

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

**ATMOSFERA CONTROLADA DINÂMICA  
MONITORADA PELO QUOCIENTE RESPIRATÓRIO:  
EFEITO DO MANEJO DO ETILENO, TEMPERATURA  
E NÍVEIS DE CO<sub>2</sub> SOBRE COMPOSTOS VOLÁTEIS E  
CONSERVAÇÃO DE MAÇÃS**

**TESE DE DOUTORADO**

**Vanderlei Both**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

**ATMOSFERA CONTROLADA DINÂMICA MONITORADA  
PELO QUOCIENTE RESPIRATÓRIO: EFEITO DO MANEJO  
DO ETILENO, TEMPERATURA E NÍVEIS DE CO<sub>2</sub> SOBRE  
COMPOSTOS VOLÁTEIS E CONSERVAÇÃO DE MAÇÃS**

**Vanderlei Both**

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

**Orientador: Auri Brackmann**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

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

Both, Vanderlei

Atmosfera controlada dinâmica monitorada pelo quociente respiratório: efeito do manejo do etileno, temperatura e níveis de CO<sub>2</sub> sobre compostos voláteis e conservação de maçãs / Vanderlei Both.-2015.

160 p.; 30cm

Orientador: Auri Brackmann

Coorientadores: Alberto Cargnelutti Filho, Roger Wagner

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, RS, 2015

1. Atmosfera controlada dinâmica 2. Metabolismo fermentativo 3. Aroma 4. Quociente respiratório 5. Maçãs I. Brackmann, Auri II. Cargnelutti Filho, Alberto III. Wagner, Roger IV. Título.

**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

**ATMOSFERA CONTROLADA DINÂMICA MONITORADA PELO  
QUOCIENTE RESPIRATÓRIO: EFEITO DO MANEJO DO ETILENO,  
TEMPERATURA E NÍVEIS DE CO<sub>2</sub> SOBRE COMPOSTOS VOLÁTEIS  
E CONSERVAÇÃO DE MAÇÃS**

elaborada por  
**Vanderlei Both**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Agronomia**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

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

---

**Roger Wagner**  
**Prof. Dr. (UFSM)**

---

**Cláudia Kaehler Sautter**  
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

---

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

---

**Ivan Sestari**  
**Prof. Dr. (UFSC)**

Santa Maria, 12 de junho de 2015.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais Eugênio e Maria  
Reinilda (*in memorium*) pela  
educação e exemplo de vida.  
À minha esposa Daiane, que me  
apoiou e auxiliou nesta caminhada.

DEDICO.

## **AGRADECIMENTOS**

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

Ao professor Dr. Auri Brackmann pela orientação e ensinamentos.

Aos colegas de pós-graduação Fabio, Rogerio, Anderson e Elizandra por compartilharem ideias e informações a respeito do tema estudado.

A todos os colegas de pós-graduação e iniciação científica do Núcleo de Pesquisa em Pós-colheita, pela valiosa ajuda nos trabalhos de condução dos experimentos.

Ao professor Roger e colega Daniele pelo auxílio nas análises cromatográficas e interpretação dos dados.

Aos Eng. Agr<sup>o</sup> Thiago e Jorge, funcionários da Agropecuária Schio, pela troca de experiência e informações dos pomares de maçãs e câmaras comerciais de armazenamento.

À Dr<sup>a</sup> Claudia pelos ensinamentos e sua família pelo incentivo e suporte.

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

**AGRADEÇO.**

## RESUMO

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

### ATMOSFERA CONTROLADA DINÂMICA MONITORADA PELO QUOCIENTE RESPIRATÓRIO: EFEITO DO MANEJO DO ETILENO, TEMPERATURA E NÍVEIS DE CO<sub>2</sub> SOBRE COMPOSTOS VOLÁTEIS E CONSERVAÇÃO DE MAÇÃS

AUTOR: Vanderlei Both  
ORIENTADOR: Auri Brackmann  
Santa Maria, 12 de junho de 2015.

A diminuição dos níveis de oxigênio durante o armazenamento de maçãs em atmosfera controlada (AC) reduz a produção de etileno, a respiração e retarda a sua maturação. Níveis excessivamente baixos de O<sub>2</sub> induzem a via anaeróbica da respiração, com produção de compostos da fermentação que, em excesso, causam distúrbios e afetam o aroma. Portanto, é necessário o monitoramento do limite mínimo de O<sub>2</sub> durante o armazenamento, sendo esta técnica chamada de atmosfera controlada dinâmica (ACD). Esta tese é composta por cinco artigos científicos que resultaram de trabalhos de pesquisa com os seguintes objetivos: avaliar a produção de compostos voláteis em maçãs após o armazenamento em atmosfera controlada com níveis extremamente baixos de O<sub>2</sub> e em ACD e compará-los com a AC convencional; comparar o armazenamento em AC convencional com a ACD pela técnica da fluorescência de clorofila (ACD-FC) e do quociente respiratório (ACD-QR), com relação à manutenção da qualidade dos frutos; determinar o QR ideal para diferentes cultivares de maçãs e avaliar o efeito da temperatura e níveis de CO<sub>2</sub>, durante o armazenamento em ACD sobre a qualidade de maçãs. Foram utilizadas maçãs ‘Royal Gala’, ‘Galaxy’ e ‘Fuji Kiku’, armazenadas por nove meses e mais sete dias de vida de prateleira (20°C), antes das análises de qualidade. De uma forma geral, a manutenção da qualidade dos frutos em função das condições de armazenamento ocorre na seguinte ordem: ACD-QR > ACD-FC > AC convencional. Apesar de maior produção de compostos da fermentação nos maiores níveis de QR, não houve grande diferença entre os níveis estudados, apesar de uma tendência de melhor manutenção da qualidade de maçã ‘Royal Gala’ no menor QR (QR=1,5). A aplicação de 1-metilciclopropeno (1-MCP) em maçã ‘Galaxy’ e ‘Fuji Kiku’ armazenadas em ACD-QR não melhora a qualidade em relação aos frutos sem a aplicação do produto, inclusive, aumenta a ocorrência de podridões em ‘Fuji Kiku’. A temperatura de 2,0 °C no armazenamento de maçãs ‘Galaxy’ em ACD-QR mantém uma melhor qualidade que temperaturas mais baixas usadas em atmosfera controlada tradicional gerando economia de energia elétrica com a refrigeração das câmaras. A utilização de 1-MCP no armazenamento em AC convencional pode ser outra estratégia para aumentar a temperatura. Os níveis de CO<sub>2</sub>, em ACD-QR, podem ser mantidos em 1,4 kPa para a maçã ‘Fuji Kiku’ e até 1,6 kPa para maçã ‘Galaxy’. A utilização de níveis extremamente baixos de O<sub>2</sub> (0,5 – 0,7 kPa) ou ACD-QR causa a supressão de alguns compostos voláteis, especialmente ésteres de cadeia linear, enquanto outros compostos de impacto para o aroma não são prejudicados, quando comparado com a AC convencional. Em ACD-FC a produção de compostos voláteis é drasticamente reduzida em comparação com AC convencional e também ACD-QR, provavelmente em função do estresse inicial por baixo O<sub>2</sub>, que ocorre naquela condição de armazenamento.

**Palavras-chave:** *Malus domestica* Borkh. Aroma. Metabolismo fermentativo. Qualidade. Etileno.

## ABSTRACT

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

### **DYNAMIC CONTROLLED ATMOSPHERE MONITORED BY RESPIRATORY QUOTIENT: EFFECT OF ETHYLENE MANAGEMENT, TEMPERATURE AND CO<sub>2</sub> LEVELS IN VOLATILE COMPOUNDS AND APPLE PRESERVATION**

Author: Vanderlei Both  
Adviser: Auri Brackmann  
Santa Maria, June 12<sup>th</sup>, 2015

The decrease in oxygen levels during storage of apples in controlled atmosphere (CA) reduces ethylene production, respiration rate and delay fruit ripening. Excessively low O<sub>2</sub> levels induce the fermentative pathway, producing fermentation compounds, if in excess, cause flesh breakdown and affect the aroma. Therefore, it is essential to monitor the minimum O<sub>2</sub> threshold during storage, using a technique called dynamic controlled atmosphere (DCA). This thesis is composed of five papers, which resulted from studies with the following aims: to evaluate volatile compounds production in apples after storage in controlled atmosphere (CA) with extremely low O<sub>2</sub> levels and DCA, and compare them with standard CA; to compare storage in conventional CA with the DCA by the chlorophyll fluorescence technique (DCA-CF) and respiratory quotient (DCA-RQ) with respect to fruit quality maintenance; to determine the optimum RQ level for the different apples cultivars and evaluate the effect of different temperature and CO<sub>2</sub> levels during DCA storage on apple quality. 'Royal Gala', 'Galaxy' and 'Fuji Kiku' apples were stored for 9 months and plus 7 days of shelf life (20 °C) before the quality analyses. In general, the fruit quality maintenance, on basis of storage conditions occur in the following order: DCA-RQ > DCA-CF > standard CA. Despite the higher production of fermentative compounds in the higher RQ levels, there was no greater difference between the levels of RQ studied, although a trend towards better RQ 1.5 on 'Royal Gala' apples. 1-Methylcyclopropene (1-MCP) application in 'Galaxy' and 'Fuji Kiku' apple stored in DCA-RQ does not improve quality, furthermore 1-MCP increases decay incidence in 'Fuji Kiku' apples. The temperature of 2.0 °C in storage of 'Galaxy' apples in DCA-RQ, maintains better quality than lower temperatures used in standard CA, saving electrical energy with the refrigeration systems of the storage rooms. 1-MCP application in fruits stored in standard CA may be another strategy to increase storage temperature. CO<sub>2</sub> levels, in DCA-RQ storage, can be kept at 1.4 kPa for 'Fuji Kiku' apples and up to 1.6 kPa for 'Galaxy' apples. The use of extremely low O<sub>2</sub> levels (0.5 to 0.7 kPa) or DCA-RQ decreases some volatile compounds, especially straight chain esters, while other impact compounds of the aroma are not impaired in relation to standard CA storage. In DCA-CF volatile compounds production are sharply reduced in comparison to standard CA and DCA-RQ, probably due to the initial low oxygen stress, which occurs in DCA-CF.

**Keywords:** *Malus domestica* Borkh. Aroma. Fermentative metabolism. Quality. Ethylene.

## LISTA DE FIGURAS

<b>3 ARTIGO 1.....</b>	<b>41</b>
Figure 1 – a) scores (samples) and b) loadings (variables) plots showing the two major principal components from the analysis of ‘Royal Gala’ apples stored under controlled atmosphere with different O <sub>2</sub> levels. A1, A2 and A3 - replicates of the each treatment, E – ethylene concentration and R – fruit respiration. ....	48
<b>4 ARTIGO 2.....</b>	<b>61</b>
Figure 1 – Respiratory quotient, O <sub>2</sub> and CO <sub>2</sub> levels during 9 months storage in DCA monitoring by chlorophyll fluorescence (A) and respiratory quotient of 1.5 (B) and 2.0 (C). ....	66
Figure 2 - Scores of treatments (a) and weights of the compounds (b) of ‘Royal Gala’ apple after nine months of storage in static controlled atmosphere (CA) and dynamic controlled atmosphere (DCA) plus seven days of shelf life at 20°C.....	69
Figure 3 - ACC oxidase enzyme activity (A), ethylene production (B) and respiration rate (C) of ‘Royal Gala’ apple after 9 months of storage in static controlled atmosphere (CA) and dynamic controlled atmosphere (DCA) plus 7 days of shelf life at 20°C. ....	71
Figure 4 - Flesh firmness (A), titratable acidity (B), soluble solids (C), flesh breakdown (D), mealiness (E) and healthy fruits (F) of ‘Royal Gala’ apple after 9 months of storage in static controlled atmosphere (CA) and dynamic controlled atmosphere (DCA) plus 7 days of shelf life at 20°C.....	73
<b>5 ARTIGO 3.....</b>	<b>85</b>
Figure 1 - Ethylene production during shelf life of ‘Galaxy’ apple after nine months storage in Controlled Atmosphere or Dynamic Controlled Atmosphere (A= ½ day; B = 2 days; C = 4 days and D = 6 days shelf life at 20 °C). ....	91
<b>6 ARTIGO 4.....</b>	<b>93</b>
Figura 1 - Quociente respiratório e pressão parcial de O <sub>2</sub> durante o armazenamento de maçãs ‘Fuji Kiku’ em ACD-QR de 1,5 (A e B) e 1,7 (C e D) com 0,8 kPa de CO <sub>2</sub> (A e C) e com 1,4 kPa de CO <sub>2</sub> (B e D). ....	98
<b>7 ARTIGO 5.....</b>	<b>119</b>
Figura 1 - Quociente respiratório (RQ) e pressão parcial de oxigênio (O <sub>2</sub> ) durante nove meses de armazenamento em atmosfera controlada dinâmica de maçãs ‘Galaxy’, nas temperaturas de 1,0 °C (A), 1,5 °C (B) e 2,0 °C (C). ....	126

## LISTA DE TABELAS

<b>3 ARTIGO 1</b> .....	<b>41</b>
Table 1 – Volatile compounds emitted by ‘Royal Gala’ apples after 8 months of storage under different CA conditions followed by 7 days of shelf-life at 20 °C.....	51
Table 2 – Ethylene synthesis in ‘Royal Gala’ apples after 8 months of storage under different CA conditions followed by 6 days of shelf-life at 20 °C.....	54
Table 3 – Respiration in ‘Royal Gala’ apples after 8 months of storage under different CA conditions followed by 6 days of shelf-life at 20 °C.....	55
<b>4 ARTIGO 2</b> .....	<b>61</b>
Table 1 – Volatile compounds profile ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) of ‘Royal Gala’ apples at harvest and after 9 months of storage in static controlled atmosphere (CA) and dynamic controlled atmosphere (DCA), plus 7 days of shelf life, at 20°C. ....	76
<b>5 ARTIGO 3</b> .....	<b>85</b>
Table 1 - Flesh firmness and titratable acidity of ‘Galaxy’ apples after 9 months storage in controlled atmosphere (CA) or dynamic controlled atmosphere (DCA) monitored by chlorophyll fluorescence (HW-DCA) or by respiratory quotient (RQ-DCA), plus 7 days at 20 °C.....	89
Table 2 - Mealiness and healthy fruits of ‘Galaxy’ apples after 9 months storage in controlled atmosphere (CA) or dynamic controlled atmosphere (DCA) monitored by chlorophyll fluorescence (HW-DCA) or by respiratory quotient (RQ-DCA), plus 7 days at 20 °C.....	90
<b>6 ARTIGO 4</b> .....	<b>93</b>
Tabela 1 - Concentração interna de etileno na abertura das câmaras e atividade da enzima ACC oxidase após sete dias a 20°C de maçãs ‘Fuji Kiku’ armazenadas por nove meses em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pelo quociente respiratório (QR) de 1,5 ou 1,7, com dois níveis de CO <sub>2</sub> e com ou sem aplicação de 1-MCP.....	102
Tabela 2 - Produção de etileno na abertura das câmaras e após seis dias a 20 °C de maçãs ‘Fuji Kiku’ armazenadas por nove meses em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pelo quociente respiratório (QR) de 1,5 ou 1,7, com dois níveis de CO <sub>2</sub> e com ou sem aplicação de 1-MCP.....	104
Tabela 3 - Respiração na abertura das câmaras e após seis dias a 20°C de maçãs ‘Fuji Kiku’ armazenadas por nove meses em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pelo quociente respiratório (QR) de 1,5 ou 1,7, com dois níveis de CO <sub>2</sub> e com ou sem aplicação de 1-MCP. ....	105
Tabela 4 - Produção de compostos da fermentação de maçãs ‘Fuji Kiku’ após nove meses de armazenamento em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pelo quociente respiratório (QR) de 1,5 ou 1,7, com dois níveis de CO <sub>2</sub> e com ou sem aplicação de 1-MCP, mais sete dias de prateleira a 20°C.....	107
Tabela 5 - Firmeza de polpa e acidez total titulável de maçãs ‘Fuji Kiku’ após nove meses de armazenamento em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica	

(ACD) monitorada pelo quociente respiratório (QR) de 1,5 ou 1,7, com dois níveis de CO<sub>2</sub> e com ou sem aplicação de 1-MCP, mais sete dias de prateleira a 20°C. .... 109

Tabela 6 - Distúrbios fisiológicos em maçãs ‘Fuji Kiku’ após nove meses de armazenamento em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pelo quociente respiratório (QR) de 1,5 ou 1,7, com dois níveis de CO<sub>2</sub> e com ou sem aplicação de 1-MCP, mais sete dias de prateleira a 20 °C..... 112

Tabela 7 - Ocorrência de podridões e total de frutos sadios em maçãs ‘Fuji Kiku’ após nove meses de armazenamento em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pelo quociente respiratório (QR) de 1,5 ou 1,7, com dois níveis de CO<sub>2</sub> e com ou sem aplicação de 1-MCP, mais sete dias de vida de prateleira a 20 °C. .... 114

## **7 ARTIGO 5..... 119**

Tabela 1 - Atividade da enzima ACC oxidase em maçãs ‘Galaxy’ após nove meses de armazenamento em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD), em diferentes temperaturas, com ou sem aplicação de 1-MCP, mais sete dias de vida de prateleira a 20 °C. .... 128

Tabela 2- Produção de etileno em maçãs ‘Galaxy’ armazenadas por nove meses em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD), em diferentes temperaturas, com ou sem aplicação de 1-MCP, após a abertura das câmaras e aos seis dias de vida de prateleira a 20 °C. .... 129

Tabela 3 - Respiração de maçãs ‘Galaxy’ armazenadas por nove meses em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD), em diferentes temperaturas, com ou sem aplicação de 1-MCP, após a abertura das câmaras e aos seis dias de vida de prateleira a 20 °C. .... 131

Tabela 4 - Compostos da fermentação produzidos por maçãs ‘Galaxy’ armazenadas por nove meses em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD), em diferentes temperaturas, com ou sem aplicação de 1-MCP, após sete dias de vida de prateleira a 20 °C. .... 133

Tabela 5 - Firmeza de polpa e acidez titulável de maçãs ‘Galaxy’ armazenadas por nove meses em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD), em diferentes temperaturas, com ou sem aplicação de 1-MCP, mais sete dias de vida de prateleira a 20 °C. .... 137

Tabela 6 - Distúrbios fisiológicos em maçãs ‘Galaxy’ após nove meses de armazenamento em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD), em diferentes temperaturas, com ou sem aplicação de 1-MCP, mais sete dias de vida de prateleira a 20 °C. .... 139

Tabela 7 - Porcentagem de frutos sadios de maçãs ‘Galaxy’ após nove meses de armazenamento em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD), em diferentes temperaturas, com ou sem aplicação de 1-MCP, mais sete dias de vida de prateleira a 20 °C. .... 141

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1-MCP	1-metilciclopropeno
AAT	Álcool Acetil Transferase
AC	Atmosfera controlada
ACC	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
ACC oxidase	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidase
ACC sintase	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintase
ACD	Atmosfera controlada dinâmica
ACD-FC	Atmosfera controlada dinâmica monitorada pela fluorescência de clorofilas
ACD-QR	Atmosfera controlada dinâmica monitorada pelo quociente respiratório
ADH	Álcool desidrogenase
ATP	Adenosina trifosfato
AVG	Aminoetoxivinilglicina
CA	Controlled atmosphere
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	Fórmula molecular do Etileno
C <sub>4</sub> H <sub>6</sub>	Fórmula molecular do 1-MCP
CIE	Concentração Interna de Etileno
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono (gás carbônico)
DCA	Dynamic controlled atmosphere
DCA-FC	Dynamic controlled atmosphere – chlorophyll fluorescence
DCA-RQ ou RQ-DCA	Dynamic controlled atmosphere – respiratory quotient
F <sub>0</sub>	Fluorescência mínima
F <sub>α</sub>	Estimativa de F <sub>0</sub>
FID	Flame ionization detector (detector por ionização em chama)
FIRM	Fluorescence Interactive Response Monitor
FS II	Fotossistema II
GC-FID	Cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama
GC-MS	Cromatógrafo a gás acoplado à espectrômetro de massa
HS-SPME	Microextração em fase sólida (solid phase microextraction)
kg	Quilograma
KI	Índice de Kovats (Kovats Index)
kPa	Kilopascal
LDH	Lactato desidrogenase
LED	Light Emitting Diode
LOL	Limite mínimo de oxigênio (Lowest oxygen limit)
LOX	Enzima Lipoxigenase
μL L <sup>-1</sup>	Micro litro por litro
μg	Micrograma
mL	Mililitro
m <sup>3</sup>	Metro cúbico
mM	Milimolar
<i>MdACO1</i>	Gene para ACC oxidase em maçã
<i>MdACS1</i>	Gene para ACC sintase em maçã
<i>MdERS1/MdERS2</i>	Genes para receptores de etileno em maçã
<i>MdPG1</i>	Gene para enzima poligalacturonase em maçã
meq	Miliequivalente

MES	(ácido 2 (N-morfolino) etanossulfônico)
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
N	Newton ou Normal
N <sub>2</sub>	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
nL L <sup>-1</sup>	Nanolitro por litro
NAD <sup>+</sup> / NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada/ reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NaOH	Hidróxido de sódio
NTP	Nucleotídeo Trifosfato
O <sub>2</sub>	Oxigênio
°C	Temperatura em graus Celsius
PCA	Ponto de compensação anaeróbico
PDC	Enzima piruvato descarboxilase
PDH	Piruvato desidrogenase
pH	Potencial hidrogeniônico
ppb	Parte por bilhão
PPO	Polifenoloxidase
PQ	Plastoquinona
QR	Quociente respiratório
RQ	Respiratory quotient
SST	Sólidos Solúveis Totais
t	Tonelada
ULO	Ultralow oxygen (ultrabaixo oxigênio)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>15</b>
1.1 Hipóteses .....	19
1.2 Objetivos.....	19
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
2.1 Armazenamento de maçãs .....	21
2.1.1 Armazenamento Refrigerado.....	21
2.1.2 Atmosfera Controlada.....	22
<b>2.2 O metabolismo fermentativo .....</b>	<b>23</b>
2.3 Atmosfera Controlada Dinâmica .....	27
2.3.1 Formas de monitoramento do O <sub>2</sub> durante o armazenamento .....	27
2.3.1.1 Determinação do etanol .....	28
2.3.1.2 Fluorescência de clorofilas (FC) .....	28
2.3.1.3 Quociente Respiratório (QR).....	30
2.3.2 Nível de CO <sub>2</sub> nas câmaras de armazenamento .....	32
2.3.3 Temperatura de armazenamento.....	33
<b>2.4 Aplicação de 1-MCP .....</b>	<b>35</b>
2.5 Produção de compostos voláteis relacionados com o aroma.....	37
<b>3 ARTIGO 1.....</b>	<b>41</b>
3.1 Effect of storage under extremely low oxygen on volatile composition of ‘Royal Gala’ apples.....	41
3.1.1 Introduction .....	41
3.1.2 Material and Methods .....	43
3.1.2.1 Fruit harvest and storage conditions .....	43
3.1.2.2 Sample preparation .....	44
3.1.2.3 Analysis of volatile compounds .....	44
3.1.2.4 Ethylene and respiration analysis .....	45
3.1.2.5 Statistical analysis .....	46
3.1.3 Results and Discussion .....	46
3.1.4 Conclusions .....	55

3.1.5 Acknowledgements.....	55
3.1.6 References.....	56
<b>4 ARTIGO 2.....</b>	<b>61</b>
4.1 Dynamic controlled atmosphere by respiratory quotient maintain quality and volatile profile of ‘Royal Gala’ apples after long-term storage.....	61
4.1.1 Introduction.....	61
4.1.2 Material and methods.....	63
4.1.2.1 Fruit harvest and selection process.....	63
4.1.2.2 Controlled atmosphere and dynamic controlled atmosphere conditions.....	63
4.1.2.3 Atmosphere establishment.....	64
4.1.2.4 Temperature and relative humidity.....	64
4.1.2.5 Fruit quality evaluation.....	64
4.1.2.6 Statistical analysis.....	67
4.1.3 Results and discussion.....	67
4.1.4 Conclusion.....	79
4.1.5 References.....	79
<b>5 ARTIGO 3.....</b>	<b>85</b>
5.1 CO <sub>2</sub> Partial Pressure for Respiratory Quotient and HarvestWatch™ Dynamic Controlled Atmosphere for ‘Galaxy’ Apples Storage.....	85
5.1.1 Introduction.....	85
5.1.2 Materials and Methods.....	87
5.1.3 Results and Discussion.....	88
5.1.4. Conclusions.....	91
5.1.5 Literature cited.....	92
<b>6 ARTIGO 4.....</b>	<b>93</b>
6.1 Armazenamento de maçãs ‘Fuji Kiku’ em Atmosfera Controlada Dinâmica com alto CO <sub>2</sub> e aplicação de 1-MCP.....	93
6.1.1 Introdução.....	94
6.1.2 Material e Métodos.....	96
6.1.3 Resultados e Discussão.....	101
6.1.4 Conclusões.....	115
6.1.5 Referências Bibliográficas.....	115
<b>7 ARTIGO 5.....</b>	<b>119</b>
7.1 Armazenamento de maçã ‘Galaxy’ em atmosfera controlada dinâmica em temperatura mais elevada e com aplicação de 1-MCP.....	119
7.1.1 Introdução.....	120

7.1.2 Material e métodos .....	122
7.1.3 Resultados e discussão.....	127
7.1.4 Conclusões.....	141
7.1.5 Referências Bibliográficas.....	142
<b>8 DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>145</b>
<b>9 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>151</b>
<b>10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>153</b>

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A produção brasileira de maçãs no ano de 2014 foi de aproximadamente 1,3 milhão de toneladas, com uma importação de 116.000 toneladas, ao passo que a exportação da fruta foi de 44.000 toneladas (REETZ et al., 2015). Estes números indicam que grande parte da maçã produzida no país é consumida internamente, com uma parte sendo exportada, especialmente no período de safra, que coincide com a entressafra no hemisfério norte, onde estão os maiores importadores.

As cultivares de maçãs mais produzidas no Brasil são a ‘Gala’ e a ‘Fuji’ e suas mutantes, que possuem coloração vermelha da epiderme mais pronunciada e, por isso, são mais aceitas pelo consumidor. Dentre elas se destacam a ‘Royal Gala’, ‘Galaxy’, ‘Maxi Gala’, ‘Fuji Suprema’ e ‘Fuji Kiku’. Os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina são responsáveis por mais de 95% da produção nacional de maçã, em função do clima apropriado para o cultivo nas regiões serranas. Nestes estados, a colheita dos frutos se concentra nos meses de janeiro a abril. Portanto, para regular a oferta desta fruta no período de entressafra e depender menos de importações, é necessária a utilização de uma forma eficiente de armazenamento, que permita boa conservação da qualidade e o mínimo de perdas por um longo período.

Atualmente, a forma de armazenamento mais utilizada para a maçã, visando um longo período de armazenagem, é a atmosfera controlada (AC), em que, além do controle da temperatura e da umidade relativa no interior das câmaras, utiliza baixas pressões parciais de oxigênio e altas de CO<sub>2</sub>. Os baixos níveis de O<sub>2</sub> promovem a redução da respiração e produção de etileno, que retardam a maturação e senescência, e reduzem a ocorrência de distúrbios fisiológicos (WRIGHT et al., 2015). Entretanto, quando o nível de O<sub>2</sub> está muito baixo, os frutos podem desenvolver sintomas de danos por baixo oxigênio, como *off-flavour* e escurecimento dos tecidos (KE et al., 1991; KE et al., 1993; WRIGHT et al., 2015), como resultado do baixo suprimento de energia para as células nesta condição (SAQUET et al., 2000) ou danos por produtos da fermentação (PESIS, 2005; WEBER et al., 2015).

A partir do aperfeiçoamento dos equipamentos que determinam as concentrações gasosas, bem como da melhoria da estrutura das câmaras de armazenamento, foi possível o desenvolvimento de algumas técnicas mais avançadas de AC visando a melhoria da manutenção da qualidade dos frutos. Dentre estas, está o armazenamento em ultrabaixo O<sub>2</sub> (ULO – *Ultra Low Oxygen*), com pressão parcial menor que 1,0 kPa. No armazenamento de

maças ‘Royal Gala’ em ULO, entretanto, pressões parciais de O<sub>2</sub> menores que 0,8 kPa resultaram em maior ocorrência de degenerescência nos frutos (WEBER et al., 2011).

O estresse inicial de O<sub>2</sub> é outra técnica avançada de AC, mas a qual não apresentou resultados positivos quando aplicada antes do armazenamento em AC de maçãs ‘Royal Gala’ e ‘Fuji’ (BOTH et al., 2014a; BRACKMANN, et al., 2012). A terceira técnica é a aplicação de etanol, um produto da fermentação, que durante o armazenamento em AC apresenta resultados animadores, porém depende da dose aplicada para melhorar a manutenção da qualidade dos frutos (WEBER, 2010). Estes resultados sugerem que para propiciar uma melhor manutenção da qualidade dos frutos com a redução do O<sub>2</sub> nas câmaras de AC é necessário que este seja monitorado, para não ocorrer um estresse demasiado, resultando em efeitos inesperados.

Pesquisas atuais estão desenvolvendo técnicas para acompanhar o metabolismo dos frutos durante o armazenamento e, assim, estabelecer o nível mais adequado de O<sub>2</sub>. Este método foi denominado de atmosfera controlada dinâmica (ACD), pela possibilidade de variar a concentração de O<sub>2</sub> durante o armazenamento. Para tanto, existem atualmente três formas de monitorar o metabolismo dos frutos em resposta a um estresse provocado pelo O<sub>2</sub> excessivamente baixo, a citar: 1) Determinação do etanol presente nas câmaras ou na polpa dos frutos; 2) Emissão de fluorescência de clorofilas dos frutos; 3) Determinação do quociente respiratório (QR) dos frutos (WEBER et al., 2015; WRIGHT et al., 2015). A técnica mais pesquisada e utilizada comercialmente é a fluorescência de clorofilas (ACD-FC), em que é aplicada uma luz de baixa frequência sobre amostras de frutos armazenados. Quando ocorre um estresse pelo baixo O<sub>2</sub>, a clorofila dos frutos emite fluorescência como resposta à luz incidente, que é captada por um sensor e registrada na forma de um pico em um gráfico. Após o estresse, verificado pelo pico de fluorescência, o nível O<sub>2</sub> é aumentado em 0,2 a 0,3 kPa, permanecendo assim até o final do armazenamento (DeLONG et al., 2004; 2007; GASSER et al., 2008; KÖPCKE, 2015; WATKINS, 2008; ZANELLA et al., 2005).

As pesquisas com o QR também estão em andamento e atualmente sua avaliação também ocorre em câmaras comerciais no Sul do Brasil. Esta técnica possibilita o monitoramento do metabolismo fermentativo dos frutos armazenados, pelo cálculo da relação entre a produção de CO<sub>2</sub> e o consumo de O<sub>2</sub>. Um aumento no QR reflete a transição da rota aeróbica para a anaeróbica, ou fermentativa (GASSER et al., 2008; WEBER et al., 2015). Esta técnica é a que mais se aproxima do conceito de ACD, pois os níveis de O<sub>2</sub> podem variar diariamente, dependendo do metabolismo dos frutos, a fim de manter constante um QR pré-definido. A determinação do QR pode ser realizada a partir da variação na concentração dos

níveis de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, realizada diretamente no ambiente de câmaras comerciais, exigindo vedação perfeita dos painéis para impedir a entrada de O<sub>2</sub> (VAN SCHAIK et al., 2015). Além disso, o QR pode ser determinado a partir de uma amostra de frutos, que permanecem dentro de um recipiente, que fica dentro da câmara comercial, onde estão conectados com o ambiente da câmara e, quando desejado, podem ser isolados para medição do QR, representando a condição dos frutos da câmara inteira. Trabalhos neste sentido estão sendo desenvolvidos pelo Núcleo de Pesquisa em Pós-colheita, da Universidade Federal de Santa Maria. Em condição experimental foi observado melhoria da qualidade de maçãs com QR 2,0 comparado com o armazenamento em AC, porém, QRs acima de 2,0 causaram danos aos frutos em função do elevado metabolismo fermentativo (WEBER et al., 2015). Portanto, ainda existe a necessidade de definir o melhor QR para o armazenamento de diferentes cultivares de maçã.

Durante o armazenamento o CO<sub>2</sub> é produzido tanto pela respiração aeróbica quanto pelo metabolismo fermentativo dos frutos e precisa ser adsorvido das câmaras. Pequenas concentrações são desejáveis na câmara pela sua ação na redução da respiração e produção de etileno, porém altas concentrações podem causar distúrbios nos frutos (ARGENTA et al., 2002; CORRÊA et al., 2010; LUMPKIN et al., 2015). Apesar de ter sido pesquisado para o armazenamento em AC, os níveis ótimos de CO<sub>2</sub> durante o armazenamento em ACD ainda não foram determinados, sendo que a única recomendação é para que esses sejam menores que os utilizados em AC convencional (NEUWALD et al., 2012) ou que se mantenha a relação CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> específica de cada cultivar (ZANELLA et al., 2005), que geralmente é de 2:1. Para o armazenamento em ACD-QR, isso resultaria em níveis bastante baixos de CO<sub>2</sub>, uma vez que o O<sub>2</sub> pode ser reduzido a pressões parciais menores que 0,2 kPa. Esta condição exigiria a aquisição de equipamentos com maior capacidade de adsorção e acionamento mais frequente em câmaras comerciais, gerando custos adicionais (GASSER et al., 2008).

A retirada de calor das câmaras de armazenamento, por meio de sistemas de refrigeração é outro fator que aumenta os custos durante o armazenamento. As pesquisas já comprovaram que a melhor temperatura para o armazenamento de maçãs em AC é próximo de 0,0°C, com alguma variação entre as cultivares. Entretanto, com a finalidade de gerar economia com os sistemas de refrigeração, novas pesquisas foram realizadas, associando outras técnicas à AC para poder utilizar temperaturas um pouco mais elevadas, como aplicação de 1-metilciclopropeno (1-MCP), um inibidor da ação do etileno, e a utilização de ACD-FC (KITTERMANN et al., 2015; KÖPCKE, 2015; McCORMICK et al., 2012). A solubilidade do O<sub>2</sub> diminui com o aumento da temperatura, portanto, ocorre um incremento no limite mínimo de O<sub>2</sub> com temperaturas de armazenamento mais elevadas (WEBER et al.,

2011; WRIGHT et al., 2010). No armazenamento em ACD-QR, o metabolismo dos frutos é monitorado constantemente, portanto, seria uma possibilidade a associação desta técnica com o aumento da temperatura, mantendo o metabolismo constante e adequado, variando para isso os níveis de O<sub>2</sub> nas câmaras e gerando economia com os sistemas de refrigeração.

O 1-MCP é um composto que inibe a ação do etileno e, por isso, auxilia na manutenção da qualidade de frutos climatéricos armazenados sob refrigeração e em AC. Entretanto, foram relatados problemas associados com a aplicação deste produto em maçãs, como aumento da incidência de podridões quando em condição estressante para os frutos (LEVERENTZ et al., 2003), distúrbios internos e externos quando associados com alto CO<sub>2</sub> ou temperatura mais elevada (FAWBUSH et al., 2008; JUNG; LEE et al., 2012; WATKINS, 2011) e impacto negativo sobre o aroma (MATTHEIS et al., 2005). Portanto, também o comportamento deste produto em frutos armazenados em ACD-QR necessita ser investigado quanto à ocorrência de danos e à necessidade de aplicação do mesmo, uma vez que o fato de armazenar em ACD-QR já mantém baixa a produção de etileno durante o período de vida de prateleira dos frutos (LUDWIG et al., 2014; WEBER et al., 2015). Além disso, ao contrário do 1-MCP, a ACD é uma técnica limpa e que não faz uso de produtos químicos, podendo também ser utilizada na agricultura orgânica (REBEAUD; GASSER, 2015).

A satisfação do consumidor de frutas depende de um conjunto complexo de fatores, que incluem a cor da epiderme, a textura, o balanço entre ácidos e açúcares e o aroma. Este último depende dos compostos voláteis produzidos durante o armazenamento e/ou vida de prateleira. Condições de armazenamento com baixo O<sub>2</sub> ou que inibem a produção de etileno, prejudicam a síntese de voláteis (BANGERTH, et al., 2012; BRACKMANN et al., 1993; MATTHEIS et al., 2005). Entretanto, o armazenamento em condições de O<sub>2</sub> extremamente baixo afeta principalmente a produção de ésteres de cadeia linear, enquanto outros componentes de impacto para o aroma de maçãs não foram afetados nesta condição de armazenamento (BOTH et al., 2014b; BRACKMANN et al. 1993). Ademais, no armazenamento em ACD ocorre uma transição para o metabolismo fermentativo, com produção de álcoois, que são substratos para produção de ésteres, a classe mais importante para o aroma da maçã (FELLMAN et al., 1993). Ainda, com esta técnica de armazenamento existe a possibilidade de suprimir a aplicação de 1-MCP, mantendo os atributos de qualidade por um período prolongado de armazenamento, resultando em boa aceitação por parte dos consumidores, mesmo com menor produção de voláteis, pois é o balanço entre os compostos voláteis presentes, a acidez e a firmeza dos frutos que interfere na aceitação dos consumidores (ECHEVERRÍA et al., 2008).

## 1.1 Hipóteses

O armazenamento em AC com níveis de oxigênio extremamente baixos, assim como ACD, causa supressão da emissão de determinados compostos voláteis relacionados com o aroma, mas estimula a emissão de outros que podem interferir na qualidade do aroma, pelo início do metabolismo fermentativo nestas condições de armazenamento;

O armazenamento em ACD, por utilizar concentrações variáveis de O<sub>2</sub>, próximas ao limite mínimo tolerável, possibilita a diminuição do metabolismo dos frutos e melhora a manutenção da qualidade, quando comparado à AC convencional;

Uma vez determinado o QR ideal para cada cultivar, este método pode ser mais eficiente que a fluorescência de clorofilas no armazenamento em ACD de maçãs;

Durante o armazenamento em ACD a temperatura pode ser mantida um pouco mais elevada, quando comparada com AC, por utilizar concentrações de O<sub>2</sub> próximas ao limite mínimo, diminuindo o custo com energia elétrica;

Os níveis de CO<sub>2</sub> no armazenamento em ACD podem ser mantidos em concentrações próximas às utilizadas para o armazenamento em AC convencional, sem causar dano aos frutos, diminuindo-se assim os custos de energia com absorção deste gás;

## 1.2 Objetivos

Avaliar o padrão da emissão de compostos voláteis de maçãs após o armazenamento em AC com níveis extremamente baixos de O<sub>2</sub> e em ACD e compará-lo com aquele observado em maçãs armazenadas em AC convencional;

Comparar parâmetros de qualidade de maçãs durante o armazenamento em AC convencional com ACD monitorada com as técnicas de fluorescência de clorofila e pela determinação do QR;

Avaliar a influência da temperatura e de níveis de CO<sub>2</sub>, durante o armazenamento em ACD sobre a qualidade de maçãs;

Determinar o QR ideal para diferentes cultivares de maçã, bem como a temperatura e concentração de CO<sub>2</sub> adequada para cada cultivar durante o armazenamento em ACD.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Armazenamento de maçãs

A produção brasileira de maçãs supre praticamente a demanda pela fruta no mercado interno. Tanto a exportação como a importação não são muito significativas, representando cerca de 10% da produção nacional. A exportação é realizada principalmente logo após a safra, coincidindo com a entressafra no hemisfério norte, destino da maior parte dos frutos exportados. Portanto, para o mercado interno, tem-se a necessidade de armazenar os frutos para prolongar o período de oferta.

O Rio Grande do Sul, juntamente com Santa Catarina, são os maiores produtores de maçã do país. Na safra de 2014 foram colhidas 502.591 t no estado do Rio Grande do Sul, sendo que destas, 420.421 t (84%) foram armazenadas em câmaras frias (AGAPOMI, 2014). De acordo com esta mesma fonte, 35% do armazenamento é realizado em atmosfera refrigerada e 65% em câmaras de atmosfera controlada (AC).

#### 2.1.1 Armazenamento Refrigerado

O armazenamento refrigerado é caracterizado pelo uso de baixas temperaturas e controle da umidade relativa (UR) nas câmaras. Baseia-se na Lei de Van't Hoff, que postula um aumento de duas vezes na taxa das reações químicas e bioquímicas, a cada 10 °C de elevação da temperatura (CHITARRA; CHITARRA, 2005). No entanto, foi observado um incremento de mais de quatro vezes na respiração de maçãs com aumento de 10 °C na temperatura de armazenamento (STEFFENS et al., 2007).

Apesar do grande efeito da redução da temperatura sobre o metabolismo dos frutos, o tempo máximo de conservação no armazenamento refrigerado é de três a quatro meses. Após um prolongado período de armazenamento, ocorre perda de suculência, de firmeza e aumentam os danos por degenerescência e polpa farinácea (SAQUET et al., 1997). Portanto, como o objetivo é fornecer maçãs por um longo período para o mercado consumidor, são necessárias outras técnicas para prolongar o armazenamento. A aplicação de 1-metilciclopropeno (1-MCP), um inibidor da ação do etileno (SISLER; SEREK, 1997), na dose de 625 ppb no início do armazenamento refrigerado, mantém a qualidade de maçãs

‘Gala’ por até seis meses, sem necessidade de reaplicação do produto (BRACKMANN et al., 2004). Entretanto, as pesquisas na conservação de maçãs evoluíram pela necessidade de ofertar o produto por um período maior do ano. Estas alternativas serão discutidas nos próximos tópicos.

### 2.1.2 Atmosfera Controlada

Uma alternativa para prolongar o período de conservação de maçãs é a utilização da atmosfera controlada (AC). Neste método de armazenamento, além da redução da temperatura e controle da UR, a concentração de gases do ambiente também é alterada, pela redução da pressão parcial de oxigênio e aumento dos níveis de CO<sub>2</sub>. A pressão parcial de O<sub>2</sub> recomendada para o armazenamento em AC de maçãs ‘Fuji’, ‘Gala’ e suas mutantes é de 1,0 a 1,2 kPa (BRACKMANN et al., 1998; 2009), permanecendo estável durante todo o período de armazenamento (9 a 10 meses). O armazenamento com estes níveis de O<sub>2</sub> serão denominados, no presente trabalho, de AC convencional, quando a intenção for estabelecer uma comparação com a atmosfera controlada dinâmica (ACD). A AC é eficiente em manter vários aspectos relacionados com a qualidade dos frutos em relação ao armazenamento refrigerado, como maior firmeza de polpa e acidez, menor produção de etileno, respiração e distúrbios fisiológicos (BRACKMANN et al., 2008; LUMPKIN et al., 2015).

O papel do baixo nível de oxigênio na redução do metabolismo dos frutos armazenados em AC é a redução da respiração, uma vez que o O<sub>2</sub> é o aceptor final de elétrons na enzima citocromo oxidase, da membrana mitocondrial, durante a respiração aeróbica (WRIGHT et al., 2015). O baixo oxigênio também pode atuar de forma indireta, pela redução da produção de etileno, que é o hormônio vegetal responsável pelo amadurecimento dos frutos climatéricos, como a maçã (LELIÈVRE et al., 1997). O oxigênio é necessário para a oxidação do ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) a etileno, na última etapa da rota de produção deste fitormônio, numa reação catalisada pela enzima ACC oxidase (YANG; HOFFMAN, 1984).

A exemplo do baixo O<sub>2</sub>, o aumento da pressão parcial de CO<sub>2</sub> nas câmaras de AC também auxilia na redução do metabolismo, pela menor respiração ou diminuição da produção e ação de etileno (KUBO et al., 1990). O alto CO<sub>2</sub> inibe a expressão gênica e atividade de enzimas da rota de produção de etileno, especialmente a ACC sintase (GORNY; KADER, 1997). Entretanto, Wild et al. (1999) sugerem que o CO<sub>2</sub> afeta a produção de etileno

pela redução da produção de ATP, como resultado da inibição da respiração pelo alto CO<sub>2</sub>. A presença do CO<sub>2</sub> nas câmaras de armazenamento inibe algumas enzimas da rota respiratória, a exemplo da succinato desidrogenase, isocitrato desidrogenase, citocromo *c* oxidase e fosfofrutoquinase, causando acúmulo de ácido succínico (KUBO et al.,1990; LIU et al., 2004). Entretanto, as respostas são variáveis e bastante complexas e dependem da concentração de CO<sub>2</sub> utilizada (WRIGHT et al., 2015).

As pressões parciais de gases utilizadas em AC devem ser monitoradas e controladas para não ultrapassarem um determinado limite. Para maçãs cultivadas no Sul do Brasil, as melhores pressões parciais são de 1,0 kPa de O<sub>2</sub> e 0,5kPa de CO<sub>2</sub> para maçãs ‘Fuji’ e 0,8 a 1,0 kPa de O<sub>2</sub> e 2,5 kPa de CO<sub>2</sub> para mutantes da cultivar Gala (BRACKMANN et al., 1998; 2008). Níveis de O<sub>2</sub> excessivamente baixos ou de CO<sub>2</sub> altos podem induzir a via fermentativa de respiração, acumulando etanol, acetaldeído e acetato de etila, que em altas concentrações causam *off-flavour* e degenerescência, depreciando a qualidade dos frutos (KE et al., 1991; KE et al., 1993; TRAN et al., 2015; WRIGHT et al., 2015). Portanto, como medida de segurança, a pressão parcial de O<sub>2</sub> geralmente é mantida acima do que seria o ideal para o mínimo metabolismo dos frutos e mantida constante durante todo o período de armazenamento. Além disso, o nível mínimo de oxigênio tolerado pelos frutos é variável para as diferentes cultivares, safras e locais de produção (TRAN et al., 2015). Assim, trabalhos de pesquisa atuais estão focados em uma forma de armazenamento em que os frutos possam ser monitorados em tempo real, de forma não-destrutiva e rápida, para manter o metabolismo em um nível mínimo e com a segurança de não ocorrer problemas com a indução da fermentação. Pesquisas neste sentido estão em andamento em diversas partes do mundo e com o uso de diferentes técnicas para monitorar o estresse por baixo O<sub>2</sub> (WRIGHT et al., 2015). Este novo sistema é uma variante da AC e chamado de atmosfera controlada dinâmica (ACD), que será abordada em detalhes nos tópicos seguintes.

## **2.2 O metabolismo fermentativo**

O armazenamento em níveis de O<sub>2</sub> muito baixos induz ao metabolismo fermentativo, com produção de etanol, acetaldeído e acetato de etila, que são indesejáveis em altas concentrações, pois os mesmos podem produzir *off-flavour* e reduzir a qualidade dos frutos, causando escurecimento interno (LEE et al., 2012; WRIGHT et al., 2010; 2015). Por outro

lado, o baixo nível de oxigênio, quando manejado de forma adequada, é responsável pela manutenção da qualidade dos frutos, pois limita as atividades de enzimas da produção de etileno e promove a produção de compostos da fermentação que estão associados com a redução da síntese de etileno (PESIS, 2005). O efeito dos compostos da fermentação, como etanol e acetaldeído, sobre a qualidade dos frutos é devido a sua atuação na rota de síntese do etileno, no metabolismo respiratório, na produção de aroma e na expressão de algumas proteínas e enzimas, o que pode ser comprovado pelos efeitos positivos observados da aplicação exógena destes compostos sobre frutos e verduras (ASODA et al., 2009; LIU et al., 2012; PESIS, 2005).

Durante o armazenamento em AC convencional, ocorre a respiração aeróbica, com o início da via fermentativa, dependendo da temperatura utilizada e do estágio de maturação dos frutos. Mesmo frutos armazenados em ambiente refrigerado podem produzir compostos da fermentação, o que ocorre quando estão entrando em senescência (WRIGHT, et al., 2015). No armazenamento em ACD, o equilíbrio se desloca mais para a via fermentativa da respiração, por utilizar níveis mais baixos de O<sub>2</sub>, porém estes podem ser monitorados constantemente para evitar um estresse demasiado. A respiração aeróbica é uma via com alto rendimento em produção de energia, na forma de Adenosina Trifosfato (ATP). Na teoria, são produzidos 38 ATPs por molécula de glicose na respiração mitocondrial aeróbica, apesar de que *in vivo* este número se aproxima de 30 (RICH, 2003), enquanto que pela via fermentativa são produzidos apenas 2 ATPs por glicose (TAIZ; ZEIGER, 2009). Assim, grande parte dos distúrbios que ocorrem devido ao armazenamento em O<sub>2</sub> excessivamente baixo, podem resultar, em parte, de um suprimento inadequado de energia para as células nesta situação (SAQUET et al., 2000).

Em uma condição de estresse severo por baixo O<sub>2</sub>, ocorre uma diminuição de fluxo de NADH (reduzido) para a membrana interna da mitocôndria, onde seria oxidado pela cadeia transportadora de elétrons (KE et al. 1993). Dessa forma, a atividade da enzima piruvato desidrogenase (PDH) é reduzida, diminuindo o fluxo de piruvato para o ciclo de Krebs, na matriz mitocondrial. As enzimas piruvato descarboxilase (PDC), álcool desidrogenase (ADH) e/ou lactato desidrogenase (LDH) são ativadas pelo aumento da transcrição e tradução de genes destas enzimas em tais condições e/ou pelo decréscimo do pH citosólico. De acordo com Roberts et al. (1992), o lactato seria o primeiro composto produzido pelo metabolismo fermentativo quando a respiração aeróbica é reduzida pelas baixas pressões parciais de O<sub>2</sub>. O piruvato é fermentado a lactato, pela ação da enzima LDH. Em uma condição normal de pH do citoplasma (7,3 a 7,5) a respiração anaeróbica resulta na produção de lactato que acidifica o citoplasma (PRANGE et al., 2005a). O pH normal do vacúolo das células é de 5,8, mantido

pela ação das  $H^+$ -ATPases, que bombeiam os prótons  $H^+$  do citoplasma para o vacúolo. A baixa produção de energia, na forma de ATP, pela inibição da cadeia transportadora de elétrons, provoca a saída de prótons dos vacúolos e inibe a volta desses através do transporte ativo realizado pelas ATPases, localizadas no tonoplasto (TAIZ; ZEIGER, 2009). Além disso, em condições de anoxia, a acidificação do citoplasma também pode ocorrer devido à hidrólise de ATP e outros nucleotídeos trifosfato (NTPs), que geram ácido fosfórico (GOUT et al., 2001). Desta forma, ocorre acidificação do citoplasma pelo aumento de lactato e de prótons  $H^+$ . Essa diminuição do pH do citoplasma provoca a inibição das enzimas PDH e LDH e ativa a PDC (KE et al., 1995). Dessa forma, o lactato é acumulado apenas no início do processo fermentativo, sendo que, com a alteração do pH, é estimulada a produção de etanol, acetaldeído e acetato de etila.

Em condições de baixo  $O_2$ , com a inibição do ciclo de Krebs e da cadeia transportadora de elétrons, ocorre um aumento de piruvato, de frutose-6-fosfato e NADH (reduzido) e diminuição de ATP e  $NAD^+$  (oxidado). Assim, o piruvato é direcionado para o metabolismo fermentativo, causando acúmulo de acetaldeído, etanol, acetato de etila e/ou lactato (KE et al., 1993). Com o aumento do metabolismo fermentativo, ocorre a oxidação do NADH, permitindo um acréscimo substancial na glicólise e produção de ATP em nível de substrato, o que permite que os tecidos sobrevivam temporariamente mesmo em condições de ausência de  $O_2$  (anóxia). A produção de ATP suficiente, a partir da glicólise, depende de um pool suficiente de  $NAD^+$  (oxidado). Assim, a conversão de NADH (reduzido) em  $NAD^+$  é acompanhada pela produção de lactato pela LDH ou de etanol pela ADH, dependendo do pH do citoplasma (SAQUET; STREIF, 2008).

O metabolismo fermentativo é acompanhado por um incremento na produção de  $CO_2$  pelos frutos armazenados e, conseqüentemente, do quociente respiratório (QR). Isso ocorre pelo fato de que no final da glicólise o piruvato não é mais direcionado para a mitocôndria, em condições de baixo  $O_2$  e sim é degradado a acetaldeído (composto com dois carbonos), pela PDC, com liberação de uma molécula de  $CO_2$ . Ao mesmo tempo, o NADH não é mais direcionado para a cadeia transportadora de elétrons, onde o  $O_2$  seria o acceptor dos elétrons. Em uma reação catalisada pela ADH é formando etanol a partir do acetaldeído, com a oxidação do NADH (SAQUET; STREIF, 2006). Tanto o baixo  $O_2$ , como o alto  $CO_2$  possuem efeito supressor sobre a enzima citocromo *c* oxidase da cadeia transportadora de elétrons (KUBO et al., 1990; LIU et al., 2004; WRIGHT et al., 2015) e, portanto, o consumo de  $O_2$  também é menor. Assim, é possível monitorar, por meio do QR, o metabolismo fermentativo dos frutos (GASSER et al., 2008).

De acordo com Chervin et al. (1996), o acetaldeído é um composto tóxico para as células pela sua capacidade de inativar enzimas. Assim, é importante que ocorra a ativação da ADH ao mesmo tempo que a PDC está ativa, de forma a evitar o acúmulo de acetaldeído, para permitir que o mesmo seja reduzido pelo NADH a etanol, que é bem menos tóxico para as células do que o acetaldeído. Por outro lado, doses baixas de etanol podem ser benéficas para a manutenção da qualidade dos frutos durante o armazenamento pelo seu efeito regulador sobre a produção de etileno e respiração (PESIS, 2005).

A fermentação não é necessariamente prejudicial para o funcionamento normal das células, desde que os níveis de energia estejam adequados para o mínimo metabolismo e o acúmulo de compostos da fermentação não se torne excessivo (WRIGHT et al., 2015). Quando as condições de armazenamento são realizadas com níveis de O<sub>2</sub> extremamente baixos e/ou CO<sub>2</sub> alto, pode ocorrer produção insuficiente de ATP para manutenção do metabolismo celular (SAQUET et al., 2000), pelo fato de que o rendimento energético é bem menor no metabolismo fermentativo que na respiração aeróbica (RICH, 2003; TAIZ; ZEIGER, 2009). A baixa energia para o reparo de membranas celulares, associado à maior permeabilidade das membranas, provocado pelo excesso de compostos da fermentação, provoca a liberação de íons, prótons, ácidos e fenóis do vacúolo, levando à acidificação do citoplasma e oxidação de fenóis, causando o escurecimento dos tecidos (SAQUET et al., 2000).

A questão crucial para o armazenamento de frutos, então, é encontrar um nível de O<sub>2</sub> em que o metabolismo seja mínimo, mas suficiente para produzir energia necessária para o funcionamento normal das células e reparo dos tecidos. Este nível de O<sub>2</sub> está próximo ou um pouco abaixo do ponto de compensação anaeróbico (PCA), que, segundo Boersig et al (1988), é o nível de O<sub>2</sub> em que a evolução de CO<sub>2</sub> é mínima. É possível monitorar o PCA a partir do QR, uma vez que o consumo de O<sub>2</sub> e a produção de CO<sub>2</sub> diminuem com a redução da pressão parcial de O<sub>2</sub> nas câmaras, até que seja atingido o PCA, quando ocorre aumento substancial na produção de CO<sub>2</sub>, resultante do metabolismo fermentativo, com menor consumo de O<sub>2</sub>, juntamente com um aumento no QR (GRAN; BEAUDRY, 1993). Nesta condição ocorre o início do metabolismo fermentativo, com produção de baixas quantidades de compostos da fermentação, que auxiliam no retardo da maturação e, ao mesmo tempo, não causam *off-flavour* e distúrbios, resultantes de energia insuficiente. O armazenamento nestas condições somente é possível com monitoramento constante dos níveis de O<sub>2</sub> nas câmaras durante todo o período de armazenamento.

## 2.3 Atmosfera Controlada Dinâmica

O armazenamento em atmosfera controlada dinâmica (ACD) difere do armazenamento em AC convencional pelo fato de possibilitar o manejo da pressão parcial de  $O_2$  de forma dinâmica, adaptando ao limite mínimo de oxigênio tolerado pelos frutos, reduzindo as reações oxidativas e processo de senescência, diminuindo o desenvolvimento de distúrbios fisiológicos e perda de qualidade (ZANELLA et al., 2008). O limite mínimo de oxigênio pode ser entendido como o nível de oxigênio na câmara de armazenamento que provoca uma redução na respiração de forma que a produção de  $CO_2$  seja mínima, também conhecido por ponto de compensação anaeróbico (PCA) (BOERSIG et al., 1988; GRAN; BEAUDRY, 1993). Quando o  $O_2$  é reduzido além deste limite provoca um incremento drástico na produção de  $CO_2$ , em função da ativação do metabolismo fermentativo. Entretanto, Wright et al. (2015) definem o termo “limite mínimo de oxigênio”, como o menor nível de oxigênio em que uma fruta pode ser armazenada de forma segura, uma vez que atualmente, com as novas tecnologias adotadas no armazenamento, os níveis de  $O_2$  utilizados estão bem abaixo daqueles historicamente considerados seguros. Portanto, nestas condições possivelmente os frutos estejam com o metabolismo abaixo do PCA.

### 2.3.1 Formas de monitoramento do $O_2$ durante o armazenamento

O estabelecimento, com segurança, de pressões parciais extremamente baixas de  $O_2$ , utilizadas no armazenamento em ACD, somente é possível se o início da fermentação dos frutos for detectada durante a diminuição dos níveis de oxigênio (REBEAUD; GASSER, 2015). Existem basicamente três formas de acompanhar e monitorar este limite mínimo de  $O_2$  durante o armazenamento em ACD que são: pela detecção de etanol nas câmaras de armazenamento ou na polpa dos frutos, pela fluorescência de clorofilas e pela determinação do quociente respiratório (QR) dos frutos armazenados. As três formas estão em testes e/ou sendo utilizadas no armazenamento comercial de maçãs e outras frutas (WRIGHT et al., 2015) e serão descritas em maiores detalhes abaixo.

### 2.3.1.1 Determinação do etanol

O uso da determinação da produção de etanol durante o armazenamento para estabelecer a pressão parcial de O<sub>2</sub>, no armazenamento em ACD foi proposto por Veltman et al. (2003). O nível de O<sub>2</sub> é reduzido nas câmaras de armazenamento, enquanto o etanol é monitorado, até atingir um determinado limite, quando o nível de O<sub>2</sub> é levemente aumentado. A empresa Marvil<sup>®</sup>, da Itália, desenvolveu um sistema de determinação do etanol a partir do suco extraído dos frutos que estão sob condições de O<sub>2</sub> extremamente baixo (< 0,5 kPa). Uma vez detectada a presença de etanol, o nível de oxigênio é aumentado nas câmaras, até que ocorra um novo estresse. Este sistema é denominado de ILOS-Plus. A empresa Storex<sup>®</sup> também vem trabalhando há 15 anos com a metodologia de determinação de etanol para avaliar o nível de O<sub>2</sub> em que os frutos podem ser armazenados. Inicialmente eram realizadas determinações manuais da presença de etanol, a partir de análises destrutivas da polpa dos frutos. Atualmente, está sendo comercializado um sistema denominado de DCS<sup>™</sup> (Storex, Gravendeel, The Netherlands), que utiliza uma minicâmara com uma amostra de frutos, colocada dentro de uma câmara maior, podendo ser isolada para medir o etanol do *headspace* da mesma (WRIGHT et al., 2015).

O método da determinação de etanol possui alguns inconvenientes. De acordo com PRANGE et al. (2005a), a produção de etanol depende do pH do citoplasma, sendo que o primeiro composto produzido pela respiração anaeróbica é o lactato e, somente após a acidificação do citoplasma que é ativada a enzima ADH para produção de etanol. De acordo com estes autores a acidificação do citoplasma deveria ser evitada para manter a viabilidade dos produtos. Além disso, é possível que a enzima ADH possa não estar ativa ou que o etanol seja convertido em outros produtos, como ésteres, justificando o fato de não ter aumentado a concentração de etanol em baixo O<sub>2</sub>, no armazenamento da cultivar de maçã ‘Northern Spy’, no experimento realizado pelos autores (PRANGE et al., 2005a).

### 2.3.1.2 Fluorescência de clorofilas (FC)

No método de monitoramento do limite mínimo de oxigênio pela fluorescência de clorofilas (FC), utiliza-se uma amostra de seis frutos que são colocados em uma caixa plástica específica, que possui um sensor FIRM (*Fluorescence Interactive Response Monitor*) e permanece no escuro, em que é aplicado uma luz de LED (*Light Emitting Diode*) de baixa frequência. Quando os frutos estão sob estresse por exposição a baixas pressões parciais de O<sub>2</sub>, a clorofila presente na epiderme dos frutos responde à luz emitindo fluorescência, que é detectada pelo sensor, que transforma o sinal em um pico no gráfico do computador que contém um *software* específico. O parâmetro medido durante o armazenamento é o Fa, que é uma estimativa da fluorescência mínima (Fo) da fluorescência de clorofilas. O Fa aumenta de acordo com o estresse gerado pelo baixo O<sub>2</sub>, gerando um pico de emissão. Esse aumento de Fa é reversível em resposta ao aumento da pressão parcial de O<sub>2</sub> nas câmaras a um nível acima do estresse (PRANGE et al., 2005b). A recomendação é para que a pressão parcial de O<sub>2</sub> seja aumentada em 0,2 a 0,3 kPa acima do nível no momento do estresse, mantendo-se este nível durante o armazenamento e sendo monitorada no gráfico a fim de detectar um eventual novo estresse, identificado pelo pico de fluorescência (GASSER et al., 2008; TRAN et al., 2015). Este método já está sendo bastante utilizado tanto no exterior como também por empresas brasileiras para o armazenamento de maçãs, utilizando a tecnologia HarvestWatch™ (Satlantic L.P., Halifax, Nova Escócia, Canadá). Entretanto, o estresse é detectado apenas no início (pico no gráfico), sendo que após permanece em uma condição de O<sub>2</sub> mais elevada e estática, a não ser que um novo incremento na linha do gráfico (pico) seja registrado. Além disso, o limite mínimo de O<sub>2</sub> em que ocorre a fluorescência de clorofilas também pode sofrer a interferência da temperatura e da taxa de redução do O<sub>2</sub> nas câmaras e a intensidade dos picos é influenciada pelo intervalo de escaneamentos (WRIGHT et al., 2010). Além disso, foi observado que a magnitude de Fa não foi a mesma para diferentes amostras. Esse fato ocorre devido à diferença no tamanho das maçãs, que afeta a distância entre a epiderme da maçã e o sensor, mudando a intensidade do sinal (TRAN et al., 2015).

O mecanismo fisiológico que conecta o metabolismo celular que ocorre na mitocôndria (respiração aeróbica) e no citosol (fermentação), com a fluorescência nos cloroplastos ainda não foi estudado em detalhes, apesar de serem levantadas algumas hipóteses. De acordo com Wright et al (2015), a menor respiração aeróbica diminui a produção de energia, ocorrendo perda de homeostase celular e aumento de compostos reduzidos no citoplasma. O oxigênio é aceptor de elétrons na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria. Quando o armazenamento ocorre em O<sub>2</sub> muito baixo, a fosforilação oxidativa é inibida, acumulando NADH no citoplasma. Este então é transportado para o

cloroplasto, onde é utilizado para reduzir o *pool* de plastoquinona (PQ). O estado altamente reduzido da PQ no cloroplasto é responsável pelo aumento no  $F\alpha$  (WRIGHT et al, 2011). Além disso, com a fermentação, ocorre aumento de etanol, acetaldeído, acetato de etila e lactato que, em altas concentrações, causam danos às membranas celulares, danificando o centro de reação do fotossistema II (FS-II), aumentando a dispersão de energia na forma de fluorescência (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Também a acidose no cloroplasto, provocada pela condição de anaerobiose, pode explicar este incremento no  $F\alpha$  como resultado do baixo  $O_2$  (PRANGE et al., 2005a).

O ciclo das xantofilas também possui um papel importante na regulação da dissipação da energia nos cloroplastos. De acordo com Wright et al. (2011), a violaxantina funciona como pigmento antena e transfere energia para a clorofila *a* e desta, para o centro de reação. Em condição de estresse ou excesso de luz a violaxantina de-epoxidase é ativada, estimulando a produção do intermediário anteroxantina e, finalmente, a zeaxantina. Isso resulta em uma maior quantidade de zeaxantina do que violaxantina no ciclo das xantofilas. A zeaxantina é responsável pelo mecanismo não-fotoquímico da dissipação da excitação do sistema de antena do fotossistema II, que é a fluorescência de clorofilas (TAIZ; ZEIGER, 2009). Assim, um incremento no pico de fluorescência pode ser induzido diretamente pelo baixo  $O_2$ , uma vez que o oxigênio é requerido pela enzima zeaxantina epoxidase do estroma dos cloroplastos, reduzindo a atividade desta enzima, que converte a zeaxantina para anteraxantina. Com a menor atividade desta enzima, o equilíbrio do ciclo favorece uma maior quantidade de zeaxantina. Por outro lado, o baixo  $O_2$  pode atuar de forma indireta, estimulando a violaxantina de-epoxidase, por proporcionar a acidificação do lúmen que ativa, por protonação, essa enzima, aumentando a concentração de zeaxantina (KRAMER et al., 2004).

### 2.3.1.3 Quociente Respiratório (QR)

O terceiro método utilizado no armazenamento em ACD é a medição do quociente respiratório (QR) dos frutos. A medida que a pressão parcial de  $O_2$  é reduzida nas câmaras de armazenamento, há uma diminuição da respiração mitocondrial, que reduz o montante de  $CO_2$  produzido. Abaixo de uma determinada concentração de  $O_2$ , que é o ponto de compensação anaeróbico, ocorre um aumento da produção de  $CO_2$  pela fermentação, em função do

incremento na glicólise, como forma de aumentar a produção de energia (BOERSIG et al., 1988). Assim, é possível avaliar o QR de uma amostra de frutos armazenados em condições de níveis extremamente baixos de O<sub>2</sub>, pela razão entre a produção de CO<sub>2</sub> pela respiração aeróbica e/ou anaeróbica e o consumo de O<sub>2</sub> pelos frutos armazenados ( $QR = \Delta CO_2 / \Delta O_2$ ). Valores próximos de 1,0 expressam que a respiração é aeróbica e, quanto maior este valor, maior a fermentação (respiração anaeróbica). Uma vez determinado o QR ideal, este pode ser considerado um método que mais se aproxima do conceito de ACD, pela possibilidade da variação diária de O<sub>2</sub>, se necessário, para adequar-se ao mínimo metabolismo dos frutos.

Alguns grupos já estão disponibilizando comercialmente sistemas baseados em QR. Na Holanda está sendo utilizado um sistema que determina o QR diretamente em uma câmara comercial, pela empresa Van Amerongen CA Technology B.V. Outra empresa que está adotando esta tecnologia é a Storage Control Systems Inc. (Sparta, MI, USA), em que é utilizado um recipiente de pequeno volume com amostras de frutos. Este recipiente é colocado dentro da câmara comercial e pode permanecer aberta para troca de gases com o ambiente da câmara, como pode estar fechada a fim de determinar o QR e que é usado para monitorar novas atmosferas antes de serem adotadas na câmara comercial (WRIGH et al., 2015). Também no Brasil, mais especificamente no Núcleo de Pesquisa em Pós-colheita da Universidade Federal de Santa Maria, está sendo testado um sistema que permite a determinação do QR bem como o controle do nível de O<sub>2</sub> na câmara comercial de forma totalmente automatizada. Este sistema, de forma semelhante ao anterior, também isola temporariamente uma amostra de frutos dentro de uma minicâmara para o cálculo do QR e ajuste da concentração de O<sub>2</sub> da câmara comercial a partir do QR obtido. Este sistema está sendo aperfeiçoado pela empresa italiana Isolcell<sup>®</sup> para aplicação comercial. Trabalhos de pesquisa também revelaram o benefício da utilização deste sistema de monitoramento do nível crítico de O<sub>2</sub> para maçãs 'Royal Gala' produzidas no Brasil (WEBER et al., 2015).

A utilização em câmaras comerciais do método do QR também foi testada por Van Schaik et al. (2015). Entretanto, estes pesquisadores fazem a determinação do QR a partir da pressão parcial de gases (O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>) diretamente da atmosfera da câmara comercial de 175 t de maçãs. Para tanto, todo o sistema de ventilação, refrigeração e adsorção de CO<sub>2</sub> é desligado por um período de aproximadamente seis horas, permitindo o acúmulo de CO<sub>2</sub> e consumo do O<sub>2</sub> pelos frutos. Neste sistema, portanto, é importante que as câmaras apresentem vedação perfeita, não somente para manter o nível de O<sub>2</sub> em concentração extremamente baixa,

próximo ao PCA, mas também para evitar a entrada deste gás na câmara durante o período de determinação do QR, o que resultaria em erros, superestimando o QR.

### 2.3.2 Nível de CO<sub>2</sub> nas câmaras de armazenamento

No armazenamento em AC, juntamente com a diminuição da pressão parcial de O<sub>2</sub> também ocorre a elevação do CO<sub>2</sub>, pelo seu efeito direto sobre a redução da respiração e produção e ação do etileno, atuando sobre várias enzimas que regulam os processos metabólicos (KUBO et al., 1990; LIU et al., 2004; WILD et al., 1999). Algumas cultivares, a exemplo da 'Fuji', são suscetíveis a altos níveis de CO<sub>2</sub> nas câmaras de armazenamento, podendo ocorrer distúrbios como escurecimento interno e formação de cavernas nos frutos (ARGENTA et al., 2002; CORRÊA et al., 2010; LUMPKIN et al., 2015).

O CO<sub>2</sub> é produzido naturalmente pela respiração dos frutos e necessita ser adsorvido das câmaras de armazenamento de AC. Quando o alto CO<sub>2</sub> é limitante para a manutenção da qualidade, existe a necessidade de aquisição de equipamentos com maior capacidade de adsorção e acionamento mais frequente, gerando custos adicionais (GASSER et al., 2008).

Apesar da atenção das pesquisas em relação ao monitoramento dos limites críticos de O<sub>2</sub> durante o armazenamento em ACD, existem poucos trabalhos relacionados com a concentração adequada de CO<sub>2</sub>. De acordo com Zanella et al. (2005), a recomendação é para que se mantenha a relação CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> específica de cada cultivar, geralmente 2:1, durante o armazenamento em ACD. Isto implicaria em uma concentração de CO<sub>2</sub> bastante baixa, levando em consideração que em ACD o armazenamento ocorre em uma pressão parcial de O<sub>2</sub> menor ou igual a 0,4 kPa. Neuwald et al. (2012) afirmam que não há uma recomendação unânime para o nível ótimo de CO<sub>2</sub>, sugerindo que os níveis em ACD sejam mantidos mais baixos que os usados em AC com o nível O<sub>2</sub> estático, objetivando evitar o escurecimento de polpa causado pelo alto CO<sub>2</sub>. No entanto, isso pode ocorrer em cultivares mais suscetíveis ao alto CO<sub>2</sub>, não sendo válido de uma forma geral. Além disso, outros fatores, como o clima e local de produção podem influenciar a tolerância dos frutos ao CO<sub>2</sub> durante o armazenamento. Por exemplo, maçãs 'Braeburn' cultivadas nas condições climáticas brasileiras, não são tão suscetíveis à degenerescência no armazenamento em atmosfera controlada com alto CO<sub>2</sub> quanto maçãs produzidas em países mais frios (BRACKMANN et al., 2002).

Apesar das recomendações para o armazenamento com pressão parcial de CO<sub>2</sub> mais baixo em ACD, alguns autores reportam que utilizaram a mesma pressão parcial que no armazenamento em AC convencional e não observaram dano por CO<sub>2</sub> em ACD, ou mesmo alguns resultados superiores no controle destes danos com armazenamento em ACD, mesmo com esse nível de CO<sub>2</sub> (GASSER et al., 2008; KÖPCKE, 2015). Entretanto, estes trabalhos foram realizados com armazenamento em ACD-FC, onde após o estresse detectado pela fluorescência de clorofilas, a pressão parcial de O<sub>2</sub> permanece geralmente em 0,4 kPa durante o armazenamento. Ao contrário, nos trabalhos com ACD-QR o nível de oxigênio é mantido abaixo deste valor, necessitando assim ser avaliado o efeito do CO<sub>2</sub> também nesta condição de armazenamento.

### 2.3.3 Temperatura de armazenamento

A temperatura é um fator determinante sobre a manutenção da qualidade dos frutos durante o armazenamento, uma vez que a velocidade das reações químicas e bioquímicas está relacionada com a temperatura em que o produto se encontra (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Na literatura é possível encontrar recomendação de temperatura para o armazenamento de diversas cultivares de maçãs armazenadas em ambiente refrigerado e AC, que são as mais adequadas para prolongar o armazenamento, mantendo a qualidade, sem causar distúrbios. Nas condições brasileiras, a recomendação é de temperaturas entre -0,5 °C e 0,5 °C para maçãs ‘Fuji’ e de 0,0 a 1,0 °C para a ‘Gala’ e mutantes (BRACKMANN et al., 1998; 2002; 2009; SAQUET et al., 1997).

O nível de O<sub>2</sub> utilizado na câmara possui uma relação com a temperatura de armazenamento. Isso se deve à menor solubilidade do oxigênio em temperaturas maiores, o que causa um incremento no limite mínimo de O<sub>2</sub> com o aumento da temperatura (WRIGHT et al., 2010). Esses autores monitoraram o estresse pela exposição à baixa pressão parcial de O<sub>2</sub> em maçãs submetidas às temperaturas de 20, 10, 3,5 e 0 °C e observaram a ocorrência de pico de fluorescência (estresse) em 0,72, 0,33, 0,22 e 0,08 kPa de O<sub>2</sub>, respectivamente.

De acordo com KE et al. (1991), a taxa de acúmulo de etanol nos frutos armazenados em baixo O<sub>2</sub> é dependente da temperatura. À medida que a temperatura aumenta, a taxa de consumo de O<sub>2</sub> e a taxa respiratória aumentam, causando acúmulo de etanol, para um determinado nível de O<sub>2</sub>. Portanto, a adoção de temperaturas maiores implica na necessidade

de aumento da concentração de O<sub>2</sub> nas câmaras de armazenamento (WEBER et al., 2011). Entretanto, isso poderia ocasionar aceleração do metabolismo e maturação antecipada dos frutos armazenados em AC, com níveis de O<sub>2</sub> constantes.

O aumento da temperatura de armazenamento é desejável e está sendo pesquisado, em função da economia de energia elétrica com o sistema de refrigeração. Em baixas temperaturas, como as utilizadas no armazenamento de maçã, uma pequena elevação da temperatura resulta em considerável economia de energia. No entanto, a elevação da temperatura no armazenamento em AC acelera o metabolismo e a maturação dos frutos e seria um contrassenso com relação aos resultados obtidos pelas pesquisas realizadas até o momento para avaliar a melhor temperatura de armazenamento. As pesquisas mais recentes, portanto, estão voltadas para a combinação de AC com outras técnicas que reduzam o metabolismo para possibilitar o aumento da temperatura. McCormick et al. (2012) observaram que, com aplicação de 1-MCP, foi possível elevar a temperatura de armazenamento em 2,4 °C acima da recomendada, sem prejuízo à qualidade dos frutos, além de obter uma economia de energia de 26% e 35% para as cultivares ‘Jonagold’ e ‘Gala’, respectivamente, durante seis meses de armazenamento. Em trabalho recente, foi avaliado o armazenamento de três cultivares de maçãs, durante sete meses, em ultrabaixo oxigênio (ULO - 1,0 kPa O<sub>2</sub>) em 1,0 °C, ULO + aplicação de 1-MCP em 5,0 °C e ACD-FC em 1,0 °C (KITTERMANN et al., 2015). Os autores observaram uma economia de energia do sistema de refrigeração de 20% no armazenamento em ACD-FC e de 70% na maior temperatura, comparado com ULO em 1,0 °C. De uma forma geral, não houve grandes alterações de qualidade dos frutos após o armazenamento nas diferentes temperaturas, entretanto, ocorreu comportamento distinto para as diferentes cultivares.

Diferentes cultivares de maçãs reagem de forma diferenciada ao aumento da temperatura e outras técnicas associadas, como a aplicação de 1-MCP, o armazenamento em ACD-FC e a combinação entre elas (KÖPCKE, 2015). Segundo estes autores, a cultivar Jonagold adapta-se bem ao armazenamento em maiores temperaturas, enquanto a ‘Gloster’ e ‘Elstar’ são mais sensíveis, com maior incidência de escurecimento interno causado pela interação entre 1-MCP e alta temperatura. Para a maçã ‘Fuji’, Kweon et al. (2013) recomendam o armazenamento em 0 °C, a fim de reduzir a perda de qualidade, mesmo que a ocorrência de degenerescência seja menor na temperatura mais elevada (2,0 °C). No entanto estes autores utilizaram AC convencional, sem aplicação de 1-MCP em seu experimento, promovendo um alto metabolismo na temperatura mais elevada, uma vez que o menor nível de O<sub>2</sub> utilizado foi de 1,5 kPa. Desta forma, um simples aumento da temperatura em AC, pode

trazer efeitos adversos, necessitando a utilização de uma técnica auxiliar à AC para possibilitar o aumento da temperatura de armazenamento. Uma possível estratégia seria utilizar temperatura mais elevada associada ao armazenamento em ACD-QR, em que é possível monitorar o limite mínimo de O<sub>2</sub>, reduzindo a ocorrência de distúrbios, mantendo a qualidade e economizando energia elétrica durante o armazenamento de maçãs. Utilizando fluorescência de clorofilas para monitorar o limite mínimo de O<sub>2</sub>, Köpcke (2015) obteve como concentração final de O<sub>2</sub> de 0,6; 0,7 e 0,8 kPa de O<sub>2</sub> para as temperaturas de 2,0; 3,5 e 10 °C, respectivamente. Estes níveis de O<sub>2</sub> estavam 0,2 kPa acima do PCA, de acordo com a recomendação para a técnica de fluorescência de clorofilas.

## 2.4 Aplicação de 1-MCP

O 1-metilciclopropeno (1-MCP), fórmula molecular C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>, é um gás à temperatura e pressão ambiente. Este composto controla a ação do etileno por se ligar aos receptores na membrana das células, impedindo a ligação do etileno e sua rota de transdução de sinal até o núcleo das células, onde ocorre a transcrição gênica de muitas proteínas e enzimas relacionadas com a maturação e senescência. De acordo com Sisler & Serek (1997), a afinidade do 1-MCP pelos receptores é aproximadamente 10 vezes maior que do próprio etileno, sendo ativo em concentrações muito menores.

Na literatura existem vários trabalhos que reportam os benefícios da aplicação de 1-MCP sobre o retardo da maturação e manutenção da qualidade de maçãs (BLANKENSHIP; DOLE, 2003; BRACKMANN et al., 2004; WATKINS; NOCK, 2012;) e controle de escaldadura (FAN et al., 1999). De acordo com Tatsuki et al. (2007), a aplicação de 1-MCP diminui a perda de firmeza e acidez de maçãs, suprime o aumento da produção de etileno e a expressão dos genes *MdACS1*, *MdERS1*, *MdERS2*, e *MdPG1*, de enzimas relacionadas com a rota de produção de etileno, receptores de membrana e enzimas que degradam a parede celular.

Apesar dos benefícios da aplicação de 1-MCP, também podem ocorrer efeitos adversos da aplicação deste produto, dependendo da combinação de outros fatores pós-colheita adotados durante o armazenamento. Um exemplo é a redução da produção de compostos voláteis, como ésteres e álcoois, relacionados com o aroma. A produção destes compostos sofreu um atraso em maçãs ‘Gala’ tratadas com 1-MCP, que permaneceram no

armazenamento refrigerado. Para os frutos tratados com 1-MCP e armazenados em AC, houve maior decréscimo na produção destes voláteis, sugerindo que o armazenamento em AC pode prolongar o impacto negativo do 1-MCP (MATTHEIS et al., 2005). Além disso, o 1-MCP aumenta o risco de danos externos por alto CO<sub>2</sub> em maçã ‘Empire’, especialmente quando os frutos permaneceram nas primeiras semanas em altas concentrações de CO<sub>2</sub> (FAWBUSH et al., 2008). Tratamento com 1-MCP aumenta a suscetibilidade desta cultivar de maçã ao escurecimento interno, com sintomas parecidos ao dano por frio (LEE et al., 2012). De acordo com estes autores, a menor sensibilidade ao etileno causado pelo 1-MCP, resulta em mudanças metabólicas, apesar dos pontos-chaves associados com o desenvolvimento do distúrbio ainda serem desconhecidos. Também a incidência e severidade de podridões aumentaram em maçãs ‘Golden Delicious’ tratadas com o produto, especialmente quando combinado com outros tratamentos estressantes aos frutos (LEVERENTZ et al., 2003).

Trabalhos recentes com armazenamento de maçãs estão focados no aumento da temperatura, buscando economizar energia com sistema de refrigeração. Para tanto, uma das estratégias utilizadas é a aplicação de 1-MCP associado ao armazenamento em AC, a fim de manter a qualidade e possibilitar o armazenamento em temperatura mais elevada. O armazenamento de maçãs ‘Jonagold’, ‘Golden Delicious’ e ‘Pinova’ em AC, na temperatura de 5,0 °C e com aplicação de 1-MCP, foi eficiente em economizar energia e manter a qualidade dos frutos de forma similar ao armazenamento em AC ou ACD-FC em 1,0 °C (KITTERMANN et al., 2015).

Entretanto, Jung & Watkins (2011) observaram maior escurecimento interno em maçãs ‘Empire’ tratadas com 1-MCP, comparadas com aquelas sem tratamento. Este resultado ficou mais evidente na temperatura de armazenamento de 4,0 °C em relação a 0,5 °C. O escurecimento interno estava correlacionado positivamente com a atividade da polifenoloxidase (PPO), sendo que na temperatura de 4,0 °C e sem a aplicação de 1-MCP houve redução da atividade desta enzima. Assim, os autores sugerem que o armazenamento em baixa temperatura (0,5 °C) e, em 4,0 °C associado à aplicação de 1-MCP, sejam condições estressantes para a maçã, provocando maior dano por escurecimento interno, o que não acontece em 4,0 °C sem a aplicação do produto. Em outro trabalho foi observado que a associação das técnicas aplicação de 1-MCP e armazenamento em ACD é benéfica e necessária para o controle dos distúrbios por alta temperatura causados pelo 1-MCP (KÖPCKE, 2015).

Apesar dos trabalhos existentes, avaliando a aplicação de 1-MCP juntamente com a ACD, estes foram realizados com a utilização do método da fluorescência de clorofilas, sendo que o efeito da aplicação deste produto em frutos armazenados em ACD-QR ainda não foi avaliado, nem a associação destas técnicas com armazenamento em temperatura mais elevada.

Outra situação a considerar é que, apesar do 1-MCP ser utilizado em pequenas concentrações, possuir um modo de ação não tóxico e ser seguro para os humanos, ambiente e animais (BLANKENSHIP; DOLE, 2003), não possui autorização para ser utilizado na agricultura orgânica (REBEAUD; GASSER, 2015). Por outro lado, a ACD pode ser considerada uma técnica “limpa” e, portanto, ser utilizada na produção orgânica. Mesmo a preferência de grande parte dos consumidores por produtos sem a aplicação de compostos “químicos” pode favorecer a escolha pela utilização da ACD como substituto para a aplicação de 1-MCP.

## **2.5 Produção de compostos voláteis relacionados com o aroma**

Com o desenvolvimento de técnicas como a cromatografia gasosa e espectrometria de massa foi possível explorar melhor a produção de aroma dos frutos. Mais de 300 compostos voláteis foram identificados em maçãs de diferentes cultivares, dentre álcoois, aldeídos, ésteres, cetonas e éteres, sendo que os de maior impacto são em torno de 30 a 40 compostos (CUNNINGHAM et al., 1986) que pertencem à classe dos ésteres e álcoois (DIXON; HEWETT, 2001). Com relação aos álcoois, o 1-butanol é desejável por possuir um aroma doce e característico de maçã (MEHINAGIC et al., 2006).

Os ésteres são produzidos pela combinação de álcoois e CoA, provenientes de ácidos carboxílicos em uma reação catalisada pela enzima álcool acil CoA transferase (AAT). Uma vez que o CoA mais abundante nos tecidos dos frutos é o Acetil-CoA, a maior parte dos ésteres são acetatos (DIXON; HEWETT, 2001). De acordo com Young et al. (1996), o acetato de 2-metil-butila é o éster que mais contribui para a propriedade sensorial de maçãs ‘Royal Gala’ cultivadas na Nova Zelândia. Outros autores afirmam que este éster, juntamente com o acetato de hexila e acetato de butila são os compostos de maior impacto no aroma de maçãs do grupo Gala (PLOTTO et al., 2000). Para a maçã ‘Fuji’, os compostos que mais contribuem para o aroma, tanto na colheita como após o armazenamento, são os ésteres 2-metil butanoato de etila, acetato de 2-metil butila e acetato de hexila (ECHEVERÍA et al.,

2004). Outra classe de compostos presentes em maçãs armazenadas em AC é a dos aldeídos, especialmente o hexanal e trans-2-hexenal, que estão relacionados com o aroma de “maçã verde” (MEHINAGIC et al., 2006).

Os primeiros estudos sobre a composição volátil em maçãs evidenciaram que a redução da respiração, com o armazenamento em baixas pressões parciais de O<sub>2</sub>, foi o responsável pela diminuição do aroma nos frutos. Entretanto, quando foi aplicado aminoetoxivinilglicina aos frutos, um inibidor da síntese de etileno, mesmo com o armazenamento refrigerado (O<sub>2</sub> ambiente), foi observado um efeito semelhante ao baixo O<sub>2</sub> sobre a redução da produção de compostos voláteis. Portanto, o baixo O<sub>2</sub> não poderia ser o único fator responsável pela menor produção de compostos voláteis durante o armazenamento (BANGERTH et al., 2012). De acordo com estes autores, a produção autocatalítica de etileno é um pré-requisito para iniciação do amadurecimento, incluindo a produção de voláteis em frutos climatéricos. Quanto mais imaturos os frutos na colheita, maior a concentração de etileno requerida para iniciar a produção autocatalítica de etileno. Portanto, o ponto de colheita e estratégias de armazenamento, como diminuição gradativa de O<sub>2</sub> nas câmaras, influenciam a produção de voláteis dos frutos.

No armazenamento em AC, o baixo O<sub>2</sub> e o alto CO<sub>2</sub> influenciam a produção de voláteis por diferentes processos. De acordo com Brackmann et al. (1993), a produção de ésteres e álcoois de cadeia linear foi suprimida pela condição de baixo O<sub>2</sub>, enquanto que a produção de ésteres de cadeia ramificada apenas foi reduzida em alto CO<sub>2</sub> (3,0%). Estes autores também afirmam que o baixo O<sub>2</sub> reduz a síntese de compostos voláteis de cadeia linear pela influência deste gás no metabolismo e/ou síntese de lipídios, pela menor concentração de ácidos graxos, principalmente ácido linoleico, nesta condição de armazenamento. Ácidos graxos livres ou aqueles oriundos da atividade de lipases e metabolizados pela  $\beta$ -oxidase e/ou lipoxigenase são considerados os maiores precursores de ésteres, álcoois e aldeídos, produzidos durante a maturação de maçãs (FELLMAN et al., 2000). Por tratar-se de uma enzima dependente de O<sub>2</sub>, a lipoxigenase possui sua atividade reduzida com o armazenamento em baixos níveis de O<sub>2</sub>, apresentando um efeito residual do armazenamento em AC também durante o período de vida de prateleira, em que a atividade desta enzima permanece baixa e, portanto, reduzindo a capacidade dos tecidos em biossintetizar voláteis também durante este período (LARA et al., 2006). Entretanto, em maçã ‘Royal Gala’ foi observado que houve manutenção da concentração de ésteres de cadeia ramificada, a exemplo do acetato de 2-metil-butila, mesmo em condições de O<sub>2</sub> bastante baixas (0,5 kPa), apesar da redução de outros ésteres, principalmente de cadeia linear (BOTH

et al., 2014b), confirmando que o baixo  $O_2$  possui pouca influência sobre a produção de compostos de cadeia ramificada.

A produção de compostos voláteis também é altamente dependente do etileno (MATTHEIS et al., 2005). De acordo com Bangerth et al. (2012), tanto a aplicação de inibidores da síntese ou ação do etileno, como o armazenamento em baixo  $O_2$ , provocam uma redução da sensibilidade dos frutos ao etileno. De acordo com Kondo et al. (2005), a aplicação de 1-MCP, um inibidor da ação do etileno, diminuiu a produção de aroma em maçãs durante o amadurecimento, prejudicando a qualidade sensorial dos frutos. A produção de ácidos graxos, especialmente o linoleico, um importante precursor de compostos voláteis, é estimulada pelo etileno e com o avanço da maturação dos frutos na colheita (SONG; BANGERTH, 2003). Segundo estes autores, a ausência de produção autocatalítica de etileno nos frutos colhidos na fase pré-climatérica, diminui a respiração e produção de energia na forma de ATP, resultando em menor produção de ácidos graxos, o que pode influenciar negativamente na produção de aroma. Da mesma forma, o armazenamento prolongado em AC também diminui estes eventos e reduz a produção de compostos voláteis, com a diferença que frutos colhidos precocemente são responsivos à aplicação exógena de etileno e aqueles em AC não.

Praticamente inexistem trabalhos avaliando o efeito do armazenamento em ACD sobre a produção de compostos voláteis. Entretanto, Raffo et al. (2009) observaram em maçãs 'Pinova' melhor preservação de compostos relacionados com o aroma em ACD, comparado com AC + 1-MCP. No trabalho destes autores foi utilizado um nível de  $O_2$  que variou entre 0,4 a 0,6 kPa, utilizando a técnica de fluorescência de clorofilas (ACD-FC). Portanto, ainda são necessários estudos para avaliar a produção de compostos voláteis com o armazenamento em níveis de  $O_2$  mais baixos, como aqueles utilizados em ACD-QR.

O armazenamento em ACD-FC é caracterizado por um estresse inicial por baixo  $O_2$  (pico de fluorescência), que após é mantido em condição estática e, em torno de 0,2 kPa acima do pico (GASSER et al., 2008; TRAN et al., 2015). Assim, esse estresse inicial poderia de alguma forma interferir na atividade enzimática ou na expressão gênica de intermediários na produção dos voláteis, influenciando na sua capacidade de produzir estes compostos. De acordo com Chitarra & Chitarra (2005), os voláteis produzidos pela modificação da atmosfera de armazenamento, como o acetaldeído, podem mediar a atividade de enzimas como a glicose-6-fosfato desidrogenase, ribonuclease, álcool desidrogenase e lactato desidrogenase. Também é possível que o armazenamento em ACD-QR, mesmo com pressões parciais de  $O_2$  mais baixas que em ACD-FC, por manter o metabolismo em um nível baixo, mas sem

estresse demasiado, poderia preservar melhor os precursores dos ésteres, para serem usados durante o período de vida de prateleira para a produção destes compostos. De acordo com Fellman et al. (1993), a disponibilidade de substrato é um fator importante na regeneração do aroma em maçãs armazenadas em AC por longos períodos. Além disso, Song & Bangerth (2003) verificaram que o atraso na instalação de AC proporcionou maior produção de aroma em maçãs, por este tempo de adaptação ao baixo  $O_2$  ter proporcionado maior produção de ATP e síntese *de novo* de ácidos graxos, que são compostos utilizados na produção de voláteis, especialmente compostos de cadeia linear.

A produção de compostos da fermentação, como acetaldeído, etanol e acetato de etila, que ocorre no armazenamento em  $O_2$  excessivamente baixo, são indesejáveis em quantidades excessivas e contribuem para *off-flavours* (FORNEY et al., 2000; WRIGHT et al., 2015), mas a presença em pequenas quantidades pode potencializar o aroma e *flavour* de maçãs. Echeverría et al. (2008) observaram que amostras de maçãs ‘Mondial Gala’ que tiveram maior aceitação pelo consumidor possuíam a presença de acetato de etila, justificando que a presença deste éster até um determinado limite pode contribuir para o aroma de maçãs, mas quando em maior concentração pode ser indesejável. Além disso, o importante na aceitação dos consumidores é o balanço entre os compostos voláteis presentes, a acidez e a firmeza dos frutos (ECHEVERRÍA et al., 2008). De acordo com López et al. (2007), apesar do armazenamento em baixo  $O_2$  afetar negativamente o aroma de maçãs, o fato desta técnica ser eficiente em manter os outros atributos de qualidade após armazenamento prolongado, resulta em boa aceitação por parte dos consumidores destes frutos. No armazenamento em ACD-QR, por manter o nível de  $O_2$  variável durante o armazenamento e com uma baixa produção de compostos da fermentação, possivelmente haverá um comportamento diferente em relação à AC convencional na composição volátil destes frutos. Além disso, esta técnica de armazenamento mantém melhor as características físico-químicas após um prolongado armazenamento (WEBER et al., 2015), o que também pode contribuir para uma maior aceitação pelo mercado consumidor.

### 3 ARTIGO 1

#### 3.1 Effect of storage under extremely low oxygen on volatile composition of ‘Royal Gala’ apples<sup>1</sup>

##### Abstract

The aim of this work was to assess the profile of volatile compounds in ‘Royal Gala’ apples stored under controlled atmosphere (CA) with O<sub>2</sub> levels ranging from 1.0 kPa to as low as 0.5 kPa during 8 months (0.5 °C) followed by 7 days of shelf-life at 20 °C. Volatile compounds were collected via solid-phase microextraction (HS-SPME) and analyzed by gas chromatography. Straight and branched-chain esters exhibited a distinct pattern. The emission of straight-chain esters decreased under extremely low O<sub>2</sub> (0.5 kPa) while branched-chain esters were not significantly affected in such condition. 2-Methyl-butyl acetate, a significant contributor to ‘Royal Gala’ aroma, was higher in intermediate O<sub>2</sub> concentration, suggesting that lowering the O<sub>2</sub> levels down to 0.7 kPa does not negatively affect the volatile composition of ‘Royal Gala’ apples as compared to the standard CA (1.0 kPa O<sub>2</sub>). The remaining volatile compounds were not strongly affected by storing fruits under extremely low O<sub>2</sub>.

**Keywords:** *Malus domestica*. Controlled atmosphere. Aroma. Volatile compounds. Ethylene.

##### 3.1.1 Introduction

Apples are one of the most produced and consumed fruits in the world. In this production, Brazil occupied the 9th position with 1.3 million tonnes of apples produced per year (Agriannual, 2012; FAO, 2011). In Brazil, apple production remains to two cultivars, ‘Gala’ and ‘Fuji’ and its respective strains. One of the most important ‘Gala’ strains is the ‘Royal Gala’ with almost 25% of total Brazilian production (Agapomi, 2013).

---

<sup>1</sup> Artigo publicado na revista Food Chemistry, v.156, p.50–57, 2014.

The storage of apples in controlled atmosphere (CA), is widely used by fruit storage companies because of the beneficial effect of CA in maintaining fruit quality and reducing the incidence of physiological disorders both during and after storage. However, despite the positive effect of CA on the postharvest quality of apples, exposing these fruits to long-term storage under low O<sub>2</sub>, can have a negative impact on the release of volatile compounds. In fact, CA-stored apples produce significantly less volatile compounds during shelf-life than those stored under low temperature with natural air (López et al., 2007; Plotto, McDaniel & Mattheis, 1999). Thus, although CA storage negatively affects fruit aroma, the fact that it efficiently maintains other quality parameters after long-term storage results in good acceptance of CA-stored fruits by consumers (López et al., 2007).

In Brazil, it is common practices extend the apple storage under CA up to 8 or 9 months (Brackmann et al., 2013; Weber, Brackmann, Anese, Both & Pavanello, 2013). This long storage life is due the fact that Brazil does not commonly import apples during the off season. So, this long-term storage can impact the apple volatile emission. Furthermore, it is becoming a common practice in packing houses to lower the partial pressures of O<sub>2</sub> below those conventionally used. In fact, O<sub>2</sub> levels as low as 0.5 kPa or even lower are nowadays commonly used. Lowering the partial pressure of O<sub>2</sub> to such levels has only been possible by concomitantly monitoring the minimum O<sub>2</sub> levels tolerated by fruits during the storage, as for example under dynamic CA (DCA) storage (Gasser, Eppler, Naunheim, Gabioud & Hoehn, 2008; Prange, DeLong, Harrison, Leyte & McLean, 2003; Watkins, 2008; Wright, DeLong, Harrison, Gunawardena & Prange, 2010; Zanella et al., 2005). It is noteworthy, however, that in DCA the O<sub>2</sub> levels are kept at levels that do not cause harm to fruits. In the case of apples, the storage under DCA also reduces significantly the synthesis of ethylene and, as a consequence, maintains quality parameters such as pulp firmness and peel color, and reduces storage scald (Watkins, 2008).

Besides fruit respiration, also the presence of ethylene in an active form can affect the emission of volatile compounds. The effect of ethylene on the metabolism of fruits has been assessed by inhibiting biochemical steps of its synthesis, such as preventing the activity of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase by the application of aminoethoxyvinylglycine (AVG). It has been previously shown that the pre-harvest application of AVG on apples had a similar effect as CA storage on the emission of volatiles, albeit AVG-treated fruits were stored only under cold air (Bangerth, Streif, Song & Brackmann, 1998). Thus, the study of Bangerth et al. (1998) suggests that low O<sub>2</sub> levels are not the only factor inhibiting the release of volatile compounds by fruits. In this regard, it has

been reported that whereas the application of 1-methylcyclopropene (1-MCP), a potent inhibitor of ethylene action, significantly delays ripening and senescence in apples (Blankenship & Dole, 2003), it has the disadvantage of reducing the production of volatiles (Fan, Mattheis & Buchanan, 1998; Kondo, Setha, Rudell, Buchanan & Mattheis, 2005).

The aroma of apples results from a complex interaction between several organic compounds. Although esters are of major importance, other compounds such as alcohols, aldehydes, ketones, terpenes, among others, do also contribute significantly to the characteristic aroma of apples (Mehinagic, Royer, Symoneaux, Jourjon & Prost, 2006). Moreover, the perception of aroma is strongly influenced not only by the relative quantities, but also by the interaction of the volatile compounds present in a specific fruit (Aprea et al., 2012). In the case of cv. Royal Gala apples grown in New Zealand, it has been found that the ester 2-methyl-butyl acetate contributes strongly to the sensory properties of these fruits (Young, Gilbert, Murray & Ball, 1996). An increase in 2-methyl-butyl acetate is associated with a “sweet” aroma, a property also influenced by the presence of hexyl acetate and butanol (Young et al., 1996). According to Echeverría, Fuentes, Graell, Lara and López (2004), the storage of cv. Fuji apples under CA with either 1.0 or 3.0 kPa O<sub>2</sub> results in reduced concentrations of hexyl acetate. Such results suggest that at least part of the negative effect of CA on aroma may be related to a decrease in the accumulation of this volatile compound. Thus, low partial pressures of O<sub>2</sub> seem to negatively affect the emission of volatile compounds. This effect may either be directly associated with the low O<sub>2</sub> levels or indirectly because of the effect of low O<sub>2</sub> on ethylene synthesis. However, up to date there are no reports indicating the consequence of ultra-low O<sub>2</sub> levels, as for example those commonly used in DCA systems, on the composition of volatile compounds in apples stored during long term.

Against this background, the main goal of the present work was to assess the influence of ultra-low O<sub>2</sub> during CA storage on the emission or synthesis of volatile compounds in ‘Royal Gala’ apples.

### 3.1.2 Material and Methods

#### 3.1.2.1 Fruit harvest and storage conditions

Apples (cv. Royal Gala) were harvested on the 19<sup>th</sup> February 2011 from a commercial orchard in Vacaria, RS, Brazil. At harvest, fruits had an iodide-starch index of 6.25 (scale 1-10, where 1 = green and 10 = ripe), 0.39  $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  of ethylene synthesis, 5.89 mL  $\text{CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  of respiration rate, 4.35 mEq  $100 \text{ mL}^{-1}$  of NaOH (0.1 N) for titratable acidity and 11.2 °Brix of soluble solids. Apples were stored in experimental CA chambers (230 L volume each) placed inside a cold chamber, where the temperature was maintained at 0.5 °C ( $\pm 0.1$  °C) throughout the whole experiment. The levels of  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$  and relative humidity in each of these chambers were monitored and controlled daily.

Fruits were stored under four different  $\text{O}_2$  conditions (with three replicates each): (1) 1.0 kPa  $\text{O}_2$ ; 0.8 kPa  $\text{O}_2$ ; 0.7 kPa  $\text{O}_2$  or 0.5 kPa  $\text{O}_2$ . In the first day of storage, the partial pressure of  $\text{O}_2$  was lowered down to 5.0 kPa by flushing the storage chamber with  $\text{N}_2$ . From this day onwards,  $\text{O}_2$  was consumed by fruit respiration and decreased to 1.5 kPa at the end of the first week of storage. Then, during one week, fruits were conditioned to low  $\text{O}_2$  levels by gradually decreasing the partial pressure of  $\text{O}_2$  down to the level stipulated for each treatment. The atmosphere composition of each storage chamber was monitored daily with the help of a gas analyzer Ultramat 23 (Siemens, Germany). These conditions were then maintained until the end of the experiment by injecting natural air inside the store chambers whenever the  $\text{O}_2$  levels dropped below the desirable levels. The partial pressure of  $\text{CO}_2$  was maintained at 1.2 kPa, and the excess was removed by circulating the chambers' atmosphere through calcium hydroxide.

#### 3.1.2.2 Sample preparation

Apples were stored during 8 months under the conditions mentioned above. At the end of the storage period, fruits were kept at 20 °C for seven days to simulate shelf-life. The production of volatile compounds was assessed during shelf-life. A transversal slice from the equatorial part was removed from fruits previously cooled down to 0 °C (pulp temperature) and the endocarp and seeds were discharged. The whole procedure was undertaken under low temperature (approximately 5 °C) to prevent the chemical and enzymatic oxidation of samples. Then, samples were ground and centrifuged and the juices were placed inside amber glass flasks and immediately frozen to -30 °C.

#### 3.1.2.3 Analysis of volatile compounds

Samples were stored during three weeks and then thawed for 24 h in a refrigerator (5 °C). An aliquot of 10 mL was taken, mixed with 3 g NaCl and 10 µL of a 3-octanol standard solution (82.2 µg mL<sup>-1</sup>) and placed inside 20-mL vial and sealed with PTFE-coated silicone lid seals.

In order to extract volatile compounds from the headspace, samples were subjected to solid phase microextraction (HS-SPME). A Divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fiber (Supelco, 50/30 µm × 20 mm) was preconditioned following the manufacturer's protocol. The vials containing the samples were submerged in water bath at 35 °C for 5 min. Afterwards the fiber was exposed to the headspace of each sample for 60 min under constant stirring.

The volatile compounds were quantified by a Varian Star 3400CX (CA, USA) gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (GC-FID). The fiber was thermally desorbed into the injection port at a temperature of 250 °C for 10 min, in a splitless mode for 2 min. The compounds were separated in a polar fused silica capillary column CP-WAX 52 CB (Chrompack, USA; 60 m × 0.25 mm × 0.25 µm). Hydrogen was used as carrier gas at constant pressure (15 psi) and flow rate (1.2 mL min<sup>-1</sup>). The initial column temperature was set to 35 °C and held for 3 min. Then, a temperature gradient was started of 2 °C min<sup>-1</sup> until 80 °C, followed by a 5 °C min<sup>-1</sup> increase until 230 °C, and maintained at isothermal conditions for 5 min. The temperature in the detector was kept at 230 °C. A series of homologous n-alkanes was analyzed under the same conditions to calculate the Kovats index (KI). The concentration of volatile compounds was determined by internal standardization according to Ban, Oyama-Okubo, Honda, Nakayama and Moriguchi (2010) and Qin et al. (2012) methods.

Qualitative analysis of volatile compounds was carried out by a Shimadzu QP2010 Plus gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). For these analyses, the same chromatographic conditions described above were used and helium was the column carrier gas. The detector was operated in the electron impact ionization mode with ionization energy of +70 eV and a scan mass range from 35 to 350 m/z. The analytes were identified based on comparison with mass spectra available in the National Institute of Standards and Technology (NIST) library and by comparing the calculated Kovats indexes with those available in the scientific literature.

#### 3.1.2.4 Ethylene and respiration analysis

Ethylene synthesis was assessed during shelf-life at 20 °C. The analyses were carried out with intact fruits at four time points: at removal from chambers, and after 2, 4 and 6 days at 20 °C. Apples (approximately 1500 g) were placed inside 5-L glass jars, which were hermetically sealed. Samples (1.0 mL) from the headspace were then collected and injected in a Varian, Star 3400CX gas chromatograph (CA, USA) equipped with a flame ionization detector (FID) and a Porapak N80/100 (2 m) column. The temperatures in the column, injector and detector were adjusted to 90, 140 and 200 °C, respectively. Ethylene concentrations were calculated automatically by software, taking into account the peak area of each sample and that of a standard (3.27  $\mu\text{L L}^{-1}$  ethylene) in the same conditions. Ethylene synthesis was then calculated by considering the concentration of ethylene detected, the free volume of jar, the mass of fruits and time, and was expressed as  $\mu\text{L ethylene kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

In order to determine fruit respiration, the concentration of  $\text{CO}_2$  accumulated inside the glass jars used for ethylene synthesis analysis was assessed by circulating the atmosphere through a gas analyzer (Agri-datalog, Italy). Respiration was then expressed as  $\text{mL of CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  of  $\text{CO}_2$  by taking into account the measured  $\text{CO}_2$  concentrations, the free volume of each jar, the mass of fruits and time.

#### 3.1.2.5 Statistical analysis

All data were subjected to a multivariate analysis via a Principal Component Analysis (PCA) using the Pirouette 3.11 software (Woodinville, USA, 2003). Before multivariate analysis the data matrix was auto scaled for each variable in order to assume the same weight during analysis. In addition, data was assessed by ANOVA, followed by a Tukey's multiple range test ( $p < 0.05$ ). This analysis was performed using the Sisvar statistical software.

#### 3.1.3 Results and Discussion

After 8 months of storage under CA with ultra-low  $\text{O}_2$  followed by seven days of shelf-life at 20 °C, apple samples were evaluated for the incidence of decay (four replicates

with 25 fruits per treatment), total acidity and total soluble solids. No statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) among the treatments were observed for the aforementioned variables (data not shown). Thus, it is assumed that differences in the composition of volatile compounds are likely associated to the storage conditions and not to other factors, such as the occurrence of decay.

The GC-FID analysis detected more than 80 volatile compounds, from which 46 were identified by GC/MS. The compounds present in the fruit samples contained esters (12 compounds), alcohols (15), aldehydes (7), organic acids (5), ketones (3), furans (1), hydrocarbonates (1), ethers (1) and terpenes (1) (Table 1). These compounds were detected in all samples, independently from the  $O_2$  level used during storage, although the storage condition had an effect on the concentration of many of them.

An exploratory multivariate analysis, namely principal components analysis (PCA), was used with the aim of better visualizing the effect of the partial pressures of  $O_2$  on the volatile profile due to the large amount of data. Figure 1a and 1b shows the scores (samples) and weights (compounds), respectively, from the two major principal components. Together, principal component 1 (PC1) and principal component 2 (PC2) explained 56.1% of the overall variance. This analysis allowed a separation of samples in distinct groups according to their  $O_2$  levels. The  $O_2$  conditions used in the present work were separated along PC1, where 1.0 kPa  $O_2$  and 0.5 kPa  $O_2$  located in the two opposing extremities and the intermediate conditions in the center of the PCA plot (Fig. 1a). The PC1's right-hand quadrant, which was correlated with fruits stored under the highest  $O_2$  levels, not only exhibited a higher abundance of esters, but also of variables related to ethylene synthesis and respiration. Thus, these results indicated that there was a high correlation among ethylene synthesis and esters compounds with the highest  $O_2$  level (1.0 kPa) samples.

Although PC2 had a smaller weight on the discrimination of samples, it was important in separating the samples stored under the intermediate levels of  $O_2$ , mainly in 0.7 kPa  $O_2$  treatment and in minor rate in 0.8 kPa  $O_2$  (Fig. 1a and 1b). The compounds falling to the top left-hand of the plot are related to fruits stored under 0.7 kPa  $O_2$ . Among them were the aldehydes 2,4-hexadienal and (E)2-hexenal, the alcohols (Z)3-hexen-1-ol and (Z)2-hexen-1-ol and the ester 2-methylbutyl acetate, correlated with this condition of storage. The latter has previously been considered as important for the sensory properties of 'Royal Gala' apples (Young et al., 1996). Thus, although the extremely low  $O_2$  levels used during storage were associated to the lowest concentration of some esters associated with aroma, these storage conditions were correlated to a higher abundance of other compounds. Most likely, low

partial pressures of O<sub>2</sub> do not affect negatively the synthesis of all esters, since especially some branched-chain esters that were increased or not affected in fruits stored under extremely low O<sub>2</sub>.

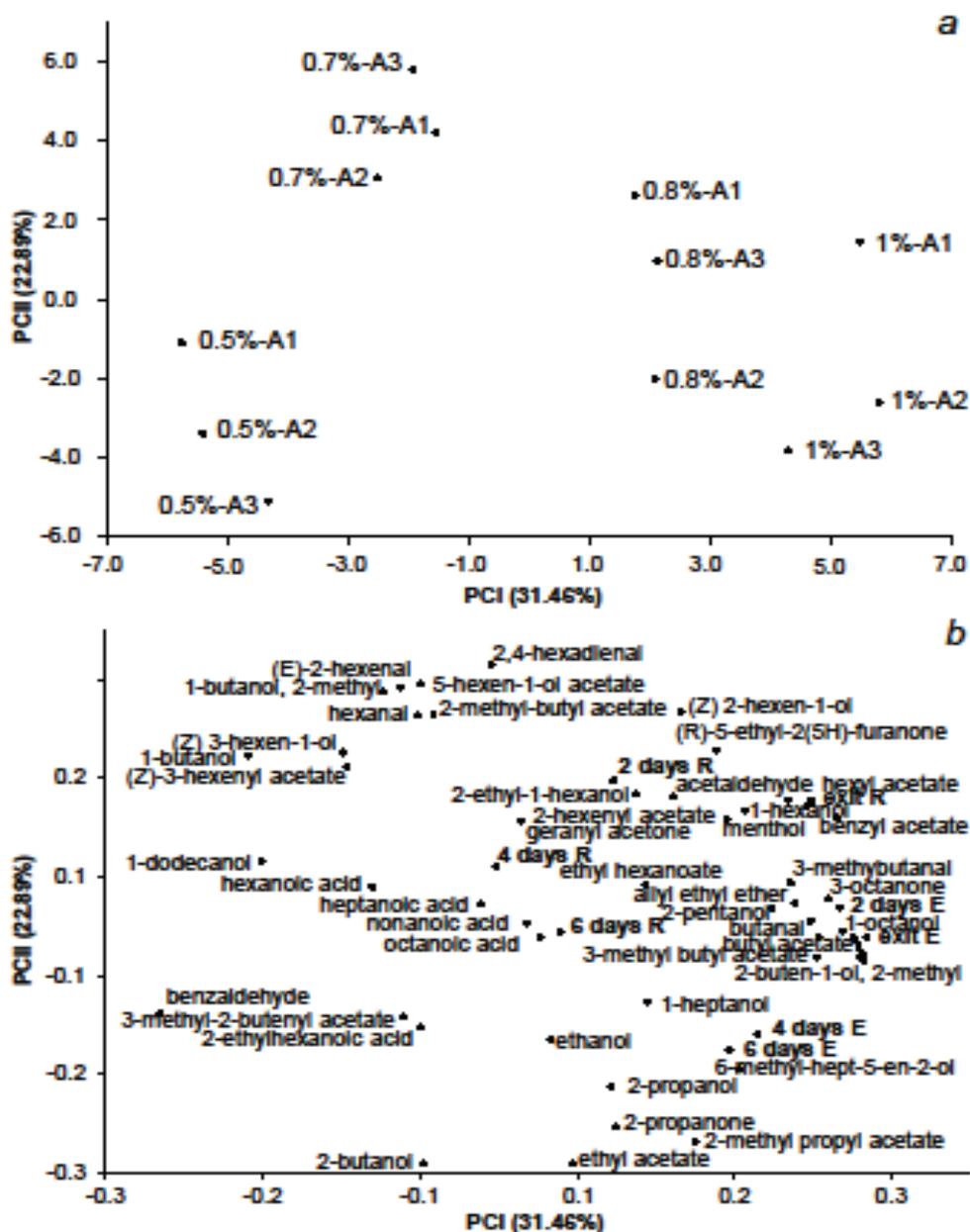


Figure 1 – a) scores (samples) and b) loadings (variables) plots showing the two major principal components from the analysis of ‘Royal Gala’ apples stored under controlled atmosphere with different O<sub>2</sub> levels. A1, A2 and A3 - replicates of the each treatment, E – ethylene concentration and R – fruit respiration.

Esters are important for the aroma of apples, because they are responsible for the characteristic fruity or floral flavor (Plotto et al., 1999). It has been shown that in apples from the Gala group, the esters 2-methylbutyl acetate, hexyl acetate and butyl acetate have the

highest impact on aroma and flavor (Plotto, McDaniel & Mattheis, 2000; Young et al., 1996). In the present work, 2-methylbutyl acetate and hexyl acetate were, together with 3-methyl-2-butenyl acetate the most abundant esters detected. In general terms, the storage under the lowest O<sub>2</sub> levels reduced the concentrations of esters, especially the straight-chain ones, such as butyl acetate, hexyl acetate and 2-hexenyl acetate (Fig. 1b and Table 1). The concentration of straight-chain esters was increased in apples stored under 1.0 kPa O<sub>2</sub>, and decreased as the O<sub>2</sub> levels in the CA chamber were decreased (Fig. 1a and 1b). Echeverría et al. (2004) suggested that the reduction in the concentration of esters was related to the negative effect of CA storage in the development of aroma in apples. Although the O<sub>2</sub> levels used in the present work were even lower than those used in the study of Echeverría et al. (2004), it was still observed that the concentration of straight-chain esters was reduced when fruits were stored under the lowest O<sub>2</sub> levels. The precursors for the synthesis of straight-chain esters are synthesized by  $\beta$ -oxidation of fatty acids and/or via lipoxygenase (LOX) pathway (Brackmann, Streif & Bangerth, 1993). Importantly, both routes require the presence of O<sub>2</sub> and are, consequently, affected by the O<sub>2</sub> levels used during CA storage (Echeverría et al., 2004). Furthermore, a decrease in the production of aroma in CA-stored 'Jonagold' apples has been also associated with the biosynthesis of fatty acids and lower concentrations of ATP. In this regard, it has been suggested that the limiting step for the synthesis of aroma-related volatile in apples is the *de novo* synthesis of fatty acids rather than their release from cell membranes or intracellular storage pools (Song & Bangerth, 2003). Thus, it is likely that the lowest O<sub>2</sub> concentrations used during CA storage may have inhibited the synthesis of important substrates for the further production of esters.

In addition, the reduced ethylene synthesis of apples stored under the lowest O<sub>2</sub> levels, as revealed by the four assessments carried out after storage (Table 2), may have limited the production of some esters. In transgenic 'Greensleeves' apples, which have their ethylene synthesis suppressed, the production of esters is significantly reduced (Defilippi, Kader & Dandekar, 2005). In the same study, also the application of the inhibitor of ethylene perception, 1-methylcyclopropene (1-MCP), resulted in low synthesis of esters. The same authors have also shown that both the transcription and the activity of the enzyme alcohol acetyl transferase (AAT) were highly modulated by ethylene, suggesting that ethylene interferes with the last step of esters biosynthesis.

However, it is noteworthy that in the present study the concentrations of some esters, such as the 2-methyl-butyl acetate were increased in apples stored under intermediate O<sub>2</sub> levels (0.8 and 0.7 kPa) (Table 1 and Fig. 1b). 2-methylbutyl acetate derives from the

pathway that synthesizes branched-chain amino acids (Brackmann et al., 1993). According to Echeverría et al. (2004), the synthesis of branched-chain esters, particularly 2-methylbutyl acetate, is not inhibited by extremely low O<sub>2</sub>. Rather, the synthesis of this compound is suppressed when apples are exposed to room temperature after CA storage. Furthermore, it has been reported that also high CO<sub>2</sub> levels during storage have a negative effect on the concentration of branched-chain volatile compounds (Bangerth, Song, & Streif, 2012; Brackmann et al., 1993). Importantly, the major ester detected during the present study, the branched-chain ester 3-methyl-2-butenyl acetate, was also not negatively affected by ultra-low O<sub>2</sub> levels. It therefore seems that partial pressures of O<sub>2</sub> as low as 0.5 kPa do not affect the synthesis of branched-chain esters in 'Royal Gala' apples. In line with this study, it has been previously reported that low O<sub>2</sub> levels did not affect significantly the synthesis of branched-chain esters in 'Fuji' and 'Mondial Gala' apples (Echeverría, Graell, Lara & López, 2008; Echeverría et al., 2004). Thus, the maintenance of higher concentrations of these esters under low O<sub>2</sub> partial pressures may be associated with an unchanged concentration of amino acids during CA storage (Echeverría et al., 2008).

In relation to ethanol, no increases in the levels of this compound were detected in apples stored under extremely low O<sub>2</sub> (0.5 kPa O<sub>2</sub>) in relation to 1.0 kPa O<sub>2</sub> condition (Table 1). This is in agreement with López, Lavilla, Recasens, Graell and Vendrell (2000), who stored 'Golden Delicious' apples under three different O<sub>2</sub> levels and did also not observe any significant increase in ethanol concentrations under the lowest partial pressures of O<sub>2</sub>. Because 'Royal Gala' apples showed no increase in ethanol under ultra-low O<sub>2</sub> (Table 1), one can conclude that fruits from this cultivar withstand extremely low O<sub>2</sub> levels without developing injuries. When fruits are exposed to hypoxia, the concentration of ethyl esters increases, since the excess of ethanol synthesized is readily available to react with acyl-CoAs and, hence, form ethyl esters (Ke, Zhou & Kader, 1994). In CA-stored strawberries, higher levels of ethyl acetates are produced due to an increase in the biosynthesis of ethanol and acetaldehyde, which are, in turn, related to the development of off-flavors (Forney, Kalt & Jordan, 2000). Therefore, since in the present work the synthesis of ethanol and acetaldehyde was not increased even when apples were stored under the lowest O<sub>2</sub> levels, the concentrations of ethyl acetates were comparable to those detected in fruits stored under the other CA conditions tested.

The profile of the remaining alcohols did not show a clearly defined pattern in response to the storage conditions, and most of them were either unaffected or decreased as the O<sub>2</sub> levels used during CA were lowered (Table 1). Similar results were also observed by

López et al. (2007) in ‘Pink Lady’ apples, who reported reduced production of alcohols in CA-stored fruits as compared to cold-stored ones. However, in the same study it was observed that the length of the storage and shelf-life had also a significant effect on the concentration of alcohols.

Table 1 – Volatile compounds emitted by ‘Royal Gala’ apples after 8 months of storage under different CA conditions followed by 7 days of shelf-life at 20 °C.

(continua)

Compound	KI	Partial pressure of O <sub>2</sub> (kPa)			
		1.0	0.8	0.7	0.5
<i>Esters</i>					
Ethyl acetate	897 <sup>a</sup>	13.6 ± 3.11 <sup>a**</sup>	12.6 ± 0.45 <sup>a</sup>	9.39 ± 0.89 <sup>a</sup>	13.5 ± 0.35 <sup>a</sup>
2-Methylpropyl acetate	1021 <sup>b</sup>	2.80 ± 0.63 <sup>a</sup>	2.24 ± 0.85 <sup>ab</sup>	0.93 ± 0.25 <sup>b</sup>	2.02 ± 0.25 <sup>ab</sup>
Butyl acetate	1085 <sup>b</sup>	3.68 ± 1.23 <sup>a</sup>	1.91 ± 0.32 <sup>b</sup>	1.42 ± 0.14 <sup>b</sup>	1.05 ± 0.18 <sup>b</sup>
2-Methylbutyl acetate	1133 <sup>b</sup>	32.43 ± 4.63 <sup>b</sup>	37.20 ± 2.06 <sup>ab</sup>	48.43 ± 5.79 <sup>a</sup>	31.72 ± 3.93 <sup>b</sup>
3-Methylbutyl acetate	1186 <sup>c</sup>	14.75 ± 2.59 <sup>a</sup>	9.63 ± 0.23 <sup>b</sup>	8.47 ± 1.01 <sup>b</sup>	7.73 ± 1.27 <sup>b</sup>
Ethyl hexanoate	1246 <sup>a</sup>	1.50 ± 0.23 <sup>b</sup>	9.31 ± 0.65 <sup>a</sup>	1.27 ± 0.23 <sup>bc</sup>	0.30 ± 0.03 <sup>c</sup>
3-Methyl-2-butenyl acetate	1261 <sup>b</sup>	39.10 ± 1.46 <sup>a</sup>	37.98 ± 3.63 <sup>a</sup>	38.15 ± 1.70 <sup>a</sup>	40.99 ± 2.59 <sup>a</sup>
Hexyl acetate	1282 <sup>b</sup>	33.73 ± 5.56 <sup>a</sup>	32.08 ± 3.60 <sup>ab</sup>	28.80 ± 1.00 <sup>ab</sup>	23.43 ± 3.73 <sup>b</sup>
(Z)3-hexenyl acetate	1327 <sup>c</sup>	9.22 ± 1.00 <sup>a</sup>	9.36 ± 1.96 <sup>a</sup>	12.11 ± 1.17 <sup>a</sup>	10.18 ± 2.66 <sup>a</sup>
5-Hexen-1-ol acetate	1338 <sup>c</sup>	2.14 ± 0.19 <sup>b</sup>	2.19 ± 0.34 <sup>ab</sup>	2.90 ± 0.23 <sup>a</sup>	2.10 ± 0.30 <sup>b</sup>
2-Hexenyl acetate	1346 <sup>c</sup>	11.81 ± 1.21 <sup>a</sup>	8.93 ± 1.25 <sup>ab</sup>	10.35 ± 1.09 <sup>ab</sup>	7.37 ± 1.38 <sup>b</sup>
Benzyl acetate	1746 <sup>c</sup>	5.02 ± 0.22 <sup>a</sup>	4.82 ± 0.06 <sup>ab</sup>	4.14 ± 0.37 <sup>b</sup>	2.27 ± 0.40 <sup>c</sup>
<i>Alcohols</i>					
2-Propanol	937 <sup>b</sup>	3.06 ± 0.46 <sup>a</sup>	3.01 ± 0.35 <sup>a</sup>	2.72 ± 0.40 <sup>a</sup>	2.87 ± 0.31 <sup>a</sup>
Ethanol	944 <sup>b</sup>	18.45 ± 1.25 <sup>a</sup>	21.75 ± 2.88 <sup>a</sup>	16.45 ± 2.18 <sup>a</sup>	19.34 ± 1.50 <sup>a</sup>
2-Butanol	1036 <sup>b</sup>	6.21 ± 1.67 <sup>a</sup>	2.55 ± 0.76 <sup>b</sup>	1.80 ± 0.32 <sup>b</sup>	8.05 ± 0.52 <sup>a</sup>
2-Pentanol	1146 <sup>b</sup>	20.41 ± 3.02 <sup>b</sup>	34.05 ± 3.28 <sup>a</sup>	11.22 ± 2.80 <sup>c</sup>	4.38 ± 0.13 <sup>c</sup>
1-Butanol	1168 <sup>a</sup>	4.10 ± 0.47 <sup>b</sup>	5.37 ± 0.75 <sup>ab</sup>	6.16 ± 0.41 <sup>a</sup>	5.72 ± 1.22 <sup>ab</sup>
2-Methylbutanol	1226 <sup>b</sup>	15.76 ± 1.79 <sup>b</sup>	21.33 ± 3.59 <sup>ab</sup>	23.12 ± 2.17 <sup>a</sup>	18.24 ± 1.26 <sup>ab</sup>
2-Methyl-2-buten-1-ol,	1335 <sup>c</sup>	6.90 ± 1.20 <sup>a</sup>	6.34 ± 0.36 <sup>ab</sup>	4.58 ± 0.36 <sup>bc</sup>	3.69 ± 0.44 <sup>c</sup>
1-Hexanol	1365 <sup>b</sup>	136.26 ± 15.71 <sup>a</sup>	123.63 ± 15.37 <sup>ab</sup>	120.60 ± 8.47 <sup>ab</sup>	95.39 ± 2.68 <sup>b</sup>
(Z)3-hexen-1-ol	1390 <sup>c</sup>	5.65 ± 0.41 <sup>ab</sup>	5.24 ± 0.74 <sup>b</sup>	7.24 ± 0.57 <sup>a</sup>	5.96 ± 1.02 <sup>ab</sup>
(Z)2-hexen-1-ol	1411 <sup>b</sup>	16.71 ± 1.79 <sup>ab</sup>	15.02 ± 2.29 <sup>ab</sup>	17.33 ± 2.16 <sup>a</sup>	12.26 ± 1.08 <sup>b</sup>
1-Heptanol	1462 <sup>b</sup>	1.38 ± 0.32 <sup>a</sup>	1.87 ± 0.86 <sup>a</sup>	1.10 ± 0.20 <sup>a</sup>	1.13 ± 0.46 <sup>a</sup>
6-Methyl-hept-5-en-2-ol	1472 <sup>c</sup>	1.32 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.19 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.06 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.13 ± 0.05 <sup>a</sup>
2-Ethylhexanol	1494 <sup>b</sup>	3.25 ± 0.12 <sup>bc</sup>	3.66 ± 0.12 <sup>a</sup>	3.42 ± 0.04 <sup>ab</sup>	3.08 ± 0.14 <sup>c</sup>
1-Octanol	1565 <sup>b</sup>	1.80 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.67 ± 0.08 <sup>ab</sup>	1.49 ± 0.10 <sup>bc</sup>	1.44 ± 0.06 <sup>c</sup>
1-Dodecanol	1971 <sup>b</sup>	0.83 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.89 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.14 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.25 ± 0.57 <sup>a</sup>
<i>Aldehyde</i>					
Acetaldehyde	640 <sup>c</sup>	18.4 ± 5.23 <sup>a</sup>	15.5 ± 4.32 <sup>a</sup>	19.2 ± 3.60 <sup>a</sup>	10.8 ± 0.93 <sup>a</sup>
Butanal	884 <sup>b</sup>	1.36 ± 0.28 <sup>a</sup>	0.78 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.79 ± 0.20 <sup>b</sup>	0.55 ± 0.01 <sup>b</sup>
3-Methylbutanal	923 <sup>b</sup>	0.36 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.28 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.21 ± 0.04 <sup>b</sup>
Hexanal	1094 <sup>b</sup>	560.41 ± 116.89 <sup>a</sup>	696.69 ± 102.98 <sup>a</sup>	738.94 ± 64.56 <sup>a</sup>	611.68 ± 41.01 <sup>a</sup>
(E)2-hexenal	1233 <sup>b</sup>	611.99 ± 44.04 <sup>b</sup>	759.71 ± 97.85 <sup>ab</sup>	811.13 ± 51.72 <sup>a</sup>	668.42 ± 32.12 <sup>ab</sup>

(conclusão)

Compound	KI	Partial pressure of O <sub>2</sub> (kPa)			
		1.0	0.8	0.7	0.5
2,4-Hexadienal	1417 <sup>b</sup>	1.14 ± 0.26ab	1.31 ± 0.10ab	1.55 ± 0.15a	1.07 ± 0.07b
Benzaldehyde	1541 <sup>c</sup>	0.55 ± 0.10c	0.64 ± 0.03c	1.06 ± 0.16b	2.12 ± 0.18a
<i>Acid</i>					
Hexanoic acid	1848 <sup>a</sup>	0.77 ± 0.13a	0.58 ± 0.07a	1.04 ± 0.44a	0.88 ± 0.33a
2-Ethylhexanoic acid	1950 <sup>b</sup>	1.87 ± 1.34a	2.21 ± 1.38a	1.88 ± 0.85a	2.56 ± 1.56a
Heptanoic acid	1954 <sup>b</sup>	0.59 ± 0.10a	0.92 ± 0.34a	0.79 ± 0.20a	0.67 ± 0.15a
Octanoic acid	2062 <sup>b</sup>	2.03 ± 0.27a	2.53 ± 1.05a	2.20 ± 0.55a	1.90 ± 0.53a
Nonanoic acid	2168 <sup>b</sup>	1.63 ± 0.13a	2.56 ± 1.66a	2.08 ± 0.90a	1.67 ± 0.48a
<i>Ketone</i>					
2-Propanone	826 <sup>b</sup>	6.09 ± 2.01a	3.77 ± 0.26ab	3.35 ± 0.31b	5.02 ± 0.20ab
3-Octanone	1265 <sup>b</sup>	4.05 ± 0.25a	3.47 ± 0.34a	3.35 ± 0.30ab	2.66 ± 0.29b
Geranyl acetone	1867 <sup>c</sup>	1.31 ± 0.65a	1.89 ± 0.06a	1.38 ± 0.36a	1.00 ± 0.25a
<i>Furan</i>					
(R)5-Ethyl-2(5H)furanone	1789 <sup>c</sup>	2.68 ± 0.35a	2.40 ± 0.16ab	2.66 ± 0.26a	1.99 ± 0.14b
<i>Hydrocarbon</i>					
Heptadecane, 2,6,10,15-tetramethyl	1799 <sup>c</sup>	1.78 ± 0.49a	1.53 ± 0.36a	1.61 ± 0.21a	1.54 ± 0.19a
<i>Ether</i>					
Allyl ethyl ether	919 <sup>c</sup>	0.84 ± 0.09ab	0.92 ± 0.06a	0.65 ± 0.13bc	0.52 ± 0.05c
<i>Terpene</i>					
Menthol	1647 <sup>b</sup>	1.29 ± 0.18a	1.23 ± 0.17ab	1.29 ± 0.20a	0.83 ± 0.08b

KI = experimental Kovats Index

\*Concentrations were calculated relative to an internal standard (3-octanol).

\*\*Mean values followed by the same letter within a row are not significantly different from each other according to a Tukey's multiple range test ( $p < 0.05$ ).<sup>a</sup> Mass spectrum and retention time comparable to standard (positively identified).<sup>b</sup> Mass spectrum and Kovats retention index in agreement with literature data.<sup>c</sup> Mass spectrum in agreement with NIST 98 library (tentatively identified).

SD = standard deviation.

The most abundant alcohol detected in 'Royal Gala' apples was 1-hexanol. The concentration of this alcohol was the highest in fruits stored under 1.0 kPa O<sub>2</sub> and was decreased as the O<sub>2</sub> levels in the storage chamber were decreased (Table 1). Such a pattern could help to explain the reduction on the levels of hexyl acetate, since 1-hexanol is the precursor of this ester (Holland et al., 2005). In this regard, it has been proposed previously that low O<sub>2</sub> levels lead to a decrease in the biosynthesis of fatty acids, the precursors of both alcohols and straight-chain esters (Saquet, Streif & Bangerth, 2003). Noteworthy, it appears that the availability of the substrate rather than AAT activity is more relevant for the synthesis of volatile compounds after storage (Lara, Graell, López & Echeverría, 2006). This assumption has been based on the observation that whereas models developed to assess AAT activity were not able to discriminate the patterns of volatile emissions after the storage under cold storage or two CA conditions, the activity of the enzymes that produce the substrates for the

biosynthesis of esters (namely LOX and pyruvate decarboxylase) were able to discriminate the samples stored under different storage conditions (Lara et al., 2006).

Among the volatile compounds detected in the samples of the present work, the majority of them were aldehydes, particularly hexanal and (E)2-hexenal (Table 1). Although the concentrations of these compounds were not significantly affected by the storage conditions, the levels of (E)2-hexenal were lower in fruits stored under 1.0 kPa O<sub>2</sub>. These two compounds are related to “green apple” flavor (Mehinagic et al., 2006) and have been shown by sensory assessments to be enriched in ‘Gala’ apples stored under CA (1.0 kPa O<sub>2</sub> + 1.0 kPa CO<sub>2</sub>), as compared to storage in cold air (Plotto et al., 1999). In fact, it has been suggested that the perception of a higher intensity of green-like attribute in CA-stored ‘Gala’ apples could be associated with a decreased fruity attribute in these fruits (Plotto et al., 1999). However, the quantitative analysis carried out in this study indicates that hexanal and (E)2-hexenal accumulate at higher levels in fruits stored under ultra-low O<sub>2</sub> (Table 1), which is in agreement with results obtained in ‘Fuji’ and ‘Granny Smith’ apples (Holland et al., 2005). Regarding the effect of different partial pressures of O<sub>2</sub> on the levels of other aldehydes, it was found that whereas levels of (E)2-hexenal and benzaldehyde were increased by the lowest O<sub>2</sub> partial pressures, butanal and 3-methylbutanal were increased in fruits stored under the highest O<sub>2</sub> levels (Table 1).

The five organic acids detected in the samples were not affected by neither of the storage conditions tested herein (Table 1). Likewise, the storage conditions did not significantly change the concentrations of the ketone geranyl acetone. However, the two other ketones (2-propanone and 3-octanone) as well as the ether allyl ethyl ether were reduced as the O<sub>2</sub> levels during storage were lowered.

The synthesis of ethylene was decreased in apples as lower O<sub>2</sub> levels were used during storage (Fig. 1 and Table 2), indicating that the storage under ultra-low O<sub>2</sub> has a significant effect on reducing the synthesis of this plant hormone. This is of particular interest, since the ripening of climacteric fruits, such as apples, is induced by the presence of ethylene (Schaffer et al., 2007). However, a decrease in ethylene synthesis may have also a negative impact on the emission of volatile compounds related to a fruit’s aroma, as a consequence of the dependency on ethylene perception or due to the sensitivity to low concentrations of this hormone (Bangerth et al., 2012; Johnston, Gunaseelan, Pidakala, Wang & Schaffer, 2009). The role of ethylene on the emission of volatile compounds was previously investigated by supplying exogenous ethylene to transgenic ‘Royal Gala’ apples which had their endogenous ethylene synthesis inhibited by the expression an anti-sense version of the gene encoding for

ACC oxidase (Schaffer et al., 2007). It was concluded that ethylene has an essential role on the expression of some of the enzymes involved in the synthesis of aroma-related volatiles. However, the same study also demonstrated that only some steps in these pathways appear to be dependent on ethylene. In fact, from 15 genes encoding for AATs in the final step of esters synthesis, only *MpAAT1* was induced by ethylene (Schaffer et al., 2007). This gene encodes for an isoform of the enzyme that is capable of synthesizing a series of the esters found in apples by using alcohols and CoA as substrates (Souleyre, Greenwood, Friel, Karunairetnam & Newcomb, 2005). The same transgenic apples were used to assess the role of ethylene on other parameters related to ripening (Johnston et al., 2009). It was found that the synthesis of volatile compounds, particularly esters, was highly dependent on ethylene, even though the effect was only observed when high ethylene concentrations were supplied. Thus, the accumulation of esters was increased in ACC oxidase-silenced apples as the dose of ethylene supplied was increased (Johnston et al., 2009). Altogether, one can conclude that the low concentration of some esters detected in apples stored under ultra-low O<sub>2</sub> was associated with the reduced ethylene synthesis exhibited by these fruits (Fig. 1 and Table 2).

Table 2 – Ethylene synthesis in ‘Royal Gala’ apples after 8 months of storage under different CA conditions followed by 6 days of shelf-life at 20 °C.

Partial pressure of O <sub>2</sub> (kPa)	Ethylene synthesis ( $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) $\pm$ S.D.			
	Removal from storage	2 days	4 days	6 days
1.0	1.641 $\pm$ 0.076a*	0.113 $\pm$ 0.013a	0.057 $\pm$ 0.019a	0.064 $\pm$ 0.016a
0.8	1.184 $\pm$ 0.253b	0.083 $\pm$ 0.025ab	0.031 $\pm$ 0.009ab	0.030 $\pm$ 0.005b
0.7	0.568 $\pm$ 0.007c	0.063 $\pm$ 0.020b	0.024 $\pm$ 0.006b	0.024 $\pm$ 0.011b
0.5	0.258 $\pm$ 0.008c	0.038 $\pm$ 0.008b	0.024 $\pm$ 0.006b	0.036 $\pm$ 0.012ab

\*Mean values followed by the same letter within a column are not significantly different from each other according to a Tukey’s multiple range test ( $p < 0.05$ ).

SD = standard deviation.

Although respiration was significantly lower in apples stored under the lowest O<sub>2</sub> partial pressure (0.5 kPa) one day after removal from the storage chamber, no significant difference was detected in the following days (Table 3). From Figure 1 one can observe a good correlation between the first assessment of respiration, the synthesis of volatiles and the highest O<sub>2</sub> partial pressure. It is noteworthy that this evaluation was undertaken few hours after fruits had been removed from storage, when the fruit’s temperature had stabilized at 20 °C. Thus, the reduced respiration of apples stored under 0.5 kPa O<sub>2</sub> only at this earlier time point may indicate that respiration was lowered throughout the whole storage period.

Respiration rates can also interfere with the synthesis of volatiles, since a reduction in respiration after prolonged CA storage decreases significantly the synthesis of ATP and, consequently, the synthesis of fatty acids (Bangerth et al., 2012; Saquet et al., 2003). Thus, the under representation of volatile compounds in the bottom left-hand of the PCA plot (Fig. 1a and b), which was associated to the lowest O<sub>2</sub> level (0.5 kPa), is at least partially related to the lower respiration of fruits stored under this condition.

Table 3 – Respiration in ‘Royal Gala’ apples after 8 months of storage under different CA conditions followed by 6 days of shelf-life at 20 °C.

Partial pressure of O <sub>2</sub> (kPa)	CO <sub>2</sub> production (mL CO <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) ± SD			
	Removal from storage	2 days	4 days	6 days
1.0	5.83 ± 0.65a*	4.03 ± 0.95 <sup>ns</sup>	2.93 ± 0.32 <sup>ns</sup>	2.94 ± 0.54 <sup>ns</sup>
0.8	5.33 ± 0.40a	3.96 ± 0.75	2.15 ± 0.44	2.63 ± 0.27
0.7	5.24 ± 0.15a	3.85 ± 0.20	2.93 ± 0.82	2.48 ± 0.48
0.5	3.72 ± 0.29b	3.55 ± 0.55	2.65 ± 0.20	2.90 ± 0.45

\* Mean values followed by the same letter within a column are not significantly different from each other according to a Tukey’s multiple range test ( $p < 0.05$ ).  
SD = standard deviation.

### 3.1.4 Conclusions

The storage of ‘Royal Gala’ apples under extremely low O<sub>2</sub> levels (0.5 kPa) decreases the production of some of the esters related to aroma. Other volatile compounds were, in general, not affected by the extremely low O<sub>2</sub> levels. In fact, the concentration of some of the esters that contribute greatly to the aroma of ‘Royal Gala’, such as 2-methyl-butyl acetate, showed an increased in apples stored under the intermediate O<sub>2</sub> levels. These results suggest that the storage under CA with partial pressures of O<sub>2</sub> down to 0.7 kPa does not have a negative effect on the volatile compounds in this apple cultivar as compared to the storage under standard CA (1.0 kPa).

### 3.1.5 Acknowledgements

To Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), for financial support.

### 3.1.6 References

- Agapomi. (2013). Associação gaúcha dos produtores de maçã. URL: <http://www.agapomi.com.br/dadosestatisticos.php> Accessed 10.12.13.
- Agriannual. (2012). *Anuário da Agricultura Brasileira*. (17<sup>th</sup> ed.). São Paulo.
- Aprea, E., Corollaro, M. L., Betta, E., Endrizzi, I., Demattè, M. L., Biasioli, F., & Gasperi, F. (2012). Sensory and instrumental profiling of 18 apple cultivars to investigate the relation between perceived quality and odour and flavour. *Food Research International*, 49, 677-686.
- Ban, Y., Oyama-Okubo, N., Honda, C., Nakayama, M., & Moriguchi, T. (2010). Emitted and endogenous volatiles in 'Tsugaru' apple: The mechanism of ester and (E,E)- $\alpha$ -farnesene accumulation. *Food Chemistry*, 118, 272-277.
- Bangerth, F., Song, J., & Streif, J. (2012). Physiological impacts of fruit ripening and storage conditions on aroma volatile formation in apple and strawberry fruit: a review. *Hort Science*, 47, 4-10.
- Bangerth, F., Streif, J., Song, J., & Brackmann, A. (1998). Investigations into the physiology of volatile aroma production of apple fruits. *Acta Horticulturae*, 464, 189-194.
- Blankenship, S. M., & Dole, J. M. (2003). 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biology and Technology*, 28, 1-25.
- Brackmann, A., Streif, J., & Bangerth, F. (1993). Relationship between a reduced aroma production and lipid metabolism of apples after long-term controlled-atmosphere storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118, 243-247.
- Brackmann, A., Anese, R.O., Weber, A., Both, V., Gasperin, A.R., & Pavanello, E.P. (2013). Efeito do estresse inicial por baixo O<sub>2</sub> combinado com 1-metilciclopropeno na conservação de maçãs 'Royal Gala' armazenadas com ultrabaixo O<sub>2</sub>. *Semina: Ciências Agrárias*, 34, 1185-1194.
- Defilippi, B.G., Kader, A.A., & Dandekar, A.M. (2005). Apple aroma: Alcohol Acyltransferase, a rate limiting step for ester biosynthesis, is regulated by ethylene. *Plant Science*, 168, 1199-1210.

- Echeverría, G., Fuentes, T., Graell, J., Lara, I., & López, M. L. (2004). Aroma volatile compounds of 'Fuji' apples in relation of harvest date and cold storage technology – a comparison of two seasons. *Postharvest Biology and Technology*, 32, 29-44.
- Echeverría, G., Graell, J., Lara, I., & López, M. L. (2008). Physicochemical measurements in 'Mondial Gala®' apples stored at different atmospheres: Influence on consumer acceptability. *Postharvest Biology and Technology*, 50, 135-144.
- Fan, X., Mattheis, J. P., & Buchanan, D. (1998). Continuous requirement of ethylene for apple fruit volatile synthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1959-1963.
- Fao. (2011). Food and Agriculture Organization of the United Nations. URL: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> Accessed 10.12.13.
- Forney, C. F., Kalt, W., & Jordan, M. A. (2000). The composition of strawberry aroma is influenced by cultivar, maturity and storage. *Hort Science*, 35, 1022-1026.
- Gasser, F., Eppler, T., Naunheim, W., Gabioud, S., & Hoehn, E. (2008). Control of the critical oxygen level during dynamic CA storage of apples by monitoring respiration as well as chlorophyll fluorescence. *Acta Horticulturae*, 796, 69-76.
- Holland, D., Larkov, O., Bar-ya'akov, I., Bar, E., Zax, A., Brandeis, E., Ravid, U., & Lewinsohn, E. (2005). Developmental and varietal differences in volatile ester formation and acetyl-CoA: Alcohol Acetyl Transferase activities in apple (*Malus domestica* Borkh.) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7198-7203.
- Johnston, J.W., Gunaseelan, K., Pidakala, P., Wang, M., & Schaffer, R.J. (2009). Co-ordination of early and late ripening events in apples is regulated through differential sensitivities to ethylene. *Journal of Experimental Botany*, 60, 2689-2699.
- Ke, D., Zhou, L., & Kader, A.A. (1994). Mode of oxygen and carbon dioxide action on strawberry ester biosynthesis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119, 971-975.
- Kondo, S., Setha, S., Rudell, D. R., Buchanan, D. A., & Mattheis, J. P. (2005). Aroma volatile biosynthesis in apples affected by 1-MCP and methyl jasmonate. *Postharvest Biology and Technology*, 36, 61-68.
- Lara, I., Graell, J., López, M.L., & Echeverría, G. (2006). Multivariate analysis of modifications in biosynthesis of volatile compounds after CA storage of 'Fuji' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 19-28.

- López, M.L., Lavilla, M.T., Recasens, I., Graell, J., & Vendrell, M. (2000). Changes in aroma quality of 'Golden Delicious' apples after storage at different oxygen and carbon dioxide concentrations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 311-324.
- López, M. L., Villatoro, C., Fuentes, T., Graell, J., Lara, I., & Echeverría, G. (2007). Volatile compounds, quality parameters and consumer acceptance of 'Pink Lady®' apples stored in different conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 43, 55-66.
- Mehinagic, E., Royer, G., Symoneaux, R., Jourjon, F., & Prost, C. (2006). Characterization of odor-active volatiles in apples: influence of cultivars and maturity stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2678-2687.
- Plotto, A., Mc Daniel, M.R., & Mattheis, J.P. (2000). Characterization of changes in 'Gala' apple aroma during storage using Osme analysis, a gas chromatography-olfactometry technique. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125, 714-722.
- Plotto, A., Mc Daniel, M.R., & Mattheis, J.P. (1999). Characterization of 'Gala' apple aroma and flavor: differences between controlled atmosphere and air storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124, 416-423.
- Prange, R. K., DeLong, J. M., Harrison, P. A., Leyte, J. C., & McLean, S. D. (2003). Oxygen concentration affects chlorophyll fluorescence in chlorophyll-containing fruit and vegetable. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128, 603-607.
- Qin, G., Tao, S., Cao, Y., Wu, J., Zhang, H., Huang, W., & Zhang, Z. (2012). Evaluation of the volatile profile of 33 *Pyrus ussuriensis* cultivars by HS-SPME with GC-MS. *Food Chemistry*, 134, 2367-2382.
- Saquet, A. A., Streif, J., & Bangerth, F. (2003). Impaired aroma production of CA-stored 'Jonagold' apples as affected by adenine and pyridine nucleotide levels and fatty acid concentration. *Journal Horticultural Science and Biotechnology*, 78, 695-705.
- Schaffer, R.J., Friel, E.N., Souleyre, E.J.F., Bolitho, K., Thodey, K., Ledger, S., Bowen, J.H., Ma, J., Nain, B., Cohen, D., Gleave, A.P., Crowhurst, R.N., Janssen, B.J., Yao, J., & Newcomb, R.D. (2007). A genomic approach reveals that aroma production in apple is controlled by ethylene predominantly at the final step in each biosynthetic pathway. *Plant Physiology*, 144, 1899-1912.
- Song, J., & Bangerth, F. (2003). Fatty acids as precursor for aroma volatile biosynthesis in pre-climacteric and climacteric apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 30, 113-121.
- Souleyre, E.J.F., Greenwood, D.R., Friel, E.N., Karunairetnam, S., & Newcomb, R.D. (2005). An alcohol acyl transferase from apple (cv. Royal Gala), MpAAT1, produces esters

- involved in apple fruit flavor. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 272, 3132-3144.
- Watkins, C. B. (2008). Postharvest ripening regulation and innovation in storage technology. *Acta Horticulturae*, 796, 51-58.
- Weber, A., Brackmann, A., Anese, R.O., Both, V., & Pavanello, E.P. (2013). Atmosfera controlada para o armazenamento da maçã 'Maxi Gala'. *Ciência Agrônômica*, 44, 294-301.
- Wright, H., DeLong, J., Harrison, P.A., Gunawardena, A.H.L.A.N., & Prange, R. (2010). The effect of temperature and other factors on chlorophyll a fluorescence and the lower oxygen limit in apples (*Malus domestica*). *Postharvest Biology and Technology*, 55, 21-28.
- Young, H., Gilbert, J. M., Murray, S. H., & Ball, R. D. (1996). Causal effect of aroma compounds on Royal Gala apple flavours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71, 329-336.
- Zanella, A., Cazzanelli, P., Panarese, A., Coser, M., Chistè, C., & Zeni, F. (2005). Fruit fluorescence response to low oxygen stress: modern storage technologies compared to 1-MCP treatment of apple. *Acta Horticulturae*, 682, 1535-1542.



## 4 ARTIGO 2

### 4.1 Dynamic controlled atmosphere by respiratory quotient maintain quality and volatile profile of 'Royal Gala' apples after long-term storage

#### Abstract

The aim of this paper was to evaluate the effect of dynamic controlled atmosphere (DCA), based on chlorophyll fluorescence and respiratory quotient, on 'Royal Gala' quality and volatile profile after long-term storage. The apple were stored during 9 months under low temperature (1.0 °C) and thereafter held at 20 °C during 7 days in order to simulate the shelf life period. After this period, the fruits were submitted to the quality analyses and volatile compounds analysis. Fruits stored under DCA showed lower ACC oxidase enzyme activity, ethylene production and respiration rate, leading in higher flesh firmness and titratable acidity. DCA stored fruits also resulted in less physiological disorders leading in higher amount of healthy fruits. Fruits stored under controlled atmosphere show higher total volatile compounds compared to the ones stored under DCA based on chlorophyll fluorescence, but there are little differences compared to fruits stored under DCA-RQ1.5 and RQ 2.0. 'Royal Gala' apples stored in DCA based on chlorophyll fluorescence lead to fruits with lower ester production, especially 2-methyl butyl acetate that is the most important compound for 'Royal Gala' apple flavor. There is a trend of higher quality maintenance of 'Royal Gala' apples stored in DCA-RQ 1.5. The storage in DCA-CF affect negatively the volatile compounds emission.

**Keywords:** *Malus domestica*. Chlorophyll fluorescence. Aroma. Flesh firmness. Physiological disorders. Ethylene production. Respiration rate.

#### 4.1.1 Introduction

The pomiculture shows a key importance in worldwide fruit production. In Brazil, its production is mainly limited to apple, which belong to 'Gala' and 'Fuji' mutants. Among

'Gala' mutants, 'Royal Gala' shows significant production area, especially by the higher red skin color compared to 'Gala' standard. The area occupied by this 'Gala' mutant range from 20 up to 25 % of total Brazilian apple production. However, its harvest window is very short, about two weeks, leading in storage of a significant part of the production.

Apples are stored under controlled atmosphere (CA) with oxygen partial pressure ranging from 1.0 up to 1.2 kPa (Brackmann et al., 2009; Weber et al., 2013) and carbon dioxide from 2.0 a 3.0 kPa (Brackmann et al., 2008; Brackmann et al., 2009). Nevertheless, even under this storage method occur significant quality losses after long-term storage. This quality losses are related to the high physiological disorders incidence (Brackmann et al., 2008; Weber et al., 2013), flesh firmness loss (Weber et al., 2015) and a significant reduction on volatile compounds production and emission (Song and Bangerth, 1996; Fellmann et al., 2003; Bangerth et al., 2012). Thus, it is necessary the development of a technology that allows fruit storage with low physiological disorders incidence, flesh firmness loss and better volatile compounds maintenance.

During the last few years, a new trend in oxygen partial pressure monitoring has been develop and tested for apples storage under CA. These new technologies are based on the lowest oxygen limit (LOL) tolerated by the fruits in their metabolic stage. With the LOL monitoring the oxygen partial pressures can be reduced to the lowest limit tolerated by the fruit at this moment and also changed during storage according the LOL of fruits throughout storage, leading in a new storage technology called dynamic controlled atmosphere (DCA). Nowadays, there are three methods to monitor the LOL in real time during apple storage: based on the ethanol production by fruits (Veltman et al., 2003), chlorophyll fluorescence (DeEll et al., 1999; Prange et al., 2007; Wright et al., 2010; Wright et al., 2012) and the respiratory quotient of fruit during storage (Gasser et al., 2008; Wright et al., 2012; Weber et al., 2015). The storage of apples under DCA decrease significantly the ACC oxidase enzyme activity, ethylene production and maintain high flesh firmness and lower physiological disorder (Weber et al., 2015). However, there are little reports of DCA effect on volatile profile compared to CA.

The volatile profile of apple is composed by a complex interaction among some organic compounds, such esters, alcohols, aldehydes, among some other. These volatile compounds are very dynamic compounds that change with the maturity stage, cultivar, 1-methylcyclopropene (1-MCP) application and storage condition. 'Royal Gala' apple stored under ultralow oxygen partial pressure (0.5 kPa) reduced significantly the straight chain ester production, but branched chain esters were not reduced by oxygen lowering (Both et al.,

2014a). Another paper comparing ULO with DCA-CF (dynamic controlled atmosphere based on chlorophyll fluorescence) found significant ester reduction in ‘Pinova’ apples stored in DCA-CF compared to ULO (1.5 kPa O<sub>2</sub> + 1.3 kPa CO<sub>2</sub>), but showed lower reduction in relation to ULO + 1-MCP (Raffo et al., 2009). However, there are no reports in literature evaluating the comparison of CA, DCA-CF and DCA-RQ (dynamic controlled atmosphere based on respiratory quotient) on quality and volatile profile.

In this context, the aim of this paper was to evaluate the effect of DCA, based on chlorophyll fluorescence and respiratory quotient, on ‘Royal Gala’ quality and volatile profile after long-term storage.

#### 4.1.2 Material and methods

##### 4.1.2.1 Fruit harvest and selection process

‘Royal Gala’ apples of the experiment were randomly harvest in a commercial orchard of Vacaria-RS, Brazil. Thereafter the fruits were transported to the Postharvest Research Center of the Federal University of Santa Maria, where a selection was once again carried out discarding fruits with any damage.

After the selection, the experimental samples were formed with 50 fruits each. In order to form the samples the fruit were selected randomly. These samples were put into small experimental chambers (233 L) and different storage conditions were used.

##### 4.1.2.2 Controlled atmosphere and dynamic controlled atmosphere conditions

The experiment was composed by 4 different storage conditions: [1] controlled atmosphere with 1.2 kPa O<sub>2</sub> + 2.0 kPa CO<sub>2</sub> (CA); [2] dynamic controlled atmosphere based on chlorophyll fluorescence (DCA-CF) + 1.2 kPa CO<sub>2</sub>; [3] dynamic controlled atmosphere based on respiratory quotient (DCA-RQ), with respiratory quotient 1.5 (DCA-RQ1.5) + 1.2 kPa CO<sub>2</sub>; [4] DCA-RQ2.0 + 1.2 kPa CO<sub>2</sub>. The DCA-CF was performed according to methodology proposed by Prange et al. (2007). DCA-RQ was based on the methodology proposed by Weber et al. (2015). Respiratory quotient (RQ) was daily calculated and chambers remained closed 24 hours for this determination. Each treatment was composed by 4 replicates of 50 fruits each replicate, totalizing 200 fruit per treatment.

#### 4.1.2.3 Atmosphere establishment

On the first day of storage, the apples were stored at 5 °C and held under this temperature for one week, when it was reduced from 5 °C down to 1 °C. Initially, the oxygen partial pressure was reduced down to 5 kPa with N<sub>2</sub> flushing and, during one week, the oxygen was decreased down to the desired condition by fruit respiration. This gradual temperature and oxygen reduction was undertaken to simulate the commercial conditions adopted by the CA stores in Brazil. After this process, the oxygen and carbon dioxide partial pressures were monitored and corrected by an automatic CA control system. The equipment compared the oxygen and carbon dioxide partial pressure to a set point. If the oxygen partial pressure was lower than the set point, O<sub>2</sub> was injected up to the desired concentration. The same manner was used for carbon dioxide correction, but generally the CO<sub>2</sub> was above the desired concentration and the excess of CO<sub>2</sub> in the chamber was automatically absorbed with lime scrubber. The O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> levels during storage and calculated RQ are shown in figure 1. The process of oxygen monitoring and correction in DCA-CF was according to Prange et al. (2007) and in the DCA-RQ according to Weber et al. (2015).

#### 4.1.2.4 Temperature and relative humidity

The storage temperature was  $1.0 \pm 0.1$  °C. Mercury thermometers, with 0.1 °C resolution, inserted in apple flesh were used to monitor temperature. The apple with the thermometer was allocated inside the experimental chamber.

Relative humidity was set at  $94 \pm 1\%$  throughout the storage. In order to absorb the humidity, calcium chloride was put into the experimental chamber (7.5 g kg<sup>-1</sup> of fruit). The relative humidity was monitored weekly with a psychrometer.

#### 4.1.2.5 Fruit quality evaluation

After 9 months of storage plus 7 days of shelf life ( $20 \pm 1$  °C and relative humidity  $80 \pm 5\%$ ), aiming to simulate the commercialization period, the fruits were submitted to the following quality analysis:

a) *ACC oxidase enzyme activity*: Evaluated according to methodology developed by Bufler (1986), with results expressed in nL C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>.

b) *Ethylene production and respiration rate*: Ethylene production was evaluated by gas chromatography. About 1.5 kg of fruits were put into a 5 L-glass container and hermetically closed during 2 hours. Thereafter, 2 aliquots of 1 mL were taken from the container and injected in a Varian<sup>®</sup> gas chromatograph model Star 3400CX (Varian, Palo Alto, CA, USA) equipped with a flame ionization detector (FID) and a Porapak N80/100 column. The temperature of injector, column and detector were 140, 90 and 200°C respectively. Taken in account the container volume, fruit mass, time of closure and ethylene concentration inside the container, the ethylene production rate was calculated and expressed in  $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ . The respiration rate was evaluated by fruit  $\text{CO}_2$  production. The air of the same container used to evaluate ethylene production was circulated throughout a gas analyzer (Schele<sup>®</sup>, model KB7), which quantified the  $\text{CO}_2$  concentration inside the 5 L-container. Taken in account the container volume, fruit mass, time of closure and  $\text{CO}_2$  concentration inside the container the respiration rate was calculated and expressed in  $\text{mL CO}_2 \text{ kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ .

c) *Flesh firmness*: Determined by the insertion of an 11 mm tip in two opposite sides of the equatorial region of fruits, where previously the skin was removed. Results expressed in Newton (N).

d) *Titrateable acidity*: By the titration of 10 mL apple juice diluted in 100 mL of distilled water, with a 0.1 N NaOH solution up to pH 8.1. The results were expressed in  $\text{mEq } 100 \text{ mL}^{-1}$ .

e) *Soluble solids*: Determined by refractometry of a sample of 1 mL of juice, obtained from the juice of 50 apples and results expressed in °Brix.

f) *Flesh breakdown, mealiness and healthy fruits amount*: These parameters were evaluated by counting the fruits that showed such disorder or quality in relation to total number of fruits per replicate (50 fruits). Data were presented in percentage.

g) *Volatile compounds analysis*: The volatile compounds were identified and quantified according to methodology proposed by Both et al. (2014a). Thus, fruit slices of the equatorial region were cooled down to 0 °C (pulp temperature). After cooling, the slices were processed to obtain the juice; this procedure was undertaken under low temperature (< 5.0 °C) to avoid enzymatic oxidation. Thereafter, the juice was put into 100 mL amber flasks and frozen at  $-30 \pm 1.0$  °C until the volatile compounds analysis.

One day before the volatile compounds analysis, the juice was thawed for 24 h in a refrigerator at temperature of 5.0 °C. Thereafter, a aliquot of 10 mL juice was put in a 20 mL amber vial, where previously was put 3 g of NaCl and 10  $\mu\text{L}$  of 3-octanol standard solution ( $82.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), and immediately hermetically closed with a PTFE-coated silicon lid seal. The

vial was then put in a water bath at temperature of 35 °C during 5 minutes; thereafter a Divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fiber (Supelco, 50/30  $\mu\text{m} \times 20 \text{ mm}$ ) was exposed to the vial headspace to adsorb the volatile compounds. The fiber was exposed to the headspace during 60 minutes under constant stirring.

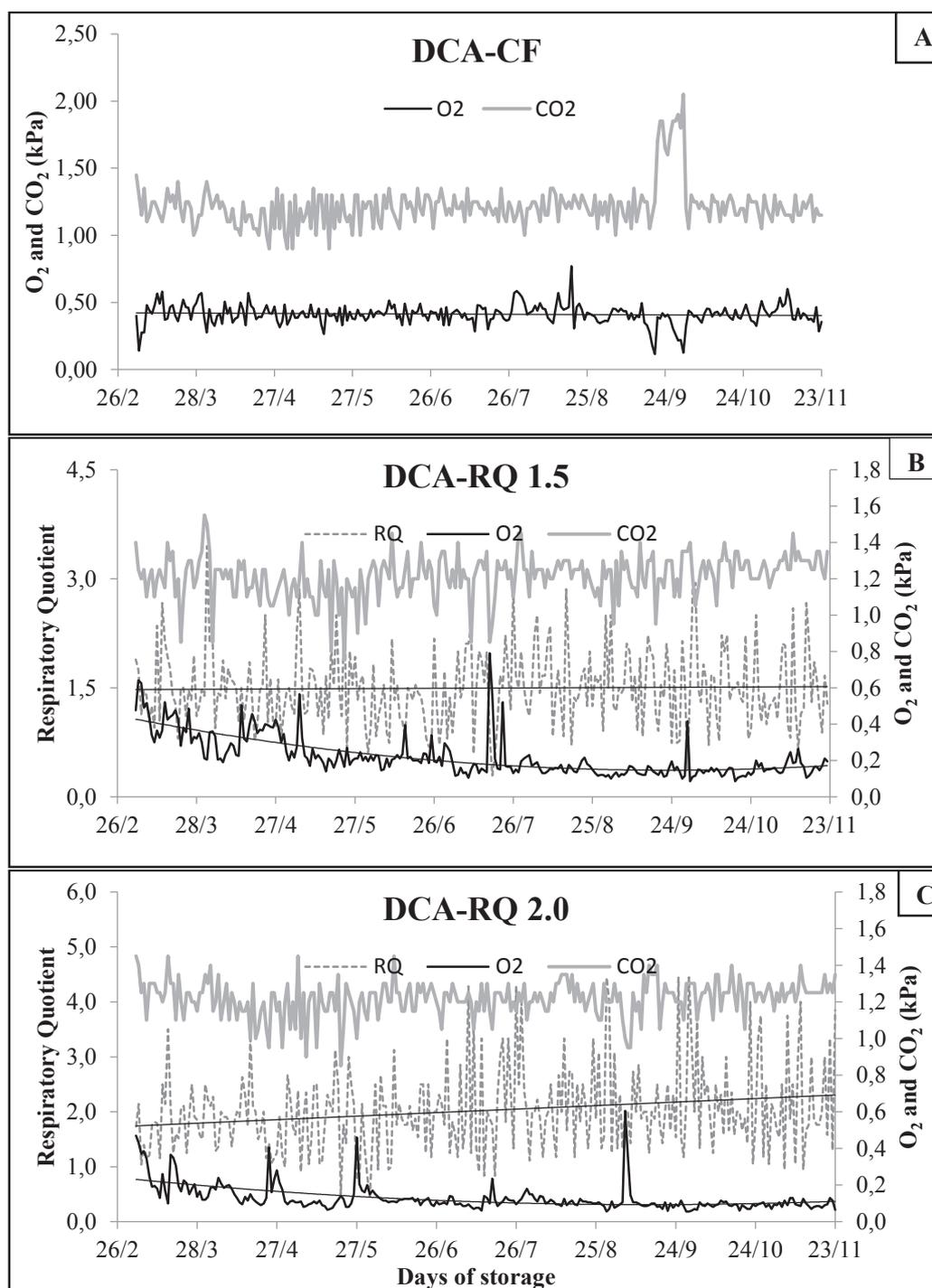


Figure 1 – Respiratory quotient,  $\text{O}_2$  and  $\text{CO}_2$  levels during 9 months storage in DCA monitoring by chlorophyll fluorescence (A) and respiratory quotient of 1.5 (B) and 2.0 (C).

In order to identify and quantify the volatile compounds a Shimadzu QP2010 Plus gas chromatograph coupled to mass spectrometry (GC/MS; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) was used. The volatile compounds adsorbed on the fiber were thermally desorbed into the injector portion at a temperature of 250 °C for 10 min, in a splitless mode for 2 min. The chromatograph was equipped with a polar CP-WAX 52 CB (Chrompack, USA; 60 m × 0.25 mm × 0.25 μm) column. The temperature of the column was seated at 35 °C for 3 minutes, and then increased up to 80 °C in a ratio of 2 °C min<sup>-1</sup> followed by another ramp until 230 °C in a ratio of 5 °C min<sup>-1</sup> and maintained in isothermal for 5 min. The detector was operating in an electro impact ionization mode with ionization energy of +70 eV and a scan range from 35 up to 350 m/z. The identification of compounds was based on the National Institute of Standards and Technology (NIST) library and by comparing the calculated Kovats indexes with the one of literature.

#### 4.1.2.6 Statistical analysis

Results were subjected to a variance analysis (ANOVA) at 5% of error probability. Data that showed significant difference by ANOVA were subjected to a Principal Component Analysis (PCA). Before the PCA the data matrix was autoscaled for each variable in order to obtain the same weight for all variables (mean = 0 and variance = 1). When the ANOVA was significant ( $p < 0.05$ ), means were also compared by Tukey's test at 5% of error probability. Data expressed in percentage were transformed by the formula  $\text{arc.sin}\sqrt{x/100}$  before variance analysis.

#### 4.1.3 Results and discussion

After 9 months of storage plus 7 days of shelf life fruits were submitted to quality and volatile compounds analysis. The results that showed significant difference by ANOVA were submitted to a multivariate analysis termed Principal Component Analysis (PCA) in order to show an overview of the results (Figure 2). The two major components (PCI and PCII) together represented 72.57% of the overall variation of variables. The PCI (49.59% of data variance) show the separation of the fruits stored under CA from the ones stored under DCA, independently of DCA treatment (Figure 2A). Concerning the variable evaluated (Figure 2B),

fruits stored under CA showed the largest amount of volatile compounds compared with fruits stored under DCA. Probably, this is a result of higher ethylene production and respiration rate. Nevertheless, fruits stored under CA showed high flesh breakdown and mealiness incidence, reducing the physical quality of these fruits. On the other hand, fruits stored under DCA-RQ 1.5 showed high flesh firmness, titratable acidity and healthy fruit amount. This result evidenced fruits stored under CA show a completely different response on quality maintenance and volatile compounds production compared to the ones stored under DCA. Perhaps, this is an effect of the different oxygen partial pressure adopted in CA (1.2 kPa), DCA-CF (0.35 – 0.45 kPa) and DCA-RQ (< 0.25 kPa).

The PCII (22.98% percentage of variance) carried out the separation of the different DCA storage conditions. According to PCII the fruits stored under DCA-RQ 2.0 showed a completely opposite response compared to DCA-CF, with fruits stored under DCA-RQ1.5 showing an intermediate response (Figure 2A). Fruits stored under DCA-RQ 1.5 and DCA-RQ 2.0 show higher amount of volatile compounds compared to fruits stored under DCA-CF, according to the PCII (Figure 2B). This lower volatile compound in fruits stored under DCA-CF may be related to the initial low oxygen stress that the fruits were submitted until the chlorophyll spikes. The major part of branched-chain volatile compounds was related to fruits stored under DCA-RQ, either under 1.5 or 2.0. Both et al. (2014a) working with ‘Royal Gala’ apples found higher branched-chain esters in fruits stored under ULO (0.5 and 0.7 kPa O<sub>2</sub>) in relation to CA (1.0 kPa O<sub>2</sub>). This result shows that branched-chain esters are not affected by oxygen lowering. DCA-RQ 2.0 storage result in higher acetaldehyde, ethanol and ethyl acetate accumulation, which are compounds related to off-flavor of mandarins and apples (Tietel et al., 2011; Wright et al., 2015).

ACC oxidase is a key enzyme in ethylene production pathway, consequently in fruit ripening and volatile compound synthesis. Fruits stored under CA showed the highest ACC oxidase enzyme activity; an intermediary activity was observed in DCA-CF stored fruits and the lowest by fruits stored under DCA-RQ, independently of the RQ level (Figure 3A). The higher ACC oxidase enzyme activity by fruits stored under CA is a result of the high oxygen partial pressure during storage (1.2 kPa O<sub>2</sub>). Some early paper found high ACC oxidase enzyme activity in CA storage compared to ULO (Brackmann et al., 2013; Weber et al., 2013), DCA-CF (Thewes et al., 2015; Weber et al., 2015) and DCA-RQ (Weber et al., 2015). Nevertheless, the lower ACC oxidase enzyme activity by fruits stored under DCA, may be a result of high ethanol production, once ethanol reduced ACC oxidase enzyme activity (Asoda et al., 2009; Thewes et al., 2015).

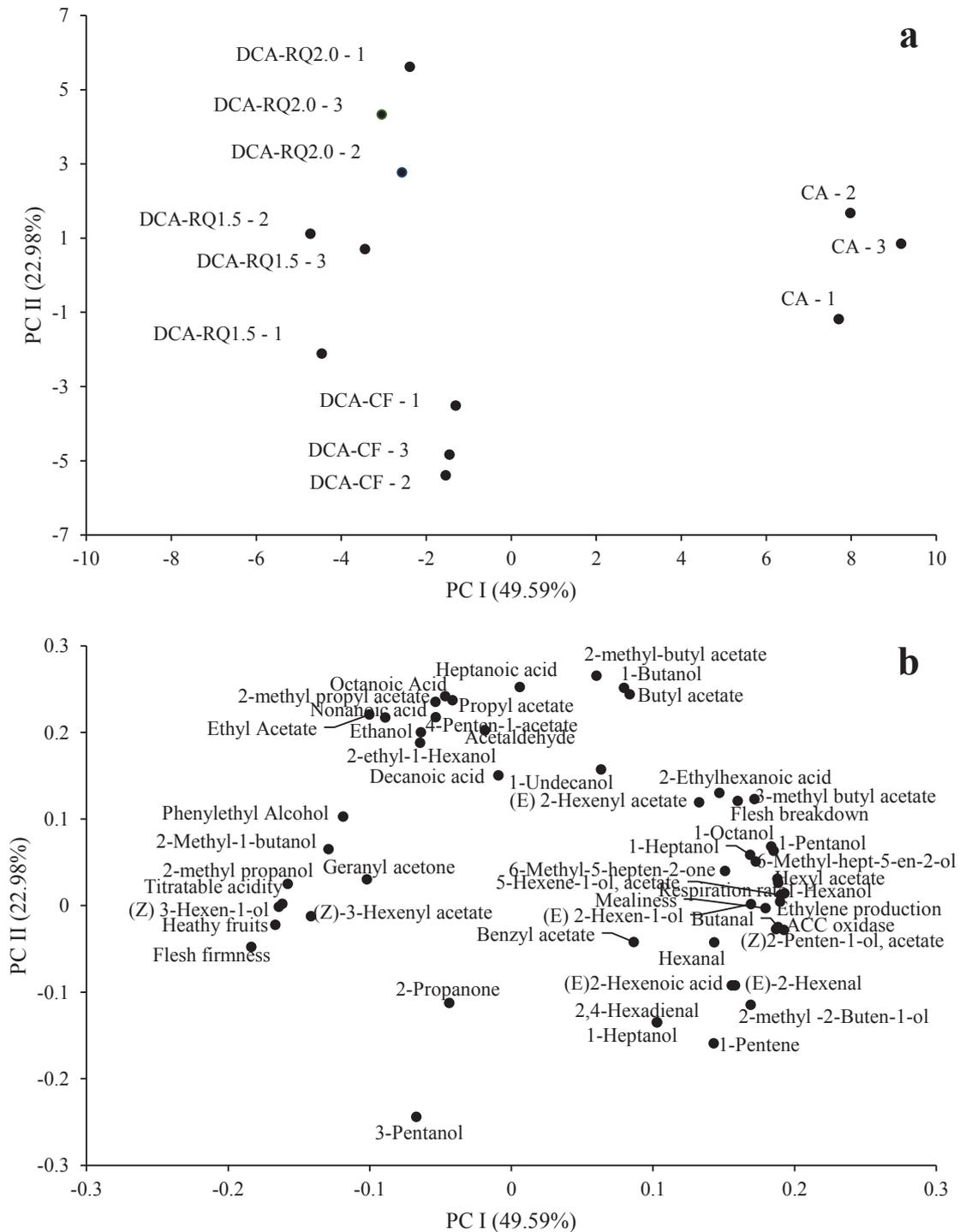


Figure 2 - Scores of treatments (a) and weights of the compounds (b) of 'Royal Gala' apple after nine months of storage in static controlled atmosphere (CA) and dynamic controlled atmosphere (DCA) plus seven days of shelf life at 20 °C.

\*Numbers 1; 2 and 3 in figure 2a represent the 3 replicates of each treatment.

The higher ACC oxidase enzyme activity by fruits stored in CA resulted in high ethylene production rate by these fruit (Figure 3B). Fruit stored under DCA-CF showed lower

ethylene production compared to CA, but higher when compared to DCA-RQ1.5 and DCA-RQ2.0. Weber et al. (2015) comparing CA, DCA-CF and DCA-RQ also found lower ethylene production by fruit stored under DCA compared to CA, but they did not find significant difference between DCA-CF and DCA-RQ. Perhaps, the differences between our and their study are due to the different RQ levels (2.0, 4.0 and 6.0) by Weber et al. (2015) in contrast of our work (1.5 and 2.0). Once more, the lower ethylene production may be related to the ethanol production by fruit stored in DCA, early works raise up the hypothesis that this compound decrease significantly ethylene production (Asoda et al., 2009; Liu et al., 2012; Jin et al., 2013; Thewes et al., 2015).

Similarly to ethylene production respiration rate was higher in fruits stored under CA compared to the two DCA methods tested (Figure 3C). The close response between ethylene and respiration, as showed by the PCA (Figure 2B), is due to the respiration is an ethylene-triggered event. Some early papers found an analogous response between ethylene and respiration rate (Weber et al., 2013; Brackmann et al., 2013; Weber et al., 2015; Thewes et al., 2015). Fruit stored under DCA-RQ 1.5 showed the lowest respiration rate, evidencing lower metabolism and consequently a better storage condition, but when the RQ level was increased up to 2.0 the respiration rate also increase, showing the RQ 2.0 promoted to much fermentation resulting in any type of damage to the cell leading in higher respiration. The means of O<sub>2</sub> levels during storage were 0.41; 0.22 and 0.13 kPa for DCA-CF; DCA-RQ1.5 and DCA-RQ2.0, respectively (Figure 1). Weber et al. (2015) evaluating different RQ levels found lower respiration in fruits stored under DCA-RQ 2.0 compared to CA, however, when the RQ level was increased up to 4.0 and 6.0 there was no difference from CA stored fruits.

Flesh firmness is one of the most important indicator of fruit physical quality so, it is important the development of a storage method that reduce fruit softening. According to figure 4A, higher flesh firmness was verified in fruits stored under DCA-RQ 1.5, differing from fruit stored under CA and DCA-RQ 2.0. Fruit stored in DCA-CF and DCA-RQ 2.0 showed higher flesh firmness compared to CA, but there was no difference between each other. The lower flesh firmness in fruit stored in CA is a result of the higher ethylene production and respiration by these fruits. The ethylene is a plant hormone that starts fruit ripening, increasing the cell wall enzyme activity (Nishiyama et al., 2007; Prasanna et al., 2007; Payasi et al., 2009; Wei et al., 2010). On the other hand, the higher flesh firmness by fruits stored under DCA may be a result of higher fermentation that resulted in higher ethanol concentration in flesh (Table 1), as soon as ethanol retard flesh firmness loss (Liu et al., 2012; Jin et al., 2013; Thewes et al., 2015). Some early works found higher flesh firmness by fruit

stored under DCA-CF (Lafer, 2008; Zanella, Cazzanelli & Rossi, 2008; Watkins, 2008; Weber et al., 2015; Thewes et al., 2015), but in our work there is a trend that DCA-RQ 1.5 maintain higher flesh firmness compared to DCA-CF.

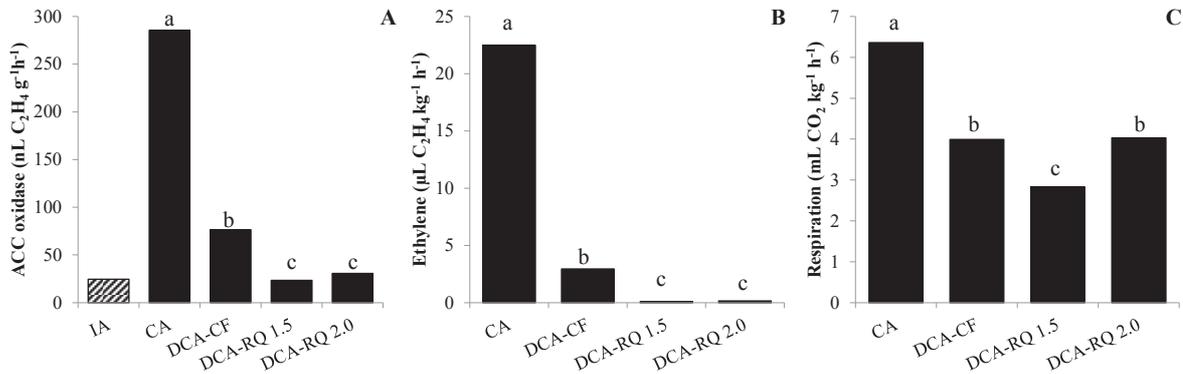


Figure 3 - ACC oxidase enzyme activity (A), ethylene production (B) and respiration rate (C) of 'Royal Gala' apple after 9 months of storage in static controlled atmosphere (CA) and dynamic controlled atmosphere (DCA) plus 7 days of shelf life at 20°C (IA = initial analysis).

According to an early work, the flesh firmness is the main factor in consumer acceptance for apples, however, the soluble solids and titratable acidity also play a key role in apple acceptance by de consumers (Harker et al., 2008). On the present research the soluble solids did not differ among treatments (Figure 4C), but fruits stored under DCA-RQ 1.5 show the highest titratable acidity, differing only from fruits stored under CA (Figure 4B). Analyzing the results obtained for titratable acidity and flesh firmness together, fruits stored under DCA-RQ 1.5 will be more accepted by the consumers (Harker et al., 2008). The oxygen lowering probably reduced the respiration rate and consequently the titratable acidity degradation in the tri-carboxylic acid cycle. Probably, the hypoxic storage condition resulted in fermentative metabolism that supplies energy for cell integration maintenance, reducing the acid consumption (Weber et al., 2015).

Physiological disorders are one of the most important problems for the apple storers, so its reduction is important to increase income for the storers and offer high quality products to the market. Higher flesh breakdown incidence was observed in fruits stored under CA and DCA-RQ 2.0 compared to fruits stored under DCA-CF and DCA-RQ 1.5 (Figure 4D). Some early paper found high flesh breakdown incidence in fruit stored under CA (Brackmann et al., 2008; Weber et al., 2013; Weber et al., 2015; Thewes et al., 2015). Nevertheless, the higher

flesh breakdown in fruit stored under DCA-RQ 2.0 compared to DCA-RQ 1.5 and DCA-CF is a result of high fermentation leading to excessive acetaldehyde and ethanol accumulation that might be result in flesh breakdown (Franck et al., 2007). Another explanation is fermentative metabolism resulted in insufficient energy production to maintain cell integrity, leading in flesh breakdown incidence (Pedreschi et al., 2009; Ho et al., 2013).

Mealiness in another important physiological disorder and its incidence is closely related to fruit ripening, as higher is the mealiness incidence than riper are the fruits (Both et al., 2014b). Fruits stored under CA showed the highest mealiness incidence after 9 month of storage plus 7 days of shelf life at 20 °C compared to fruits stored under DCA, independently of the DCA method, although there is a tendency of lower disorder in DCA-RQ 1.5 (Figure 4E). This result shows that fruits stored under CA stay in an advanced ripening stage. Perhaps, the high mealiness incidence of fruits stored in CA is a result of higher ethylene production by these fruits, once the high ethylene started the cell wall enzymes that degraded the middle layer of cell (Nishiyama et al., 2007; Goulao & Oliveira, 2008; Payasi et al., 2009; Wei et al., 2010) resulting in a mealy pulp aspect. Analyzing the mealiness and flesh breakdown of fruits stored under DCA-RQ 2.0, is evidenced that the higher flesh breakdown in fruits stored under this condition is not a result of advanced ripening stage due to the low mealiness incidence in this storage condition, raising the hypothesis that flesh breakdown incidence in this storage conditions is due to the excess of fermentation, according to Table 1 and Figure 2B.

Fruit stored in DCA, independently of the method, showed higher healthy fruit amount compared to CA (Figure 4F). The higher healthy fruits percentage is a result of lower mealiness and flesh breakdown in fruits stored in DCA-CF and DCA-RQ 1.5. Weber et al. (2015) also found higher healthy fruits in DCA-RQ and DCA-CF compared to CA. Thewes et al. (2015) found higher healthy fruit amount, in 'Royal Gala' apples, by storage in DCA-CF compared to CA, but for 'Galaxy' apples, there was no significant difference between DCA-CF and CA, showing the effect of DCA, monitored by chlorophyll fluorescence, in quality maintenance is cultivar dependent. Another research, studying 'Topaz', 'Otava' and 'Ariane' apple cultivars, also shows that the effect of DCA in quality maintenance is cultivar dependent (Gasser and Von Arx, 2015). The lower healthy fruits in CA may be related to higher ethylene production and respiration rate, which advanced the ripening of fruits, leading in lower quality after 9 months of storage plus 7 days of shelf life.

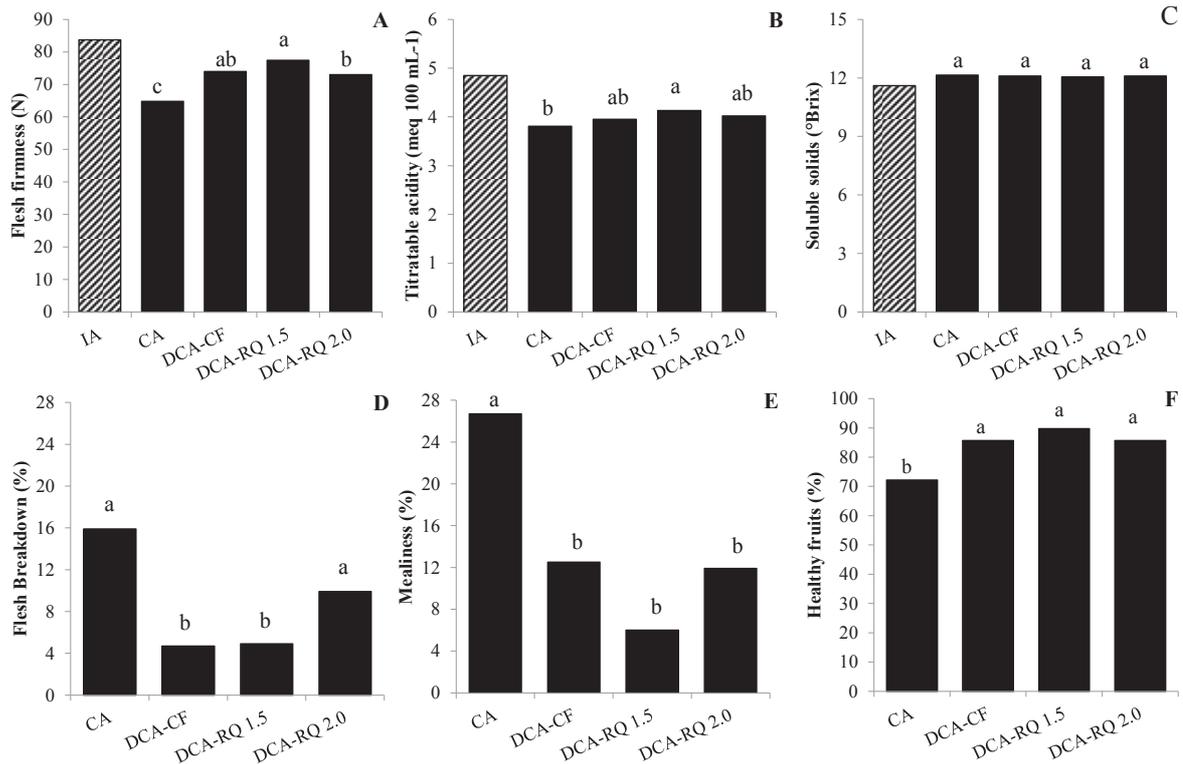


Figure 4 - Flesh firmness (A), titratable acidity (B), soluble solids (C), flesh breakdown (D), mealiness (E) and healthy fruits (F) of 'Royal Gala' apple after 9 months of storage in static controlled atmosphere (CA) and dynamic controlled atmosphere (DCA) plus 7 days of shelf life at 20°C (IA = initial analysis).

The apple volatile profile was evaluated at harvest and after 9 months of storage plus 7 days of shelf life (Table 1). In the analysis carried out at harvest, 18 esters, 14 alcohols, 3 aldehydes, 4 ketones and 6 acids were identified and quantified by GC/MS, but after storage plus shelf life there was a decrease of esters (13) and ketones (3) and an increasing up to 16 alcohols. This result agrees with literature, which showed the storage of apples under CA decrease significantly the ester production (Brackmann et al., 1993; Song and Bangerth, 1996; Fellmann et al., 2003; Bangerth et al., 2012). However, there are little reports in the literature taken in account the increase in alcohols after storage, as report in our work. Probably the higher number of alcohols after storage is related to the low oxygen partial pressure during storage in this new DCA storage method.

Esters are the main apple odor compounds, so than higher its concentration after storage, better fruit quality is achieved. For apples of 'Gala' group, such as 'Royal Gala' the esters of major impact are butyl acetate, hexyl acetate and 2-methyl butyl acetate (Brackmann et al., 1993; Young et al., 1996; Both et al., 2014a). These three esters are dramatically reduced by the storage, independently of the condition (Table 1). Butyl acetate was most significantly reduced in fruits stored under DCA-CF and DCA-RQ 1.5, but when fruits were

stored under DCA-RQ 2.0 there is no difference compared to fruits stored under CA. This result shows that oxygen reduction in DCA, with RQ 2.0 level, did not reduce the butyl acetate concentration. Probably, the lower butyl acetate production by apple stored under DCA-CF and DCA-RQ1.5 is a result of lower precursor concentration (1-butanol). Another early paper also reported that the main trouble for high volatile compound production is not the enzyme activity, but the precursor concentration (Echeverría et al., 2004). Both et al. (2014a) and Raffo et al. (2009) working with 'Royal Gala' and 'Pinova' apples, respectively, also found a significant butyl acetate concentration reduction in ULO (0.8, 0.7 and 0.5 kPa O<sub>2</sub>) and DCA-CF compared to CA, corroborating the result obtained in our work. However, in our work if the oxygen partial pressure was decreased up to 0.13 kPa (RQ 2.0), the butyl acetate concentration increase due to the precursor concentration increase. Additionally, this is the first report in literature of butyl acetate increase by the use of extremely low oxygen partial pressure.

In relation to hexyl acetate, all fruits stored under DCA, independently of the method, showed lower concentration of this compound (Table 1). The lower hexyl acetate concentration is a result of lower 1-hexanol concentration in fruits stored under these conditions. Perhaps, there is a problem in hexanal conversion into 1-hexanol, by the enzyme alcohol dehydrogenase (ADH) (Schaffer et al., 2007), once there is no reduction in hexanal concentration by storage under DCA. The ADH gene family is composed by 10 genes, where 9 genes are induced by ethylene and 1 is decreased in response to ethylene (ADH1) (Defilippi et al., 2005; Schaffer et al., 2007). On our work, the ethylene production was significantly lower in fruits stored under DCA (Figure 3B), what may result in lower ADH gene expression resulting in lower hexanal conversion into 1-hexanol and consequently decreasing the hexyl acetate production. Raffo et al. (2009) verified lower 1-hexanol and hexyl acetate concentration in DCA-CF compared to CA with 1.5 kPa O<sub>2</sub> + 1.3 kPa CO<sub>2</sub>, corroborating to our findings.

2-Methyl butyl acetate was the most abundant ester detected in 'Royal Gala' apples after 9 months of storage plus 7 days of shelf life (Table 1). According to Young et al. (1996) 2-methyl butyl acetate had the most effect on eight of nine sensory attributes for 'Royal Gala' apples after storage, assessed by trained sensory panellists. Thus, fruits stored under CA, DCA-RQ1.5 and DCA-RQ2.0 showed higher sensory quality compared to fruits stored under DCA-CF, once DCA-CF showed the lowest 2-methyl butyl acetate (Table 1). The lower 2-methyl butyl acetate by fruits stored under DCA-CF may be a result of lower alcohol acyl transferases (AAT), once 2-methyl-1-butanol was not influenced by the storage conditions.

Some early works suggest the activity of AAT is triggered by ethylene (Difilippi et al., 2004; Difilippi et al., 2005; Li et al., 2006), but on the present work the treatments with lowest ethylene production (Figure 3B) did not show lower 2-methyl butyl acetate concentration. Probably, the low ethylene production by fruits stored under DCA-RQ 1.5 and DCA-RQ 2.0 was enough to start the AAT activity, leading in high 2-methyl butyl acetate production. Both et al. (2014a) also verified an increase in 2-methyl butyl acetate by oxygen lowering down to 0.7 kPa O<sub>2</sub>, but when the oxygen was lowered below 0.7 the 2-methyl butyl acetate concentration decreased. In this work the DCA-RQ allow the oxygen lowering up to 0.22 – 0.13 kPa (means in RQ 1.5 and 2.0, respectively) and still with maintenance of a high level of 2-methyl butyl acetate.

Ethyl acetate is a volatile compound closely related to fermentative metabolism and off-flavor formation during storage (Tietel et al., 2011). Fruits stored under CA and DCA-CF showed the lowest ethyl acetate production, without significant difference between each other (Table 1). Some early paper found no difference between CA and DCA-CF for ethyl acetate production (Raffo et al., 2009; Thewes et al., 2015). On the other hand, fruits stored under DCA-RQ 1.5 and 2.0 showed a sharp increase in ethyl acetate concentration, with the highest concentration in fruit stored under DCA-RQ 2.0. The higher ethyl acetate production by these fruits is a result of higher ethanol concentration, once the ethyl acetate is formed by the linkage of an ethanol to an Acyl moiety by AAT (Difilippi et al., 2005; Li et al., 2006). The ethyl acetate and ethanol production by fruit stored under DCA-RQ 2.0 probably was too high, resulting in higher flesh breakdown in these fruits (Figure 4D). Another research found higher ethyl acetate production by ‘Delicious’ apples stored under 0.05 kPa O<sub>2</sub> (Mattheis et al., 1991).

Despite the higher ethyl acetate production by fruits stored under DCA-RQ, there is a higher quality of these fruits, once they show higher flesh firmness, titratable acidity and more volatile compounds production compared to fruits stored under DCA-CF (Figure 4 and Table 1). These results are confirmed by the PCA, where a low number of volatile compounds was related to DCA-CF (Figure 2B). Probably, the lower volatile production by fruits stored under DCA-CF is a result of the initial low oxygen stress up to the chlorophyll spikes, leading in a damage to the ester formation pathway. Raffo et al. (2009) also found a significant reduction of the main esters production by storage under DCA-CF compared to CA (1.5 kPa O<sub>2</sub> + 1.3 kPa CO<sub>2</sub>), but they found higher volatile compounds in DCA-CF compared to CA plus 1-methylcyclopropene.

Table 1 – Volatile compounds profile ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) of ‘Royal Gala’ apples at harvest and after 9 months of storage in static controlled atmosphere (CA) and dynamic controlled atmosphere (DCA), plus 7 days of shelf life, at 20°C.

(continua)

Compounds	At harvest	CA	DCA-CF <sup>1</sup>	DCA-RQ 1.5 <sup>1</sup>	DCA-RQ 2.0 <sup>1</sup>
<i>Esters</i>					
Ethyl Acetate	1.8	7.8c	9.7c	510.2b	1400.8a
Propyl Acetate	4.82	1.17b	0.33c	1.11b	4.76a
2-methyl Propyl Acetate	7.65	8.85b	5.42c	11.80a	11.45a
Butyl Acetate	2053.5	45.0a	6.2b	14.6b	52.2a
2-methyl Butyl Acetate	327.1	146.4ab	71.9c	113.9b	158.8a
3-methyl Butyl Acetate	109.7	12.1a	1.7c	2.7bc	5.6b
4-penten-1-yl Acetate	7.02	0.76b	0.40c	1.16a	1.03a
(Z) 2-penten-1-ol Acetate	7.87	24.15a	6.92b	2.27b	0.96b
Hexyl Acetate	499.1	92.2a	26.9b	24.4b	23.9b
(Z) 3-hexenyl Acetate	8.21	1.99b	2.80b	4.35a	2.75b
5-hexen-1-ol Acetate	10.55	5.77a	1.61b	1.05b	1.18b
(E) 2-hexenyl Acetate	4.28	8.54a	5.40b	6.91ab	6.54ab
Benzyl Acetate	1.51	1.09a	1.02a	0.90a	0.78a
<i>Alcohols</i>					
Ethanol	0.25	1.93c	3.64c	17.10b	67.47a
2-methyl propanol	-	1.25b	2.25ab	3.13a	2.32ab
3-pentanol	-	0.40c	1.44a	0.85b	0.28c
1-butanol	51.4	16.6a	5.8b	8.5b	18.3a
2-methyl-1-butanol	20.1	45.2a	57.1a	63.9a	64.4a
1-pentanol	3.77	3.12a	1.18b	1.16b	1.41b
2-methyl-2-buten-1-ol	-	8.27a	5.14b	1.12c	0.37c
1-hexanol	118.0	81.6a	35.5b	29.8b	32.4b
(Z) 3-hexen-1-ol	0.18	0.41b	0.93ab	1.38a	1.00a
(E) 2-hexen-1-ol	1.26	5.10a	2.48b	2.26b	2.57b
1-haptanol	4.09	2.85a	0.81b	1.09b	0.87b
6-methyl-hept-5-en-2-ol	0.56	0.83a	0.39b	0.30b	0.40b
2-ethyl-1-hexanol	1.91	0.98a	0.76a	1.39a	1.36a
1-octanol	1.73	1.05a	0.40b	0.42b	0.47b
Phenylethyl Alcohol	0.21	0.29b	0.43ab	0.39ab	0.53a
1-undecanol	0.27	0.37a	0.23a	0.31a	0.33a
<i>Aldehyde</i>					
Acetaldehyde	-	2.23b	1.61b	1.58b	4.46a
Butanal	-	0.76a	0.32b	0.16b	0.18b
Hexanal	110.6	177.9a	138.1a	113.2a	133.1a
(E) 2-hexenal	288.0	195.3a	160.1ab	114.7b	129.8b
2,4 hexadienal	3.19	2.62a	2.17a	2.16a	1.59a
<i>Ketones</i>					
2-propanone	0.49	1.00b	1.16b	2.43a	0.09c
6-methyl-5-hepten-one	0.72	1.03a	0.61b	0.67ab	0.69ab
Geranyl acetone	0.62	0.51a	0.63a	0.81a	0.67a

(conclusão)

Compounds	At harvest	CA	DCA-CF <sup>1</sup>	DCA-RQ 1.5 <sup>1</sup>	DCA-RQ 2.0 <sup>1</sup>
<i>Acids</i>					
Hexanoic Acid	1.54	1.98a	1.72a	1.81a	1.90a
2-ethylhexanoic Acid	0.98	1.36a	1.01b	1.03b	1.15ab
Heptanoic Acid	0.44	0.59a	0.49a	0.57a	0.67a
(E) 2-hexanoic Acid	0.41	0.39a	0.31ab	0.26b	0.23b
Octanoic Acid	1.19	1.91a	1.54a	2.20a	2.23a
Nonanoic Acid	2.17	3.78a	2.95a	4.82a	4.61a
Decanoic Acid	-	0.74a	0.53a	0.91a	0.73a

\* Means followed by equal letters in the line do not differ by Tukey's test at 5% of error probability.

<sup>1</sup> The carbon dioxide partial pressure was 1.2 kPa for all treatments.

KI: Experimental Kovats index.

\*Concentrations were calculated relative to an internal standard (3-octanol).

Esters that were detected only at harvest: Butyl Propanoate (3.96); Butyl Butyrate (3.56); 2-methyl Butyl Butyrate (1.38); 3-methyl-2-butenyl Acetate (1.52) and Heptyl Acetate (0.96).

Alcohol that was presented only at harvest: 1-octen-3-ol (0.79).

Ketone: 3-octanone (3.28).

After 9 months of storage plus 7 day of shelf life 16 alcohols were identified and quantified by GC/MS (Table 1). Among the 16 alcohols, the ethanol was the unique related to fermentation. Its concentration was lower in fruits stored under CA and DCA-CF; intermediary concentration in fruit stored under DCA-RQ1.5 and the highest by fruit stored under DCA-RQ 2.0. The higher ethanol concentration by fruits stored under DCA-RQ results in lower ACC oxidase enzyme activity (Figure 3A) and ethylene production (Figure 3B) by these fruits. Some early researches found a reduction in ethylene concentration by ethanol application (Liu et al., 2012; Jin et al., 2013) or production by fruit (Thewes et al., 2015).

Concerning the strain-chain alcohols, produced by  $\beta$ -oxidation, generally there is a higher concentration in fruits stored under CA compared to the ones stored under DCA, independently of the method (Table 1). This is a result of higher oxygen partial pressure during storage, allowing the  $\beta$ -oxidation of fatty acid resulting in alcohols accumulation in these fruits. The compounds generated by  $\beta$ -oxidation are important strain-chain ester precursors (Brackmann et al., 1993; Song and Bangerth, 2003). Both et al. (2014a) suggest that extremely low oxygen partial pressure inhibit the synthesis of important substrates for ester production. However, on our work it appear that this is not entirely true, especially at DCA-RQ 2.0, where the oxygen partial pressure is very low (0.13 kPa) and was observed high volatile compounds synthesis (Table 1).

Acetaldehyde is a very toxic metabolite for fruits, so than higher its concentration more risk to occurring physiological disorders. Thus, the higher flesh breakdown in fruits

stored under DCA-RQ 2.0 (Figure 4D) may be related to higher acetaldehyde concentration (Table 1). The higher acetaldehyde in DCA-RQ 2.0 was substrate for higher ethanol production by ADH in this treatment. Another important aldehyde is hexanal, which confers to the apples a green aroma (Mehinagic et al., 2006), but there was no difference among treatments (Table 1). Nevertheless, fruits stored under DCA-RQ 1.5 and 2.0 showed lower (E) 2-hexenal concentration compared to fruits stored under CA. This result disagree with the ones of Both et al. (2014a) that found lower concentration in CA compared to extremely low oxygen partial pressures storage of 0.7 kPa. The (E) 2-hexenal also confers to the fruits a green leave, vegetable and apple sensorial attribute (Mehinagic et al., 2006; Amaro et al., 2012). The aldehydes are important ester precursor, so than lower its concentration lower may be the ester concentration in fruits.

Among the three ketones detected, geranyl acetone was no significantly affected by the treatments tested (Table 1). In 'Royal Gala' apples stored under extremely low oxygen partial pressures this ketone was not affected by the oxygen (Both et al., 2014a). 6-Methyl-5-hepten-one is another important ketone originated by the carotenoids oxidation (Kobori et al., 2014). Higher 6-methyl-5-hepten-one was quantified in fruits stored under CA, differing only from the ones stored under DCA-CF (Table 1). Thus, fruits stored under CA probably showed higher carotenoids oxidation, because of the high oxygen partial pressure during storage. Probably, the higher carotenoids oxidation resulted in fruits without acceptable skin color, once the carotenoids are important apple skin color pigments (Delgado-Pelayo et al., 2014). 2-Propanone was higher in fruits stored under DCA-RQ 1.5, with fruits stored under CA and DCA-CF showing an intermediate concentration and fruits stored under DCA-RQ 2.0 the lowest concentration. Both et al. (2014a) found a reduction in 2-propanone as the oxygen partial pressure were reduced, but on our work this response was a little different, with higher concentration in intermediary O<sub>2</sub> and lowest at lowest oxygen concentration.

In relation to the acids, 7 compounds were detected and quantified (Table). In general terms there are little difference among treatments concerning the acids concentration. 2-Ethylhexanoic acid showed lower concentration in fruits stored under DCA-CF and DCA-RQ 1.5 compared to fruits stored in CA. (E) 2-hexanoic acid was also significantly affected by the storage conditions, with lower concentration in fruits stored under DCA RQ 1.5 and RQ 2.0 compared to CA.

#### 4.1.4 Conclusion

The storage of 'Royal Gala' apples under DCA, independently of the DCA method, maintain higher quality after 9 months storage plus 7 days of shelf life. However, there is a trend to fruits stored under DCA-RQ 1.5 maintain higher quality due to the low ethylene production and respiration rate leading in high flesh firmness and titratable acidity maintenance.

Fruits stored under controlled atmosphere show high volatile compounds concentration, but there are little differences compared to fruits stored under DCA-RQ1.5 and RQ 2.0. The storage of 'Royal Gala' apples in DCA-CF decrease the fruit ester production, especially 2-methyl butyl acetate that is the most important for 'Royal Gala' apple flavor. This results is likely related to the initial low oxygen stress employed in DCA-CF method, showing that this storage method change the volatile profile more significantly than the storage under DCA-RQ.

#### 4.1.5 References

- Amaro, A.L., Beaulieu, J.C., Grimm, C.C., Stein, R.E., & Almeida, D.P.F. (2012). Effect of oxygen on aroma volatiles and quality of fresh-cut cantaloupe and honeydew melons. *Food Chemistry* 49, 49-57.
- Asoda, T., Terai, H., Kato, M., & Suzuki, Y., (2009). Effects of postharvest ethanol vapor treatment on ethylene responsiveness in broccoli. *Postharvest Biology and Technology*, 52, 216-220.
- Bangerth, F., Song, J., & Streif, J. (2012). Physiological impacts of fruit ripening and storage conditions on aroma volatile formation in apple and strawberry fruit: a review. *Hort Science*, 47, 4-10.
- Both, V., Brackmann, A., Thewes, F.R., Ferreira, D.F., & Wagner, R. (2014). Effect of storage under extremely low oxygen on the volatile composition of 'Royal Gala' apples. *Food Chemistry*, 156, 50-57a.

- Both, V., Brackmann, A., Weber, A., Anese, R.O., & Thewes, F.R. (2014). Estresse inicial por baixo oxigênio seguido do armazenamento em atmosfera controlada de maçãs 'Royal Gala'. *Ciência Agronômica*, 45, 708-718b.
- Brackmann, A., Streif, J., & Bangerth, F. (1993). Relationship between a reduced aroma production and lipid metabolism of apples after long-term controlled-atmosphere storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118, 243-247.
- Brackmann, A., Weber, A., Pinto, J.A.V., Neuwald, D.A., & Steffens, C.A. (2008). Manutenção da qualidade pós-colheita de maçãs 'Royal Gala' e 'Galaxy' sob armazenamento em atmosfera controlada. *Ciência Rural*, 38, 2478-2484.
- Brackmann, A., Weber, A., Pavanello, E.P., Both, V., & Sestari, I. (2009). Armazenamento em atmosfera controlada de maçãs mutantes da cultivar Gala. *Revista Brasileira de Armazenamento*, 34, 136-143.
- Brackmann, A., Anese, R.O., Weber, A., Both, V., Gasperin, A.R., & Pavanello, E.P. (2013). Efeito do estresse inicial por baixo O<sub>2</sub> combinado com 1-metilciclopropeno na conservação de maçãs 'Royal Gala' armazenadas com ultrabaixo O<sub>2</sub>. *Semina: Ciências Agrárias*, 34, 1185-1194.
- Bufler, G., 1986. Ethylene-promoted conversion of 1-aminocyclopropene-1-carboxylic acid to ethylene in peel of apple at various stages of fruit development. *Plant Physiology*, 80, 539-543.
- DeEll, J.R., van Kooten, O., Prange, K.R., & Murr, D.P. (1999). Applications of chlorophyll fluorescence techniques in post-harvest physiology. *Horticultural Reviews*, 23, 69-107.
- Defilippi, B.G., Dandekar, A.M., & Kader, A.A. (2004). Impact of suppression of ethylene action on flavor metabolites in apple (*Malus domestica* Borkh) fruits. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5694-5701.
- Defilippi, B.G., Kader, A.A., & Dandekar, A.M. (2005) Apple aroma: alcohol acyltransferase, a rate limiting step for ester biosynthesis, is regulated by ethylene. *Plant Science*, 168, 1199–1210.
- Delgado-Pelayo, R., Gallardo-Guerrero, L., & Hornero-Méndez, D. (2014). Chlorophyll and carotenoids pigments in the peel and flesh of commercial apple fruit varieties. *Food Research International*, 65, 272-281.
- Echeverría, G., Graell, J., López, M.L., & Lara, I. (2004). Volatile production, quality and aroma-related enzyme activities during maturation of 'Fuji' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 31, 217-227.

- Fellmann, J.K., Rudell, D.R., Mattinson, D.S., & Mattheis, J.P. (2003). Relationship of harvest maturity to flavor regeneration after CA storage of 'Delicious' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 39-51.
- Franck, C., Lammertyn, J., Ho, Q.T., Verboven, P., Verlinden, B., & Nicolaï, B.M. (2007). Browning disorders in pear fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 43, 1-13.
- Gasser, F., Eppler, T., Naunheim, W., Gabioud, S., & Nising, A. B., (2008). Dynamic CA storage of apples: monitoring of the critical oxygen concentration and adjustment of optimum conditions during oxygen reduction. *Acta Horticulturae*, 796, 69-76.
- Gasser, F., & Von Arx, K., (2015). Dynamic CA storage of organic apple cultivars. *Acta Horticulturae*, 1071, 527-532.
- Goulao, L.F., & Oliveira, C.M., (2008). Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Food Science and Technology*, 19, 4-25.
- Harker, F.R., Kupferman, E.M., Marin, A., Gunson, F.A.B., & Triggs, C.M. (2008). Eating quality standards for apples based on consumer preferences. *Postharvest Biology and Technology*, 50, 70-78
- Ho, Q.T., Verboven, P., Verlinden, B.E., Schenk, A., & Nicolaï, B. M. (2013). Controlled atmosphere storage may lead to local ATP deficiency in apples. *Postharvest Biology and Technology*, 78, 103-112.
- Jin, Y.Z., Lv, D.Q., Liu, W.W., Qi, H.Y., & Bai, X.H., (2013). Ethanol vapor treatment maintains postharvest storage quality and inhibits ethylene biosynthesis during storage of oriental sweet melons. *Postharvest Biology and Technology*, 86, 372-380.
- Kobori, C.N., Wagner, R., Padula, M., & Rodriguez-Amaya, D.B. (2014). Formation of volatile compounds from lycopene by autoxidation in a model system simulating dehydrated foods. *Food Research International*, 63, 49-54.
- Lafer, G. (2008). Storability and fruit quality of 'Braeburn' apples as affected by harvest date, 1-MCP treatment and different storage conditions. *Acta Horticulturae*, 796, 179-184.
- Li, D., Xu, Y., Xu, G., Gu, L., Li, D., & Shu, H. (2006). Molecular cloning and expression of a gene encoding alcohol acyltransferase (*MdAAT2*) from apple (cv. Golden Delicious). *Phytochemistry*, 67, 658-667.
- Liu, W.W., Qi, H.Y., Xu, B.H., Li, Y., Tian, X.B., Jiang, Y.Y., Xu, X.F., & Lv, D.Q., (2012). Ethanol treatment inhibits internal ethylene concentration and enhances ethyl ester production during storage of oriental sweet melons (*Cucumis melo* var. *Makuwa* Makino). *Postharvest Biology and Technology*, 67, 75-83.

- Mattheis, J.P., Buchanan, D.A., & Fellman, J.K. (1991). Change in apple fruit volatile after storage in atmosphere inducing anaerobic metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1602-1605.
- Mehinagic, E., Royer, G., Symoneaux, R., Jourjon, F., & Prost, C. (2006). Characterization of odor-active volatiles in apples: influence of cultivars and maturity stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2678-2687.
- Nishiyama, K.; Guis, M.; Rose, J.K.C.; Kubo, Y.; Bennett, K.A.B.; Lu, W.; Kato, K.; Koichiro, U.; Ryohei, N.; Akitsugu, I.; Mondher, B.; Alain, L.; Jean-Claude, P.; & Bennett, A.B. (2007). Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in charentais melon. *Journal of Experimental Botany*, 58, 1281-1290.
- Payasi, A.; Mishra, N.N.; Chaves, A.L.S.; & Singh, R., (2009). Biochemistry of fruit softening: an overview. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 15, 103-113.
- Pedreschi, R., Franck, C., Lammertyn, J., Erban, A., Kopka, J., Hertog, M., Verlinden, B., & Nicolaï, B. (2009). Metabolic profile of 'Conference' pears under low oxygen stress. *Postharvest Biology and Technology*, 51, 123-130.
- Prange, R.K., Delong, J.M., Harrison, P., Mclean, S., Scrutton, J., & Cullen, J., (2007). Method and apparatus for monitoring a condition in chlorophyll containing matter. U.S. Patent, n.WO/2002/006795.
- Prasanna, V.; Prabha, T.N.; & Tharanathan, R.N. (2007). Fruit ripening phenomena - an overview. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, 47, 1-19.
- Raffo, A., Kelderer, M., Paoletti & Zanella., (2009). Impact of innovative controlled atmosphere storage technologies and postharvest treatments on volatile compounds production in Cv. Pinova Apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 915-923.
- Schaffer, R.J., Friel, E.N., Souleyre, E.J.F., Bolitho, K., Thodey, K., Ledger, S., Bowen, J.H., Ma, J., Nain, B., Cohen, D., Gleave, A.P., Crowhurst, R.N., Janssen, B.J., Yao, J., & Newcomb, R.D. (2007). A genomic approach reveals that aroma production in apple is controlled by ethylene predominantly at the final step in each biosynthetic pathway. *Plant Physiology*, 144, 1899-1912.
- Song, J., & Bangerth, F. (1996). The effect of harvest date on aroma compounds production from 'Golden Delicious' apple fruit and relationship to respiration and ethylene production. *Postharvest Biology and Technology*, 8, 259-269.

- Song, J., & Bangerth, F. (2003). Fatty acids as precursor for aroma volatile biosynthesis in pre-climacteric and climacteric apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 30, 113-121.
- Thewes, F.R., Both, V., Brackmann, A., Weber, A. & Anese, R.O. (2015). Dynamic controlled atmosphere and ultralow oxygen storage on 'Gala' mutants quality maintenance, *Food Chemistry*., doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.128>. In press.
- Tietel, Z., Lewinsohn, E., Fallik, E., & Porat, R. (2011). Elucidating the roles of ethanol fermentation metabolism in causing off-flavors in mandarin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 11779-11785.
- Veltman, R.H., Verschoor, J.A., & Ruijsch van Dugteren, J.H., (2003). Dynamic control system (DCS) for apples (*Malus domestica* Borkh. cv. 'Elstar'): optimal quality through storage based on products response. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 79-86.
- Watkins, C, B. (2008). Dynamic controlled atmosphere storage – a new technology for the New York storage industry? *New York Fruit Quarterly*, 16, 23-26.
- Wei, J.; Ma, F.; Shi, S.; Qi, X.; Zhu, X.; & Yuan, J. (2010). Changes and postharvest regulation of activity and gene expression of enzymes related to cell wall degradation in ripening apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 56, 147-154.
- Wright, H., DeLong, J., Harrison, P.A., Gunawardena, A.H.L.N., & Prange, R., (2010). The effect of temperature and other factors on chlorophyll fluorescence and the lower oxygen limit in apples (*Malus domestica*). *Postharvest Biology and Technology*, 55, 21-28.
- Wright, A.H., DeLong, J.M., Arul, J., & Prange, R.K. (2015). The trend toward lower oxygen levels during apple (*Malus x domestica* Borkh) storage – A review. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 90, 1-13.
- Wright, A.H., DeLong, J.M., Gunawardena, A.H.L.A.N., & Prange, R.K. (2012). Dynamic controlled atmosphere (DCA): Does fluorescence reflect physiology in storage?. *Postharvest Biology and Technology*, 64, 19-30.
- Weber, A., Brackmann, A., Anese, R.O., Both, V., & Pavanello, E.P. (2013). Atmosfera controlada para o armazenamento da maçã 'Maxi Gala'. *Revista Ciência Agronômica*, 44, 294-301.
- Weber, A., Brackmann, A., Both, V., Pavanello, E.P., Anese, R.O., & Thewes, F.R., (2015). Respiratory quotient: innovative method for monitoring 'Royal Gala' apple storage in dynamic controlled atmosphere. *Scientia Agricola*, 72, 28-33.

Zanella, A., Cazzanelli, P., & Rossi, O. (2008). Dynamic controlled atmosphere (DCA) storage by the means of chlorophyll fluorescence response for firmness retention in apple. *Acta Horticulturae*, 796, 77-82.

Young, H., Gilbert, J. M., Murray, S. H., & Ball, R. D. (1996). Causal effect of aroma compounds on Royal Gala apple flavours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71, 329-336.

## 5 ARTIGO 3

### 5.1 CO<sub>2</sub> Partial Pressure for Respiratory Quotient and HarvestWatch™ Dynamic Controlled Atmosphere for ‘Galaxy’ Apples Storage<sup>2</sup>

**Keywords:** *Malus × domestica*, quality, ethylene, low oxygen, respiration.

#### Abstract

Apples stored in low oxygen conditions, especially in dynamic controlled atmosphere (DCA), change from aerobic to anaerobic respiration, which if not excessive, reduces the quality losses during storage and at shelf life. Our group developed a new DCA storage method based on the respiratory quotient (RQ). However, the CO<sub>2</sub> level in this new DCA method and in the already commercially established method was not yet studied. Therefore, this work evaluated the quality of ‘Galaxy’ apples after storage in CA, RQ DCA and HarvestWatch™ DCA (HW DCA) at three CO<sub>2</sub> levels (1.2, 1.6 and 2.0 kPa). The O<sub>2</sub> in the CA condition was 1.2 kPa. All fruits were stored at 1.0°C for 9 months and additional 7 days in shelf life at 20°C. The fruit assessment was carried out after the shelf life period. ‘Galaxy’ apples stored in RQ DCA resulted in lower ethylene biosynthesis rate, which in turn, maintained higher flesh firmness, lower mealiness and higher percentage of ‘healthy’ fruits. An interaction between CO<sub>2</sub> level and storage condition was observed on the quality parameters. ‘Galaxy’ apples stored at CA with 2.0 kPa CO<sub>2</sub> maintained higher acidity, lower mealiness than those stored at 1.2 kPa CO<sub>2</sub>, probably as a result of the lower ethylene biosynthesis and respiration rate. At DCA storage, monitored with RQ or with HarvestWatch™, these parameters showed an opposite behaviour, in which 1.2 kPa or 1.6 kPa CO<sub>2</sub> partial pressure resulted in better fruit quality. Therefore, this work concluded that RQ DCA maintained better apple fruit quality after long-term storage and 1.2 to 1.6 kPa are the best CO<sub>2</sub> partial pressures to use in RQ-DCA storage. In standard CA storage, 2.0 kPa is the most appropriate CO<sub>2</sub> partial pressure.

#### 5.1.1 Introduction

Controlled atmosphere (CA) storage is widespread worldwide and used to maintain apple quality. Some countries, such as Brazil, in which the apple sale rely primarily on domestic production and presented a short harvest window, need to store for long-term. In such situation, considerable losses may occur in CA storage, since the O<sub>2</sub> level is maintained static during the entire storage period, and generally above to the ideal to decrease fruits metabolism.

---

<sup>2</sup> Artigo publicado na revista Acta Horticulturae, v.1079, p.435-440, 2015.

A new storage system, derived from conventional CA, namely Dynamic Controlled Atmosphere (DCA), was developed and patented by a group of Canadian researchers (Prange et al., 2002). In this system the chlorophyll fluorescence of a fruit sample is used for detecting the lowest O<sub>2</sub> stress (DeLong et al., 2004). This system is called HarvestWatch™ and in the present study from this point onwards we used the term HW-DCA. Chlorophyll fluorescence is used to monitor the minimum O<sub>2</sub> tolerated by the fruits. At the storage beginning, the oxygen of the chamber is reduced until a fluorescence spike is detected, showing that this level of O<sub>2</sub> is the minimum tolerated by the fruits. Thereafter, the partial pressure of this gas is increased by 0.2 to 0.3 kPa and remained so until a new spike of chlorophyll fluorescence occurs or up to the end of storage.

In the concept of DCA storage, is being developed by our research group a new storage method, based on the respiratory quotient of the fruits (RQ-DCA). The respiratory quotient (RQ) is the ratio from CO<sub>2</sub> production by O<sub>2</sub> consumption from fruit respiration during storage. RQ close to 1.0 means that aerobic respiration is occurring and than higher this value, higher is the fermentation. By this method it is possible to monitor and maintain the O<sub>2</sub> near the threshold tolerated by the fruit, substantially reducing metabolism and maintaining quality. Furthermore, there is still the possibility of automatizing this system, by using the same facilities of conventional CA. The gas analyzers currently available have a good precision and thus the same equipment used to monitor the gas concentration in conventional CA chambers may be used to determine the RQ.

In conventional CA storage, the increase in CO<sub>2</sub> levels was shown to be beneficial for decreasing fruit metabolism and preservation overall quality. For apples from Gala group, the recommended CO<sub>2</sub> level is between 2.0 and 3.0 kPa (Brackmann et al., 2001). In DCA storage, both in the chlorophyll fluorescence method, but especially when the RQ method is used, the oxygen concentration is maintained far below that in conventional CA. Thus, the maintenance of the same CO<sub>2</sub> conditions could result in damage to the fruits. There are no studies that prove the ideal CO<sub>2</sub> level for storage in DCA, only recommendations for maintenance at levels below conventional CA (Zanella et al., 2005). It is important to investigate the optimal concentration of this gas, because storage at very low partial pressures leads to higher energy costs for CO<sub>2</sub> absorption in the storage chambers.

So, we aimed with this research to compare the apple storage in DCA by the proposed method (QR-DCA) with another method already widespread (HW-DCA) and comparing both with storage in conventional CA. In addition, we tried to identify the optimal CO<sub>2</sub> concentration for storage in these conditions.

### 5.1.2 Materials and Methods

'Galaxy' apples were harvested at a commercial orchard in Vacaria county, state of Rio Grande do Sul, in a Southern Brazil traditional apple production area. Fruit were stored in test containers of 0.23 m<sup>3</sup>, in standard CA (1.2 kPa O<sub>2</sub>), in DCA monitored by chlorophyll fluorescence (HW-DCA) and DCA monitored by respiratory quotient (RQ-DCA). For each storage condition, three CO<sub>2</sub> partial pressures were used: 1.2; 1.6 and 2.0 kPa, at temperature of 1.0 °C. In HW-DCA the fluorescence spike was recorded at 0.06 kPa O<sub>2</sub>, and thereafter oxygen was injected up to 0.40 kPa, and remained so until a new spike of chlorophyll fluorescence occurs or up to the end of storage. The RQ was initially calculated every two days and later after every five days by the ratio of CO<sub>2</sub> production and O<sub>2</sub> uptake. According results of calculated RQ, the partial pressure of O<sub>2</sub> was adjusted (increased or decreased) so that the RQ remained close to 1.5 during the entire period of storage. We used RQ of 1.5 for being the most suitable for apples from Gala group, according to preliminary tests in our research institute (A. Brackmann, pers. Commun, 2013).

Fruit were stored in such conditions for 9 months, when test containers were open and the fruits remained for 7 days at shelf life (20 °C) prior to quality parameters analysis. Were evaluated: a) Flesh firmness, by inserting a tip of 11mm diameter in the pulp of the fruits and the values were expressed in Newton; b) Titratable acidity, by neutralizing the acid present in a sample of 10 ml juice with NaOH 0.1 N up to pH 8.1; c) Mealiness, by counting the fruits which showed any symptoms of mealy pulp and without juiciness, and the data were expressed as percentage of fruits with this disorder; d) Healthy fruits, expressed as the percentage of fruit that had no any symptoms of decay and /or external or internal damage and e) Ethylene production, which was evaluated every two days during shelf life. The samples were placed in 5 L glass flasks and remained closed for approximately two hours. After a sample of the headspace of the glass was removed and analyzed in a Varian<sup>®</sup> 3400 gas chromatograph, equipped with flame ionization detector (FID), column packed with Poropak N with two meters length and temperature of the column, injector and detector of 90 °C, 140 °C and 200 °C, respectively. From the ethylene concentration, the fruit mass, the free space in the glasses flasks and closing time, the ethylene production was calculated and expressed as  $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

The experiment was analyzed in a bifactorial way (three storage conditions x three CO<sub>2</sub> levels), with four replicates of 50 fruits each. An analysis of variance was performed and means were compared by Tukey test at 5% significance.

### 5.1.3 Results and Discussion

For flesh firmness no interaction occurring between the two factors (storage conditions x CO<sub>2</sub> levels). Thus, treatments means were compared. Regarding CO<sub>2</sub> partial pressure used during storage, there was no difference between the three levels. Already when comparing the storage conditions, it is possible to observe a significant difference between treatments. DCA was more efficient in maintaining flesh firmness compared to standard CA and fruits stored in RQ method (RQ-DCA) maintaining higher firmness than these stored by chlorophyll fluorescence method (HW-DCA) (Table 1). The literature also reports advantage of HW-DCA storage in relation to standard CA in maintaining flesh firmness and overall quality of apples (DeLong et al., 2004; Zanella et al., 2005; Watkins, 2008). However, this higher flesh firmness in RQ-DCA in relation to HW-DCA may be due to the fruit metabolism reduction until the lower oxygen threshold tolerated by the fruits, because in this storage method was provided a monitoring and adjust of the O<sub>2</sub> partial pressure during the entire storage period. In opposition, in HW-DCA only in the beginning of the storage period is performed an evaluation of the lower oxygen limit with a later adjust (increasing), maintaining the level of this gas constant until the end of the storage. After this adjust, the O<sub>2</sub> partial pressure remained higher and do not change according to the fruits metabolism. As reported by DeLong et al. (2004), the fruit tolerance to low oxygen levels can change from one year to another, and thus, it's necessary a kind of monitoring and adjust to this threshold. On the same way, it could also occur a change in the fruit metabolism during the storage time and, thus, on the O<sub>2</sub> consumption.

In the storage with low CO<sub>2</sub> partial pressure (1.2 or 1.6 kPa) the lowest acid consumption was recorded in fruits stored in DCA, independent of the method used: RQ or HW-DCA (Table 1). At the highest CO<sub>2</sub> partial pressure there was no significant difference between standard CA and the two conditions of DCA for acidity. In standard CA, higher levels of CO<sub>2</sub> was advantageous for acidity maintenance, while in DCA the level of CO<sub>2</sub> did not affect the acid consumption.

Table 1 - Flesh firmness and titratable acidity of 'Galaxy' apples after 9 months storage in controlled atmosphere (CA) or dynamic controlled atmosphere (DCA) monitored by chlorophyll fluorescence (HW-DCA) or by respiratory quotient (RQ-DCA), plus 7 days at 20 °C.

	Partial pressure of CO <sub>2</sub> during storage (kPa)			Mean
	1.2 kPa CO <sub>2</sub>	1.6 kPa CO <sub>2</sub>	2.0 kPa CO <sub>2</sub>	
<b><i>Flesh firmness (N)</i></b>				
CA <sup>z</sup>	55.52	58.18	60.72	58.14 c
HW-DCA	63.39	62.79	64.21	63.46 b
RQ-DCA <sup>y</sup>	66.89	66.23	66.20	66.44 a
Mean	61.94 A <sup>x</sup>	62.40 A	63.71 A	
CV (%)			3.47	
<b><i>Titratable acidity (mEq 100 mL<sup>-1</sup>)</i></b>				
CA	3.76 bB	3.70 bB	4.17 aA	3.87
HW-DCA	4.10 aA	4.16 aA	4.10 aA	4.12
RQ-DCA	4.08 aA	4.14 aA	4.07 aA	4.09
Mean	3.98	4.00	4.11	
CV (%)			4.19	

<sup>z</sup> Controlled atmosphere with 1.2 kPa O<sub>2</sub>.

<sup>y</sup> Respiratory Quotient of 1.5

<sup>x</sup> Means separation at 5% level (Tukey's test); capital letters between mean values in the same storage atmosphere, small letters between means in the same CO<sub>2</sub> level.

Mealiness is the disorder that more affect the quality of Gala group apple stored during long term. At the present study, RQ-DCA with 1.2 kPa of CO<sub>2</sub> was the storage condition that better controlled mealiness disorder and also produced better results compared with standard CA or HW-DCA for this same level of CO<sub>2</sub>. Again, it is possible to observe a positive effect of higher levels of CO<sub>2</sub> when fruits are stored in standard CA. Nevertheless, when fruits are stored in RQ-DCA, levels higher than 1.6 kPa of CO<sub>2</sub> increase the occurrence of mealiness in the fruits (Table 2).

We made an evaluation of fruits that were suitable for consumption after 9 months of storage plus 7 days of shelf life. The result was expressed in percentage of fruits without symptoms of external or internal damage. Higher percentage of healthy fruits was observe in RQ-DCA method with 1.6 kPa CO<sub>2</sub>, without statistically difference from storage in such DCA condition and 1.2 kPa CO<sub>2</sub>. The storage in CO<sub>2</sub> partial pressure above 1.6 kPa reduced the percentage of healthy fruits in RQ-DCA method, while in the storage in HW-DCA method there was no effect of levels of CO<sub>2</sub> in healthy fruits. However, in standard CA, the increasing in CO<sub>2</sub> levels also increased the percentage of healthy fruits (Table 2), showing the beneficial effect of high CO<sub>2</sub> in this storage system.

Table 2 - Mealiness and healthy fruits of 'Galaxy' apples after 9 months storage in controlled atmosphere (CA) or dynamic controlled atmosphere (DCA) monitored by chlorophyll fluorescence (HW-DCA) or by respiratory quotient (RQ-DCA), plus 7 days at 20 °C.

	Partial pressure of CO <sub>2</sub> during storage (kPa)			Mean
	1.2 kPa CO <sub>2</sub>	1.6 kPa CO <sub>2</sub>	2.0 kPa CO <sub>2</sub>	
	<b>Mealiness (%)</b>			
CA <sup>z</sup>	52.9 aA	35.3 aB	24.5 aB	37.6
HW-DCA	28.0 bA	32.5 aA	30.1 aA	30.2
RQ-DCA <sup>y</sup>	11.9 cB	23.1 aAB	29.8 aA	21.6
Mean	30.9	30.3	28.1	
CV (%)			24.28	
	<b>Healthy fruits (%)</b>			
CA	43.7 bC	59.4 bB	70.8 aA	58.0
HW-DCA	62.5 aA	62.1 bA	67.6 abA	64.1
RQ-DCA	71.5 aA	72.9 aA	59.4 bB	67.9
Mean	59.3	64.8	65.9	
CV (%)			9.60	

<sup>z</sup> Controlled atmosphere with 1.2 kPa O<sub>2</sub>.

<sup>y</sup> Respiratory Quotient of 1.5

<sup>x</sup> Means separation at 5% level (Tukey's test); capital letters between mean values in the same storage atmosphere, small letters between means in the same CO<sub>2</sub> level.

Ethylene production was evaluated during the entire shelf life period (Fig. 1). In the first and second evaluation, performed at 12 hours of shelf life and 2 days thereafter, there was interaction between the factors level CO<sub>2</sub> and storage regime (Fig. 1A and 1B). Fruits stored in DCA produced significantly lower rate of ethylene than fruits stored in standard CA, independent of the CO<sub>2</sub> level used in the chambers. This helps to explain the better quality maintenance of the fruits stored in DCA, because ethylene is responsible for initiate and accelerate the ripening and senescence processes of climacteric fruits, such as apple (Lelièvre et al., 1997). Fruits stored in standard CA, at chamber opening, produced lower ethylene rate with 2.0 kPa CO<sub>2</sub> compared to lower levels of this gas, likely because of the lower metabolism of these fruits during storage in higher CO<sub>2</sub> levels. However, two days later the ethylene production was higher in fruits that were stored in this level of CO<sub>2</sub>. So, this result showed that, even in ideal CO<sub>2</sub> levels, the storage in standard CA is not effective in reduction the ethylene production during shelf life of the fruits. In the evaluation made at the fourth and sixth days of shelf life (Fig. 1C and 1D) there were no interactions between the factors, however, ethylene production was always substantially lower in the fruits stored in DCA, especially in RQ-DCA. Results reported herein confirm the beneficial effect of these storage

conditions, by maintaining very low the ethylene production of the fruits, even after removal from cold storage and maintenance at room temperature for the entire period of shelf life.

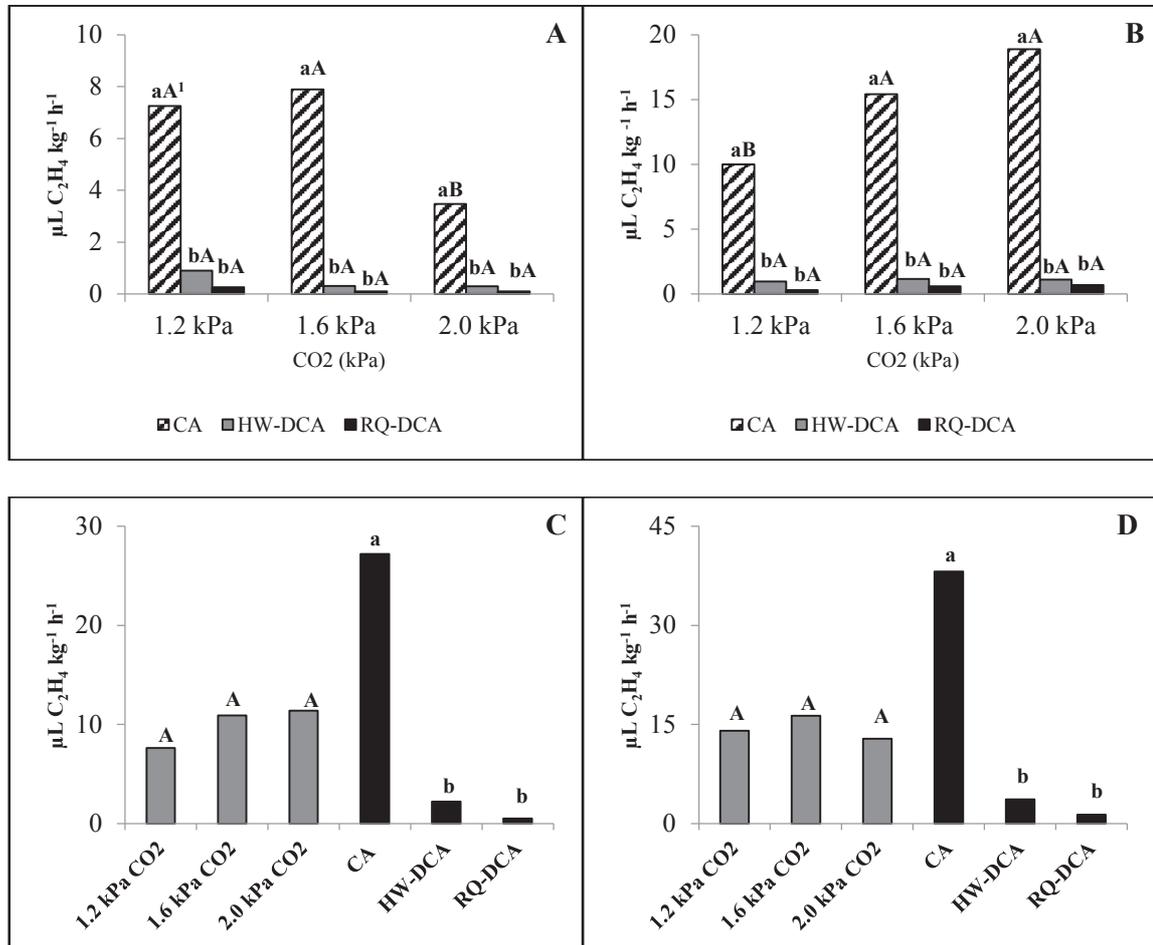


Figure 1 - Ethylene production during shelf life of 'Galaxy' apples after 9 months storage in Controlled Atmosphere or Dynamic Controlled Atmosphere (A= 1/2 day; B = 2 days; C = 4 days and D = 6 days shelf life at 20 °C).

<sup>1</sup>Means separation at 5% level (Tukey's test); capital letters between mean values in the same storage atmosphere, small letters between means in the same CO<sub>2</sub> level.

#### 5.1.4. Conclusions

The storage in RQ-DCA is more efficient in keeping the flesh firmness of 'Galaxy' apple compared to HW-DCA. RQ-DCA is a promising method for apple storage, however, CO<sub>2</sub> levels should not exceed 1.6 kPa for storage of this apple cultivar. In the storage of apple in standard CA there are beneficial effects of high CO<sub>2</sub> levels in quality maintenance. These

results showed an opposite behavior of storage in DCA, likely due to the additional effect of extremely low levels of O<sub>2</sub> and high CO<sub>2</sub> that can be led to CO<sub>2</sub> damage in the fruits. Apple storage in DCA maintain the ethylene production lower than of apples stored and standard CA, and this low ethylene production remain during the entire shelf life period, helping to maintain the fruit quality.

#### 5.1.5 Literature cited

- Brackmann, A. Mello, A.M., Freitas, S.T., Vizzotto, M. and Steffens, C.A. 2001. Armazenamento de maçãs ‘Royal Gala’ sob diferentes temperaturas e pressões parciais de oxigênio e gás carbônico. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 23:532-536.
- DeLong, J.M., Prange, R.K., Leyte, J.C. and Harrison, P.A. 2004. A new technology that determines low-oxygen thresholds in controlled-atmosphere-stored apples. *HortTechnol*. 14:262-266.
- Lelièvre, J.M., Latché, A., Jones, B., Bouzayen, M. and Pech, J.C. 1997. Ethylene and fruit ripening. *Physiol. Plant*. 101:727-739.
- Prange, R.K., DeLong, J.M. and Harrison, P.A. 2002. Oxygen concentration affects chlorophyll fluorescence in Chlorophyll-containing fruit. *Postharvest Biol. Technol*. 24:201-205.
- Watkins, C.B. 2008. Dynamic Controlled Atmosphere Storage – A new technology for the New York storage industry? *New York Fruit Quarterly*. 16:23-26.
- Zanella, A., Cazzanelli, P., Panarese, A., Coser, M., Cecchinell, M. and Rossi, O. 2005. Fruit fluorescence response to low oxygen stress: modern storage technologies compared to 1-MCP treatment of apple. *Acta Hort*. 682:1535-1542.

## 6 ARTIGO 4

### 6.1 Armazenamento de maçãs ‘Fuji Kiku’ em Atmosfera Controlada Dinâmica com alto CO<sub>2</sub> e aplicação de 1-MCP

#### Resumo

Novas técnicas no armazenamento de maçãs permitem monitorar o limite mínimo de O<sub>2</sub> tolerado pelos frutos, mantendo a pressão parcial deste gás bem abaixo do usual, preservando a qualidade. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a utilização da atmosfera controlada dinâmica pela técnica do quociente respiratório (ACD-QR) no armazenamento de maçãs ‘Fuji Kiku’, a necessidade de aplicação de 1-metilciclopropeno (1-MCP) e a tolerância desta cultivar a diferentes níveis de CO<sub>2</sub> durante o armazenamento em ACD-QR. Os frutos foram armazenados durante nove meses, na temperatura de -0,5 °C, em atmosfera controlada (AC), com 1,0 kPa de O<sub>2</sub> e dois níveis de ACD-QR: 1,5 e 1,7. Para cada condição foram utilizados dois níveis de CO<sub>2</sub>: 0,8 e 1,4 kPa e, para todas as condições, um grupo de frutos foi armazenado com e outro sem aplicação de 1-MCP. A ACD-QR foi mais eficiente que a AC para conservar maçãs ‘Fuji’ durante o armazenamento prolongado, em função da menor pressão parcial de O<sub>2</sub> utilizada, que resultou em menor metabolismo. Com QR 1,7 ocorreu maior produção de compostos da fermentação, mas sem prejuízo à qualidade dos frutos. A pressão parcial de 1,4 kPa de CO<sub>2</sub> não aumentou a ocorrência de distúrbios durante o armazenamento em ACD-QR, sendo uma condição desejável, pelo menor gasto de energia elétrica com funcionamento de equipamentos de adsorção deste gás nas câmaras comerciais de armazenamento. A aplicação de 1-MCP não foi benéfica para a manutenção da qualidade das maçãs ‘Fuji Kiku’, por provocar o aumento da ocorrência de podridões nos frutos.

**Palavras-chave:** Quociente respiratório. Compostos da fermentação. Distúrbios. Etileno.

### Abstract

The use of new techniques in the apple storage, allow to monitor the lowest oxygen limit tolerated by the fruit, keeping the O<sub>2</sub> partial pressure far below the usual, to ensure quality. The aim of this study was to evaluate the use of dynamic controlled atmosphere by respiratory quotient technique (DCA-RQ) in the storage of 'Fuji Kiku' apples, 1-methylcyclopropene (1-MCP) application and the CO<sub>2</sub> tolerance of this cultivar during storage in DCA-RQ. The fruits were stored for nine months, at temperature of -0.5°C, in a controlled atmosphere (CA) with 1.0 kPa O<sub>2</sub> and two DCA-RQ levels: 1.5 and 1.7. For each storage condition, were used two CO<sub>2</sub> levels: 0.8 and 1.4 kPa, and one group of fruits was stored with and the other without 1-MCP application. DCA-RQ was more efficient compared to CA in quality maintenance of 'Fuji' apples after long-term storage, due to the lower oxygen level employed, which resulted in lower fruit metabolism. There are higher fermentative compounds production in QR 1.7, but without quality losses. The CO<sub>2</sub> partial pressure of 1.4 kPa does not increase physiological disorders during DCA-RQ storage. This is a desirable condition, because it may save energy with lower CO<sub>2</sub> adsorption in commercial storage chambers. 1-MCP is not beneficial to maintaining the quality of 'Fuji Kiku' apples, by increasing fruit decay.

**Keywords:** Respiratory quotient. Fermentative compounds. Disorders. Ethylene.

#### 6.1.1 Introdução

A maçã 'Fuji Kiku', uma mutação natural da cultivar 'Fuji' descoberta no Japão na década de 1990, apresenta coloração vermelha mais intensa da epiderme, inclusive no lado sombreado (GÓMEZ, 2005), portanto, de boa aceitação pelo consumidor. As maçãs do grupo da Fuji são colhidas tardiamente na região sul, centro de produção do Brasil, o que permite que sejam armazenadas por um período prolongado para serem ofertadas ao consumidor até o início da colheita das cultivares precoces da safra seguinte.

O armazenamento em atmosfera controlada (AC), em que são controladas as pressões parciais de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, permite o armazenamento da maçã 'Fuji' por até oito meses (BRACKMANN et al., 2005), entretanto, nesta forma de armazenamento ainda ocorrem perdas decorrentes de podridões e distúrbios nos frutos. No armazenamento em AC a

concentração de O<sub>2</sub>, por segurança, é mantida acima do que seria o ideal para reduzir ao mínimo o metabolismo, pois o O<sub>2</sub> excessivamente baixo ou CO<sub>2</sub> alto também podem provocar distúrbios. As maçãs do grupo da Fuji são consideradas suscetíveis a altos níveis de CO<sub>2</sub> durante o armazenamento (ARGENTA et al., 2002; LUMPKIN et al., 2015), tendo como sintomas escurecimento da polpa e aparecimento de cavernas (CASTRO et al., 2007 LAU, 1998).

O local de produção também pode influenciar na ocorrência de danos nos frutos. Para maçãs 'Fuji', temperaturas médias baixas durante o desenvolvimento dos frutos aumentam a suscetibilidade à degenerescência de polpa, durante o armazenamento em atmosfera controlada, especialmente em alto CO<sub>2</sub> (CORRÊA et al., 2010). Maçãs 'Braeburn', cultivadas nas condições climáticas brasileiras, também foram menos suscetíveis à degenerescência no armazenamento com alto CO<sub>2</sub> em relação às maçãs produzidas em países de clima mais frio (BRACKMANN et al., 2002).

As variações de clima, solo e safras podem alterar a tolerância dos frutos aos níveis limites de gases durante o armazenamento em AC. Portanto, necessita-se buscar técnicas que possam monitorar o estresse causado nos frutos pela concentração inadequada de gases, em tempo real, de forma rápida e que possam ser acessadas sem abrir as câmaras de AC. Dentre estas a mais utilizada e difundida é a atmosfera controlada dinâmica que utiliza a técnica da fluorescência de clorofilas (ACD-FC) da epiderme de uma amostra de frutos expostos ao baixo O<sub>2</sub> (GASSER et al., 2008; KÖPCKE, 2015; TRAN, et al., 2015). Porém nesta forma de armazenamento o nível de oxigênio na câmara é reduzido inicialmente até ocorrer um pico de fluorescência (estresse), com posterior aumento da concentração deste gás em 0,2% permanecendo assim até o final do armazenamento. Portanto, algumas vezes não é observado incremento na manutenção da qualidade, como firmeza de polpa e acidez em comparação com AC convencional, apesar da vantagem de proporcionar um monitoramento mais confiável do produto armazenado (TRAN et al., 2015).

Outra forma de monitoramento dos frutos durante o armazenamento em ACD é pela avaliação do quociente respiratório dos frutos (QR). Os frutos permanecem em uma minicâmara hermética por um determinado período e o QR é calculado em função do acúmulo de CO<sub>2</sub> e consumo de O<sub>2</sub> resultante da respiração dos frutos neste período. O monitoramento do QR permite detectar a transição da rota de respiração aeróbica para anaeróbica (GASSER et al., 2008), quando valores maiores que um (1,0) indicam o deslocamento para rota anaeróbica. Portanto, o que se busca com esta técnica é reduzir o nível de oxigênio próximo aos valores mínimos tolerados pelos frutos, chamado de ponto de

compensação anaeróbica (KÖPCKE, 2015), a fim de reduzir o metabolismo. O armazenamento de maçãs ‘Royal Gala’ por oito meses em ACD-QR apresentou resultados superiores ao armazenamento em AC convencional, sendo o QR 2,0 o mais adequado, enquanto que QR maiores podem causar risco de danos por fermentação (WEBER et al., 2015). Portanto, é preciso avaliar esta técnica de armazenamento também para outras cultivares, a exemplo da Fuji, e verificar também o comportamento da maçã em diferentes concentrações de CO<sub>2</sub> nas câmaras.

O CO<sub>2</sub> é produzido pela respiração dos frutos e acumula nas câmaras de armazenamento, necessitando de equipamentos para sua absorção. Baixas concentrações deste gás exigem um investimento maior em adsorvedores de CO<sub>2</sub> e maior gasto com energia elétrica para o funcionamento do equipamento. Não existe ainda um estudo para os níveis adequados de CO<sub>2</sub> no armazenamento em ACD pelo método do QR, entretanto a recomendação geral para o armazenamento em ACD é de que seja mantida a mesma proporção de O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> utilizada em AC convencional (ZANELLA et al., 2008). Entretanto, Köpcke (2015) utilizou em ACD a mesma concentração de CO<sub>2</sub> que foi utilizada em AC e observou redução de escurecimento interno de maçãs ‘Elstar’.

Outra técnica utilizada para prolongar o armazenamento de maçãs é a aplicação de 1-metilciclopropeno (1-MCP), que inibe a ação do etileno. Entretanto, este composto pode apresentar reações adversas, a exemplo do aumento e severidade de escurecimento interno em maçãs ‘Empire’ armazenadas em AC (JUNG; WATKINS, 2011) e incremento de dano externo por CO<sub>2</sub> em maçãs ‘McIntosh’ (NOCK; WATKINS, 2013). Além disso, o efeito do 1-MCP, da ACD ou a combinação de ambos dependem da cultivar e da temperatura de armazenamento (KÖPCKE, 2015).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi comparar o armazenamento de maçãs ‘Fuji Kiku’ em AC convencional com ACD-QR, a necessidade de aplicação de 1-MCP nestas condições, bem como a tolerância a níveis mais altos de CO<sub>2</sub> durante o armazenamento buscando economia de energia elétrica com sistemas de absorção deste gás.

### 6.1.2 Material e Métodos

Maçãs ‘Fuji Kiku’ foram colhidas em um pomar comercial no município de Vacaria-RS, sendo em seguida transportadas até a Universidade Federal de Santa Maria, onde foram

selecionadas para descarte daquelas com danos mecânicos ou defeitos graves. Após, foram coletados frutos de forma aleatória para formar as unidades experimentais (4 repetições/tratamento, com 30 frutos cada). Estas foram acondicionadas em minicâmaras herméticas de 230 litros, onde foi controlado o nível dos gases da atmosfera controlada (AC) e estabelecido o quociente respiratório (QR). As minicâmaras permaneceram dentro de uma câmara frigorífica maior, onde foi controlada a temperatura, por meio de termostatos eletrônicos e conferida diariamente por um termômetro com de bulbo de mercúrio inserido na polpa de um fruto. No interior das minicâmaras a temperatura foi de  $-0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e a umidade relativa de  $95 (\pm 1,0\%)$ .

No momento da instalação dos experimentos, os frutos apresentavam índice iodo-amido de 9,18 (escala de 1-10); acidez titulável de  $4,76\text{ meq }100\text{mL}^{-1}$ ; sólidos solúveis totais de 14,6 °Brix; firmeza de polpa de 67 N; atividade da enzima ACC oxidase de  $58,3\text{ nL C}_2\text{H}_4\text{ g}^{-1}\text{ h}^{-1}$ ; produção de etileno de  $0,38\text{ }\mu\text{L C}_2\text{H}_4\text{ kg}^{-1}\text{ h}^{-1}$  e atividade respiratória de  $7,58\text{ mL CO}_2\text{ kg}^{-1}\text{ h}^{-1}$ .

Os tratamentos adotados neste experimento consistiram de três formas de armazenamento: [1] atmosfera controlada convencional, com 1,0 kPa de  $\text{O}_2$  (AC); [2] atmosfera controlada dinâmica com quociente respiratório de 1,5 (ACD-QR 1,5) e [3] ACD-QR com quociente respiratório de 1,7 (ACD-QR 1,7). Para as três formas de armazenamento foram utilizados dois níveis de  $\text{CO}_2$ : 1,4 e 0,8 kPa e, para cada uma destas condições, foi aplicado 1-metilciclopropeno (1-MCP) aos frutos e outro grupo foi armazenado sem a aplicação do produto.

Todos os frutos permaneceram durante cinco dias na temperatura de  $5,0\text{ }^{\circ}\text{C}$  e em atmosfera convencional. No sexto dia, a temperatura foi reduzida para  $-0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , permanecendo assim durante os nove meses de armazenamento. Também neste dia a pressão parcial de  $\text{O}_2$  foi reduzida para 5,0 kPa, por meio da varredura das minicâmaras com  $\text{N}_2$ . A partir deste dia, o nível de oxigênio foi reduzindo gradativamente até a pressão parcial estipulada para cada tratamento, em função do consumo de  $\text{O}_2$  e produção de  $\text{CO}_2$  como resultado da respiração dos frutos. Durante todo o período de armazenamento, o  $\text{CO}_2$  em excesso foi absorvido através da circulação do ar das minicâmaras por um recipiente contendo cal hidratada ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ). Para corrigir a concentração de  $\text{O}_2$  foi injetado ar do ambiente nas minicâmaras, até a concentração desejada. O monitoramento da concentração dos gases ( $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$ ) foi realizado por um analisador da marca Siemens Ultramat-23.

Para o cálculo do QR foi utilizado o mesmo analisador de gases, que possui duas casas decimais após a vírgula. Foram utilizadas minicâmaras de 230 litros, com uma proporção de

frutos de  $270 \text{ kg m}^{-3}$ , simulando a quantidade de frutos em câmaras comerciais. Foram mensurados os valores de  $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$  de cada minicâmara que, em seguida, permaneceu fechada por mais 14 horas sem correção do nível dos gases, quando então foi realizada uma nova determinação dos gases. Em função da produção de  $\text{CO}_2$  e consumo de  $\text{O}_2$  durante este período, foi calculado o QR. Quando o QR estava de acordo com o desejado, a pressão parcial de  $\text{O}_2$  do sistema de controle automático não era alterado, porém, se estava abaixo ou acima do valor estipulado o nível de  $\text{O}_2$  era reduzido ou aumentado, respectivamente, a fim de obter o QR ideal. Esta nova concentração de  $\text{O}_2$  era informada ao sistema automático de controle de AC, a fim de manter o oxigênio neste nível por mais três dias, quando era realizada nova determinação QR e ajuste do nível de  $\text{O}_2$ . A pressão parcial de  $\text{CO}_2$  permaneceu constante durante todo o período de armazenamento para cada condição, sendo o  $\text{O}_2$  ajustado a fim de manter o QR constante e conforme estipulado para cada tratamento. Assim, foi possível manter os frutos em pressão parcial extremamente baixa de  $\text{O}_2$  durante o armazenamento. As médias de  $\text{O}_2$  durante o período de armazenamento foram de 0,19; 0,24; 0,22 e 0,27 kPa, para o armazenamento em QR 1,7/1,4 kPa  $\text{CO}_2$ ; QR 1,7/0,8 kPa  $\text{CO}_2$ ; QR 1,5/1,4 kPa  $\text{CO}_2$  e QR 1,5/0,8 kPa  $\text{CO}_2$ , respectivamente (Figura 1).

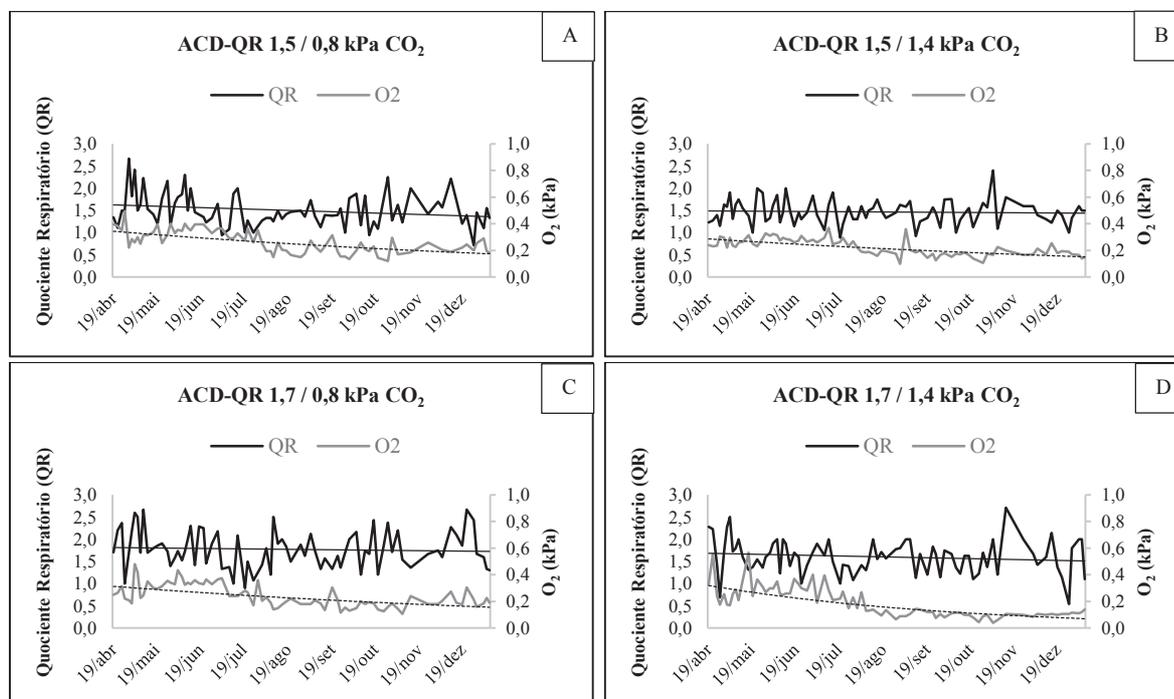


Figura 1 - Quociente respiratório e pressão parcial de  $\text{O}_2$  durante o armazenamento de maçãs 'Fuji Kiku' em ACD-QR de 1,5 (A e B) e 1,7 (C e D) com 0,8 kPa de  $\text{CO}_2$  (A e C) e com 1,4 kPa de  $\text{CO}_2$  (B e D).

A aplicação de 1-MCP foi realizada no início da instalação do experimento, na temperatura de 5,0 °C. Foi utilizado o produto SmartFresh<sup>®</sup>, na concentração de 625 ppb de princípio ativo. O produto em pó foi solubilizado em água destilada e em seguida vertido em uma placa de Petri no interior das minicâmaras, hermeticamente fechadas, a fim ocorrer a volatilização e reação do produto com os frutos. Os frutos ficaram expostos ao produto por 24 horas, quando as minicâmaras foram ventiladas com ar externo, antes de serem abertas para retirada dos frutos. Em seguida estes frutos foram acondicionados em diferentes minicâmaras, para obter as condições de armazenamento previstas nos diferentes tratamentos.

Após nove meses de armazenamento, os frutos foram retirados das minicâmaras, permanecendo por mais sete dias a 20 °C, quando foram realizadas as análises finais de qualidade. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

a) *Concentração interna de etileno (CIE)*: a determinação foi baseada na metodologia proposta Mannapperuma et al. (1991), onde o ar do interior dos frutos foi removido com o auxílio de uma bomba de vácuo, com 565 mm Hg de pressão negativa, ligada por 2 minutos. Esta bomba removia ar do interior de um frasco com água onde os frutos foram acondicionados. O ar retirado do interior dos frutos ficava acumulado em um funil invertido colocado sobre os mesmos. Do gás removido dos frutos foram injetadas amostras de 1 mL em um cromatógrafo a gás, marca Varian<sup>®</sup> modelo Star 3400CX, equipado com um detector por ionização em chama (FID) e coluna Porapak N80/100 de dois metros de comprimento, com temperatura da coluna, injetor e detector de 90; 140 e 200 °C, respectivamente. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ L}^{-1}$ .

b) *Atividade da enzima ACC oxidase*: de acordo com metodologia de Bufler (1986), foram retirados 3 g da epiderme dos frutos, que reagiram por 30 min em uma solução contendo 5 mL de ACC (0,1 mM) com 5 mL de tampão MES (ácido 2 (N-morfolino) etanossulfônico) (10mM) em pH 6,0. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em seringas herméticas de 50 mL de volume, nas quais foram adicionados 2% de CO<sub>2</sub>, onde permaneceram por 30 minutos. Após, foi determinada, por cromatografia gasosa (método descrito acima), a concentração de etileno presente nas seringas e calculada a atividade desta enzima, com os dados expressos em  $\text{nL C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ;

c) *Produção de etileno*: realizada após a abertura das câmaras (aproximadamente 12 horas) e após 6 dias a 20 °C. Aproximadamente 1.500 g de frutos foram acondicionados em recipientes de vidro com volume de 5.000 mL e fechados hermeticamente. Após duas horas a 20 °C, foram retiradas duas amostras de 1 mL de ar do *headspace* de cada recipiente, que foram imediatamente injetadas no cromatógrafo descrito acima. A produção de etileno foi calculada

em função da concentração deste gás no recipiente, da massa dos frutos, do volume do espaço livre no recipiente e do tempo de fechamento, sendo expresso em  $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

d) *Respiração*: avaliação realizada com os mesmos frutos durante a análise da produção de etileno. Para tanto, o ar dos recipientes foi circulado por um analisador de gases da marca Schele® e a respiração dos frutos foi determinada em função da massa de frutos no recipiente, tempo de fechamento, volume de espaço livre e concentração de  $\text{CO}_2$  e os resultados expressos em  $\text{mL CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$

e) *acetaldeído*; f) *etanol*; g) *acetato de etila*: baseado na metodologia proposta por Saquet & Streif (2008) com algumas modificações. Foram acondicionados 10 mL de suco dos frutos de cada repetição em frascos de Vial de 20 mL, que foram imediatamente fechados e congelados a temperatura de  $-30\text{ }^\circ\text{C}$  para posterior análise. Após descongelamento, os frascos foram aquecidos até  $70\text{ }^\circ\text{C}$  por 30 minutos, quando foi retirado 0,1 mL do *headspace* dos frascos e injetado em um cromatógrafo Dani, equipado com coluna DN-WAX, na temperatura de  $60\text{ }^\circ\text{C}$  e detector FID (ionização em chama), operando a  $250\text{ }^\circ\text{C}$ . As concentrações foram calculadas a partir da área do pico de cada composto, usando soluções padrão e os resultados expressos em  $\mu\text{L L}^{-1}$ ;

h) *Firmeza de polpa*: foi retirada parte da epiderme na região equatorial dos frutos, em lados opostos, onde os mesmos foram perfurados com a ponteira de 11 mm de um penetrômetro da marca Effegi e os resultados expressos em Newton (N);

i) *Acidez titulável total*: determinada pela titulação, com NaOH 0,1N, de uma solução contendo 10 mL de suco dos frutos, diluídos em 100 mL de água deionizada, até atingir pH 8,1. Os valores foram expressos em  $\text{meq } 100 \text{ mL}^{-1}$ ;

j) *Degenerescência de polpa*: determinada através de análise visual quanto ao escurecimento da polpa de cortes transversais na região equatorial dos frutos, sintoma característico de degenerescência. Foi realizada uma contagem dos frutos com danos e os resultados foram expressos em porcentagem;

k) *Cavernas internas*: na mesma avaliação da degenerescência foram contados e anotados os frutos que apresentavam cavernas na polpa dos frutos. Dados apresentados em porcentagem;

l) *Podridões*: avaliação visual dos frutos que apresentavam sintoma externo de incidência de podridão com lesão igual ou maior que 5 mm de diâmetro e/ou podridão de miolo. Foi realizada a contagem dos frutos e calculada a porcentagem para cada repetição.

m) *Frutos sadios*: pela contagem do total de frutos com ausência de problemas com podridões ou distúrbios, tanto internos como externos, estando estes aptos à comercialização. Os resultados foram expressos em porcentagem.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema trifatorial (3 formas de armazenamento x 2 níveis de CO<sub>2</sub> x aplicação ou não de 1-MCP). Os dados foram testados quanto à normalidade, sendo que aqueles que não apresentavam distribuição normal foram transformados pela fórmula arco-seno  $((x + 0,5)/100)^{1/2}$  antes da análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 6.1.3 Resultados e Discussão

A concentração interna de etileno (CIE) foi determinada logo após a abertura das câmaras, portanto, representa a atividade metabólica em que os frutos se encontravam no período final do armazenamento. O armazenamento em ACD-QR 1,5 e 1,7 mantém baixa a CIE em todas as combinações avaliadas, comparado com AC convencional. O alto CO<sub>2</sub> reduz a CIE apenas em AC, sendo que em ACD não houve diferença entre os dois níveis de CO<sub>2</sub> (Tabela 1). O efeito de altas pressões parciais de CO<sub>2</sub> pode ser consequência do menor conteúdo de ACC e atividade da enzima ACC sintase nesta condição de armazenamento (BUFLER; STREIF, 1986). Para os fatores formas de armazenamento e aplicação de 1-MCP também houve interação dupla significativa. A aplicação de 1-MCP reduziu a CIE apenas dos frutos armazenados em AC, sendo que em ACD-QR não houve diferença entre os frutos que receberam ou não a aplicação do produto. Isso demonstra que em ACD-QR, por utilizar pressão parcial extremamente baixa de O<sub>2</sub>, a produção de etileno pelos frutos durante o armazenamento é reduzida de forma similar à aplicação de 1-MCP. Quando o QR é maior que 1,0, está ocorrendo metabolismo fermentativo nos frutos, com produção de etanol e acetaldeído (Tabela 4). Estes compostos, quando aplicados de forma exógena aos frutos, reduzem a produção de etileno (ASODA et al., 2009; WEBER, 2010) e a CIE (LIU et al., 2012).

Os níveis de CO<sub>2</sub> não influenciaram na atividade da enzima ACC oxidase, porém a aplicação de 1-MCP reduziu drasticamente sua atividade em todas as condições de armazenamento (Tabela 1). A aplicação de 1-MCP atua sobre a atividade da enzima ACC oxidase inibindo a expressão gênica de *MdACO1* (WAKASA et al., 2006; TATSUKI et al., 2007). Ainda com relação à atividade da ACC oxidase, ocorreu interação dupla significativa entre os fatores formas de armazenamento x aplicação de 1-MCP. Quando foi aplicado 1-MCP não houve diferença significativa para a atividade da ACC oxidase entre AC e os dois

níveis de ACD-QR. Entretanto, sem a aplicação deste composto a atividade da enzima foi significativamente inferior quando foi utilizado o armazenamento em ACD-QR, com QR 1,5 ou 1,7. A menor atividade da enzima nesta condição possui relação com a menor CIE destes frutos, uma vez que o aumento da expressão gênica da *MdACO1* depende da presença de etileno (TATSUKI et al., 2007). Além disso, o etanol produzido pelos frutos nesta condição de armazenamento (Tabela 4) também pode afetar a expressão gênica desta enzima, como observado em brócolis com aplicação exógena de etanol (ASODA et al., 2009).

Tabela 1 - Concentração interna de etileno na abertura das câmaras e atividade da enzima ACC oxidase após sete dias a 20°C de maçãs ‘Fuji Kiku’ armazenadas por nove meses em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pelo quociente respiratório (QR) de 1,5 ou 1,7, com dois níveis de CO<sub>2</sub> e com ou sem aplicação de 1-MCP.

Tratamento	Concentração Interna de Etileno ( $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ L}^{-1}$ )			
	AC**	QR 1,5	QR 1,7	Média
0,8 kPa CO <sub>2</sub>	5,85 aA*	1,33 aB	0,63 aB	2,60
1,4 kPa CO <sub>2</sub>	3,88 bA	0,75 aB	0,46 aB	1,70
Média	4,87	1,04	0,55	
Sem 1-MCP	6,81 aA	1,18 aB	0,53 aB	2,84
Com 1-MCP***	2,92 bA	0,90 aB	0,56 aB	1,46
Média	4,87	1,04	0,55	
	0,8 kPa CO <sub>2</sub>		1,4 kPa CO <sub>2</sub>	
Sem 1-MCP	3,34		2,34	2,84 a
Com 1-MCP	1,87		1,07	1,46 b
Média	2,60 A		1,70 B	
CV (%)		40,1		
----- Atividade da ACC oxidase ( $\text{nL C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) -----				
	AC	QR 1,5	QR 1,7	Média
0,8 kPa CO <sub>2</sub>	80,1	35,4	24,4	46,6 a
1,4 kPa CO <sub>2</sub>	72,5	32,5	25,1	43,4 a
Mean	76,3 A	34,0 B	24,7 B	
Sem 1-MCP	143,9 aA	52,8 aB	42,2 aB	79,7
Com 1-MCP	8,7 bA	15,1 bA	7,2 bA	10,3
Média	76,3	34,0	24,7	
	0,8 kPa CO <sub>2</sub>		1,4 kPa CO <sub>2</sub>	
Sem 1-MCP	83,3		76,0	79,7 a
Com 1-MCP	9,9		10,8	10,3 b
Média	46,6 A		43,4 A	
CV (%)		24,2		

\*Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey a 5% probabilidade de erro.

\*\*AC com 1,0 kPa O<sub>2</sub>.

\*\*\* 1-Metilciclopropeno (0,625  $\mu\text{L L}^{-1}$ ).

A menor CIE nos frutos armazenados em alto CO<sub>2</sub>, em ACD-QR e naqueles que receberam 1-MCP, está associada com a menor produção de etileno nos frutos na avaliação da saída da câmara (Tabela 2), uma vez que o etileno presente no ambiente estimula a sua produção autocatalítica (BUFLER; STREIF, 1986). Na interação dupla significativa entre formas de armazenamento e aplicação de 1-MCP, observa-se que quando foi aplicado este produto não houve diferença entre o armazenamento em AC e ACD-QR. Por outro lado, sem a aplicação de 1-MCP, a produção de etileno foi significativamente superior em AC convencional, evidenciando o efeito benéfico da ACD em reduzir a produção de etileno e o metabolismo dos frutos, concordando com resultados obtidos por Weber et al. (2015). Na comparação da aplicação de 1-MCP dentro de cada condição de armazenamento, constata-se que apenas em AC convencional houve maior produção de etileno para os frutos sem 1-MCP, enquanto que nas duas condições de ACD-QR a produção de etileno não diferiu estatisticamente entre frutos tratados e não tratados, evidenciando que com este método de armazenamento não seria necessário aplicar 1-MCP aos frutos para o controle do etileno.

Após seis dias de exposição a 20 °C, a produção de etileno apresentou a mesma tendência que na abertura das câmaras, apenas com valores mais elevados para todos os tratamentos, com exceção do nível de CO<sub>2</sub>, que nesta avaliação não houve diferença significativa (Tabela 2). Pode-se constatar ainda que o armazenamento em ACD-QR mantém baixa a produção de etileno durante todo o período de prateleira dos frutos, sem necessidade de aplicar 1-MCP, pois mesmo após seis dias a 20 °C não há diferença significativa entre frutos tratados ou não tratados tanto em ACD-QR de 1,5 e 1,7. No armazenamento em ACD-QR, em que o metabolismo fermentativo é estimulado, a produção de etileno pode ser reduzida por dois meios: pela menor expressão gênica para a enzima ACC oxidase ou pela necessidade de um determinado nível de O<sub>2</sub> para a atividade desta enzima converter o ACC a etileno (BUFLER; STREIF, 1986). De acordo com estes autores o K<sub>M</sub> de O<sub>2</sub> para a atividade da ACC oxidase, em maçãs 'Golden Delicuos', é de 1,3%, na temperatura de 20 °C. Este valor é bem superior ao utilizado em ACD-QR no presente trabalho. Entretanto, como esta análise de etileno foi realizada depois de seis dias de exposição à atmosfera ambiente e, portanto, rica em O<sub>2</sub>, provavelmente a primeira hipótese seja a mais adequada para a menor produção de etileno, o que também explica a menor atividade da ACC oxidase nesta condição de armazenamento.

Tabela 2 - Produção de etileno na abertura das câmaras e após seis dias a 20 °C de maçãs 'Fuji Kiku' armazenadas por nove meses em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pelo quociente respiratório (QR) de 1,5 ou 1,7, com dois níveis de CO<sub>2</sub> e com ou sem aplicação de 1-MCP.

Tratamento	Produção de de Etileno ½ dia a 20 °C (µL C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )			
	AC**	QR 1,5	QR 1,7	Média
0,8 kPa CO <sub>2</sub>	1,11	0,17	0,13	0,47 a
1,4 kPa CO <sub>2</sub>	0,88	0,07	0,15	0,37 b
Média	1,00 A*	0,12 B	0,14 B	
Sem 1-MCP	1,91 aA	0,15 aB	0,19 aB	0,75
Com 1-MCP***	0,09 bA	0,08 aA	0,09 aA	0,09
Média	1,00	0,12	0,14	
	0,8 kPa CO <sub>2</sub>		1,4 kPa CO <sub>2</sub>	
Sem 1-MCP	0,85		0,65	0,75 a
Com 1-MCP	0,10		0,08	0,09 b
Média	0,47 A		0,37 B	
CV (%)		32,0		
----- Produção de Etileno 6 dias a 20°C (µL C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) -----				
	AC	QR 1,5	QR 1,7	Média
0,8 kPa CO <sub>2</sub>	2,21	0,59	0,60	1,13 a
1,4 kPa CO <sub>2</sub>	2,17	0,51	0,41	1,03 a
Mean	2,19 A	0,55 B	0,51 B	
Sem 1-MCP	3,95 aA	0,67 aB	0,67 aB	1,77
Com 1-MCP	0,43 bA	0,42 aA	0,35 aA	0,40
Média	2,19	0,55	0,51	
	0,8 kPa CO <sub>2</sub>		1,4 kPa CO <sub>2</sub>	
Sem 1-MCP	1,79		1,74	1,77 a
Com 1-MCP	0,47		0,33	0,40 b
Média	1,13 A		1,03A	
CV (%)		26,8		

\*Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey a 5% probabilidade de erro.

\*\*AC com 1,0 kPa O<sub>2</sub>.

\*\*\* 1-Metilciclopropeno (0,625 µL L<sup>-1</sup>).

Na análise da respiração dos frutos na saída da câmara não houve interação entre os fatores estudados, sendo, portanto, apenas comparadas as médias dos tratamentos. Para os dois níveis de CO<sub>2</sub> estudados, não houve diferença significativa quanto à respiração (Tabela 3), evidenciando que o alto CO<sub>2</sub>, apesar de manter menor produção de etileno na saída da câmara não foi eficiente em reduzir a respiração. Entretanto, após seis dias de exposição a 20 °C, houve menor respiração nos frutos armazenados em AC convencional e alto CO<sub>2</sub>. Assim, a pressão parcial de 1,4 kPa de CO<sub>2</sub> reduziu o metabolismo dos frutos durante o período de

prateleira. Este resultado está de acordo com Corrêa et al. (2010), que obtiveram diminuição da respiração com 2,0 kPa de CO<sub>2</sub> no armazenamento em AC convencional de maçãs ‘Fuji’, em comparação com < 0,5 kPa, apesar da maior ocorrência de degenerescência, porque a maçã ‘Fuji’ é suscetível ao alto CO<sub>2</sub> (LUMPKIN et al., 2015).

Tabela 3 - Respiração na abertura das câmaras e após seis dias a 20°C de maçãs ‘Fuji Kiku’ armazenadas por nove meses em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pelo quociente respiratório (QR) de 1,5 ou 1,7, com dois níveis de CO<sub>2</sub> e com ou sem aplicação de 1-MCP.

Tratamento	Respiração ½ dia a 20°C (mL CO <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )			Média
	AC**	QR 1,5	QR 1,7	
0,8 kPa CO <sub>2</sub>	5,37	4,08	4,05	4,50 a
1,4 kPa CO <sub>2</sub>	5,98	3,89	4,14	4,67 a
Média	5,68 A*	3,98 B	4,09 B	
Sem 1-MCP	6,09	4,28	4,28	4,88 a
Com 1-MCP***	5,27	3,69	3,91	4,29 b
Média	5,68 A	3,98 B	4,09 B	
CV (%)	12,3			
----- Respiração 6 dias a 20°C (mL CO <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) -----				
	AC	QR 1,5	QR 1,7	Média
0,8 kPa CO <sub>2</sub>	13,56 aA	7,98 aB	8,80 aB	10,12
1,4 kPa CO <sub>2</sub>	10,12 bA	7,59 aB	7,39 aB	8,37
Mean	11,84	7,79	8,10	
Sem 1-MCP	14,04 aA	8,19 aB	8,31 aB	10,18
Com 1-MCP	9,65 bA	7,38 aB	7,89 aAB	8,31
Média	11,84	7,79	8,10	
	0,8 kPa CO <sub>2</sub>	1,4 kPa CO <sub>2</sub>		
Sem 1-MCP	10,80	9,56		10,18 a
Com 1-MCP	9,43	7,18		8,31 b
Média	10,12 A	8,37 B		
CV (%)	14,1			

\*Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey a 5% probabilidade de erro.

\*\*AC com 1,0 kPa O<sub>2</sub>.

\*\*\* 1-Metilciclopropeno (0,625 µL L<sup>-1</sup>).

O armazenamento em ACD-QR manteve menor a respiração dos frutos comparado com o armazenamento em AC na saída da câmara, mantendo esta tendência durante o período de prateleira (Tabela 3). Resultados semelhantes foram observados por Weber et al. (2015), com menor respiração nos frutos armazenados em ACD-QR durante todo o período de prateleira, porém, apenas com QR = 2,0, sendo que em QR > 2,0 ocorreu aumento na

atividade respiratória. Portanto, parece que o menor metabolismo dos frutos ocorre com armazenamento em QR menor ou igual a 2,0. Uma baixa produção de CO<sub>2</sub>, em função da menor respiração dos frutos, é uma condição desejável durante o armazenamento, pelo menor acúmulo deste gás nas câmaras e, portanto, menor gasto de energia com sua absorção e também pela redução do risco de danos por CO<sub>2</sub> em cultivares suscetíveis (KÖPCKE, 2015).

A aplicação de 1-MCP também foi eficiente em reduzir a respiração, porém após seis dias a 20°C, apenas houve diferença significativa entre frutos com ou sem 1-MCP no armazenamento em AC convencional (Tabela 3). A exemplo da produção de etileno, o armazenamento em ACD-QR também reduziu a respiração durante o período de prateleira, sem a necessidade de aplicação de 1-MCP. A taxa respiratória dos frutos segue um padrão idêntico à produção de etileno, mesmo com a aplicação de 1-MCP (DEFILIPPI et al., 2004).

Os compostos da fermentação, como etanol e acetaldeído podem acumular durante o armazenamento em baixo O<sub>2</sub>, e alto CO<sub>2</sub> (SAQUET; STREIF, 2008). No presente trabalho, além dos compostos supracitados, também foi avaliado o acetato de etila, que não diferiu significativamente para nenhuma das combinações de formas de armazenamento, níveis de CO<sub>2</sub> e aplicação de 1-MCP (dados não apresentados). No entanto, houve alteração da produção de etanol e acetaldeído, em função das formas de armazenamento e níveis de CO<sub>2</sub>, com tendência semelhante para ambos os compostos (Tabela 4). Na média dos tratamentos, tanto o etanol como o acetaldeído estiveram presentes em concentrações mais elevadas quando foi utilizada a pressão parcial de 1,4 kPa de CO<sub>2</sub>, comparado com 0,8 kPa, demonstrando que esse nível mais alto de CO<sub>2</sub> induz ao metabolismo fermentativo nos frutos. Também houve interação dupla significativa entre formas de armazenamento x níveis de CO<sub>2</sub>. No armazenamento com 0,8 kPa de CO<sub>2</sub>, não houve diferença entre AC e ACD-QR de 1,5, sendo que em QR de 1,7 a produção de etanol e acetaldeído foi superior. Já com armazenamento em 1,4 kPa de CO<sub>2</sub>, ambas as formas de ACD (QR 1,5 e 1,7) estimularam o aumento da produção de compostos da fermentação em relação à AC. Da mesma forma, pode-se observar que em AC não houve diferença entre o armazenamento com 1,4 ou 0,8 kPa de CO<sub>2</sub>, enquanto que em ACD, na maioria dos casos, a presença de compostos da fermentação foi superior em 1,4 kPa de CO<sub>2</sub>, como resultado de um efeito conjunto entre baixo O<sub>2</sub> e alto CO<sub>2</sub> nestas condições. A presença de produtos de fermentação em pequenas quantidades na câmara de armazenamento é desejável, uma vez que retarda a maturação, por afetar a síntese de etileno (ASODA et al., 2009; LIU et al., 2012). No presente trabalho também foi possível estabelecer esta relação, pois igualmente houve menor produção e concentração interna de etileno nos frutos armazenados em ACD e com maior CO<sub>2</sub>. Por outro

lado, o excesso de fermentação pode levar ao acúmulo de etanol, acetaldeído e acetato de etila, podendo causar *off-flavour* e provocar danos aos frutos, como observado por Weber et al. (2015) com o armazenamento em QR > 4,0.

Tabela 4 - Produção de compostos da fermentação de maçãs 'Fuji Kiku' após nove meses de armazenamento em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pelo quociente respiratório (QR) de 1,5 ou 1,7, com dois níveis de CO<sub>2</sub> e com ou sem aplicação de 1-MCP, mais sete dias de prateleira a 20°C.

Tratamento	Produção de Etanol (μL L <sup>-1</sup> )			
	AC**	QR 1,5	QR 1,7	Média
0,8 kPa CO <sub>2</sub>	58,4 aB*	53,7 bB	171,2 bA	94,4
1,4 kPa CO <sub>2</sub>	44,1 aC	169,7 aB	269,6 aA	161,1
Média	51,2	111,7	220,4	
Sem 1-MCP	55,4	96,5	212,4	121,4 a
Com 1-MCP***	47,1	126,8	228,4	134,1 a
Média	51,2 C	111,7 B	220,4 A	
	0,8 kPa CO <sub>2</sub>		1,4 kPa CO <sub>2</sub>	
Sem 1-MCP	94,0		148,8	121,4 a
Com 1-MCP	94,8		173,4	134,1 a
Média	94,4 B		196,1 A	
CV (%)		37,6		
----- Produção de Acetaldeído (μL L <sup>-1</sup> ) -----				
	AC	QR 1,5	QR 1,7	Média
0,8 kPa CO <sub>2</sub>	5,74 aB	5,16 bB	8,53 aA	6,48
1,4 kPa CO <sub>2</sub>	4,43 aB	8,67 aA	9,59 aA	7,57
Mean	5,08	6,92	9,06	
Sem 1-MCP	5,91	6,27	8,85	7,01 a
Com 1-MCP	4,26	7,56	9,27	7,03 a
Média	5,08 C	6,92 B	9,06 A	
	0,8 kPa CO <sub>2</sub>		1,4 kPa CO <sub>2</sub>	
Sem 1-MCP	6,97		7,05	7,01 a
Com 1-MCP	5,98		8,08	7,03 a
Média	6,48 B		7,57 A	
CV (%)		26,1		

\*Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey a 5% probabilidade de erro.

\*\*AC com 1,0 kPa O<sub>2</sub>.

\*\*\* 1-Metilciclopropeno (0,625 μL L<sup>-1</sup>).

Com relação à manutenção da firmeza de polpa, as maçãs podem ser classificadas em dois grupos: aquelas que perdem rapidamente a firmeza e as que a conservam por um maior período após a colheita. Este último grupo, a qual pertence a maçã 'Fuji', possui menor

expressão gênica de *MdPG1*, que codifica para a enzima poligalacturonase (PG) (WAKASA et al., 2006). Isso pode justificar o menor efeito dos tratamentos sobre esta variável, observado no presente trabalho. A aplicação de 1-MCP não manteve a firmeza de polpa mais elevada em relação aos frutos sem aplicação do produto (Tabela 5). Da mesma forma, não houve diferença entre os frutos armazenados com 0,8 e 1,4 kPa de CO<sub>2</sub> quando armazenados em AC e ACD-QR de 1,5, discordando do resultado obtido por Corrêa et al. (2010) que verificaram maior firmeza de polpa na maçã ‘Fuji’ armazenada em AC e com pressão parcial de CO<sub>2</sub> mais elevada. Entretanto no armazenamento em ACD-QR de 1,7 houve maior manutenção da firmeza de polpa com 1,4 kPa de CO<sub>2</sub>, em relação a 0,8 kPa. Este resultado é interessante pela possibilidade de manter o CO<sub>2</sub> mais elevado nas câmaras de armazenamento, mesmo em ACD.

Com relação à forma de armazenamento, a condição de ACD-QR de 1,7 foi mais eficiente em manter a firmeza de polpa dos frutos em relação às demais condições, exceto quando foi utilizado 0,8 kPa de CO<sub>2</sub>, em que não diferiu da AC convencional (Tabela 5). Outros autores não verificaram diferença entre AC e ACD pelo método da fluorescência de clorofilas (TRAN et al., 2015). Nesta técnica de monitoramento o nível de oxigênio é mantido mais elevado, em torno de 0,4 a 0,7 kPa, comparado com valores próximos de 0,2 kPa, no presente trabalho. O amaciamento dos tecidos está relacionado com atividade de enzimas que degradam os componentes da parede celular, a exemplo da  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase e pectato liase, sendo que sua atividade é reduzida com o armazenamento em baixo O<sub>2</sub> (ORTIZ et al., 2011). De acordo com os autores, a ação do armazenamento em baixo O<sub>2</sub> sobre a atividade destas enzimas decorre primeiramente do atraso na maturação, proporcionado pela menor produção de etileno. Apesar de no presente trabalho a produção de etileno ter sido semelhante entre os dois tratamentos de ACD-QR, a firmeza de polpa foi superior com QR 1,7 em todas as situações. Isso sugere que exista outro evento auxiliando na manutenção da firmeza que não apenas a baixa produção de etileno, o que pode estar relacionado com o metabolismo fermentativo que é maior com QR 1,7 (Tabela 4). De acordo com Wakasa et al. (2006), a perda de firmeza também está relacionada a expressão gênica para a enzima poligalacturonase (PG), com menor expressão de *MdPG1*, em maçãs do grupo da ‘Fuji’, que conservam mais a firmeza após a colheita, independente da produção de etileno.

Os níveis de CO<sub>2</sub> utilizados durante o armazenamento não influenciaram na acidez dos frutos e houve interação significativa entre formas de armazenamento x aplicação de 1-MCP (Tabela 5). No armazenamento em AC, a aplicação de 1-MCP diminuiu o consumo de ácidos, que ocorre em função da redução da produção de etileno e do metabolismo respiratório destes

frutos, que receberam aplicação do produto. De acordo com Bai et al. (2005), para a maçã 'Fuji' não houve benefício na manutenção da acidez com aplicação de 1-MCP e armazenamento em AC. Resultado semelhante foi observado no presente trabalho apenas quando foi utilizado o armazenamento em ACD-QR, em que não houve diferença entre frutos tratados e não tratados com 1-MCP.

Tabela 5 - Firmeza de polpa e acidez total titulável de maçãs 'Fuji Kiku' após nove meses de armazenamento em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pelo quociente respiratório (QR) de 1,5 ou 1,7, com dois níveis de CO<sub>2</sub> e com ou sem aplicação de 1-MCP, mais sete dias de prateleira a 20°C.

Tratamento	Firmeza de Polpa (N)			
	AC**	QR 1,5	QR 1,7	Média
0,8 kPa CO <sub>2</sub>	70,4 aAB*	69,1 aB	72,0 bA	70,5
1,4 kPa CO <sub>2</sub>	68,6 aB	70,7 aB	75,5 aA	71,6
Média	69,5	69,9	73,8	
Sem 1-MCP	69,3	69,9	72,3	70,5 a
Com 1-MCP***	69,7	69,9	75,2	71,6 a
Média	69,5 B	69,9 B	73,8 A	
	0,8 kPa CO <sub>2</sub>		1,4 kPa CO <sub>2</sub>	
Sem 1-MCP	69,9		71,1	70,5 a
Com 1-MCP	71,1		72,1	71,6 a
Média	70,5 A		71,6 A	
CV (%)		3,07		
----- Acidez Total Titulável (meq 100 mL <sup>-1</sup> ) -----				
	AC	QR 1,5	QR 1,7	Média
0,8 kPa CO <sub>2</sub>	3,93	3,65	3,56	3,71 a
1,4 kPa CO <sub>2</sub>	3,85	3,79	3,65	3,76 a
Mean	3,89 A	3,72 B	3,60 B	
Sem 1-MCP	3,68 bA	3,64 aA	3,57 aA	3,63
Com 1-MCP	4,09 aA	3,80 aB	3,64 aB	3,84
Média	3,89	3,72	3,60	
	0,8 kPa CO <sub>2</sub>		1,4 kPa CO <sub>2</sub>	
Sem 1-MCP	3,60		3,67	3,63 b
Com 1-MCP	3,83		3,86	3,84 a
Média	3,71 A		3,76 A	
CV (%)		4,63		

\*Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey a 5% probabilidade de erro.

\*\*AC com 1,0 kPa O<sub>2</sub>.

\*\*\* 1-Metilciclopropeno (0,625 µL L<sup>-1</sup>).

Na comparação entre as formas de armazenamento, com exceção do tratamento sem 1-MCP, a utilização de AC sempre foi mais eficiente que o armazenamento em ACD-QR na preservação da acidez dos frutos (Tabela 5). Este resultado parece inconsistente pois os ácidos são consumidos pelo processo respiratório a fim de fornecer energia para as células (SWEETMAN et al., 2009), sendo que no armazenamento em AC a respiração foi maior que em ACD em todas as avaliações. Este fato necessita ser melhor investigado em trabalhos futuros, mas é possível que os ácidos sejam consumidos pela rota fermentativa nos frutos armazenados em ACD-QR. Em um experimento com mutantes da ‘Gala’ também foi observado que em temperatura mais elevada houve maior consumo de ácidos com armazenamento em menor pressão parcial de O<sub>2</sub>, provavelmente pela ativação do metabolismo fermentativo (WEBER et al., 2013). O metabolismo do ácido málico em maçãs é catalisada pela enzima málica NAD<sup>+</sup> dependente, que converte malato à piruvato, podendo ser este último convertido a acetaldeído e etanol (PALIYATH; MURR, 2008). Como em condições de armazenamento com baixo O<sub>2</sub> ocorre um acúmulo de compostos reduzidos, o NAD<sup>+</sup> (oxidado) poderia ser limitante também para esta reação. Entretanto, o fosfoenolpiruvato pode ser convertido em oxaloacetato pela enzima PEP carboxilase, sendo o oxaloacetato convertido à malato pela malato desidrogenase, utilizando NADH e suprindo NAD<sup>+</sup> para outras rotas (TAIZ; ZEIGER, 2009). Em pêssego sob anóxia também foi verificado que a enzima málica pode fornecer piruvato para a fermentação, consumindo malato. Entretanto, o *pool* de malato não foi modificado, provavelmente devido a um equilíbrio entre reações envolvidas em sua síntese e degradação (LARA et al., 2011). Em outras cultivares de maçã também foram encontrados dados inconsistentes para a acidez titulável com armazenamento em AC, ACD e aplicação de 1-MCP (KÖPCKE, 2015) e sem diferença entre AC e ACD, para este parâmetro (TRAN et al., 2015).

A maçã ‘Fuji’ é suscetível ao escurecimento interno durante o armazenamento em AC, o que é agravada em alto CO<sub>2</sub> (ARGENTA et al., 2012). No presente trabalho, este sintoma foi avaliado juntamente com outros danos que causaram o escurecimento da polpa, sendo todos reportados como degenerescência de polpa. Mesmo nas piores condições de armazenamento, estes danos afetaram menos de 2% dos frutos (Tabela 6). Para maçã ‘Braeburn’ cultivada nas condições climáticas brasileiras, também foi verificado menor dano por CO<sub>2</sub> no armazenamento em AC em relação aos países mais frios (BRACKMANN et al., 2002). Na comparação entre os dois níveis de CO<sub>2</sub> utilizados, apenas na ACD-QR de 1,5 houve maior degenerescência com 1,4 kPa de CO<sub>2</sub> e nos frutos sem aplicação de 1-MCP, sendo que quando foi utilizado 1-MCP o comportamento foi inverso, com menor dano na

maior concentração de CO<sub>2</sub>. Entretanto, sempre a porcentagem de frutos afetados foi bastante baixa e, portanto, o armazenamento em ACD com 1,4 kPa de CO<sub>2</sub> não foi prejudicial para a ocorrência de degenerescência nas condições do presente trabalho (Tabela 6). Já a utilização de pressões parciais um pouco maiores de CO<sub>2</sub> aumentaram a ocorrência deste dano em maçã 'Fuji', que também foi dependente da temperatura média durante a fase de desenvolvimento dos frutos (CORRÊA et al., 2010) e que pode ser amenizada com aumento gradativo de CO<sub>2</sub> na instalação de AC (KWEON et al., 2013). Desordens fisiológicas em maçãs, incluindo escurecimento interno, estão associadas com a maior produção de metanol (LEE et al., 2012) e ésteres de metila (LUMPKIN et al., 2015). Estes últimos autores verificaram aumento da produção de ésteres de metila com o armazenamento de maçãs em 5,0 kPa de CO<sub>2</sub>, em comparação com 1,5 kPa.

De uma forma geral, no presente trabalho, o armazenamento em ACD-QR sempre manteve menor ou igual à AC a porcentagem de frutos com degenerescência de polpa. A aplicação de 1-MCP também teve pouco efeito sobre este dano, apenas na ACD-QR 1,5, em que o baixo CO<sub>2</sub> aumentou a degenerescência e em alto CO<sub>2</sub> diminuiu este dano, discordando de Jung & Watkins (2011), que relatam aumento de danos em maçã 'Empire' com aplicação de 1-MCP.

Outra forma de manifestação de desordem fisiológica em maçãs armazenadas em AC, principalmente com alto CO<sub>2</sub> é a ocorrência de cavernas internas (CASTRO et al., 2007). No presente trabalho a ocorrência deste dano afetou um número maior de frutos em comparação aos danos causados por degenerescência (Tabela 6). Houve interação tripla significativa entre as variáveis estudadas. De uma forma geral, a menor ocorrência deste dano foi com o armazenamento em ACD-QR de 1,5. Quando foi utilizado ACD-QR de 1,7 houve maior dano com a aplicação de 1-MCP em comparação aos frutos que não receberam aplicação do produto. Por outro lado, no armazenamento em AC convencional também houve formação de cavernas nos frutos, sendo nesta condição a maior ocorrência deste dano, com 6,59% dos frutos afetados, quando armazenados em 1,4 kPa de CO<sub>2</sub> e com 1-MCP. De acordo com Lau (1998), a formação de cavernas é um distúrbio induzido pelo CO<sub>2</sub>, com o baixo O<sub>2</sub> agravando a ocorrência. No entanto, o armazenamento em ACD-QR de 1,5 ocorrem níveis de O<sub>2</sub> mais baixos que em AC convencional e a porcentagem de frutos com o dano foi inferior. Possivelmente o menor metabolismo destes frutos está relacionado com o menor consumo de O<sub>2</sub> no interior dos frutos, reduzindo as zonas de anaerobiose e formação de cavernas. Também danos externos por CO<sub>2</sub> podem ocorrer com a aplicação de 1-MCP (NOCK; WATKINS,

2013; KÖPCKE, 2015), porém no presente trabalho não foram registrados tais danos, mesmo com maior nível de CO<sub>2</sub>.

Tabela 6 - Distúrbios fisiológicos em maçãs 'Fuji Kiku' após nove meses de armazenamento em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pelo quociente respiratório (QR) de 1,5 ou 1,7, com dois níveis de CO<sub>2</sub> e com ou sem aplicação de 1-MCP, mais sete dias de prateleira a 20 °C.

Tratamento		Degenerescência de Polpa (%)		
		AC**	QR 1,5	QR 1,7
0,8 kPa CO <sub>2</sub>	Sem 1-MCP	1,96 aA*	0,00 bB	0,92 aAB
	Com 1-MCP***	1,00 aA	0,96 aA	0,92 aA
1,4 kPa CO <sub>2</sub>	Sem 1-MCP	1,92 aA	1,82 aA	1,89 aA
	Com 1-MCP	1,85 aA	0,00 bB	0,00 bB
Sem 1-MCP	0,8 kPa CO <sub>2</sub>	1,96 a	0,00 b	0,92 a
	1,4 kPa CO <sub>2</sub>	1,92 a	1,82 a	1,89 a
Com 1-MCP	0,8 kPa CO <sub>2</sub>	1,00 a	0,96 a	0,92 a
	1,4 kPa CO <sub>2</sub>	1,85 a	0,00 b	0,00 a
CV (%)			26,6	
----- Formação de Cavernas Internas (%) -----				
0,8 kPa CO <sub>2</sub>	Sem 1-MCP	AC	QR 1,5	QR 1,7
	Com 1-MCP	3,81 aA	2,71 aAB	0,92 bB
1,4 kPa CO <sub>2</sub>	Sem 1-MCP	0,00 bB	0,00 bB	4,63 aA
	Com 1-MCP	3,08 bA	1,92 aAB	0,96 bB
Sem 1-MCP	0,8 kPa CO <sub>2</sub>	6,59 aA	0,96 aB	4,70 aA
	1,4 kPa CO <sub>2</sub>	3,81 a	2,71 a	0,92 a
Com 1-MCP	0,8 kPa CO <sub>2</sub>	3,08 a	1,92 a	0,96 a
	1,4 kPa CO <sub>2</sub>	0,00 b	0,00 a	4,63 a
CV (%)			24,18	

\*Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey a 5% probabilidade de erro.

\*\*AC com 1,0 kPa O<sub>2</sub>.

\*\*\* 1-Metilciclopropeno (0,625 µL L<sup>-1</sup>).

A podridão dos frutos é um dos principais problemas na maçã 'Fuji' armazenada por longos períodos. Após armazenamento por nove meses, mais sete dias de exposição a 20 °C, não houve diferença significativa entre os níveis de CO<sub>2</sub> para a ocorrência de podridões (Tabela 7). Porém o armazenamento em ACD-QR, tanto com QR de 1,5, como 1,7 foi mais

eficiente em reduzir a ocorrência de podridões em relação ao armazenamento em AC convencional, provavelmente pela menor pressão parcial de O<sub>2</sub> utilizada. De acordo com Imahori et al. (2013), o armazenamento em baixo O<sub>2</sub> inibiu a ocorrência de podridões em bananas, mesmo na temperatura de 20 °C. O armazenamento em AC reduz a ocorrência de podridões por afetar tanto o fungo, como o hospedeiro. O crescimento, esporulação e atividade enzimática do patógeno é reduzida, enquanto o fruto fica mais resistente à infecção. Isso ocorre, em parte, à menor produção de etileno e diminuição da sensibilidade ao etileno pelos frutos armazenados em AC (SAMS; CONWAY, 1987). Como no presente experimento a produção de etileno foi menor nos frutos em ACD do que em AC, isso pode explicar a maior eficiência da ACD no controle de podridões. Além disso, a maior produção de etanol e acetaldeído produzido pelos frutos em ACD também auxilia no controle de podridões (PESIS, 2005).

Ainda na análise de podridões, foi verificada interação dupla significativa entre 1-MCP e níveis de CO<sub>2</sub>. Nos frutos sem aplicação de 1-MCP não houve diferença entre os níveis de CO<sub>2</sub> no controle da podridão, porém quando foi aplicado este produto o armazenamento em alto CO<sub>2</sub> reduziu a ocorrência de podridões nos frutos. Frutos tratados com 1-MCP ficaram mais sensíveis às podridões e, tanto em baixa como alta concentração de CO<sub>2</sub>, houve maior podridão com aplicação de 1-MCP (Tabela 7). Como a produção de etileno dos frutos que receberam 1-MCP é menor e, portanto, há maior retardo do amadurecimento, era esperada uma redução na ocorrência da podridão nestes frutos, ao contrário do que foi verificado. Em outro trabalho em que foram avaliados tratamentos com calor, microrganismos antagonistas e aplicação de 1-MCP sobre maçãs inoculadas com fungos causadores de podridões pós-colheita de maçãs, também foi observado aumento da incidência de lesões por fungos em frutos tratados com 1-MCP (LEVERENTZ et al., 2003). Estes autores também afirmam não compreender este efeito negativo do 1-MCP no aumento da ocorrência de podridões em maçã, mas lançam a hipótese de que as respostas de defesa da planta, mediadas pelo etileno, podem ser inibidas pelo 1-MCP antes que as respostas relacionadas com a senescência. Além disso, relatam que o aumento da podridão causada pelo 1-MCP ocorre principalmente quando em combinação com outros tratamentos que causam estresse. Possivelmente essa possa ser uma explicação para os resultados obtidos no presente estudo, em que o baixo O<sub>2</sub> utilizado pode ser considerado como estressante em combinação com o 1-MCP. Também para frutos não-climatéricos foi observado um aumento da podridão com aplicação de 1-MCP (MARCOS et al., 2005). Estes autores concluíram que o etileno ativa

processos de defesa contra o ataque fúngico e a inibição de sua ação provocaria o aumento da ocorrência de doenças.

Tabela 7 - Ocorrência de podridões e total de frutos sadios em maçãs ‘Fuji Kiku’ após nove meses de armazenamento em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD) monitorada pelo quociente respiratório (QR) de 1,5 ou 1,7, com dois níveis de CO<sub>2</sub> e com ou sem aplicação de 1-MCP, mais sete dias de vida de prateleira a 20 °C.

Tratamento	Ocorrência de Podridões (%)			Média
	AC**	QR 1,5	QR 1,7	
0,8 kPa CO <sub>2</sub>	43,41	36,86	36,56	38,94 a
1,4 kPa CO <sub>2</sub>	41,45	34,39	30,64	35,50 a
Média	42,43 A*	35,63 B	33,60 B	
Sem 1-MCP	35,92	28,25	26,01	30,06 b
Com 1-MCP***	48,95	43,00	41,18	44,38 a
Média	42,43 A	35,63 B	33,60 B	
	0,8 kPa CO <sub>2</sub>		1,4 kPa CO <sub>2</sub>	
Sem 1-MCP	29,12 bA		31,00 bA	30,06
Com 1-MCP	48,76 aA		39,99 aB	44,38
Média	38,94		35,50	
CV (%)		12,14		
----- Frutos Sadios (%) -----				
	AC	QR 1,5	QR 1,7	Média
0,8 kPa CO <sub>2</sub>	51,86	61,78	60,67	58,10 a
1,4 kPa CO <sub>2</sub>	54,41	63,30	66,56	61,43 a
Mean	53,14 B	62,54 A	63,61 A	
Sem 1-MCP	59,34	68,53	69,80	65,89 a
Com 1-MCP***	46,94	56,55	57,43	53,63 b
Média	53,14 B	62,54 A	63,61 A	
CV (%)		11,63		

\*Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey a 5% probabilidade de erro.

\*\*AC com 1,0 kPa O<sub>2</sub>.

\*\*\* 1-Metilciclopropeno (0,625 µL L<sup>-1</sup>).

Na avaliação da porcentagem de frutos sadios não houve interação entre os fatores, sendo, portanto, realizada uma comparação entre as médias dos tratamentos. Com relação aos níveis de CO<sub>2</sub>, não houve diferença significativa, confirmando a constatação de que é possível utilizar 1,4 kPa de CO<sub>2</sub> para a maçã ‘Fuji’, nestas condições (Tabela 7). Com a aplicação de 1-MCP a porcentagem de frutos sadios foi menor e, isso deve-se principalmente ao aumento

das podridões nestes frutos. O armazenamento em ACD-QR, comparado com o armazenamento em AC convencional, tanto com QR 1,5 e 1,7 foi mais eficiente em preservar a qualidade dos frutos, evidenciado pela maior porcentagem de frutos sadios. Isso provavelmente deve-se à redução do metabolismo durante o armazenamento, pela menor concentração interna de etileno e, durante o período de prateleira, à menor produção de etileno e respiração dos frutos que estavam em ACD. Estes resultados estão de acordo com Weber et al. (2015), que verificaram maior porcentagem de frutos sadios no armazenamento de maçãs ‘Royal Gala’ em ACD, seja pela técnica da fluorescência de clorofilas ou ACD-QR.

#### 6.1.4 Conclusões

A atmosfera controlada dinâmica com o uso do monitoramento do QR é mais eficiente que a AC convencional para conservar maçãs ‘Fuji Kiku’ durante o armazenamento prolongado, sem grande variação entre os QR 1,5 e 1,7. Apesar da maior produção de compostos da fermentação em QR 1,7, os níveis estão dentro do limite tolerável pelos frutos, que pode ser observado pela baixa ocorrência de danos e boa manutenção da qualidade destes frutos.

A pressão parcial de 1,4 kPa de CO<sub>2</sub> não aumenta a ocorrência de distúrbios durante o armazenamento em ACD-QR, sendo uma condição desejável para o armazenamento pelo menor gasto de energia elétrica com funcionamento de equipamentos de adsorção deste gás nas câmaras comerciais de armazenamento.

A aplicação de 1-MCP não é benéfica para a manutenção da qualidade das maçãs ‘Fuji Kiku’, por provocar o aumento da ocorrência de podridões nos frutos.

#### 6.1.5 Referências Bibliográficas

ARGENTA, L. C.; FAN, X.; MATTHEIS, J. P.; Responses of ‘Fuji’ apples to short and long duration exposure to elevated CO<sub>2</sub> concentration. **Postharvest Biology and Technology**, v.24, p.13-24, 2002.

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

BAI, J. et al. Response of four apple cultivars to 1-methylcyclopropene treatment and controlled atmosphere storage. **Hort Science**, v.40, n.5, p.1534-1538, 2005.

BRACKMANN, A. et al. Condições de atmosfera controlada, temperatura e umidade relativa no armazenamento de maçãs 'Fuji'. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.4, p.803-809, 2005.

BRACKMANN, A.; STEFFENS, C. A.; WACLAWOVSKY, A. J. Influência da época de colheita e do armazenamento em atmosfera controlada na qualidade da maçã 'Braeburn'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.3, p.295-301, 2002.

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

CASTRO, E. et al. Carbon dioxide-induced flesh browning in Pink Lady apples. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v.132, n.5, p.713-719, 2007.

CORRÊA, T. R. et al. Qualidade de maçãs 'Fuji' armazenadas em atmosfera controlada e influência do clima na degenerescência da polpa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p.531-538, 2010.

DEFILIPPI, B. G.; DANDEKAR, A. M.; KADER, A. A. Impact of suppression of ethylene action or biosynthesis on flavor metabolites in apple (*Malus domestica* Borkh) fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.5694-5701, 2004.

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

GÓMEZ, A. C. S. **Influência das condições de conservação sobre a qualidade pós-colheita de diferentes cultivares de maçã**. 2005. 81 f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

IMAHORI, Y. et al. Residual effects of low oxygen storage of mature green fruit on ripening processes and ester biosynthesis during ripening in bananas. **Postharvest Biology and Technology**, v.77, p.19-27, 2013.

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

KÖPCKE, D. 1-Methylcyclopropene (1-MCP) and dynamic controlled atmosphere (DCA) applications under elevated storage temperatures: Effects on fruit quality of 'Elstar', 'Jonagold' and 'Gloster' apple (*Malus domestica* Borkh.). **European Journal of Horticultural Science**, v.80, p.25-32, 2015.

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

LARA, M. V. et al. Peach (*Prunus persica*) fruit response to anoxia: reversible ripening delay and biochemical changes. **Plant Cell Physiology**, v.52, n.2, p.392-403, 2011.

LAU, O. L. Effect of growing season, harvest maturity, waxing, low O<sub>2</sub> and elevated CO<sub>2</sub> on flesh browning disorders in 'Braeburn' apples. **Postharvest Biology and Technology**, v.14, p.131-141, 1998.

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

LEVERENTZ, B. et al. Effect of combining MCP treatment, heat treatment, and biocontrol on the reduction of postharvest decay of 'Golden Delicious' apples. **Postharvest Biology and Technology**, v.27, p.221-233, 2003.

LIU, W. W. et al. Ethanol treatment inhibits internal ethylene concentrations and enhances ethyl ester production during storage of oriental sweet melons (*Cucumis melo* var. makuwa Makino). **Postharvest Biology and Technology**, v.67, p.75-83, 2012.

LUMPKIN, C.; FELLMAN, J. K.; RUDELL, D. R.; MATTHEIS, J. P. 'Fuji' apple (*Malus domestica* Borkh.) volatile production during high pCO<sub>2</sub> controlled atmosphere storage. **Postharvest Biology and Technology**, v.100, p.234-243, 2015.

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

MARCOS, J. F.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L.; ZACARÍAS, L. Involvement of ethylene biosynthesis and perception in the susceptibility of citrus fruits to *Penicillium digitatum* infection and the accumulation of defence-related mRNAs. **Journal of Experimental Botany**, v.56, n.418, p.2183-2193, 2005.

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

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

PALIYATH, G.; MURR, D. P. Biochemistry of Fruits. In: PALIYATH, G.; MURR, D. P.; HANDA, A. K.; LURIE, S. **Postharvest Biology and Technology of Fruits, Vegetables, and Flowers**. Iowa, USA: Wiley-Blackwell Publishing, 2008. cap. 3, p.19-50.

- PESIS, E. The role of the anaerobic metabolites, acetaldehyde and ethanol, in fruit ripening, enhancement of fruit quality and fruit deterioration. **Postharvest Biology and Technology**, v.37, p.1-19, 2005.
- SAMS, C. E.; CONWAY, W. S. Additive effects of controlled atmosphere storage and calcium chloride on decay, firmness retention, and ethylene production in apples. **Plant Disease**, v.71, p.1003-1005, 1987.
- SAQUET, A. A.; STREIF, J. Fermentative metabolism in 'Jonagold' apples under controlled atmosphere storage. **European Journal of Horticultural Science**, v.73, p.43-46, 2008.
- SWEETMAN, C.; DELUC, L.G.; CRAMER, G.R.; FORD, C.M.; SOOLE, K.L. Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. **Phytochemistry**, v.70, p.1329-1344, 2009.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848 p.
- TATSUKI, M. et al. Influence of time from harvest to 1-MCP treatment on apple fruit quality and expression of genes for ethylene biosynthesis enzymes and ethylene receptors. **Postharvest Biology and Technology**, v.43, p.28-35, 2007.
- TRAN, D. T. et al. Monitoring of extreme low oxygen control atmosphere storage of 'Greenstar' apples using chlorophyll fluorescence. **Scientia Horticulturae**, v.184, p.18-22, 2015.
- WAKASA, Y. et al. Low expression of an endopolygalacturonase gene in apple fruit with long-term storage potential. **Postharvest Biology and Technology**, v.39, p.193-198, 2006.
- WEBER, A. **Aplicação de produtos da fermentação e ultrabaixo oxigênio para a conservação de maçãs 'Royal Gala'**. 2010. 90 f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- WEBER, A. et al. Respiratory quotient: innovative method for monitoring 'Royal Gala' apple storage in a dynamic controlled atmosphere. **Scientia Agricola**, v.72, p.28-33, 2015.
- WEBER, A. et al. 'Gala', 'Royal Gala' and 'Brookfield' apples stored under ultra-low oxygen and two temperatures. **Bioscience Journal**, v.29, n.6, p.1887-1895, 2013.
- ZANELLA, A.; CAZZANELLI, P.; ROGGI, O. Dynamic controlled atmosphere (DCA) storage by means of chlorophyll fluorescence response for firmness retention in apple. **Acta Horticulturae**, v.796, p.77-82, 2008.

## 7 ARTIGO 5

### 7.1 Armazenamento de maçã ‘Galaxy’ em atmosfera controlada dinâmica em temperatura mais elevada e com aplicação de 1-MCP

#### Resumo

A baixa temperatura de armazenamento, juntamente com baixos níveis de O<sub>2</sub>, reduz o metabolismo dos frutos, mantendo a qualidade. O alto custo da energia elétrica e o longo período de armazenamento de maçãs aumentam as despesas com energia elétrica do sistema de refrigeração, exigindo estratégias para armazenar com temperatura mais elevada. O objetivo do presente trabalho foi comparar o armazenamento em atmosfera controlada dinâmica pelo método do quociente respiratório (ACD-QR) com o armazenamento em AC convencional e verificar a necessidade de utilizar 1-MCP nestas condições de armazenamento e a possibilidade de armazenar maçãs ‘Galaxy’ em ACD-QR e em temperatura mais elevada. Os frutos foram armazenados durante nove meses em AC (1,2 kPa O<sub>2</sub> + 2,0 kPa CO<sub>2</sub>) ou ACD-QR (QR 1,5 e 1,2 kPa CO<sub>2</sub>), nas temperaturas de 1,0; 1,5 e 2,0°C, combinados ou não com aplicação de 1-MCP. O armazenamento em ACD-QR, com níveis extremamente baixos de O<sub>2</sub> (0,19 – 0,24 kPa), reduz a produção de etileno dos frutos, mantendo melhor as qualidades físicas e químicas dos frutos e diminui a ocorrência de distúrbios em relação ao armazenamento em AC convencional. Portanto, o armazenamento em ACD-QR dispensa a aplicação de 1-MCP, pelo menor benefício deste produto na manutenção da qualidade nesta condição de armazenamento. No armazenamento em AC convencional com a aplicação de 1-MCP e, principalmente, em ACD pelo método do QR, mesmo sem aplicação de 1-MCP, pode-se usar uma temperatura de armazenamento mais elevada, de 2,0 °C ao invés de 1,0 °C, sem prejuízo à qualidade dos frutos, economizando energia com o sistema de refrigeração.

**Palavras-chave:** *Malus domestica* Borkh. Quociente respiratório. Economia de energia. Qualidade.

#### Abstract

Low storage temperature, combined to low oxygen levels, reduce the fruit metabolism and maintain quality. The high electric power cost and the long-term apple storage increases the expenses with cooling systems, requiring strategies to store in higher temperature. The aim of this study was to compare the storage in dynamic controlled atmosphere monitored by respiratory quotient (DCA-RQ) with standard controlled atmosphere (CA) storage and investigate the need of 1-methylcyclopropene (1-MCP) application on such storage condition and the possibility of storing ‘Galaxy’ apple in DCA-RQ with higher temperature. The apples were stored for 9 months either in CA (1.2 kPa O<sub>2</sub> + 2.0 kPa CO<sub>2</sub>) or in DCA-RQ (RQ 1.5 + 1.2 kPa CO<sub>2</sub>) at storage temperature of 1.0, 1.5 and 2.0°C, a group of fruits without and another with 1-MCP application. The storage in DCA-RQ, with extremely low O<sub>2</sub> levels (0.19 - 0.24 kPa), decreased the ethylene production, keeping better physical and chemical quality and lowered physiological disorders in relation to CA storage. Thus, DCA-RQ storage dispense 1-MCP application, because its lower benefit in keeping quality in such storage condition. In CA storage together with 1-MCP application, and especially in DCA-RQ even without 1-MCP application, it is possible maintain higher storage temperature, of 2.0 °C instead of 1.0°C, without losses in fruit quality and saving energy in the cooling systems.

**Keywords:** *Malus domestica* Borkh. Respiratory quotient. Energy saving. Quality.

### 7.1.1 Introdução

A colheita de maçãs do grupo Gala é realizada nos meses de janeiro e fevereiro na região Sul do Brasil, onde se concentra a maior parte da produção. Com o objetivo de manter a qualidade e ampliar o período de comercialização é necessário que sejam utilizadas formas eficientes de armazenamento. O método mais pesquisado e utilizado é o armazenamento em atmosfera controlada (AC), em que a pressão parcial de O<sub>2</sub> é reduzida e o CO<sub>2</sub> aumentado nas câmaras de armazenamento, visando diminuir o metabolismo dos frutos. Para maçãs mutantes da ‘Gala’ as recomendações para o armazenamento em AC são de 0,8 a 1,0 kPa de O<sub>2</sub> e 2,5 kPa de CO<sub>2</sub> (BRACKMANN et al., 2008).

Apesar dos benefícios da AC, podem ocorrer perdas com o armazenamento prolongado, uma vez que a pressão parcial de O<sub>2</sub> é mantida constante durante todo o período

de armazenamento e o metabolismo dos frutos varia com o tempo. Como segurança, a fim de evitar problemas como a indução da fermentação durante o armazenamento em AC, os níveis de O<sub>2</sub> são mantidos acima do que seria o ideal para alcançar o nível mínimo de metabolismo. De acordo com Boersig et al. (1988), o metabolismo dos frutos diminui de acordo com a redução da concentração de O<sub>2</sub> até o nível em que a evolução de CO<sub>2</sub> é mínima, determinada de ponto de compensação anaeróbico (PCA) ou limite mínimo de oxigênio. Assim, tornou-se necessário o estudo de outras técnicas em que seria possível acompanhar o limite mínimo de oxigênio durante o armazenamento. Dentre estas, a mais estudada até o momento é a atmosfera controlada dinâmica pelo método da fluorescência de clorofilas (ACD-FC), com a possibilidade de manter a qualidade sem necessidade de aplicação de produtos auxiliares para controle da escaldadura e redução da produção de etileno (DELONG et al., 2004). Nesta forma de armazenamento, ocorre uma redução inicial do O<sub>2</sub> até que seja detectado um estresse nos frutos, com posterior aumento da pressão parcial de oxigênio em 0,2 kPa, permanecendo assim pelo restante do período (DELONG et al., 2004; KÖPCKE, 2015; WEBER et al., 2015), sendo apenas monitorada pelos sensores a fim de verificar a eventual ocorrência de novo pico. Portanto, durante este período o nível de oxigênio também permanece constante.

Outra forma de monitorar o PCA é pela avaliação do quociente respiratório (QR), obtido pela razão entre a produção de CO<sub>2</sub> e o consumo de O<sub>2</sub> em função da respiração dos frutos armazenados em condição de baixo O<sub>2</sub> (GRAN; BEAUDRY, 1993). Na respiração aeróbica esta razão é próxima a 1,0, porém quando inicia o metabolismo fermentativo esta relação aumenta. Esta forma de monitoramento está sendo testada experimentalmente e também comercialmente, sendo que em publicação recente foi observado que o QR 2,0 mantém a qualidade de maçãs ‘Royal Gala’ de forma similar a ACD-FC e superior à AC convencional, sendo que o armazenamento em oxigênio mais baixo (maior QR) pode provocar desordens por excesso de fermentação (WEBER et al., 2015). Portanto, também é importante a avaliação de QR inferior a 2,0 sobre a manutenção da qualidade de maçãs.

A aplicação de 1-metilciclopropeno (1-MCP) atua sobre os receptores de etileno na membrana do retículo endoplasmático das células, impedindo a ligação do etileno e a transdução de sinal que culminará com o amadurecimento dos frutos (LIN et al., 2009). Assim, pode ser utilizado como complemento à AC para prolongar o período de armazenamento, porém apresenta alguns inconvenientes como o escurecimento interno nos frutos (JUNG; WATKINS, 2011) e na epiderme (KÖPCKE, 2015). Além disso, por ser um produto “químico”, o 1-MCP não pode ser utilizado na produção orgânica, enquanto que a

ACD não possui nenhuma restrição, sendo considerada uma tecnologia “limpa” (REBEAUD; GASSER, 2015).

A temperatura de armazenamento já foi exaustivamente estudada para condições de armazenamento refrigerado e atmosfera controlada. Entretanto, ainda são necessários estudos para avaliar a melhor condição no armazenamento com níveis de oxigênio extremamente baixos, como aqueles utilizados em ACD-QR, onde o metabolismo dos frutos é mínimo. Trabalhos de literatura revelam que é possível armazenar maçãs em AC + 1-MCP (McCORMICK et al., 2012) e ACD-FC (KÖPCKE, 2015) em temperatura mais elevada, mantendo a qualidade comparável ao armazenamento em menor temperatura e AC. Ademais, o gasto de energia elétrica para o sistema de refrigeração das câmaras representa um importante custo para as empresas armazenadoras, sendo que uma pequena elevação na temperatura poderia representar uma considerável economia. Trabalhos relatam economia de energia de até 70% para maçãs armazenadas em AC + 1-MCP, na temperatura de 5,0 °C, em comparação ao armazenamento em AC e 1,0 °C, sem prejuízo à qualidade dos frutos (KITTERMANN et al., 2015).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi comparar o armazenamento em ACD pelo método do QR com o armazenamento em AC convencional e avaliar a necessidade de utilizar 1-MCP nestas condições de armazenamento. Além disso, buscou-se avaliar a possibilidade de armazenar maçãs ‘Galaxy’ nas condições expostas anteriormente em temperatura mais elevada à tradicionalmente utilizada em AC, buscando uma forma de economizar energia elétrica com o sistema de refrigeração.

### 7.1.2 Material e métodos

Para a condução do trabalho foram utilizadas maçãs ‘Galaxy’, colhidas em um pomar comercial no município de Vacaria-RS, quando apresentavam índice iodo-amido de 6,9 (escala de 1 a 10, onde 1 = fruto verde e 10 = completamente maduro), firmeza de polpa de 78,6 N, acidez de 5,2 meq/100 mL, sólidos solúveis totais (SST) de 11,4 °Brix, atividade da enzima ACC oxidase de 27,9 nL C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, produção de etileno de 1,01 µL C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> e atividade respiratória de 17,9 mL CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, no momento da instalação do experimento.

Os frutos foram selecionados e descartados aqueles com algum defeito ou dano mecânico. Após, foram coletados frutos aleatoriamente, formando repetições com 40 frutos,

tendo cada tratamento quatro repetições. As maçãs foram armazenadas em minicâmaras de 230 litros, onde foi realizado o controle da atmosfera de armazenamento e o cálculo do quociente respiratório (QR). As minicâmaras permaneceram dentro de câmaras frigoríficas maiores, onde foi realizado o controle da temperatura. Para cada temperatura foi utilizada uma câmara diferente. A temperatura foi controlada por termostatos eletrônicos e monitorada diariamente por meio de termômetros de bulbo de mercúrio inseridos na polpa de frutos. A umidade relativa foi mantida constante dentro das minicâmaras onde se encontravam os frutos, em 95% ( $\pm 1\%$ ).

Os tratamentos avaliados consistiram de duas formas de armazenamento: atmosfera controlada (AC) convencional (1,2 kPa O<sub>2</sub> + 2,0 kPa CO<sub>2</sub>) e atmosfera controlada dinâmica pelo método do quociente respiratório (ACD-QR), com O<sub>2</sub> variável e 1,2 kPa de CO<sub>2</sub>, armazenados em três temperaturas: 1,0; 1,5 e 2,0 °C ( $\pm 0,1$  °C). Para cada forma de armazenamento e temperatura foi armazenado um lote (4 repetições) de frutos sem e outro com aplicação de 1-metilciclopropeno (1-MCP). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema trifatorial com parcelas subdivididas: temperatura (parcela principal) x formas de armazenamento (subparcela) x aplicação de 1-MCP (subsubparcela).

Nos cinco primeiros dias após a colheita, os frutos permaneceram na temperatura de 5,0 °C em atmosfera ambiente, a fim de simular o procedimento de enchimento das câmaras em nível comercial. No quinto dia a pressão parcial de O<sub>2</sub> foi reduzida até 5,0 kPa para todos os tratamentos, por meio da varredura das minicâmaras com nitrogênio gasoso. A temperatura foi reduzida até os valores preestabelecidos para cada câmara. Deste dia em diante, durante mais cinco dias, houve redução gradativa do O<sub>2</sub> e elevação do CO<sub>2</sub> até o nível definido para cada tratamento, por meio da respiração dos frutos. A partir deste dia, a pressão parcial de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> foram mantidas constantes nas minicâmaras de AC convencional, pela injeção de ar externo e absorção do excesso de CO<sub>2</sub> produzido pela respiração, por meio da circulação do ar por um absorvedor que continha cal hidratada (Ca(OH)<sub>2</sub>). Também, a partir deste dia, foi realizado o cálculo e ajuste do QR para as minicâmaras destes tratamentos. Para o monitoramento e correção dos gases das minicâmaras foi utilizado um analisador de gases da marca Siemens Ultramat-23.

O QR foi calculado a partir do acúmulo de CO<sub>2</sub> e consumo de O<sub>2</sub> em função da respiração aeróbica e anaeróbica dos frutos em minicâmaras fechadas hermeticamente. Para o presente experimento estipulou-se um QR de 1,5, em função de testes e outros experimentos anteriores, no entanto, o QR real (média dos nove meses) foi de 1,45 para a temperatura de

1,0 °C e de 1,43 para as temperaturas de 1,5 e 2,0 °C. A cada dois dias foi realizada uma determinação do QR em cada minicâmara, durante todo o período de armazenamento. Para tanto, era feita uma determinação dos níveis de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> das minicâmaras e após o controlador de gases automático era desligado por um período de 14 horas, quando então foi realizada uma nova determinação do nível destes gases nas minicâmaras. O QR foi calculado pela razão entre a produção de CO<sub>2</sub> pelo consumo de O<sub>2</sub> neste período. Quando o cálculo resultava em QR de 1,5 o nível de O<sub>2</sub> permanecia como estava por mais dois dias, até nova determinação do QR. Porém, se o QR era maior, em função da maior respiração anaeróbica, a pressão parcial de O<sub>2</sub> era aumentada em 0,01 kPa para obter o QR ideal. Por outro lado, se o QR era menor que 1,5 a pressão parcial de O<sub>2</sub> era reduzida em 0,01 kPa para estimular maior respiração anaeróbica nos frutos. Desta forma, a média da pressão parcial de O<sub>2</sub> das câmaras, durante os nove meses de armazenamento, foi de 0,21; 0,19 e 0,24 kPa de O<sub>2</sub> nas temperaturas de 1,0; 1,5 e 2,0 °C, respectivamente (Figura-1).

O 1-MCP foi aplicado no início do período de armazenamento, na temperatura de 5,0 °C. Foi utilizado o produto SmartFresh<sup>®</sup>, na concentração de 625 ppb. O produto foi solubilizado em 20 mL de água destilada, em um frasco de vidro fechado hermeticamente. Em seguida, foi transferido para uma placa de Petri, no interior das minicâmaras em que estavam os frutos, onde ocorreu a volatilização e reação com os frutos. Os frutos ficaram expostos ao produto por 24 horas, quando as minicâmaras foram ventiladas com ar externo. Após a abertura os frutos retirados, devidamente identificados e acondicionados com os demais, de acordo com cada forma de armazenamento e temperatura.

O tempo de armazenamento foi de nove meses e após este período, os frutos foram retirados das câmaras e permaneceram por mais sete dias a 20 °C e atmosfera ambiente, quando foram avaliadas as seguintes variáveis:

- a) *Firmeza de polpa*: foi retirada parte da epiderme na região equatorial dos frutos, em lados opostos, onde os mesmos foram perfurados com um penetrômetro da marca Effegi, com ponteira de 11 mm, com os valores sendo expressos em Newton (N);
- b) *Acidez titulável total*: determinada pela titulação, com NaOH 0,1N, de uma solução contendo 10 mL de suco dos frutos, diluídos em 100 mL de água deionizada, até atingir pH 8,1. Os valores foram expressos em meq 100 mL<sup>-1</sup>;
- c) *Polpa farinácea*: foram realizados cortes transversais na região equatorial dos frutos, em que foram avaliados visualmente quanto à ocorrência de polpa seca e sem suculência, sintoma de polpa farinácea, com os dados expressos em porcentagem de frutos com o dano;

d) *Degenerescência de polpa*: por meio de cortes transversais na região equatorial dos frutos, com análise visual quanto ao escurecimento da polpa, sintoma característico de degenerescência. Foi realizado a contagem dos frutos e os resultados expressos em porcentagem;

e) *Frutos sadios*: pela contagem do total de frutos que não apresentam problemas com podridões ou distúrbios, tanto internos como externos, estando aptos à comercialização. Os resultados foram expressos em porcentagem;

f) *Atividade da enzima ACC oxidase*: de acordo com Bufler (1986). Foram retiradas 3 g da epiderme dos frutos e colocadas em uma solução contendo 0,1 mM de ACC em 10 mM do tampão MES (ácido 2 (N-morfolino) etanossulfônico) em pH 6,0, onde permaneceram por 30 minutos. Em seguida as amostras foram acondicionadas em seringas herméticas com volume de 50 mL, com 2% de CO<sub>2</sub>, onde permaneceram por aproximadamente 30 minutos. Após, como resultado da atividade da enzima, foi determinada a produção de etileno presente nas seringas, por cromatografia gasosa, com os dados expressos em nL C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>;

g) *etanol*; h) *acetato de etila*; i) *acetaldeído*: baseado na metodologia proposta por Saquet & Streif (2008) com algumas modificações. Para as determinações foram separados 10 mL do suco dos frutos de cada repetição e congelados em frascos Vial de 20 mL, para posterior análise. Após descongelamento, os frascos foram aquecidos até 70°C por 30 minutos, quando foi retirado 0,1 mL do *headspace* dos frascos e injetado em um cromatógrafo Dani, equipado com coluna DN-WAX, na temperatura de 60°C e detector FID (ionização em chama), operando a 250°C. As concentrações foram calculadas a partir da área do pico de cada composto, comparando com soluções padrão e os resultados foram expressos em µL L<sup>-1</sup>;

j) *Produção de etileno*: realizada em dois momentos: após a abertura das câmaras e após seis dias a 20°C. Aproximadamente 1.500 g de frutos foram acondicionados em recipientes de vidro com volume de 5.000 mL e fechados hermeticamente. Após duas horas a 20°C, foram retiradas duas amostras de 1 mL de ar do *headspace* de cada recipiente e imediatamente injetados em um cromatógrafo a gás, marca Varian<sup>®</sup> modelo Star 3400CX, equipado com um detector por ionização em chama (FID) e coluna Porapak N80/100 de dois metros de comprimento. A temperatura da coluna, injetor e detector era de 90; 140 e 200 °C, respectivamente. A produção de etileno foi calculada em função da concentração deste gás no recipiente no momento da determinação, da massa dos frutos, do volume do espaço livre no recipiente e do tempo de fechamento, sendo expresso em µL C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

k) *Respiração*: análise realizada após a retirada dos frutos das câmaras e estabilização da temperatura (1/2 dia a 20°C) e depois de seis dias de vida de prateleira. A mesma amostra de

frutos que permaneceu fechada para avaliação da produção de etileno foi utilizada para esta análise. Para tanto, o ar dos recipientes foi circulado por um analisador de gases marca Shelle e a respiração dos frutos foi medida em função da produção de CO<sub>2</sub>, com os resultados expressos em mL CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, em função da massa de frutos no recipiente, tempo de fechamento, volume de espaço livre e a concentração do CO<sub>2</sub> determinada pelo analisador.

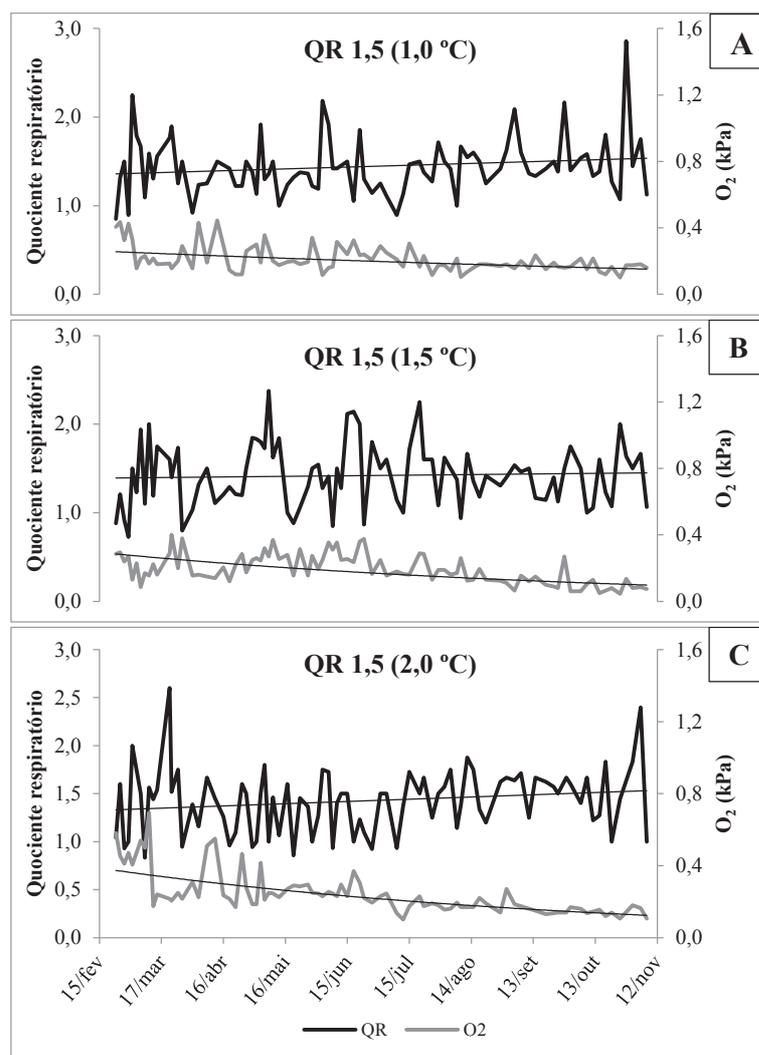


Figura 1 - Quociente respiratório (RQ) e pressão parcial de oxigênio (O<sub>2</sub>) durante nove meses de armazenamento em atmosfera controlada dinâmica de maçãs 'Galaxy', nas temperaturas de 1,0 °C (A), 1,5 °C (B) e 2,0 °C (C).

Após tabulação dos dados, foi realizada análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Aqueles dados que não apresentavam normalidade foram transformados pela fórmula arco seno  $((x + 0,5)/100)^{1/2}$  antes da análise de variância.

### 7.1.3 Resultados e discussão

A enzima ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) oxidase atua na última etapa da rota de produção de etileno, oxidando o composto ACC a etileno (YANG; HOFFMAN, 1984). No presente trabalho houve redução significativa na atividade desta enzima com o armazenamento em ACD-QR quando comparado ao armazenamento em AC convencional (Tabela 1), podendo ser resultado da baixa pressão parcial de O<sub>2</sub> a que os frutos estiveram submetidos durante o armazenamento (em média abaixo de 0,25 kPa de O<sub>2</sub>), uma vez que oxigênio é necessário para atividade desta enzima (YANG; HOFFMAN, 1984). Além disso, nesta condição de armazenamento também ocorre produção de compostos da fermentação, como etanol e acetaldeído, que reduzem a atividade da enzima (ASODA et al., 2009). Também a aplicação de 1-MCP reduziu significativamente a atividade da ACC oxidase. Isso se deve ao fato de que este composto liga-se aos receptores da membrana das células, inibindo a ação do etileno. Desta forma, ocorre redução da produção autocatalítica de etileno, natural durante o amadurecimento, regulando assim a atividade e expressão gênica para a enzima ACC oxidase (MATHOOKO et al., 2004). Na comparação das três temperaturas avaliadas, observa-se que apesar de uma atividade da enzima estatisticamente maior em 2,0 °C, este efeito é bem menor ao observado na comparação entre forma de armazenamento e aplicação de 1-MCP. No desdobramento da interação dupla significativa entre formas de armazenamento e 1-MCP, fica evidente o benefício de armazenar em ACD-QR e da aplicação de 1-MCP, além do efeito sinérgico destas duas técnicas na redução da atividade da ACC oxidase (Tabela 1).

A produção de etileno foi menor nos frutos armazenados em ACD-QR em relação àqueles em AC convencional, durante todo o período de prateleira (Tabela 2). De acordo com Saquet & Streif (2008), durante o armazenamento em AC com pressões parciais baixas de O<sub>2</sub> e/ou altas de CO<sub>2</sub>, ocorre um aumento na atividade de enzimas do processo fermentativo, com produção de acetaldeído e etanol. Estudos demonstram que a aplicação exógena de etanol é responsável pela diminuição da produção de etileno em frutas, sendo dependente da dose (PESIS, 2005). Além disso, nos frutos com aplicação de etanol não ocorre pico na produção de etileno, comparado com frutos sem a aplicação do produto (LIU et al., 2012). Estes compostos da fermentação foram detectados nos frutos de todos os tratamentos, porém em maior concentração naqueles armazenados em ACD-QR (Tabela 4), resultando em menor produção de etileno, que contribuiu para manutenção das características físicas e químicas

destes frutos e redução da ocorrência de distúrbios, quando comparado aos frutos em AC convencional. Estratégias que inibem a produção de etileno durante o armazenamento são úteis, uma vez que a síntese autocatalítica de etileno é necessária para aumentar a transcrição de genes relacionados com a maturação de frutos climatéricos (LIN et al., 2009).

Tabela 1 - Atividade da enzima ACC oxidase em maçãs ‘Galaxy’ após nove meses de armazenamento em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD), em diferentes temperaturas, com ou sem aplicação de 1-MCP, mais sete dias de vida de prateleira a 20 °C.

Tratamento	Atividade da enzima ACC oxidase (nL C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )			
	1,0 °C	1,5 °C	2,0 °C	Média
AC**	125,71	115,78	123,16	121,55 a
ACD-QR***	38,66	48,54	53,73	46,98 b
Média	82,2 B*	82,2 B	88,4 A	
Com 1-MCP****	39,11	31,65	34,03	34,93 b
Sem 1-MCP	125,27	132,67	142,86	133,60 a
Média	82,2 B	82,2 B	88,4 A	
	AC		ACD-QR	Média
Com 1-MCP	49,22 bA		20,64 bB	34,93 b
Sem 1-MCP	193,88 aA		73,32 aB	133,60 a
Média	121,55		46,98	
CV temp. (%)		4,78		
CV CA (%)		14,79		
CV 1-MCP (%)		17,04		

\*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

\*\*AC com 1,2 kPa O<sub>2</sub> e 2,0 kPa CO<sub>2</sub>.

\*\*\*QR de 1,5 e 1,2 kPa de CO<sub>2</sub>.

\*\*\*\* 1-Metilciclopropeno (0,625 µL L<sup>-1</sup>).

A temperatura de armazenamento não apresentou efeito sobre a produção de etileno dos frutos na análise de saída da câmara, independente da forma de armazenamento e uso de 1-MCP (Tabela 2). Porém aos seis dias de prateleira, a produção de etileno foi maior nos frutos armazenados em 2,0 °C, em relação àqueles armazenados nas menores temperaturas, com exceção daqueles em que foi aplicado 1-MCP, que manteve baixa a produção de etileno inclusive na maior temperatura. Resultados similares foram observados por Köpcke (2015), em que aumento da temperatura de armazenamento provocou acréscimo e maior concentração final de etileno nos frutos, sendo maior em ultra baixo oxigênio (ULO) que em ACD.

Tabela 2 - Produção de etileno em maçãs 'Galaxy' armazenadas por nove meses em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD), em diferentes temperaturas, com ou sem aplicação de 1-MCP, após a abertura das câmaras e aos seis dias de vida de prateleira a 20 °C.

Tratamento	Produção de Etileno – Saída da câmara ( $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )			
	1,0 °C	1,5 °C	2,0 °C	Média
AC**	1,85	2,30	1,97	2,04 a
ACD-QR***	0,28	0,19	0,42	0,29 b
Média	1,06 A*	1,24 A	1,19 A	
Com 1-MCP****	0,26	0,25	0,33	0,30 b
Sem 1-MCP	1,87	2,23	2,06	2,05 a
Média	1,06 A	1,24 A	1,19 A	
	AC		ACD-QR	
Com 1-MCP	0,26 bA		0,30 aA	0,30
Sem 1-MCP	3,82 aA		0,29 aB	2,05
Média	2,04		0,29	
CV temp. (%)			35,4	
CV AC (%)			39,5	
CV 1-MCP (%)			37,5	
----- Produção de Etileno – 6 dias a 20°C ( $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) -----				
	1,0 °C	1,5 °C	2,0 °C	Média
AC	16,12	18,61	20,51	18,41 a
ACD-QR	0,62	1,23	5,55	2,47 b
Média	8,37 B	9,92 B	13,03 A	
Com 1-MCP	0,27 bA	0,27 bA	0,15 bA	0,23
Sem 1-MCP	16,47 aB	19,57 aB	25,91 aA	20,65
Média	8,37	9,92	13,03	
	AC		ACD-QR	
Com 1-MCP	0,31 bA		0,16 bA	0,23
Sem 1-MCP	36,52 aA		4,78 aB	20,65
Média	18,41		2,47	
CV temp. (%)			20,0	
CV AC (%)			20,5	
CV 1-MCP (%)			20,8	

\* Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

\*\* AC com 1,2 kPa O<sub>2</sub> e 2,0 kPa CO<sub>2</sub>.

\*\*\* QR de 1,5 e 1,2 kPa de CO<sub>2</sub>.

\*\*\*\* 1-Metilciclopropeno (0,625  $\mu\text{L L}^{-1}$ ).

Houve interação dupla significativa entre as condições de armazenamento e aplicação de 1-MCP para a produção de etileno, tanto na análise de saída da câmara como aos seis dias a 20 °C (Tabela 2). Quando os frutos receberam 1-MCP não houve diferença significativa para este parâmetro entre AC e ACD-QR, entretanto sem 1-MCP, em todas as avaliações, a

produção de etileno foi menor nos frutos armazenados em ACD-QR. Na análise da saída da câmara observa-se efeito benéfico da aplicação de 1-MCP sobre a redução da produção de etileno nos frutos armazenados em AC convencional, enquanto que no armazenamento em ACD-QR os níveis de etileno não diferiram significativamente entre frutos tratados ou não, significando que a ACD-QR, por utilizar níveis baixos de O<sub>2</sub> e seu efeito sobre a produção de etanol, acabam interferindo na produção de etileno (PESIS, 2005; LIU et al., 2012), sem a necessidade de aplicação de 1-MCP. Após seis dias de exposição dos frutos a 20 °C, a produção de etileno dos frutos em ACD-QR sem 1-MCP foi estatisticamente superior aos com 1-MCP. Entretanto, esta produção ainda é bastante baixa quando comparada com o armazenamento em AC convencional e sem 1-MCP. Um pequeno restabelecimento na produção de etileno durante o período de prateleira é desejável, especialmente para produção de compostos voláteis e amadurecimento normal dos frutos (JOHNSTON et al., 2009; JUNG; WATKINS, 2011).

Na primeira avaliação da respiração dos frutos (saída da câmara), apenas a forma de armazenamento e a temperatura tiveram efeito significativo, sem interação entre os fatores. A respiração foi menor nos frutos armazenados em ACD-QR, independente da aplicação ou não de 1-MCP e temperatura de armazenamento (Tabela 3). Estes resultados estão de acordo com Weber et al (2015) que observaram menor respiração de maçãs 'Royal Gala' em ACD-QR, com QR de 2,0, em comparação com AC convencional. A menor respiração é um resultado da menor atividade da enzima ACC oxidase (Tabela 1) e menor produção de etileno por estes frutos (Tabela 2). Desta forma, pode-se afirmar que o armazenamento em ACD-QR é mais eficiente em reduzir o metabolismo dos frutos durante o armazenamento e manter a qualidade durante a vida de prateleira, em comparação à AC convencional. O aumento da temperatura de 1,0 para 2,0 °C causou uma redução na respiração dos frutos, na análise realizada na saída da câmara. Outros trabalhos também reportaram comportamento semelhante quanto à respiração dos frutos em relação à temperatura de armazenamento (BRACKMANN et al., 2008; WEBER et al., 2011), significando que nesta faixa de temperatura, com armazenamento em condições de O<sub>2</sub> bastante baixo, como as utilizadas no armazenamento em ACD, é desejável a utilização de temperaturas um pouco mais elevadas, diminuindo o metabolismo e sem causar danos aos frutos.

Tabela 3 - Respiração de maçãs ‘Galaxy’ armazenadas por nove meses em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD), em diferentes temperaturas, com ou sem aplicação de 1-MCP, após a abertura das câmaras e aos seis dias de vida de prateleira a 20 °C.

Tratamento	Respiração – Saída da câmara (mL CO <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )			
	1,0 °C	1,5 °C	2,0 °C	Média
AC**	6,52	6,07	5,15	5,91 a
ACD-QR***	4,85	3,21	3,03	3,70 b
Média	5,69 A*	4,64 B	4,09 C	
Com 1-MCP****	5,54	4,48	3,97	4,66 a
Sem 1-MCP	5,83	4,80	4,22	4,95 a
Média	5,69 A	4,64 B	4,09 C	
CV temp. (%)		4,00		
CV AC (%)		9,78		
CV 1-MCP (%)		9,09		
----- Respiração – 6 dias a 20°C (mL CO <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) -----				
	1,0 °C	1,5 °C	2,0 °C	Média
AC	6,28	8,14	6,19	6,86 a
ACD-QR	5,39	5,21	5,72	5,44 b
Média	5,83 A	6,67 A	5,95 A	
Com 1-MCP	5,41 aA	4,95 bA	3,92 bA	4,76
Sem 1-MCP	6,26 aB	8,40 aA	7,98 aAB	7,55
Média	5,83	6,67	5,95	
	AC		ACD-QR	
Com 1-MCP	4,80 bA		4,72 bA	4,76
Sem 1-MCP	8,94 aA		6,16 aB	7,55
Média	6,86		5,44	
CV temp. (%)		20,8		
CV AC (%)		23,8		
CV 1-MCP (%)		19,9		

\* Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

\*\* AC com 1,2 kPa O<sub>2</sub> e 2,0 kPa CO<sub>2</sub>.

\*\*\* QR de 1,5 e 1,2 kPa de CO<sub>2</sub>.

\*\*\*\* 1-Metilciclopropeno (0,625 µL L<sup>-1</sup>).

Na avaliação após seis dias de prateleira, a respiração também foi reduzida com o armazenamento em ACD-QR em comparação à AC convencional, evidenciando a eficiência desta técnica mesmo durante exposição à temperatura e atmosfera ambiente (Tabela 3). A temperatura de armazenamento praticamente não teve efeito sobre a respiração após este período. Entretanto, houve interação dupla significativa entre formas de armazenamento e aplicação de 1-MCP. Quando foi aplicado este produto, não houve diferença entre as formas de armazenamento, mas sem a aplicação de 1-MCP a respiração foi menor nos frutos

armazenados em ACD-QR. Em ambas as formas de armazenamento houve redução significativa da respiração com a aplicação de 1-MCP, no entanto, o efeito foi mais pronunciado para o armazenamento em AC convencional. Em ACD-QR a aplicação de 1-MCP possui menor efeito, pois a concentração de O<sub>2</sub> é monitorada constantemente e mantida próxima ao ponto de compensação anaeróbico (PCA), ou limite mínimo de oxigênio (GRAN; BEAUDRY, 1993), onde o metabolismo dos frutos é mínimo, ao contrário da AC convencional em que o O<sub>2</sub> é mantido em um nível seguro, porém superior ao PCA.

O armazenamento em níveis baixos de oxigênio, como os adotados em ACD, estimulam a rota fermentativa. Portanto, foi avaliada a produção de compostos da fermentação nas diferentes formas de armazenamento. A produção de etanol foi maior nos frutos armazenados em ACD-QR, comparado com AC convencional, como resposta à maior fermentação em função do nível de O<sub>2</sub> mais baixo (Tabela 4). Os produtos da fermentação não são necessariamente prejudiciais às células, desde que exista suprimento de energia suficiente para as funções celulares básicas e o acúmulo de voláteis não atinja níveis excessivos (WRIGHT et al., 2015), podendo ser benéfico quando presentes em baixas concentrações, pois inibem a enzima ACC oxidase, reduzem a produção de etileno e auxiliam no controle da escaldadura (PESIS, 2005; WRIGHT et al., 2015). A temperatura de armazenamento também apresentou efeito significativo sobre a produção de etanol, com maior produção na temperatura de 1,5 e 2,0 °C em ACD-QR e em AC com 2,0 °C, comparado com as menores temperaturas. A temperatura mais elevada aumenta o metabolismo, podendo causar regiões internas de anaerobiose nos frutos, provocando o aumento da produção de etanol, mesmo no armazenamento em AC. Além disso, a solubilidade do oxigênio diminui em temperaturas maiores, o que causa um incremento no limite mínimo de O<sub>2</sub> com o aumento da temperatura (WRIGHT et al., 2010).

A produção de acetato de etila, outro composto da fermentação, apresentou tendência semelhante à produção de etanol, como resposta aos diferentes tratamentos avaliados (dados não apresentados). O acetato de etila é formado a partir da combinação do Acetil CoA com o etanol, reação esta catalisada pela enzima Álcool Acil CoA Transferase (AAT) (LEE et al., 2012).

Na análise da produção de acetaldeído ocorreu interação tripla significativa entre os fatores estudados (Tabela 4). Ao contrário da produção de etanol, em que o 1-MCP não teve efeito, para o acetaldeído a aplicação deste composto manteve baixa a produção nos frutos em AC na temperatura de 1,5 e 2,0 °C e no armazenamento em ACD-QR em 1,0 °C. As temperaturas mais elevadas promoveram maior produção de acetaldeído, exceto no

armazenamento em ACD-QR sem 1-MCP, em que não houve diferença entre as três temperaturas.

Tabela 4 - Compostos da fermentação produzidos por maçãs 'Galaxy' armazenadas por nove meses em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD), em diferentes temperaturas, com ou sem aplicação de 1-MCP, após sete dias de vida de prateleira a 20 °C.

Tratamento	Etanol ( $\mu\text{L L}^{-1}$ )			
	1,0 °C	1,5 °C	2,0 °C	Média
AC**	41,8 bB	37,2 bB	64,9 bA	48,0
ACD-QR***	59,1 aB	93,7 aA	99,0 aA	83,9
Média	50,4	65,4	82,0	
Com 1-MCP****	45,5	64,0	80,8	63,4 a
Sem 1-MCP	55,4	66,9	83,1	68,4 a
Média	50,4 C	65,4 B	82,0 A	
	AC		ACD-QR	
Com 1-MCP	43,3		83,6	63,4 a
Sem 1-MCP	52,6		84,3	68,4 a
Média	48,0 B		83,9 A	
CV temp. (%)			13,9	
CV AC (%)			10,0	
CV 1-MCP (%)			12,8	
	----- Acetaldeído ( $\mu\text{L L}^{-1}$ ) -----			
		1,0 °C	1,5 °C	2,0 °C
AC	Com 1-MCP	3,88 aB	3,04 bB	6,64 bA
	Sem 1-MCP	5,07 aB	5,04 aB	10,07 aA
ACD-QR	Com 1-MCP	4,14 bB	6,22 aA	7,62 aA
	Sem 1-MCP	7,49 aA	7,25 aA	6,91 aA
Com 1-MCP	AC	3,88 a	3,04 b	6,64 a
	ACD-QR	4,14 a	6,22 a	7,62 a
Sem 1-MCP	AC	5,07 b	5,04 b	10,07 a
	ACD-QR	7,49 a	7,25 a	6,91 b
CV temp. (%)			13,4	
CV AC (%)			11,9	
CV 1-MCP (%)			16,7	

\* Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

\*\* AC com 1,2 kPa O<sub>2</sub> e 2,0 kPa CO<sub>2</sub>.

\*\*\* QR de 1,5 e 1,2 kPa de CO<sub>2</sub>.

\*\*\*\* 1-Metilciclopropeno (0,625  $\mu\text{L L}^{-1}$ ).

Na comparação entre as formas de armazenamento, quando ocorreu diferença entre a produção de acetaldeído, geralmente foi maior em ACD-QR, em função do baixo oxigênio

utilizado e indução do metabolismo fermentativo. Porém, para os frutos armazenados em AC, sem aplicação de 1-MCP e na temperatura de 2,0 °C, surpreendentemente houve alta produção de acetaldeído. Diferentemente da produção de compostos da fermentação que ocorre em resposta ao armazenamento em baixo O<sub>2</sub>, neste caso pode ter ocorrido acúmulo de acetaldeído em função do avanço da maturação e alto metabolismo destes frutos. À medida que a maturação avança, ocorrem danos às membranas celulares, com redução da atividade mitocondrial, resultando em menor produção de energia e ativação da rota fermentativa, que ocorre no citoplasma, como forma de suprir a demanda energética, aumentando a produção de compostos da fermentação (PESIS, 2005). Neste caso, a produção de acetaldeído pode ser melhor descrita como o resultado de um dano causado aos tecidos, ao invés de ser considerado o causador do dano aos frutos em função de sua alta concentração (WRIGHT et al., 2015). Esta afirmação pode ser comprovada pelo fato que nestes frutos a alta concentração de acetaldeído não inibiu a atividade da enzima ACC oxidase, produção de etileno e respiração dos frutos (Tabelas 1, 2 e 3), enquanto os frutos armazenados em ACD-QR, com maior produção de etanol e acetaldeído inibiram estes eventos. Também, os frutos armazenados em AC e sem 1-MCP e AC em alta temperatura (Tabela 6) tiveram alta ocorrência de polpa farinácea, o que comprova o avanço da maturação deste e a relação com maior concentração de acetaldeído.

A manutenção da firmeza de polpa é uma característica desejável durante o armazenamento prolongado de maçãs. De acordo com as análises estatísticas, para esta variável apenas ocorreu interação dupla significativa entre os fatores condição de armazenamento e aplicação de 1-MCP (Tabela 5). Desta forma, na comparação das médias dos tratamentos, o armazenamento em ACD-QR foi mais eficiente em manter a firmeza, quando comparado ao armazenamento em AC, independente da temperatura de armazenamento. Da mesma forma, a aplicação de 1-MCP também manteve maior a firmeza quando comparado aos frutos que não receberam esse tratamento. Entretanto, quando é realizado o desdobramento da interação dupla entre formas de armazenamento e aplicação de 1-MCP, observa-se maior preservação da firmeza no armazenamento em ACD-QR, independente da aplicação ou não de 1-MCP. Este efeito pode ser devido a menor produção de etileno dos frutos em atmosfera dinâmica comparado com AC, entretanto, este comportamento apenas foi observado nos tratamentos sem 1-MCP (Tabela 2 – interação formas de armazenamento x 1-MCP). O etileno atua sobre as enzimas que degradam a parede celular e o armazenamento em baixo O<sub>2</sub> mantém a firmeza de polpa e reduz o amadurecimento pela diminuição da produção de etileno (ORTIZ et al., 2011). Como a

firmeza dos frutos foi maior em ACD-QR comparada com AC convencional, mesmo com a aplicação de 1-MCP, sendo a produção de etileno semelhante nesta condição, é provável que também exista outro mecanismo atuando sobre as enzimas que degradam a parede celular nesta condição de armazenamento. De acordo com Pesis (2005), o etanol e acetaldeído atuam nas enzimas que degradam a parede celular. Possivelmente a maior produção destes compostos pelos frutos armazenados em ACD-QR (Tabela 4) possa ser responsável pela maior manutenção da firmeza mesmo com produção de etileno similar à AC convencional nos frutos que receberam 1-MCP. Apesar da aplicação de 1-MCP proporcionar maior firmeza, mesmo nos frutos em ACD-QR, a diferença da firmeza nestes foi de apenas 2,9 N, ao passo que no armazenamento em AC convencional a diferença entre frutos tratados e não tratados é de 8,1 N. Portanto, a maior eficiência do armazenamento em ACD-QR em reduzir o metabolismo dos frutos, diminui o efeito do 1-MCP sobre a manutenção da firmeza de polpa, de forma que é preciso reavaliar a necessidade de seu uso.

Apesar da diferença estatística na firmeza de polpa entre os frutos armazenados em 1,0 e 1,5 °C, esta diferença é pequena, sendo que o armazenamento em 2,0 °C não diferiu significativamente das outras duas temperaturas (Tabela 5). Portanto, o armazenamento em temperatura mais elevada não traz prejuízo à manutenção da firmeza dos frutos, apresentando o mesmo comportamento, independente de armazenados em AC ou ACD-QR e com ou sem 1-MCP. Estes resultados concordam com outros trabalhos que relatam a possibilidade de armazenar em temperatura mais elevada quando utilizado ACD ou aplicação de 1-MCP (KÖPCKE, 2015; KITTERMANN et al., 2015), mantendo a firmeza de polpa dos frutos.

Houve interação dupla significativa entre os parâmetros formas de armazenamento e temperatura para a variável acidez titulável (Tabela 5). Para os frutos armazenados em AC convencional a melhor temperatura é de 1,0 °C, enquanto em ACD-QR a temperatura de 2,0 °C manteve mais elevada a acidez dos frutos. Em AC convencional, as temperaturas mais elevadas aceleram o metabolismo dos frutos, degradando mais rapidamente os ácidos, uma vez que os mesmos são consumidos durante o processo respiratório, servindo como substratos para o ciclo de Krebs, gerando energia para reparo celular (TRAN et al., 2015). Por outro lado, o armazenamento em ACD-QR com a temperatura um pouco mais elevada é desejável pela possibilidade de economizar energia elétrica. Uma pequena diferença de temperatura nestas faixas utilizadas no armazenamento de maçãs pode significar grande economia de energia para o resfriamento dos frutos. Existem na literatura outros relatos de estratégias de armazenamento visando a economia de energia com o aumento da temperatura de armazenamento. De acordo com McCormick et al. (2012), maçãs ‘Gala’ podem ser

armazenadas em 4,0 °C, com aplicação de 1-MCP, mantendo qualidade similar aquelas armazenadas em 1,5°C e sem 1-MCP, com economia de energia de 35%, em um período de 28 semanas. Além disso, existem relatos de até 70% de economia com elevação da temperatura de 1,0 para 5,0 °C e aplicação de 1-MCP (KITTERMANN et al., 2015). No presente trabalho fica evidente que o armazenamento em ACD-QR pode ser realizado em temperatura mais elevada, mantendo a acidez dos frutos inclusive em níveis superiores ao armazenamento em AC convencional e temperatura de 1,0 °C mais baixa. Portanto esta também pode ser uma estratégia para economia de energia elétrica com o sistema de refrigeração.

Ainda com relação à acidez, os frutos com aplicação de 1-MCP mantiveram uma maior acidez quando comparado aos frutos sem 1-MCP (Tabela 5). Entretanto na análise do desdobramento entre formas de armazenamento x aplicação de 1-MCP, é possível constatar que nos frutos tratados com 1-MCP a acidez não difere estatisticamente entre AC e ACD-QR, enquanto que nos frutos sem tratamento com o produto, a acidez é estatisticamente superior em ACD-QR. Portanto, quando se opta por não utilizar a aplicação de 1-MCP, o armazenamento nesta condição traz benefícios para a manutenção da qualidade dos frutos. Apesar do benefício da aplicação de 1-MCP para as duas formas de armazenamento, em ACD-QR a diferença é de apenas 0,18 meq 100 mL<sup>-1</sup>, enquanto em AC é de 0,44 meq 100 mL<sup>-1</sup>, entre frutos tratados e não tratados com o produto.

A polpa farinácea foi o distúrbio fisiológico que mais causou danos para maçãs após o armazenamento mais sete dias a 20 °C, com ocorrência superior a 30%, dependendo da condição de armazenamento (Tabela 6). Houve interação dupla significativa para todos os fatores estudados, sendo que em todas as temperaturas avaliadas, sempre o armazenamento em ACD-QR foi mais eficiente em reduzir a ocorrência deste distúrbio. Da mesma forma, a aplicação de 1-MCP manteve menor porcentagem de frutos com polpa farinácea, independente da temperatura de armazenamento. A produção de etileno dos frutos armazenados nestas condições também foi significativamente inferior (Tabela 2), comprovando a relação do etileno com a ocorrência deste distúrbio. A sensação de polpa farinácea é percebida quando a força que mantém as células da polpa unidas é menor do que a força que mantém a integridade da parede celular. Isso acontece quando a protopectina da lamela média é transformada em pectina solúvel, diminuindo a coesão entre as células (PRASANNA et al., 2007). As enzimas que atuam sobre a degradação das pectinas são reguladas pelo etileno (WEI et al., 2010).

Tabela 5 - Firmeza de polpa e acidez titulável de maçãs 'Galaxy' armazenadas por nove meses em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD), em diferentes temperaturas, com ou sem aplicação de 1-MCP, mais sete dias de vida de prateleira a 20 °C.

Tratamento	Firmeza de Polpa (N)			
	1,0 °C	1,5 °C	2,0 °C	Média
AC**	65,1	64,1	64,1	64,4 b
QR***	69,2	67,6	70,0	68,9 a
Média	67,2 A*	65,9 B	67,0 AB	
Com 1-MCP****	70,5	68,6	69,2	69,4 a
Sem 1-MCP	63,8	63,1	64,9	63,9 b
Média	67,2 A	65,9 B	67,0 AB	
	AC		QR	
Com 1-MCP	68,5 aB		70,4 aA	69,4
Sem 1-MCP	60,4 bB		67,5 bA	63,9
Média	64,4		68,9	
CV temp. (%)			1,88	
CV AC (%)			1,95	
CV 1-MCP (%)			2,61	
----- Acidez Titulável (meq 100 mL <sup>-1</sup> ) -----				
	1,0 °C	1,5 °C	2,0 °C	Média
AC	4,37 aA	4,12 aB	4,27 bAB	4,25
QR	4,21 aB	4,13 aB	4,54 aA	4,29
Média	4,29	4,12	4,41	
Com 1-MCP	4,46	4,27	4,56	4,43 a
Sem 1-MCP	4,12	3,98	4,25	4,12 b
Média	4,29 A	4,12 B	4,41 A	
	AC		QR	
Com 1-MCP	4,47 aA		4,38 aA	4,43
Sem 1-MCP	4,03 bB		4,20 bA	4,12
Média	4,25		4,29	
CV temp. (%)			3,91	
CV AC (%)			3,99	
CV 1-MCP (%)			3,00	

\* Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

\*\* AC com 1,2 kPa O<sub>2</sub> e 2,0 kPa CO<sub>2</sub>.

\*\*\* QR de 1,5 e 1,2 kPa de CO<sub>2</sub>.

\*\*\*\* 1-Metilciclopropeno (0,625 µL L<sup>-1</sup>).

O desdobramento condição de armazenamento x aplicação de 1-MCP confirma a redução da polpa farinácea em ACD-QR comparada à AC convencional e também o efeito benéfico da aplicação de 1-MCP, independente da forma de armazenamento. Entretanto,

quando utilizado o QR 1,5, a diferença entre os tratamentos com e sem 1-MCP é de apenas 5,5% de frutos, enquanto que em AC convencional ocorreu 20,5% a mais de frutos com o distúrbio sem a aplicação de 1-MCP (Tabela 6). Isso demonstra que a condição de armazenamento com níveis de oxigênio extremamente baixos, como aqueles usados para obter um QR de 1,5, não causa estresse aos frutos. Em um trabalho com maçãs 'Royal Gala', Both et al. (2014) observaram aumento da ocorrência deste distúrbio com aplicação de estresse no início do período de armazenamento com baixo oxigênio, o que significa que nesta fase os frutos são muito suscetíveis ao baixo oxigênio. Assim, como no armazenamento em ACD-QR, o oxigênio sempre está próximo ao limite mínimo tolerado, este varia de acordo com o metabolismo dos frutos e, portanto, não causa estresse excessivo.

Quando os frutos permaneceram em ACD-QR, não houve diferença de polpa farinácea entre as diferentes temperaturas. Portanto, nesta condição de armazenamento pode-se utilizar a temperatura de 2,0 °C sem prejuízo à qualidade dos frutos. Entretanto, quando é utilizado o armazenamento em AC convencional, à medida que se aumenta a temperatura, ocorre acréscimo na porcentagem de frutos com este distúrbio. Estes resultados contrariam aqueles observados por Weber et al (2011), com maçãs 'Royal Gala', em que observaram menor polpa farinácea com temperatura mais elevada, em AC. No entanto naquele trabalho foi comparada a temperatura de 1,0 °C com outras menores, enquanto que no presente trabalho foram comparadas temperaturas superiores a 1,0 °C. Este fato sugere que em AC a temperatura ideal para menor ocorrência de polpa farinácea é 1,0 °C, enquanto que temperaturas superiores provocam a aceleração do metabolismo, com aumento do dano, o que não ocorre quando os frutos permanecem em condições de O<sub>2</sub> mais baixas como no armazenamento em ACD-QR.

A degenerescência de polpa é outro distúrbio que ocorre durante o armazenamento, sendo caracterizado pelo escurecimento da polpa. Dos fatores avaliados neste experimento apenas houve interação dupla significativa entre temperatura e 1-MCP para esta variável (Tabela 6). As formas de armazenamento AC convencional ou ACD-QR não influenciaram na ocorrência deste distúrbio. Por outro lado, a temperatura teve grande efeito, sendo que o aumento da temperatura até 2,0 °C proporcionou uma redução significativa na degenerescência de polpa, independente da forma de armazenamento. Estes resultados estão de acordo com Kweon et al. (2013), que observaram menor escurecimento interno em maçãs 'Fuji' armazenadas em 2,0 °C comparado a 0,0 °C, porém observaram que a firmeza de polpa e acidez também foi menor. No presente trabalho não houve prejuízo para estes parâmetros com o aumento na temperatura, quando utilizado o armazenamento em ACD-QR, justificando

a utilização de temperatura mais elevada nesta condição de armazenamento, mantendo os atributos físico-químicos dos frutos e reduzindo a ocorrência de distúrbios. Em maçãs ‘Royal Gala’ o aumento da temperatura de 0,5 para 1,0 °C também reduziu a ocorrência de degenerescência de polpa dos frutos armazenados em ACD-QR (WEBER et al., 2015).

Tabela 6 - Distúrbios fisiológicos em maçãs ‘Galaxy’ após nove meses de armazenamento em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD), em diferentes temperaturas, com ou sem aplicação de 1-MCP, mais sete dias de vida de prateleira a 20 °C.

Tratamento	Polpa Farinácea (%)			Média
	1,0 °C	1,5 °C	2,0 °C	
AC**	17,3 aB*	22,0 aAB	24,6 aA	21,3
ACD-QR***	9,4 bA	9,6 bA	5,3 bA	8,1
Média	13,3	15,8	14,9	
Com 1-MCP****	8,5 bA	6,3 bA	9,8 bA	8,2
Sem 1-MCP	18,2 aB	25,4 aA	20,1 aB	21,2
Média	13,3	15,8	14,9	
	AC		ACD-QR	
Com 1-MCP	11,1 bA		5,3 bB	8,2
Sem 1-MCP	31,6 aA		10,8 aB	21,2
Média	21,3		8,1	
CV temp. (%)		18,23		
CV AC (%)		15,41		
CV 1-MCP (%)		17,48		
	----- Degenerescência de Polpa (%) -----			
	1,0 °C	1,5 °C	2,0 °C	Média
AC	13,09	4,58	2,44	6,70 a
ACD-QR	13,96	8,58	0,67	7,74 a
Média	13,52 A	6,58 B	1,56 C	
Com 1-MCP	12,36 aA	7,02 aAB	3,12 aB	7,50
Sem 1-MCP	14,69 aA	6,15 aB	0,00 bC	6,95
Média	13,52	6,58	1,56	
	AC		ACD-QR	
Com 1-MCP	7,54		7,46	7,50 a
Sem 1-MCP	5,87		8,03	6,95 a
Média	6,70 A		7,74 A	
CV temp. (%)		26,24		
CV AC (%)		26,52		
CV 1-MCP (%)		29,99		

\* Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

\*\* AC com 1,2 kPa O<sub>2</sub> e 2,0 kPa CO<sub>2</sub>.

\*\*\* QR de 1,5 e 1,2 kPa de CO<sub>2</sub>.

\*\*\*\* 1-Metilciclopropano (0,625 µL L<sup>-1</sup>).

O escurecimento interno dos frutos está associado com o aumento da produção de acetaldeído, etanol e ésteres de etila (LEE et al., 2012). No presente trabalho, a produção destes compostos da fermentação foi maior nas temperaturas mais elevadas (Tabela 4), em que a degenerescência foi menor. Isso comprova que os níveis destes compostos produzidos nos tratamentos utilizados estão adequados, pois não causaram danos aos frutos e que provavelmente a degenerescência que ocorreu nos frutos caracteriza-se como um dano por baixa temperatura, pois foi maior nas menores temperaturas. No desdobramento temperatura x 1-MCP, constata-se uma diminuição na ocorrência de degenerescência com o aumento da temperatura até 2,0 °C, tanto para frutos com ou sem aplicação de 1-MCP. A aplicação deste produto não trouxe benefícios para redução do distúrbio durante o amadurecimento, sendo inclusive maior nos frutos que receberam 1-MCP, na temperatura de 2,0 °C. Resultados semelhantes foram obtidos por Jung & Watkins (2011), em que o tratamento de maçãs 'Empire' com 1-MCP aumentou a incidência e severidade de escurecimento de polpa, estando associado à maior atividade da enzima polifenoloxidase em frutos tratados com 1-MCP.

Na análise da porcentagem de frutos sadios ocorreu interação tripla significativa entre os fatores avaliados. Para os frutos armazenados em AC, exceto para a temperatura de 1,0 °C, a aplicação de 1-MCP proporcionou maior porcentagem de frutos sadios (Tabela 7). Ainda em AC convencional, com a aplicação de 1-MCP, a melhor temperatura de armazenamento foi de 1,5 °C, sem diferir significativamente de 2,0 °C, ao passo que sem aplicação do produto a maior porcentagem de frutos sadios foi com armazenamento em 1,0 °C. Quando foi utilizado o armazenamento em ACD-QR, a aplicação de 1-MCP trouxe resultados inconsistentes em relação à porcentagem de frutos sadios. Com a aplicação do produto, não houve diferença entre as temperaturas de armazenamento, ao passo que sem a aplicação de 1-MCP a melhor temperatura de armazenamento foi de 2,0 °C. Ainda, quando foi aplicado 1-MCP não houve diferença entre o armazenamento em AC convencional e ACD-QR, ao passo que nos frutos sem 1-MCP, exceto para a temperatura de 1,0 °C, o armazenamento em ACD-QR proporcionou maior quantidade de frutos sadios em comparação com AC convencional. Resultados semelhantes foram observados por Weber et al. (2015) em que ACD-QR 2,0 e 4,0 proporcionaram maior porcentagem de frutos sadios e, especialmente, na condição de temperatura mais elevada.

Em uma análise conjunta dos resultados da porcentagem de frutos sadios, comprova-se que para permitir um aumento da temperatura de armazenamento é necessário utilizar o

armazenamento em ACD ou aplicar 1-MCP aos frutos armazenados em AC convencional, a fim de reduzir o metabolismo para não ocorrer perdas.

Tabela 7 - Porcentagem de frutos sadios de maçãs ‘Galaxy’ após nove meses de armazenamento em atmosfera controlada (AC) ou atmosfera controlada dinâmica (ACD), em diferentes temperaturas, com ou sem aplicação de 1-MCP, mais sete dias de vida de prateleira a 20 °C.

Tratamento		Frutos sadios (%)		
		1,0 °C	1,5 °C	2,0 °C
AC**	Com 1-MCP****	77,6 aB*	86,2 aA	79,8 aAB
	Sem 1-MCP	70,8 aA	63,8 bAB	61,1 bB
ACD-QR***	Com 1-MCP	73,4 aA	79,7 aA	79,4 bA
	Sem 1-MCP	71,5 aB	71,4 bB	88,8 aA
Com 1-MCP	AC	77,6 a	86,2 a	79,8 a
	ACD-QR	73,4 a	79,7 a	79,4 a
Sem 1-MCP	AC	70,8 a	63,8 b	61,1 b
	ACD-QR	71,5 a	71,4 a	88,8 a
CV temp. (%)			7,96	
CV AC (%)			9,30	
CV 1-MCP (%)			6,26	

\* Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

\*\* AC com 1,2 kPa O<sub>2</sub> e 2,0 kPa CO<sub>2</sub>.

\*\*\* QR de 1,5 e 1,2 kPa de CO<sub>2</sub>.

\*\*\*\* 1-Metilciclopropeno (0,625 µL L<sup>-1</sup>).

#### 7.1.4 Conclusões

O armazenamento em ACD-QR, com níveis extremamente baixos de O<sub>2</sub> (< 0,25 kPa em média), reduz a atividade da enzima ACC oxidase, produção de etileno e respiração dos frutos e, portanto, mantém as qualidades físicas e químicas dos frutos e diminui a ocorrência de distúrbios em relação ao armazenamento em AC convencional.

A menor produção de etileno e redução do metabolismo dos frutos armazenados em ACD monitorados pelo QR dispensa a aplicação de 1-MCP, pelo menor benefício deste produto na manutenção da qualidade nesta condição de armazenamento.

No armazenamento em AC convencional com a aplicação de 1-MCP e, principalmente, em ACD pelo método do QR, mesmo sem aplicação de 1-MCP, pode-se usar

uma temperatura de armazenamento mais elevada nas câmaras, sem prejuízo à qualidade dos frutos, economizando energia com o sistema de refrigeração.

#### 7.1.5 Referências Bibliográficas

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

BOERSIG, M. R.; KADER, A. A.; ROMANI, R. J. Aerobic-anaerobic transition in pear fruit and cultured pear fruit cells. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.113, n.6, p.869-873, 1988.

BOTH, V.; BRACKMANN, A.; WEBER, A.; ANESE, R. O.; THEWES, F. R. Estresse inicial por baixo oxigênio seguido do armazenamento em atmosfera controlada de maçãs ‘Royal Gala’ **Revista Ciência Agrônômica**, v.45, n.4, p.708-717, 2014.

BUFLER, G. Ethylene-promoted conversion of 1-aminocyclopropene-1-carboxylic acid to ethylene in peel of apple at various stages of fruit development. **Plant Physiology**, v.80, n.2, p.539-543, 1986.

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

DeLONG, J. M. et al. A new technology that determines low-oxygen thresholds in controlled atmosphere-stored apples. **Hort Technology**, v.14, n.2, p.262-266, 2004.

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

JOHNSTON, J. W. et al. Co-ordination of early and late ripening events in apples is regulated through differential sensitivities to ethylene. **Journal of Experimental Botany**, v.60, n.9, p.2689-2699, 2009.

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

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

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

LIN, Z.; ZHONG, S.; GRIERSON, D. Recent advances in ethylene research. **Journal of Experimental Botany**, v.60, n.12, p.3311-3336, 2009.

LIU, W. W. et al. Ethanol treatment inhibits internal ethylene concentrations and enhances ethyl ester production during storage of oriental sweet melons (*Cucumis melo* var. makuwa Makino). **Postharvest Biology and Technology**, v.67, p.75-83, 2012.

KITTERMANN, D.; McCORMICK, R.; NEUWALD, D. A. Effect of high temperature and 1-MCP application on dynamic controlled atmosphere on energy savings during apple storage. **European Journal of Horticultural Science** v.80, n.1, p.33-38, 2015.

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

MATHOOKO, F. M.; TSUNASHIMA, Y.; KUBO, Y.; INABA, A. Expression of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene in peach (*Prunus pérsica* L.) fruit in response to treatment with carbon dioxide and 1-methylcyclopropene: possible role of ethylene. **African Journal of Biotechnology**, v.3, p.497-502, 2004.

McCORMICK, R.; NEUWALD, D. A.; STREIF, J. Commercial Apple CA Storage Temperature Regimes with 1-MCP (SmartFresh™): Benefits and Risks. **Acta Horticulturae**, v.934, p.263-270, 2012.

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

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

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

REBEAUD, S. G.; GASSER, F. Fruit quality as affected by 1-MCP treatment and DCA storage – a comparison of the two methods. **European Journal of Horticultural Science** v.80, n.1, p.18-24, 2015.

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

TRAN, D. T.; VERLINDEN, B. E.; HERTOOG, M.; NICOLAI, B. M. Monitoring of extremely low oxygen control atmosphere storage of 'Greenstar' apples using chlorophyll fluorescence. **Scientia Horticulturae**, v.184, p.18-22, 2015.

WEBER, A.; BRACKMANN, A.; ANESE, R. O.; BOTH, V.; PAVANELLO, E. P. 'Royal Gala' apple quality stored under ultralow oxygen concentration and low temperature conditions. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.46, n.12, p.1597-1602, 2011.

WEBER, A.; BRACKMANN, A.; BOTH, V.; PAVANELLO, E. P.; ANESE, R. O.; THEWES, F. R. Respiratory quotient: innovative method for monitoring 'Royal Gala' apple storage in a dynamic controlled atmosphere. ***Scientia Agricola***, v.72, n.1, p.28-33, 2015.

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

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

WRIGHT, A. H.; DELONG, J. M.; ARUL, J.; PRANGE, R. K. The trend toward lower oxygen levels during apple (*Malus x domestica* Borkh) storage - A review. ***Journal of Horticultural Science & Biotechnology***, v.90, n.1, p.1-13, 2015.

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

## 8 DISCUSSÃO GERAL

A busca por condições mais adequadas para o prolongado armazenamento de maçãs fez com que os trabalhos de pesquisa chegassem aos conhecimentos atuais, em que é possível monitorar o limite mínimo de oxigênio tolerado pelos frutos, em tempo real, de forma rápida e não-destrutiva (TRAN et al. 2015; WRIGHT et al., 2015). A partir desse conhecimento é possível estabelecer a pressão parcial de O<sub>2</sub> mais adequada a ser utilizada nas câmaras de armazenagem, para diminuir ao mínimo o metabolismo dos frutos, sem causar danos pela utilização de níveis excessivamente baixos de O<sub>2</sub>. No armazenamento em ACD existem duas formas de monitoramento do limite mínimo de O<sub>2</sub> com maior potencial de uso comercial e que foram objeto de estudo desta tese, que são a fluorescência de clorofila (ACD-FC) e o quociente respiratório (ACD-QR). No primeiro é aplicado um estresse inicial aos frutos, monitorado pela fluorescência de clorofila, com posterior aumento dos níveis de O<sub>2</sub>, permanecendo geralmente em 0,4 kPa durante o restante do período, pois a recomendação é manter 0,2 a 0,3 kPa de O<sub>2</sub> acima do nível quando houve o estresse (GASSER et al., 2008; TRAN et al., 2015). No método do QR, não ocorre o estresse inicial e os níveis de O<sub>2</sub> são ajustados ao limite mínimo de O<sub>2</sub> durante todo o período de armazenamento, permanecendo em média de 0,30 a 0,15 kPa, de acordo com dados obtidos nos experimentos realizados. Isso pode ser uma explicação para as diferenças encontradas entre estes dois métodos de ACD, no presente trabalho, quanto à qualidade dos frutos e produção de compostos voláteis.

Apesar dos avanços das pesquisas neste campo do armazenamento, muitos pontos ainda necessitam ser elucidados, especialmente no método do ACD-QR. Com relação ao melhor QR para o armazenamento, Weber et al. (2015) observaram melhor qualidade dos frutos após armazenamento em QR 2,0, entretanto não foram avaliados QR < 2,0. Portanto, este foi um dos objetivos de estudo do presente trabalho. Para a maçã ‘Royal Gala’, não houve grandes diferenças entre QR 1,5 e QR 2,0, apesar de uma tendência de melhor manutenção da qualidade em QR 1,5 (Artigo 2). Na comparação entre QR 1,5 e 1,7, na maçã ‘Fuji Kiku’, praticamente não houve diferença entre os dois tratamentos com relação à manutenção da qualidade, sendo ambos melhor que AC convencional (Artigo 4). Por outro lado, foi observado um incremento na produção de etanol, acetaldeído e acetato de etila, com o armazenamento em QR 2,0 na maçã ‘Royal Gala’ e QR 1,7 a maçã ‘Fuji’, sugerindo que o armazenamento em maiores níveis de QR, com menor pressão parcial de O<sub>2</sub>, poderiam trazer

problemas, uma vez que o excesso destes compostos da fermentação pode causar *off-flavour* e distúrbios nos frutos (KE et al., 1991; KE et al., 1993; TIETEL et al., 2011; WRIGHT et al., 2015), apesar de baixas concentrações serem benéficas para manutenção da qualidade (ECHEVERRÍA et al., 2008).

O efeito notório de armazenar em ACD-QR é sobre a redução da produção de etileno. Para todas as cultivares avaliadas houve uma redução drástica na produção deste fitormônio em ACD-QR comparado com o armazenamento em AC convencional e, algumas vezes, inferior à ACD-CF. Esta menor produção de etileno resulta em menor respiração e, portanto menor metabolismo. É importante destacar que este efeito persiste por todo o período de prateleira dos frutos, mantendo baixa a produção de etileno. Assim, nessa forma de armazenamento a aplicação de 1-MCP possui pouco efeito, pois as próprias condições de armazenamento já restringem a produção de etileno. Este efeito da ACD sobre a menor produção de etileno pode ser tanto devido à menor pressão parcial de O<sub>2</sub>, uma vez que o oxigênio é necessário para atividade da enzima ACC oxidase (YANG; HOFFMAN, 1984), como pela maior produção de etanol e acetaldeído nesta condição de armazenamento (Tabela 1 – Artigo 2; Tabela 4 – Artigo 4; Tabela 4 – Artigo 5), que reduzem a produção de etileno (ASODA et al., 2009; LIU et al., 2012; PESIS, 2005).

A aplicação de 1-MCP foi avaliada para as cultivares ‘Fuji Kiku’ (Artigo 4) e ‘Galaxy’ (Artigo 5), sendo que em ambas o armazenamento em ACD pode substituir a aplicação do produto, por proporcionar baixa produção de etileno e respiração, mantendo a qualidade. Para alguns parâmetros houve melhoria com a aplicação de 1-MCP em ACD, mas esse acréscimo foi bem inferior ao observado em AC convencional. Por outro lado, a aplicação do produto causou alguns danos nos frutos, especialmente na maçã ‘Fuji Kiku’, em que houve aumento da ocorrência de podridões (Tabela 7 – Artigo 4). De acordo com Leverentz et al. (2003), é possível que a menor produção de etileno nos frutos tratados com 1-MCP possa estar relacionada com menor indução de mecanismos de defesa da planta, que necessitam deste fitormônio para serem induzidas. Assim, um pequeno restabelecimento na produção de etileno durante o período de prateleira, como observado no armazenamento em ACD (Tabela 2 – Artigo 5 – 6 dias a 20°C), pode ser desejável para ativar as respostas de defesa.

A aplicação de 1-MCP é benéfica como estratégia para utilizar temperaturas de armazenamento mais elevadas no armazenamento em AC convencional (Artigo 5), concordando com Köpcke (2015) e Kittermann et al. (2015), que armazenaram maçãs em temperatura mais elevadas, em AC e com aplicação de 1-MCP, economizando energia com sistemas de refrigeração. Entretanto, no presente trabalho o armazenamento em QR 1,5 e com

temperatura de 2,0 °C, mesmo sem aplicação de 1-MCP, manteve a qualidade de forma semelhante ao armazenamento em AC, com temperatura de 1,0 °C e com aplicação do produto. Portanto, como estratégia para economizar energia com a refrigeração das câmaras, pode-se utilizar o armazenamento em ACD-QR, mantendo a temperatura mais elevada.

Com o aumento da temperatura de armazenamento, ocorre um incremento no limite mínimo de O<sub>2</sub>, pois a solubilidade do O<sub>2</sub> diminui com a elevação da temperatura (WEBER et al., 2011; WRIGHT et al., 2010). No armazenamento em ACD-QR, o limite mínimo de O<sub>2</sub> é monitorado e ajustado diariamente, permitindo manter o O<sub>2</sub> sempre próximo do limite mínimo. Assim, mesmo com temperatura mais elevada, é possível manter a pressão parcial de O<sub>2</sub> próximos do limite mínimo, mesmo que seja necessário estar em níveis mais altos, preservando assim a qualidade dos frutos. Isso difere este método do armazenamento em AC, onde os níveis de O<sub>2</sub> são estáticos e, mesmo da ACD-FC, em que após o estresse inicial, também não há mais variação do oxigênio durante o armazenamento.

A pressão parcial de CO<sub>2</sub> durante o armazenamento em ACD ainda foi pouco estudada, sobretudo em ACD-QR, com níveis extremamente baixos de O<sub>2</sub>, sendo sugerida uma redução equivalente entre O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (ZANELLA et al., 2005). A manutenção de níveis bastante baixos de CO<sub>2</sub> exigiria a aquisição de equipamentos com maior capacidade de adsorção e acionamento mais frequente, gerando custos adicionais em câmaras comerciais (GASSER et al., 2008). Portanto, nos trabalhos desta tese foram avaliados diferentes níveis de CO<sub>2</sub> para duas cultivares. Para maçã ‘Galaxy’, mais tolerante ao CO<sub>2</sub>, foi observado que níveis de até 1,6 kPa de CO<sub>2</sub> não afetam a qualidade e ocorrência de distúrbios, porém, níveis mais elevados podem causar problemas em ACD-QR 1,5 (Tabela 2 - Artigo 3). Em ACD-FC não há diferença na manutenção da qualidade entre os níveis de CO<sub>2</sub>, porém, o armazenamento em ACD-FC não é superior ao ACD-QR, mesmo no maior nível de CO<sub>2</sub> e isso é compensado pelo efeito benéfico da menor pressão parcial de O<sub>2</sub> e maior produção de compostos da fermentação em ACD-QR, em relação ao efeito negativo do alto CO<sub>2</sub> nesta condição.

Para a maçã ‘Fuji Kiku’, mais suscetível ao alto CO<sub>2</sub>, foram testados dois níveis de CO<sub>2</sub> (0,8 e 1,4 kPa). De uma forma geral, não houve problemas com a utilização da maior pressão parcial de CO<sub>2</sub>, inclusive apresentou um efeito benéfico sobre a redução da podridão nos frutos tratados com 1-MCP (Artigo 4 – Tabela 7). Na maçã ‘Fuji’ armazenada em alto CO<sub>2</sub> ocorre maior degenerescência (ARGENTA et al., 2002; CORRÊA et al., 2010), o que não foi observado no presente trabalho. Este fato necessita ser melhor investigado, uma vez que os dados da literatura sobre CO<sub>2</sub> em ‘Fuji’ são com o armazenamento em AC

convencional e não em ACD-QR, como neste trabalho. É possível que, com o menor metabolismo em ACD ocorra menor acúmulo interno de CO<sub>2</sub> durante o período de armazenamento, resultando em menores problemas nesta condição de armazenamento. Além disso, existe uma variação de acordo com a localização do pomar e a temperatura em que os frutos se desenvolvem no campo (CORRÊA et al., 2010), portanto, caso estas informações sejam confirmadas em outros trabalhos, os limites de CO<sub>2</sub> para o armazenamento em ACD, para estas duas cultivares testadas no presente trabalho, são bastante próximas.

O armazenamento em ACD-QR apresentou resultados iguais ou melhores que ACD-FC, como, por exemplo, o efeito benéfico sobre a manutenção da firmeza de polpa em maçãs ‘Galaxy’ (Tabela 1 – Artigo 3) e redução da produção de etileno e respiração em ‘Royal Gala’, especialmente com QR 1,5 (Figura 2 – Artigo 2). Estes resultados podem ser devido ao armazenamento com menores níveis de O<sub>2</sub> em ACD-QR (mais próximo do limite mínimo), bem como ao efeito negativo do estresse inicial por baixo O<sub>2</sub> que ocorre em ACD-FC e que não acontece em ACD-QR. Trabalhos anteriores evidenciaram que o estresse inicial por baixo O<sub>2</sub> não traz benefícios para maçãs produzidas no Brasil, podendo prejudicar a qualidade dos frutos armazenados (BOTH et al., 2014a; BRACKMANN, et al., 2012). Além disso, diferentes cultivares e variações na condição climática entre os diferentes anos de cultivo, interferem no limite mínimo de O<sub>2</sub> tolerado pelos frutos durante o armazenamento (GASSER; VON ARX, 2015). Em função do monitoramento constante do limite mínimo de O<sub>2</sub>, o armazenamento em ACD-QR pode detectar com mais facilidade estas variações, adequando o nível de O<sub>2</sub> e mantendo constante o QR e o metabolismo dos frutos.

Vários trabalhos na literatura reportam o efeito negativo da AC sobre a produção de compostos voláteis em maçãs (MATTHEIS et al., 2005; LARA et al., 2006; LÓPEZ et al., 2007; PLOTTO et al., 1999). Entretanto, a manutenção dos demais atributos de qualidade, por um período prolongado de armazenamento, somente são obtidos com a utilização de baixos níveis de O<sub>2</sub> e/ou outras formas de controle da síntese ou ação do etileno, a exemplo da aplicação de aminoetoxivinilglicina (AVG) ou 1-MCP, que também comprometem a produção de voláteis (BANGERTH et al., 2012; MATTHEIS et al., 2005).

Assim, os trabalhos realizados nesta tese buscaram avaliar outras formas de armazenamento, superiores à AC convencional, a exemplo do armazenamento em níveis extremamente baixos de O<sub>2</sub> (ULO – *Ultra Low Oxygen*), bem como o armazenamento em ACD. No primeiro trabalho, realizado em ULO (Artigo 1), foi observado que condições de O<sub>2</sub> de até 0,7 kPa não afetam de forma pronunciada a produção de voláteis, inclusive mantendo maior a concentração do éster acetato de 2-metil butila, um volátil de impacto da maçã ‘Royal

Gala' (YOUNG et al., 1996). Por outro lado, a redução de O<sub>2</sub> para 0,5 kPa, provocou uma redução maior na produção de certos ésteres, especialmente de cadeia linear. Uma hipótese é de que com a menor respiração nesta condição de armazenamento, poderia ocorrer menor produção de ATP e síntese de ácidos graxos, que são precursores de compostos voláteis (BANGERTH et al., 2012). A biossíntese de ácidos graxos necessita de grande quantidade de energia, geralmente supridas pelo ATP, NADH e NADPH (SAQUET et al., 2003), enquanto que a enzima lipoxigenase (LOX) necessita de O<sub>2</sub> para sua atividade, em que é oxidado o ácido linoleico, produzindo precursores de ésteres (BRACKMANN et al., 1993; LARA et al., 2006).

No segundo trabalho realizado (Artigo 2), foram avaliados os compostos voláteis em ACD e, portanto, em níveis de O<sub>2</sub> menores que em ULO. Um ponto a ser considerado é que no armazenamento em ACD-QR, houve maior produção de compostos voláteis em relação à ACD-FC, sendo que nesta última condição os níveis de O<sub>2</sub> foram maiores durante o armazenamento e houve maior respiração e produção de etileno. Então, provavelmente, não é apenas a menor disponibilidade de energia que afeta a produção de voláteis em baixo O<sub>2</sub>, como considerado anteriormente. No armazenamento em ACD-FC ocorre um estresse inicial por baixo O<sub>2</sub>, que não acontece em ACD-QR. Este estresse pode interferir na expressão gênica para enzimas da rota de produção de voláteis ou de precursores destes compostos, enquanto que em ACD-QR ocorre uma adaptação ao baixo oxigênio e sem estresse. Além da menor produção de voláteis em ACD-FC, os demais atributos de qualidade também foram iguais ou inferiores ao armazenamento em ACD-QR. Por outro lado, em AC convencional a produção de voláteis foi maior, porém a firmeza de polpa, acidez e porcentagem de frutos sadios foi inferior e houve maior incidência de distúrbios, comparado com ACD-QR (Figura 3 – Artigo 2). Uma vez que a aceitação por parte dos consumidores depende desta interação complexa entre aroma, textura e relação entre ácidos e açúcares (LÓPEZ et al., 2007), provavelmente estes frutos teriam uma boa aceitação.

Na comparação dentro dos dois níveis de ACD-QR, o QR 2,0, com menor concentração de O<sub>2</sub>, proporcionou maior produção de voláteis em relação ao QR 1,5, mesmo para ésteres de cadeia linear (Tabela 1 – Artigo 2), que até então eram relacionados como sendo suprimidos pelo baixo O<sub>2</sub> (BANGERTH et al., 2012; BRACKMANN et al., 1993). Esta comprovação necessita ser melhor investigada pois nenhum trabalho com voláteis foi realizado até o momento com níveis de O<sub>2</sub> tão baixos e por tempo prolongado. Nesta condição ocorre a ativação do metabolismo fermentativo e, portanto, o estímulo de enzimas desta via, que podem auxiliar na produção de voláteis e intermediários de maneira diferenciada ao

armazenamento em ULO. O entendimento da rota de produção de voláteis é complexo. Lara et al. (2006) observaram que, pela avaliação da atividade da enzima LOX, apenas é possível separar os frutos em armazenamento refrigerado daqueles em AC, quanto à produção de voláteis, não diferindo os níveis de 1,0 e 3,0 kPa de O<sub>2</sub> (a atividade da enzima era igual entre os dois níveis de O<sub>2</sub>). Já a presença de álcoois precursores de ésteres para os frutos armazenados nos dois níveis de O<sub>2</sub> eram diferentes. Assim constataram que não era a enzima álcool acetil transferase (AAT) a limitante para produção de voláteis em 1,0 kPa, mas sim a disponibilidade de substrato que, por sua vez, depende da atividade de enzimas que atuam anteriormente na rota de formação de precursores. Portanto, possivelmente esta rota de formação de precursores seja alterada pelo metabolismo fermentativo, com um aumento na produção de voláteis em ACD-QR, especialmente com QR 2,0, em relação à ACD-FC.

## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De uma forma geral, a manutenção da qualidade dos frutos em função das condições de armazenamento ocorre na seguinte ordem: ACD-QR > ACD-FC > AC convencional. Ocorreu maior produção de compostos da fermentação nos maiores QRs (QR 2,0 para maçã ‘Royal Gala’ e QR 1,7 para a ‘Fuji Kiku’), mas sem grandes alterações na qualidade em relação ao QR 1,5. Entretanto, a maçã ‘Royal Gala’ apresentou uma tendência de melhor qualidade com QR 1,5.

A aplicação de 1-MCP em maçã ‘Galaxy’ e ‘Fuji Kiku’ armazenadas em ACD-QR não melhora a qualidade em relação aos frutos sem a aplicação do produto, inclusive, aumenta a ocorrência de podridões em ‘Fuji Kiku’.

É possível elevar a temperatura de armazenamento de maçãs ‘Galaxy’ para 2,0 °C em ACD-QR, com boa manutenção da qualidade, ou associando 1-MCP ao armazenamento em AC convencional. A partir dos bons resultados obtidos com o armazenamento em temperatura mais elevada, fica a sugestão para em trabalhos futuros serem avaliadas temperaturas maiores em ACD-QR, buscando maior economia de energia.

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se utilizar até 1,4 kPa de CO<sub>2</sub> no armazenamento de maçã ‘Fuji Kiku’ em ACD-QR 1,5 e de até 1,6 kPa para maçã ‘Galaxy’. Em ACD-FC, esta última pode ser armazenada em até 2,0 kPa de CO<sub>2</sub>.

Há redução da produção de alguns compostos voláteis, especialmente ésteres de cadeia linear, com o armazenamento em níveis extremamente baixos de O<sub>2</sub> (0,5 – 0,7 kPa), enquanto que a produção de outros compostos de impacto para o aroma de maçãs não são alterados nesta condição de armazenamento, em comparação com a AC convencional.

Em ACD, ocorre um comportamento semelhante quando se utiliza o método do ACD-QR, entretanto em ACD-FC a produção de compostos voláteis é drasticamente reduzida, provavelmente em função do estresse inicial por baixo O<sub>2</sub>.

A menor produção de alguns ésteres em ACD-QR, comparado com AC convencional, pode ser compensada pela maior firmeza de polpa e acidez e menor ocorrência de distúrbios fisiológicos, influenciando na aceitabilidade pelos consumidores.

Ainda com relação aos voláteis, fica a sugestão para em trabalhos futuros ser comparado o armazenamento em ACD-QR com 1-MCP + AC convencional, em temperaturas maiores, uma vez que o 1-MCP possui efeitos negativos sobre a produção de voláteis.



## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAPOMI, Associação Gaúcha dos Produtores de Maçã. Disponível em: [http://www.agapomi.com.br/arquivos/Evol.\\_Ma\\_\\_s.pdf](http://www.agapomi.com.br/arquivos/Evol._Ma__s.pdf). 2014. Acessado em: 16 abr. 2015.

ARGENTA, L.; FAN, X.; MATTHEIS, J. P. Responses of ‘Fuji’ apples to short and long duration exposure to elevated CO<sub>2</sub> concentration. **Postharvest Biology and Technology**, v.24, p.13-24, 2002.

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

BANGERTH, F.; SONG, J.; STREIF, J. Physiological impacts of fruit ripening and storage conditions on aroma volatile formation in apple and strawberry fruit: a review. **Hort Science**, v.47, p.4–10, 2012.

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

BOERSIG, M. R.; KADER, A. A.; ROMANI, R. J. Aerobic-anaerobic transition in pear fruit and cultured pear fruit cells. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.113, n.6, p.869-873, 1988.

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

BOTH, V. et al. Estresse inicial por baixo oxigênio seguido do armazenamento em atmosfera controlada de maçãs ‘Royal Gala’. **Revista Ciência Agronômica**, v.45, n.4, p.708-717, 2014a.

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

BRACKMANN, A. et al. Manejo do etileno e sua relação com a maturação de maçãs ‘Gala’ armazenadas em atmosfera controlada. **Bragantia**, v.68, n.2, p.519-525, 2009.

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

BRACKMANN, A. et al. Qualidade da maçã cv. Gala tratada com 1-metilciclopropeno. **Ciência Rural**, v.34, n.5, p.1415-1420, 2004.

BRACKMANN, A., STREIF, J., BANGERTH, F., Relationship between a reduced aroma production and lipid metabolism of apples after long-term controlled-atmosphere storage. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.118, p.243-247, 1993.

BRACKMANN, A.; BORTOLUZ, L.; BORTOLUZZI, G. Frigoconservação de maçã 'Fuji' em duas temperaturas e em atmosfera controlada. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.4, p.26-30, 1998.

BRACKMANN, A.; STEFFENS, C. A.; WACLAWOVSKY, A. J. Influência da época de colheita e do armazenamento em atmosfera controlada na qualidade da maçã 'Braeburn'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.3, p.295-301, 2002.

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

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

CORRÊA, T. R. et al. Qualidade de maçãs 'Fuji' armazenadas em atmosfera controlada e influência do clima na degenerescência da polpa, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.6, p.531-538, 2010.

CUNNINGHAM, D. G. et al. Charm analysis of apple volatiles. **Food Chemistry**, v.19, p.137-147, 1986.

DeLONG, J. M. et al. A new technology that determines low-oxygen thresholds in controlled atmosphere-stored apples. **Hort Technology**, v.14, n.2, p.262-266, 2004.

DeLONG, J. M. PRANGE, R. K., HARRISON, P. A. Chlorophyll fluorescence-based low-O<sub>2</sub> CA storage of organic 'Cortland' and 'Delicious' apples. **Acta Horticulturae**, v.737, p. 31-37, 2007.

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

ECHEVERRÍA, G. et al. Aroma volatile compounds of 'Fuji' apples in relation of harvest date and cold storage technology – A comparison of two seasons. **Postharvest Biology and Technology**, v.32, p.29-44, 2004.

ECHEVERRÍA, G. et al. Physicochemical measurements in 'Mondial Gala' apples stored at diferente atmospheres: influence in consumer acceptability. **Postharvest Biology and Technology**, v.50, p.135-144, 2008.

FAN, X.; MATTHEIS, J.P.; BLANKENSHIP, S. Development of superficial scald, coreflush, and peel greasiness is reduced by MCP. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, n.8, p.3063-3068, 1999.

FAWBUSH, F.; NOCK, J. F.; WATKINS, C. B. External carbon dioxide injury and 1-methylcyclopropene (1-MCP) in the 'Empire' apple. **Postharvest Biology and Technology**, v.48, p.92-98, 2008.

FELLMAN, J. K. et al. Ester biosynthesis in 'Rome' apples subjected to low-oxygen atmospheres, **Postharvest Biology and Technology**, v.3, p.201-214, 1993.

FELLMAN, J. K. et al. Factors that influence biosynthesis of volatile flavor compound in apple fruits. **HortScience**, v.35, p.1026-1033, 2000.

FORNEY, C. F.; KALT, W.; JORDAN, M. A. The composition of strawberry aroma is influenced by cultivar, maturity and storage. **Hort Science**, v.35, p.1022-1026, 2000.

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

GASSER, F.; VON ARX, K. Dynamic CA storage of organic apple cultivars. **Acta Horticulturae**, v.1071, p.527-532, 2015.

GORNY, J. R.; KADER, A. A. Low oxygen and elevated carbon dioxide atmospheres inhibit ethylene biosynthesis in preclimacteric and climacteric apple fruits. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.122, n.4, p.542-546, 1997.

GOUT, E. 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. Determination of the low oxygen limit for several commercial apple cultivars by respiratory quotient breakpoint. **Postharvest Biology and Technology**, v.3, p.259-267, 1993.

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

KE, D. et al. Regulation of fermentative metabolism in avocado fruit under oxygen and carbon dioxide stresses. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.120, n.3, p.481-490, 1995.

KE, D.; MATEOS, M.; KADER, A. A. Regulation of fermentative metabolism in fruits and vegetables by controlled atmospheres. In: International Controlled Atmosphere Research Conference, 6<sup>th</sup>. **Proceedings...** Cornell University, Ithaca, NY, p.63-77, 1993.

KE, D.; RODRIGUEZ-SINOBAS, L.; KADER, A. A. Physiology and prediction of fruit tolerance to low-oxygen atmospheres. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v.116, n.2, p.253-260, 1991.

KITTERMAN, D.; McCORMICK, R.; NEUWALD, D. A. Effect of high temperature and 1-MCP application or dynamic controlled atmosphere on energy savings during apple storage. **European Journal of Horticultural Science**, v.80, p.33-38, 2015.

KONDO, S. et al. Aroma volatile biosynthesis in apple affected by 1-MCP and methyl jasmonate. **Postharvest Biology and Technology**, v.36, p. 61-68, 2005.

KÖPCKE, D. 1-Methylcyclopropene (1-MCP) and dynamic controlled atmosphere (DCA) applications under elevated storage temperatures: effects on fruit quality of 'Elstar', 'Jonagold' and 'Gloster' apple (*Malus domestica* Borkh.). **European Journal of Horticultural Science**, v.80, n.1, p.25-32, 2015.

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

KUBO, Y.; INABA, A.; NAKAMURA, R. Respiration and C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> production in various harvested crops held in CO<sub>2</sub>-enriched atmospheres. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.115, n.6, p.975-978, 1990.

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

LARA, I. et al. Multivariate analysis of modifications in biosynthesis of volatile compounds after CA storage of 'Fuji' apples. **Postharvest Biology and Technology**, v.39, p.19-28, 2006.

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

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

LEVERENTZ, B. et al. Effect of combining MCP treatment, heat treatment, and biocontrol on the reduction of postharvest decay of 'Golden Delicious' apples. **Postharvest Biology and Technology**, v.27, p.221-233, 2003.

LIU, S. et al. Effects of CO<sub>2</sub> on respiratory metabolism in ripening banana fruit. **Postharvest Biology and Technology**, n.33, p.27-34, 2004.

LIU, W. W. et al. Ethanol treatment inhibits internal ethylene concentrations and enhances ethyl ester production during storage of oriental sweet melons (*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino). **Postharvest Biology and Technology**, v.67p.75-83, 2012.

LÓPEZ, M. L. et al. Volatile compounds, quality parameters and consumer acceptance of 'Pink Lady' apples stored in different conditions. **Postharvest Biology and Technology**, v.43, p.55-66, 2007.

LUDWIG, V. et al. Influência do armazenamento em atmosfera controlada dinâmica e aplicação de 1-MCP sobre a produção de etileno e respiração de maçãs 'Galaxy'. In: JORNADA ACADÊMICA INTEGRADA, 29., 2014. Santa Maria. **Anais eletrônicos...** Santa Maria: UFSM, 2014. Disponível em: <<http://portal.ufsm.br/jai/trabalho/arquivo.html?arquivo=14081>>. Acesso em: 25 abr. 2015.

LUMPKIN, C.; FELLMAN, J. K.; RUDELL, D. R.; MATTHEIS, J. P. 'Fuji' apple (*Malus domestica* Borkh.) volatile production during high pCO<sub>2</sub> controlled atmosphere storage. **Postharvest Biology and Technology**, v.100, p.234-243, 2015.

MATTHEIS, J. P.; FAN, X.; ARGENTA, L. C. Interactive Responses of Gala Apple Fruit Volatile Production to Controlled Atmosphere Storage and Chemical Inhibition of Ethylene Action. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.4510-4516, 2005.

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

McCORMICK, R.; NEUWALD, D. A.; STREIF, J. Commercial Apple CA Storage Temperature Regimes with 1-MCP (SmartFresh™): Benefits and Risks. **Acta Horticulturae**, v.934, p.263-270, 2012.

MEHINAGIC, E. et al. Characterisation of odor-active volatiles in apples: Influence of cultivars and maturity stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.2678–2687, 2006.

NEUWALD, D. A. et al. Conservação da qualidade de maçãs devido aos avanços nas técnicas de armazenamento. **Jornal da Fruta**, n.253, p.19-21, 2012.

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

PLOTTO, A.; Mc. DANIEL, M. R.; MATTHEIS, J. P. Characterisation of changes in 'Gala' apple aroma during storage using Osme analysis, a gas chromatography-olfactometry technique. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.125, p.714-722, 2000.

PLOTTO, A.; McDANIEL, M. R.; MATTHEIS, J. P. Characterization of 'Gala' apple aroma and flavor: difference between controlled atmosphere and air storage. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v.124, n.4, p.416-423, 1999.

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, 2005a.

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

RAFFO, A. et al. Impact of innovative controlled atmosphere storage technologies and postharvest treatments on volatile compound production in cv. Pinova apples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.915-923, 2009.

REBEAUD, S. G.; GASSER, F. Fruit quality as affected by 1-MCP treatment and DCA storage – a comparison of the two methods. **European Journal of Horticultural Science**, v.80, n.1, p.18-24, 2015.

REETZ, E. R. et al. **Anuário Brasileiro da Fruticultura 2014**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2015. 104p.

RICH, P. R. The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. **Biochemical Society Transactions**, v.31, p.1095-1105, 2003.

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

SAQUET, A. A.; BRACKMANN, A.; STORCK, L. Armazenamento de maçã 'Gala' sob diferentes temperaturas e concentrações de oxigênio e gás carbônico. **Ciência Rural**, v.27, n.3, p.399-405, 1997.

SAQUET, A. A.; STREIF, J. Fermentative metabolism in 'Conference' pears under various storage conditions. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.81, n.5, p.910-914, 2006.

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

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. Impaired aroma production of CA-stored 'Jonagold' apples as affected by adenine and pyridine nucleotide levels and fatty acid concentrations. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.78, n.5, p.695-705, 2003.

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

SONG, J.; BANGERTH, F. Fatty acids as precursor for aroma volatile biosynthesis in pre-climacteric and climacteric apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.30, p.113-121, 2003.

STEFFENS, C. A.; BRACKMANN, A.; PINTO, J. A. V.; EISERMANN, A. C. Taxa respiratória de frutos de clima temperado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.3, p.313-321, 2007.

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

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

TIETEL, Z. et al. Elucidating the roles of ethanol fermentation metabolism in causing off-flavors in mandarin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.11779-11785, 2011.

TRAN, D. T. et al. Monitoring of extremely low oxygen control atmosphere storage of 'Greenstar' apples using chlorophyll fluorescence. **Scientia Horticulturae**, v.184, p.18-22, 2015.

VAN SCHAİK, A. C. R. et al. A new interactive storage concept: dynamic control of respiration. **Acta Horticulturae**, v.1071, p.245-251, 2015.

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

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

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

WEBER, A. **Aplicação de produtos da fermentação e ultrabaixo oxigênio para a conservação de maçãs 'Royal Gala'**. 2010. 90 f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

WEBER, A. et al. 'Royal Gala' apple quality stored under ultralow oxygen concentration and low temperature conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.26, p.1597-1602, 2011.

WEBER, A. et al. Respiratory quotient: innovative method for monitoring 'Royal Gala' apple storage in a dynamic controlled atmosphere. **Scientia Agricola**, v.72, p.28-33, 2015.

WILD, H. P. J.; WOLTERING, E. J.; PEPPELENBOS, H. W. Carbon dioxide and 1-MCP inhibit ethylene production and respiration of pears fruit by different mechanisms. **Journal of Experimental Botany**, v.50, n.335, p.837-844, 1999.

WRIGHT, A. H. et al. The interrelationship between the lower oxygen limit, chlorophyll fluorescence and the xanthophyll cycle in plants. **Photosynthesis Resesarch**, v.107, p.223-235, 2011.

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

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

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

YOUNG, H. et al. Causal effect of aroma compounds on Royal Gala apple flavours. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.71, p.329-336, 1996.

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

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