

WILLIAN COSER

**ATMOSFERA CONTROLADA COM ÓXIDO NÍTRICO NO
ARMAZENAMENTO DE MAÇÃS 'BAIGENT'**

**LAGES
2022**

WILLIAN COSER

**ATMOSFERA CONTROLADA COM ÓXIDO NÍTRICO NO
ARMAZENAMENTO DE MAÇÃS 'BAIGENT'**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano André Steffens

**LAGES
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Coser, Willian

Atmosfera controlada com óxido nítrico no
armazenamento de maçãs 'Baigent' / Willian Coser. -- 2022.
55 p.

Orientador: Cristiano André Steffens

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages,
2022.

1. Brookfield®. 2. estresse oxidativo. 3. compostos
fenólicos. 4. atividade enzimática. I. Steffens, Cristiano André
. II. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de
Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Produção Vegetal. III. Título.

Willian Coser

**Atmosfera controlada com óxido nítrico no armazenamento de maçãs
'baigent'**

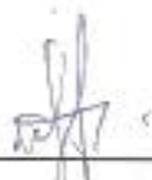
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal,
da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Banca examinadora

Orientador:  _____

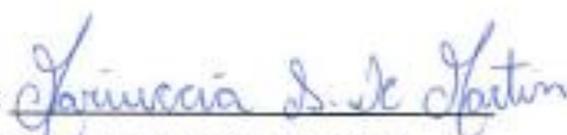
Professor Dr. Cristiano André Steffens

Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias (CAV-UDESC), Lages/SC.

Membro interno:  _____

Professor Dr. Marcelo Alves Moreira

Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias (CAV-UDESC), Lages/SC.

Membro externo:  _____

Dr. Mariuccia Schlichting De Martin

Pesquisadora da Epagri - Estação Experimental de São Joaquim

Lages, 21 de abril de 2022

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de óxido nítrico (NO) em AC, em diferentes doses e momentos do armazenamento, sobre a qualidade de maçãs 'Baigent', na safra de 2020/2021. Os tratamentos avaliados foram: T₁ – Atmosfera controlada (AC), T₂ – AC + NO na dose 10 µL L⁻¹ aplicado no início do armazenamento, T₃ – AC + NO com aplicações de 1 µL L⁻¹ a cada 30 dias, T₄ – AC + NO com aplicações de 2 µL L⁻¹ a cada 30 dias, T₅ – AC + NO com aplicações de 5 µL L⁻¹ a cada 30 dias e T₆ – AC + NO na dose de 5 µL L⁻¹ aplicado no início e ao final do armazenamento. A condição de AC, em todos os tratamentos, foi 1,2 kPa O₂+2,0 kPa CO₂, 1,5±0,2 °C/UR de 94±2% e armazenados por 8 meses. Foram avaliadas às variáveis taxas respiratórias e de produção de etileno, cor de fundo da casca, firmeza de polpa (FP), acidez titulável (AT), sólidos solúveis (SS), incidência de podridões, polpa farinácea, compostos fenólicos totais (CFT), atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD) e conteúdo de peróxido de hidrogênio. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott (p<0,05). Os tratamentos com NO reduziram a produção de etileno e, na saída da câmara, os tratamentos NO com aplicações de 5 µL L⁻¹ a cada 30 dias e NO na dose de 5 µL L⁻¹ aplicado no início e ao final do armazenamento, reduziram a taxa respiratória. A maior incidência de podridões externas, na saída da câmara, ocorreu no controle e no tratamento NO na dose de 5 µL L⁻¹ com aplicações a cada 30 dias. Em relação à cor da epiderme, a aplicação de NO, independe da dose e momento de aplicação, manteve a coloração da epiderme menos amarelada e reduziu a incidência de podridões interna e de polpa farinácea. O SS apresentou maiores valores nos frutos dos tratamentos controle e com NO na dose de 2 µL L⁻¹ aplicado a cada 30 dias. A AT apresentou menor valor nos frutos dos tratamentos controle e com NO na dose de 1 e 2 µL L⁻¹ aplicado a cada 30 dias. A FP não apresentou diferença entre tratamentos. O tratamento NO na dose de 5 µL L⁻¹ aplicado no início e ao final do armazenamento, apresentou os maiores valores de CFT. A atividade enzimática da SOD na polpa foi mais elevada nos frutos do tratamento controle, seguido dos tratamentos NO na dose de 10 µL L⁻¹ aplicado no início do armazenamento e 2 µL L⁻¹ aplicado a cada 30 dias. A enzima POD, apresentou maior atividade em frutos do tratamento NO na dose de 10 µL L⁻¹ aplicado no início do armazenamento e 2 µL L⁻¹ de NO aplicado a cada 30 dias. O conteúdo de peróxido de hidrogênio apresentou maior valor nos frutos do tratamento controle. As aplicações de NO apresentaram efeitos positivos em manter melhor qualidade das maçãs 'Baigent'.

Palavras-chave: Brookfield®; estresse oxidativo; compostos fenólicos; atividade enzimática.

Controlled atmosphere with nitric oxide in the storage of 'Baigent' apples

The objective of this work was to evaluate the effect of nitric oxide (NO) application in CA, at different doses and storage times, on the quality of 'Baigent' apples in the 2020/2021 harvest. The treatments evaluated were: T₁ – Controlled atmosphere (CA), T₂ – CA + NO at a dose of 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ applied at the beginning of storage, T₃ – CA + NO with applications of 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ every 30 days), T₄ – AC + NO with applications of 2 $\mu\text{L L}^{-1}$ every 30 days, T₅– AC + NO with applications of 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ every 30 days and T₆ – AC + NO at a dose of 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ applied at the beginning and end of storage. The AC condition, in all treatments, was 1.2 kPa O₂+2.0 kPa CO₂, 1.5±0.2 °C/RH of 94±2% and stored for 8 months. Variables were evaluated respiratory rates and ethylene production, skin background color, flesh firmness (FP), titratable acidity (AT), soluble solids (SS), incidence of rot, farinaceous pulp, total phenolic compounds (CFT), activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and hydrogen peroxide content. The data were submitted to analysis of variance and the means compared by Scott-Knott test ($p < 0.05$). The treatments with NO reduced the production of ethylene and, at the exit of the chamber, the treatments NO with applications of 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ every 30 days and NO in the dose of 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ applied at the beginning and the end of the storage, reduced respiratory rate. The highest incidence of external rot, at the exit of the chamber, occurred in the control and the NO treatment at a dose of 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ with applications every 30 days. Regarding the color of the epidermis, the application of NO, regardless of the dose and time of application, kept the color of the epidermis less yellow and reduced the incidence of internal rot and farinaceous pulp. The SS showed higher values in the fruits of the control treatments and with NO at the dose of 2 $\mu\text{L L}^{-1}$ applied every 30 days. The AT showed lower value in the fruits of the control treatments and with NO at, the dose of 1 and 2 $\mu\text{L L}^{-1}$ applied every 30 days. The PF showed no difference between treatments. The NO treatment at a dose of 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ applied at the beginning and the end of storage, showed the highest CFT values. The enzymatic activity of SOD in the pulp was higher in the fruits of the control treatment, followed by the NO treatments at a dose of 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ applied at the beginning of storage and 2 $\mu\text{L L}^{-1}$ applied every 30 days. The POD enzyme showed higher

activity in fruits of the NO treatment at the dose of $10 \mu\text{L L}^{-1}$ applied at the beginning of storage and $2 \mu\text{L L}^{-1}$ of NO applied every 30 days. The hydrogen peroxide content showed the highest value in the fruits of the control treatment. Applications of NO had positive effects in maintaining better quality of 'Baigent' apples.

Key words: Brookfield®; oxidative stress; phenolic compounds; enzymatic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Plantas da cultivar Brookfield®	15
Figura 2: Frutos da cultivar Brookfield®	16
Figura 3: Mecanismos pelos quais o NO possivelmente antagoniza o etileno, causando inibição do amadurecimento.	18
Figura 4: Armazenamento dos frutos	21
Figura 5: Podridão e podridão interna dos frutos	22
Figura 6: Frutos rachados e escurecimento de polpa	23
Figura 7: Análise de cor de fundo da epiderme de maçãs	23
Figura 8: Recipientes utilizados nas taxas respiratórias e de produção de etileno 25	
Figura 9: Penetrômetro eletrônico	25
Figura 10: Refratômetro digital modelo PR201	26
Figura 11: Leitor de microplacas	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Leitura das taxas de produção de etileno ($\text{pmol C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$) realizadas a cada dois dias após a retirada das maçãs Baigent das câmaras, após 8 meses de armazenamento em atmosfera controlada ($1,2 \text{ O}_2$ e $2,0 \text{ CO}_2$; T: $1,5 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ e UR de $94 \pm 2\%$) em função da aplicação de óxido nítrico em diferentes doses e momentos do armazenamento. Lages, 2022.	31
Tabela 2: Taxa respiratória dos frutos ($\eta\text{mol CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$), realizados a cada dois dias após a retirada das maçãs Baigent das câmaras, após 8 meses de armazenamento em atmosfera controlada em função da aplicação de óxido nítrico em diferentes doses e momentos do armazenamento. Lages, 2022. ...	33
Tabela 3: Cor de fundo da epiderme (L , C e h°) de maçãs Baigent, após 8 meses de armazenamento em atmosfera controlada ($1,2 \text{ O}_2$ e $2,0 \text{ CO}_2$; T: $1,5 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ e UR de $94 \pm 2\%$) (saída da câmara) e após mais 7 dias em condições ambiente (T: $20 \text{ }^\circ\text{C}$) em função da aplicação de óxido nítrico (NO) em diferentes doses e momentos do armazenamento. Lages, 2022.	35
Tabela 4: Sólidos solúveis (SS; $^\circ\text{Brix}$), acidez titulável (AT; % de ácido málico) e firmeza de polpa (FP; N) de maçãs Baigent, após 8 meses de armazenamento em atmosfera controlada ($1,2 \text{ O}_2$ e $2,0 \text{ CO}_2$; T: $1,5 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ e UR de $94 \pm 2\%$) (saída da câmara) e mais 7 dias em condições ambiente (T: $20 \text{ }^\circ\text{C}$) em função da aplicação de óxido nítrico (NO) em diferentes doses e momentos do armazenamento. Lages, 2022.	37
Tabela 5: Incidência de podridões (%) e podridão interna (%) de maçãs Baigent, após 8 meses de armazenamento em atmosfera controlada ($1,2 \text{ O}_2$ e $2,0 \text{ CO}_2$; T: $1,5 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ e UR de $94 \pm 2\%$) (saída da câmara) e após mais 7 dias em condições ambiente (T: $20 \text{ }^\circ\text{C}$) em função da aplicação de óxido nítrico (NO) em diferentes doses e momentos do armazenamento. Lages, 2022.	38
Tabela 6: Incidência de frutos rachados e frutos murchos de maçãs Baigent, após 8 meses de armazenamento em atmosfera controlada ($1,2 \text{ O}_2$ e $2,0 \text{ CO}_2$; T: $1,5 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ e UR de $94 \pm 2\%$) (saída da câmara) e após mais 7 dias em condições ambiente (T: $20 \text{ }^\circ\text{C}$) em função da aplicação de óxido nítrico em diferentes doses e momentos do armazenamento. Lages, 2022.	40
Tabela 7: Incidência de degenerescência da polpa (%) e polpa farinácea (%) de maçãs Baigent, após 8 meses de armazenamento em atmosfera controlada ($1,2 \text{ O}_2$ e $2,0 \text{ CO}_2$; T: $1,5 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ e UR de $94 \pm 2\%$) e após mais 7 dias em condições	

ambiente (T: 20 °C) em função da aplicação de óxido nítrico (NO) em diferentes doses e momentos do armazenamento. Lages, 2022.....	41
Tabela 8: Resultado dos compostos fenólicos (CF; mg EAG.100 g ⁻¹ de massa fresca), realizados na polpa de maçãs Baigent, após 8 meses de armazenamento em atmosfera controlada (1,2 O ₂ e 2,0 CO ₂ ; T: 1,5±0,2 °C e UR de 94±2%) em função da aplicação de óxido nítrico em diferentes doses e momentos do armazenamento. Lages, 2022.	43
Tabela 9: Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD; μmol min ⁻¹ mg proteína ⁻¹), peroxidase (POD; μmol min ⁻¹ mg proteína ⁻¹) e teor de peróxido de hidrogênio (μmol H ₂ O ₂ /gr MF) em polpa de maçãs Baigent, após 8 meses de armazenamento em atmosfera controlada em função da aplicação de óxido nítrico em diferentes doses e momentos do armazenamento. Lages, 2022. ...	44

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 objetivo geral	14
1.1.1 Objetivos específicos	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 A CULTURA DA MAÇÃ	15
2.2 'BAIGENT'.....	15
2.3 ARMAZENAMENTO	16
2.4 ÓXIDO NÍTRICO.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 incidência de podridões	22
3.2 Distúrbios fisiológicos	23
3.3 COR DA EPIDERME	23
3.4 TAXAS RESPIRATÓRIA E DE PRODUÇÃO DE ETILENO	24
3.5 FIRMEZA DE POLPA	25
3.6 ACIDEZ TITULÁVEL.....	26
3.7 TEOR DE SÓLIDOS SOLÚVEIS	26
3.8 COMPOSTOS FENÓLICOS	26
3.8.1 Compostos fenólicos totais	26
3.8.2 Atividade enzimática	28
3.8.3 Peróxido de hidrogênio	29
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Produção de etileno dos frutos.....	31
4.2 Taxas respiratória dos frutos	33
4.3 cor de fundo da epiderme de maçãs baigent	34
4.4 Análises de SS, Fp e at.....	36
4.5 Incidência de podridão interna e externa.....	38
4.6 distúrbios fisiológicos e perda de massa	40
4.6 compostos fenólicos	43
4.7 Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POD) e teor de peróxido de hidrogênio	44
5 Conclusão	47
6 REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

A maçã é um dos frutos mais consumidos do mundo, perdendo apenas para a banana, citrus e uva (FURLAN et al, 2010). No ano de 2018, a produção total de maçãs no mundo foi de aproximadamente 86 milhões de toneladas e o Brasil teve uma produção de aproximadamente 1,2 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2020).

Para colher uma maçã de qualidade, exige tempo, habilidade e investimentos e por ter um grande volume de produção de maçã num curto período, é necessário um apropriado armazenamento para que essas maçãs sejam entregues ao consumidor com uma boa qualidade (GIRARDI et al, 2004; SOARDI, 2019).

Existem várias formas para armazenar maçãs, contudo atualmente o principal utilizado é a atmosfera controlada (AC). A AC tem como objetivo o armazenamento dos frutos por um longo período, podendo se estender de 7 a 10 meses, por meio da redução das pressões parciais de oxigênio (O_2) e/ou aumento das pressões parciais de gás carbônico (CO_2), redução da temperatura (próximas a $0^\circ C$) e manutenção de uma alta umidade relativa ($> 90\%$) nas câmaras para assim prolongar a vida pós-colheita dos frutos (ARGENTA, 2002; GIRARDI et al, 2004; BRACKMANN et al, 2005; SOARDI, 2019).

Na AC podem ocorrer grandes perdas se o manejo não for adequado. Por esse motivo, vem sendo utilizadas tecnologias complementares que reduzem a síntese e/ou a ação do etileno e promovam outras alterações fisiológicas que beneficiem os frutos durante o armazenamento em AC. Com o intuito de aumentar a duração do armazenamento e melhorar o controle do amadurecimento e senescência dos frutos, novas tecnologias foram desenvolvidas, como por exemplo, AC associada com a aplicação de 1-metilciclopropeno (AC+1-MCP), AC com ultrabaixo oxigênio (AC-ULO), AC com extremamente baixo oxigênio (AC-ELO) e AC dinâmica (ACD) (MDITSHWA et al., 2018).

A AC+1-MCP, AC-ULO e AC-ELO, embora tenham proporcionado resultados positivos na manutenção da qualidade de algumas cultivares de maçãs (FERNANDES, 2020), podem causar maior risco de ocorrência de alterações não desejáveis nos frutos, como a manifestação de distúrbios

fisiológicos internos, formação de sabor alcoólico nos frutos e a redução de aroma (MDITSHWA et al., 2018; FERNADES, 2020).

O óxido nítrico (NO) é uma espécie reativa de nitrogênio, naturalmente produzida em células vivas, estando envolvida na regulação de diversos processos durante o desenvolvimento vegetal (MANJUNATHA et al., 2010). A aplicação exógena de NO, em baixas concentrações, retarda o processo de amadurecimento. Sua ação sobre o amadurecimento e senescência pode ser atribuída, ao menos em parte, pela redução na síntese de etileno através da inibição das enzimas 1-aminociclopropano 1-ácido carboxílico sintase (ACC sintase) e 1-aminociclopropano 1-ácido carboxílico oxidase (ACC oxidase) (MANJUNATHA et al., 2012). O NO também possivelmente exerce a função de proteção da célula, através da reação que ocorre nos radicais lipídicos, eliminação de ânions O_2^- (superóxido) e de ONOO⁻ (peroxinitrito), ativação de enzimas antioxidantes que atuam como regulador positivo das principais enzimas envolvidas no metabolismo das ERO's (Espécies Reativas de Oxigênio), como a catalase (CAT), peroxidase (POD), superóxido dismutase (SOD) e a supressão da lipoxigenase (LOX), podendo prevenir a manifestação de distúrbios fisiológicos. Além disso o NO inibe a expressão de genes envolvidos na rota biossintética do etileno (FERRANTE, 2006; ZHU et al., 2006; LIU, et al., 2007; FRANCISCO et al., 2008; ZHU et al., 2008; HAYAT et al., 2010; MANJUNATHA et al., 2010; SIS et al., 2012; SOARDI, 2019).

Já existem vários trabalhos realizados sobre a aplicação de óxido nítrico em diferentes culturas, onde conclui-se que o NO diminuiu a produção de etileno (SOZZI et al, 2003; CHENG et al, 2009; BRACKMANN et al, 2017) e aumentou a firmeza de polpa (SOZZI et al, 2003; HENDGES et al, 2016). SOZZI et al. (2003) relataram que a dose de NO $10 \mu\text{L L}^{-1}$ diminuiu a produção de etileno e manteve uma melhor firmeza de polpa em relação a testemunha em pera 'Bartlett'. Contudo, todos estes trabalhos avaliaram o efeito da aplicação de NO no início do armazenamento dos frutos, os quais foram armazenados em ambiente refrigerado. O efeito da associação do NO com a AC e sua repetida aplicação ao longo do armazenamento de maçãs é pouco conhecido. É importante ressaltar que a aplicação de NO deve ser realizada em ambiente com baixo O_2 para evitar a reação do NO com O_2 , formando NO_2 , e assim garantir a sua efetividade (LIU et al, 2016). Portanto, as condições de AC utilizadas no

armazenamento de maçã é um ambiente adequado para a aplicação e reaplicação do NO e pode potencializar a conservação da qualidade dos frutos no armazenamento prolongado. Contudo, este efeito do NO é dependente da sua concentração e da espécie de fruto (MANJUNATHA et al., 2010).

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho foi de avaliar o efeito da aplicação de óxido nítrico (NO) em atmosfera controlada (AC), em diferentes doses e momentos do armazenamento, sobre a qualidade de maçãs 'Baigent'.

1.1.1 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da aplicação do NO em AC sobre a manutenção da qualidade sensorial de maçãs 'Baigent';

Avaliar o efeito da aplicação do NO em AC sobre o conteúdo de compostos fenólicos totais em maçãs 'Baigent';

Avaliar o efeito da aplicação do NO em AC sobre as taxas respiratória e de produção de etileno em maçãs 'Baigent';

Avaliar o efeito da aplicação do NO em AC sobre as incidências de podridões e de distúrbios fisiológicos em maçãs 'Baigent';

Avaliar se a reaplicação de NO durante o armazenamento em AC pode melhorar a manutenção da qualidade de maçãs 'Baigent' após o armazenamento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A CULTURA DA MAÇÃ

A macieira (*Malus domestica* Bork) tem como centro de origem a região do Cáucaso, que fica na Ásia entre os mares Negro e Cáspio. Existem cerca de 7 mil variedades de macieira, mas apenas 40 tem importância econômica (BLEICHER, 2002).

Atualmente, a macieira é uma das fruteiras mais consumidas do mundo. No Brasil, a produção de maçã se concentra basicamente em três estados, Paraná (2,6%), na região de Palmas, Rio Grande do Sul (44,8%), na região de Vacaria, e Santa Catarina (52,6%), nas regiões de São Joaquim e Fraiburgo (BONETI et al., 2002; PETRI et al., 2016; KRETZSCHMAR & RUFATO 2020). As cultivares Gala e Fuji representam em torno de 56% e 39% da produção, respectivamente, sendo que em São Joaquim as maçãs do grupo Fuji representam cerca de 60% da produção e 40% do grupo Gala (KRETZSCHMAR & RUFATO 2020). Ambas são cultivares internacionalmente bem-conceituadas, que abastecem o mercado interno e externo, com elevado padrão de qualidade, coloração e sabor (FIORAVANÇO et al., 2011; PETRI, et al., 2016; SOARDI, 2019).

Na cultivar Gala existem vários tipos de clones originados por mutações somáticas, dentre eles a Royal Gala', 'Imperial Gala', 'Gala Real', 'Mondial Gala', 'Galaxy', 'Maxi Gala' e 'Baigent' (CAMILO & DENARDI, 2006; FIORAVANÇO et al., 2010; FIORAVANÇO et al., 2013).

2.2 'BAIGENT'

A cultivar de maçã Baigent ou Brookfield® (Figura 1) foi originada através de uma mutação espontânea da cultivar Royal Gala descoberta por Paul Brookfield, em Hawkes Bay, Nova Zelândia, em 1994. Essa mutação origina frutos completamente vermelhos, com estrias vermelho-escuras (Figura 2). O fruto possui um formato oblongo-cônico uniforme com um peso médio em torno de 136 g em porta-enxerto M-9 e 121 g em porta-enxerto Maruba/M-9 (FIORAVANÇO et al., 2010; FIORAVANÇO et al., 2013).

Figura 1: Plantas da cultivar Brookfield®



Fonte: FIORAVANÇO et al., 2013

Figura 2: Frutos da cultivar Brookfield®



Fonte: FIORAVANÇO et al., 2013

2.3 ARMAZENAMENTO

Maçãs da cultivar Gala e seus clones apresentam relativamente um bom potencial de armazenamento em AC, o que se faz necessário para aumentar a disponibilidade dos frutos ao longo do ano. No Brasil, a capacidade estática de armazenagem em atmosfera convencional e controlada é de aproximadamente 705 mil toneladas (PETRI, et al., 2016).

Na AC de maçãs do grupo Gala, as pressões parciais de O₂ e CO₂ são reduzidas próximas ou inferiores a 1 e 2 kPa, respectivamente, mantendo uma

alta umidade relativa e temperaturas próximas a 0°C. Isso vai levar a um aumento do período de armazenamento, se estendendo de 7 a 10 meses, que varia de acordo com a cultivar e do estágio de maturação. Esse prolongamento do armazenamento é devido que essas baixas concentrações de O₂ e CO₂, vai reduzir as produções de etileno e as taxas respiratórias devido ao baixo metabolismo dos frutos, prevenindo o amadurecimento do fruto durante o armazenamento. Esse menor metabolismo dos frutos é devido as baixas concentrações de O₂, que reduz a atividade da oxidase do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), que é a enzima responsável pela síntese do etileno, e enquanto que a alta taxa de CO₂ (2kPa) reduz a atividade da síntese do ACC e promove a atividade da oxidase do ACC. Além disso, essas baixas concentrações de CO₂, atuam reduzindo a atividade de enzimas responsáveis pela degradação de ácidos tricarbóxicos e conseqüentemente vai gerar um menor metabolismo do fruto, devido a menores produções de energia que seria utilizado na respiração (ARGENTA, 2002; SOARDI, 2019).

A AC com baixo O₂, proporciona potencial limitado de armazenamento de maçãs, já a AC-ULO e AC-ELO propiciam maior potencial de armazenamento, porém maior risco de ocorrência de distúrbios fisiológicos e de sabor alcoólico, podendo, dependendo do ano, do estágio de maturação e outros fatores, causar enormes perdas dos frutos armazenados. Esses problemas podem ser agravados com combinação de AC-ULO e AC-ELO com o 1-MCP (MDITSHWA et al., 2018).

A ACD apresenta um sistema mais seguro de armazenamento prolongado para as maçãs do grupo 'Gala' por possuir uma capacidade de monitorar o estresse causado pela redução do O₂, manejando a pressão parcial do gás de forma a minimizar as reações de fermentação. Porém, esse sistema apresenta um alto custo de implantação e não permite o aproveitamento da estrutura de armazenamento existente (MDITSHWA et al., 2018).

Existem vários compostos que podem interferir nas enzimas responsáveis pela síntese do etileno, através do uso de produtos como o 1-MCP (inibidor da ação do etileno), etanol (suprime a indução da expressão de genes de resposta ao etileno) e do óxido nítrico, que inibe a biossíntese de etileno (ARGENTA, 2002; SOARDI, 2019).

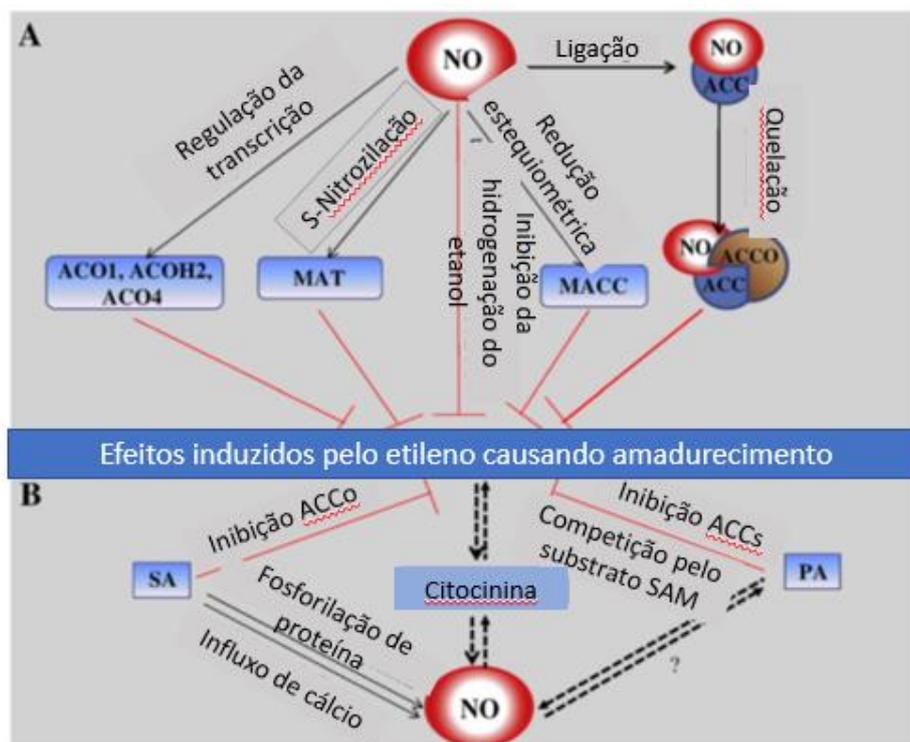
2.4 ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é uma espécie reativa de nitrogênio que é produzida naturalmente pelas plantas. Existem várias evidências que comprovam que o NO possui propriedades antisenescência. Além disso, existe uma relação entre estágio de maturação e conteúdo interno de NO nos frutos, sendo que frutos verdes possuem altas concentrações de NO e baixas concentrações de etileno, ou seja, o óxido nítrico possui uma inversa correlação com o etileno (LESHEM et al., 1998; LESHEM, 2000; LESHEM et al., 2000; SIS et al., 2012).

Alguns estudos sobre o NO, indicam que ele atua como regulador das principais enzimas envolvidas no metabolismo das ERO's como a catalase (CAT), peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD), através da inibição da biossíntese de etileno (FERRANTE, 2006; FRANCISCO et al., 2008; ZHU et al., 2008; MANJUNATHA et al., 2010; SIS et al., 2012; SOARDI, 2019).

O NO interfere de várias maneiras na biossíntese de etileno (Figura 3). Os efeitos diretos do NO sobre a síntese de etileno são descritos a seguir: o NO atua como um regulador negativo de 6 genes envolvidos no amadurecimento e senescência do fruto, fazendo com que o fruto perca a sensibilidade ao etileno (MANJUNATHA et al., 2010; LAI et al., 2011; ZUCCARELLI et al., 2020); o NO faz com que ocorra uma nitrosilação-S da MAT (metionina adenosiltransferase) e ele acaba inibindo a hidrogenação do etanol (C_2H_6) (MANJUNATHA et al., 2010); com a inibição da biossíntese de etileno, vai ocorrer um aumento da concentração de ACC, fazendo com que isso gere uma redução estequiométrica da ACC para MACC (1-malonilaminociclopropano-1-carboxílico); e outro efeito direto do NO sobre a biossíntese do etileno é através de um mecanismo onde o NO se liga à ACC oxidase para formar um complexo binário ACC oxidase-NO, que é quelado pelo ACC para produzir um complexo ternário estável ACC-ACC oxidase-NO, levando a uma diminuição na produção de etileno (ZHU et al., 2006; MANJUNATHA et al., 2010; KANG et al., 2015).

Figura 3: Mecanismos pelos quais o NO possivelmente antagoniza o etileno, causando inibição do amadurecimento.



Fonte: MANJUNATHA et al., 2010.

Além desses efeitos diretos na inibição do etileno, o NO também atua de forma indireta na inibição da biossíntese de etileno, através do efeito sinérgico do NO com o ácido salicílico (AS), poliaminas (PA) e com as citocininas. O AS atua juntamente com o NO através da fosforilação de proteínas e do influxo de cálcio na membrana, fazendo com que o AS iniba a ACC oxidase. As PA e as citocininas também apresentam um efeito sinérgico com o NO, porém o mecanismo de como isso ocorre não é conhecido. As PA acabam atuando na inibição da ACC sintase, fazendo com que ocorra uma maior competição de ACC sintase entre a biossíntese de etileno e com o substrato produzido do ciclo de Yang, a SAM (S-adenosyl methionine) (MANJUNATHA et al., 2010).

Existem vários trabalhos realizados sobre NO, onde os autores perceberam que o NO diminuiu a produção de etileno em morango (ZHU & ZHOU., 2007), kiwi (ZHU et al., 2010), banana (CHENG et al., 2009), ameixa (SINGH et al., 2009), pêssego (ZHU et al., 2006; HAN et al., 2018), nectarina (JAYARAJAN e SHARMA, 2018), manga (TRAN et al., 2015; ZAHARAH et al., 2011), pera (SOZZI et al., 2003; LIU et al., 2011), tomate (LAI et al., 2011; ZUCCARELLI et al., 2020) e em maçã (RUDELL & MATTHEIS, 2006;

BRACKMANN et al., 2017). Alguns trabalhos também demonstram diminuição das taxas respiratória dos frutos (SOZZI et al., 2003; ZHU & ZHOU 2007; CHENG et al., 2009; SINGH et al., 2009; ZAHARAH et al., 2011; TRAN et al., 2015; BRACKMANN et al., 2017).

O NO também atua mantendo uma melhor firmeza de polpa (SOZZI et al., 2003; ZHU et al., 2010; SINGH et al., 2009; LIU et al., 2011; ZAHARAH et al., 2011; SUN et al., 2011; WANG et al., 2013; TRAN et al., 2015; HENDGES et al., 2016; HAN et al., 2018; JAYARAJAN e SHARMA, 2018), reduzindo a coloração amarelada dos frutos (CHENG et al., 2009; ZAHARAH et al., 2011; TRAN et al., 2015) ou a coloração vermelha de ameixa e tomate (SINGH et al., 2009; LAI et al., 2011; ZUCCARELLI et al., 2020).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos utilizados foram colhidos na safra 2020/2021, provenientes de um pomar comercial localizado no município de Vacaria (coordenadas geográficas: Latitude: 28° 30' 39" sul, Longitude: 50° 55' 47" oeste), RS. Após a colheita os frutos foram transportados ao Laboratório de Fisiologia e Tecnologia Pós-colheita do CAV/UDESC para o preparo das amostras e realização das análises iniciais.

Nessas análises iniciais esses frutos apresentaram as seguintes características. Cor de fundo da epiderme de maçãs de 76,0 (Luminosidade), 39,6 (Cromo) e 100,4 (h^0); firmeza de polpa de 80,4 N; teor de sólidos solúveis de 12,1 ($^{\circ}$ Brix) e uma acidez titulável de 0,378 (% de ácido málico).

Os tratamentos avaliados foram: T₁ – Atmosfera controlada (AC), T₂ – AC + NO na dose 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início do armazenamento, T₃ – AC + NO com aplicações de 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ a cada 30 dias, T₄ – AC + NO com aplicações de 2 $\mu\text{L L}^{-1}$ a cada 30 dias, T₅ – AC + NO com aplicações de 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ a cada 30 dias e T₆ – AC + NO na dose de 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início e ao final do armazenamento. Cada tratamento foi constituído por quatro repetições e unidade experimental constituída de 25 frutos. A condição de AC utilizada foi de 1,2 kPa O₂ + 2,0 kPa CO₂, temperatura de 1,5 \pm 0,2 °C e UR de 94 \pm 2%. Os frutos foram armazenados em AC por um período de aproximadamente 8 meses (224 dias) (Figura 4). Na saída da câmara, os frutos foram avaliados quanto às variáveis taxas respiratórias e de produção de etileno, cor da epiderme, incidência de podridões, rachadura e frutos murchos. Após mais sete dias em condições ambiente (20°C), os frutos foram avaliados quanto as mesmas variáveis da saída da câmara além da firmeza de polpa, acidez titulável, sólidos solúveis, polpa farinácea, degenerescência da polpa, compostos fenólicos totais, conteúdo de peróxido de hidrogênio e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POD).

Figura 4: Armazenamento dos frutos



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021

As aplicações de NO ocorreram após instalada a atmosfera controlada. Para realizar a/s aplicações de NO, foi utilizado uma seringa hipodérmica de vidro de 100ml e um cilindro de óxido nítrico.

As metodologias das variáveis analisadas estão descritas a seguir.

3.1 INCIDÊNCIA DE PODRIDÕES

A incidência de podridões foi avaliada na saída da câmara e após mais 7 dias em prateleira.

Foi realizado após mais 7 dias em prateleira, a incidência de frutos com podridão interna. Para caracterizar uma podridão interna, esses frutos foram cortados horizontalmente e se em volta do endocarpo estivesse com podridão era caracterizado como uma podridão interna (Figura 5). Essa podridão se iniciava no endocarpo e se espalhava para o restante do fruto.

Figura 5: Podridão e podridão interna dos frutos



Fontes: Elaborado pelo autor (imagem esquerda) e google imagem (imagem direita), 2021

3.2 DISTURBIOS FISIOLÓGICOS

Foi avaliado a incidência de frutos rachados, polpa farinácea e escurecimento de polpa.

Para fazer a incidência de escurecimento de polpa e polpa farinácea, os frutos foram cortados horizontalmente. Se na polpa do fruto estivesse escura, era caracterizado como escurecimento de polpa. Para polpa farinácea, era pego o fruto cortado e era feito compressão manual para ver se saia água. Se não saísse água ou se saísse bem pouca água, era caracterizado como polpa farinácea.

Figura 6: Frutos rachados e escurecimento de polpa



Fontes: Elaborado pelo autor (imagem esquerda) e google imagem (imagem direita), 2021

3.3 COR DA EPIDERME

Foi avaliada a cor de fundo dos frutos, com auxílio de um colorímetro (Konica Minolta, Tóquio, Japão) (Figura 7), em termos de valores de 'L' (Luminosidade), croma (C) e ângulo 'hue' (h°).

Figura 7: Análise de cor de fundo da epiderme de maçãs



Fonte: elaborado pelo autor, 2021

3.4 TAXAS RESPIRATÓRIA E DE PRODUÇÃO DE ETILENO

As taxas respiratórias ($\eta\text{mol de CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e de produção de etileno ($\eta\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$) foram quantificadas por meio de analisador eletrônico de gases e cromatografia gasosa, respectivamente, a cada dois dias após a retirada dos frutos das câmaras por um período de 7 dias. Os frutos foram acondicionados em recipientes plásticos de capacidade de 4,1L, com fechamento hermético (Figura 8). A taxa respiratória e produção de etileno, respectivamente, foram obtidas pela diferença de concentração de CO_2 e C_2H_4 no interior do recipiente após o fechamento. Para a taxa respiratória, o ar contido no 'head space' dos recipientes foi circulado, em sistema fechado, por um analisador eletrônico de gases (O_2 e CO_2). Para a taxa de produção de etileno, com uma seringa plástica de capacidade de 1 mL, foram coletadas 3 amostras da atmosfera do espaço livre destes recipientes. As amostras coletadas foram injetadas em um cromatógrafo gasoso, marca PerkinElmer®, modelo Clarus 580 (Norwalk, EUA), equipado com uma coluna Porapak N® de 3 m de comprimento (80-100 mesh) e detector de ionização de chama. Os gases utilizados foram nitrogênio (arraste), hidrogênio e ar sintético, com fluxo de 70, 45 e 450 mL min⁻¹

¹, respectivamente. A temperatura da coluna foi de 70 °C, do detector de 250 °C e do injetor 130 °C.

Figura 8: Recipientes utilizados nas taxas respiratórias e de produção de etileno



Fonte: elaborado pelo autor, 2021

3.5 FIRMEZA DE POLPA

A firmeza de polpa foi quantificada com o auxílio de um penetrômetro eletrônico (Figura 9) com ponteira de 11 mm (Guss Manufacturing Ltd., Cidade do Cabo, África do Sul) em duas regiões opostas dos frutos, na porção equatorial, após a retirada de uma fina camada da epiderme.

Figura 9: Penetrômetro eletrônico



Fonte: elaborado pelo autor, 2021

3.6 ACIDEZ TITULÁVEL

Os valores de AT foram obtidos através de uma amostra de 5 mL de suco, obtido pelo processamento dos frutos em uma centrífuga. Essa amostra foi diluída em 45 mL de água destilada e titulada com solução de NaOH (0,1 N) até pH 8,0. Para titulação das amostras foi utilizado um titulador automático (Radiometer Analytical). Os resultados foram expressos em % de ácido málico.

3.7 TEOR DE SÓLIDOS SOLÚVEIS

O conteúdo de sólidos solúveis foi determinado com auxílio de um refratômetro digital modelo PR201 α (Atago®, Tóquio, Japão) (Figura 10), utilizando uma alíquota de suco das frutas, os resultados foram expressos em °Brix.

Figura 10: Refratômetro digital modelo PR201



Fonte: elaborado pelo autor, 2021

3.8 COMPOSTOS FENÓLICOS

De cada fruto foram retiradas amostras para as análises de compostos funcionais, as quais foram armazenadas e suas respectivas análises realizadas posteriormente.

Para as análises de compostos fenólicos totais, a casca foi separada da polpa. De cada fruto foi cortada uma fatia da região equatorial de 1 cm e foram retiradas duas cunhas de lados opostos, que foram descascada e compuseram a amostra de polpa.

3.8.1 Compostos fenólicos totais

Para a obtenção dos extratos das frutas para a análise de compostos fenólicos totais foram realizados os mesmos procedimentos utilizados na

atividade antioxidante proposta por Rufino et al, (2007a). Inicialmente foram pesadas 5 g de polpa em um béquer com capacidade de 100mL. Após a pesagem foi adicionado 10mL de metanol 50%. As amostras foram homogeneizadas, e ficaram em repouso por 1 hora a temperatura ambiente em um local onde não houvesse incidência de luz para que não ocorresse a oxidação da amostra. Passado este período as amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm por 10min e o sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 25mL. No resíduo que restou da primeira extração foi adicionado 10mL de acetona 70%, as amostras foram homogeneizadas e permaneceram em repouso por 1 hora em temperatura ambiente em um local onde não houvesse incidência de luz para que não ocorresse a oxidação da amostra. O extrato novamente foi centrifugado a 15.000 rpm por 10 min. O sobrenadante desta última extração foi transferido para o mesmo balão que contém o primeiro sobrenadante. O volume do balão foi completado com água destilada até atingir 25mL, obtendo-se assim o extrato da amostra.

Para a análise através de espectrofotometria foi adaptado a metodologia descrita por Roesler et al. (2007). Em tubos de ensaio foram adicionados 2,5mL de Folin-Ciocalteu (diluído na proporção de 1:3 com água destilada) e 0,5mL do extrato da amostra. Passados 3 min, foram adicionados 2,0mL de carbonato de sódio 10%. Os tubos foram agitados em vórtex e incubados por 1 hora ao abrigo de luz, após este período foi efetuada a leitura em um leitor de microplacas (Figura 11) no comprimento de onda de 765 nm. A curva padrão foi produzida com ácido gálico nas concentrações de 0, 10, 30, 50, 70, 90 e 100 ppm. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico por 100 g de amostra.

Figura 11: Leitor de microplacas



Fonte: elaborado pelo autor, 2021

3.8.2 Atividade enzimática

Foram avaliadas a atividade das enzimas superóxido dismutase e peroxidase.

3.8.2.1 Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase foi determinada de acordo com o método descrito por Del Longo et al. (1993), com modificações. Uma amostra de 0,3 g de polpa foi homogeneizada com 3 mL do meio de extração, composto de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico 1 mM. A homogeneização foi feita em almofariz mantido em gelo. Em seguida as amostras foram centrifugadas à 4 °C por 15 minutos à 10.000 rpm. Uma alíquota de 50 µL do sobrenadante foi adicionada à 2,95 mL do meio de reação, composto pelo tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, metionina 13 mM, 75 µL de azul de p-nitro tetrazólio, ácido etilenodiaminotetracético 0,1 mM e riboflavina 2 µL. As leituras das amostras foram realizadas com auxílio de um leitor de microplacas modelo EnSpire (PerkinElmer, USA, Figura 11) no comprimento de onda de 560 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prote\acute{a}ina}^{-1}$.

3.8.2.2 Atividade da enzima Peroxidase (POD)

A quantificação da atividade da enzima peroxidase foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Kar e Mishra (1976), com modificações. Para a obtenção do extrato enzimático foram homogeneizados 0,3 g de polpa e 3 mL do meio de extração, composto do tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico 1 mM. As amostras do extrato enzimático foram centrifugadas à 4 °C por 15 minutos à 10.000 rpm. Uma alíquota de 600 µL do sobrenadante foi adicionada a um tampão composto de fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, guaiacol 20 mM e H₂O₂ 20 mM. Com auxílio de um leitor de microplacas modelo EnSpire (PerkinElmer, USA, Figura 11), foi medida a absorvância das amostras durante 1 minuto à 25 °C, utilizando comprimento de onda de 420 nm. A atividade da enzima peroxidase foi determinada de acordo com a inclinação da reta no intervalo de 0 a 1 minuto. Os resultados foram expressos em µmol min⁻¹ mg proteína⁻¹.

3.8.3 Peróxido de hidrogênio

A quantificação de peróxido de hidrogênio foi realizada de acordo com o método proposto por Loreto e Velikova (2001), com algumas alterações. Foi pesado 0,3 g da amostra, foi adicionado 2 mL de TCA (0,1%) e foram homogeneizadas. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas à 4 °C por 10 minutos a 12.000 rpm, com auxílio de uma centrífuga (modelo 5810R). Uma alíquota de 500 µL do sobrenadante foi adicionada à um recipiente contendo 500 µL de TFK 10mM pH 7,0 e 1 ml de KI 1M no escuro. Após isso foi feita as absorvâncias que foram mensuradas no comprimento de onda de 390 nM em um leitor de microplacas modelo EnSpire (PerkinElmer, USA, Figura 11). A curva padrão foi determinada com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio e os resultados foram expressos em µmol g⁻¹.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados que estavam em porcentagem (podridões, frutos murchos e rachados, degenerescência de polpa e polpa farinácea), foram utilizado transformação de dados através do arco seno da raiz da porcentagem dividido por 100.

A análise estatística dos dados foi realizada através da análise de variância, e as variáveis cujos resultados revelaram significância ($p < 0,05$), foram

submetidas à comparação de médias pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram executadas pelo programa Sisvar, versão 5.3 (FERREIRA, 2010).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRODUÇÃO DE ETILENO DOS FRUTOS

A produção de etileno na saída da câmara foi menor quando se aplicou a dose de NO de $5 \mu\text{L L}^{-1}$ no início e ao final do armazenamento. Ao terceiro dia em condição ambiente, esse mesmo tratamento foi o que apresentou maior taxa de produção de etileno. No quinto dia o tratamento controle apresentou a maior taxa e pico de produção de etileno. No sétimo dia, o tratamento NO na dose de $10 \mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início do armazenamento apresentou a maior taxa de produção de etileno, seguido do tratamento controle. Esse efeito inibitório do NO na produção de etileno possivelmente ocorre porque o NO se liga à ACC oxidase, formando um complexo binário ACC oxidase-NO, que é quelado pelo ACC. O resultado disso é a produção de um complexo ternário ACC-ACC oxidase-NO, que leva à diminuição na produção de etileno. Além disso, ocorre um mecanismo secundário do NO, onde há um redirecionamento da ACC, usada na produção do etileno para a produção de MACC (1-malonilaminociclopropano-1-carboxílico), inibindo/ diminuindo a biossíntese de etileno (ZHU et al., 2006; MANJUNATHA et al., 2010; KANG et al., 2015).

Tabela 1: Leitura das taxas de produção de etileno ($\text{pmol C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$) realizadas a cada dois dias após a retirada das maçãs Baigent das câmaras, após 8 meses de armazenamento em atmosfera controlada ($1,2 \text{ O}_2$ e $2,0 \text{ CO}_2$; T: $1,5 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ e UR de $94 \pm 2\%$) em função da aplicação de óxido nítrico em diferentes doses e momentos do armazenamento. Lages, 2022.

Tratamentos	Tempo de prateleira (dias)			
	1	3	5	7
T1-Controle	0,42 a	0,50 b	1,55 a	0,80 b
T2- NO na dose de $10 \mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início do armazenamento	0,40 a	0,60 b	0,86 b	1,02 a

T3- NO na dose de 1 μL L^{-1} aplicado a cada 30 dias	0,34 a	0,43 b	0,82 b	0,59 c
T4- NO na dose de 2 μL L^{-1} aplicado a cada 30 dias	0,38 a	0,40 b	0,52 c	0,58 c
T5- NO na dose de 5 μL L^{-1} aplicado a cada 30 dias	0,33 a	0,77 b	0,51 c	0,55 c
T6- NO na dose de 5 μL L^{-1} aplicado no início e ao final do armazenamento	0,24 b	0,88 a	0,61 c	0,54 c
CV (%)	18,52	25,22	15,28	18,76

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade. NO: óxido nítrico; CV: coeficiente de variação (%);

Cheng et al. (2009) realizaram um experimento com NO em banana em temperatura ambiente a 24 °C e observaram que a aplicação de NO diminui a produção de etileno e isso foi associada à redução da atividade de ACC oxidase e da expressão do gene MAACCO1. Além disso, as frutas tratadas com NO apresentaram menor expressão do gene MAACS1, mas maior atividade de ACCsintase e conteúdo de ACC, com isso, eles concluíram que a inibição da atividade da ACCoxidase e da transcrição do gene MAACO1 pelo NO resultou na diminuição da síntese de etileno.

Brackmann et al. (2017) realizaram um trabalho com óxido nítrico e etanol em maçãs 'Galaxy' que foram armazenadas por 8 meses em atmosfera controlada, porém a aplicação de etanol e NO foram realizadas apenas antes do armazenamento, sendo que os frutos foram expostos ao óxido nítrico por um período de 24 horas e foi posteriormente instalada a atmosfera controlada nas pressões de 1,2 kPa O_2 + 2,0 kPa CO_2 e deixadas numa temperatura de 1,5 °C e a aplicação de NO na dose de 40 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou uma menor produção de etileno. No presente experimento, as aplicações de NO ocorreram após sido implantada a AC e independente da dose ou das aplicações de NO houve diminuição da produção de etileno.

4.2 TAXAS RESPIRATÓRIA DOS FRUTOS

Nas taxas respiratórias dos frutos, houve diferença apenas na saída da câmara, nos tratamentos de NO nas doses de 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias e 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início e ao final do armazenamento que apresentaram uma menor taxa respiratória. Na saída da câmara essa menor respiração possivelmente ocorreu devido as altas doses de NO, o que resultou em um maior período de menores produções de CO_2 . Esse efeito do NO é devido que ele é um forte inibidor da cadeia respiratória mitocondrial, onde vai ocorrer ligações nas proteínas ferro-sulfúricas dos complexos da cadeia, resultando numa inibição das atividades biológicas e com isso vai gerar menores produção de CO_2 nos frutos (MACHADO., 2021).

Tabela 2: Taxa respiratória dos frutos ($\eta\text{mol CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$), realizados a cada dois dias após a retirada das maçãs Baigent das câmaras, após 8 meses de armazenamento em atmosfera controlada em função da aplicação de óxido nítrico em diferentes doses e momentos do armazenamento. Lages, 2022.

Tratamentos	Tempo de prateleira (dias)			
	1	3	5	7
Controle	15,04 a	38,65 ^{ns}	39,73 ^{ns}	44,38 ^{ns}
NO na dose de 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início do armazenamento	15,53 a	42,40	39,41	34,50
NO na dose de 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias	16,73 a	40,00	36,31	37,80
NO na dose de 2 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias	16,81 a	38,31	37,75	34,53
NO na dose de 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias	13,25 b	37,24	38,74	36,34

NO na dose de 5 μL
 L^{-1} aplicado no início
 e ao final do

armazenamento	10,16 b	38,37	27,50	37,93
CV (%)	18.49	8,66	10.49	12.16

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade. NO: óxido nítrico; CV: coeficiente de variação (%); ns: nenhuma significância

Segundo Kang et al. (2015) em trabalho realizado em pêssigo, a aplicação de NO resultou em uma regulação de várias proteínas que participam do processo respiratório dos frutos. Dentre essas proteínas reguladas, existem as proteínas PGK (Fosfoglicerato kinase), PGM (fosfoglicerato mutase) e TIM (isomerase de triosefosfato) responsáveis pelas etapas de glicólise e gliconeogênese. Além dessas proteínas, o NO regula a proteína citocromo c oxidase, a última enzima envolvida no transporte de elétrons respiratório da mitocôndria. Através dessas inibições, resultará em uma menor respiração dos frutos, como ocorreu nos tratamentos de NO nas doses de 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias e 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início e ao final do armazenamento.

Existem diversos trabalhos em diferentes tipos de frutos que mostram que o NO diminui as taxas respiratórias. Em ameixa a utilização de NO em ambiente refrigerado e em atmosfera controlada reduziu as taxas respiratórias dos frutos (SINGH et al., 2009; STEFFENS et al., 2021b). E em maçã 'Galaxy', a aplicação de NO antes da instalação da atmosfera controlada resultou em menores taxas respiratórias dos frutos (BRACKMANN et al., 2017).

4.3 COR DE FUNDO DA EPIDERME DE MAÇÃS BAIGENT

Na saída da câmara, não houve diferença entre os tratamentos em relação à coloração dos frutos. Contudo, após mais 7 dias em condições ambiente o tratamento controle apresentou frutos com cor de casca mais amarela (menor valor de h°) do que os tratamentos com aplicação de NO, que não diferiram entre si (Tabela 3). Esse maior amarelecimento no tratamento controle, é devido a maior taxa e pico de produção de etileno, que resultou em maior senescência do fruto e com isso também resultou em maior degradação da clorofila. O menor amarelecimento dos frutos com aplicação de NO, tem relação com a presença de clorofila nos frutos. O NO atua preservando os níveis de clorofila durante a

senescência, através da regulação negativa da enzima clorofilase, que é responsável pela degradação da clorofila (GUO et al., 2013). Essa regulação ocorre por causa que os tratamentos com NO, resultam em menores produções de etileno, com isso, o NO acaba atuando indiretamente na inibição da enzima clorofilase.

Tabela 3: Cor de fundo da epiderme (*L*, *C* e *h°*) de maçãs Baigent, após 8 meses de armazenamento em atmosfera controlada (1,2 O₂ e 2,0 CO₂; T: 1,5±0,2 °C e UR de 94±2%) (saída da câmara) e após mais 7 dias em condições ambiente (T: 20 °C) em função da aplicação de óxido nítrico (NO) em diferentes doses e momentos do armazenamento. Lages, 2022.

Tratamento	<i>L</i>	<i>C</i>	<i>h°</i>
Saída da câmara			
Controle	73,6 ^{ns}	40,8 ^{ns}	96,0 ^{ns}
NO na dose de 10 µL L ⁻¹ aplicado no início do armazenamento	73,9	39,3	97,0
NO na dose de 1 µL L ⁻¹ aplicado a cada 30 dias	73,8	38,7	95,7
NO na dose de 2 µL L ⁻¹ aplicado a cada 30 dias	72,0	38,8	97,8
NO na dose de 5 µL L ⁻¹ aplicado a cada 30 dias	72,2	40,2	99,5
NO na dose de 5 µL L ⁻¹ aplicado no início e ao final do armazenamento	73,1	39,6	98,4
CV (%)	2.73	2.69	2.79
Após mais 7 dias em condições ambiente			
Controle	68,3 ^{ns}	38,7 ^{ns}	80,5 b

NO na dose de 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início do armazenamento	71,9	40,2	90,4 a
NO na dose de 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias	72,2	40,7	92,3 a
NO na dose de 2 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias	71,5	40,5	91,7 a
NO na dose de 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias	71,8	40,5	90,8 a
NO na dose de 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início e ao final do armazenamento	71,7	40,8	91,4 a
CV (%)	2,94	3,55	4,65

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade. NO: óxido nítrico; CV: coeficiente de variação (%); ns: nenhuma significância

Resultados similares foram relatados por diversos autores em diferentes frutos. Em ameixa, Singh et al. (2009) observaram que a fumigação de NO por 2 horas, independente da dose avaliada, restringiu as mudanças de cor dos frutos durante o armazenamento refrigerado. Lai et al. (2011) e Zuccarelli et al. (2020) aplicaram NO e SNP (nitroprusiato de sódio) em tomate e verificaram retardamento no desenvolvimento da cor da casca do tomate, que pode estar diretamente ligado a regulação negativa de 6 genes que codificam a enzima ACC oxidase (ACCO1, ACCO2, ACCO3, ACCO4, ACCO5 e ACCO6) envolvidos na síntese de etileno, com conseqüente redução na síntese e retardo do amadurecimento.

4.4 ANÁLISES DE SS, FP E AT

O metabolismo e acúmulo de açúcares são de grande importância para a qualidade do fruto. No presente estudo, o tratamento controle e NO na dose de 2 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias apresentaram um maior teor de sólido solúveis (Tabela 4). A acidez titulável foi superior em frutos dos tratamentos controle, NO nas doses de 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 2 $\mu\text{L L}^{-1}$, ambos aplicados a cada 30 dias de

armazenamento (Tabela 4). Resultados similares ocorreram em dois trabalhos de Steffens et al. (2021a, b) em maçãs Cripps Pink e em ameixa Laetitia.

Tabela 4: Sólidos solúveis (SS; °Brix), acidez titulável (AT; % de ácido málico) e firmeza de polpa (FP; N) de maçãs Baigent, após 8 meses de armazenamento em atmosfera controlada (1,2 O₂ e 2,0 CO₂; T: 1,5±0,2 °C e UR de 94±2%) (saída da câmara) e mais 7 dias em condições ambiente (T: 20 °C) em função da aplicação de óxido nítrico (NO) em diferentes doses e momentos do armazenamento. Lages, 2022.

Tratamento	SS	AT	FP
Controle	14,0 a	0,298 a	69,2 ^{ns}
NO na dose de 10 µL L ⁻¹ aplicado no início do armazenamento	12,7 b	0,261 b	68,8
NO na dose de 1 µL L ⁻¹ aplicado a cada 30 dias	13,2 b	0,278 a	71,0
NO na dose de 2 µL L ⁻¹ aplicado a cada 30 dias	13,4 a	0,290 a	70,6
NO na dose de 5 µL L ⁻¹ aplicado a cada 30 dias	13,1 b	0,269 b	68,8
NO na dose de 5 µL L ⁻¹ aplicado no início e ao final do armazenamento	12,8 b	0,257 b	67,5
CV (%)	3,3	5,59	2,7

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade. NO: óxido nítrico; SS: sólidos solúveis; AT: acidez titulável; FP: firmeza de polpa; CV: coeficiente de variação (%); ns: nenhuma significância

A firmeza de polpa não apresentou diferença entre os tratamentos (Tabela 4), em vários trabalhos realizados com aplicação de NO ou SNP foi observado que o óxido nítrico manteve maior firmeza de polpa, ameixa (SINGH et al., 2009), pera (SOZZI et al., 2003; LIU et al., 2011; HENDGES et al., 2016), pêssigo (SUN et al., 2011; HAN et al., 2018) e nectarina (JAYARAJAN e SHARMA, 2018). Esse efeito de aumento da firmeza, talvez esteja relacionada com o tipo de fruto, dosagem do NO e a interação de melatonina com NO, aonde a melatonina atua sinergicamente com o NO na redução do amolecimento de frutas, através do atraso da senescência e da diminuição da produção de etileno (MACHADO, 2021).

Em frutos climatéricos a perecibilidade do fruto é determinada pela respiração e produção de etileno, consideradas as principais alterações

metabólicas associadas à vida pós-colheita, por causa disso, é necessário manter uma baixa respiração e produção de etileno para conseguir aumentar a vida útil do fruto e conseqüentemente aumentar o tempo de armazenamento e vida de prateleira (JAYARAJAN e SHARMA, 2018). As aplicações de NO no presente experimento, diminuiu as produções de etileno (Tabela 1), mas as taxas respiratórias só ocorreu diminuição na saída da câmara, nos tratamentos com NO nas doses de $5 \mu\text{L L}^{-1}$ de NO aplicado a cada 30 dias e $5 \mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início e ao final do armazenamento (Tabela 2). Já que não ocorreu uma baixa taxa respiratória, isso pode ter influenciado nos valores de acidez titulável e sólidos solúveis.

4.5 INCIDÊNCIA DE PODRIDÃO INTERNA E EXTERNA

O tratamento controle apresentou maior incidência de podridão interna nos frutos de 'Baigent', em relação aos demais tratamentos com NO. Em relação à incidência de podridão, o tratamento controle e NO na dose de $5 \mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias apresentaram maior incidência de podridão (Tabela 5). Após mais 7 dias em prateleira não houve diferença entre os tratamentos. A maior incidência de podridões no tratamento NO na dose de $5 \mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias pode estar associado, ao fato de que essa dosagem tenha alcançado o pico de efeito que o NO tem sobre os frutos, com isso, não houve efeito da dosagem em relação à proteção contra podridão. Segundo os trabalhos de Lai et al. (2011) e Zuccarelli et al. (2020), a aplicação de NO controla negativamente 6 genes relacionados com o amadurecimento, através disso, estes frutos tratados com NO acabam perdendo a sensibilidade ao etileno, resultando em um aumento da resistência dos frutos, no caso desses dois trabalhos do tomate a podridão cinzenta (*Botrytis cinerea*). No presente estudo, foi observado que os tratamentos com NO, exceto o tratamento NO na dose de $5 \mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias, resultaram em menores incidências de frutos com podridões externas e podridão interna.

Tabela 5: Incidência de podridões (%) e podridão interna (%) de maçãs Baigent, após 8 meses de armazenamento em atmosfera controlada ($1,2 \text{ O}_2$ e $2,0 \text{ CO}_2$; T: $1,5 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ e UR de $94 \pm 2\%$) (saída da câmara) e após mais 7 dias em

condições ambiente (T: 20 °C) em função da aplicação de óxido nítrico (NO) em diferentes doses e momentos do armazenamento. Lages, 2022.

Tratamento	Podridões	Podridão interna
Saída da câmara		
Controle	6,0 a	
NO na dose de 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início do armazenamento	0,0 b	
NO na dose de 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias	2,0 b	
NO na dose de 2 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias	1,0 b	
NO na dose de 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias	5,0 a	
NO na dose de 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início e ao final do armazenamento	1,0 b	
CV (%)	97,8	
Após mais 7 dias em condições ambiente		
Controle	6,5 ^{ns}	4,3 a
NO na dose de 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início do armazenamento	4,2	0,0 b
NO na dose de 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias	5,5	1,1 b
NO na dose de 2 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias	2,1	0,0 b
NO na dose de 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias	0,0	0,0 b
NO na dose de 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início e ao final do armazenamento	1,9	1,0 b
CV (%)	106,6	154,1

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade. NO: óxido nítrico; CV: coeficiente de variação (%); ns: nenhuma significância

Brackmann et al. (2017) em maçã 'Galaxy' relataram que a aplicação de NO, antes de instalar a atmosfera controlada, não apresentaram benefícios na manutenção da qualidade dos frutos após o armazenamento em AC, devido à maior incidência de podridões nos frutos. Resultado similar ocorreu com o tratamento NO na dose de 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias, que, com o controle, apresentou maior incidência de podridões na saída da câmara. Essa maior incidência de podridões, ocorre por causa que a dose utilizada foi alta e não houve efeito do NO sobre os frutos.

4.6 DISTÚRBIOS FISIOLÓGICOS E PERDA DE MASSA

O controle apresentou maior perda de massa/ murchamento de frutos do que os tratamentos com NO e após mais 7 dias em prateleira não apresentou diferença entre os tratamentos avaliados (Tabela 6). Em nectarina, a aplicação de 0,5 mM de SNP, resultou em uma menor perda fisiológica de peso. Isso ocorre por causa que os frutos tratados com SNP, apresentaram uma maior consolidação das células e à permeabilidade dos tecidos conhecidos por diminuir a perda de umidade dos tecidos dos frutos e enquanto frutos não tratados apresentaram maior atividade metabólica e por causa disso essas frutas se deterioraram a uma taxa mais rápida do que as tratadas (JAYARAJAN e SHARMA, 2018). O controle apresentou uma maior atividade metabólica, devida a maior produção de etileno, por causa disso, resultou em uma maior perda de umidade dos tecidos dos frutos.

Tabela 6: Incidência de frutos rachados e frutos murchos de maçãs Baigent, após 8 meses de armazenamento em atmosfera controlada (1,2 O₂ e 2,0 CO₂; T: 1,5±0,2 °C e UR de 94±2%) (saída da câmara) e após mais 7 dias em condições ambiente (T: 20 °C) em função da aplicação de óxido nítrico em diferentes doses e momentos do armazenamento. Lages, 2022.

Tratamento	Frutos rachados	Frutos murchos
Saída da câmara		
Controle	4,2 ^{ns}	11,0 a
NO na dose de 10 µL L ⁻¹ aplicado no início do armazenamento	1,1	0,0 b
NO na dose de 1 µL L ⁻¹ aplicado a cada 30 dias	2,0	3,0 b
NO na dose de 2 µL L ⁻¹ aplicado a cada 30 dias	3,0	1,0 b
NO na dose de 5 µL L ⁻¹ aplicado a cada 30 dias	1,0	1,0 b
NO na dose de 5 µL L ⁻¹ aplicado no início e ao final do armazenamento	1,0	0,0 b
CV (%)	102,7	186,6
Após mais 7 dias em condições ambiente		
Controle	2,2 ^{ns}	12,0 ^{ns}
NO na dose de 10 µL L ⁻¹ aplicado no início do armazenamento	0,0	4,0
NO na dose de 1 µL L ⁻¹ aplicado a cada 30 dias	0,0	7,9

NO na dose de 2 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias	1,1	8,5
NO na dose de 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias	0,0	8,5
NO na dose de 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início e ao final do armazenamento	1,0	7,0
CV (%)	189,6	64,2

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade. NO: óxido nítrico; CV: coeficiente de variação (%); ns: nenhuma significância

A incidência de frutos rachados na saída da câmara e após mais 7 dias em condições ambiente não houve diferença (Tabela 6).

A degenerescência de polpa é um tipo de distúrbio fisiológico que ocorre devido ao estresse oxidativo que causa danos às membranas celulares e consequente perda de compartimentalização celular. A aplicação de NO acaba reduzindo o estresse oxidativo, induzindo enzimas como SOD, POD e CAT, e suprimindo a enzima LOX (MANJUNATHA et al., 2010). No presente estudo, a aplicação de NO de 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início e ao final do armazenamento apresentou a menor incidência de degenerescência da polpa/ escurecimento de polpa (Tabela 7). O NO atua inibindo a biossíntese de etileno, ocorrendo um menor estresse oxidativo e gerando menores danos nas membranas celulares. Esse tratamento que teve menor escurecimento, na saída da câmara apresentou uma menor produção de etileno e menor respiração, com isso, resultou em menores estresses oxidativo nas células, devida a menor degradação da parede celular ocasionada pela enzima poligalacturonase. Ou seja, o NO atua indiretamente em uma menor atividade da enzima poligalacturonase.

Tabela 7: Incidência de degenerescência da polpa (%) e polpa farinácea (%) de maçãs Baigent, após 8 meses de armazenamento em atmosfera controlada (1,2 O₂ e 2,0 CO₂; T: 1,5±0,2 °C e UR de 94±2%) e após mais 7 dias em condições ambiente (T: 20 °C) em função da aplicação de óxido nítrico (NO) em diferentes doses e momentos do armazenamento. Lages, 2022.

Tratamento	Degenerescência da polpa	Polpa farinácea
Controle	6,52 a	6,52 a
NO na dose de 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início do armazenamento	4,14 a	0,00 b
NO na dose de 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias	4,45 a	1,00 b

NO na dose de 2 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias	7,34 a	0,00 b
NO na dose de 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias	4,17 a	0,00 b
NO na dose de 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início e ao final do armazenamento	0,00 b	0,00 b
CV (%)	24,44	245,03

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade. NO: óxido nítrico; CV: coeficiente de variação (%); ns: nenhuma significância

A maior incidência de polpa farinácea ocorreu no controle, em relação aos tratamentos com NO (Tabela 7). A incidência de polpa farinácea, está associado a frutos de estágio de maturação mais avançado e principalmente clones do grupo Gala. Essa incidência, ocorre por causa das forças de coesão existente entre as paredes celulares que acabam diminuindo, por causa da transformação de pectina insolúvel (protopectina) em pectinas solúveis, com isso, vai ocorrer a separação das células e as células que ficam intactas, acabam gerando uma sensação de textura farinácea (PRASANNA et al., 2007; BOTH et al., 2014; SOARDI. 2019). O tratamento controle, apresentou maior taxa e pico de produção de etileno, isso vai gerar maior transformação de pectina insolúvel em pectinas solúveis, resultando em uma maior degradação da parede celular e conseqüentemente frutos de textura farinácea. Os tratamentos com NO, por terem uma menor produção e pico de etileno, indiretamente induziu a uma menor degradação das protopectina em pectinas solúveis e ocasionou menores degradação da parede celular.

Segundo Brackmann et al. (2017), em maçã 'Galaxy', relataram que a aplicação de NO, como pré-tratamento ao armazenamento em AC, não apresentou benefício na manutenção da qualidade dos frutos após o armazenamento em AC, por causa da maior ocorrência de polpa farinácea e degenerescência de polpa, devido a maior produção de etileno, resultando em uma maior degradação da parede celular dos frutos. Esses resultados diferem daqueles obtidos no presente estudo, sendo que os tratamentos com NO apresentaram uma menor polpa farinácea e degenerescência de polpa. Essa menor incidência de distúrbios, é devido que o NO diminuiu a produção de etileno (Tabela 1), ocorrendo assim menores degradações da parede celular.

4.6 COMPOSTOS FENÓLICOS

O maior conteúdo de compostos fenólicos na polpa de maçãs Baigent, foi encontrado no tratamento NO na dose de $5 \mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início e ao final do armazenamento (Tabela 8). O tratamento controle e o tratamento NO na dose de $10 \mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início do armazenamento apresentaram os menores valores. A menor concentração de compostos fenólicos nesses tratamentos, pode estar associado a maior oxidação dos compostos fenólicos, ocasionados pelas maiores produções de etileno durante e após o armazenamento (Tabela 1), que resultou numa maior produção de ERO's em células, resultando em uma maior atividade da enzima polifenoloxidase. As aplicações mensais de NO podem, possivelmente, inibir indiretamente a atividade da enzima polifenoloxidase resultando em menores oxidações dos compostos fenólicos. Essa inibição indireta pode ser resultado de menores produções de etileno através do efeito inibitório que o NO tem sobre a biossíntese de etileno, com isso, vai gerar um menor estresse oxidativo nas células e resultara em uma menor atividade da enzima polifenoloxidase (CHENG et al., 2009; ZHU et al., 2010; LIU et al., 2011; SAADATIAN et al., 2012). A aplicação de NO na dose de $5 \mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início e ao final do armazenamento, teve um efeito inibitório da enzima polifenoloxidase como resultado de menor produção de etileno na saída da câmara (Tabela 1), resultando em um maior teor de compostos fenólicos e menor escurecimento de polpa de maçãs Baigent (Tabela 7).

Tabela 8: Resultado dos compostos fenólicos (CF; mg EAG.100 g⁻¹ de massa fresca), realizados na polpa de maçãs Baigent, após 8 meses de armazenamento em atmosfera controlada (1,2 O₂ e 2,0 CO₂; T: 1,5±0,2 °C e UR de 94±2%) em função da aplicação de óxido nítrico em diferentes doses e momentos do armazenamento. Lages, 2022.

Tratamento	Compostos fenólicos (mg EAG.100 g ⁻¹)
Controle	21,2 c
NO na dose de $10 \mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início do armazenamento	18,5 c
NO na dose de $1 \mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias	27,6 b

NO na dose de 2 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias	27,8 b
NO na dose de 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias	26,4 b
NO na dose de 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início e ao final do armazenamento	31,7 a
CV (%)	9,4

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade. NO: óxido nítrico; CV: coeficiente de variação (%).

4.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) E PEROXIDASE (POD) E TEOR DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

A atividade enzimática da SOD nos frutos da maçã 'Baigent', apresentou o tratamento controle uma maior atividade em relação aos tratamentos com NO (Tabela 9). Essa maior atividade enzimática no controle, é devido ao maior estresse oxidativo, provocado pela maior produção de etileno, que vai gerar maior produção da enzima SOD para eliminar as EROs (MANJUNATHA et al., 2010). Já que nos tratamentos com NO ocorreu um menor estresse oxidativo, através de coloração menos amarelada (maior h°), menores incidência de distúrbios fisiológicos, menores podridões e menor produção de etileno, isso gerou uma menor atividade enzimática da SOD.

Tabela 9: Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD; $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$), peroxidase (POD; $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$) e teor de peróxido de hidrogênio ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{gr MF}$) em polpa de maçãs Baigent, após 8 meses de armazenamento em atmosfera controlada em função da aplicação de óxido nítrico em diferentes doses e momentos do armazenamento. Lages, 2022.

Tratamento	SOD	POD	H ₂ O ₂
Controle	260,1 a	35,5 b	0,43 a
NO na dose de 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início do armazenamento	195,4 b	62,4 a	0,34 b
NO na dose de 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias	140,3 c	23,0 b	0,34 b
NO na dose de 2 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias	179,1 b	64,3 a	0,27 b
NO na dose de 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias	145,7 c	27,0 b	0,31 b
NO na dose de 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início e ao final do armazenamento	106,5 c	31,0 b	0,28 b
CV (%)	21,0	26,3	16,48

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade. NO: óxido nítrico; CV: coeficiente de variação (%).

O tratamento NO na dose de 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início do armazenamento teve maior atividade enzimática da POD, em relação aos demais tratamentos (Tabela 9). Soardi (2019) e Zhu et al. (2008) observaram que o NO aplicado em baixas concentrações, resulta em maior atividade da SOD, potencializando o sistema de defesa do fruto. Resultados similares foram observados no presente experimento e por Flores et al. (2008) em pêssogo, e Wu et al. (2014) em banana.

A enzima superóxido dismutase (SOD) é a primeira enzima ativada quando a planta ou fruto sofre um estresse fisiológico provocado pelas baixas temperaturas e estresses oxidativos. A SOD é uma metaloenzima, que quando ativada serve como um mensageiro químico, protegendo as células dos radicais reduzindo-os a O_2 e H_2O_2 e formam assim a primeira linha de defesa contra as ERO's antes de serem metabolizada pela catalase (CAT) e peroxidase (POD). A enzima peroxidase (POD), é responsável por desintoxicar espécies reativas de oxigênio nas plantas e frutos, principalmente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 é um indicativo de estresse oxidativo, sendo também importante na transdução de sinais envolvida em vários processos, como a morte celular programada (BEERS e McDOWELL, 2001; MITTLER, 2002; LURIE, 2003; APEL e HIRT, 2004; ZHU et al., 2008; MANJUNATHA et al., 2010; YANG et al., 2011; SOARDI, 2019).

O teor de peróxido de hidrogênio foi maior no tratamento controle (tabela 9), do que as aplicações de NO, que não diferiram entre si. Esse maior teor, é devido que o tratamento controle apresentou maior produção e pico de etileno, maior incidência de podridão interna e polpa farinácea, maior coloração amarelada dos frutos (menor h°) e devido a esses e outros fatores como baixas temperaturas, apresentou maior atividade da enzima SOD devido ao estresse oxidativo, que originou maiores produções de H_2O_2 . Já a enzima POD, não ocorreu esse incremento de produção em relação à enzima SOD, isso ocasionou maiores acúmulos de peróxido de hidrogênio na polpa de maçãs Baigent do tratamento controle (MITTLER, 2002; LURIE, 2003; MANJUNATHA et al., 2010; ZEVALLOS et al., 2014; SOARDI, 2019).

Os tratamentos com NO o teor de peróxido de hidrogênio foi menor, devido, segundo Sun et al. (2021) que o NO, acaba inibindo a extensão do desenvolvimento da morte celular durante a resposta de hipersensibilidade pela S-nitrosação da NADPH oxidase, inibindo assim as ERO's e com isso vai ocorrer menor atividade das enzimas SOD e POD, gerando menores teores de peróxido de hidrogênio na polpa de maçãs Baigent.

5 CONCLUSÃO

Os tratamentos com NO independente da dosagem ou quantidade de aplicações, apresentam menores produções de etileno, incidência de distúrbios fisiológicos e menor coloração amarelada nos frutos (maior ângulo h°).

Os tratamentos com NO nas doses de $2 \mu\text{L L}^{-1}$ aplicado a cada 30 dias e $5 \mu\text{L L}^{-1}$ aplicado no início e ao final do armazenamento, foram as doses e/ou aplicações que tem os melhores efeitos em manter a qualidade de maçãs Baigent armazenadas e após mais 7 dias em prateleira.

6 REFERÊNCIAS

- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, n.123, p.373-399, 2004.
- ARGENTA, L. C. Fisiologia pós-colheita: Maturação, colheita e armazenagem dos frutos. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. 1ed. Epagri, Florianópolis, v.1, p.691-732, 2002.
- ASGHARI, M., AGHADAM, M.S. **Impact of salicylic acid on post-harvest**, 2010.
- BEERS, E. P., MCDOWELL, J. M. Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. **Current opinion in plant biology**, Australia, v.4, n.6, p.561-567, 2001.
- BLEICHER, J. História da macieira. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. 1ed. Epagri, Florianópolis, v.1, p.29-36, 2002.
- BONETI, J. I. S., CESA, J. D., PETRI, J. L., BLEICHER, J. Evolução da cultura da macieira. In EPAGRI. **A cultura da macieira**. 1ed. Epagri, Florianópolis, v.1, p.37-57, 2002.
- BOTH, V., BRACKMANN, A., THEWES, F. R., DE FREITAS FERREIRA, D., WAGNER, R. Effect of storage under extremely low oxygen on the volatile composition of 'Royal Gala' apples. **Food Chemistry**, London, v.156, p.50-57, 2014.
- BOTH, V., THEWES, F.R., BRACKMANN, A., ANESE, R. O., FERREIRA, D, F., WAGNER, R. **Effects of dynamic controlled atmosphere by respiratory quotient on some quality parameters and volatile profile of 'Royal Gala' apple after long-term storage**, Food Chemistry (2016).
- BRACKMANN, A., LUDWIG, V., THEWES, F. R., ANESE, R. O., SCHULTZ, E. E., BERGETTI, M. R. P. Ethanol and nitric oxide in quality maintenance of 'Galaxy' apples stored under controlled atmosphere. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s.l.], v.39, n.5, p.1-9, 18 dez. 2017.
- BRACKMANN, A., PINTO, J., NEUWALD, D., GIEHL, R., & SESTARI, I. Temperatura e otimização da atmosfera controlada para o armazenamento de maçã 'Gala'. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.11, n.4, p.505- 508, 2005.

- CAMILO, A. P.; DERNARDI, F. Cultivares: descrição e comportamento no Sul do Brasil. In: **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2006. p.113-168.
- CHENG, G., YANG, E., LU, W., JIA, Y., JIANG, Y., & DUAN, X. Effect of nitric oxide on ethylene synthesis and softening of banana fruit slice during ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.5799-804, 2009.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2.ed. Lavras: FAEPE, p.785, 2005.
- DEL LONGO, O. T. et al. Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant and Cell Physiology**, Córdoba v. 34, n. 7, p. 1023-1028, 1993.
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Acesso em 05. Maio. 2020.
- FERNANDES, R. C. **Qualidade de maçãs ‘Cripps Pink’ armazenadas sob refrigeração com 1-MCP e em pressões parciais baixas, ultrabaixas e extremamente baixas de O₂**. 86 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal – Área: Biologia e Tecnologia Pós-Colheita) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2020.
- FERRANTE, A.; FRANCINI, A. Ethylene and leaf senescence. In: **KHAN, N. A. Ethylene action in plants**. New York: Springer, p.51-67, 2006.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR – programa estatístico**. Versão 5.3 (Build 75). Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2010.
- FIORAVANÇO, J. C., de ALMEIDA, G. K., CZERMAINSKI, A., & de OLIVEIRA, P. R. D. Avaliação da cultivar de macieira Pink Lady® em Vacaria, RS. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, Embrapa Uva e Vinho. **Comunicado Técnico**, v.112, p.8, 2011.
- FIORAVANÇO, J. C., CZERMAINSKI, A., & de OLIVEIRA, P. R. D. Avaliação da Cultivar de Macieira Baigent (Brookfield®) em Vacaria, RS. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, Embrapa Uva e Vinho. **Comunicado Técnico**, v.140, p.8, 2013.
- FIORAVANÇO, J. C., GIRARDI, C. L., CZERMAINSKI, A. B. C., SILVA, G. A., NACHTIGALL, G. R.; OLIVEIRA, P. R. D. **Cultura da macieira no Rio Grande do Sul: análise situacional e descrição varietal**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010. 60 p. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 71).

- FLORES FB., SANCHEZ-BEL P., VALDENEGRO M., ROMOJARO F., MARTINEZ- MADRID MC., EGEA MI. **Effects of a pretreatment with nitric oxide on peach (*Prunus persica* L.) storage at room temperature.** Eur Food Res Technol v.227, p1599, 2008.
- FRANCISCO, F. B., PALOMA, S., MONIKA, V., FELIX, R., ISABEL, E. M. **Effects of a pretreatment with nitric oxide on peach (*Prunus persica* L.) storage at room temperature.** Eur. Food. Res. Technol. v.227, p.1599–1611, 2008.
- FURLAN, C. R. C., DANTAS, A. C. D. M., DENARDI, F., BECKER, W. F., & GIRARDI, C. L., BRACKMANN, A., PARUSSOLO, A. Capítulo 14 Colheita e Armazenamento. In: **Frutas do Brasil Maçã Produção.** P. 148-155, 2004.
- GUO, Q., WU, B., CHEN, W., ZHANG, Y., WANG, J., & LI, X. Effects of nitric oxide treatment on the cell wall softening related enzymes and several hormones of papaya fruit during storage. **Food Science and Technology International**, 20, 309-317, 2013. DOI: 10.1177/1082013213484919.
- HAN, S., et al. Effect of nitric oxide on sugar metabolism in peach fruit (cv. Xiahui 6) during cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 142, p. 72-80, 2018.
- HAYAT, S., HASAN, S. A., MORI, M., FARIDUDDIN, Q., & AHMAD, A. Nitric oxide: chemistry, biosynthesis and physiological role. In: HAYAT, S. et al. (Eds.). **Nitric oxide in plant physiology.** Ames: Wiley-Blackwell, p.1-16, 2010.
- HENDGES, M. V., STEFFENS, C. A., AMARANTE, C. V. T., NEUWALD, D. A., BRACKMANN, A. 'Packham's triumph' pear response to 1- methylcyclopropene and nitric oxide treatments. **Revista Caatinga**, v.29, n.2, p.283-289, 2016.
- HODGES, D.M. **Postharvest oxidative stress in horticultural crops.** New York Food Production Press. p: 284, 2003.
- JAYARAJAN, S., SHARMA, R. R. Impact of nitric oxide on shelf life and quality of nectarine (*Prunus persica* var. nucipersica). **Acta Physiologiae Plantarum**, 40(12), p.1-9, 2018.
- KANG, R., ZHANG, L., JIANG, L., Yu, M., Ma, R., Yu, Z. Effect of postharvest nitric oxide treatment on the proteome of peach fruit during ripening. **Postharvest Biol Technol** v.112, p.277–289, 2015.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant physiology**, Oxford, v. 57, n. 2, p.315-319, 1976.

- KERBAUY, G.B. Fisiologia Vegetal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- KRETZSCHMAR, A, A., RUFATO, L. **Maçãs: O que você ainda não sabe sobre a atividade.** Revista Campo & Negócios. 2020 <<https://revistacampoenegocios.com.br/macac-o-que-voce-ainda-nao-sabe-sobre-a-atividade/>>
- LAI, T., WANG, Y., LI, B., QIN, G., & TIAN, S. Defense responses of tomato fruit to exogenous nitric oxide during postharvest storage. **Postharvest Biology and Technology**, v.62, p.127-132, 2011.
- LAI, T., Y. WANG, B. Li, G. Qin, S. Tian. Defense responses of tomato fruit to exogenous nitric oxide during postharvest storage. **Postharvest Biology and Technology**, 62: 127- 132, 2001.
- LESHEM, Y. Y. **Nitric Oxide in Plants: Occurrence, Function and Use.** Kluwer Academic Publishers, Dordrech, The Netherlands, 2000.
- LESHEM, Y. Y., PINCHASOV, Y. **Photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria ananassa* (Duch.) and avocados *Persea americana* (Mill.).** J. Exp. Bot. v.51, p. 1471-1473, 2000.
- LESHEM, Y. Y., WILLS, R. B. H., KU, V. V. V. Evidence for the function of the free radical gas nitric oxide (NO) as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. **Plant Physiol. Biochem**, p.825–833, 1998.
- LIU, Li-qin; YU, D. O. N. G., GUAN, Jun-feng. Effects of nitric oxide on the quality and pectin metabolism of Yali pears during cold storage. **Agricultural Sciences in China**, v. 10, n. 7, p. 1125-1133, 2011.
- LIU, M et al. Comprehensive profiling of ethylene response factor expression identifies ripening-associated ERF genes and their link to key regulators of fruit ripening in tomato. **Plant Physiology**, v. 170, n. 3, p. 1732-1744, 2016.
- Liu, M., SONG, W., ZHU, S., ZHOU, J. Effects of nitric oxide and exogenous ethylene treatments on ethylene biosynthesis in Feicheng peach. *Agric. Sci. China*, p.290–295, 2007.
- LORETO, F., VELIKOVA, V. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. **Plant Physiology**, v.127, p. 1781-1787, 2001.

- LURIE, S. Antioxidants. In: HODGES, D.M. **Postharvest oxidative stress in horticultural crops**. New York: Food Products Press, p.131-150, 2003.
- MACHADO, M, R. **Mudanças físico-químicas, fisiológicas e bioquímicas em mamão com a aplicação de óxido nítrico**. Campinas, 2021.
- MANJUNATHA, G.; LOKESH, V.; NEELWARNE, B. Nitric oxide in fruit ripening: trends and opportunities. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v.28, n.4, p.489-499, 2010.
- MANJUNATHA, Girigowda et al. Nitric oxide counters ethylene effects on ripening fruits. **Plant signaling & behavior**, v. 7, n. 4, p. 476-483, 2012.
- MITTLER, R. et al. Reactive oxygen gene network of plant. **Trends in Plant Science**, v.9, p.490-498, 2004.
- PETRI, J. L., SEZERINO, A. A., MARTIN, M. S. **ESTADO ATUAL DA CULTURA DA MACIEIRA**. Epagri/Estação Experimental de Caçador, 2016.
- PRASANNA, V.; PRABHA, T. N.; THARANATHAN, R. N. Fruit ripening phenomena-an overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.47, n.1, p.1-19, 2007.
- ROESLER, R., MALTA, L. G., CARRASCO, L. C., HOLANDA, R. B., SOUSA, C. A. S., & PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.1, p.53-60, 2007.
- RUDELL, David R.; MATTHEIS, James P. Nitric oxide and nitrite treatments reduce ethylene evolution from apple fruit disks. **HortScience**, v. 41, n. 6, p. 1462-1465, 2006.
- RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2007a.
- SAADATIAN, M., AHMADIYAN, S., AKBARI, M., & BALOUCHI, Z. "Effects of pretreatment with nitric oxide on kiwifruit storage at low temperature." **Advances in Environmental Biology**, June 2012, pp. 1902+. Gale Academic OneFile, link.gale.com/apps/doc/A304466589/AONE?u=anon~323b2d00&sid=googleScholar&xid=86000027. Accessed 24 Jan. 2022.
- SHARMA, S., SHARMA, R. R. Nitric oxide inhibits activities of PAL and PME enzymes and reduces chilling injury in 'Santa Rosa' Japanese plum (*Prunus salicina* Lindell). **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 292-297, 2015.

SING, S. P., SING, Z., SWINNY, E. E. Postharvest nitric oxide fumigation delays fruit ripening and alleviates chilling injury during cold storage of Japanese plums (*Prunus salicina* Lindell). **Postharvest Biology and Technology** v.53, p.101–108, 2009.

SIS, S. A. et al. Effect of nitric oxide on ethylene biosynthesis and antioxidant enzymes on Iranian peach (*Prunus persica* cv. Anjiri). **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v.10, n.2, p.125-129, 2012.

SOARDI, K. **Qualidade de maçãs ‘Cripps Pink’ armazenadas em atmosfera controlada em função do 1-mcp, vapor de etanol e óxido nítrico**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal – Área de Fisiologia Pós-Colheita) - Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2019.

SOETHE, C. **Maturação, compostos bioativos e atividade antioxidante de maçãs ‘Baigent’ em função da forma de aplicação de aminoetoxivinilglicina e etefom e da data de colheita**. 2018. 115 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal – Área: Biologia e Tecnologia Pós-Colheita) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2018.

SOZZI, G. O., TRINCHERO, G. D., FRASCHINA, A. A. Delayed ripening of ‘Bartlett’ pears treated with nitric oxide, **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, 78:6, p.899-903, 2003.

STEFFENS, C. A., MIQUELOTO, T., FERNANDES, R., DEMARI, C., ANAMI, J., LUGARESI, A. and AMARANTE, C. **Treatment with nitric oxide preserves the quality of cold stored ‘Cripps Pink’ apples**. *Bragantia*, 80, e5021, 2021a. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20200494>.

STEFFENS, C. A., SANTANA, G.R.O., AMARANTE, C.V.T.d., ANTONOVVISKI, J.L., MIQUELOTO, T., ANAMI, JÉ. MAYUMI., FENILI, C.L., Treatment with nitric oxide in controlled atmosphere storage to preserve the quality of ‘Laetitia’ plums, **LWT - Food Science and Technology** (2021b), doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.113033>.

SUN, C., ZHANG, Y., LIU, L., LIU, X., LI, B., JIN, C., & LIN, X. Molecular functions of nitric oxide and its potential applications in horticultural crops *Horticulture Research*, 2021.

- SUN, Z.; LI, Y.; ZHOU, J.; ZHU, S. Effects of exogenous nitric oxide on contents of soluble sugars and related enzyme activities in 'Feicheng' peach fruit. **Journal of Science Food and Agriculture**, Malden, v.91, n.10, p.1795-1800, 2011.
- TRAN, T. T. L., AIAMLA-OR, S., SRILAONG, V., JITAREERAT, P., WONGS-AREE, C., UTHAIRATANAKIJ, A. Application of nitric oxide to extend the shelf life of mango fruit. In: **II Southeast Asia Symposium on Quality Management in Postharvest Systems 1088**. 2013. p. 97-102.
- TSAO, R., YANG, R., YOUNG, J. C., & ZHU, H. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, p. 6347–6353, 2003.
- WANG, Y., LUO, Z., DU, R., LIU, Y., YING, T., MAO, L. Effect of nitric oxide on antioxidative response and proline metabolism in banana during cold storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 37, p. 8880-8887, 2013.
- WU, B., GUO, Q., LI, Q., HA, Y., LI, X., & CHEN, W. Impact of postharvest nitric oxide treatment on antioxidant enzymes and related genes in banana fruit in response to chilling tolerance. **Postharvest Biol Technol** v.92, p.157–163, 2014.
- YANG H., WU F., CHENG J. Reduced chilling injury in cucumber by nitric oxide and the antioxidant response. **Food Chem** v.127, p.1237–1242, 2011.
- ZAHARAH, S. S.; SINGH, Zora. Postharvest nitric oxide fumigation alleviates chilling injury, delays fruit ripening and maintains quality in cold-stored 'Kensington Pride'mango. **Postharvest Biology and Technology**, v. 60, n. 3, p. 202-210, 2011.
- ZEVALLOS, C, L., JACOBO-VELÁZQUEZ, D. A., PECH, J. C., KOIWA, H. 12 Signaling Molecules Involved in the Postharvest Stress Response of Plants. **Handbook of plant and crop physiology**. Third Edition Volume 20144886. p. 259–276, 2014.
- ZHU S, ZHOU J. Efeito do óxido nítrico na produção de etileno em frutos de morango durante o armazenamento. **Food Chemmistry**, v.100, p.1517-1522, 2007.
- ZHU, S., LIU, M., ZHOU, J. Inhibition by nitric oxide of ethylene biosynthesis and lipoxygenase activity in peach fruit during storage. **Postharvest Biol. Technol.** P.41–48, 2006.

ZHU, S., SUN, L., LIU, M., ZHOU, J. Effect of nitric oxide on reactive oxygen species and antioxidant enzymes in kiwi fruit during storage. *J. Sci. Food Agric*, p.2324-2331, 2008.

ZHU, S., SUN, L., ZHOU, J. Effects of different nitric oxide application on quality of kiwifruit during 20 C storage. *International journal of food science & technology*, v. 45, n. 2, p. 245-251, 2010.

ZUCCARELLI, R et al. Multifaceted roles of nitric oxide in tomato fruit ripening: NO-induced metabolic rewiring and consequences for fruit quality traits. *Journal of Experimental Botany*, v. 72, n. 3, p. 941-958, 2021.