for ethanol accumulation in stored apples. In INTERNATIONAL

CONTROLLED ATMOSPHERE RESEARCH CONFERENCE, 6, **Proceedings...** v.1, p.78-86, 1993. University of Cornell, Ithaca, 1993.

Bowen, J. H.; Watkins, C. B. The effect of watercore severity on carbohydrate levels in “Fuji” apples. In: POSTHARVEST, 1996, Taupo. **Abstracts**. Taupo, 1996, p.152.

Bowen, J. H.; Watkins, C. B. Fruit maturity, carbohydrate and mineral content relationships with watercore in ‘Fuji’ apples. **Postharvest Biology and Tehnology**, v. 11, p. 31 – 38, 1997.

Brackmann, A.; Ribeiro, N. D. Desordens fisiológicas em macieira induzidas por deficiência de cálcio e seu controle. **Ciência Rural**, v.22, n.2, p.247-253, 1992.

Brackmann, A.; Saquet, A. A. Efeito das condições de atmosfera controlada sobre a ocorrência de degenerescência em maçã ‘Fuji’. **Scientia Agricola**, v.52, n.2, p.263-267, 1995.

Brackmann, A.; Chitarra, A. B. Atmosfera controlada e atmosfera modificada. In: Borén, F. M. (Ed.) **Armazenamento e processamento de produtos agrícolas**. Lavras: SBEA, 1998, p.133-170.

Brackmann, A., Bortoluz, L., Bortoluzzi, G. Frigoconservação de maçãs ‘Fuji’ em duas temperaturas e em atmosfera controlada. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.4, n.1, p.26-30, 1998.

Brackmann, A., Bortoluzzi, G., Bortoluz, L. Controle da degenerescência da polpa da maçã Fuji com concentrações dinâmicas de O₂ e CO₂ e redução da umidade relativa durante o armazenamento em atmosfera controlada. **Ciência Rural**, v.29, n.3, p.459-463. 1999.

Brackmann, A.; Steffens, C. A.; Neuwald, D. A. et al Armazenamento de maçã ‘Royal Gala’ sob diferentes concentrações de etileno. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 6, n. 1, p. 39 – 41, 2000.

Brackmann, A., Waclawovsky, A. J., Donazzolo, J. Resposta da maçã cv. Fuji no armazenamento em atmosfera controlada. **Ciência Rural**, v.31, n.6, p.953-956, 2001.

Brackmann, A., Neuwald, D. A., Steffens, C. A. Armazenamento de maçã ‘Fuji’, com incidência de pingo de mel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.3, p.526-531, 2001b.

Brackmann, A.; Steffens, C. A.; Neuwald, D. A. et al Armazenamento de maçã ‘Gala’ em atmosfera controlada com remoção de de etileno. **Ciência Rural**, v. 336, n. 4, p. 647 – 650, 2003.

Brackmann, A.; Pinto, J. A. V.; Weber, A.; Neuwald, D. A.; Steffens, C. A. Indução da perda de massa fresca e a ocorrência de distúrbios fisiológicos em maçãs ‘Royal Gala’ durante o armazenamento em atmosfera controlada. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa (Prelo). 2008.

Burmeister, D.M.; Roughan, S. 1997. Physiological and biochemical basis for the ‘Braeburn’ Browning Disorder (BBD). Proceedings of the. 7th International Controlled Atmosphere Research Conference, Davis, CA, v. 2, p.126-131.

Calbo, A. G. & Sommer, N. F. Intercellular volume and resistance to air flow of fruits and vegetables. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.112, n.1, p.131-134. 1987.

Cassells, A. C. & Doyle, B. M. Genetic engineering mutation breeding for tolerance to abiotic and biotic stress: science, technology and safety. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Special Issue, p. 52 – 82, 2003.

Castro, de E.; Biasi, B.; Mitcham, E.; Tustin, S.; Tanner, D.; Jobling, J. Carbon Dioxide-induced flesh browning in Pink Lady apples. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v. 132, n. 5, P. 713 – 719. 2007.

Ceretta, M.; Neuwald, D. A; Brackmann, A. Permeabilidade da polpa de maçã ‘Fuji’ ao CO₂. In: JORNADA ACADÊMICA INTEGRADA, 16, 2002, Santa Maria. **Anais... (CD)** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 2002 trabalho nº 1163.

Ceretta, M. **Tolerância de maçã ‘Gala’ e ‘Fuji’ a baixas temperaturas e extremas pressões parciais de O₂ e CO₂ durante o armazenamento em atmosfera controlada.** 2003. 70p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2003.

Chitarra, M. I. F.; Chitarra, A. B. 2005. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio.** 2 ed. rev. e ampl. Lavras, UFLA. 783 p.

Clarck, C. J.; MacFall, J. S.; Bielecki, R. L. Amelioration of watercore in 'Fuji' apple viewed by two-and-three-dimensional nuclear magnetic resonance imaging. In: PH 96 INTER. POSTHARVEST SCI, CONF., 1996, Taupo. **Abstracts...** Taupo, 1996. p.90. p.76.

Cosgrove, D. J. Creeping walls, softening fruit and penetrating pollen tubes: The role of expansins. **Proceedings of the National Academy of Science (USA)**, v. 94, p. 5504 – 5505, 1997

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

Curry, E. A. 1998. Physiology of Braeburn maturity and disorders: a discussion. Postharvest Information Network, 8. <http://postharvest.tfrec.wsu.edu/pgDisplay.php?article=PC98P>

Curry, E. Factors contributing to lenticel breakdown. **Postharvest Information Network**, 4p. **2002 Disponible** <<http://postharvest.tfrec.wsu.edu/PC2002B.pdf>>.

Curry, E. Factors associated with apple lenticel breakdown. **Postharvest Information Network**, 9p. **2003 Disponible** <<http://postharvest.tfrec.wsu.edu/REP2003B.pdf>>.

Dadzie, B. K. et al. Role of skin resistance in the response of fruit to modified atmospheres. **Acta Horticulturae**, n.343, p.129-134, 1993.

DeEll, J. R., Prange, R. K.; Murr, D. P. Chlorophyll fluorescence as a potential indicator of controlled atmosphere disorders in 'Marshall' McIntosh apples. **HortScience** v. 30, n. 5, p. 1084 - 1095, 1995.

DeEll, J. R.; Prange, R. K.; Murr, D. P. Chlorophyll fluorescence techniques to detect atmospheric stress in stored apples. **Acta Horticulturae**, v. 464, p. 127 – 131, 1998.

East, A.R., Mawson, A.J. Maguire, K.M, Tanner, D. and Jobling, J. Using the respiration rate of 'Pink Lady' apples as an indicator of their susceptibility to the flesh browning disorder. **Acta Horticulturae** v. 682, p. 2085 – 2090, 2005.

Elgar, H. J., Watkins, C.B.; Lallu, N. Harvest date and crop load effects on a carbon dioxide related storage injury of 'Braeburn' apple. **HortScience** v. 34, n .2, p, 305-309, 1999.

Eksteen, G. J.; Ginsburg, L.; Visage, T. R. Postharvest prediction of bitter pit. **The Deciduous Fruit Grower**, v. 27, n. 1, p. 16-20, 1977.

EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis : EPAGRI, 2002. 743p.

Fallahi, E., Fallahi, B., Retamales, J.B., Valdés, C. and Tabatabaei, S.J. Prediction of apple fruit quality using preharvest mineral nutrients. **Acta Horticulturae** (ISHS), v. 721, p. 259-264, 2006.

Fan, X. **Maturity and storage of 'Fuji' apples**. Washington: Washington State University, 1992. 201p. Thesis (Master Science in Horticulturae) – Washington State University, 1992.

Ferguson, I. B.; Watkins, C. B. Bitter pit in apple fruit. **Horticultural Review**, v.11, p. 289-355, 1989.

Franck, C.; Lammertyn, J.; Tri Ho, Q.; Verboven, P.; Verlinden, B.; Nicolai, B. M. Browning disorders in pear fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 43, n. 1, p. 1 – 13, 2007.

Frenkel, C.; Patterson, M. E. Effect of carbon dioxide on activity of succinic dehydrogenase in 'Bartlett' pears during cold storage. **HortScience**, v.8, p. 395-396, 1973.

Gasser F., Höhn, E., Streif, J.; Kitemann, D. Aktuelle lagertechnische Themen. Schweiz. **Z. Obst-Weinbau**, v. 21, p. 12-13, 2006.

Gout, E. ; Boisson, A. M.; Aubert, S. et al. Origin of the cytoplasmic pH changes during anaerobic stress in higher plant cells. Carbon-13 and phosphorus 31 nuclear magnetic resonance studies. **Plant Physiology**, v. 125, p. 912 – 925, 2001.

Gran, C. D.; Beaudry, R. M. Modified atmosphere packaging determination of lower oxygen limits for apple fruit using respiratory quotient and ethanol accumulation. In INTERNATIONAL CONTROLLED ATMOSPHERE RESEARCH CONFERENCE, 6, **Proceedings...** v.2, p.54-62, 1993. University of Cornell, Ithaca, 1993.

Grant, J.; Mitcham, B.; Biasi, B. *et al.* Late harvest, high CO₂ storage increases internal browning of 'Fuji' apples. **California Agriculturae**, v.50, p.26-29, 1996.

Jones, R. G. W.; Lunt, O. R. The function of calcium in plants. **Botany Review**, v.33, p.407 - 426, 1967.

Ke, D., Rodriguez-Sinobas, L.; Kader A. A. Physiology and prediction of fruit tolerance to low oxygen atmospheres. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v. 116, n. 2, p. 253 – 260, 1991.

Kupferman, E. Controlled atmosphere storage of apples. In INTERNATIONAL CONTROLLED ATMOSPHERE RESEARCH CONFERENCE, 7, **Proceedings...** v.2, p.1-30, 1997. University of California, Davis, 1997.

Lau, O.L. 1997 Influence of Influence of climate, harvest maturity, waxing, O₂ and CO₂ on browning disorder of Braeburn Apples. In: INTERNATIONAL CONTROLLED ATMOSPHERE RESEARCH CONFERENCE, 7, Proceedings... 2:126-131.

Lidster, P. D. Storage humidity influences fruit quality and permeability to ethane in 'MacIntosh' apples stored in diverse controlled atmospheres. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.115, n.1, p. 94 - 96, 1990.

Luchi, V. L. & Luchi, T. Descrição dos distúrbios fisiológicos da macieira. In: **Distúrbios fisiológicos nutricionais em macieira**. Florianópolis, EPAGRI, 2001. 74p. p.12-61.

Lunardi, R. **Suculência e solubilização de pectinas em maçãs 'Gala' após o armazenamento refrigerado ou atmosfera controlada**. 2003. 67p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2003.

Lurie, S.; Ronen, R.; Meier, S. 1994, Determining Chilling injury induction in green peppers using nondestructive pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 119, n. 1, p. 59-62, 1994.

Marlow, G. C. & Loescher, W. H. Watercore. **Horticultural Review**, v. 6, p. 189 - 251, 1984

Marschner, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 2 ed., 889p., 1997.

Medeiros, E. A. A.; Efeito do tempo de resfriamento, temperatura de armazenamento e concentração de oxigênio sobre a qualidade da maçã 'Fuji' conservada em atmosfera controlada. 1999. 54p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1999.

Meheriuk, M. CA Storage of apples In: **Controlled Atmosphere Research Conference**, 5., Wenatchee (USA), 1989, v.2. p.257-284.

Milani, J.; Hamed, M. Susceptibility of five apple cultivars to enzymatic browning. *Acta Horticulturae* (ISHS) v. 682, p. 2221 – 2226, 2005.

Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants, and stress tolerance. **Trends Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405 – 410, 2002.

Mittler, R.; Vanderauwera, S.; Gollery, M; Breusegem, F. V. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends Plant Science**, v. 9, n. 10, p. 490 – 498, 2004.

Mooning, A. Studies on the reation of Krebs cycle enzymes from apple tissue (cv. Cox Orange) to increased levels of CO₂. **Acta Horticulturae**, v.138, p.113-119, 1983.

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

Neuwald, D. A.; Sestari, I.; Pinto, J. A. V.; Weber, A.; Giehl, R. F. H.; Brackman, A. Previão de distúrbios fisiológicos internos em maçã 'Fuji'. In: JORNADAS DE JÓVENES INVESTIGADORES DE AUGM, 13, 2005, S M Tucumán. **Trabajos Completos (CD)** S M Tucumán : Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM) e Universidad Nacional de Tucumán, 2005 trabalho nº CA 0707 UFSM.

Neuwald, D.A., McCormick, R.J., Kitemann, D., Streif J. The chlorophyll fluorescence behaviour of 'Braeburn' apples under different CO₂ stress treatments at-harvest. **Acta Horticulturae**, Proceedings of COST924 Novel approaches for the control of postharvst diseases and disorders. 2007 (Prelo).

Park, Y. M.; Blanpied, G. D.; Joswiak, Z. *et al.* Postharvest studies of resistance to gas diffusion in McIntosh apples, **Postharvest Biology and Technology**, v.2, p.329-339, 1993.

Prange, R. K. ; DeLong, J. M.; Leyte, J. C.; Harrison, P. A. Oxygen concentration affects chlorophyll fluorescence in Chlorophyll-containing fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 24, p.201-205, 2002.

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

Prange, R. K.; DeLong, J. M.; DeLong, J. M.; Daniels-Lake, B. J.; Harrison, P. A. Innovation in controlled atmosphere technology. **Stewart Postharvest Review**, v. 3, n. 9, p. 1 – 11, 2005.

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

Rabus, C. **Entwicklung eines Simulationsmodells zur Berechnung von fruchtinternen Atmungs- und Diffusionsvorgängen am Beispiel der Apfelsorte Braeburn**. 2002, 168p. Stuttgart: Verlag Grauer. Tese (Doutorado) – Universität Hohenheim, Stuttgart, 2002.

Rajapaksen, N. C.; Banks, N. H.; Hewett, E. W. *et al.* Development of oxygen concentration gradients in flesh tissues of bulky plant organs. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.115, n.5, p.793-797, 1990.

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

Retamales, J. B. *et al.* Bitter pit prediction in apples through Mg infiltration. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.512, p. 169 - 179, 2000.

Ribeiro, C. J. O., Nazaré-Pereira, J., Sobreiro, R.H.; Veltman, R.H. 2003. Influence of orchard, harvest date and controlled atmosphere, on storage quality of “Rocha” Pear. **Acta Horticulturae** v. 599, p. 639 - 645. http://www.actahort.org/books/599/599_83.htm

Ruess, F.; Stösser, R. Das Interzellularvolumen von Apfelfrüchten und seine Beziehung zur Lagerfähigkeit. **Erwerbsobstbau**, v.35, n.5, p.129-133, 1993.

Saquet, A. A.; Efeito das temperaturas e concentrações de CO₂ e O₂ sobre a qualidade da maçã cultivar Gala durante o armazenamento em atmosfera controlada. Santa Maria, RS : UFSM, 1997. 105 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1997.

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

Saquet, A. A.; Streif, J.; Bangerth, F. On the involvement of adenine nucleotides in the development of brown heart in 'Conference' pears during delayed controlled atmosphere storage. **Gartenbauwissenschaft**, v. 66, n. 3, p. 140 - 144, 2001.

Saquet, A.A. **Untersuchungen zur Entstehung physiologischer Fruchterkrankungen sowie zur mangelhaften Aromabildung von Conference Birnen und Jonagold Äpfeln unter verschiedenen CA-Lagerbedingungen**. Tese de Doutorado. Stuttgart: Verlag Grauer, 2001, 191p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universität Hohenheim, Stuttgart, 2001b.

Saquet, A. A.; Streif, J. Chlorophyll Fluorescence as a predictive method for detection of browning disorders in 'Conference' pears and 'Jonagold' apples during controlled atmosphere storage. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 571 – 576, 2002.

Saquet, A. A.; Streif, J. Respiração e produção de etileno de maçãs armazenadas em diversas concentrações de oxigênio. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 8, n. 1, p. 71-75, 2002.

Saquet, A. A.; Streif, J. Chlorophyll Fluorescence as a predictive method for detection of browning disorders in 'Conference' pears during controlled atmosphere storage. **Acta Horticulturae**, v. 596, p. 863 - 866, 2002.

Saquet, A. A., Streif, J.; Bangerth, F. Reducing internal browning disorders in 'Braeburn' apples by delayed controlled atmosphere storage and some related physiological and biochemical changes. **Acta Horticulturae**, n. 628, p. 453 - 458, 2003.

Schreiber, U.; Bilger, W.; Neubauer, C. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze, E. D.; Calwell, M. M. (eds) **Ecophysiology of photosynthesis**. Berlin : Springer, v. 100, p. 49 – 70, 1994.

Sestari, I. **Avaliação de métodos para predição do potencial de ocorrência de “bitter pit” em maçãs**. 2006. 86p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

Sestari, I.; Neuwald, D. A.; Saquet, A. A.; Streif, J.; Brackman, A. Relação entre parâmetros de qualidade e índice de maturação na colheita com a incidência de ‘bitter pit’ em maçãs ‘Gala’ e ‘Royal Gala’ após o armazenamento. In: CONGRESO IBEROAMERICANO DE TECNOLOGÍA POSTCOSECHA Y AGROEXPORTACIONES, 5, 2007, Cartagena. **Trabajos Completos (Pen drive)** Cartagena : Asociación Iberoamericana de Tecnología Postcosecha (AITEP) e Grupo de Postrecolecciones y Refrigeración da Universidad Politécnica de Cartagena, 2007. p. 307 – 311, trabalho nº S2 – P194.

Smillie, R. M.; Hetherington, S. E.; Nott, R.; et al. Application of chlorophyll fluorescence to the postharvest physiology and storage of mango and banana fruit and the chilling tolerance of mango cultivars. **Asean Food Journal**, v. 3, p. 55 - 59, 1987.

Song, J., Deng, W., Beaudry, R. M., and Armstrong, P. R. Changes in chlorophyll fluorescence of apple fruit during maturation, ripening, and senescence. **HortScience**, v. 32, n. 5, p. 891 – 896, 1997.

Stoll, K. Der Apfel Zürich Enrico Negri AG, Buch- und Offsetdruckerein,. 1997, 303pp.

Streif, J. Jod-Stärke-Teste zur Beurteilung der Fruchtreife bei Äpfeln. **Obst und Garten**, v. 8, p. 14, 1984.

Streif, J., Saquet, A. A., and Xuan, H. Ca-related disorders of apples and pears. **Acta Horticulturae**, v. 600, p. 223 - 230, 2001.

Streif, J. **14 Ernte, Lagerung, Sortierung und Verpackung**. In: Lucas`Anleitung zum Obstbau, 32. Auflage, Ulmer p. 338 – 369, 2002.

Streif, J. Internal browning disorders in stored Pip fruit. **Acta Horticulturae EurAsia** 2007, 2008 (Prelo).

- Taiz, L. & Zeiger, E. 2004. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 719p.
- Toivone, P. M. A.; DeEll, J. R. Chlorophyll fluorescence, fermentation product accumulation, and quality of stored broccolis in modified atmosphere packages and subsequent air storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 23, p. 61-69, 2001.
- Vandeven, M. J.; Holub, O. Gohlke, C. et al. Fast, Macroscopic chlorophyll fluorescence lifetime imaging of apple fruit skin. **Biophys. J. (Annual Meeting Abstracts)**, v. 82, n. 1, p. 502, 2002.
- Veltman, R. H.; Verschoor, J. A.; Ruijsch van Dugteren, J. H. Dynamic control system (DCS) for apples (*Malus domestica* Borkh. cv 'Elstar'): optimal quality trough storage based on product respnse. **Postharvest Biology and Technology**, v. 27, p. 79 – 86, 2003.
- Volz, R. K.; Biasi. W. V.; Grant, J. A. et al. Prediction of controlled atmosphere- induced flesh browning in 'Fuji' apple. **Postharvest Biology and Tehnology**, v. 13, n. 7, p. 1231 – 1234, 1998.
- Volz, R. K., Biasi, W. V., Grant, J.A. *et al.* Fermentative volatile production in relation to carbon dioxide-induced flesh browning in 'Fuji' apple. **HortScience**, v.33, n.7, p.1231-1234, 1998b.
- Wang, S. Y.; Wang, P. C.; Faust, M. Non-destructive detection of watercore in Apple with Nuclear Magnetic Resonance Imaging. **Scientia Horticulturae**, v. 35, p. 227 – 234, 1988.
- Watkins, C.B., Burmeister, D. M., Elgar, H. J., and Liu, F. W. 1997. A comparison of two carbon dioxide related injuries of apple fruit. **Proceedings of the 7th International Controlled. Atmosphere Research Conference**, Davis, CA, vol. 2, p. 119-122.
- Williams, M. W. Relationship of sugars and sorbitol to watercore in apples. **Proceedings of American Society for Horticultural Science**, v.88, p.67-76, 1966.
- Wills, R. B. H. & Scott, k. J. Chemical induction of low temperature breakdown in apples. **Phytochemistry**, v. 10, p. 1783 – 1785, 1971.
- Wills, R. B. H. Influence of purines and related compounds on the development of low-temperature breakdown in apples. **Plant Science Letters**, v. 1, p. 217 – 219, 1973.

Wills, R.; McGlasson, B.; Graham, D.; Joyce, D. Postharvest – **An Introduction to the Physiology & Handling of fruit, Vegetables & Ornamentals**. Adelaide, South Australia, Uhyde Park Press, 4. ed, 262p. 1998.

Xuan, H. 2003. **Fruchtfleischverbräunungen bei ‘Conference’ Birne und ‘Braeburn’ Apfel**. 2003, 182p. Stuttgart: Verlag Grauer. Tese (Doutorado) – Universität Hohenheim, Stuttgart, 2003.

Xuan, H.; Streif, J. 2005. Effect of 1-MCP on the respiration and ethylene production as well as on the formation of aroma volatiles in ‘Jonagold’ apple during storage. **Acta Horticulturae**, v. 682, p. 1203 - 1210, 2005.

Zanella, A.; Cazzanelli, P. DCA-Lagerun hat sich bewährt. **Apfel Aktuell: Lagerung**, p. 16 – 17, 2007.

Zhang, J.; Bunn, J. M. Oxygen Diffusivities of apple flesh and skin. **Transactions of the ASAE**. v.43, n.2, p.359-363, 2000.