

**INFLUÊNCIA DO REVESTIMENTO DE QUITOSANA NA ATIVIDADE
RESPIRATÓRIA, NA EMISSÃO DE ETILENO E NOS PROCESSOS DE
AMADURECIMENTO DA GOIABA 'CORTIBEL'**

ANDRÉ VICENTE DE OLIVEIRA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
NOVEMBRO – 2017**

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

O48

Oliveira, Andre Vicente de.

Influência do revestimento de quitosana na atividade respiratória, na emissão de etileno e nos processos de amadurecimento da goiaba / Andre Vicente de Oliveira. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2017.

68 f. : il. Bibliografia: 55 - 68.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2017.

Orientador: Jurandi Goncalves de Oliveira.

1. Quitosana. 2. Pós-colheita. 3. Psidium guajava. 4. Etileno. 5. Espécies reativas de oxigênio. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

INFLUÊNCIA DO REVESTIMENTO DE QUITOSANA NA ATIVIDADE
RESPIRATÓRIA, NA EMISSÃO DE ETILENO E NOS PROCESSOS DE
AMADURECIMENTO DA GOIABA 'CORTIBEL'

ANDRÉ VICENTE DE OLIVEIRA

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal.

Orientador: Jurandi Gonçalves Oliveira
Coorientador: Luis Miguel Mazorra Morales

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
NOVEMBRO – 2017

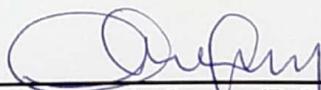
INFLUÊNCIA DO REVESTIMENTO DE QUITOSANA NA ATIVIDADE
RESPIRATÓRIA, NA EMISSÃO DE ETILENO E NOS PROCESSOS DE
AMADURECIMENTO DA GOIABA

ANDRÉ VICENTE DE OLIVEIRA

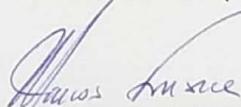
Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal.

Aprovado em 28 novembro de 2017

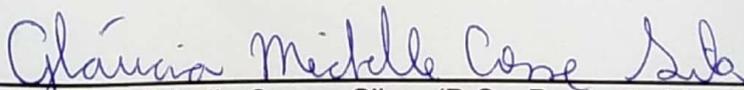
Comissão Examinadora



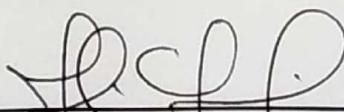
Prof. Cláudio Luiz Melo de Souza (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF



Prof. Marcos José de Oliveira Fonseca
(D.Sc., Produção Vegetal) – EMBRAPA/CTAA



Gláucia Michelle Cosme Silva (D.Sc. Produção Vegetal)



Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira
(D.Sc. Biologia Vegetal) – UENF
(Orientador)

DEDICO E OFEREÇO

Aos meus pais, Nelson Preto (*in memoriam*), Dilma e ao meu filho Hugo, com todo meu amor e gratidão.

AGRADECIMENTO

A Deus, por se fazer presente em todos os momentos de minha vida.

À Thaynã pelo apoio e paciência durante os anos de curso.

Aos meus irmãos, pelo apoio em todos os momentos de minha vida.

Ao professor Jurandi Gonçalves de Oliveira, pela orientação, ensinamentos, compreensão e confiança demonstrados ao longo desses anos de trabalho e convivência.

Ao Dr. Luís Miguel Mazorra Morales, pelos ensinamentos, apoio e incentivo, durante todo o tempo de curso.

Aos amigos de laboratório, Diederson, Gláucia, Thamires, Aline, Willian, Fábio e aos alunos de iniciação científica que por lá passaram, pois todos contribuíram de alguma forma para minha formação.

Ao senhor Paulo César, agradeço pelo fornecimento dos frutos durante o desenvolvimento do trabalho;

Aos professores de outros laboratórios que sempre se mostraram dispostos a colaborar com nossos trabalhos.

À CAPES pela concessão da bolsa sem a qual não teria sido possível a realização do meu doutorado.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

À UENF pela oportunidade de realização do curso.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Importância econômica	4
2.2. Fisiologia do amadurecimento	5
2.3. Mudanças físicas e químicas durante o amadurecimento	6
2.3.1. Etileno	10
2.3.2. Respiração	13
2.3.3. Espécies reativas de oxigênio e sistema antioxidante.....	15
2.4. Tecnologias para conservação pós-colheita de frutos	19
2.4.2. Revestimento de quitosana como modificador de atmosfera	20
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo geral	23
3.2. Objetivos específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Material vegetal.....	24
4.2. Aplicação do tratamento	24
4.3. Avaliação da respiração e da produção de etileno em frutos intactos	25

4.4.	Atributos químicos e físicos	25
4.4.1.	Avaliações físicas	25
4.4.2.	Avaliações químicas.....	26
4.5.	Atividade respiratória de mitocôndrias isoladas	27
4.5.1.	Isolamento e purificação de mitocôndrias	27
4.5.2.	Determinação da integridade das mitocôndrias	28
4.5.3.	Quantificação da atividade respiratória	29
4.6.	Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio e atividade de enzimas antioxidantes	29
4.6.1.	A obtenção do extrato proteico.....	29
4.6.2.	Produção de ERO	30
4.6.3.	Atividade da SOD.....	30
4.6.4.	Atividade da POD.....	30
4.7.	Delineamento experimental e análise estatística	31
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1.	Respiração.....	32
5.2.	Etileno	34
5.3.	Atributos físicos e químicos	36
5.4.	Respiração em mitocôndrias isoladas.....	46
5.5.	Espécies reativas de oxigênio e enzimas antioxidantes	50
6.	CONCLUSÕES	54
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

RESUMO

As perdas na pós-colheita de frutos são claramente um problema que afeta os produtores, comerciantes e consumidores. Grande parte destas perdas ocorre em função do rápido amadurecimento e senescência. O uso de revestimentos biodegradáveis tem se demonstrado uma boa alternativa para prolongar a vida de prateleira dos frutos. O objetivo do presente trabalho foi investigar como o revestimento biodegradável à base de quitosana interfere no processo respiratório, na liberação de etileno, na homeostase de espécies reativas de oxigênio (ERO) e por consequência, no amadurecimento dos frutos da goiabeira (*Psidium guajava* L.). Foram utilizadas goiabas 'Cortibel' coletadas na região Norte do Estado do Rio de Janeiro no município de Bom Jesus do Itabapoana, de onde foram transportadas para o setor de Fisiologia Vegetal no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal onde foram tratadas com solução de quitosana na concentração de 1,5% (p/v). Posteriormente, os frutos permaneceram armazenados sob condições controladas de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa ($85\% \pm 5\%$). Os frutos foram avaliados 1, 4 e 7 dias após a aplicação do revestimento para as variáveis estudadas, excetuando o consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas, que foi realizado com 1 e 4 dias após a aplicação do revestimento. As emissões de CO_2 e etileno dos frutos foram mensuradas por cromatografia de gases. Foram realizadas análises físico-químicas para a determinação da coloração do epicarpo, firmeza, teor de sólidos solúveis, acidez

titulável, teor de ácido ascórbico e perda de massa fresca dos frutos. Foi efetuada também a extração e purificação de mitocôndrias e a análise do consumo de O₂ por meio do método polarográfico com utilização de um eletrodo do tipo Clark. Os resultados demonstraram que o revestimento de quitosana reduziu a liberação de CO₂ e etileno do fruto. A mudança na coloração também foi mais lenta em frutos cobertos com o revestimento como evidenciado pela redução nos valores de ângulo *hue*, enquanto a perda de firmeza não foi influenciada e o teor de sólidos solúveis foi maior aos sete dias após a aplicação do revestimento. O consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de frutos revestidos com quitosana foi menor no primeiro dia de avaliação e nos dois momentos avaliados a participação da COX foi majoritária. A produção de ERO foi menor nos frutos com o revestimento de quitosana após sete dias da aplicação do revestimento. Nas avaliações realizadas aos quatro e sete dias após o revestimento, a atividade da SOD foi menor em frutos tratados com quitosana sendo que aos sete dias a atividade da POD também foi menor nestes frutos. Diante do exposto pode-se concluir que o revestimento com quitosana causou moderado atraso na maturação de goiabas 'Cortibel' em função da menor taxa respiratória, menor liberação de etileno e produção de ROS.

ABSTRACT

Post-harvest losses of fruits are clearly a problem affecting producers, traders and consumers. Most of these losses occur due to rapid maturation and senescence. The use of biodegradable coatings has been shown to be a good alternative to extend the shelf life of the fruits. The objective of the present work was to investigate how the biodegradable coating based on chitosan interferes with the respiratory process, the ethylene release, the homeostasis of reactive oxygen species (ROS) and, consequently, the ripening of guava fruits (*Psidium guajava* L.). 'Cortibel' guavas collected in the northern region of the state of Rio de Janeiro in the municipality of Bom Jesus do Itabapoana were used, from where they were transported to the Plant Physiology Laboratory at the Genetic Plant Breeding Laboratory where they were treated with chitosan solution at the concentration of 1.5% (w / v). Afterwards, fruits were stored under controlled conditions at temperature (25 ° C ± 1 ° C) and relative humidity (85% ± 5%). The fruits were evaluated 1, 4 and 7 days after the application of the coating for most of the studied variables, except for the evaluation of oxygen consumption in isolated mitochondria, which was performed 1 and 4 days after the coating application. The CO₂ and ethylene emissions were measured by gas chromatography. Physical and chemical analyzes were performed to determine the epicarp color, firmness, soluble solids content, titratable acidity, ascorbic acid content and loss of fresh fruit mass. The extraction and purification of mitochondria was also carried out and the O₂ consumption analysis was performed using the polarographic method using a

Clark type electrode. The results demonstrated that the chitosan coating reduced the release of CO₂ and ethylene from the fruit. The change in coloration was also slower in fruits coated with the coating as evidenced by the reduction in hue values, while the loss of firmness was not influenced and the soluble solids content was higher at 7 days after coating application. Oxygen consumption by mitochondria isolated from fruits coated with chitosan was lower on the first day of evaluation and in the second evaluated moments the participation of COX was the majority. ROS production was lower in the fruits with the chitosan coating after seven days of coating application. In the evaluations carried out four and seven days after the coating, the SOD activity was lower in chitosan treated fruits and at seven days the POD activity was also lower in these fruits. In view of the above, it can be concluded that the chitosan coating caused a moderate delay in the maturation of 'Cortibel' guavas due to the lower respiratory rate, lower ethylene release and ROS production.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores exportadores de frutas do mundo. Em 2016, o país exportou cerca de 790 mil toneladas de frutas frescas e secas, movimentando cerca de 700 milhões de dólares. Os principais destinos para estas frutas são: Holanda, Estados Unidos, Reino Unido e Espanha (ABF, 2017). Contudo, o país também registra alto índice de perdas da produção, resultantes de falhas em diferentes pontos da cadeia produtiva, que vão desde o produtor até o consumidor final. Cuidados na pós-colheita podem reduzir em parte estas perdas e conseqüentemente aumentar a disponibilidade de frutos sem a necessidade de aumento na área destinada ao cultivo.

A goiaba é um fruto bastante apreciado no Brasil e apresenta potencial para a exportação. No entanto, possui curta vida útil (Abreu et al., 2012a). Isto caracteriza um problema para a comercialização do fruto, principalmente para mercados mais distantes, como na exportação.

A intensidade das reações bioquímicas, que ocorrem durante o amadurecimento, define a velocidade com que os frutos atingem a senescência. Dessa forma o controle da respiração é essencial para a manutenção da qualidade e para o prolongamento da vida útil dos frutos depois de colhidos (Bouzayen et al., 2010). Portanto, tecnologias que visam diminuir a taxa respiratória e aumentar a vida pós-colheita de frutos têm sido amplamente estudadas. Um grande desafio para a pós-colheita é reduzir a velocidade de amadurecimento dos frutos, porém, sem bloquear o processo, mantendo a

qualidade e as propriedades sensoriais dos frutos.

O uso de refrigeração apenas ou em associação com atmosfera controlada ou modificada são técnicas de conservação na pós-colheita que se mostram eficientes na diminuição do metabolismo dos frutos, quer seja pela redução da atividade enzimática ou diminuição das trocas gasosas, proporcionando maior longevidade aos mesmos. Entretanto, a eficiência destas técnicas é bastante variável em função do tipo de fruto, da temperatura e tipo de atmosfera utilizada, ou mesmo ajustes no controle da atmosfera para cada produto que se deseja armazenar (Gvozdenović e Lazić, 2010; Cerqueira et al., 2011; Cunha Junior et al., 2012).

Um tipo de atmosfera modificada muito utilizada é o emprego de embalagens plásticas, mas com a crescente preocupação com a preservação do meio ambiente, alternativas aos derivados de petróleo, como o uso de filmes biodegradáveis vêm ganhando importância como tecnologia para conservação de alimentos. Atualmente, estes dois tipos de atmosfera modificada são estudados para a aplicação tanto em produtos in natura quanto em minimamente processados dos mais diversos grupos de frutas e hortaliças (Hojo et al., 2011; Mariano et al., 2011). Além disso, diversas substâncias têm sido utilizadas para a confecção de revestimentos biodegradáveis, como o amido (de Aquino et al., 2015), a quitosana (Qiu et al., 2013) e o alginato (Carvalho et al., 2015).

O uso de revestimentos biodegradáveis é compatível com a ideia de sustentabilidade que atualmente tem ganhado grande importância. Além disso, é uma alternativa viável para a conservação pós-colheita de goiabas (de Aquino et al., 2015), pois afeta as trocas gasosas, reduzindo a concentração interna de O_2 e aumentando a de CO_2 com o passar do tempo (Ali et al., 2011). Tal fato é importante sob o ponto de vista da conservação em pós-colheita, pois pode diminuir a síntese do etileno e atrasar o pico respiratório de frutos climatéricos, causando atraso no amadurecimento do fruto (Imahori et al., 2013). Além disto, o uso de revestimentos biodegradáveis pode alterar a atividade de enzimas antioxidantes, conseqüentemente o conteúdo de espécies reativas de oxigênio (Hong et al., 2012), que são importantes sinalizadores do processo de amadurecimento e senescência (Tian et al., 2013).

Entretanto, frequentemente o aumento da vida pós-colheita de frutos revestidos é atribuído à menor taxa respiratória (Ali et al., 2011) ou a menor

síntese de etileno (Alves et al., 2010). Estes dois processos têm o oxigênio como fator limitante, além de poderem afetar um ao outro. Portanto, neste trabalho realizou-se um estudo envolvendo a investigação conjunta da atividade da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, a produção de espécies reativas de oxigênio e a atividade de enzimas antioxidantes, bem como a síntese de etileno, durante o amadurecimento do fruto para que se possa entender melhor qual a dinâmica do efeito da menor tensão de O_2 na atmosfera modificada, quando se utiliza revestimentos à base de quitosana.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância econômica

A goiabeira (*P. guajava* L.) pertence à família Myrtaceae e gênero *Psidium* (Wilson et al., 2001). Para alguns autores a espécie é originária da região tropical do continente americano, tendo como provável centro de origem a região compreendida entre o Sul do México e o Norte da América do Sul (Risterucci et al., 2005). Outros, porém, citam que a origem da espécie é alvo de especulação, pois ainda restam dúvidas se a espécie é realmente originária da América ou do continente asiático (Gonzaga Neto e Soares, 1994).

Os frutos da goiabeira são comercializados tanto *in natura* quanto para industrialização. Devido à grande variabilidade genética da espécie, trabalhos vêm sendo realizados para identificar cultivares de goiabeira específicas para uso em cada uma das duas finalidades (Pereira et al., 2003).

Atualmente, o cultivo de goiabeiras está difundido por quase todo Brasil. Sendo o país um dos maiores produtores mundiais deste fruto. No ano de 2015 o país produziu mais de 420 mil toneladas de goiaba, colhidas em uma área superior à 17.000 ha. Esta produção foi responsável pela movimentação de cerca de 470 milhões de reais (IBGE, 2016).

No Nordeste do país a produção de goiaba é uma das principais atividades hortifrutícolas beneficiando muito a agricultura familiar (Araújo e Correia, 2010).

Apesar do grande volume de produção, a exportação de goiaba pelo Brasil é relativamente pequena. Os principais motivos são a curta vida de prateleira dos frutos, em consequência de seu rápido metabolismo, que pode ser ainda mais reduzida devido à incidência de doenças como antracnose e pinta-preta (Soares-Colletti et al., 2014). Neste contexto, o uso de revestimentos comestíveis, dentre eles o de quitosana têm se mostrado eficiente para prevenção quanto ao surgimento de fungos e manutenção da qualidade dos frutos por mais tempo (Ali et al., 2010).

2.2. Fisiologia do amadurecimento

Os frutos, de modo geral, passam por intensas mudanças durante seu desenvolvimento. Este, de modo simplificado, pode ser dividido em três fases: crescimento, maturação e senescência. O amadurecimento é a etapa final da maturação, tornando difícil separar esta fase do início da senescência (Paul et al., 2012). Apesar de a senescência ser um processo natural no desenvolvimento do fruto, seu atraso é comercialmente desejável, pois propicia maior vida útil aos frutos.

As modificações observadas nos frutos durante seu amadurecimento são geneticamente controladas e envolvem intensa atividade enzimática que possibilita modificação na firmeza da polpa (Pinto et al., 2011), mudança na coloração da casca e da polpa (Gady et al., 2012) e alterações em vários componentes químicos responsáveis pelo aroma e sabor característico de cada fruto (Klee e Giovannoni, 2011). Estas mudanças tornam os frutos mais palatáveis contribuindo fortemente para a dispersão de sementes na natureza. Além disso, como muitos destes frutos são amplamente apreciados por humanos, a alteração das características sensoriais é de grande importância comercial.

Quase todos os frutos carnosos passam pelas mudanças acima citadas durante o seu desenvolvimento. Porém, o padrão de amadurecimento pode ser bastante distinto entre frutos de diferentes espécies ou até mesmo entre as variedades dentro da mesma espécie. Em função disto os frutos são divididos em dois grupos, os climatéricos e os não climatéricos de acordo com a ocorrência ou não do aumento na taxa respiratória e de produção de etileno durante a fase de amadurecimento. Os frutos climatéricos apresentam aumento na respiração e

emissão de etileno, mesmo após serem desligados da planta. Esses frutos são capazes de completar o processo de amadurecimento mesmo após serem colhidos. Outra diferença entre frutos climatéricos e não climatéricos é o efeito da aplicação exógena do etileno sobre a taxa respiratória dos frutos. Enquanto nos frutos climatéricos a magnitude da resposta da taxa respiratória é independente da concentração de etileno exógeno aplicado, nos frutos não climatéricos essa resposta é diretamente dependente da concentração de etileno exógeno. Ainda, nos frutos climatéricos o aumento na taxa respiratória devido à ação do etileno exógeno é irreversível, ao passo que nos frutos não climatéricos essa resposta é reversível (cessa) após a não exposição do fruto ao etileno exógeno (Kays, 1991).

Como frutos climatéricos pode-se citar o mamão (Resende et al., 2012), a banana (Imahori et al., 2013), o maracujá (Alves et al., 2010), a manga (Considine et al., 2001) e o melão cantaloupe (Gonçalves et al., 2013). Por outro lado, como exemplo de frutos não climatéricos podem ser citados, dentre outros, os citros de modo geral, a uva e o morango (Paul et al., 2012).

Contudo, tem sido sugerido nos últimos anos que esta classificação pode ser demasiada simplista e pode não enquadrar todos os padrões de amadurecimento observados. Tais dúvidas são citadas, principalmente, quanto à classificação de alguns frutos como em goiabas (Azzolini et al., 2005; Porat et al., 2009), uma vez que apenas parte dos requisitos necessários para a classificação como climatéricos é observada (Paul et al., 2012).

2.3. Mudanças físicas e químicas durante o amadurecimento

Dentre as mudanças físicas que os frutos passam durante a fase do amadurecimento está a perda da firmeza. Este processo está relacionado com o aumento da atividade de enzimas como a pectinametilesterase (PME), a poligalacturonase (PG), as celulases e outras enzimas hidrolíticas que atuam sobre a parede celular. Este é um fator que colabora fortemente para a alta susceptibilidade da goiaba aos danos mecânicos (Jain et al., 2001; Fontes et al., 2008). A perda de firmeza dos tecidos vegetais dificulta seu manuseio e transporte além de favorecer a penetração de microrganismos. Isto contribui para a degradação do órgão e acelera a senescência, favorecendo o aumento das perdas após a colheita.

Mohamed-Nour e Abu-Goukh (2010) verificaram que a perda da firmeza no fruto da goiabeira se correlacionou positivamente com a aplicação de etileno ou do Ethrel, um produto comercial cujo princípio ativo, o ácido 2-cloro-etil-fosfônico, libera etileno em meio ligeiramente alcalino. Os resultados destes autores sugerem que a ação das enzimas de degradação da parede celular em goiaba é dependente da sinalização do etileno. Porém, é importante salientar que Pech et al. (2008) estudando mudanças dependentes e independentes de etileno durante o amadurecimento em melões, verificaram que esta característica pode ocorrer também por ação de enzimas cuja tradução é independente da ação do etileno. Dessa forma, tais modificações podem se dar em resposta a outros fatores além do etileno, ainda que a maioria dos trabalhos encontrados na literatura se refere à perda de firmeza como uma resposta à sinalização do etileno.

Como medida para evitar a rápida perda de firmeza, técnicas como o uso de resfriamento e revestimentos, têm se mostrado eficientes (Hong et al., 2012). Mas ambas as técnicas citadas podem afetar tanto a síntese ou ação do etileno, quanto a respiração celular que tem influência direta na produção de energia e ERO, deixando dúvidas sobre quais destes fatores afetam a perda de firmeza e como eles se relacionam.

A coloração dos frutos é outro parâmetro qualitativo que passa por alterações visíveis durante a evolução do amadurecimento para a maioria das espécies, fazendo deste atributo um dos mais utilizados para determinação do estágio de maturação dos frutos (Parra-Coronado et al., 2017). A coloração da casca da goiaba muda naturalmente do verde para o amarelo (Abreu et al., 2012a). Tais transformações acontecem em função da síntese dos carotenoides, antocianina e decréscimo no teor das clorofilas (Dube e Singh, 2017). Esta mudança da coloração da casca é influenciada pelo etileno (Mohamed-Nour e Abu-Goukh, 2010).

Enquanto os frutos ainda estão ligados à planta, estes agem como drenos tendo as suas principais necessidades energética, nutricional e hídrica, supridas pela planta. Porém, após o desligamento do fruto da planta mãe, esses tendem a perder massa (fresca e seca) por utilizarem compostos orgânicos como substrato respiratório e principalmente em decorrência do processo transpiratório. A perda de massa fresca pode ser influenciada pela temperatura e umidade relativa ambiente, material de acondicionamento, tipo de fruto, espécie, variedade e

estádio de maturação do mesmo (Garry Kerch, 2015; Anese et al., 2016).

Em goiaba a perda de massa aceitável é de até 5%, acima deste valor os frutos começam a perder as características desejáveis para a comercialização (Mahajan et al., 2009). Contudo, na prática é comum observar perdas de massa fresca maiores que 5%. Silva et al. (2012) verificaram perdas de massa de 8% em doze dias de armazenamento da goiaba, sendo que o uso de filme de fécula de mandioca foi capaz de manter o nível de perda mais próximo do aceitável. Hong et al. (2012) também obtiveram resultados positivos quanto à diminuição da perda de massa com o uso de revestimento à base de quitosana em goiabas.

Tem sido demonstrado que a perda de massa em goiabas pode ser influenciada por fatores pré ou pós-colheita (Goutam et al., 2010; Sharma et al., 2013). Além da diminuição da qualidade, a perda de massa pode representar considerável prejuízo para os produtores e, ou, comerciantes pelo fato de que normalmente os frutos são negociados em função de seu peso. Portanto, o uso de revestimentos é um tratamento promissor, pois tende a diminuir o processo transpiratório e a perda de massa fresca dos frutos.

Os componentes químicos como açúcares, ácidos orgânicos e compostos voláteis dos frutos carnosos são responsáveis pelo sabor e aroma dos mesmos, fazendo com que estes sejam mais ou menos apreciados pelos consumidores. Via de regra, o que se observa é a melhoria das características sensoriais dos frutos durante o amadurecimento, principalmente se o processo ocorre com o fruto ainda ligado à planta (Jha et al., 2013; Souza et al., 2013). A degradação e interconversão de carboidratos são processos decisivos para a determinação do sabor dos frutos.

Os carboidratos são a principal fonte energética dos vegetais. Os açúcares presentes nos frutos podem estar na forma de carboidratos complexos como o amido, na forma de açúcares não redutores como sacarose e verbascose ou ainda na forma de açúcares redutores como a glicose e a frutose (Buchanan et al., 2002).

Lee et al. (2010) observaram em goiabas, aumento na concentração de frutose e sacarose durante o amadurecimento dos frutos. Segundo esses autores, esse fato se deve à hidrólise do amido que libera formas mais simples de açúcares. Esta informação corrobora com o registrado por Jain et al. (2001) que verificaram diminuição no teor de amido de 6% para 1% em relação à massa seca

com o avanço da maturação de goiabas cv. Lucknow-49. Por outro lado, Abreu et al. (2012b) relatam que em goiabas cv. Pedro Sato o teor de amido não ultrapassa 0,15% no início da maturação. Estes autores verificaram que os teores de açúcares não variam durante a maturação da goiaba, provavelmente por não haver amido em quantidade significativa sendo degradado, com consequente liberação de açúcares. Estes resultados indicam que o teor de amido pode ser altamente variável dentro da espécie.

A parede celular (PC) dos vegetais é composta principalmente de celulose, hemicelulose e pectina, podendo em alguns casos estar impregnada de lignina (Gilbert, 2010). A pectina é o principal componente da lamela média. Durante o amadurecimento há a expressão de genes que codificam para enzimas como a PME, a PG e a pectato liase que atuam na degradação da pectina liberando os ácidos orgânicos que a compõe (Goulao e Oliveira, 2008).

Há, portanto, uma tendência natural de aumento no teor dos ácidos com a evolução do amadurecimento, influenciando fortemente no sabor dos frutos. Porém, Lee et al. (2010) verificaram uma diminuição da concentração de ácido cítrico em goiabas com o avanço da maturação, assim como fora verificado por Liang et al. (2011) em uvas. A utilização destes ácidos como substrato respiratório no ciclo do ácido cítrico é a causa mais provável para esta diminuição (Nunes-Nesi et al., 2013).

O ácido ascórbico (AA) é um ácido orgânico de grande importância para o metabolismo vegetal por ter a função de antioxidante, regulador da divisão e crescimento celular, estar envolvido na transdução de sinais e ainda como substrato para a respiração mitocondrial (Gallie, 2013). Cerqueira et al. (2009) observaram acréscimo nos teores de AA durante o amadurecimento de goiabas com posterior decréscimo com a chegada da senescência. Esta oscilação no teor de AA em goiabas ocorre em função de mudanças na atividade de enzimas de síntese, oxidação e reciclagem do ácido, como demonstrado por Gomez e Lajolo (2008).

De modo geral, os teores de ácidos orgânicos flutuam de acordo com a degradação da PC e a atividade respiratória, conferindo aos frutos sabor característico com a evolução do amadurecimento (Yao et al., 2012).

Uma variável muito utilizada no estudo de açúcares e ácidos orgânicos é o teor de sólidos solúveis (SS), expresso em °Brix. Para alguns frutos como o

mamão e a goiaba, não há grande variação no teor de SS com a evolução do amadurecimento (Cerqueira et al., 2009; Ali et al., 2011). Em contrapartida, para outros frutos como a banana, pode ser verificado um aumento no teor de SS de dez vezes em frutos maduros se comparados a frutos verdes. Esta variação ocorre porque a banana armazena muito amido durante o seu desenvolvimento sendo este degradado durante o amadurecimento, liberando açúcares solúveis (Khanbarad et al., 2012).

Os dois principais processos associados ao amadurecimento e que estão intimamente associados às mudanças que ocorrem durante esta etapa do desenvolvimento dos frutos são a emissão de etileno e a atividade respiratória. No entanto, como foi dito anteriormente, o amadurecimento e a senescência são etapas que se sucedem no desenvolvimento dos frutos. Um fator importante para a ocorrência da senescência é o aumento de ERO. Estes são capazes de oxidar moléculas de DNA, proteínas mitocondriais envolvidas no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, transportadores de membrana e ainda proteínas antioxidantes, levando a uma desordem celular e conseqüentemente à senescência (Qin et al., 2009).

2.3.1. Etileno

O etileno (C_2H_4) é um hidrocarboneto apolar encontrado naturalmente na forma gasosa, capaz de atravessar facilmente as membranas biológicas. A síntese do etileno tem como precursor inicial o aminoácido metionina que é convertido a S-adenosil metionina (SAM) pela ação da SAM sintetase. Nesta reação há a liberação de metil adenosina que, sob custo de ATP, é reciclado a metionina mantendo a via autocatalítica. Esta via autocatalítica é conhecida também como Ciclo de Yang. Prosseguindo na síntese de etileno, o SAM é convertido em 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) pela ação da ACC sintase (ACS) e por fim ocorre a conversão do ACC em etileno, sendo esta reação mediada pela ação da enzima ACC oxidase (ACO) que tem como cofatores oxigênio, ascorbato e o Fe^{+3} (Lin et al., 2009).

O etileno é um fitormônio envolvido em várias respostas gênicas e fisiológicas a partir de sua ligação a um receptor de membrana, sendo esta ligação dependente de cobre. Os receptores de etileno ficam predominantemente

na membrana do retículo endoplasmático e são provenientes da expressão de famílias multigênicas. Na presença do etileno estes receptores enviam sinal ao núcleo que inicia uma série de respostas gênicas (Merchante et al., 2013). Estas respostas podem desencadear processos como a morte celular, a formação de aerênquima (Yamauchi et al., 2013), diferentes respostas a estresses bióticos e abióticos (Lin et al., 2009), além de atuar fortemente no amadurecimento de frutos, sobretudo nos climatéricos (Bapat et al., 2010).

Muitas mudanças que ocorrem durante o amadurecimento de frutos climatéricos são dependentes da presença de etileno em níveis maiores do que o observado em outros momentos do desenvolvimento destes frutos (Pech et al., 2008). Há que destacar, portanto, que neste tipo de fruto ocorre um súbito aumento na produção de etileno durante a maturação do mesmo, devido à produção autocatalítica denominada de sistema II de síntese de etileno. O sistema II pode também ser encontrado em tecidos vegetativos senescentes. No período pré-climatérico ou em frutos não climatéricos há apenas o sistema I de produção de etileno, ou seja, não se verifica a produção autocatalítica, pois o etileno nestes casos funciona como um inibidor de sua própria síntese (Bouzayen et al., 2010; Paul et al., 2012). Assim, a presença ou ausência deste sistema II pode ser bom indicativo para distinguir o padrão de maturação dos frutos como observado por Liu et al. (2012) estudando duas variedades de goiaba.

A expressão de diferentes membros da família gênica que codifica para ACS é o ponto que regula a ocorrência dos sistemas I e II de síntese do etileno. Dependendo do estágio de desenvolvimento dos frutos um ou outro grupo de genes pode ser expresso, o que explica a ocorrência ou não do sistema autocatalítico, uma vez que diferentes membros desta família gênica podem ser regulados positiva ou negativamente pela presença de etileno (Liu et al., 2015). No entanto, tem se demonstrado que mesmo na ausência do etileno, há um aumento na produção do hormônio, indicando que este pico nos frutos climatéricos pode ser controlado de forma autocatalítica e, ou, independente do etileno (Pech et al., 2008; Yokotani et al., 2009).

O controle da síntese do etileno é relacionado à maior transcrição gênica de enzimas relacionadas à sua síntese (Klee e Giovannoni, 2011). Contudo a ação deste fitormônio no processo de amadurecimento de frutos é demasiada complexa envolvendo outros hormônios e uma cascata de transcrição gênica que

leva à ativação de fatores de resposta ao etileno (Liu et al., 2015).

A presença de 1-metilciclopropeno (1-MCP) pode influenciar a síntese e, ou, a ação do etileno, uma vez que inibe a expressão de genes envolvidos na biossíntese e na percepção da molécula (Yang et al., 2013). Além disto, De Wild et al. (2005) verificaram em tomates armazenados sob atmosfera enriquecida com CO₂, um acúmulo de mRNA da ACO e diminuição no conteúdo de ACC e consequentemente de etileno.

Os frutos climatéricos são conhecidos por completarem o amadurecimento mesmo após serem colhidos, sendo esta característica frequentemente atribuída à produção de etileno. A ação deste fitormônio no amadurecimento de goiabas tem influência na mudança de cor, perda de firmeza e na taxa respiratória como verificado por Mohamed-Nour e Abu-Goukh (2010).

Nishiyama et al. (2007) verificaram que a transcrição de diferentes genes envolvidos na tradução de proteínas de degradação de parede celular em melão '*Charentais*' é dependente de etileno. Além disto, foi demonstrado por Hayama et al. (2006) que a aplicação de etileno exógeno em pêsego cvs. '*Akatsuki*' e '*Manami*' resultou em acentuado aumento na atividade da PG. Porém, Azzolini et al. (2005) afirmam que a perda de firmeza em goiabas '*Pedro Sato*' ocorreu antes do aumento dos níveis de etileno endógeno do fruto. Estes dados geram divergências sobre qual o nível de exigência em etileno para que ocorra a degradação de parede celular em frutos carnosos.

Durante o climatério, além do pico na produção de etileno, é comumente observado um pico respiratório. Estes dois eventos podem ser concomitantes como observado por Zhang et al. (2011) em abacate cv. Booth 7. Estes autores verificaram ainda que em condições onde a síntese de etileno foi inibida como na presença do 1-MCP, a atividade respiratória também foi influenciada, sugerindo que o pico respiratório esteja ligado à produção do etileno.

Pode ocorrer, também, o pico do etileno antes da ocorrência do pico respiratório, ou mesmo, o contrário, ou seja, a produção máxima de etileno vir após o surto respiratório. Além disto, foi demonstrado por Fugate et al. (2010) que raízes de beterraba açucareira, quando feridas, mesmo na presença do aminoetoxivinilglicina (AVG, um inibidor da síntese de etileno) ou de 1-MCP, apresentam um aumento na taxa respiratória, deixando dúvidas sobre a necessidade do fitormônio para a ocorrência do aumento da respiração. Porém,

os mesmos autores verificaram um aumento na taxa respiratória em raízes tratadas com etileno. Portanto, o etileno provavelmente é apenas um dos fatores que podem gerar um aumento na atividade respiratória.

Tanto a síntese de etileno quanto a respiração são fatores que potencialmente são limitados por baixa tensão de O₂. Porém, Imahori et al. (2013) constataram que o armazenamento de bananas a 2 KPa de O₂ foi responsável por uma forte diminuição na produção de etileno, enquanto a respiração também foi reduzida, mas de modo menos acentuado refletindo em um atraso na maturação dos frutos. Alves et al. (2010) observaram o mesmo efeito na emissão de etileno em maracujás revestidos com quitosana, provavelmente devido à hipóxia causada pelo filme, explicitando o efeito da baixa tensão de oxigênio sobre a síntese de etileno.

No entanto, Zhang et al. (2010) demonstraram que este efeito foi reversível, pois quando armazenaram tomates em uma atmosfera com apenas 8 kpa de O₂ por seis horas a concentração interna de etileno nestes frutos foi apenas momentaneamente diminuída, se igualando e se mantendo sem diferença quando comparado aos frutos do grupo controle por 16 dias.

2.3.2. Respiração

A respiração celular é o mecanismo pelo qual as plantas convertem a energia armazenada na forma de carboidratos, lipídios ou outras moléculas reduzidas em energia prontamente disponível, na forma de adenosina trifosfato (ATP) (Van Dongen et al., 2011). Didaticamente, a respiração celular pode ser dividida em três etapas, a glicólise, o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (CAT) e a cadeia de transporte de elétrons (CTE).

O amadurecimento dos frutos é bastante dependente da respiração celular. Além de fornecer energia na forma de ATP, vários intermediários do processo respiratório são demandados em rotas de síntese de outros compostos envolvidos nas transformações que ocorrem durante o amadurecimento dos frutos (Conde et al., 2008). Além disto, Centeno et al. (2011) demonstraram que o malato, um intermediário do ciclo de Krebs, é um importante regulador do desenvolvimento e da maturação de frutos de tomate, uma vez que afeta os níveis de amido, sólidos solúveis, perda de massa e ainda a suscetibilidade às infecções. A correlação

entre a respiração e a evolução do amadurecimento dos frutos é alta e pode ser explicitada pelas diferenças marcantes no processo de amadurecimento que ocorrem em frutos climatéricos e não climatéricos depois de colhidos (Paul et al., 2012).

Durante o amadurecimento do mamão participação de vias alternativas como a alternativa oxidase (AOX) e a proteína desacopladora (UCP) na CTE aumenta propiciando um incremento na taxa respiratória (Oliveira et al., 2015). De acordo com Perotti et al. (2014) a maior atividade da AOX nesta etapa permite maior fluxo na CTE gerando o ATP necessário para manter a síntese de etileno, além de prevenir contra a super redução dos complexos da CTE e consequentemente a produção de ERO. No entanto, um fato que deve ser levado em consideração é que o acúmulo de ATP potencialmente inibe a respiração (Ramzan et al., 2010). Assim sendo, o aumento da atividade da AOX pode ser visto como uma alternativa para a manutenção do fluxo da CTE, não necessariamente acoplado à produção de ATP, evitando assim a inibição da respiração.

Xu et al. (2012) verificaram que frutos de tomate com baixa, ou alta expressão da AOX liberaram, respectivamente, menos e mais etileno, sugerindo que a AOX desempenha algum papel na síntese do fitormônio ou mesmo em sua síntese auto catalítica. Oliveira et al. (2015) observaram que em mamão a participação da AOX e UCP foi aumentada simultaneamente a maior liberação de etileno, sendo a contribuição destas vias mais expressiva ao final do amadurecimento e na senescência. Tal fato sugere que nesta etapa a manutenção do fluxo de elétrons na CTE é mais importante que a produção de ATP.

Um dos principais pontos de controle da respiração celular está na atividade da CTE e este passo é totalmente dependente de oxigênio (Millar et al., 2011). Segundo Zabalza et al. (2009), raízes de ervilha reduzem a taxa respiratória em função da diminuição da disponibilidade de oxigênio. De acordo com esses autores, o consumo de O₂ pela via AOX diminui de forma linear até o tecido alcançar a anoxia, por outro lado, a atividade da COX decresce de forma linear até certo ponto, a partir do qual passa por um abrupto declínio, evidenciando que as duas rotas apresentam respostas diferentes à diminuição da disponibilidade de oxigênio.

Com a diminuição da respiração aeróbica o nível de piruvato tende a aumentar, este aumento funciona como um sinal para a ativação da via anaeróbica (Zabalza et al., 2009). Imahori et al. (2013) verificaram que bananas quando armazenadas em atmosfera com 0,5% de oxigênio apresentaram concentração de etanol bastante superior aos frutos armazenados em atmosfera com 21% de O₂.

Gupta et al. (2009) também verificaram decréscimo na taxa respiratória de raízes de cevada sob hipóxia, contudo estes autores verificaram que a atividade da AOX foi a mais afetada pela diminuição do O₂.

Hong et al. (2012) verificaram uma redução na taxa respiratória em goiabas cobertas com revestimento biodegradável, o que pode ter sido causada pela baixa tensão de oxigênio sobre o fruto. Estes autores verificaram ainda redução na produção de ERO e aumento na atividade de enzimas antioxidantes na goiaba coberta com o revestimento biodegradável. Estas alterações podem ser em resposta à mudança na atividade da COX e AOX, devido as alterações no nível de oxigênio no tecido do fruto. Considerando os resultados de Zabalza et al. (2009), a maior atividade da AOX sob baixa tensão de oxigênio pode ainda ter contribuído para a menor formação de ERO retardando a degradação de membranas e, por consequência, a descompartimentalização celular que culmina com a senescência. Sabban-Amin et al. (2011) corroboram esta teoria ao verificarem que frutos de maçã armazenados sob baixa tensão de oxigênio foram menos afetados pela escaldadura, uma injúria causada pela ação de ERO.

2.3.3. Espécies reativas de oxigênio e sistema antioxidante

A importância da respiração celular para a manutenção da vida e desenvolvimento vegetal é incontestável. Porém, uma consequência natural do fluxo de elétrons na CTE é a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). O nível de formação de ERO está positivamente correlacionado com o consumo de oxigênio em mitocôndrias (Mailloux e Harper, 2011). Durante o amadurecimento de frutos climatéricos ocorre um surto respiratório (Paul et al., 2012) que potencializa, também, a produção de ERO pelas mitocôndrias levando os frutos à senescência, como verificado em pêssegos (Kan et al., 2011).

Espécies reativas de oxigênio são formas parcialmente reduzidas de

oxigênio que apresentam alto poder oxidante. O aumento no potencial de membrana na mitocôndria é considerado um forte contribuinte para a formação de ERO. Segundo Kadenbach et al. (2010), quando o potencial de membrana alcança valores acima de 140 mV, aumenta exponencialmente a produção de radical ânio superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pelos complexos I, II e III da CTE. Neste contexto, tem sido sugerido que a atividade da Ucp é um importante mecanismo capaz de controlar a homeostase de ERO nas células, uma vez que ela é ativada pela presença de $O_2^{\bullet-}$, sendo capaz de desfazer ou ao menos reduzir o potencial de membrana (Mailloux e Harper, 2011).

Na CTE, os complexos I e III responsáveis pela oxidação do NADH e redução do citocromo C, respectivamente, são os principais locais formadores de ERO. Uma sobre-redução destes complexos faz com que haja um desvio de elétrons que podem reagir com o oxigênio ou mesmo com o nitrogênio dando origem a ERO ou espécies reativas de nitrogênio (ERN). Assim sendo, a atividade da AOX tem mostrado desempenhar um importante papel na diminuição da formação de ERO e ERN, uma vez que ela pode juntamente com a COX utilizar os elétrons que fluem na CTE, diminuindo a possibilidade de estes serem desviados e utilizados na síntese de ERO ou ERN (Gupta et al., 2012).

As ERO podem estar na forma radicalar como o $O_2^{\bullet-}$ e o radical hidroxila OH^{\bullet} ou na forma molecular como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou oxigênio singlete (1O_2). Tanto em animais quanto em vegetais, as mitocôndrias são a principal fonte de ERO. Mas nas plantas os cloroplastos, também, podem ser importantes sítios de formação de ERO, bem como os peroxissomos e NAD(P) oxidases presentes nas membranas celulares (Marino et al., 2012; Gupta et al., 2012).

A presença de ERO nos tecidos vegetais pode ser benéfica ou não, dependendo de sua concentração. Portanto, se faz necessário manter uma rigorosa homeostase, controlando a síntese e degradação destes compostos. A detoxificação de ERO é realizada de forma enzimática pela ação de enzimas como a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a conversão do $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 , a catalase (CAT) que catalisa a conversão de H_2O_2 a água e oxigênio, a ascorbato peroxidase (APX) que converte o H_2O_2 a água pela oxidação do ácido ascórbico ou ainda pelas peroxidases (Gill e Tuteja, 2010). Também participam das ações

de detoxificação de ERO algumas reações não enzimáticas como por exemplo as reações de oxidação do ascorbato (AA) à dehidroascorbato (DHA) reduzindo $O_2^{\bullet-}$ à H_2O_2 e a reação que ocorre com a glutathiona reduzida (GSH). A GSH, por sua vez, pode ser oxidada (GSSG) por H_2O_2 liberando água, ou ainda a mesma ser oxidada e seus elétrons doados para o DHA, regenerando o AA (Foyer e Noctor, 2011).

Uma vasta gama de respostas, genéticas e fisiológicas, à formação de ERO tem sido reportada na literatura. Em plantas, tanto nas criptógamas quanto nas fanerógamas observa-se a expressão de vários genes alterada em função da presença de ERO, pois estes influenciam direta ou indiretamente na síntese de diversos hormônios vegetais (Mittler et al., 2011). As ERO podem atuar como sinalizadores fundamentais para o desenvolvimento (Marino et al., 2012) e para a sobrevivência dos vegetais sob condições de estresse como no alagamento (Bailey-Serres et al., 2012), na seca (Uzilday et al., 2012), ou devido a infecção por patógenos (Coll et al., 2011).

No início da maturação de frutos climatéricos ocorre o aumento na produção ERO. Porém, nesta etapa há grande atividade de enzimas antioxidantes e somente com a evolução da maturação é que a atividade destas enzimas diminui prevalecendo a ação das ERO, causando a peroxidação de lipídios e levando os frutos à senescência (Kumar et al., 2011). O declínio nas razões AA:DHA e GSH:GSSG também foi observado por Singh et al. (2012) em ameixa japonesa, evidenciando a participação do sistema antioxidante não enzimático durante o amadurecimento. Esses autores verificaram que o efeito do sistema antioxidante não enzimático foi mais pronunciado na cultivar de ameixa com alto nível de emissão de etileno.

Estudando o potencial antioxidante de goiabas, de diferentes regiões do Paquistão, em três estádios de maturação Gull et al. (2012) também concluíram que frutos verdes apresentaram maior teor de fenóis e flavonoides, resultando em maior atividade antioxidante que foi decrescendo com o avanço do amadurecimento do fruto. Estes resultados suportam a hipótese de que a redução da capacidade detoxificante de ERO, pelo sistema antioxidante, leva o tecido vegetal ao acúmulo de ERO o que está relacionado às alterações metabólicas no tecido que culminam com a senescência do fruto.

Vicente et al. (2006) verificaram que frutos de morango cv. Selva tratados

com temperaturas altas (45°C por 3h) apresentaram maior capacidade antioxidante, maior concentração de ácido ascórbico e maior atividade de enzimas responsáveis pela detoxificação de ERO, como SOD e ascorbato peroxidase (APX). Conseqüentemente, foi verificado nestes frutos uma menor concentração de ERO, o que resultou no atraso na senescência quando comparado com frutos não tratados.

Wang et al. (2009) observaram em frutos de manga cv. Tainong que a atividade de enzimas antioxidantes como a catalase, a SOD e a ascorbato peroxidase foi intensificada pela ação do etileno e inibida por um inibidor da ação deste fitormônio. No entanto, Zhang et al. (2013) verificaram que a aplicação de 1-MCP em frutos de abacate cv. Booth 7 não afetou o nível de atividade destas enzimas, mas atrasou o incremento de sua atividade, assim como foi atrasada a ocorrência do pico de etileno.

Estes resultados sugerem que o etileno pode ser o gatilho para o surto oxidativo, provocado pelo aumento da taxa respiratória durante o amadurecimento de frutos climatéricos. Assim como este fitormônio seria o responsável por regular a atividade de enzimas antioxidantes, desempenhando, portanto, papel crucial na regulação do estado redox dos frutos durante a maturação.

O incremento da produção de ERO na mitocôndria pode afetar diversos componentes da própria organela, comprometendo o bom funcionamento do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, o transporte de elétrons e conseqüentemente a produção de energia e intermediários da respiração. Este colapso mitocondrial está fortemente relacionado com a senescência dos frutos (Tian et al., 2013).

Além disto, as ERO possuem a capacidade de ativação de mecanismos envolvidos na morte celular programada e alto poder oxidativo causando a peroxidação de DNA, proteínas e lipídios, degradando as membranas celulares e desfazendo a compartimentalização necessária para manutenção da homeostase celular. Sabe-se, portanto, que as ERO são importantes sinalizadoras para a ocorrência de morte celular programada, evento marcante durante o crescimento e desenvolvimento vegetal (Coll et al., 2011).

Diante do exposto, o que se nota é que o etileno, a respiração e as ERO formam uma rede complexa que coordena o amadurecimento e a senescência dos frutos.

2.4. Tecnologias para conservação pós-colheita de frutos

Visando a redução de perdas na pós-colheita, vários compostos e ou metodologias vêm sendo estudados e empregados em diferentes frutos a fim de aumentar a vida útil destes órgãos.

Dentre as tecnologias utilizadas é comum observar o uso do resfriamento (Hong et al., 2012), armazenamento sob atmosfera controlada (Singh e Pal, 2008; Teixeira e Durigan, 2010), aplicação do 1-MCP (Cerqueira et al., 2009) e atmosfera modificada (Alves et al., 2010; Han et al., 2014). Estas estratégias apresentam potencial para diminuir a síntese do etileno e também a taxa respiratória. A redução na atividade respiratória diminuiria a produção de energia e a liberação de intermediários do processo, além de afetar os níveis de ERO, potencialmente atrasando a maturação e a senescência.

No entanto, diferentes técnicas podem afetar de modo distinto cada um destes eventos, fazendo necessária a realização de trabalhos abrangentes que considerem todos estes fatores e as possíveis relações entre os mesmos.

2.4.1. Atmosfera modificada

O metabolismo vegetal é influenciado pela disponibilidade de oxigênio e CO₂ do fruto. Quando este não realiza trocas gasosas livremente com o ambiente externo tensão destes gases é alterada na atmosfera ao redor dos frutos e o metabolismo é alterado, interferindo na vida pós-colheita do vegetal (Imahori et al., 2013), este é o princípio da modificação de atmosfera.

Díaz-Mula et al. (2011) armazenaram ameixas a 2°C em embalagens confeccionados com poliéster e propileno com micro perfurações e utilizaram como controle embalagens com macro perfurações. Estes autores verificaram que os frutos armazenados em embalagens micro perfuradas apresentaram menor liberação de etileno e mantiveram os atributos de qualidade por até quatro semanas a mais que os frutos do grupo controle.

O uso de atmosfera modificada pode também ser conjugada com outras técnicas, como a utilização de 1-MCP. Reuck et al. (2009) demonstraram que lichias armazenadas em embalagens de prolipropileno expostos à 1-MCP 300 nL L⁻¹ apresentaram redução da atividade da peroxidase, mantendo a integridade de

membrana. Além disto, mudanças inerentes ao processo de amadurecimento dos frutos como a coloração e perda de firmeza, ocorreram mais lentamente nestes frutos que no grupo controle, estendendo a período pós-colheita dos mesmos.

Apesar da eficiência comprovada do uso de embalagens plásticas como modificadores de atmosfera, alternativas a estes derivados de petróleo vem sendo buscadas e neste sentido o uso de revestimentos biodegradáveis tem se destacado.

Os revestimentos biodegradáveis utilizados atualmente podem apresentar diferentes origens, é comum na literatura a utilização de biofilme à base de proteínas, lipídeos e carboidratos (Bourtoom, 2008). O uso destes revestimentos tem potencial para retardar o amadurecimento, reduzir a perda de massa, agregar valor nutritivo aos produtos e ainda prevenir contra a senescência e contaminação por micro-organismos (Limchoowong et al., 2016).

2.4.2. Revestimento de quitosana como modificador de atmosfera

As transformações que ocorrem durante o armazenamento de frutos frescos e vegetais são em decorrência de processos metabólicos e a velocidade que isto acontece é dependente das condições de armazenamento. Por este motivo, a modificação da atmosfera de armazenamento pela utilização de embalagens ou revestimentos biodegradáveis que mudam, por exemplo, a tensão de O_2 e CO_2 é uma alternativa viável para prolongar a vida de prateleira destes órgãos vegetais. Há de se observar, porém, que a utilização destes recursos deve ser ajustada para cada produto que se deseja armazenar (Hong et al., 2012; Han et al., 2014).

A quitina é um dos polímeros naturais mais abundantes no mundo, pois é constituinte da parede celular de fungos, leveduras e exoesqueletos de crustáceos e insetos. A quitosana é um biopolímero formado a partir da desacetilação da quitina. Em pH ácido (a baixo de 6) a quitosana se torna solúvel em água em função da protonação de um grupamento amino presente no carbono dois da molécula (Rinaudo, 2006).

O estudo da quitosana tem ganhado muita expressão por se tratar de um composto biodegradável passível de ser utilizado na indústria farmacêutica e alimentícia. Contudo, é imprescindível que se atente para o grau de desacetilação

da mesma, o peso molecular e, ainda, a forma estrutural da quitosana, pois apesar de não inviabilizar seu uso, estas características podem influenciar bastante no desempenho do biopolímero (Kean e Thanou, 2010).

Jongsri et al. (2016) avaliaram a influência do filme à base de quitosana de peso molecular baixo (40 kDa), médio (270 kDa) e alto (360 kDa), sobre o amadurecimento de mangas. Os autores constataram que a quitosana com alto peso molecular apresentou maior viscosidade, formando uma camada mais espessa e cobrindo os estômatos presentes na superfície do fruto, reduzindo as trocas gasosas e retardando de modo mais eficiente a maturação dos frutos.

A quitosana possui propriedades que tornam seu uso promissor na agricultura, sobretudo na conservação pós-colheita de frutos. Dentre estas características estão a atividade antifúngica (Palma-Guerrero et al., 2010), a redução da perda de massa fresca (Qiu et al., 2013), a influência na produção de ácido abscísico e troca gasosa (Iriti et al., 2009), influencia na produção de etileno e na maturação de frutos (Alves et al., 2010). A capacidade que o revestimento à base de quitosana possui em funcionar como uma barreira para gases como vapor d'água, O₂ e CO₂ é bastante variável e pode ser afetada pela concentração do filme, tipo de agente acidificante e surfactante utilizado, bem como, a umidade relativa no ambiente de secagem (Ziani et al., 2008; Kurek et al., 2014).

O uso de revestimento à base de quitosana pode melhorar a aparência de frutos, como visto em citrus (Arnon et al., 2014). É possível, ainda, agregar valor nutricional aos mesmos pela adição de minerais ou vitaminas sem alterar a capacidade do revestimento em retardar as mudanças relacionadas com os processos de amadurecimento (Rahman et al., 2012).

O revestimento biodegradável à base de quitosana é um modificador de atmosfera com inúmeros benefícios para a conservação de frutos na pós-colheita.

Hong et al. (2012) ao aplicarem revestimento à base de quitosana em goiabas verificaram atraso no amadurecimento dos frutos e decréscimo na taxa respiratória, além de menor produção de ERO. Segundo esses autores, isto ocorreu pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes. Porém, em outros casos, como observado em *Luffa cylindrica* (bucha vegetal) por Han et al. (2014) o uso de revestimento à base de quitosana foi responsável pela diminuição da atividade destas enzimas antioxidantes, sugerindo que a resposta à modificação da atmosfera pelo uso do revestimento é dependente da espécie em estudo.

No entanto, a menor produção de ERO pode ter sido função da menor tensão de oxigênio, causada pelo recobrimento dos frutos levando-os à menor taxa respiratória nos tecidos. Também, pode ter sido devido à maior participação das vias respiratórias alternativas (AOX e UcP), que contribuem para reduzir a produção de ERO na mitocôndria devido a maior velocidade na utilização dos elétrons da CTE (Calegario et al., 2003; Mailloux e Harper, 2011).

Alves et al. (2010) verificaram atraso no amadurecimento de maracujás cobertos com revestimento biodegradável. Os resultados de Alves et al. (2010) mostraram que a liberação de etileno foi inversamente proporcional à concentração de quitosana no revestimento, o que reforça a hipótese que a produção de etileno foi reduzida em função da menor tensão de O₂ na microatmosfera circundante dos frutos, causando o atraso no amadurecimento dos mesmos. Esta hipótese corrobora com os dados de Asif et al. (2009) que verificaram atraso na ocorrência do pico de etileno em maçã sob baixa tensão de oxigênio, justificado pela menor expressão de genes de síntese do fitormônio sob esta condição.

O revestimento de frutos pode ainda favorecer a via respiratória anaeróbica produzindo acetaldeído que pode inibir a síntese de etileno (Burdon et al., 1996). Além disto, é importante salientar que o acetaldeído em baixas concentrações é importante por ser precursor de compostos aromáticos durante a maturação (Pesis, 2005).

Resultados como estes sugerem que o uso de revestimentos de quitosana é eficiente em retardar o amadurecimento e conseqüentemente a senescência em frutos, principalmente aqueles mais perecíveis. Porém, o mecanismo pelo qual isto acontece ainda precisa ser melhor compreendido.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Contribuir para o esclarecimento do efeito da aplicação do revestimento à base de quitosana na atividade respiratória e no estado redox associado à respiração, na produção de etileno e no prolongamento da vida de prateleira da goiaba cv. Cortibel.

3.2. Objetivos específicos

Analisar como a cobertura à base de quitosana afeta a produção de etileno e a respiração em frutos intactos de goiaba.

Investigar o efeito do uso do revestimento sobre a evolução do amadurecimento e sobre as mudanças físicas e químicas que ocorrem nesta fase.

Analisar o padrão respiratório de mitocôndrias isoladas de goiabas cobertas pelo revestimento à base de quitosana.

Investigar a influência da cobertura dos frutos com o revestimento à base de quitosana na manutenção da homeostase de espécies reativas de oxigênio em mitocôndrias isoladas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

Os frutos de goiabeira foram colhidos entre os meses de junho e novembro nos anos 2015 e 2016 em uma propriedade rural do distrito de Carabuçu situada nas coordenadas geográficas 21° 08' 02" S e 41° 40' 47" W, no município de Bom Jesus de Itabapoana, região norte Fluminense. Os frutos foram colhidos maduros fisiologicamente, com a casca totalmente verde e transportados até a unidade de Bioquímica e Fisiologia Pós-colheita do Setor de Fisiologia Vegetal (LMGV/CCTA) na UENF.

4.2. Aplicação do tratamento

No laboratório os frutos foram selecionados e submetidos à sanitização por imersão em solução de hipoclorito de sódio 200 mg L⁻¹ por 15 minutos antes de receberem os seguintes tratamentos: *i*) controle, mergulhados em água com pH entre 5,5 e 6 (ajustado com ácido acético) e *ii*) frutos revestidos com quitosana a 1,5% (p/v).

Para a formação do revestimento utilizou-se quitosana de peso molecular médio com pureza de 99,5% e desacetilação de 75-85% (Sigma-Aldrich, MO, USA) e os aditivos Tween 20 (Sigma-Aldrich, MO, USA), como agente surfactante

e ácido acético (Sigma-Aldrich, MO, USA) para ajuste do pH. A quitosana foi adicionada à água destilada em uma concentração de 1,5% (p/v) e mantida sob agitação por cerca de 30 minutos ou até a completa solubilização. O ácido acético foi acrescentado gradualmente a fim de ajustar o pH da solução entre 5,6 e 5,8. Posteriormente foi adicionado Tween 20 (0,1% p/v).

A aplicação da cobertura foi realizada por completa imersão dos frutos na solução por 30 segundos. Durante e após a aplicação dos tratamentos os frutos foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa ($85 \pm 5\%$).

4.3. Avaliação da respiração e da produção de etileno em frutos intactos

A produção de etileno e de CO_2 pelos frutos de goiabeira foi avaliada com 1, 4 e 7 dias após a aplicação dos tratamentos. Os frutos foram acondicionados em recipiente fechado, com volume conhecido, por 30 minutos para acúmulo de CO_2 e 2 horas para acúmulo de etileno e o ar amostrado com uma seringa de 5 mL. A amostra gasosa foi injetada em um cromatógrafo de gases (Thermo Scientific[®], modelo Trace 1310, Italy) equipado com um *loop* de 1 mL, coluna empacotada Porapak Q, detector de ionização em chamas e metanador. As condições da análise foram: pressão de 120 KPa no injetor e temperaturas do forno, injetor, detector e metanador, respectivamente, de 80°C , 150°C , 300°C e 360°C , o metanador foi utilizado apenas para medição do CO_2 . Para cada um dos analitos foi realizada uma curva de calibração utilizando gás padrão, possibilitando por meio de regressão linear quantificá-los nas amostras.

4.4. Atributos químicos e físicos

Os atributos de qualidade foram avaliados com 1, 4 e 7 dias após a aplicação dos tratamentos.

4.4.1. Avaliações físicas.

Coloração da casca – A coloração do epicarpo dos frutos foi avaliada

utilizando um colorímetro portátil (Croma meter[®], modelo CR-300, Minolta, Japão), foram realizadas três medições por fruto, sempre na região equatorial em lados opostos, sendo avaliados, a luminosidade (L^*), o índice de cor croma (C) e o ângulo de cor *hue* (McGuire, 1992).

Perda de massa – Os frutos foram pesados em balança semianalítica e a porcentagem de perda de massa (PM) dos frutos foi calculada utilizando a seguinte expressão:

$$PM = [(P_{\text{inicial}} - P_{\text{final}}) / P_{\text{inicial}}] \times 100$$

Em que P_{inicial} é o peso dos frutos no dia da aplicação dos tratamentos e P_{final} no dia da avaliação.

Firmeza – Foi avaliada a firmeza (resistência à penetração) dos frutos com o auxílio de um texturômetro digital (Texture analyser[®], modelo TA.XT Express, UK) com sonda de 2 milímetros de diâmetro. A velocidade de penetração da sonda nos frutos foi de 1 mm s^{-1} e a medição iniciou-se quando a sonda detectou resistência igual a 0,1 Newton. Foram efetuadas duas medições em cada fruto sempre na região equatorial e em lados opostos, os testes foram conduzidos até 1 cm de profundidade, registrou-se a maior força durante a penetração e os resultados foram expressos em Newtons (N).

4.4.2. Avaliações químicas

Teor de sólidos solúveis – Para quantificação do teor de sólidos solúveis foi utilizado um refratômetro digital (DRBS-300, França[®]). A medida, expressa em °Brix, foi realizada utilizando duas gotas do sumo da goiaba obtido da polpa dos frutos.

Acidez titulável – Foi empregado o método N° 14 descrito pela Associação Oficial de Química Analítica (A.O.A.C., 1975). A amostra consistiu de aproximadamente 10g de polpa de goiaba acrescido de água até completar o volume de 50 mL. Posteriormente a amostra foi homogeneizada utilizando um triturador modelo turrtec 102-E (Tecnal[®]). A titulação foi realizada com NaOH (0,1 N) e monitorada com um medidor de pH. Foi adotado como ponto de viragem

o pH 8,2, pois a coloração da goiaba inviabiliza o uso da fenolftaleína como indicador de viragem. Os resultados foram expressos em percentual de ácido cítrico sendo obtidos por meio da seguinte equação:

$$AT = [(V \times N \times mEq) \times 100] / P$$

Em que AT é a acidez titulável dada em percentual de ácido cítrico; V é volume (em mL) de NaOH gasto na titulação; N é a normalidade do NaOH; mEq é o equivalente grama do ácido cítrico (0,064) e P é a massa (em g) da polpa de goiaba utilizada na titulação.

Teor de ácido ascórbico – A quantificação do teor de ácido ascórbico (AA) das amostras de goiaba foi feita por titulometria como descrito pela A.O.A.C. (1970). Para tal foi pesado em um becker 1,0 g de polpa de goiaba e adicionado 9 mL de ácido oxálico 1% (p/v) para posterior homogeneização utilizando triturador modelo turratec 102-E (Tecnal). As amostras foram filtradas e 2 mL do filtrado foram transferidos para um Erlemeyer sendo adicionados 5 mL de ácido oxálico 1% (p/v). A análise foi realizada em duplicata e a titulação utilizando o 2,6-diclorofenolindofenol como indicador do ponto de viragem. Com base no volume gasto foi calculado o percentual de AA na amostra. Para obtenção da curva padrão foram utilizadas soluções de concentrações conhecidas de ácido ascórbico preparadas com reagente de padrão analítico (Sigma-Aldrich, USA).

Razão SS/AT – Foi dada pela divisão entre os valores do teor de SS e a AT.

4.5. Atividade respiratória de mitocôndrias isoladas

4.5.1. Isolamento e purificação de mitocôndrias

Para o isolamento de mitocôndrias foram utilizados aproximadamente 150 g de polpa de goiaba sem semente. A polpa foi homogeneizada com o auxílio de um Mixer (Philips Walita) em cerca de 300 mL de solução de homogeneização contendo: sacarose 0,3 M, MOPS 100 mM, EDTA 2 mM, BSA 0,3% (p/v), PVP-25 1% (p/v) e ascorbato 100mM, pH 7,5. O homogenato foi filtrado em duas camadas

de gaze e uma de Miracloth e submetido à centrifugação por 15 min a força de 1.500 g. O sobrenadante foi centrifugado a 15.000 g também por 15 min e o *pellet* formado nesta centrifugação foi suspenso em tampão de lavagem contendo: sacarose 0,6 M e BSA 0,2% (p/v) em pH 7,2 (meio de lavagem 1). Esta suspensão foi centrifugada a 1.000 g por 8 min e o sobrenadante obtido, centrifugado a 9.000 g por 15 min. Ao fim desta etapa, temos no *pellet* as mitocôndrias lavadas.

As mitocôndrias obtidas foram purificadas utilizando um gradiente de *Percoll*. O *pellet* da etapa anterior foi suspenso em 1 mL do tampão de lavagem o qual foi vertido sobre 30 mL de solução de purificação previamente preparado fracionado em dois extratos com 15 mL contendo 4,4% (p/v) de PVP, 50% do meio de lavagem 1 e *Percoll*, a segunda parte do meio de purificação foi composta de 50% de meio de lavagem 1 e *Percoll*. As concentrações de *Percoll* foram 16 e 18% (v/v) para frutos verdes e maduros respectivamente, gerando assim um gradiente descontínuo e submetido à centrifugação a 17.000 g por 40 minutos. Após a centrifugação o extrato contendo as mitocôndrias foi retirado com uma pipeta tipo Pasteur no halo formado no terço médio do tubo. Esta porção foi diluída cerca de dez vezes em solução formada por sacarose 0,3 M e MOPS 10 mM pH 7,2 (meio de lavagem 2) seguido de centrifugação por 15 min a 10.000 g duas vezes para total retirada do *Percoll*, sendo o *pellet* ressuspenso em 500 µL de meio de lavagem 2. A concentração de proteína foi determinada a partir de uma amostra de 10 µL utilizando o 2-D Quant Kit (GE Healthcare). Foi seguido o protocolo proposto por Duque e Arabaça (1999) com modificações de Oliveira et al. (2015).

4.5.2. Determinação da integridade das mitocôndrias

A determinação da integridade da membrana das mitocôndrias isoladas foi mensurada pelo método polarográfico, utilizando um eletrodo de O₂ tipo Clark (Hansatech®, Respire 1, UK) em 0,6 mL de meio de reação contendo: manitol 0,35 M, tampão fosfato 10 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, BSA 0,5% (p/v) e pH 7,2 a 25°C. A este meio foi adicionado 100 µg de proteína mitocondrial ácido ascórbico 500 mM como substrato para a respiração, posteriormente se adicionou

citocromo C 5 mM, para possível detecção de aumento na taxa respiratória caso as membranas mitocondriais estivessem rompidas e o citocromo C tivesse acesso à membrana interna. Logo após foi adicionado o detergente Triton[®] 0,05 (v/v). Medindo a taxa respiratória nestas três etapas foi possível detectar a integridade das organelas por meio da fórmula determinada por Oliveira et al. (2017)

4.5.3. Quantificação da atividade respiratória

A atividade respiratória foi determinada utilizando 100 µg de proteína mitocondrial. As avaliações foram realizadas pelo método polarográfico, utilizando um eletrodo de O₂ tipo Clark (Hansatech®, Respire 1, UK) em 0,6 mL de meio de reação contendo: manitol 0,35 M, tampão fosfato 10 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, BSA 0,5% (p/v) e pH 7,2 a 25°C. Para a determinação dos estádios 3 e 4 da respiração, evidenciando a capacidade fosforilativa das mitocôndrias, foi adicionado ADP em volume suficiente para obter uma concentração de 100 nmoles no meio de reação.

Para estudo da participação da via alternativa dada pela AOX foi medida a taxa de consumo de O₂ na presença de 20 µM de n-propilgalato (n-PG) que visou a inibição da AOX e posteriormente azida 3 mM, em mitocôndrias no estado 4 (Duque e Arrabaça, 1999). Obtidos os traçados, as taxas de consumo de O₂ das mitocôndrias isoladas bem como a participação da via sensível e da resistente ao cianeto foram calculadas seguindo protocolo adaptado de Oliveira et al. (2015).

Os resultados foram apresentados como valores médios de três diferentes extrações mitocondriais obtidas a partir da polpa de goiabas sem semente armazenadas a 25°C por 1 e 4 dias após a aplicação dos tratamentos.

4.6. Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio e atividade de enzimas antioxidantes

4.6.1. A obtenção do extrato proteico

Para determinação da atividade das enzimas antioxidantes o extrato foi homogeneizado segundo Vicente et al. (2006) com algumas modificações.

Aproximadamente 5 g de tecido da polpa sem semente foi triturado em 10 mL de solução resfriada contendo: fosfato de sódio 100 mM (pH 7,8), 1M de cloreto de sódio, fenil-metil-sulfonil fluoreto (PMSF) 1 mM, EDTA 0,1 mM, Triton X-100 0,1% (v/v) e 1% polivinilpolipirrolidona (PVPP), centrifugado a 10.000 g durante 10 min a 4°C e o sobrenadante utilizado para os ensaios de atividade da superóxido dismutase (SOD) e da pirogalol peroxidase (POD), bem como para a medição da produção de ERO.

4.6.2. Produção de ERO

A taxa de produção de ERO foi determinada em extrato proteico descrito no item 4.6.1 em tampão TRIS 0,1 M e pH 8, pela oxidação da diclorofluoresceína (DCFH) (Molecular probe, Sigma-Aldrich EUA). Esta forma reduzida, quando em contato com o peróxido de hidrogênio, superóxido ou radical hidroxila é oxidada à DCF, que quando excitado a 504 nm emite fluorescência na faixa de 529 nm. A fluorescência foi registrada em um espectrofluorímetro. Foram realizados testes preliminares para determinação da concentração de DCFH utilizada.

4.6.3. Atividade da SOD

A determinação da atividade da SOD foi realizada pelo método de Giannopolitis e Ries (1977) com modificações. O volume final da reação foi de 3 mL sendo 2,9 mL de meio de reação contendo fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, nitroazul de tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 10 µM, riboflavina 2 µM e 0,1 mL de extrato contendo enzima. As avaliações foram realizadas em espectrofotômetro durante 2 min a 560 nm a temperatura de 25°C. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima capaz de diminuir em 50% a redução do NBT. A atividade foi expressa em U/mg de proteína.

4.6.4. Atividade da POD

A atividade da POD foi determinada de acordo com Vicente et al. (2006) com leves modificações. A reação foi realizada em volume final de 3 mL, contendo 2,7 mL de meio composto por fosfato de potássio 50 mM pH 6,8,

pirogalol 45 mM, H₂O₂ 8 mM e 0,3 mL de extrato contendo enzima.

4.7. Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos, controle e revestido em quitosana 1,5% (p/v) e dez repetições, i.e. dez frutos. As avaliações foram realizadas com 1, 4 e 7 dias após a aplicação dos tratamentos, exceto para as análises mitocondriais, que foram realizadas apenas com 1 e 4 dias após o recobrimento dos frutos e cada repetição foi composta por um homogenato obtido de 200g de goiaba, sem casca e sem semente. A análise dos dados obtidos foi realizada seguindo esquema fatorial em que um fator foi constituído pelos tratamentos e o outro os dias de avaliação. A fim de realizar a comparação entre as médias, os dados foram submetidos ao teste de Tukey ($p \leq 0,05$). O programa utilizado foi o Assistat versão 7.7.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Respiração

A respiração dos frutos foi crescente até o último dia de avaliação, saindo de 36 e 26 mL de CO₂ kg⁻¹ MF h⁻¹ no primeiro dia avaliado e atingindo valores tais como 57 e 43 mL de CO₂ kg⁻¹ MF h⁻¹ para os grupos controle e revestidos, respectivamente (Figura 1). Silva et al. (2012) observaram este mesmo padrão em goiabas 'Pedro Sato' que entre o 3º e o 9º dias de avaliação apresentaram crescente taxa respiratória tendo ao nono dia atingindo liberação próxima à 50 mL kg⁻¹ h⁻¹ para o grupo controle e cerca de 40 mL kg⁻¹ h⁻¹ nos frutos revestidos com filme à base fécula de mandioca. Evidenciando a capacidade de redução da taxa respiratória pelo uso de revestimento.

Azzoline et al. (2005), ao avaliarem o perfil de amadurecimento em goiabas 'Pedro Sato', observaram que a respiração dos frutos foi crescente até o 12º dia após colhidos. Estes autores inclusive concluíram que estes frutos não se enquadram na descrição típica de frutos climatéricos. Outros autores, no entanto, observaram um pico respiratório em goiabas com o avanço do amadurecimento (Bashir et al., 2003; Mohamed-Nour e Abu-Goukh., 2010).

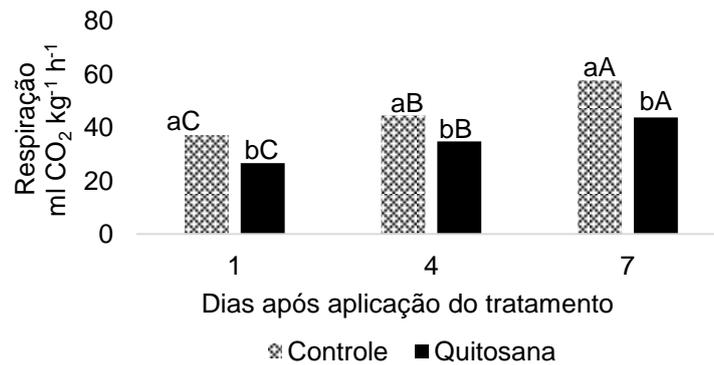


Figura 1: Taxa respiratória de goiaba ‘Cortibel’, mensurados com 1, 4 e 7 dias após a aplicação de cobertura à base de quitosana. Letras minúsculas representam a comparação entre frutos controle e tratado (DMS 4,52), enquanto as letras maiúsculas representam a comparação entre os diferentes tempos de avaliação para cada tratamento (DMS 5,43). Barras seguidas de letras iguais não diferem entre si segundo teste Tukey $p \leq 0,05$.

Mohamed-Nour e Abu-Goukh (2010) observaram um decréscimo na taxa respiratória de goiabas por volta de 14 dias após os frutos serem colhidos, tanto para goiabas de polpa branca quanto para as de polpa vermelha armazenados a 12°C. Enquanto Bashir et al. (2003) verificaram aumento na taxa respiratória no início do amadurecimento e um decréscimo a partir de dez dias após armazenamento a 22°C. Em ambos os estudos, o pico respiratório ficou muito bem definido, todavia em nenhum dos casos a liberação de CO₂ ultrapassou 25 mL kg⁻¹ de MF h⁻¹.

A discrepância entre os resultados descritos na literatura quanto a presença ou ausência de um pico climatérico, pode ser em função de diferenças intrínsecas às variedades como visto em melão, em que a variedade ‘Cataloupe’ é tipicamente climatérica e a ‘Charentais’ é não climatérica (Pech et al., 2008).

No presente estudo, possivelmente o tempo de avaliação tenha sido curto para se observar o decréscimo na taxa respiratória, evidenciando, assim, o pico climatérico. Contudo, este foi o limite de avaliação definido uma vez após este ponto os frutos já não apresentavam condições aceitáveis para comércio e consumo.

Outro resultado verificado foi que nas três avaliações realizadas os frutos revestidos com quitosana respiraram menos que os frutos não revestidos com a quitosana, a diferença na liberação de CO₂ foi de 28, 23 e 25% nas avaliações realizadas com 1, 4 e 7 dias após a aplicação do tratamento, respectivamente.

A formação de uma micro atmosfera ao redor do fruto em função do filme

criado pela quitosana, potencialmente reduziu a tensão de O_2 no entorno do fruto e as trocas gasosas com o meio. Teixeira et al. (2016) verificaram que a baixa tensão de oxigênio (5 KPa) é capaz de reduzir a taxa respiratória de frutos de goiaba armazenados à 12°C e prolongar a vida de prateleira dos mesmos, os quais se mantiveram viáveis para o consumo até 28 dias de armazenamento.

O oxigênio é o aceptor final da cadeia de elétrons e sua ausência ou menor disponibilidade naturalmente causa decréscimo na respiração mitocondrial, fato que reflete no ciclo dos ácidos tricarbóxicos reduzindo a descarboxilação de compostos orgânicos. Nestes casos, a via fermentativa é acionada com a reoxidação de $NADH_2$ em NAD^+ , permitindo o funcionamento da via glicolítica (Toro e Pinto, 2015). Apesar destas respostas adaptativas possibilitarem a sobrevivência dos tecidos vegetais a curto prazo, a menor taxa respiratória pode retardar as transformações inerentes ao processo de maturação dos frutos, já que estas dependem da energia e dos intermediários gerados durante a respiração celular (Lurie e Tonutti, 2014).

Contudo, o filme à base de quitosana além de funcionar como barreira ao O_2 não é totalmente permeável ao CO_2 (Kurek et al., 2014). Portanto, não se pode descartar a possibilidade de o revestimento ter agido como uma barreira física impedindo a saída do CO_2 , conseqüentemente, interferindo na mensuração da taxa respiratória.

5.2. Etileno

A taxa de emissão de etileno também foi crescente com o passar do tempo após a aplicação do tratamento, assim como verificado para a taxa respiratória. Inicialmente (primeiro dia de avaliação) a taxa de emissão de etileno foi de 0,72 e 0,58 μL de etileno kg^{-1} MF h^{-1} , chegando no sétimo dia à 5,28 e 2,14 μL kg^{-1} MF h^{-1} para os frutos controle e revestidos com quitosana, respectivamente. Não foi verificada diminuição na liberação de etileno no intervalo estudado e, portanto, não ficou caracterizado um pico de emissão de etileno, assim como mencionado para taxa respiratória o tempo de avaliação tenha sido curto para tal observação (Figura 2).

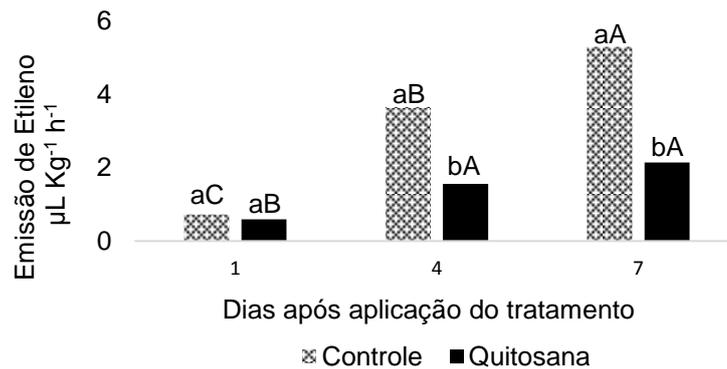


Figura 2: Liberação de etileno de goiabas ‘Cortibel’, mensurados com 1, 4 e 7 dias após a aplicação de cobertura à base de quitosana. Letras minúsculas representam a comparação entre frutos controle e tratado (DMS 0,50), enquanto as letras maiúsculas representam a comparação entre os diferentes tempos de avaliação para cada tratamento (DMS 0,60). Barras seguidas de letras iguais não diferem entre si segundo teste Tukey $p \leq 0,05$.

A taxa de liberação de etileno do presente trabalho se aproximam muito dos verificados por Abreu et al. (2012a) para goiabas ‘Pedro Sato’. Estes autores verificaram aumento na emissão de etileno pelos frutos armazenados a 22°C até os 8 dias, a partir do qual verificaram taxa de emissão de aproximadamente 5 $\mu\text{L kg}^{-1} \text{h}^{-1}$.

O padrão de emissão de etileno observado no presente trabalho também foi parecido com o verificado por Liu et al. (2012) para goiabas da variedade ‘Li-Tzy Bar’, considerada um fruto climatérico. Estes autores verificaram um aumento na taxa de emissão de etileno durante os 8 dias de armazenamento dos frutos. Por outro lado, a variedade ‘Jen-Ju Bar’, considerada não climatérica, não apresentou aumento na liberação de etileno durante a pós-colheita. Estes autores demonstraram ainda que o incremento na taxa respiratória dos frutos da variedade ‘Li-Tzy Bar’ foi em resposta ao etileno, uma vez que este aumento foi diretamente proporcional à concentração de etileno exógeno a que os frutos foram expostos.

No 4º e 7º dias após a aplicação do revestimento de quitosana verificou-se diferença na emissão de etileno entre frutos controle e revestidos. Nestes casos, a emissão de etileno nos frutos controle foi mais que o dobro daquela registrada nos frutos recobertos com quitosana. Mais uma vez, a baixa tensão de O_2 pode ter sido responsável pela alteração no metabolismo do fruto, pois o O_2 é um cofator no processo de síntese de etileno (Lin et al., 2009). Além disso, o acúmulo interno de CO_2 pode ter afetado a síntese e ou ação do etileno, inibindo a

participação do sistema II de síntese do etileno, fato que explicaria a redução tão drástica da liberação do fitormônio nos frutos tratados (De Wild et al., 2005).

A influência da redução na tensão de O_2 e o acúmulo de CO_2 sobre a liberação de etileno pode ser corroborado pelos resultados obtidos por Bonghi et al. (1999). Estes autores acondicionaram abacates em ambiente com baixa concentração de O_2 (<1%), assim como em alta concentração de CO_2 (>30%) por 24 e 48h e posteriormente foram transferidos para condição atmosférica por até 8 dias sendo observado significativa redução na emissão de etileno até o fim das avaliações. Por outro lado, Zhang et al. (2011) submeteram frutos de abacate por 12h à 2KPa de O_2 e depois os mesmos foram armazenados em condições ambiente com normóxia, não sendo verificada diferença entre frutos controle e tratados.

Esta diferença entre os resultados de ambos os trabalhos sugere que o efeito da baixa concentração de O_2 sobre a emissão de etileno é dependente do tempo de exposição dos frutos à hipóxia, o que nos faz supor que este deve ter sido a causa de não ter sido verificada diferença na emissão de etileno entre frutos controle e tratados no primeiro dia de avaliação no presente trabalho.

Considerando estes resultados, podemos supor que a menor liberação de etileno, atuou em sinergismo com a menor taxa respiratória, apresentada anteriormente, contribuindo para as alterações observadas em alguns atributos físicos e químicos nos frutos revestidos com filme à base de quitosana, durante o processo de amadurecimento.

5.3. Atributos físicos e químicos

A aplicação de quitosana sobre as goiabas influenciou, mesmo que de forma discreta, na maioria dos atributos físicos estudados. Na Figura 3 é possível observar o efeito da cobertura à base de quitosana sobre o aspecto externo dos frutos. Nota-se que os frutos recobertos com quitosana apresentam maior brilho e as mudanças de cor, isto é, a perda do verde e o amarelecimento da casca foram mais lentos.

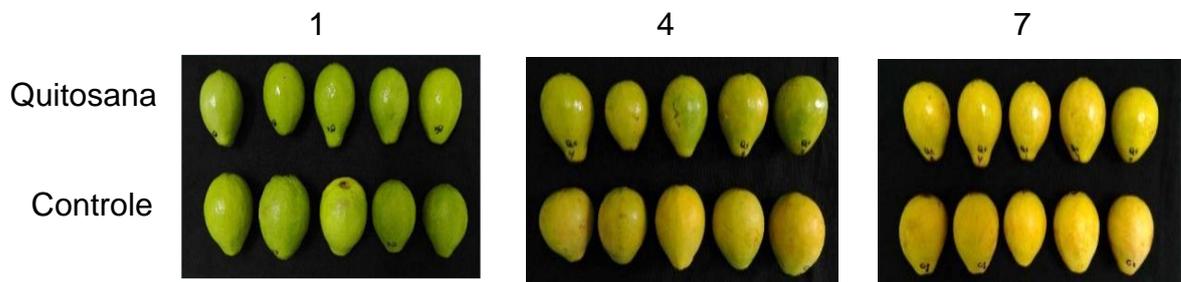


Figura 3. Aspecto externo das goiabas e controle com 1, 4 e 7 dias após a aplicação de cobertura à base de quitosana.

A mudança da coloração do verde para o amarelo dá-se devido à degradação das clorofilas e síntese dos carotenoides. Siqueira et al. (2011) relatam que a relação clorofila/carotenoide foi reduzida de 123,8 para 8,44 nos 8 primeiros dias de armazenamento de goiabas 'Paluma'. Além disto, estes autores verificaram também um aumento na concentração de flavonoides e de antocianinas.

De acordo com Azzolini et al. (2004), a coloração da casca e a firmeza dos frutos são índices adequados para distinguir os diferentes estádios de maturação de goiabas. Como esperado, no presente trabalho houve significativa queda nos valores de ângulo de cor *hue* durante as avaliações, variando de valores próximos à 120 (verde) até atingir valores próximos à 80 (transição entre verde e amarelo) tanto nos frutos do grupo controle quanto nos revestidos com quitosana.

É possível verificar que com 4 e 7 dias após a aplicação da cobertura de quitosana, os frutos tratados apresentaram valores médios do ângulo de cor *hue* superiores aqueles apresentados pelos frutos controle, o que evidencia um atraso no amarelecimento dos frutos devido à aplicação do revestimento (Figura 4).

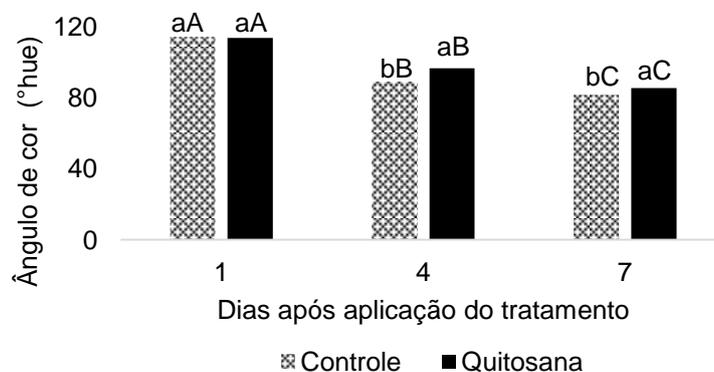


Figura 4. Ângulo de cor *hue* de goiaba 'Cortibel', mensurados com 1, 4 e 7 dias após a aplicação

de cobertura à base de quitosana. Letras minúsculas representam a comparação entre frutos controle e tratado (DMS 2,83), enquanto as letras maiúsculas representam a comparação entre os diferentes tempos de avaliação para cada tratamento (DMS 3,40). Barras seguidas de letras iguais não diferem entre si segundo teste Tukey $p \leq 0,05$.

Esta alteração no padrão de desverdecimento dos frutos revestidos com filme de quitosana se deve à modificação da atmosfera que circunda o fruto, causada pelo revestimento. Pinto et al (2013), já haviam verificado o efeito da baixa tensão de O_2 (1 e 3%) sobre o amarelecimento do mamão, constatando que nessas condições o processo acontece mais lentamente.

Uma variação no ângulo *hue* semelhante à verificada aqui neste trabalho foi observada por Abreu et al. (2012a) em goiabas cv. 'Pedro Sato' armazenadas por oito dias a 22°C e 78% de umidade relativa. Há de se atentar, no entanto, que a aplicação de revestimento nos frutos com o objetivo de atrasar as mudanças relacionadas ao amadurecimento, deve ser feita com os frutos ainda com a casca verde (maduros fisiologicamente), uma vez que a cobertura com filme formado da combinação de quitosana e amido de mandioca em frutos de goiaba com coloração entre 70 e 80° de ângulo de cor *hue* não surtiu efeito sobre a mudança de cor dos frutos (Aquino et al., 2015).

A variável luminosidade da casca dos frutos não foi influenciada pela aplicação do filme a base de quitosana, os dados mostram apenas uma mudança em função do tempo, detectada entre o 1º e 4º dia após a aplicação do tratamento, provavelmente por conta do amarelecimento dos frutos (Figura 5). Nestes dois dias de avaliação essa variável registrou valores médios de 60 e 69 para o grupo controle e 59 e 66 para os frutos revestidos com quitosana. Entre o quarto e o sétimo dia não foi observado diferença em nenhum dos grupos (Figura 5).

Sinuco et al. (2010) também verificaram a mesma tendência na evolução da luminosidade da casca de duas variedades de goiabas da Colômbia durante o amadurecimento dos frutos, assim como registrado por Morgado et al. (2010) em goiabas 'Kumagai'.

No presente estudo, apesar de um maior brilho ter sido observado nos frutos revestidos por quitosana (Figura 3), este brilho não foi suficiente para gerar diferença na luminosidade dos frutos. Freitas et al. (2015) também não observaram diferença em tal variável em cagaitas (*Eugenia dysenterica*) recobertas por quitosana na maioria de suas avaliações. Por outro lado, Silva et

al. (2018). Estes autores detectaram maior luminosidade em frutos revestidos com quitosana durante as quatro avaliações realizadas até 96 horas após a aplicação da cobertura.

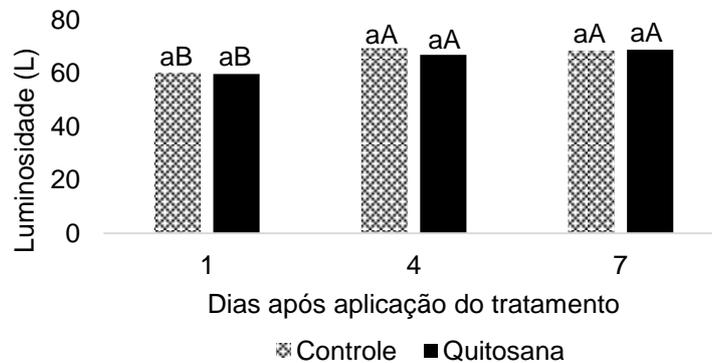


Figura 5: Luminosidade da casca de goiaba 'Cortibel', mensuradas com 1, 4 e 7 dias após a aplicação de cobertura à base de quitosana. Letras minúsculas representam a comparação entre frutos controle e tratado (DMS 1,59), enquanto as letras maiúsculas representam a comparação entre os diferentes tempos de avaliação para cada tratamento (DMS 2,35). Barras seguidas de letras iguais não diferem entre si segundo teste Tukey $p \leq 0,05$.

A variável cor aumentou constantemente desde o 1º até o 7º dia nos frutos com o revestimento de quitosana, enquanto nos frutos controle verificou-se aumento apenas entre o 1º e o 4º dias (Figura 6). O revestimento de quitosana pouco interferiu nessa variável, sendo verificado efeito significativo da aplicação do revestimento no 4º dia, quando o índice cor registrado nos frutos com o revestimento foi menor que aquele do controle. Phebe e Ong (2010) verificaram que o tratamento de goiabas 'Kamputchea' com 1-MCP influenciou nas mudanças de cor da casca do fruto. Segundo esses autores, o índice de cor permaneceu inalterado durante cinco dias de avaliação, evidenciando a importância do etileno no processo de mudança de cor dos frutos. De forma semelhante, pode-se atribuir a mesma causa, i.e. menor emissão de etileno, o menor acréscimo observado para a variável Cor nos frutos revestidos com quitosana do presente trabalho (Figura 6).

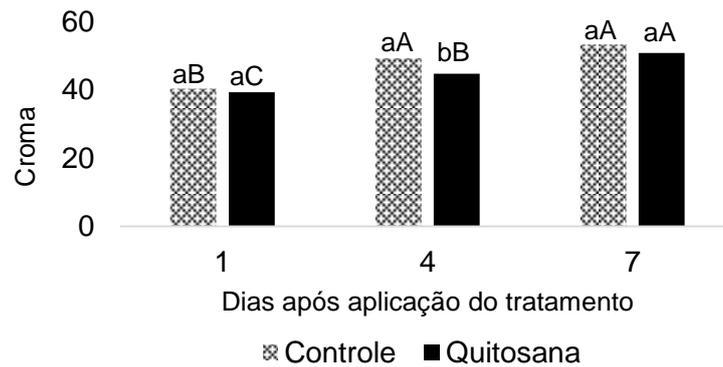


Figura 6. Croma de goiaba ‘Cortibel’, mensuradas com 1, 4 e 7 dias após a aplicação de cobertura à base de quitosana. Letras minúsculas representam a comparação entre frutos controle e tratado (DMS 3,72), enquanto as letras maiúsculas representam a comparação entre os diferentes tempos de avaliação para cada tratamento (DMS 4,48). Barras seguidas de letras iguais não diferem entre si segundo teste Tukey $p \leq 0,05$.

De acordo com os resultados da Figura 6, observa-se que a mudança de cor nos frutos revestidos com quitosana ocorreu de forma mais lenta do que o registrado para os frutos do grupo controle, o que é vantajoso para a pós-colheita da goiaba, por se tratar de um fruto bastante perecível que rapidamente perde qualidade para o consumo.

Os frutos revestidos com quitosana apresentaram valores médios de croma igual à 40, 49 e 53 enquanto aqueles não revestidos 39, 44 e 50 com 1,4 e 7 dias após aplicação do filme. A amplitude da variação nos valores de Croma verificada no presente trabalho foi alta se comparamos com a verificada por Teixeira et al. (2016) em que de 0 a 28 dias de armazenamento de goiabas ‘Pedro Sato’ sob atmosfera controlada (5 KPaO₂) registraram variação nos valores de croma de 39 a 43.

A perda de massa fresca, que nesse caso foi avaliada em relação ao primeiro dia de avaliação, foi crescente tanto nos frutos recobertos com quitosana, quanto naqueles não revestidos, durante os sete dias de armazenamento dos frutos (Figura 7). No 7º dia de armazenamento dos frutos verificou-se uma menor ($p \leq 0,05$) perda de massa nos frutos revestidos com quitosana em relação ao controle. No 7º dia enquanto a perda de massa nos frutos revestidos com quitosana foi de 4,1%, nos frutos não revestidos a perda foi de 4,6% (Figura 7).

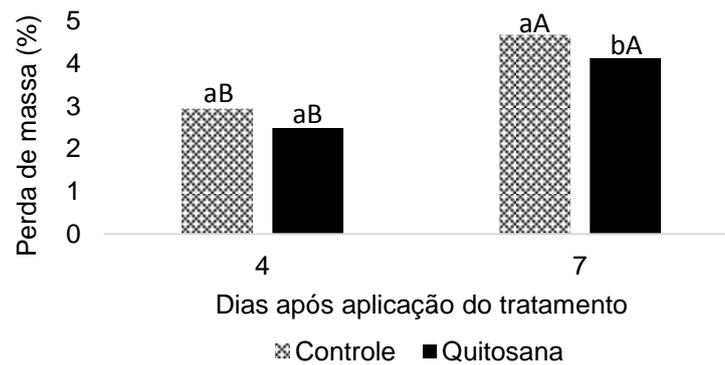


Figura 7: Perda de massa fresca de goiabas 'Cortibel', mensuradas com 4 e 7 dias após a aplicação de cobertura à base de quitosana. Letras minúsculas representam a comparação entre frutos controle e tratado (DMS 0,5), enquanto as letras maiúsculas representam a comparação entre os diferentes tempos de avaliação para cada tratamento (DMS 0,5). Barras seguidas de letras iguais não diferem entre si segundo teste Tukey $p \leq 0,05$.

A desidratação é a principal causadora da perda de massa fresca. Por isso os frutos recobertos com quitosana, por apresentarem uma barreira física que dificulta a perda de água para a atmosfera, apresentam menor perda de massa fresca.

Silva et al. (2012) verificaram que goiabas 'Pedro Sato' apresentaram perda de massa de 5,4% nos frutos revestidos com filme à base de fécula de mandioca, enquanto nos frutos não tratados a perda foi de 7,8% após 12 dias de armazenamento a 21 °C e 85% de umidade. Thommohaway et al. (2007) verificaram que filmes à base de quitosana mesmo em baixas concentrações (0,1; 0,2 e 0,5%), foram efetivos na redução da perda de massa fresca em goiabas. Tornando clara a eficiência do uso de cobertura biodegradáveis nos frutos sobre a desidratação e manutenção de uma boa aparência física dos mesmos.

Outro evento que contribui com a perda de massa fresca nos frutos é o consumo de suas reservas no processo respiratório que ocorre durante o amadurecimento. No entanto, esta perda pode ser considerada insignificante quando comparado à perda de água.

Outra característica física avaliada foi a firmeza do epicarpo, que não apresentou diferença ($p \leq 0,05$) entre frutos revestidos com quitosana e frutos controle durante todo o período de avaliação (Figura 8). Os resultados mostram uma redução mais acentuada da firmeza entre o 1º e o 4º dia nos frutos controle, não variando até o 7º dia, enquanto nos frutos revestidos com quitosana, após a redução mais acentuada na firmeza entre nos quatro primeiros dias, também foi

verificada uma redução ($p \leq 0,05$) até o 7º e último dia de avaliação.

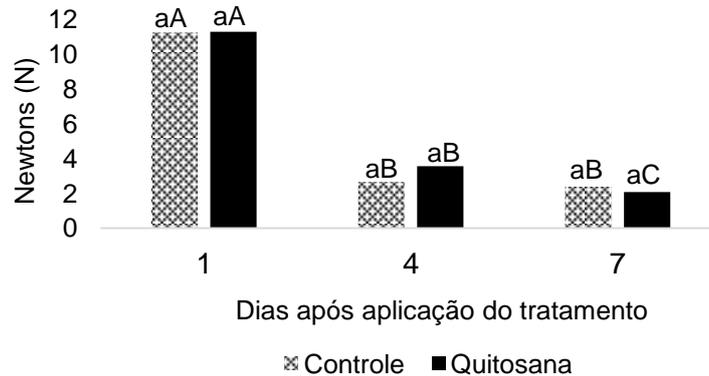


Figura 8. Firmeza de goiaba 'Cortibel', mensuradas com 1, 4 e 7 dias após a aplicação de cobertura à base de quitosana. Letras minúsculas representam a comparação entre frutos controle e tratado (DMS 1,3), enquanto as letras maiúsculas representam a comparação entre os diferentes tempos de avaliação para cada tratamento (DMS 2,1). Barras seguidas de letras iguais não diferem entre si segundo teste Tukey $p \leq 0,05$.

A perda de firmeza nos frutos carnosos ocorre principalmente pela atividade de enzimas que agem sobre a parede celular, algumas delas ativadas pela ação do etileno (Bassetto et al., 2005). No presente estudo, apesar de a liberação de etileno ter sido menor nos frutos revestidos por quitosana quando comparado aos frutos controle (Figura 2), não foi verificada diferença na firmeza dos frutos (Figura 8). Outros autores relatam retardo na perda de firmeza em frutos de tomate (Breda et al, 2017) e goiaba (Hong et al., 2012; Silva et al., 2012) em função do uso de revestimentos comestíveis.

Neste trabalho foi verificado um discreto, porém, significativo acréscimo nos teores de sólidos solúveis durante o amadurecimento dos frutos (Figura 9). Nos frutos revestidos com a quitosana o aumento no teor de sólidos solúveis foi mais lento, mostrando diferença ($p \leq 0,05$) apenas entre o 1º e o 7º, enquanto que nos frutos não revestidos com o quitosana, já foi verificada diferença ($p \leq 0,05$) no teor de sólidos solúveis entre o 1º e o 4º de avaliação (Figura 9).

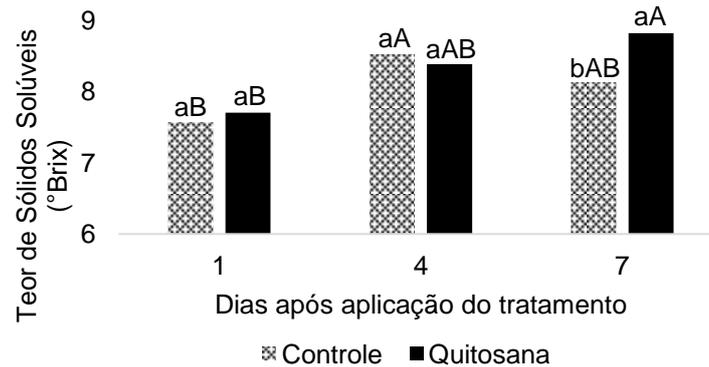


Figura 9. Teor de sólidos solúveis de goiabas 'Cortibel', mensuradas com 1, 4 e 7 dias após a aplicação de cobertura à base de quitosana. Letras minúsculas representam a comparação entre frutos controle e tratado (DMS 0,5), enquanto as letras maiúsculas representam a comparação entre os diferentes tempos de avaliação para cada tratamento (DMS 0,7). Barras seguidas de letras iguais não diferem entre si segundo teste Tukey $p \leq 0,05$.

Hong et al. (2012), também concluíram que o uso de revestimento à base de quitosana influenciou as mudanças inerentes ao amadurecimento fazendo com que o teor de sólidos solúveis aumentasse mais lentamente em goiabas cultivar pérola. Segundo estes autores os frutos revestidos apresentaram menor teor de sólidos solúveis em comparação ao controle quando avaliados aos 6, 9 e 12 dias de armazenamento.

Alguns autores relatam que durante o amadurecimento não há mudanças no teor de sólidos solúveis em goiabas 'Pedro Sato' (Abreu et al., 2012a). Em outros casos, um aumento é observado. Cerqueira et al. (2009) descreveram que em goiabas 'Kumagai' o teor de sólidos solúveis da polpa dos frutos passou de 7,5 °Brix para cerca de 9,5 °Brix, após 12 dias de armazenamento. De acordo com Cerqueira et al. (2009) os frutos tratados com 1-MCP na dose 900 nL L⁻¹ tiveram menor alteração no teor de sólidos solúveis, que atingiu valor máximo de 8,5 °Brix no 12º dia de armazenamento, evidenciando o efeito do etileno no amadurecimento e por consequência no teor de sólidos solúveis dos frutos.

A acidez titulável não mostrou variação significativa durante o período de análise dos frutos. O percentual de ácido cítrico das goiabas 'Cortibel' variou de modo geral entre 0,41 e 0,49 (Figura 10). Com exceção da avaliação feita no 4º dia, a aplicação do revestimento de quitosana não influenciou nessa variável. No 4º dia, entretanto, verificou-se um menor ($p \leq$

0,05) teor de acidez titulável nos frutos revestidos com a quitosana, em comparação aos frutos controle.

Outros autores também relataram menor acidez titulável em goiabas recobertas por quitosana (Hong et al. 2012; Silva et al. 2018). Tal fato foi atribuído a menor atividade metabólica destes frutos e consequente atraso nas transformações referentes ao processo de amadurecimento.

Bashir et al. (2003) avaliando goiabas vermelhas com quatro dias após colheita encontraram acidez em torno de 0,15% de ácido cítrico, valor que aumentou até 0,2% aos 8 dias com posterior decréscimo. Enquanto Liu et al. (2012) detectaram percentual de ácido cítrico em torno de 0,64 aos 4 e 0,52 aos 8 dias para goiabas 'Li-Tzy Bar'.

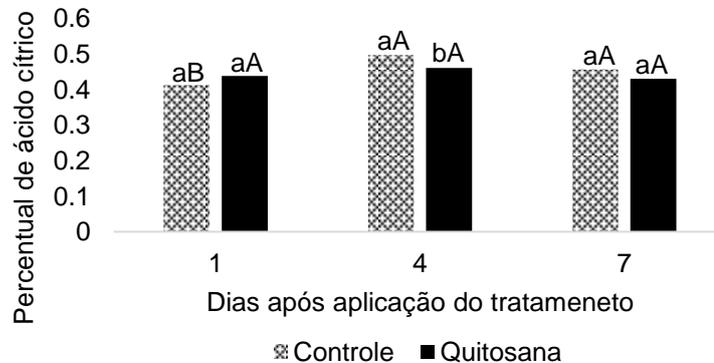


Figura 10. Acidez titulável de goiaba 'Cortibel', mensuradas com 1, 4 e 7 dias após a aplicação de cobertura à base de quitosana. Letras minúsculas representam a comparação entre frutos controle e tratado (DMS 0,03), enquanto as letras maiúsculas representam a comparação entre os diferentes tempos de avaliação para cada tratamento (DMS 0,04). Barras seguidas de letras iguais não diferem entre si segundo teste Tukey $p \leq 0,05$.

Os resultados mostram um aumento no teor de ácido ascórbico nos frutos durante o amadurecimento dos mesmos. A aplicação do filme de quitosana não influenciou ($p \leq 0,05$) o acúmulo de ácido ascórbico nos frutos aos sete dias após o tratamento, mas a velocidade deste aumento durante o período analisado, de modo que frutos tratados demonstraram atraso neste acúmulo e consequentemente menor teor de ácido ascórbico ao quarto dia após o tratamento (Figura 11).

No presente trabalho foram verificadas concentrações crescentes de ácido ascórbico sendo estas de 38,77; 54,63 e 55,14 mg 100g⁻¹ para os frutos do grupo controle e 32,63; 34,16 e 52,68 para os frutos recobertos avaliados com 1, 4 e 7 dias após o tratamento (Figura 11), evidenciando que frutos tratados tiveram evolução do amadurecimento mais lenta. Azzolini et al. (2004) observaram em

goiabas 'Pedro Sato' teores de ácido ascórbico crescente quando compararam frutos verdes, intermediários e maduros os quais apresentaram respectivamente, 30,35; 44,47 e 48,77 mg 100g⁻¹

Como o acúmulo de ácido ascórbico foi mais lento nos frutos revestidos com quitosana, no 4º dia após a aplicação do filme, o teor de ácido ascórbico nos frutos controle foi maior que nos frutos com quitosana. Porém, no último dia de avaliação, o teor de ácido ascórbico não mostrava mais diferença ($p \leq 0,05$) entre frutos revestidos ou não com quitosana (Figura 11).

A goiaba é um fruto rico em ácido ascórbico, sendo uma importante fonte desta vitamina na dieta humana (Valente et al., 2011). O controle no teor de ácido ascórbico em frutos é um processo complexo que envolve sua síntese por diferentes vias, a reciclagem, a utilização deste ácido como antioxidante, expansão celular entre outros. Um fator que é de fundamental importância na síntese de ácido ascórbico é a disponibilidade de precursores das rotas de síntese (Mellidou et al., 2012). A degradação da pectina é um processo que disponibiliza estes precursores, portanto o aumento deste ácido tem sido correlacionado com a expressão de genes envolvidos neste processo (Di Matteo et al., 2010).

No presente trabalho o acúmulo de ácido ascórbico em goiabas 'Cortibel' seguiu padrão semelhante à perda de firmeza, portanto, provavelmente a disponibilidade de precursores foi o fator limitante para o acúmulo.

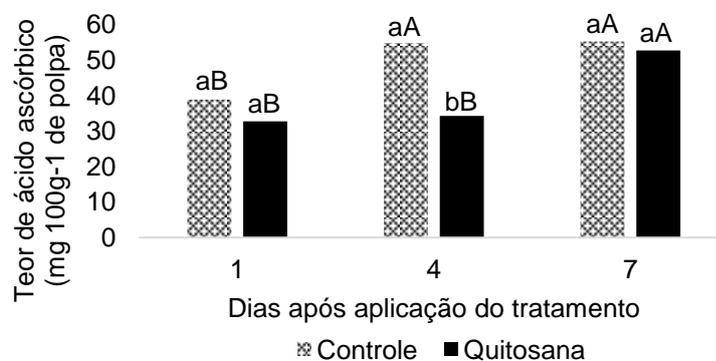


Figura 11. Teor de ácido ascórbico de goiabas 'Cortibel', mensuradas com 1, 4 e 7 dias após a aplicação de cobertura à base de quitosana. Letras minúsculas representam a comparação entre frutos controle e tratado (DMS 10,3), enquanto as letras maiúsculas representam a comparação entre os diferentes tempos de avaliação para cada tratamento (DMS 12,5). Barras seguidas de

letras iguais não diferem entre si segundo teste Tukey $p \leq 0,05$.

O *ratio*, razão entre o teor de sólidos solúveis e acidez titulável, não foi significativamente influenciado pela aplicação do filme de quitosana, tampouco variou durante o amadurecimento dos frutos se mantendo entre 17 e 20 (Figura 12). Chang (2016) encontrou valores para *ratio* de 19 e 20, bem próximos aos do presente trabalho.

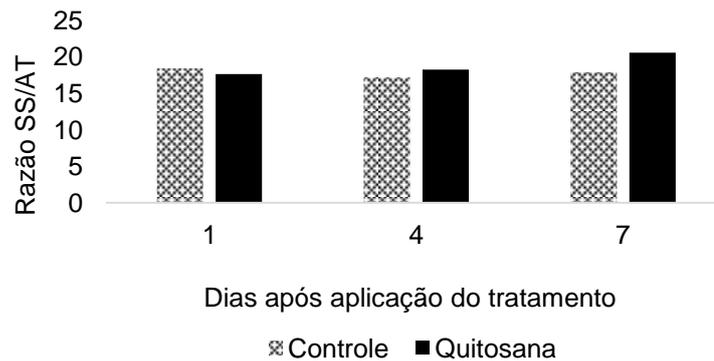


Figura 12. *Ratio* de goiaba 'Cortibel', mensuradas com 1, 4 e 7 dias após a aplicação de cobertura à base de quitosana. Não foi verificada diferença entre as médias segundo teste Tukey $p \leq 0,05$.

5.4. Respiração em mitocôndrias isoladas

Em todas as extrações mitocondriais consideradas no presente trabalho foi observada integridade das organelas superior a 75%. O controle respiratório esteve sempre entre 1,9 e 2,1, valores pouco abaixo do desejável (2,5), provavelmente esta redução se deu em função da participação da AOX no processo (Jacoby et al., 2015).

A aplicação do filme de quitosana nos frutos influenciou na respiração total em mitocôndrias isoladas (Figura 13). No primeiro dia após a aplicação do filme de quitosana, a taxa respiratória total foi de $53 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ enquanto a verificada para as mitocôndrias extraídas dos frutos que não foram revestidos com quitosana foi de $80 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Figura 13). A redução do oxigênio à água, como um dos últimos passos da respiração celular é frequentemente apontada como um ponto regulatório da respiração celular como um todo (Gnaiger et al., 1995).

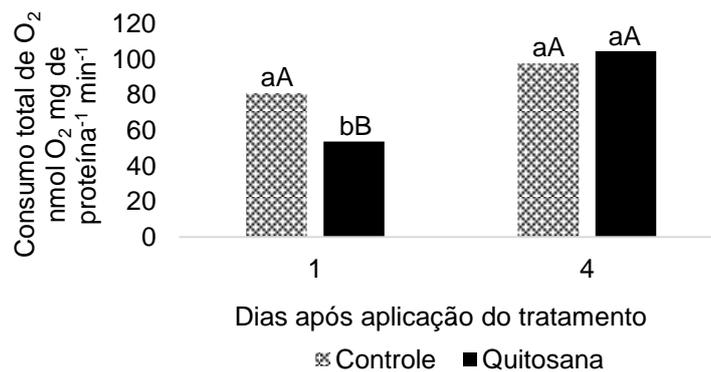


Figura 13: Taxa respiratória total em mitocôndrias isoladas dos frutos de goiaba ‘Cortibel’, mensuradas com 1 e 4 dias após a aplicação de cobertura à base de quitosana. Letras minúsculas representam a comparação entre frutos controle e tratado (DMS 22,92), enquanto as letras maiúsculas representam a comparação entre os diferentes tempos de avaliação para cada tratamento (DMS 22,92). Barras seguidas de letras iguais não diferem entre si segundo teste Tukey $p \leq 0,05$.

A aplicação do filme de quitosana sobre o fruto cria uma microatmosfera entre a casca do fruto e o filme onde pode haver uma redução na tensão de oxigênio (Rubilara et al., 2013). Assim sendo, poderia, nos frutos revestidos com o filme de quitosana ter ocorrido a regulação da taxa respiratória total pela menor disponibilidade de O₂, o que resultaria neste decréscimo de cerca de 34% na taxa respiratória total nas mitocôndrias isoladas. Zabalza et al. (2009) em um trabalho realizado com raízes de ervilhas concluíram que em condições de hipóxia o consumo de oxigênio é regulado como uma resposta adaptativa evitando assim a anoxia.

A menor taxa respiratória total em mitocôndrias isoladas no primeiro dia de avaliação segue a mesma tendência observada quando foi avaliado a respiração no fruto intacto revestido com filme de quitosana (Figura 1). Porém, no 4º dia de avaliação o efeito da aplicação do filme verificado na respiração do fruto intacto não foi observado na respiração em mitocôndrias isoladas.

O efeito da aplicação do filme de quitosana sobre a respiração total nas mitocôndrias isoladas não foi mais verificado na avaliação feita no 4º dia após a aplicação do filme, quando a taxa respiratória desses frutos foi semelhante àquela dos frutos não cobertos com o filme (Figura 13).

Os resultados da participação da via COX (Figura 14) se assemelham muito ao padrão observado para a respiração total (Figura 13), mostram a proximidade desta via com a respiração total das mitocôndrias isoladas. Semelhante ao observado com a respiração total, a aplicação do filme de

quitosana reduziu a atividade da via COX apenas no 1º dia após a aplicação do filme, diferindo ($p \leq 0,05$) do observado para os frutos controle (Figura 14).

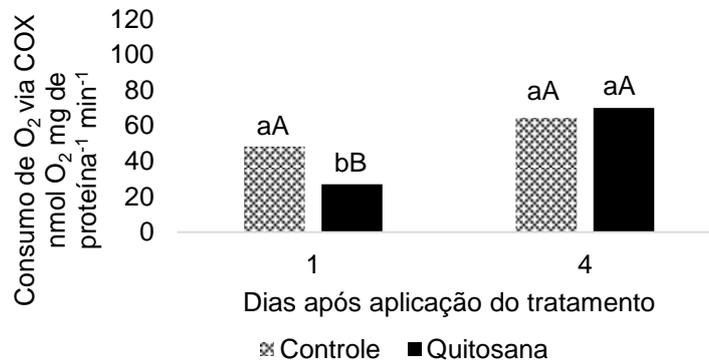


Figura 14. Atividade respiratória da via citocromo C oxidase em mitocôndrias isoladas dos frutos de goiaba 'Cortibel', mensuradas com 1 e 4 dias após a aplicação de cobertura à base de quitosana. Letras minúsculas representam a comparação entre frutos controle e tratado (DMS 9,3), enquanto as letras maiúsculas representam a comparação entre os diferentes tempos de avaliação para cada tratamento (DMS 21,7). Barras seguidas de letras iguais não diferem entre si segundo teste Tukey $p \leq 0,05$.

A participação da via AOX na respiração total nas mitocôndrias isoladas foi verificada tanto nos frutos cobertos com filme de quitosana, quanto nos frutos controle (Figura 15). O consumo de oxigênio pela AOX apesar de contribuir em todos os casos com a respiração total, não foi influenciada pela aplicação do filme de quitosana, nem se alterou entre as duas avaliações feitas durante o período estudado.

Tendo em vista que a afinidade da AOX pelo O₂ é menor que a da COX (Millar et al. 1993), seria esperado que esta via fosse mais afetada pela redução da disponibilidade de O₂, como verificado por Gupta et al. (2009). A explicação para esse resultado poderia ser a maior expressão da AOX em função da hipóxia como relatado por Gupta et al. (2012). Outra hipótese, também viável, para essa resposta observada para a AOX é que possivelmente a redução na tensão de O₂ provocada pela aplicação do filme de quitosana não tenha alterado a concentração de O₂ interna no tecido a ponto de influenciar na atividade da AOX. Sabe-se que as duas oxidases terminais da CTEM são influenciadas pela concentração de O₂. De acordo com Zabalza et al. (2009), tanto a COX quanto a AOX apresentam uma diminuição no consumo de oxigênio em baixa tensão de oxigênio.

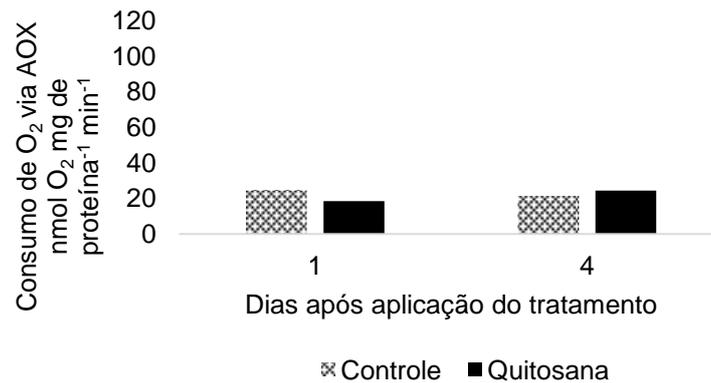


Figura 15. Atividade respiratória da via oxidase alternativa em mitocôndrias isoladas dos frutos de goiaba 'Cortibel', mensuradas com 1 e 4 dias após a aplicação de cobertura à base de quitosana. Não foi verificada diferença entre as médias segundo teste Tukey $p \leq 0,05$.

Houve ainda um consumo de oxigênio que não pode ser considerado nem pela COX, nem pela AOX, pois foi resistente aos inibidores de ambas as oxidases. Este consumo residual de oxigênio foi similar tanto em frutos cobertos com quitosana, como nos frutos controle, independentemente do tempo de avaliação e atingiu no máximo a taxa de $11 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Figura 16).

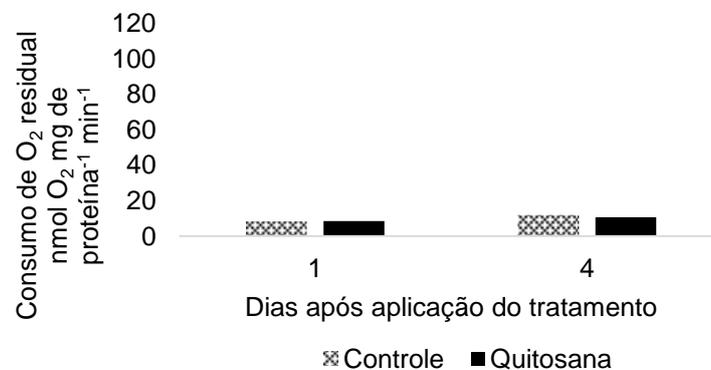


Figura 16. Atividade respiratória residual em mitocôndrias isoladas dos frutos de goiaba 'Cortibel', mensuradas com 1 e 4 dias após a aplicação de cobertura à base de quitosana. Não foi verificada diferença entre as médias segundo teste Tukey $p \leq 0,05$.

A atividade das oxidases terminais mostra uma tendência de aumento na participação da COX e redução na participação da AOX entre os dois dias de avaliação (Tabela 1). No entanto, considerando a dispersão dos dados, verificado pelo erro padrão, não se pode afirmar que existe diferença ($p \leq 0,05$) entre estes valores.

Tabela 1. Valores percentuais da participação das vias COX e AOX, bem como respiração residual de mitocôndrias isoladas dos frutos de goiaba ‘Cortibel’, seguido do erro-padrão, mensuradas com 1 e 4 dias após a aplicação de cobertura à base de quitosana.

	1 DAT			4 DAT		
	%COX	%AOX	%RES	%COX	%AOX	%RES
CONTROLE	58,5 ± 4,1	30,4 ± 4,1	11,1 ± 2,7	64,7 ± 3,4	22,8 ± 3,7	12,5 ± 2,3
QUITOSANA	52,8 ± 7,9	31,5 ± 9,2	15,7 ± 3,9	68,0 ± 6,2	21,8 ± 4,7	10,2 ± 3,3

Em mitocôndrias isoladas de maçã, Duque e Arrabaça (1999) também verificaram maior participação da COX quando comparada à AOX durante todo o período avaliado. No entanto, estes autores relatam um aumento súbito na atividade da AOX que segundo eles, pode ter sido o que desencadeou o surto respiratório nos frutos. No presente trabalho não foi verificada diferença entre a participação da AOX nos diferentes estádios avaliados, corroborando Santana (2015), tanto para a variedade ‘Cortibel’ quanto para goiabas da variedade ‘Paluma’.

O consumo residual de oxigênio, que persistiu mesmo após a inibição das duas vias de redução de oxigênio, representou entre 10 e 15% da taxa respiratória total. Apesar de serem valores relativamente altos, são aceitáveis, pois quando se compara este consumo com a taxa respiratória na presença de ADP ele representa cerca de 5%, valor considerado normal (Jacoby et al., 2015).

5.5. Espécies reativas de oxigênio e enzimas antioxidantes

A produção de ERO, de modo geral, foi menor nos frutos avaliados no 4º dia em comparação às demais avaliações (Figura 17). É sabido que a mitocôndria é o principal sítio de produção de ERO em frutos e que sua produção é diretamente proporcional à taxa respiratória destas mitocôndrias (Mailloux e Harper, 2011). Porém, aqui os resultados mostram que a aplicação do filme de quitosana nos frutos influenciou na produção de ERO (Figura 17). No 7º dia após a aplicação do tratamento, observa-se uma redução ($p \leq 0,05$) drástica na produção de ERO nos frutos cobertos com a quitosana (Figura 17), ainda que a atividade respiratória verificada a partir da emissão de CO₂ por goiabas em igual período tenha sido maior (Figura 13).

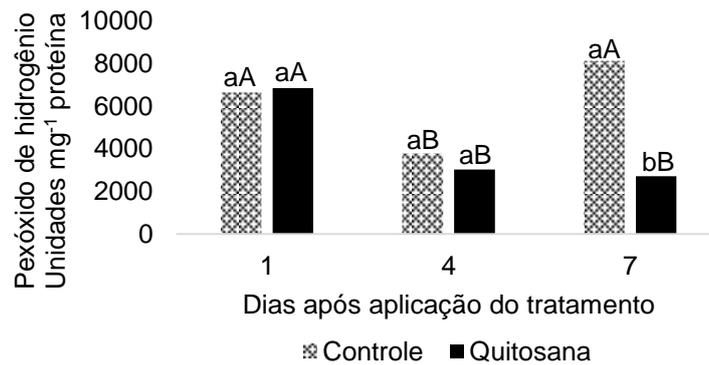


Figura 17. Produção de espécies reativas de oxigênio mensurada no extrato proteico extraído de frutos de goiaba 'Cortibel' mensurada com 1, 4 e 7 dias após a aplicação de cobertura à base de quitosana. Letras minúsculas representam a comparação entre frutos controle e tratado (DMS 1324), enquanto as letras maiúsculas representam a comparação entre os diferentes tempos de avaliação para cada tratamento (DMS 1781). Barras seguidas de letras iguais não diferem entre si segundo teste Tukey $p \leq 0,05$.

A menor produção de ERO verificada nos frutos no 4^o dia de armazenamento poderia ser explicada ainda pela maior atividade de enzimas como a SOD e POD representadas nas Figuras 18 e 19, respectivamente, além de outras enzimas não mensuradas e do sistema antioxidante não enzimático (Massolo et al., 2011).

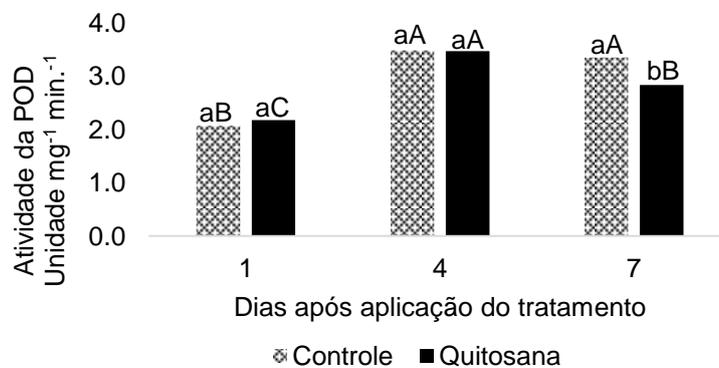


Figura 18. Atividade pirogallol peroxidase mensurada no extrato proteico extraído de frutos de goiaba 'Cortibel' mensurada com 1, 4 e 7 dias após a aplicação de cobertura à base de quitosana. Letras minúsculas representam a comparação entre frutos controle e tratado (DMS 0,46), enquanto as letras maiúsculas representam a comparação entre os diferentes tempos de avaliação para cada tratamento (DMS 0,55). Barras seguidas de letras iguais não diferem entre si segundo teste Tukey $p \leq 0,05$.

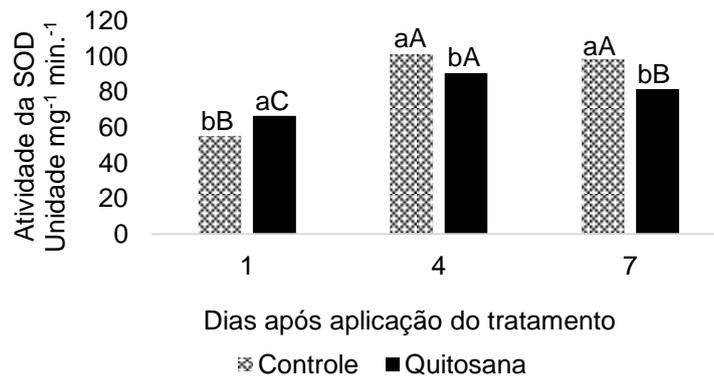


Figura 19. Atividade superóxido dismutase mensurada no extrato proteico extraído de frutos de goiaba 'Cortibel' mensurada com 1, 4 e 7 dias após a aplicação de cobertura à base de quitosana. Letras minúsculas representam a comparação entre frutos controle e tratado (DMS 6,27), enquanto as letras maiúsculas representam a comparação entre os diferentes tempos de avaliação para cada tratamento (DMS 7,53). Barras seguidas de letras iguais não diferem entre si segundo teste Tukey $p \leq 0,05$.

O desbalanço entre a produção e o combate às ERO é um fator que contribui fortemente para a senescência dos frutos (Tian et al., 2013). Aqui foi verificado que o acúmulo de ERO foi cerca de três vezes menor nos frutos cobertos com quitosana em relação aos frutos controle no 7º de armazenamento, indicando que os frutos revestidos com a quitosana potencialmente demorariam mais tempo para perderem a qualidade em função da senescência (Figura 17).

Considerável redução na produção de ERO em pêssegos foi relatada por Juan et al. (2011) quando mantiveram os frutos armazenados à 5 °C e verificaram que os frutos apresentaram menor taxa respiratória e menor conteúdo de malondialdeído, que é reflexo de uma menor peroxidação lipídica. Tais fatores fizeram com que estes frutos mantivessem as características de frutos verdes por muito mais tempo.

Menor acúmulo de ERO foi também observado tanto em maçãs armazenadas sob baixa tensão de oxigênio, quanto em maçãs tratadas com 1-MCP (Sabban-Almin et al., 2011). Isto indica que a disponibilidade de oxigênio e a ação do etileno influenciam no acúmulo de ERO e por consequência todos os processos relacionados com a senescência.

A atividade da pirogalol peroxidase aumentou entre o 1º e 4º dia de avaliação, tanto nos frutos revestidos com o filme de quitosana, quanto no controle. Neste mesmo período de avaliação também foi verificado aumento na liberação de etileno em frutos revestidos ou não com o filme de quitosana,

evidenciando que o etileno possa estar direta ou indiretamente influenciando na atividade da pirogalol peroxidase (Figura 18). Esta influência foi também observada por Massolo et al. (2011) que ao tratarem berinjelas com 1-MCP verificaram uma redução na atividade desta enzima.

No 7^o dia de avaliação a atividade da POD nos frutos tratados diminuiu, enquanto a do grupo controle se manteve alta, fazendo com que nesta avaliação houvesse diferença na atividade da enzima entre frutos revestidos ou não com filme de quitosana. Como nesta avaliação os níveis de ERO eram muito maiores nos frutos não revestidos com quitosana, a maior atividade da POD neste grupo provavelmente era uma resposta adaptativa que possibilita diminuir os danos oxidativos nos tecidos do fruto.

A atividade da SOD foi variável durante o tempo de avaliação dos frutos controle e nos revestidos com o filme de quitosana, em ambos houve aumento da atividade quando se compara a avaliação realizada no primeiro e quarto dia após o tratamento. A partir deste ponto a atividade se manteve alta nos frutos do grupo controle e decresceu nos frutos tratados (Figura 19). A exemplo do ocorrido com a POD, esta pode ser uma resposta adaptativa aos níveis de ERO.

A exposição a baixa tensão de oxigênio foi responsável pelo aumento da expressão de vários genes codificadores de enzimas antioxidantes em raiz de *Arabidopsis* (Klok et al., 2002). Portanto, mesmo a atividade destas enzimas tendo sido menor em frutos revestidos com filme de quitosana, não se pode descartar a possibilidade de a quantidade destas enzimas ser maior nestes frutos, o que explicaria o maior acúmulo de ERO nos frutos onde não foi aplicado o revestimento de quitosana.

6. CONCLUSÕES

A respiração e a emissão de etileno no fruto intacto foram as variáveis mais influenciadas pelo uso do revestimento de quitosana, sendo ambas reduzidas pelo uso de quitosana.

A mudança de coloração dos frutos revestidos com o filme de quitosana foi mais lenta como demonstrado pelo ângulo de cor *hue*, apesar de a luminosidade e o croma não terem sido afetados.

Os teores de ácido ascórbico e acidez titulável foram menores nos frutos revestidos com o filme de quitosana no quarto dia de avaliação, se igualando posteriormente aos frutos não revestidos com a quitosana.

A respiração em mitocôndrias isoladas de frutos revestidos com o filme de quitosana foi reduzida apenas no primeiro dia de avaliação.

A produção de espécies reativas de oxigênio foi mínima na avaliação feita no sétimo dia após a aplicação do filme de quitosana, mesmo que estes frutos tenham apresentado menor atividade das enzimas SOD e POD, em comparação aos frutos que não receberam a cobertura com quitosana.

De modo geral pode-se concluir que o revestimento a base de quitosana na concentração de 1,5% causou atraso na maturação dos frutos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABF (2017) Anuário Brasileiro da Fruticultura. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 88p.
- Abreu, J. R., Santos, C. D., Abreu, C. M. P., Pinheiro, A. C. M., Corrêa, A. D. (2012a) Ripening pattern of guava cv. Pedro Sato. *Food Science and Technology*, 32:344-350.
- Abreu, J. R., Santos, C. D., Abreu, C. M. P. D., Corrêa, A. D., Lima, L. C. O. (2012b) Sugar fractionation and pectin content during the ripening of guava cv. Pedro Sato. *Food Science and Technology*, 32:156-162.
- Ali, A., Muhammad, M. T. M., Sijam, K., Siddiqui, Y. (2010) Potential of chitosan coating in delaying the postharvest anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) of Eksotika II papaya. *International Journal of Food Science and Technology*, 45:2134–2140.
- Ali, A., Muhammad, M. T. M., Sijam, K., Siddiqui, Y. (2011) Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. *Food Chemistry*, 124: 620-626.
- Alves, G. V. L., dos Santos, W. C., Waldman, W. R., Oliveira, J. G., Vargas, H., da Silva, M. G. (2010) A photoacoustic technique applied to detection of ethylene emissions in edible coated passion fruit. *Journal of Physics: Conference Series*, 214:12-20.
- Aquino, A.B., Blank A.F., Santana, L.C.L.A. (2015) Impact of edible chitosan cassava starch coatings enriched with *Lippia gracilis*–Schauer genotype mixtures on the shelf life of guavas (*Psidium guajava* L.) during storage at

room temperature. *Food Chemistry*, 171:108-116.

- Araújo, J. L. P., Correia, R. C. (2010) Análise da composição dos custos de produção e da rentabilidade do sistema típico de produção da goiaba explorada na região do Submédio São Francisco. *Anais do Congresso Brasileiro de Fruticultura*.
- Arnon, H., Zaitsev, Y., Porat, R., Poverenov, E. (2014) Effects of carboxymethyl cellulose and chitosan bilayer edible coating on postharvest quality of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 87:21-26.
- Asif, M. H., Pathak, N., Solomos, T., Trivedi, P. K. (2009) Effect of low oxygen, temperature and 1-methylcyclopropene on the expression of genes regulating ethylene biosynthesis and perception during ripening in apple. *South African Journal of Botany*, 75:137-144.
- Association of Official Agricultural Chemists - A.O.A.C. (1975) Official Methods of Analyses of the Association of Official Analytical Chemistry. 12 ed. Washington, 1094p.
- Azzolini, M., Jacomino, A. P., Bron, I. U. (2004) Índices para avaliar qualidade pós-colheita de goiabas em diferentes estádios de maturação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39:139-145.
- Azzolini, M., Jacomino, A. P., Bron, I. U., Kluge, R. A., Schiavinato, M. A. (2005) Ripening of " Pedro Sato" guava: study on its climacteric or non-climacteric nature. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17: 299-306.
- Bailey-Serres, J., Fukao, T., Gibbs, D. J., Holdsworth, M. J., Lee, S. C., Licausi, F., Van Dongen, J. T. (2012) Making sense of low oxygen sensing. *Trends in plant science*, 17:129-138.
- Bapat, V. A., Trivedi, P. K., Ghosh, A., Sane, V. A., Ganapathi, T. R., Nath, P. (2010) Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnology Advances*, 28: 94-107.
- Bassetto, E., Jacomino, A. P., Pinheiro, A. L., Kluge, R. A. (2005) Delay of ripening of 'Pedro Sato' guava with 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biology and Technology*, 35:303-308.
- Bashir, H. A., Abu-Goukh, A. B. A. (2003) Compositional changes during guava fruit ripening. *Food Chemistry*, 80:557-563.
- Bouzayen, M., Latché, A., Nath, P., Pech, J. (2010) Mechanism of Fruit Ripening - Chapter 16. In: *Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives* vol. 1.
- Bonghi, C., Ramina, A., Ruperti, B., Vidrih, R., Tonutti, P. (1999). Peach fruit ripening and quality in relation to picking time, and hypoxic and high CO₂ short-term postharvest treatments. *Postharvest Biology and*

Technology, 16:213-222.

- Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15:237-248.
- Breda, C. A., Morgado, D. L., Assis, O. B. G., Duarte, M. C. T. (2017) Effect of chitosan coating enriched with pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) peel extract on quality and safety of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 13268:1-8.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R.L. (eds.) (2002) *Biochemistry Molecular Biology of Plants* 1 ed. 1367p.
- Burdon, J., Dori, S., Marinansky, R., Pesis, E. (1996) Acetaldehyde inhibition of ethylene biosynthesis in mango fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 8:153-161.
- Calegario, F.F., Cosso, R.G., Fagian, M.M., Almeida, F.V., Jardim, W.F., Jezek, P., Arruda, P., Vercesi, A.E. (2003) Stimulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35:211–220.
- Carvalho, C. P., Villaño, D., Moreno, D. A., Serrano, M., Valero, D. (2015) Alginate Edible Coating and Cold Storage for Improving the Physicochemical Quality of Cape Gooseberry (*Physalis Peruviana* L.). *Journal of Food Science and Nutrition*, 1:102-112
- Centeno, D. C., Osorio, S., Nunes-Nesi, A., Bertolo, A. L., Carneiro, R. T., Araújo, W. L., Fernie, A. R. (2011) Malate plays a crucial role in starch metabolism, ripening, and soluble solid content of tomato fruit and affects postharvest softening. *The Plant Cell Online*, 23:162-184.
- Cerqueira, T. S., Jacomino, A. P., Sasaki, F. F., Amorim, L. (2009) Ripening control of 'Kumagai' guavas submitted to 1-methylcyclopropene. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31:687-692.
- Cerqueira, F. O. D. S., Resende, E. D. D., Martins, D. R., Santos, J. L. V. D., Cenci, S. A. (2011) Quality of yellow passion fruit stored under refrigeration and controlled atmosphere. *Food Science and Technology*, 31: 534-540.
- Chang, P. T. (2016) Influence of Prohexadione-Calcium on the Growth and Quality of Summer 'Jen-Ju Bar' Guava Fruit. *Journal of plant growth regulation*, 35:980-986.
- Coll, N. S., Epple, P., Dangl, J. L. (2011) Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differentiation*, 18:1247-1256.

- Conde, C., Delrot, S. Gerós, H. (2008) Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal of plant physiology*, 165:1545-1562.
- Considine, M. J., Daley, D. O., Whelan, J. (2001) The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango. *Plant Physiology*, 126:1619-1629.
- Cunha Junior, L. C., Jacomino, A. P., Ogassavara, F. O., Trevisan, M. J., Parisi, M. (2012) Armazenamento refrigerado de morango submetido a altas concentrações de CO₂. *Horticultura Brasileira*, 30:688-694.
- De Aquino, A. B., Blank, A. F., de Aquino Santana, L. C. L. (2015) Impact of edible chitosan–cassava starch coatings enriched with *Lippia gracilis* Schauer genotype mixtures on the shelf life of guavas (*Psidium guajava* L.) during storage at room temperature. *Food chemistry*, 171:108-116.
- De Wild, H. P., Balk, P. A., Fernandes, E. C., Peppelenbos, H. W. (2005) The action site of carbon dioxide in relation to inhibition of ethylene production in tomato fruit. *Postharvest biology and technology*, 36:273-280.
- Di Matteo, A., Sacco, A., Anacleria, M., Pezzotti, M., Delledonne, M., Ferrarini, A., Frusciante, L., Barone, A. (2010) The ascorbic acid content of tomato fruits is associated with the expression of genes involved in pectin degradation. *Plant Biology*, 10:163-173.
- Díaz-Mula, H. M., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Serrano, M., Valero, D. (2011). Modified atmosphere packaging of yellow and purple plum cultivars. 1. Effect on organoleptic quality. *Postharvest Biology and Technology*, 61:103-109.
- Duque, P., Arrabaca, J. D. (1999) Respiratory metabolism during cold storage of apple fruit. II. Alternative oxidase is induced at the climacteric. *Physiologia Plantarum*, 107:24-31.
- Freitas, B. S. M., Plácido, G.R., Cagnin, C., Caliani, M., Silva, R. M., Silva, C. L. C., Cavalcante, M. D., Souza, J. L. F., Célia, J. A., Oliveira, K. B. (2015) Evaluation of the postharvest quality of Cagaita fruits (*Eugenia dysenterica* DC.) coated with chitosan and associated with refrigeration. *African Journal of Biotechnology*. 14:2035-2046.
- Fontes, R. V., Santos, M. P., Falqueto, A. R., Silva, D. M. (2008) Atividade da pectinametilesterase e sua relação com a perda de firmeza da polpa de mamão cv. Sunrise Solo e Tainung. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30: 54-58.
- Foyer, C. H., Noctor, G. (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology*, 155(1), 2-18.

- Fugate, K. K., Suttle, J. C., Campbell, L. G. (2010) Ethylene production and ethylene effects on respiration rate of postharvest sugarbeet roots. *Postharvest biology and technology*, 56:71-76.
- Gady, A. L., Vriezen, W. H., Van de Wal, M. H., Huang, P., Bovy, A. G., Visser, R. G., Bachem, C. W. (2012) Induced point mutations in the phytoene synthase 1 gene cause differences in carotenoid content during tomato fruit ripening. *Molecular Breeding*, 29:801-812.
- Gallie, D. R. (2013) L-Ascorbic Acid: A Multifunctional Molecule Supporting Plant Growth and Development. *Scientia*, 2013:1-24.
- Giannopolitis, C. N., & Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology*, 59:309-314.
- Gilbert, H. J. (2010) The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction. *Plant physiology*, 153:444-455.
- Gill, S. S., Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48:909-930.
- Gnaiger, E., Steinlechner-Maran, R., Méndez, G., Eberl, T., Margreiter, R. (1995). Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 27:583–596.
- Gomez, M. L. P. A., Lajolo, F. M. (2008). Ascorbic acid metabolism in fruits: activity of enzymes involved in synthesis and degradation during ripening in mango and guava. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88:756–762.
- Gonçalves, C. X., Tiecher, A., Chaves, F. C., Nora, L., Zhengguo, L., Latché, A., Rombaldi, C. V. (2013) Putative role of cytokinin in differential ethylene response of two lines of antisense ACC oxidase cantaloupe melons. *Postharvest Biology and Technology*, 86:511-519.
- Gonzaga Neto, L., Soares, J. M. (1994) *Goiaba para exportação: Aspectos técnicos da produção*. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Desenvolvimento Rural. Programa de Apoio à Produção e Exportação de Frutas, Hortaliças, Flores e Plantas Ornamentais. 49 p.
- Goulao, L. F., Oliveira, C. M. (2008) Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science Technology*, 19:4-25.
- Goutam, M., Dhaliwal, H. S., Mahajan, B. V. C. (2010) Effect of pre-harvest calcium sprays on post-harvest life of winter guava (*Psidium guajava* L.). *Journal of Food Science and Technology*, 47:501-506.
- Gull, J., Sultana, B., Anwar, F., Naseer, R., Ashraf, M., Ashrafuzzaman, M. (2012).

- Variation in antioxidant attributes at three ripening stages of guava (*Psidium guajava* L.) fruit from different geographical regions of Pakistan. *Molecules*, 17:3165-3180.
- Gupta, K. J., Zabalza, A., Van Dongen, J. T. (2009) Regulation of respiration when the oxygen availability changes. *Physiologia plantarum*, 137:383-391.
- Gupta, K. J., Igamberdiev, A. U., Mur, L. A. (2012) NO and ROS homeostasis in mitochondria: a central role for alternative oxidase. *New Phytologist*, 195:1-3.
- Gvozdenović, J., Lazić, V. (2010) The influence of the packaging materials on the stability of the modified atmosphere. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 14:98-101.
- Han, C., Zuo, J., Wang, Q., Xu, L., Zhai, B., Wang, Z., Gao, L. (2014) Effects of chitosan coating on postharvest quality and shelf life of sponge gourd (*Luffa cylindrica*) during storage. *Scientia Horticulturae*, 166:1-8.
- Hayama, H., Shimada, T., Fujii, H., Ito, A., Kashimura, Y. (2006) Ethylene-regulation of fruit softening and softening-related genes in peach. *Journal of Experimental Botany*, 57:4071-4077.
- Hojo, E. T. D., Durigan, J. F., Hojo, R. H. (2011) Uso de embalagens plásticas e cobertura de quitosana na conservação pós-colheita de lichias. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33:377-383.
- Hong, K., Xie, J., Zhang, L., Sun, D., Gong, D. (2012) Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of guava (*Psidium guajava* L.) fruit during cold storage. *Scientia Horticulturae*, 144:172-178.
- IBGE (2016) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Produção agrícola municipal: culturas temporárias e permanentes*, 59p.
- Imahori, Y., Yamamoto, K., Tanaka, H., Bai, J. (2013) Residual effects of low oxygen storage of mature green fruit on ripening processes and ester biosynthesis during ripening in bananas. *Postharvest Biology and Technology*, 77:19-27.
- Iriti, M., Picchi, V., Rossoni M., Gomarasca, S., Ludwig, N., Gargano, M., Faoro, F. (2009) Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. *Environmental and Experimental Botany* 66:493-500.
- Jacoby, R. P., Millar, A. H., Taylor, N. L. (2015) Assessment of respiration in isolated plant mitochondria using Clark-type electrodes. *Plant mitochondria: methods and protocols*, 1308:165-185.
- Jain, N., Dhawan, K., Malhotra, S. P., Siddiqui, S., Singh, R. (2001) Compositional and enzymatic changes in guava (*Psidium guajava* L.) fruits during ripening. *Acta Physiologiae Plantarum*, 23:357-362.

- Jha, S. N., Jaiswal, P., Narsaiah, K., Singh, A. K., Kaur, P. P., Sharma, R., Bhardwaj, R. (2013) Prediction of sensory profile of mango using textural attributes during ripening. *Food and Bioprocess Technology*, 6:734-745.
- Jongsri, P., Wangsomboondee, T., Rojsitthisak, P., Seraypheap, K. (2016). Effect of molecular weights of chitosan coating on postharvest quality and physicochemical characteristics of mango fruit. *LWT-Food Science and Technology*, 73:28-36.
- Juan, K. A. N., Wang, H. M., Jin, C. H. (2011). Changes of reactive oxygen species and related enzymes in mitochondrial respiration during storage of harvested peach fruits. *Agricultural sciences in China*, 10:149-158.
- Kadenbach, B, Ramzan, R, Wen, L, Vogt, S. (2010) New extension of the Mitchell Theory for oxidative phosphorylation in mitochondria of living organisms. *Biochimica et Biophysica Acta* 1800:205–212
- Kan, J., Wang, H. M., Jin, C. H. (2011) Changes of reactive oxygen species and related enzymes in mitochondrial respiration during storage of harvested peach fruits. *Agricultural Sciences in China*, 10:149-158.
- Kean, T., Thanou, M. (2010) Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62:3-11.
- Kays, S. J. (1991) Postharvest Physiology of Perishable Plant Products. Springer, 532 p.
- Khanbarad, S. C., Thorat, I. D., Mohapatra, D., Sutar, R. F., Joshi, D. C. (2012) Effect of temperature and period of storage on physical, biochemical and textural properties of banana during ripening. *Journal of Dairying Foods Home Sciences*, 31:212-215.
- Klee, H. J., Giovannoni, J. J. (2011) Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annual review of genetics*, 45:41-59.
- Klok, E. J., Wilson, I. W., Wilson, D., Chapman, S. C., Ewing, R. M., Somerville, S. C., Dennis, E. S. (2002). Expression profile analysis of the low-oxygen response in Arabidopsis root cultures. *The Plant Cell*, 14:2481-2494.
- Kumar, S., Yadav, P., Jain, V., Malhotra, S. P. (2011) Evaluation of oxidative stress and antioxidative system in ber (*Ziziphus mauritiana* L.) fruits during storage. *Journal of Food Biochemistry*, 35:1434-1442.
- Kurek, M., Guinault, A., Voilley, A., Galić, K., Debeaufort, F. (2014) Effect of relative humidity on carvacrol release and permeation properties of chitosan based films and coatings. *Food Chemistry*, 144:9-17.
- Lee, S., Choi, H. K., Cho, S. K., Kim, Y. S. (2010) Metabolic analysis of guava (*Psidium guajava* L.) fruits at different ripening stages using different data-

- processing approaches. *Journal of Chromatography B*, 878:2983-2988.
- Liang, Z., Sang, M., Fan, P., Wu, B., Wang, L., Duan, W., Li, S. (2011) Changes of polyphenols, sugars, and organic acid in 5 *Vitis* genotypes during berry ripening. *Journal of food science*, 76:1231-1238.
- Limchoowong, N., Sricharoen, P., Techawongstien, S., Chanthai, S. (2016). An iodine supplementation of tomato fruits coated with an edible film of the iodide-doped chitosan. *Food Chemistry*, 200:223-229.
- Lin, Z., Zhong, S., Grierson, D. (2009) Recent advances in ethylene research. *Journal of Experimental Botany*, 60:3311-3336.
- Liu, T. C., Liu, Y. C., Chen, K. E., Chao, C. W., Wu, C. T. (2012) The nonclimacteric guava cultivar 'Jen-Ju Bar' is defective in System 2 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase activity. *Postharvest Biology and Technology*, 67:10-18.
- Liu M., Pirrello, J., Chervin, C., Roustan, J. P., Bouzayen, M. (2015) Ethylene control of fruit ripening: revisiting the complex network of transcriptional regulation. *Plant Physiology*, 169: 2380-2390.
- Lurie, S., Tonutti, P., (2014). Heat and hypoxia stress and their effect on stored fruits. *Steward Postharvest Review*, 2014:3- 9.
- Mahajan, B. V. C., Sharma, S. R., Dhall, R. K. (2009) Optimization of storage temperature for maintaining quality of guava. *Journal of Food Science and Technology* 46:604-605.
- Mailloux, R. J., Harper, M. E. (2011) Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radical Biology and Medicine*, 51:1106-1115.
- Mariano, f. A. D. C., Boliani, a. C., Corrêa, I. D. S., Moreira, e. R. (2011) Vida-de-prateleira de goiabas, cv. sassaoka, minimamente processadas e armazenadas em diferentes embalagens. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33:384-391.
- Marino, D., Dunand, C., Puppo, A., Pauly, N. (2012) A burst of plant NADPH oxidases. *Trends in plant science*, 17:9-15.
- Massolo, J. F., Concellón, A., Chaves, A. R., Vicente, A. R. (2011). 1-Methylcyclopropene (1-MCP) delays senescence, maintains quality and reduces browning of non-climacteric eggplant (*Solanum melongena* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 59:10-15.
- Mathooko, F. M., Tsunashima, Y., Owino, W. Z., Kubo, Y., Inaba, A. (2001) Regulation of genes encoding ethylene biosynthetic enzymes in peach (*Prunus persica* L.) fruit by carbon dioxide and 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biology and Technology*, 21:265-281.

- McGuire, R. G. (1992) Reporting of objective color measurements .*HortScience*, 27:1254-1255.
- Mellidou, I., Chagné, D., Laing, W. A., Keulemans, J., Davey, M. W. (2012) Allelic variation in paralogs of GDP-L-galactose phosphorylase is a major determinant of vitamin C concentrations in apple fruit. *Plant Physiology* 160:1613–1629
- Merchante, C., Alonso, J. M., Stepanova, A. N. (2013). Ethylene signaling: simple ligand, complex regulation. *Current opinion in plant biology*, 16:554-560.
- Millar, A. H., Wiskich, J. T., Whelan, J., & Day, D. A. (1993). Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS letters*, 329:259-262.
- Millar, A. H., Whelan, J., Soole, K. L., Day, D. A. (2011) Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. *Annual review of plant biology*, 62:79-104.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., Van Breusegem, F. (2011) ROS signaling: the new wave? *Trends in plant science*, 16:300-309.
- Mohamed-Nour, I. A., Ali Abu-Goukh, A. B. (2010) Effect of ethrel in aqueous solution and ethylene released from ethrel on guava fruit ripening. *Agriculture Biology Journal of North America*, 1:232-237.
- Morgado, C. M. A., Durigan, J. F., Lopes, V. G., Santos, L. O. (2010). Conservação pós-colheita de goiabas' Kumagai': efeito do estágio de maturação e da temperatura de armazenamento. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32:1001-1008.
- Nishiyama, K., Guis, M., Rose, J. K., Kubo, Y., Bennett, K. A., Wangjin, L., Bennett, A. B. (2007) Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melon. *Journal of Experimental Botany*, 58:1281-1290.
- Nunes-Nesi, A., Araújo, W. L., Obata, T., Fernie, A. R. (2013) Regulation of the mitochondrial tricarboxylic acid cycle. *Current opinion in plant biology*, 16:335-343.
- Oliveira, J. G., Morales, L. M. M., Silva, G. M. C., da Cruz Saraiva, K. D., Santana, D. B., dos Santos, C. P., Oliveira, M. G., Costa, J. H. (2017). Procedures of Mitochondria Purification and Gene Expression to Study Alternative Respiratory and Uncoupling Pathways in Fruits. *In. Plant Respiration and Internal Oxygen* Humana Press, 1670:143-165.
- Oliveira, M. G., Mazorra, L. M., Souza, A. F., Silva, G. M. C., Correa, S. F.,

- Santos, W. C., Oliveira, J. G. (2015) Involvement of AOX and UCP pathways in the post-harvest ripening of papaya fruits. *Journal of Plant Physiology*, 189:42-50.
- Palma-Guerrero, J., Larriba, E., Güerri-Agulló, B., Jansson, H. B., Salinas, J., Lopez-Llorca, L. V. (2010) Chitosan increases conidiation in fungal pathogens of invertebrates. *Applied microbiology and biotechnology*, 87: 2237-2245.
- Paul, V., Pandey, R., Srivastava, G. C. (2012) The fading distinctions between classical patterns of ripening in climacteric and non-climacteric fruit and the ubiquity of ethylene an overview. *Journal of food science and technology*, 49:1-21.
- Pech, J. C., Bouzayen, M., Latché, A. (2008) Climacteric fruit ripening: ethylene-dependent and independent regulation of ripening pathways in melon fruit. *Plant Science*, 175:114-120.
- Pereira, F. M., Carvalho, C. A., Nachtigal, J. C. (2003) Século XXI: nova cultivar de goiabeira de dupla finalidade. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25:498-500.
- Perotti, V. E., Moreno, A. S., Podestá, F. E. (2014). Physiological aspects of fruit ripening: The mitochondrial connection. *Mitochondrion*, 17:1-6.
- Pesis, E. (2005) The role of the anaerobic metabolites, acetaldehyde and ethanol, in fruit ripening, enhancement of fruit quality and fruit deterioration. *Postharvest Biology and Technology*, 37:1-19.
- Phebe, D., Ong, P. T. (2010). Extending 'Kampuchea' guava shelf-life at 27°C using 1-methylcyclopropene. *International Food Research Journal*, 17:63-69.
- Pinto, L., Martins, M. L. L., Resende, E., Thiébaud, J. T. L. (2011) Atividade da pectina metilesterase e da β -Galactosidase durante o amadurecimento do mamão cv. Golden. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33:713-722.
- Pinto, L. K. A., Martins, M. L. L., Resende, E. D., Thiébaud, J. T. L., Martins, M. A. (2013) Avaliação da atividade das enzimas pectinametilesterase e β -galactosidase em mamões cv. Golden armazenados sob diferentes concentrações de oxigênio. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35:15-22.
- Porat, R., Weiss, B., Zipori, I., Dag, A. (2009) Postharvest longevity and responsiveness of guava varieties with distinctive climacteric behaviors to 1-methylcyclopropene. *HortTechnology*, 19:580-585.
- Qiu, M., Jiang, H., Ren, G., Huang, J., Wang, X. (2013) Effect of chitosan coatings on postharvest green asparagus quality. *Carbohydrate polymers*, 92:2027-2032.

- Qin, G., Meng, X., Wang, Q., Tian, S. (2009) Oxidative damage of mitochondrial proteins contributes to fruit senescence: a redox proteomics analysis. *Journal of proteome research*, 8:2449-2462.
- Rahman, M. A., Mahmud, T. M. M., Rahman, R. A., Kadir, J., Begum, M. M. (2012) Potential co-application of *Burkholderia cepacia*, calcium and chitosan on enhancement of storage life and quality of papaya fruits. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 35:439-458.
- Ramzan, R., Staniek, K., Kadenbach, B., Vogt, S. (2010) Mitochondrial respiration and membrane potential are regulated by the allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797:1672-1680.
- Resende, E. C. O., Martins, P. F., Azevedo, R. A. D., Jacomino, A. P., Bron, I. U. (2012) Oxidative processes during 'Golden' papaya fruit ripening. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 24:85-94.
- Reuck, K., Sivakumar, D., & Korsten, L. (2009). Integrated application of 1-methylcyclopropene and modified atmosphere packaging to improve quality retention of litchi cultivars during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 52:71-77.
- Rinaudo, M. (2006) Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science*, 31:603-632.
- Risterucci, A. M., Duval, M. F., Rohde, W., Billotte, N. (2005) Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. *Molecular Ecology Notes*, 5:745-748.
- Rubilara, J. F., Cruzb, R. M. S., Silva, H. D., Vicente, A.A., Khmelinskii, I., Vieira, M. C. (2013). Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. *Journal of Food Engineering* 115:466–474
- Santana, D. B. (2015) *Respiração mitocondrial e mudanças físicas e químicas na pós-colheita de goiabas 'Paluma' e 'Cortibel'* Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 82p.
- Sabban-Amin, R., Feygenberg, O., Belausov, E., Pesis, E. (2011) Low oxygen and 1-MCP pretreatments delay superficial scald development by reducing reactive oxygen species (ROS) accumulation in stored 'Granny Smith' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 62:295-304.
- Sharma, A., Wali, V., Bakshi, P., Jasrotia, A. (2013) Effect Of Organic And Inorganic Fertilizers On Quality And Shelf Life Of Guava (*Psidium Guajava* L.) Cv. Sardar. *Journal of Life Sciences*, 8:1247-1250
- Siqueira A. M. A., Costa J.M.C., Afonso M.R.A., Clemente, E. Pigments of guava

- paluma cultivar stored under environmental conditions. *African Journal of Food Science*, 5:320-323.
- Silva, D. F. P., Salomão, L. C. C., Zambolim, L., Rocha, A. (2012) Use of biofilm in the postharvest conservation of 'Pedro Sato' guava. *Revista Ceres*, 59:305-312.
- Silva, W. B., Silva, G. M. C., Santana, D. B., Salvador, A. R., Medeiros, D. B., Belghith, I., Silva, N. M., Cordeiro, M. H. N., Misobutsi, G. P. (2018) Chitosan delays ripening and ROS production in guava (*Psidium guajava* L.) fruit. *Food Chemistry*, 242:232-238.
- Singh, S. P., Pal, R. K. (2008) Controlled atmosphere storage of guava (*Psidium guajava* L.) fruit. *Postharvest Biology and technology*, 47:296-306.
- Singh, S. P., Singh, Z., Swinny, E. E. (2012) Climacteric level during fruit ripening influences lipid peroxidation and enzymatic and non-enzymatic antioxidative systems in Japanese plums (*Prunus salicina* Lindell). *Postharvest Biology and Technology*, 65:22-32.
- Sinuco, D. C., Steinhaus, M., Schieberle, P., Osorio, C. (2010). Changes in odour-active compounds of two varieties of Colombian guava (*Psidium guajava* L.) during ripening. *European Food Research and Technology*, 230:859-864.
- Soares-Colletti, A. R.; Fischer, I. H.; Lourenço, S. A. (2014) Incidence of postharvest diseases on 'Kumagai' and 'Pedro Sato' guavas at wholesale markets in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 39:478-482.
- Souza, M. E., Leonel, S., Martins, R. L., dos Santos Segtowick, E. C. (2013) Caracterização Físico-Química e Avaliação Sensorial dos Frutos de Bananeira. *Nativa*, 1:13-17.
- Sweetlove, L. J., Taylor, N. L., & Leaver, C. J. (2007). Isolation of intact, functional mitochondria from the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Mitochondria*: 125-136.
- Teixeira, G. H., Durigan, J. F. (2010) Effect of controlled atmospheres with low oxygen levels on extended storage of guava fruit (*Psidium guajava* L.) 'Pedro Sato'. *HortScience*, 45:918-924.
- Teixeira, G. H., Júnior, L. C. C., Ferraudo, A. S., Durigan, J. F. (2016). Quality of guava (*Psidium guajava* L. cv. Pedro Sato) fruit stored in low-O₂ controlled atmospheres is negatively affected by increasing levels of CO₂. *Postharvest Biology and Technology*, 111:62-68.
- Tian, S., Qin, G., Li, B. (2013) Reactive oxygen species involved in regulating fruit senescence and fungal pathogenicity. *Plant molecular biology*, 82:593-602.

- Thommohaway, C., Kanlayanarat, S., Uthairatanakij, A., Jitareerat, P. (2007). Quality of fresh-cut guava (*Psidium guajava* L.) as affected by chitosan treatment. In *International Conference on Quality Management of Fresh Cut Produce* 746:449-454.
- Toro, G., Pinto, M. (2015). Plant respiration under low oxygen. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 75:57-70.
- Uzilday, B., Turkan, I., Sekmen, A. H., Ozgur, R., Karakaya, H. C. (2012) Comparison of ROS formation and antioxidant enzymes in *Cleome gynandra* (C₄) and *Cleome spinosa* (C₃) under drought stress .*Plant Science*,182:59-70.
- Valente, A., Albuquerque, T. G., Sanches-Silva, A. Costa, H. S. (2011) Ascorbic acid content in exotic fruits: A contribution to produce quality data for food composition databases, 44:2237-2242
- Van Dongen, J. T., Gupta, K. J., Ramírez-Aguilar, S. J., Araújo, W. L., Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R. (2011) Regulation of respiration in plants: a role for alternative metabolic pathways. *Journal of plant physiology*, 168:1434-1443.
- Vicente, A. R., Martínez, G. A., Chaves, A. R., Civello, P. M. (2006) Effect of heat treatment on strawberry fruit damage and oxidative metabolism during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 40:116-122.
- Wang, B., Wang, J., Feng, X., Lin, L., Zhao, Y., Jiang, W. (2009) Effects of 1-MCP and exogenous ethylene on fruit ripening and antioxidants in stored mango. *Plant growth regulation*, 57:185-192.
- Wilson, P. G., O'Brien, M. M., Gadek, P. A., Quinn, C. J. (2001) Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. *American Journal of Botany*, 88: 2013-2025.
- Xu, F., Yuan, S., Zhang, D. W., Lv, X., Lin, H. H. (2012) The role of alternative oxidase in tomato fruit ripening and its regulatory interaction with ethylene. *Journal of experimental botany*, 63:5705-5716.
- Yamauchi, T., Shimamura, S., Nakazono, M., Mochizuki, T. (2013) Aerenchyma formation in crop species: a review. *Field Crops Research*, 152:8-16.
- Yang, X.T., Song, J., Campbell-Palmer, L., Fillmore, S., Zhang, Z. (2013) Effect of ethylene and 1-MCP on expression of genes involved in ethylene biosynthesis and perception during ripening of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 78:55-66.
- Yao, B. N., Tano, K., Konan, H. K., Bédié, G. K., Oulé, M. K., Koffi-Nevry, R., Arul, J. (2012) The role of hydrolases in the loss of firmness and of the changes in sugar content during the post-harvest maturation of *Carica papaya* L. var solo 8. *Journal of Food Science and Technology*, 51:3309-3316.

- Yokotani, N., Nakano, R., Imanishi, S., Nagata, M., Inaba, A., Kubo, Y. (2009) Ripening-associated ethylene biosynthesis in tomato fruit is autocatalytically and developmentally regulated. *Journal of experimental botany*, 60:3433-3442.
- Zabalza, A., Van Dongen, J. T., Froehlich, A., Oliver, S. N., Faix, B., Gupta, K. J., Geigenberger, P. (2009) Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration. *Plant Physiology*, 149:1087-1098.
- Zhang, Z., Huber, D. J., Rao, J. (2010) Short-term hypoxic hypobarica transiently decreases internal ethylene levels and increases sensitivity of tomato fruit to subsequent 1-methylcyclopropene treatments. *Postharvest biology and technology*, 56:131-137.
- Zhang, Z., Huber, D. J., Rao, J. (2011) Ripening delay of mid-climacteric avocado fruit in response to elevated doses of 1-methylcyclopropene and hypoxia-mediated reduction in internal ethylene concentration. *Postharvest Biology and Technology*, 60:83-91.
- Zhang, Z., Huber, D. J., Rao, J. (2013) Antioxidant systems of ripening avocado (*Persea americana* Mill.) fruit following treatment at the preclimacteric stage with aqueous 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biology and Technology*, 76:58-64.
- Ziani, K., Oses, J., Coma, V., Maté, J. I. (2008) Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. *LWT-Food Science and Technology*, 41:2159-2165