Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Estudos anatômicos e fisiológicos de frutos de caquizeiro (*Diospyros kaki* L.) quanto ao acúmulo de taninos e aos processos de destanização

Magda Andréia Tessmer

Tese apresentada para obtenção de título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2014

Magda Andréia Tessmer
Engenheira Agrônoma

Estudos anatômicos e fisiológicos de frutos de caquizeiro (*Diospyros kaki* L.) quanto ao acúmulo de taninos e aos processos de destanização

Orientadora:
Profa. Dra. **BEATRIZ APPEZZATO DA GLÓRIA**

Tese apresentada para obtenção de título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Tessmer, Magda Andréia
Estudos anatômicos e fisiológicos de frutos de caquizeiro (*Diospyros kaki* L.) quanto ao acúmulo de taninos e aos processos de destanização / Magda Andréia Tessmer. - - Piracicaba, 2014.
113 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Adstringência 2. Anatomia 3. Armazenamento refrigerado 4. Células taníferas 5. Desenvolvimento 6. *Diospyros kaki* L. 7. Pectinas 8. Taninos I. Título

CDD 634.451
T339e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte -O autor"

Aos que me serviram de exemplo!

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder saúde e por ter me iluminado durante todas as etapas desta caminhada e possibilitar mais esta vitória.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado - Processo: 2010/16392-7 e Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) - Processo: 2012/05059-0 e apoio financeiro para a realização da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de seis e quatro meses de bolsa no início do doutorado, respectivamente.

À Profa Dra. Beatriz Appezzato da Glória pela orientação durante o doutorado, pela amizade e exemplo profissional como pesquisadora e docente.

Ao Prof. Dr. Ricardo Alfredo Kluge pela co-orientação, amizade e momentos de confraternização.

À Dra. Alejandra Salvador Pérez por me orientar durante o Estágio de Pesquisa no Exterior realizado no Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Valencia, Espanha.

À Marli Kasue Misaki Soares, técnica do Laboratório de Anatomia Vegetal pelo convívio, pela amizade e pela prontidão em ajudar sempre.

Aos colegas de Laboratório de Anatomia Vegetal, Aline Bombo, Arinawa, João Paulo, Michelli, Makeli, Tuane e estagiários pela amizade, companheirismo, momentos de alegrias e apoio nas dificuldades.

Aos integrantes do laboratório de Fisiologia e Bioquímica Pós-colheita: Natalia, Jaqueline, Cléo, Luciane, Juliana e estagiários pelo auxílio nos trabalhos e pelo ambiente de alegria. Em especial agradeço a Mariana Ferraz Monteiro pelo auxílio nas coletas de caquis e à Fabiana Fumi Cerqueira Sasaki pelo auxílio nas análises.

À Prof. Dra. Isabel Pérez Munuera pela colaboração nas análises realizadas no Instituto de Tecnologia de Alimentos da Universidade Politécnica, Valencia, Espanha. Aos colegas de laboratório de Tecnologia pós-colheita que convivi e que me auxiliaram no trabalho: Alicia, Aurora, Cristina, Julia, Pedro, Pilar e Rebeca. ¡Muchas gracias!

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", aos professores que contribuíram na minha formação e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pela

oportunidade de realizar o doutorado. Aos colaboradores do Departamento de Ciências Biológicas e a Vanderlei A. Miranda pelo auxílio nas viagens de coleta.

À Maria Solizete Granziol Silva, secretária do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela amizade, pela paciência e por estar sempre disposta a ajudar os alunos.

Aos colegas de pós-graduação, que se tornaram verdadeiros amigos, que dividiram alegrias, dificuldades e vitórias. Com carinho ao Mateus Donegá, Rogerio Lorençoni, Rafaella Felipe, Vanessa Caron e Ana Elisa de Godoy.

Aos produtores de caqui de Mogi das Cruzes que gentilmente forneceram materiais para a pesquisa e à Associação Frutícola do Alto Tiete – AFRUT pela carta de apoio para este projeto de pesquisa.

Ao Felipe Doná de Siqueira por seu amor incondicional, pelo apoio e companheirismo.

Aos meus pais, Udo e Ilma (*in memorian*) pela vida e aos demais familiares.

À Jackeline e Marcela por dividirem comigo um lar e fazerem parte da minha família. A todas as moradoras que passaram por este lar: Alexandra, Cristiane, Fernanda, Juliana, Mariana e Maria Izabel. Obrigada pelo carinho, amizade e apoio em todos os momentos.

Aos profissionais e amigos que acreditaram em mim e me incentivaram a seguir na pós-graduação: Adão José Vital da Costa, Lucimara Rogéria Antoniolli e Marcos Botton. Obrigada pelo exemplo.

A todos que de uma forma ou de outra, contribuíram na realização deste trabalho.

Muito obrigada!

EPÍGRAFE

Na vida, não vale tanto o
que temos, nem tanto importa o que somos.
Vale o que realizamos com aquilo que
possuímos e, acima de tudo,
importa o que fazemos de nós.

Francisco Cândido Xavier

SUMÁRIO

RESUMO 11
ABSTRACT 13
1 INTRODUÇÃO 15
Referências 24
2 O ACÚMULO DE TANINOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS DE CAQUIZEIROS „GIOMBO' E „FUYU' 31
Resumo 31
Abstract 31
2.1 Introdução 32
2.2 Material e Métodos 33
2.3 Resultados 36
2.3.1 Discussão 42
2.4 Conclusões 44
Referências 44
3 O PROCESSO DE MATURAÇÃO DE FRUTOS DE CAQUIZEIROS ADSTRIGENTES E NÃO ADSTRINGENTES E SUA RELAÇÃO COM AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E ESTRUTURAIS 47
Resumo 47
Abstract 47
3.1 Introdução 48
3.2 Material e métodos 49
3.3 Resultados e discussão 52
3.4 Conclusões 59
Referências 60
4 DESTANIZAÇÃO DE FRUTOS DE CAQUIZEIROS „GIOMBO' EM DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO AO ETANOL 63
Resumo 63
Abstract 63
4.1 Introdução 64
4.2 Material e métodos 65
4.3 Resultados 67

4.3.1 Discussão 70
4.4 Conclusões 71
Referências 71
5 INFLUÊNCIA DAS PECTINAS NA REMOÇÃO DA ADSTRINGÊNCIA DE CAQUIS ‘GIOMBO' DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO 75
Resumo 75
Abstract 75
5.1 Introdução 76
5.2 Material e métodos 77
5.3 Resultados e discussão 79
5.4 Conclusões 85
Referências 86
6 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO NA QUALIDADE DE CAQUIS „GIOMBO’ 89
Resumo 89
Abstract 89
6.1 Introdução 90
6.2 Material e métodos 91
6.3 Resultados e discussão 94
6.4 Conclusões 101
Referências 101
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS 105
ANEXOS 107

RESUMO

Estudos anatômicos e fisiológicos de frutos de caquizeiro (*Diospyros kaki* L.) quanto ao acúmulo de taninos e aos processos de destanização

O presente trabalho visou analisar comparativamente as alterações fisiológicas e estruturais de caquis adstringentes (PVA) e não adstringentes (PCNA) desde o início do desenvolvimento até a maturação avançada. Além disso, na pós-colheita, foram realizados tratamentos de destanização e testadas diferentes condições de armazenamento para „Giombo'. Este trabalho está sendo apresentado em seis capítulos, sendo que os últimos cinco capítulos referem-se aos experimentos realizados entre 2010 a 2013. No capítulo 2 é apresentado o desenvolvimento de caquis „Giombo' (PVA) e „Fuyu' (PCNA). Foi possível observar que a diferenciação das células taníferas e o processo de acúmulo de taninos no vacúolo não variou entre as cultivares, porém houve diferença significativa em relação à densidade de células taníferas e aos teores de taninos solúveis. O capítulo 3 apresenta o estudo comparativo de sete estádios de maturação de caquis „Giombo' e „Rojo Brillante' (PVA) e „Fuyu' e „Hana Fuyu' (PCNA). A redução da firmeza do mesocarpo de caquis de ambos os grupos está relacionada ao avanço da maturação e não à perda natural da adstringência. A capacidade antioxidante e o teor de sólidos solúveis em caquis dos dois grupos indicam que pode haver relação com a perda natural da adstringência, pois houve decréscimo somente nas cultivares PVA durante a maturação. Os taninos delimitados às células taníferas no teste com vanilina clorídrica, e o conteúdo do vacúolo com aspecto alveolar observado ao Cryo-SEM podem estar relacionados à polimerização dos taninos durante o amadurecimento dos frutos. No experimento descrito no capítulo 4, caquis „Giombo' de fim e início de safra foram submetidos a diferentes tempos de exposição ao etanol (1,70 mL Kg^{-1}). No fim da safra os frutos obtiveram índice de adstringência e teores de taninos solúveis adequados para consumo em 24 horas e, no início da safra, em 36 horas. O capítulo 5 discute a influência das pectinas na remoção da adstringência de caquis 'Giombo' sob o armazenamento refrigerado a 5˚C. Os resultados indicaram que não houve interação das pectinas com os taninos solúveis na remoção da adstringência, pois mesmo com a redução da firmeza de polpa e aumento da solubilização das pectinas, o índice de adstringência e o teor de taninos solúveis permaneceram elevados nos frutos não destanizados. No capítulo 6 é apresentada a influência das temperaturas (1, 5 e 10˚C) de armazenamento na qualidade de caquis „Giombo' destanizados tratados ou não com 1-MCP. A qualidade foi melhor preservada quando os frutos foram destanizados e tratados com 1-MCP e armazenados a 1ºC por até 35 dias. Os frutos que foram apenas destanizados tiveram a estrutura celular do mesocarpo e a firmeza mais alteradas em todas as temperaturas analisadas. Provavelmente, a temperatura de 5ºC torna os frutos mais susceptíveis a danos por frio com redução drástica da firmeza e alterações estruturais.

Palavras-chave: Adstringência; Anatomia; Armazenamento refrigerado; Células taníferas; Desenvolvimento; *Diospyros kaki* L.; Pectinas; Taninos

ABSTRACT

Anatomical and physiological studies of persimmon fruits (*Diospyros kaki* L.) on the tannin accumulation and deastringency processes

This study purpose was the comparison between the physiological and structural changes of astringent persimmons (PVA) and non-astringent (PCNA) from the start of development to advanced maturation. Furthermore, postharvest treatments of deastringency were made and tested for different storage conditions at „Giombo'. This work is presented in six Chapters, and the last five chapters refer to experiments conducted between 2010 and 2013. Chapter 2 describes the development of persimmons „Giombo' (PVA) and „Fuyu' (PCNA). It was observed that the differentiation of tannin cells and the accumulation process of tannin in vacuole did not vary among cultivars, but there was a significant difference in the density of tannin cells and soluble tannins. Chapter 3 presents the comparative study of seven stages of ripening persimmons „Giombo' and „Rojo Brillante' (PVA), and „Fuyu' and „Hana Fuyu' (PCNA). Reduction of mesocarp firmness of both groups of persimmons is related to maturation advance and not due to natural loss of astringency. Antioxidant capacity and total soluble solids of persimmons from both groups indicate a possible relation with the natural loss of astringency, once only PVA cultivars showed astringency decrease during ripening. The tannins delimited in tannin cells for the test with vanillin hydrochloric, and the contents of the vacuole with alveolus aspect observed by Cryo-SEM may be related to tannin polymerization during fruit ripening. In the experiment described in Chapter 4, persimmons „Giombo' from late and early harvest were submitted to different periods of exposure to ethanol (1.70 mL kg^{-1}). Fruits obtained at late harvest presented index astringency and soluble tannin content suitable for consumption within 24 hours, while early harvest in 36 hours. Chapter 5 regards to the influence of pectins in astringency removal of persimmons „Giombo' under cold storage at 5˚C. Results indicated no interaction of pectins with soluble tannins astringency removal, because even with the reduction of flesh firmness and increased solubilization of pectins, the index of astringency and soluble tannins remained high in fruits not deastringenced. The influence of temperature (1, 5 and 10˚C) storage on the quality of persimmons „Giombo' treated or not with 1-MCP is presented in Chapter 6. Better quality was observed when the fruits were deastringenced, treated with 1-MCP and stored at 1°C for up to 35 days. Fruits that had been only deastringenced had bigger changes on their mesocarp cellular structure and firmness at all temperatures experimented. The temperature of 5°C may be responsible for making fruitsmore susceptible to chilling injury with structural changes and a drastic reduction of the firmness.

Keywords: Astringency, Anatomy, Cold storage, Development, *Diospyros kaki* L., Pectins, Tannins, Tannin cells

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo com produção de 43.892.946 toneladas (FAO, 2013), fato que se deve as condições climáticas favoráveis que permitem o cultivo de espécies frutíferas tropicais, subtropicais e temperadas. Segundo dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE/POF 2008-2009), o consumo de frutas no Brasil foi de 28,86 kg/pessoa/ano, embora venha ocorrendo um aumento nos últimos anos, o consumo ainda é baixo comparado aos países europeus. Em razão da ampliação da classe média e aumento do poder aquisitivo da população, o Brasil apresenta ampla capacidade de crescimento no mercado interno de frutas.

Dentre as frutas que merecem destaque no mercado nacional, encontra-se o caqui, o qual apresenta grande importância para o setor de frutas no Brasil (FACHINELLO et al., 2011). Mundialmente, os principais produtores de caquis são: China (2.533.899 toneladas), Coréia do Sul (430.521 toneladas), Japão (266.600 toneladas) e Brasil (173.297 toneladas), classificando-se como quarto maior produtor (FAO, 2011). Entre os estados brasileiros, São Paulo é o maior produtor com 77.649 toneladas, Rio Grande do Sul em segundo com 29.868 toneladas e o Paraná em terceiro com 23.292 toneladas e em torno de 33.000 toneladas nas partes altas dos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo, totalizando em 164.495 toneladas de caquis em área plantada de 8.652 hectares na safra de 2010 (IBGE, 2010).

Se, por um lado, o caquizeiro ainda não se encontra em uma posição destacada em termos de produção e área cultivada, por outro, ele se sobressai como a frutífera que mais cresceu nos últimos quinze anos, de 1991 a 2005 sua produção passou de 47.662 toneladas para 150.000 toneladas (crescimento de 214,7%) e sua área colhida evoluiu de 4.059 hectares para 8.500 hectares (crescimento de 109,4%) (FIORAVANÇO; PAIVA, 2007), com produtividade por área de 19.030 kg/ha, a maior quando comparada a outros produtores mundiais (MARTÍNEZ-CALVO et al., 2012).

Além do mercado consumidor interno, existe espaço para exportações brasileiras, já que o período de safra no Brasil (fevereiro a junho) tem a vantagem de atender a um período de carência do produto no mercado internacional (ROCHA; BENATO, 2006; CAMARGO FILHO et al., 2003).

Estes dados indicam o grande potencial do país na produção de caquis e uma alternativa para os produtores rurais, pois o cultivo do caquizeiro vem se constituindo numa importante

atividade agrícola para pequenos produtores. No entanto, ainda são necessárias melhorias na pós-colheita deste fruto, como tratamentos de destanização adequados para cultivares adstringentes, adoção de técnicas para conservação da qualidade, controle da maturação e deterioração dos frutos, como o armazenamento refrigerado. Estas estratégias são essenciais para a expansão do período de oferta e redução da sazonalidade dos preços do caqui.

1.2 Origem, classificação e aspectos botânicos do caquizeiro

O caquizeiro pertence à família Ebenaceae e ao gênero *Diospyrus*, o qual apresenta várias espécies de importância comercial e diferentes finalidades, como espécies para fins madeireiros (*Diospyrus ebenum*), paisagísticos (*Diospyrus incostans* e *Diospyrus rhombifolia*), extração de taninos (*Diospyrus oleifera*) e frutíferas (*Diopyros kaki*), ao qual pertence às cultivares comerciais, denominada de alimento dos deuses (dios=Deus, pyros=alimento) (NISSAN; NAMBOUR, 2011). Ainda, as espécies *Diospyros lotus e Diospyrus virginiana* são utilizadas como porta enxerto para cultivares comerciais.

Tem como centro de origem as montanhas centrais da China, onde mais de 2.000 cultivares diferentes são plantadas a milhares de anos, as quais se espalharam pelo mundo devido à sua ampla adaptação climática, sendo possível o seu cultivo em climas temperados e tropicais (SIMÃO, 1998). No Brasil, o caquizeiro foi introduzido em São Paulo no final do século XIX, mas somente a partir de 1920, com a chegada de fruticultores japoneses, é que foram introduzidas tecnologias de produção e variedades que se adaptaram muito bem ao clima do Brasil (MARTINS; PEREIRA, 1989).

O caquizeiro é uma espécie caducifólia, portanto necessita de um período de repouso para completar seu ciclo anual, e com exigência de horas de frio específicas para cada cultivar. As flores surgem logo após a brotação, que ocorre normalmente em agosto e setembro, nas axilas das folhas da base dos ramos novos, podendo ser estaminadas (masculinas), pistiladas (femininas) ou monoclinas.

As flores estaminadas são facilmente identificadas, pois são pequenas e aparecem em cachos (de três flores), tendo estames normais em número par de 14 a 24 com pólen viável e ovário atrofiado. As flores pistiladas aparecem sozinhas, são maiores e têm cálice, corola e ovário bastante desenvolvidos, sendo que os estames são atrofiados. As flores monoclinas são pouco comuns, ocorrendo geralmente associadas às estaminadas, tendo características intermediárias entre as estaminadas e as pistiladas (TEIXEIRA, 2006; YAKUSHIJI; NAKATSUKA, 2007). Geralmente as cultivares comerciais apresentam somente flores

pistiladas, com tendência à produção de frutos por partenocarpia vegetativa, não há estímulo à polinização, porém, há formação do fruto. Os óvulos se degeneram e desaparecem, sem formação de sementes (BELLÉ, 2008).

O fruto do caquizeiro é uma baga com formato e tamanho bastante variáveis entre as cultivares, com massa, normalmente, entre 250 a 350g e quando polinizados, os frutos normais podem conter até oito sementes. Quando se deseja frutos com sementes são introduzidas cultivares polinizadoras no plantio dos pomares, com recomendação de uma planta de flores estaminadas para seis plantas de flores pistiladas (TEIXEIRA, 2006). Em pomares já estabelecidos sem plantas polinizadoras, faz-se a sobreenxertia da cultivar polinizadora em cada planta da variedade comercial, para a formação de uma pequena copa com flores estaminadas.

Como resposta à polinização ou não das flores, à mudança na cor da polpa e à persistência da adstringência nos frutos, as cultivares são classificadas nos seguintes tipos: Polinização Constante (PC), os frutos não apresentam mudança na coloração da polpa em função da polinização e Polinização Variável (PV), em que os frutos apresentam polpa clara, quando partenocárpicos, e escura, quando fecundados. Ambos são divididos em adstringentes (A) e não adstringentes (NA) com base na presença ou ausência de adstringência dos frutos na maturidade (MARTINS; PEREIRA, 1989; SUGIURA, 1983).

Os caquizeiros cultivados são assim classificados: PCA - „Taubaté', „Hachiya', „Pomelo' e 'Rubi' são conhecidos como caqui moles; PCNA - „Fuyu', „Jiro' e „Hana Fuyu' são chamados de caquis duros, pois podem ser consumidos ainda com a polpa firme; PVA - „Aizumishirazu', „Rama Forte' e „Giombo' que necessitam ser destanizados para consumo e PVNA - „Zenjimaru', „Shogatsu', e „Mizushima' e são conhecidos como chocolate (ITO, 1971). Atualmente, as cultivares mais expressivas em produção no Brasil são „Rama Forte' e „Giombo' (PVA) e „Fuyu' (PCNA), sendo que as duas primeiras cultivares necessitam de remoção da adstringência e „Giombo' apresenta colheita mais tardia que as demais.

O mecanismo de perda da adstringência em frutos de cultivares de PCNA durante o desenvolvimento na árvore requer considerações. Primeiramente, a produção de acetaldeído pelas sementes é nula na maioria das cultivares PCNA e, em segundo lugar, a perda da adstringência ocorre independentemente dos frutos apresentarem sementes ou desenvolvimento por partenocarpia. Embora alguns autores mencionem que a principal causa da perda natural da adstringência em frutos PCNA seja a interrupção precoce do desenvolvimento das células taníferas no pericarpo e, consequentemente a diluição dos

taninos na polpa durante o crescimento (YONEMORI et al., 1997; YONEMORI; MATSUSHIMA, 1985), o mecanismo de perda da adstringência neste grupo ainda não foi esclarecido completamente (BESADA et al., 2012). Em frutos de cultivares PCA, não há produção de compostos voláteis (acetaldeído) pelas sementes ou esta produção é praticamente nula, fazendo com que os frutos permaneçam adstringentes até a colheita mesmo que apresentem muitas sementes (NISSAN; NAMBOUR, 2011; SUGIURA; TOMANA, 1983).

No grupo PVNA, ocorre a produção de uma grande quantidade de compostos orgânicos voláteis pelas sementes durante os estágios intermediários de desenvolvimento levando à coagulação dos taninos e, consequentemente, à perda da adstringência tornando a polpa escura (SUGIURA et al., 1979). Nos frutos PVA com ausência total de sementes persistem altos índices de taninos solúveis até a maturação.

1.3 Aspectos fisiológicos, maturação e armazenamento de caquis

Frutos de caquizeiros apresentam curva de crescimento sigmoidal dupla que compreende dois períodos de crescimento rápido (fases I e III), separados por um período de crescimento lento (fase II). Na primeira fase, o crescimento corresponde à abundante divisão celular no mesocarpo, na segunda à paralização da divisão celular e crescimento estável e, na terceira, ao alongamento das células do mesocarpo e aumento dos espaços intercelulares (SUGIURA et al., 1991).

É classificado como fruto climatérico, sendo que a biossíntese de etileno é inicialmente desencadeada pelo ácido abscísico e induzida pela perda de água no cálice, através da indução e expressão do gene da ACC sintase (*DKACS2*) e da ACC oxidase (*DKACO1*) (NAKANO et al., 2003; LENG et al., 2009). O etileno produzido no cálice se difunde no parênquima do pericarpo, agindo como um sinal para a síntese de etileno autocatalítico neste tecido, resultando em um aumento abrupto, que corresponde ao pico de produção de etileno (NAKANO et al., 2003).

Encontra-se uma correlação entre a respiração e a produção de etileno, porém pesquisas mostram que é baixa a produção de etileno em caquis (0,1-1,0 μL C_2H_4 kg^{-1} h^{-1}, a 20°C) (CHITARRA; CHITARRA, 2005), assim como a taxa respiratória (5-10 mg CO_2. Kg^{-1} h^{-1}, a 5°C; 30-40 mg CO_2 kg^{-1} h^{-1}, a 25°C) (HARDENBURG et al., 1986). Mesmo com baixa produção de etileno e respiração reduzida, ocorrem mudanças na coloração, textura, aroma e sabor, tornando os frutos comestíveis.

As modificações de coloração dos caquis durante o amadurecimento estão relacionadas à degradação da clorofila e ao aumento do conteúdo de pigmentos carotenóides, como a criptoxantina, zeaxantina e licopeno (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Quando maduro apresenta-se como uma importante fonte nutricional, por ser rico em carotenóides, em especial, β-caroteno, β-criptoxantina, zeaxantina, luteína e licopeno (ANCOS et al., 2000). É considerado fonte de polifenóis como ácido gálico e ácido cumárico (GORISTEIN et al., 2000), pertencentes aos taninos.

Uma das principais mudanças durante o amadurecimento é o amolecimento dos frutos de caquizeiros. Na parede celular, os teores de pectina e hemicelulose diminuem durante o amadurecimento, causando uma grande perda de firmeza no mesocarpo do fruto (CUTILLA-SUTURRALDE et al., 1993). A diminuição destes dois carboidratos na matriz da parede celular tem como principal consequência a separação da lamela média. Esta região da parede celular é considerada rica em substâncias pécticas, predominantemente, pectato de cálcio. Posteriormente, observa-se uma diminuição da celulose, que forma o esqueleto de microfibrilas da parede celular. Após este ponto o fruto se apresenta totalmente mole (BEN-ARIE et al., 1996).

Os tratamentos de destanização também afetam a firmeza da polpa. Redução da firmeza de polpa em frutos „Giombo' tratados com etanol foi evidenciada por Antoniolli et al. (2000) e Terra (2010). Salvador et al. (2007) verificaram que caquis „Rojo Brilhante' tratados com CO_2 apresentaram degradação no tonoplasto das células taníferas, pelo efeito do CO_2 e pelo efeito mecânico produzido pela polimerização dos taninos dentro dos vacúolos das células taníferas.

Para retardar o avanço do amadurecimento de caquis, manter a firmeza de polpa, principalmente em frutos destanizados, e prolongar o período de comercialização tem-se utilizado métodos como a refrigeração, atmosfera controlada, embalagens e a aplicação de biorreguladores, como o 1-metilciclopropeno (1-MCP), que é uma molécula bloqueadora do sítio de ação do etileno que inibi a evolução da maturação (BLANKENSHIP; DOLE, 2003).

A temperatura ideal para a conservação de caquis varia entre as cultivares. Estudos já foram realizados em caquis „Giombo' com temperaturas de armazenamento de 0ºC (MORAIS, 2012), 1ºC (ANTONIOLLI et al., 2001) e de 5ºC (MONTEIRO, 2011; TERRA, 2010). Temperaturas inadequadas por períodos prolongados podem causar danos por frio que que se manifestam em uma variedade de sintomas tais como lesões superficiais, descoloração do tecido interno, textura aquosa e translúcida, geleificação da polpa e aspecto farinhento

(BORRÁS, 2012). Geralmente durante o armazenamento os frutos apresentam aspecto normal, no entanto, os sintomas de danos pelo frio se tornam evidentes quando os frutos são transferidos a temperaturas moderadas.

1.4 Taninos e adstringência em caquis

Metabólitos secundários são formados no metabolismo secundário das plantas e são divididos em três grupos: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides. Estão relacionados ao sistema de defesa nas plantas, envolvidos na proteção contra radiação ultravioleta e patógenos agressores, ação alelopática entre plantas, além de oferecerem colorações a flores e frutos que atraem insetos polinizadores e animais silvestres que dispersam as sementes (TAIZ; ZEIGER, 2003).

Os compostos fenólicos, também chamados de polifenóis, são formados a partir do ácido chiquímico, cuja síntese ocorre com intermediação da fenilalanina, da fenilalanina amônia liase (PAL) e do ácido mevalônico (KAY, 1991). Mas a função fisiológica dos compostos fenólicos não se limita apenas ao mundo vegetal. Os polifenóis são conhecidos por sua capacidade antioxidante de impedir efeitos danosos dos radicais livres. Estudos evidenciam ação protetora dos polifenóis contra doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer (KURODA; HARA, 1999; MCKAY; BLUMBERG, 2002).

De acordo com Manach e colaboradores (2004), os compostos fenólicos podem ser divididos em quatro grandes grupos, em função do número de anéis de fenol e os elementos estruturais que ligam os anéis uns aos outros: ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e lignanos.

A classe dos ácidos fenólicos é formada pelos derivados do ácido benzóico (ácidos hidroxibenzóico) e pelos derivados do ácido cinâmico (ácidos hidroxicinâmicos). Os ácidos hidroxibenzóicos podem ser encontrados na forma livre ou então esterificados, formando os chamados taninos hidrolisáveis (MANACH et al., 2004).

A classe dos flavonóides apresenta uma estrutura comum que consiste em dois anéis aromáticos ligados entre si por três átomos de carbono que formam um heterociclo oxigenado (anel C). Em função do tipo de heterociclo envolvido, são divididos em seis subclasses, flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas e flavanóis (MANACH et al., 2004). Flavanóis podem existir tanto na forma monomérica (catequinas) como na forma de polímeros (proantocianidinas), que são chamados popularmente de taninos condensados (DALVI, 2008; CHUNG et al., 1998).

Os taninos são definidos como compostos fenólicos solúveis em água que possuem peso molecular entre 500 e 3000 Daltons e capacidade de formar complexos com alcalóides, gelatina e proteínas (HASLAN, 1996) e combinar-se com celulose e pectina para formar complexos insolúveis (BATTESTIN et al., 2004). Na boca, os taninos precipitam as proteínas presentes na saliva, principalmente a amilase, a qual, uma vez ligada aos receptores de sabor, causa uma sensação de secura no palato, a adstringência (ITTAH, 1993). Os taninos são tipicamente encontrados em frutos de caquizeiros, principalmente quando imaturos, e em algumas cultivares persistem durante a maturação.

Os taninos são classificados em dois grupos: taninos hidrolisáveis ou solúveis e taninos condensados, insolúveis ou proantocianidinas.

Taninos Hidrolisáveis: são formados principalmente a partir de ácido gálico (galotaninos) e ácido hexahidrodifênico (elagitaninos) esterificados a um poliol, normalmente a D-glicose (HANDIQUE; BARUAH, 2002) (Figuras 1 e 2). São unidos por ligações éster-carboxila, sendo prontamente hidrolisáveis em condições ácidas ou básicas (BATTESTIN et al., 2004).

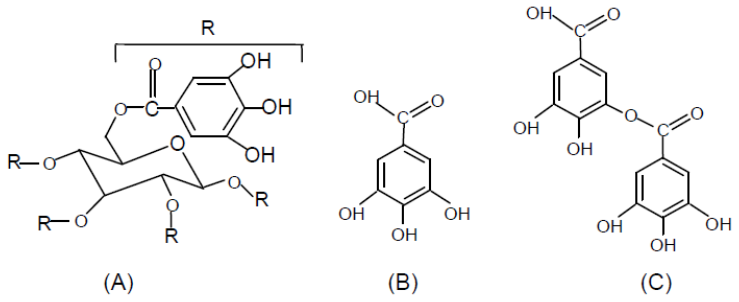

Figura 1 - Estrutura de galotaninos (A), ácido gálico (B) e digálico (C). (BHAT et al., 1998)

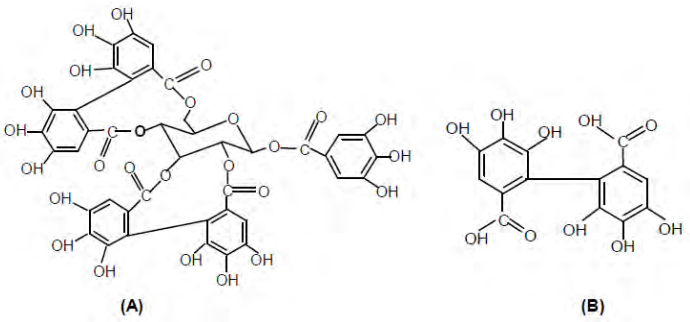

Figura 2 - Estrutura de elagitaninos (A) e do ácido hexahidroxidifênico (B). (BHAT et al., 1998)

Taninos Condensados: são constituídos por oligômeros formados pela polimerização de unidades flava-3-ols o qual é constituído por dois tipos de subunidades, extensão e unidades terminais (DIXON et al., 2005) (Figura 3), podem conter duas a cinquenta unidades

flavanóides ligados entre si por ligações entre C4 e C6 (ou C8) conferindo estruturação complexa (BATTESTIN et al., 2004).

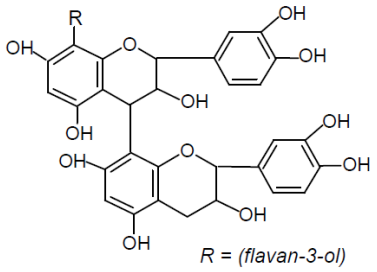

Figura 3 - Estrutura química de tanino condensado. (BHAT et al., 1998)

Os precursores dos taninos condensados são formados a partir das leucoantocianinas, que podem ser convertidas para catequina ou galocatequina (2,3-*trans* flavan-3-ols) ou a partir das antocianidinas, que podem ser convertidas para epicatequina ou epigalocatequina (2,3-*cis* flavan-3-ols) (ZHAO et al., 2010; AKAGI et al., 2009; IKEGAMI et al., 2007). Estudos moleculares indicam que estas reações são reguladas pelas enzimas leucoantocianidina redutase (LAR) e antocianidina redutase (ANR) (AKAGI et al., 2009; IKEGAMI et al., 2007). A epicatequina é mais adstringente do que o seu isômero quiral catequina e a localização e a ligação das unidades monoméricas influenciam na adstringência (ZANG et al., 2011), pois podem ser solúveis antes da polimerização.

A polimerização ocorre pela adição de unidades sequenciais de catequinas e epicatequinas (policondensação), formando compostos complexos não adstringentes (LIU et al., 2013; AKAGI et al., 2009). No entanto, os detalhes do processo da polimerização não estão claros e não é conhecido se esta é uma reação espontânea ou uma reação catalisada por enzimas (LIU et al., 2013).

Os frutos de caquizeiro apresentam como característica altos teores de taninos solúveis e proantocianidinas solúveis acumuladas no início do desenvolvimento (AKAGI et al., 2010). Os taninos estão localizados em idioblastos, também chamadas de células taníferas, que se diferenciam em estágios iniciais de desenvolvimento de primórdios foliares e do ovário das flores, sendo possível diferenciá-las das células meristemáticas e parenquimáticas, apenas pelo acúmulo de conteúdo tanífero no vacúolo das células (YONEMORI et al., 1997). Nos frutos em crescimento e maturação, as células taníferas estão distribuídas no mesocarpo, com diferentes tamanhos e formas, atingindo longos comprimentos (YANG et al., 2005).

Nos frutos de caquizeiro, dependendo do grupo que se classifica a cultivar, os taninos solúveis conferem adstringência, mesmo em frutos maduros. O desaparecimento natural da

adstringência ou o induzido por via artificial deve-se à coagulação, condensação ou polimerização dos taninos presentes no fruto, tornando-os insolúveis e, portanto, incapazes de formarem complexos (AWAD, 1993).

Segundo Sugiura et al. (1979) é provável que existam dois diferentes mecanismos na perda natural da adstringência. Um deles é dependente da produção de etanol e, presumivelmente, de acetaldeído pelas sementes durante o desenvolvimento dos frutos, estando associado aos tipos PVNA, PVA e PCA. Por outro lado, supõe-se que o segundo mecanismo, constatado em frutos de cultivares do tipo PCNA, esteja relacionado ao menor tamanho das células taníferas e aos taninos de baixo peso molecular e menor reatividade (TAYLOR, 1993).

A perda natural da adstringência por meio da ação natural do etileno ou aceleramento da maturação com aplicação de etileno exógeno só ocorre quando os frutos apresentam consistência mole, o que os inviabiliza para os processos de colheita, classificação e comercialização, devido à redução drástica da vida de prateleira. Durante o amadurecimento dos frutos, a parede celular é degradada, formando pectinas solúveis, as quais podem interagir de maneira não covalente com as moléculas de tanino, realizando uma função similar ao acetaldeído. Taira et al. (1997) observaram que a redução da adstringência em caqui pode ocorrer por aderência de taninos a fragmentos da parede celular, como as pectinas, tornando-os insolúveis, sem o acúmulo de acetaldeído.

A remoção artificial da adstringência por ser realizada com aplicação de etileno exógeno ou através da indução do processo respiratório anaeróbio. O etileno induz a formação de compostos responsáveis pelo aroma do fruto como o acetaldeído e o etanol, que polimerizam os taninos solúveis.

Para promover a destanização por respiração anaeróbia utilizam-se altas concentrações de CO_2. No processo de respiração normal, a glicose é convertida a ácido pirúvico que, por sua vez, na presença de oxigênio, é oxidado completamente a CO_2 e água produzindo energia em forma de ATP. No entanto, mesmo em condições normais de oxigênio, parte do ácido pirúvico é convertida a acetaldeído e, em seguida, a etanol no processo de glicólise anaeróbica (MUÑOZ, 2002). Em altas concentrações de CO_2, a produção de acetaldeído e etanol aumenta promovendo a polimerização dos taninos hidrolizáveis.

Outra forma de promover a destanização é através da formação de uma atmosfera com etanol em ambiente fechado, que absorvido pelos frutos, transforma o etanol em acetaldeído pela ação da enzima álcool desidrogenase, insolubilizando os taninos (OSHIDA et al., 1996).

Estudo molecular sobre a biossíntese e condensação de proantocianidinas em caqui mostra que o tratamento com etanol, não só faz a insolubilização direta das proantocianidinas, mas também afeta a regulação da síntese a nível de transcrição (IKEGAMI et al., 2007).

1.5 Objetivos

O objetivo do trabalho foi analisar o desenvolvimento dos frutos de caquizeiros „Giombo' e „Fuyu' até a sua maturidade comercial. A meta foi esclarecer quando inicia o acúmulo de taninos nas células, se há diferenças entre as células taníferas desses frutos e como são as células taníferas nessas duas cultivares ao final do desenvolvimento e durante o processo de maturação.

Em pós-colheita, submeter caquis „Giombo' ao etanol para determinar o tempo de exposição mais eficiente para a remoção da adstringência. Armazenar frutos destanizados, não destanizados e tratados com 1-MCP a 5ºC durante 60 dias e analisar as alterações anatômicas e fisiológicas decorrentes dos tratamentos. Ainda, estudar a influência de temperaturas de armazenamento refrigerado em frutos destanizados, não destanizados e tratados com 1-MCP na qualidade dos frutos e possível ocorrência de danos por frio em caquis „Giombo'.

Referências

AKAGI, T.; IKEGAMI, A.; TSUJIMOTO, T.; KOBAYASHI, S.; SATO, A.; KONO, A.; YONEMORI, K. DkMyb4 is a Myb transcription factor involved in proanthocyanidin biosynthesis in persimmon fruit. **Plant Physiolology,** Rockville, v. 151, p. 2028–2045, 2009.

ANCOS, B.; GONZALEZ, E.; PILAR CANO, M. Effect of high-pressure treatment on the carotenoid composition and the radical scavenging activity of persimmon fruit purees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 3542–3548, 2000.

ANTONIOLLI, L.R.; CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; SCARPARE FILHO, J.A. Remoção da adstringência de frutos de caquizeiro Giombo sob diferentes períodos de exposição ao vapor de álcool etílico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 10, p. 2083-2091, 2000.

_____. Influência da embalagem de polietileno na remoção da adstringência e na qualidade de caquis (*Diospyros kaki* L.), cv. Giombo, armazenados sob refrigeração. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 293-297, 2001.

AWAD, M. **Fisiologia pós-colheita de frutos**. São Paulo: Nobel, 1993. 114 p.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L.K.; MACEDO, G.A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição,** Araraquara, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2004.

BELLÉ, C. **Curva de crescimento de frutos**. Frederico Westphalen: Universidade Federal de Santa Maria, 2008. 24 p.

BEN-ARIE, R.; SAKS, Y.; SONEGO, L.; A. FRANK, A. Cell wall metabolism in gibberellin treated persimmon fruits. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 19, p. 25-33, 1996.

BESADA, C.; SANCHEZ, G.; SALVADOR, A.; GRANELL, A. Volatile compounds associated to the loss of astringency in persimmon fruit revealed by untargeted GC–MS analysis. **Metabolomics**, Los Angeles, v. 9, n. 1, p. 157-172, 2012.

BHAT, K.T.; SINGH, B.; SHARMA, P.O. Microbial degradation of tannins: a current perspective. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 9, p. 343-357, 1998.

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

BORRÁS, P.N. **Caracterización fisiológica durante el crecimiento y maduración del fruto de diferentes variedades de caqui**. 2012. 81p. Trabajo de Master (Master en Calidad y Seguridad Alimentaria) - Universidad de Valencia, Valencia, 2012.

CAMARGO FILHO, W.P.; MAZZEI, A.R.; ALVES, H.S. Mercado de caqui: variedades, estacionalidade e preços. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 81-87, 2003.

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

CHUNG, K.T.; WONG, T.Y.; WEI, C.; HUANG, Y.W.; LIN, Y. Tannins and human health: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Amherst, v. 38, n. 6, p. 421-464, 1998.

CUTILLAS-SUTURRALDE, A.; ZARRA, I.; LORENCES, E. P. Metabolism of cell wall polysaccharides from persimmon fruit. Pectin solubilization during fruit ripeningoccurs in apparent absence of poygalacturonase activity. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 89, p. 369-375, 1993.

DALVI, L.T. **Mecanismos de ação de antioxidantes de origem vegetal: estudo do polifenol ácido elágico e do extrato de caqui (*Diospyros kaki*)**. 2008. 129 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

DIXON, R.A. Engineering of plant natural product pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, Philadelphia, v. 8, p. 329–336, 2005.

FACHINELLO, J.C.; PASA, M.S.; SCHMTIZ, J.D.; BETEMPS, D.L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. especial, p. 109-120, 2011.

FAO. 2011. Disponível em: <http://www.fao.org/inicio.htm> Acesso em: 20 jan. 2013.

_____. **Statistical database.** 2013. Disponível em <http://www.fao.org> Acesso em: 10 nov. 2013.

FIORAVANÇO, J.C.; PAIVA, M.C. Cultura do caquizeiro no Brasil e no Rio Grande do Sul: situação, potencialidade e entraves para o seu desenvolvimento. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 43-51, 2007.

GORINSTEIN, S.; KULASEK, G.W.; BARTNIKOWSKA, E.; LEONTOWICZ, M.; ZEMSER, M.; MORAWIEC, M.; TRAKHTENBERG, S. The effects of diets, supplemented with either whole persimmon or phenol-free persimmon, on rats fed cholesterol. **Food Chemistry**, London, v. 70, p. 303-308, 2000.

HANDIQUE, J.G.; BARUAH, J.B. Polyphenolic compounds: an overview. **Reactive and Functional Polymers,** Amsterdam, v. 52, p. 163–188, 2002.

HARDENBURG, R. E.; WATADA, A. E.; WANG, C. Y. **The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nurcery stocks**. Washington: USDA, 1986. 130 p. (Agricultural Research Serial. Handbook, 66).

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 59, p. 205-215, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009.** Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisaresultados.php?id_pesquisa=25> Acesso em: 20 nov. 2013.

_____. 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/>. Acesso em: 22 jan. 2013.

IKEGAMI, A.; EGUCHI, S.; KITAJIMA, A.; INOUE, K.; YONEMORI, K. Identification of genes involved in proanthocyanidin biosynthesis of persimmon (*Diospyros kaki*) fruit. **Plant Science**, Amsterdan, v. 172, p. 1037–1047, 2007.

ITO, S. The persimmon. In: HULME, A.C. **The biochemistry of fruits and their products**. London: Academic Press, 1971. v. 2, n. 8, p. 281-301.

ITTAH, Y. Sugar content changes in persimmon fruits (*Diospyros kaki* L.) during artificial ripening with CO_2: a possible connection to deastringency mechanisms. **Food Chemistry**, London, v. 48, n. 1, p. 25-29, 1993.

KAY, S.J. **Postharvest physiology of perishable plant products**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 532 p.

KURODA, Y.; HARA, Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 436, p. 69–97, 1999.

LIU, Y.; SHI, Z.; MAXIMOVA, S.; PAYNE, M.J; GUILTINAN, M.J. Proanthocyanidin synthesis in *Theobroma cacao*: genes encoding anthocyanidin synthase, anthocyanidin reductase, and leucoanthocyanidin reductase. **BMC Plant Biology**, London, v. 13, n. 202, p. 1-19, 2013.

LENG, P.; ZHANG, G.L.; LI, X. WANG, L.H.; ZHENG, Z.M. Cloning of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) gene encoding a key enzyme during abscisic acid (ABA) biosynthesis and ABA-regulated ethylene production in detached young persimmon calyx. **Chinese Science Bulletin**, Xangai, v. 54, n. 16, p. 2830-2838, 2009.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical and Nutricion**, Bethesda, v. 79, p. 727-747, 2004.

MARTÍNEZ-CALVO, J.; BADENES, M.L.; LLÁCER, G. Descripción de nuevas variedades de caqui (*Diospyros kaki* Thunb.) del banco de germoplasma del IVIA. **Monografías INIA: Série Agrícola**, Valencia, v. 28, p. 1-19, 2012.

MARTINS, F.P.; PEREIRA, F.M. **Cultura do caquizeiro**. Jaboticabal: FUNEP, 1989. 71 p.

MCKAY, L.D.; BLUMBERG, J.B. The role of tea in human health: an update. **Journal of the American College of Nutrition**, Clearwater, v. 21, n. 1, p. 1–13, 2002.

MONTEIRO, M.F. **Técnicas de remoção da adstringência e refrigeração de caqui 'Giombo'**. 2011. 75 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidadede São Paulo, Piracicaba, 2011.

MORAES, M.R. **Atmosfera modificada e aplicação de cloreto de cálcio em caqui 'Giombo'**. 2012. 64 p. Dissertação (Mestrado em Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2012.

MUÑOZ, V.R.S. **Destanização do caqui (*Diospyros kaki* L.) „Rama Forte'**. 2002, 164 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

NAKANO, R.; OGURA, E.; KUBO,Y.; INABA, A. Ethylene biosynthesis in detached young persimmon fruit is initiated in calyx and modulated by water loss from the fruit. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, p. 276–286, 2003.

NISSAN, R.J.; NAMBOUR, D. History, origin and classification of persimmon cultivars in Australia and Vietnam. **Persimmon Press**, Australia, v. 52, p. 12-15, 2011.

OSHIDA, M.; YONEMORI, K.; SUGIURA, A. On the nature of coagulated tannins in **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 8, n. 4, p. 317-327, 1996.

ROCHA, P.; BENATO, E.A. Sistema produtivo e pós colheita do caqui ‘Rama Forte' e ‘Fuyu' . **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 36, n. 4, p.58-64, 2006.

SALVADOR, A.; ARNAL, L.; BESADA, C.; LARREA, V.; QUILES, A.; PEREZ-MUNUERA, I. Physiological and structural changes during ripening and deastringency treatment of persimmon fruit cv. Rojo Brilhante. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. 181-188, 2007.

SIMÃO, S. Caquizeiro. In: _____. **Tratado de fruticultura**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 382-402.

SUGIURA, A. Origin in varietal differentiation in Japanese persimmon. **Recent Advances in Plant Breeding,** Kyoto, v. 25, p. 29–37, 1983.

SUGIURA, A.; TOMANA, T. Relationships of etanol production by seeds of different types of Japanese persimmons and their tannin content. **HortScience**, Alexandria, v. 18, p. 319-321, 1983.

SUGIURA, A.; ZHENG, G.H.; YONEMORI, K. Growth and ripening of persimmon fruit at controlled temperatures during growth stage III. **Hortscience**, Alexandria, v. 26, n. 5, p. 574-576, 1991.

SUGIURA, A.; YONEMORI, K.; HARADA, H.; TOMANA, T. Changes in the ethanol acetaldehyde contents of Japanese persimmon fruits in relation to natural loss of astringency. **Studies from the Institute of Horticulture**, Kyoto, v. 9, p. 41-47, 1979.

TAIRA, S.; ONO, M.; MATSUMOTO, N. Reduction of persimmon astringency by complex formation between pectin and tannins. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 12, p. 265-271, 1997.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2003. 720 p.

TAYLOR, J.E. Exotics. In: SEYMOUR, G.B.; TAYLOR, J.E.; TUCKER, G.A. **Biochemistry of fruit ripening**. London: Chapman; Hall, 1993. p. 151-186.

TEIXEIRA, A.J. **A cultura do caquizeiro na região serrana fluminense.** Rio de Janeiro: SEBRAE, 2006. 75 p. (Série Agronegócios, nº 266).

TERRA, F.A.M. **Métodos combinados para a destanização e conservação pós-colheita de caquis ‘Giombo'**. 2010. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

YAKUSHIJI, H.; NAKATSUKA, A. Recent persimmon research in Japan. **Japanese Journal of Plant Science**, Hiroshima, v. 1, p. 42-62, 2007.

YANG, Y.; RUAN, X.; WANG, R.; LI, G. Morphological characteristics under optical microscope of tannin cells in persimmon fruit. **Acta Horticulturae**, Jinju, n. 685, p. 135-141, 2005.

YONEMORI, K.; MATSUSHIMA, J. Property of development ofthe tannin cells in non-astringent type fruits of Japanese persimmon (*Diospyros kaki*) and its relationship to natural deastringency. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v. 54, p. 201-208, 1985.

YONEMORI, K.; OSHIDA, M.; SUGIURA, A. Fine structure of tannin cells in fruit and callus tissues of persimmon. **Acta Horticulturae**, Chang Mai, n. 436, p. 403-416, 1997.

ZHANG, T.; LI, G.; MO, H. Persimmon tannin composition and function. **Advances in Biomedical Engineering**, Hong Kong, v. 1/2, p. 389-392, 2011. Apresentado no INTERNATIONAL CONFERENCE ON AGRICULTURAL AND BIOSYSTEMS, s/n, 2011, Hong Kong.

ZHAO, J., PANG, Y., DIXON, R.A. The mysterious of proanthocyanidin transport and polymerization. **Plant Physiolology**, Rockville, v. 153, p. 437-443, 2010.

2 O ACÚMULO DE TANINOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS DE CAQUIZEIROS „GIOMBO' E „FUYU'

Resumo

Os taninos são os responsáveis pela adstringência em frutos de caquizeiros. Desta forma, o objetivo do estudo foi comparar o desenvolvimento de frutos „Giombo' (PVA) e „Fuyu' (PCNA) até a maturação dos mesmos visando esclarecer se a diferença na adstringência está relacionada ao início do acúmulo de taninos nas células, às diferenças no padrão de acúmulo durante a diferenciação celular, à densidade de células e aos teores de taninos totais e solúveis. Flores e frutos foram coletados em pomar comercial de Mogi das Cruzes na safra 2010/2011, em fases previamente determinadas até os frutos atingirem a maturidade comercial. Foram realizadas análises estruturais em microscopia de luz (ML), ultraestruturais de varredura a baixas temperaturas (MEV) e transmissão (MET) e análises quantitativas de densidade e índice de células taníferas, taninos solúveis e totais. Nas duas cultivares, o ovário já apresenta pequeno número de células tanífera. Ao longo do desenvolvimento, „Giombo' apresentou maiores valores de densidade de células taníferas, bem como de teores de taninos solúveis e totais que „Fuyu'. O acúmulo dos taninos nas células pode ser homogêneo restrito às proximidades da parede, vesículas esféricas com projeções ligadas ao tonoplasto, amorfo ocupando todo o vacúolo, homogêneo com áreas circulares não preenchidas e homogêneo com preenchimento total do vacúolo. Ao final do desenvolvimento dos frutos, as células do parênquima se encontram com grandes espaços intercelulares e com pectinas sendo degradadas, indicando a maturação e senescência dos frutos.

Palavras-chave: Adstringência; Anatomia; Células taníferas**;** *Diospyros kaki* L.

Abstract

Tannins are responsible for the astringency of persimmon fruits. This way, the present study compared the development of „Giombo' (PVA) and „Fuyu' (PCNA) persimmon fruits until maturity to elucidate whether the difference in astringency between the two cultivars was related to the early accumulation of tannins in the cells, to differences in the pattern of tannin accumulation during cell differentiation, to cell density or to the concentrations of total and soluble tannins. Persimmon flowers and fruits were harvested at a commercial orchard in Mogi das Cruzes during the 2010-2011 harvest season in predetermined stages until the fruit reached commercial maturity. Structural analyses by Light Microscopy (LM), ultrastructural Cryo Scanning Electron Microscopy (Cryo-SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM), and quantitative analyses of tannin cell density, tannin cell index and total and soluble tanninswere performed. In both cultivars, the ovary already exhibited a small number of tannin cells. Throughout development, the „Giombo' persimmon presented higher tannin cell density and higher levels of total and soluble tannins compared to „Fuyu'. The accumulation of tannins in the cells was: homogeneous and restricted to the vicinity of the cell wall, in spherical vesicles connected to the tonoplast, amorphous occupying the entire vacuole, homogeneous with circular unfilled areas, and homogeneous with completely full vacuoles. At the end of fruit development, the parenchyma cells displayed large intercellular spaces and degraded pectins, indicating fruit ripening and senescence.

Keywords: Astringency; Anatomy; Tannin cells; *Diospyros kaki* L.

2.1 Introdução

O caquizeiro (*Diospyros kaki* L.) pertence à família Ebenaceae. Seu centro de origem é o continente asiático, mais precisamente, a China, sendo hoje o maior produtor mundial (FAO, 2009). Atualmente, o Brasil se destaca como o quarto maior produtor mundial, com produção de 164.495 toneladas em área plantada de 8.652 hectares no ano de 2010 (IBGE, 2010).

No Brasil, as cultivares mais produzidas são ‘Rama Forte' e ‘Giombo' pertencentes ao grupo polinização variável adstringente (PVA) e ‘Fuyu' do grupo de polinização constante não adstringente (PCNA). As cultivares do grupo PVA apresentam altos teores de taninos solúveis, responsáveis pela adstringência, e necessitam de tratamentos de destanização para consumo (EDAGI; KLUGE, 2009).

Os taninos pertencem ao grupo dos polifenóis e são divididos em dois grupos: Os taninos hidrolisáveis ou solúveis são formados a partir de ácido gálico (galotaninos) e ácido hexahidrodifênico (elagitaninos) esterificados a um poliol, normalmente a D-glicose (HANDIQUE; BARUAH, 2002). Os taninos condensados ou proantocianidinas são constituídos por oligômeros formados pela policondensação de unidades de flava-3-ols, que podem ser formados a partir das leucoantocianinas, e ser convertida para catequina ou galocatequina (2,3-*trans* flavan-3-ols) ou a partir das antocianidinas, e ser convertida para epicatequina ou epigalocatequina (2,3-*cis* flavan-3-ols) (ZHAO et al., 2010; AKAGI et al., 2009; IKEGAMI et al., 2007). As proantocianidinas podem ser solúveis antes da polimerização, e estas são polimerizadas pela adição de unidades sequenciais de catequinas e epicatequinas (policondensação), formando compostos não adstringentes (LIU et al., 2013; AKAGI et al., 2009).

O único estudo sobre a estrutura e ultraestrutura da diferenciação de células taníferas em ovário e primórdios foliares de caquizeiro não esclarece qual é a organela responsável pela biossíntese dos taninos os quais se acumulam no vacúolo desde o início do processo de diferenciação (YONEMORI et al., 1997). Estudos quantitativos de células e taninos solúveis foram realizados durante o desenvolvimento de frutos de caquizeiro adstringente e não adstringente por Yonemori e Matsushima (1987a; 1985). Segundo os autores, as células taníferas em frutos PCNA param o crescimento precocemente e apresentam menor tamanho no final do desenvolvimento, enquanto que caquis de polinização variável não adstringente

(PVNA) e adstringente (PVA) e polinização constante adstringente (PCA) continuam seu crescimento.

De acordo com o exposto acima, estudos do desenvolvimento de caquis 'Fuyu' foram realizados, porém não há relatos sobre frutos „Giombo'. Neste contexto, o objetivo do estudo foi comparar o desenvolvimento de frutos „Giombo' (PVA) e „Fuyu' (PCNA) até a maturação dos mesmos visando esclarecer se a diferença na adstringência está relacionada ao início do acúmulo de taninos nas células, às diferenças no padrão de acúmulo durante a diferenciação celular, à densidade de células e aos teores de taninos totais e solúveis.

Desenvolvimento

2.2 Material e Métodos

Material vegetal

Foram utilizados materiais das cultivares Giombo (PVA) e Fuyu (PCNA) obtidos em Mogi das Cruzes-SP (23°31'S 46°11'O) a 742 m de altitude, entre setembro de 2010 e março de 2011. Para as análises anatômicas e análises quantitativas, as fases de desenvolvimento foram padronizadas visualmente (Figura 1 A-L) e através de medidas das flores e dos frutos. **Fase a)** Aparecimento dos botões florais: botão com 0,5 cm de diâmetro e 1,0 cm de comprimento para „Giombo'; e 0,8 cm de diâmetro e 1,5 cm de comprimento para „Fuyu'; **Fase b)** Abertura do cálice do botão floral: botão com 0,8 cm de diâmetro e com 1,4 cm de comprimento para „Giombo' e 1,0 cm de diâmetro e 1,5 cm de comprimento para „Fuyu'; **Fase c)** Alongamento e alteração na cor da corola de branca para amarela clara: botão com 0,8 cm de diâmetro e 1,6 cm de comprimento para „Giombo' e com 1,1cm de diâmetro e 1,7 cm de comprimento para „Fuyu'; **Fase d)** Abertura da corola (antese): flor com 0,9 cm de diâmetro e 1,5 cm de comprimento para „Giombo' e 1,2 cm de diâmetro e 1,3 cm de comprimento para „Fuyu'; **Fase e)** Secamento e queda da corola: fruto com 1,0 cm de diâmetro e 0,9 cm de comprimento para „Giombo' e 1,0 cm de diâmetro e 0,9 cm de comprimento para „Fuyu'. A partir da fase **e** (outubro)(Figura 1F), foram realizadas coletas mensais. „Fuyu' que apresenta maturação mais precoce foi colhido até fevereiro e „Giombo', maturação mais tardia, colhido até março.

Para análise ao microscópio de luz foram utilizadas todas as fases do desenvolvimento e maturação de ambas cultivares, para análise ao microscópio eletrônico de varredura a baixas

temperaturas foi utilizada somente a fase **e** e para transmissão as fases **a-d** de „Giombo' e „Fuyu'. As análises quantitativas (densidade, índice de células e taninos totais e solúveis) foram realizadas a partir da fase **e** (outubro).

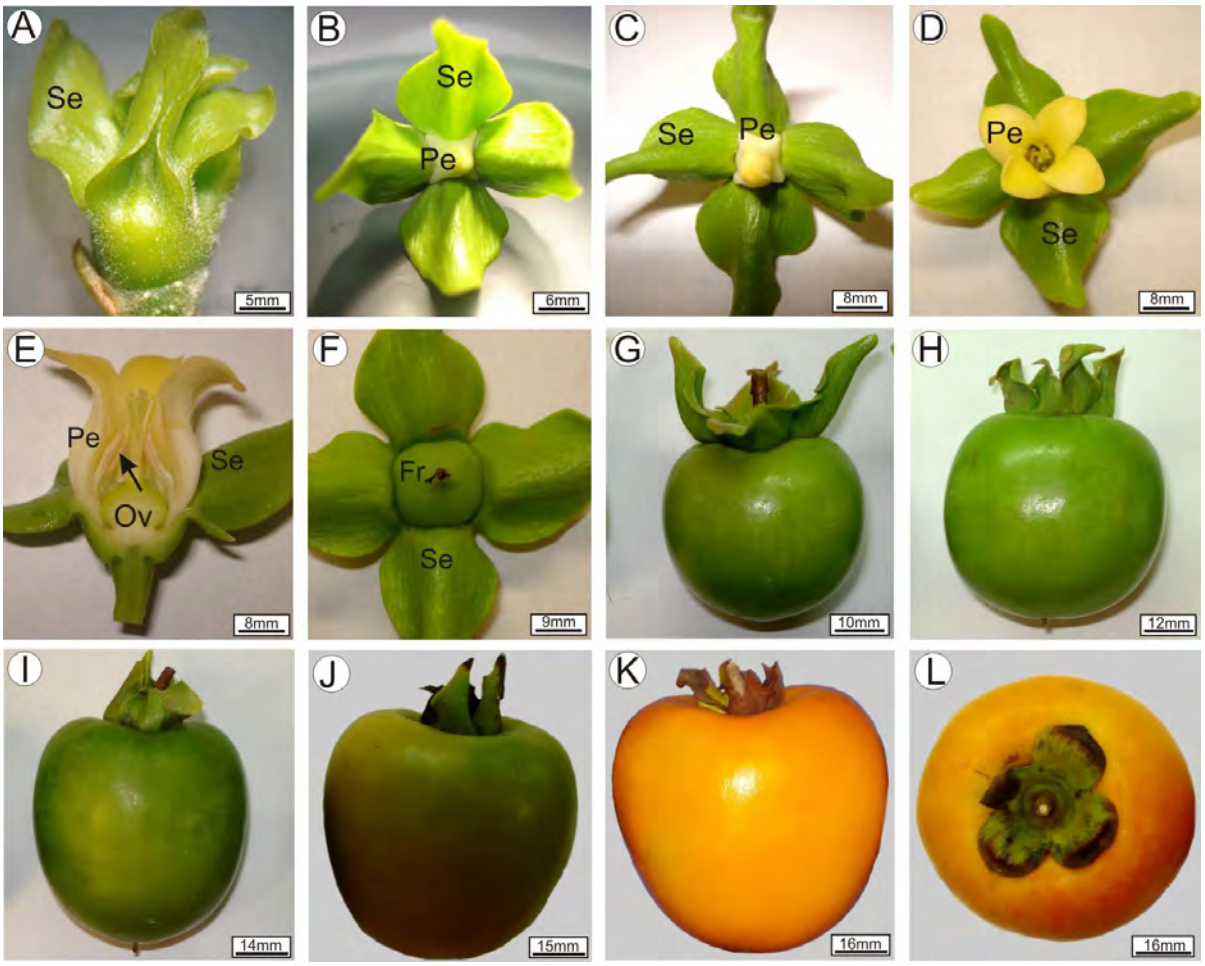

Figura 1 - Fases de desenvolvimento de flores e frutos de caquizeiros 'Giombo' (A-K) e „Fuyu' (L). A. Aparecimento dos botões florais (fase **a**). B. Abertura do cálice do botão floral (fase **b**). C. Alongamento e alteração na cor da corola de branca para amarela clara (fase **c**). D-E. Abertura da corola – antese (fase **d**). Notar estames atrofiados (seta). F. Secamento e queda da corola (fase **e**). G. Frutos da terceira coleta (nov, fase **f**). H. Frutos da quarta coleta (dez, fase **g**). I. Frutos da quinta coleta (jan, fase **h**). J. Frutos da sexta coleta (fev, fase **i**). K. Frutos da sétima coleta (março, fase **j**). L. Frutos da sétima e última coleta de caquis „Fuyu' (fev, fase **i**). Fr= fruto, Ov= Ovário, Pe= pétalas, Se= sépalas

Microscopia de luz (ML)

Foram retiradas porções do ovário e da região equatorial dos frutos para as análises ao microscópio de luz. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965), submetidas à bomba de vácuo para a retirada do ar dos espaços intercelulares, desidratadas em série etílica até etanol 100% e infiltradas em hidroxi-etil-metacrilato (Leica Historesin) para a confecção dos blocos (4 repetições para cada fase). Os blocos foram

seccionados em micrótomo rotativo a 5-6 µm de espessura obtendo-se secções transversais e longitudinais. As secções foram coradas com azul de toluidina (SAKAI, 1973) para as análises histológicas usuais, tratadas com cloreto férrico para detectar compostos fenólicos (taninos) (JOHANSEN, 1940) e com vermelho de rutênio para detectar pectinas (STRASBURGER, 1924). As secções foram montadas em lâminas com resina sintética "Entellan" e as imagens capturadas em microscópio trinocular Leica DM LB acoplado na câmara de vídeo Leica DC 300 F e processadas em computador para confecção das ilustrações.

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As amostras do ovário e frutos (fases **a**-**e**) de „Giombo' e „Fuyu' foram coletadas e imediatamente fixadas em solução de Karnovsky modificado: 2,5% glutaraldeído, 2,5% paraformaldeído, $CaCl_2$ a 0,05mM em tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,2) por 48 horas. Retirou-se o ar das amostras por 5 minutos e então foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas. As amostras foram desidratadas em série crescente de acetona até 100% e infiltradas em resina Spurr. Os blocos foram seccionados no ultramicrótomo Leica UC6 e as seções contrastadas com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo a 2% por trinta minutos em cada etapa (REYNOLDS, 1963). As observações e as eletromicrografias foram feitas ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM-900 operando a 50 Kv com as escalas das eletromicrografias diretamente impressas nas mesmas.

Microscópia eletrônica de varredura a baixas temperaturas (Cryo-SEM)

A análise foi realizada somente na **fase e** de desenvolvimento. Foram retiradas amostras de 1mm de espessura da região equatorial dos frutos com auxílio de lâmina inoxidável. As amostras foram colocadas em porta-amostra de metal e congeladas com nitrogênio líquido a -210°C e imediatamente transferidas para o Cryo-trans (CT 15000C, Oxford Instruments Ltd., Oxford, England), acoplado a um microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM 5410, Tóquio, Japão) operando em condições de congelamento de -130°C e vácuo (10^{-2} bar de pressão). No Cryo-Trans, a amostra foi fraturada a temperatura de -180°C, as secções sublimadas a -90°C durante 15 minutos para eliminar possível excesso de água superficial no tecido. As amostras foram revestidas com ouro no próprio Cryo Trans (a 10^{-2} bar e 40mA), observadas em microscópio com voltagem de 10 kV com distância de trabalho de 15 mm e as imagens capturadas em computador.

Densidade e índice de células taníferas

As determinações foram realizadas a partir da fase **e** de desenvolvimento, sendo utilizadas secções transversais de quatro blocos de frutos diferentes, coradas com azul de toluidina, e as imagens capturadas. Nestas imagens foram definidas quatro áreas de $1mm^2$ para contagem do número de células parenquimáticas e taníferas através do programa Image Tool, Windows 3.0. Utilizou-se as seguintes fórmulas:

Densidade: N° células taníferas/mm²

Índice (%) = S/(S+E)x100, sendo S o número de células taníferas por unidade de área e E o número de células do parênquima na mesma área.

Teores de taninos totais e solúveis

Os teores de taninos solúveis e totais foram determinados a partir da fase **e** de desenvolvimento, utilizando-se três repetições de três frutos. Os teores foram determinados espectrofotometricamente utilizando-se o reagente de Follin-Ciocalteau (50%), segundo técnica recomendada por Taira (1996), onde uma amostra de 1g de polpa triturada e centrifugada com metanol é diluída para um volume final de 100 mL com água destilada do qual se retira uma alíquota de 1 mL. A esta alíquota adiciona-se reagente de Follin-Ciocateau (50%) e 1,0 mL de solução de carbonato de sódio supersaturado e 7,5 mL de água destilada. Em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro marca Biochrom, modelo Libra S22 com absorbância a 725 nm. Foi utilizado, como padrão uma solução de ácido gálico (0,1 g L^{-1}) e os resultados expressos em g 100 g^{-1} polpa.

Delineamento experimental

O delineamento foi inteiramente ao acaso em esquema fatorial 2 x 6, com duas cultivares e seis períodos de coleta para ‘Giombo' e cinco períodos para ‘Fuyu'. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias das amostras comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade através do pacote estatístico SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

2.3 Resultados

As cultivares „Giombo’ e „Fuyu’ apresentam flores com verticilos de proteção bastante vistosos, tetrâmeras, gamossépalas e gamopétalas, sendo as sépalas bastante evidentes por seu tamanho desde o início do desenvolvimento dos botões florais (Figura 1 A-C). São diclinas

femininas com ovário súpero e estigma bífido e apresentam estames atrofiados e pilosos (Figura 1E).

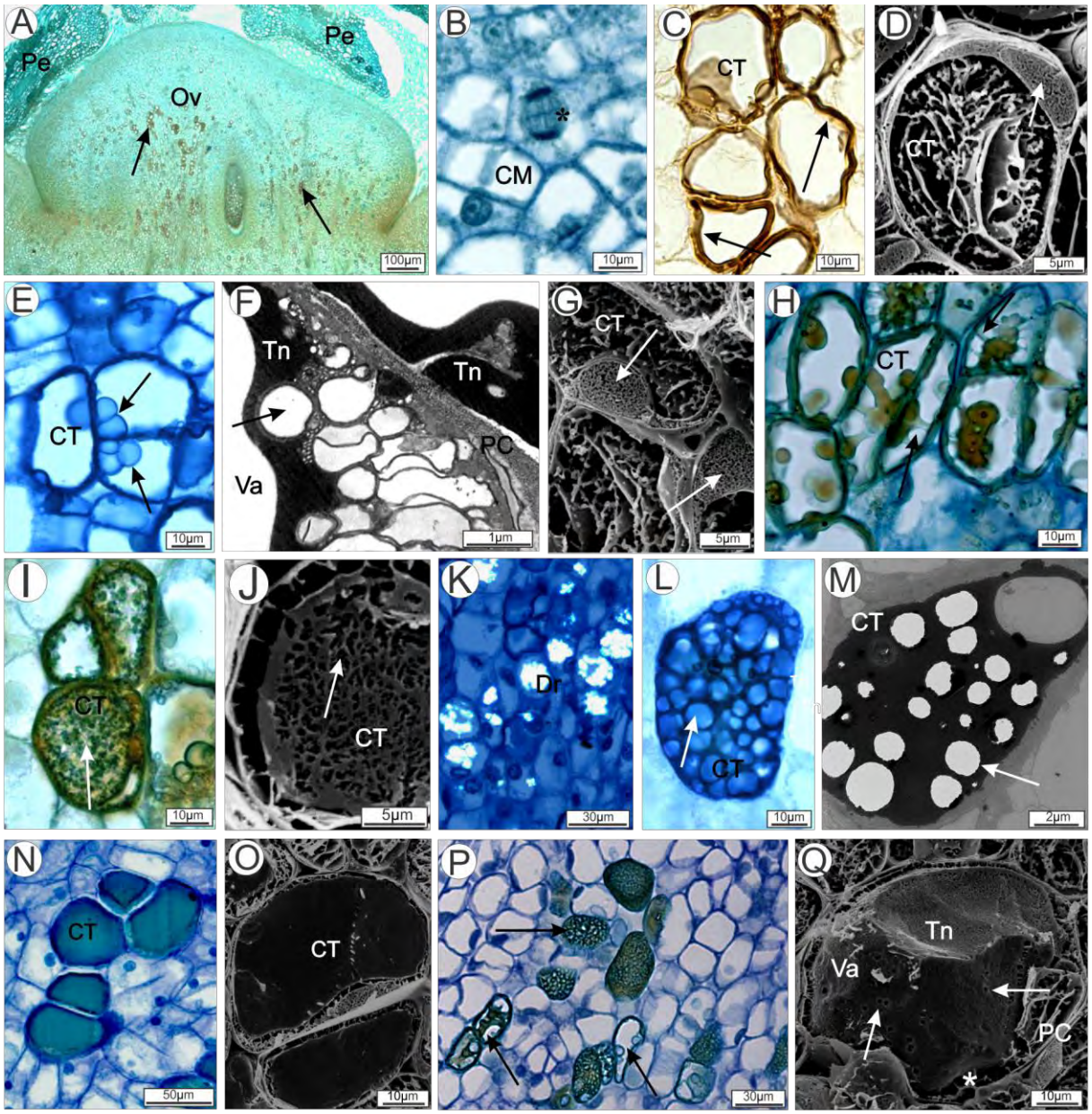

Figura 2 - Padrões de acúmulo de taninos no ovário e frutos de caquizeiros 'Giombo' (A, B, C, D, E, F, G, J, L, M, N, O, Q) e 'Fuyu' (H, I, K, P). Fotomicrografias em ML: A, B, C, E, H, I, K, L, N, P. Eletromicrografias em Cryo-SEM: D, G, J, O, Q e em MET: F, M. A. Ovário na fase a. As setas indicam aparecimento das primeiras células taníferas. B. Divisão celular (*). C-D. Início do acúmulo dos taninos próximo à parede celular (setas). Em C, observar reação com cloreto férrico. E-F-G. Estruturas vesiculares presentes no início do acúmulo de taninos (setas). H. Vesículas com projeções presentes no tonoplasto. I-J. Tanino amorfo preenchendo o vacúolo (setas). K. Cristais do tipo drusa sob luz polarizada. L. Acúmulo de taninos com áreas circulares não preenchidas (seta). M. Espaços no conteúdo vacuolar que corresponde as áreas circulares não preenchidas da figura anterior (seta). N-O. Célula tanífera com o vacúolo preenchido com tanino denso e homogêneo. P. Os diferentes padrões de acúmulo de taninos. Q. Poros no tonoplasto (setas). CM= Célula Meristematica; CT= Célula Tanífera; Dr= drusa; Ov= ovario; PC=Parede Celular; Pe= Pétalas; Tn= tanino; Va= vacúolo

A cultivar „Giombo’ (PVA) apresenta frutos com desenvolvimento partenocárpico, não há estímulo à polinização, porém, há formação do fruto e os óvulos se degeneram e desaparecem. No entanto, em „Fuyu’ são introduzidos polinizadores no pomar, obtendo-se assim flores polinizadas e frutos com formação de sementes. O ciclo de desenvolvimento dos frutos em „Giombo’ e „Fuyu’ teve início com o aparecimento do botão floral (fase a) entre agosto e setembro e os frutos atingiram a maturidade com 210-240 e de 150-180 dias, respectivamente.

Na fase **a**, início do desenvolvimento do botão floral de ‘Giombo' (Figura 2A) e ‘Fuyu', o ovário encontra-se em expansão devido à intensa divisão celular das células meristemáticas (Figura 2B). Estas se apresentam pequenas, isodiamétricas e com núcleo bastante evidente. Nesta fase, o início do acúmulo de taninos já permite diferenciar as células taníferas que estão dispersas ou agrupadas na região central do ovário.

No início, concomitante ao acúmulo que ocorre nas proximidades da parede celular (Figuras 2C-D), se observa intensa vesiculação no citoplasma da célula tanífera (Figuras 2E-F-G). Tais vesículas podem formar projeções ligadas ao tonoplasto de um lado a outro da parede celular em „Giombo’ e „Fuyu’ (Figura 2H).

Na fase **b**, gradativamente o vacúolo é ocupado pelo tanino amorfo (Figura 2I-J) e também há presença de idioblastos com cristais do tipo drusa em formato poliédrico dispersos no ovário de „Giombo’ e „Fuyu’ (Figura 2K).

Além dos padrões de acúmulo já citados, a partir da fase **c** do desenvolvimento dos frutos de ambas as cultivares, também são observadas células taníferas cujo acúmulo vacuolo se apresenta homogêneo com áreas circulares não preenchidas com tanino (Figuras 2L, M). Consequentemente estas áreas no conteúdo do vacúolo são preenchidas de forma homogênea (Figura 2N-O), sendo encontradas células com os diferentes padrões de acúmulo simultaneamente ainda nesta fase c (Figura 2P). Também foi verificada a presença de poros no tonoplasto (Figura 2Q).

Ainda na fase **c**, o ovário é revestido pela epiderme uniestratificada e a camada subepidérmica apresenta acúmulo de compostos fenólicos caracterizando a hipoderme (Figura 3A-B). Em ‘Fuyu' já são observadas esclereídes (Figura 3A), enquanto que em ‘Giombo' (Figura 3B), as esclereídes estão ausentes e nas primeiras camadas do parênquima (5-6 camadas) as células possuem tamanho menor e citoplasma denso.

Na fase **d**, período de antese, observam-se as mesmas características descritas anteriormente para a epiderme e hipoderme. A partir desta fase também são encontradas esclereídes nas camadas periféricas do pericarpo de „Giombo’ (Figura 3C). Nas demais

camadas do parênquima o processo de expansão celular continua e, nas duas cultivares, são verificadas células taníferas mais alongadas, acompanhando ou não os feixes vasculares (Figura 3D). No parênquima ainda ocorrem os diferentes padrões de acúmulo de taninos nas células taníferas, sendo que naquelas cujo acúmulo é acentuado o vacúolo ocupa quase todo o volume celular (Figura 3E).

Na fase **e**, período pós-antese, ocorre o secamento do pistilo e a queda da corola em „Giombo' e „Fuyu'. O aumento do número de células do fruto ainda está ocorrendo, confirmada pela alta densidade de células taníferas obtidas no mês de outubro e sua estabilização nos meses subsequentes (Figura 4A). Nas duas cultivares, o acúmulo de taninos mais frequente é do tipo homogêneo, sendo que as drusas antes dispersas no parênquima passam a ficar concentradas nas camadas mais externas, entre as esclereídes e a epiderme.

Nas demais fases de desenvolvimento (fases **f-j**) de „Giombo' e „Fuyu', após as células cessarem as divisões e as diferenciações, observa-se o afastamento das células epidérmicas em „Giombo' (Figuras 3F), que deixam de apresentar paredes anticlinais altas devido ao alongamento celular no sentido periclinal em „Fuyu' (Figura 3G). A cutícula também se torna mais espessa e passa a preencher os espaços intercelulares que surgem na epiderme (Figura 3F). As esclereídes se encontram presentes até o final da maturação dos frutos, conferindo dureza e resistência ao pericarpo (Figura 3G). Nas células taníferas se observa o aumento do espaço entre o vacúolo e a parede celular (Figura 3H). Os espaços intercelulares no parênquima são ampliados (Figuras 3F-G) e passam a ser preenchidos por polissacarídeos, em especial, pectinas (Figura 3I) resultantes da degradação parietal que caracteriza a maturação e senescência dos frutos. Não são mais observadas drusas nas camadas periféricas do pericarpo a partir da fase **f** do desenvolvimento em ambas as cultivares.

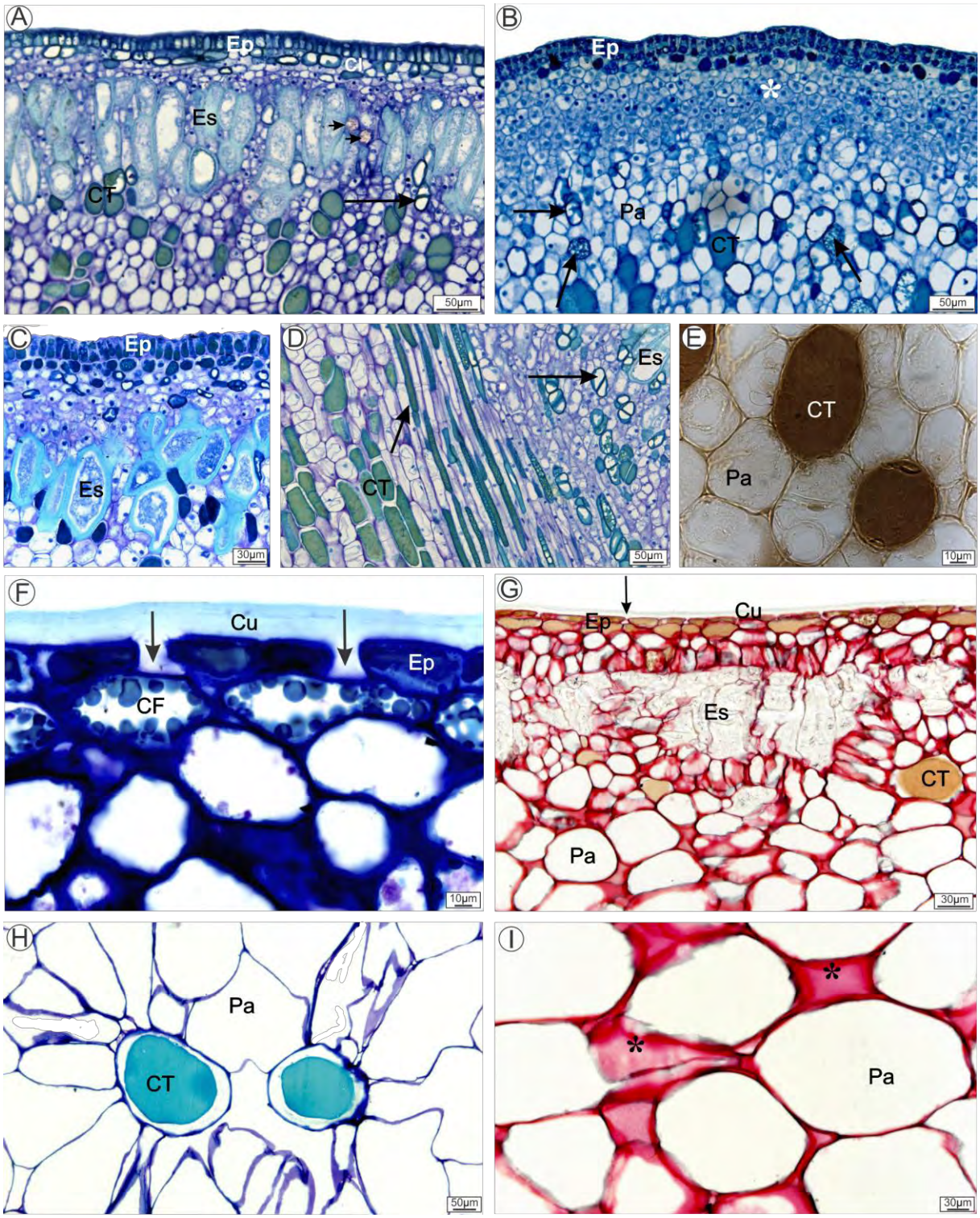

Figura 3 - Secções transversais (A-C; E-I) e secção longitudinal (D) das fases de desenvolvimento do ovário e frutos de caquizeiro 'Giombo' (B, C, D, F, H, I) e 'Fuyu' (A, E, G). A. Esclereídes, drusas (pontas de seta) e células taníferas com acúmulo inicial nas camadas externas do parênquima na fase **c** (seta). B**.** Esclereídes ausentes na fase **c**. Notar camadas de células com núcleos evidentes (*) e células com diferentes padrões de acúmulo (setas). C. Aparecimento de esclereídes no parênquima na fase **d**. D. Células taníferas alongadas e em diferentes estágios de acúmulo na fase **d** (setas). E. Células taníferas com preenchimento homogêneo após reação com cloreto férrico na fase **e**. F. Fruto em expansão celular (fase **g**). Notar os espaços entre as células epidérmicas (setas) e o acúmulo de fenóis na hipoderme. G-I. Fase de maturação dos frutos (fases **i** e **j**) mostrando o acúmulo de pectinas (*), coradas pelo vermelho de rutênio, nos espaços intercelulares (G, I) e células taníferas com vacúolo preenchido. CF= Célula Fenólica, CT= Célula Tanífera, Cu= Cutícula, Ep= Epiderme, Es= Esclereídes, Pa= Parênquima

A análise de variância demonstrou que ocorreu interação para os parâmetros quantitativos avaliados (P<0,01) (Figura 1-anexo). A densidade de células taníferas foi maior em outubro, tanto para „Fuyu' quanto para „Giombo' (Figura 4A). Comparando as duas cultivares, „Giombo' obteve maior densidade de células taníferas que „Fuyu' durante todo o desenvolvimento. Para as duas cultivares, ao longo do tempo, os valores de densidade se mantiveram estáveis, fato que indica que em novembro a divisão celular cessou.

Para o índice, que leva em consideração o número de células taníferas em relação ao número de células do parênquima, os valores oscilaram durante o desenvolvimento nas duas cultivares (Figura 4B). Considerando cada período mensal, „Giombo' apresentou valores maiores, com exceção nos meses de outubro e dezembro.

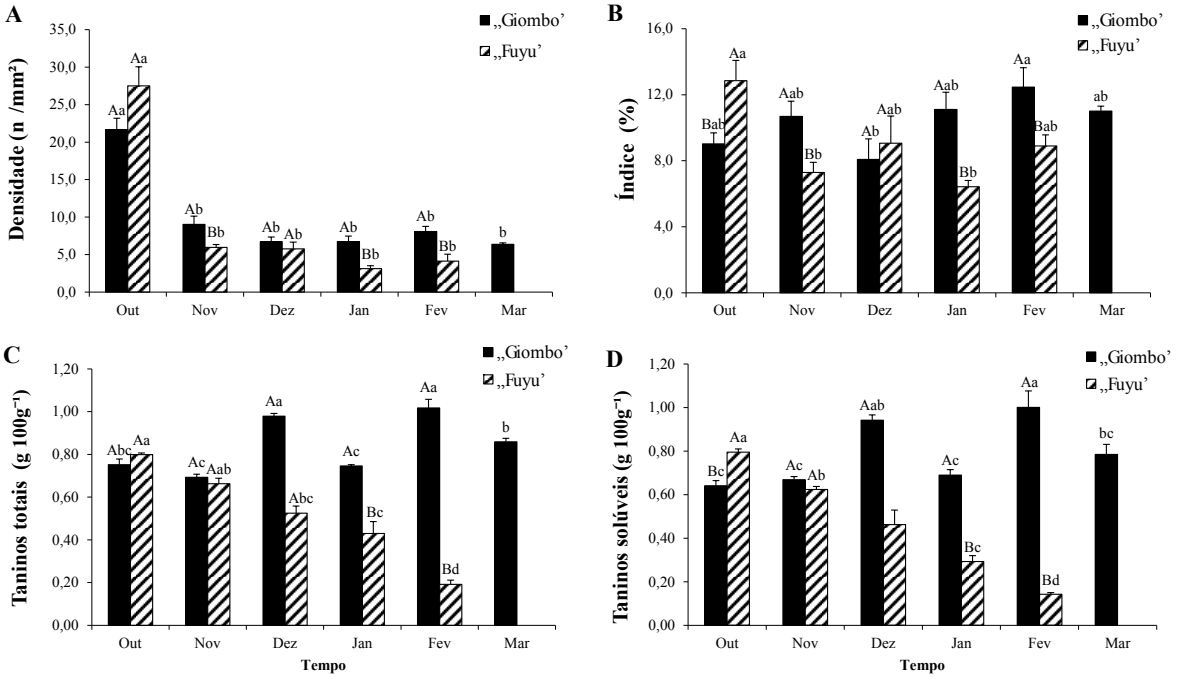

Figura 4 - Valores de densidade (A) e índice (B) de células taníferas, teores de taninos totais (C) e solúveis (D) em frutos de caquizeiros „Giombo' e „Fuyu' durante o desenvolvimento (seis e cinco períodos de coleta, respectivamente). Letras maiúsculas comparam as cultivares em cada período de coleta e as letras minúsculas comparam o efeito das épocas de coleta para cada cultivar. Valores médios com letras diferentes são significativos pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras verticais representam o erro padrão

Em „Fuyu', houve redução dos taninos totais e solúveis ao longo do desenvolvimento, porém em „Giombo', embora tenha ocorrido oscilação, os valores se mantiveram elevados durante todo o período (Figuras 4C-D). Ao final do desenvolvimento e maturação os teores de taninos solúveis, compostos responsáveis pela adstringência, se mantiveram mais elevados em „Giombo' do que em „Fuyu', atingindo valores de 0,785 g 100 g^{-1} e 0,141 g 100 g^{-1} (Figura 4D).

2.3.1 Discussão

Na cultivar adstringente „Giombo' e não-adstringente „Fuyu', ocorreu a diferenciação precoce das células taníferas na fase de aparecimento do botão floral. Nesta fase, o tecido meristemático se encontra em intensa divisão celular, sendo possível identificar as células diferenciadas somente através do início do acúmulo dos taninos em diferentes padrões. Yonemori et al. (1997) também relata o aparecimento de células taníferas antes da antese em „Fuyu' e „Hiratenenashi'.

Nas duas cultivares analisadas, os diferentes padrões de acúmulo de taninos surgem numa sequência de eventos, sendo que alguns deles aparecem em fases distintas do desenvolvimento dos frutos e outros ocorrem simultaneamente. Embora os diferentes padrões descritos tenham sido observados por outros autores Martini et al. (2008); Franceschi et al. (1998), Yonemori et al. (1997); Chafe e Durzan (1973) ainda não havia evidências de que os padrões caracterizassem uma sequência de eventos como foi demonstrada neste estudo. A presença de polifenóis próximo à parede celular, a qual caracteriza o primeiro estágio de acúmulo verificado no presente estudo, foi descrita por Yonemori et al. (1997) em ovário de caquis 'Fuyu' e 'Hiratananenashi' e por Franceschi et al. (1998) no floema secundário de *Picea abies* (Norway spruce). A formação de estruturas vesiculares nas fases iniciais do acúmulo dos taninos observada no presente estudo também foi descrita em cotilédones de espécies de *Theobroma* (Sterculiaceae) (MARTINI et al., 2008).

O padrão homogêneo interrompido por áreas não preenchidas por tanino verificado nas duas cultivares também é visualizado em espécies de *Theobroma* (MARTINI et al., 2008), em *Picea abies* (FRANCESCHI et al., 1998) e em *Picea glauca* (Pinaceae) (CHAFE; DURZAN, 1973). Yonemori e Matsushima (1987a, 1987b) comentam sobre a presença de poros na parede das células taníferas em „Fuyu' os quais se fecham coincidindo com o período de acúmulo de taninos e com o crescimento da célula, período que, segundo os autores, precede a condensação dos taninos. A presença de poros na parede celular não foi visualizada no presente estudo nem descrita por outros autores (YANG et al., 2005; YONEMORI et al., 1997; CHAFE; DURZAN, 1973).

A fase final do acúmulo que é de forma homogênea e compacta também é observada em outros estudos com células taníferas em caquizeiros (YONEMORI et al., 1997) e em outras espécies (MARTINI et al., 2008, FRANCESCHI et al., 1998, CHAFE; DURZAN, 1973).

Os diferentes modos de acúmulo descritos nas duas cultivares não resultam de artefato provocado pela fixação conforme propõe Martini et al. (2008); Durzan et al. (1973) e Curgy

(1968). De acordo com Martini et al. (2008) as células polifenólicas apresentam uma complexa citoarquitetura e, após a fixação em glutaraldeído a secreção fenólica exibe um só conteúdo ou fragmenta-se em várias gotas esféricas. No entanto, em amostras preparadas sem fixação, congeladas e capturadas as imagens, os padrões se repetem como verificado por outros autores (COLE; ALDRICH, 1971).

As possíveis organelas envolvidas com a síntese de taninos são plastídios (MUELLER; BECKMAN, 1974), dictiossomos (GINSBURG, 1967) e retículo endoplasmático (CHAFE; DURZAN, 1973; MARTINI et al., 2008). Um novo modelo de biossíntese de taninos foi proposto por Brillouet et al. (2013), no qual os taninos são polimerizados numa nova organela derivada do cloroplasto, o tanosomo. São formadas esferas com taninos em seu interior a partir dos tilacóides e grupos são encapsulados por uma membrana resultante da dupla membrana do cloroplasto, promovendo o transporte pelo citosol até o vacúolo, onde são invaginados pelo tonoplasto, agregados e armazenados no vacúolo. Na análise ultraestrutural aqui realizada não foi possível identificar a origem das estruturas vesiculares que se proliferam no início do acúmulo dos taninos nas células.

Nas fases iniciais de desenvolvimento, além dos idioblastos que acumulam taninos, há cristais e também a diferenciação de esclereídes. Os cristais podem estar associados à regulação do cálcio dos tecidos, aumento da rigidez de tecidos da planta, proteção contra herbivoria e desintoxicação de metais (FRANCESCHI; NAKATA, 2005; NAKATA, 2003). Nas fases finais do desenvolvimento e maturação dos frutos, as drusas já não eram mais observadas, provavelmente tenha havido a realocação de cálcio para as células das camadas mais externas as quais são mais resistentes no pericarpo dos frutos de caquizeiro.

Os padrões de acúmulo de taninos em „Fuyu' (PCNA), não adstringente, e em 'Giombo' (PVA) adstringente, são similares, porém o que as diferencia são o número de células taníferas e de teores de taninos solúveis ao longo do desenvolvimento. „Giombo' apresentou valores de densidade de células taníferas e índice superiores ao de „Fuyu' em quase todos os períodos avaliados, com exceção do mês de outubro, que ambas cultivares apresentaram elevada densidade de células taníferas (outubro). Após este período houve uma estabilização da densidade, o que indica que a diferenciação das células taníferas cessa em estágios iniciais (fase **e**).

De acordo com Yonemori e Matsushima (1985), o número de células taníferas por unidade de área é pouco variável nos quatro grupos de caqui, as células taníferas em frutos PCNA param o crescimento precocemente e apresentam menor tamanho no final do

desenvolvimento, enquanto que caquis de polinização PVNA, PVA e PCA continuam seu crescimento. Resposta similar foi verificada por Yonemori et al. (1987**a**) ao comparar a área de células taníferas de „Fuyu' (PCNA), que apresentou valores menores e mais estáveis que „Hiratanenashi' (PVA).

Quanto à adstringência, „Fuyu' apresentou redução dos taninos solúveis e totais desde outubro, coincidindo com a paralização da diferenciação das células taníferas. De acordo com Matsuo e Itoo (1982), a perda natural da adstringência em cultivares PCNA parece responder a um mecanismo mais complexo, pois na maioria das cultivares deste grupo ocorre produção baixa ou nula de acetaldeído, devendo-se ao menor número e paralização do crescimento das células taníferas. Na maturação, „Fuyu' apresentou quantidades de 0,141 g $100g^{-1}$ de taninos solúveis, sem percepção da adstringência. No entanto, „Giombo' manteve teores elevados de taninos solúveis até a maturação comercial, confirmando a necessidade de tratamento para a remoção da adstringência.

2.4 Conclusões

A diferença na adstringência dos frutos nas duas cultivares analisadas está relacionada à densidade de células taníferas e aos teores de taninos totais e solúveis, pois não houve diferenças quanto ao início do acúmulo de taninos e aos padrões de acúmulo durante a diferenciação celular.

Referências

AKAGI, T.; IKEGAMI, A.; TSUJIMOTO, T.; KOBAYASHI, S.; SATO, A.; KONO, A.; YONEMORI, K. DkMyb4 is a Myb transcription factor involved in proanthocyanidin biosynthesis in persimmon fruit. **Plant Physiolology,** Rockville, v. 151, p. 2028–2045, 2009.

BRILLOUET, J.M; ROMIEU, C.; SCHOEFS, B.; SOLYMOSI, K.; CHEYNIER, V.; FULCRAND, H.; VERDEIL, J.L.; CONÉJÉRO, G. The tannosome is an organelle forming condensed tannins in the chlorophyllous organs of Tracheophyta. **Annals of Botany**, Oxford, v. 112, p. 1-12, 2013.

CANTERI, M.G.; ALTHAUS, R.A.; VIRGENS FILHO, J.S.; GIGLIOTI, E.A.; GODOY, C.V. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, Ponta Grossa, v. 1, n. 2, p. 18-24, 2001.

CHAFE, S.C.; DURZAN, D.J. Tannin inclusions in cell suspension cultures of White Spruce. **Planta**, Berlin, v. 113, p. 251-262, 1973.

COLE, G.T.; ALDRICH, H.C. Demonstration of myelin figures in unfixed, freezeetched fungus spores. **Journal Cell Biology**, New York, v. 51, n.3, p. 873-874, 1971.

CURGY, J.J. Influence du mode de fixation sur la possibilité d'observer des structures myeliniques dans les hepatocytes d'embryons de poulet. **Journal Microscopie**, Oxford, v. 7, p. 63-80, 1968.

EDAGI, F.K.; KLUGE, R.A. Remoção de adstringência de caqui: um enfoque bioquímico, fisiológico e tecnológico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 2, p. 585-594, 2009.

FAO. **Food Agricultural Organization statistical:** agricultural data, 2009. Disponível em: <http://faostat.fao.org/faostat/collections>. Acesso em: 20 jan. 2012.

FRANCESCHI, V.R.; NAKATA, P.A. Calcium oxalate in plants: formation and function. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 41-71, 2005.

FRANCESCHI, V.R.; KREKLING, T.; BERRYMAN, A.A; CHRISTIANSEN, E. Specialized phloem parenchyma cells in Norway spruce (Pinaceae) bark are an important site of defense reactions. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 85, n. 5, p. 601-615, 1998.

GINSBURG, C. The relation of tannins to the differentiation of the root tissues in *Reaumuria palaestina*. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 128, n.1, p. 1-10, 1967.

HANDIQUE, J.G.; BARUAH, J.B. Polyphenolic compounds: an overview. **Reactive and Functional Polymers,** Amsterdam, v. 52, p. 163–188, 2002.

IKEGAMI, A.; EGUCHI, S.; KITAJIMA, A.; INOUE, K.; YONEMORI, K. Identification of genes involved in proanthocyanidin biosynthesis of persimmon (*Diospyros kaki*) fruit. **Plant Science**, Amsterdan, v. 172, p. 1037–1047, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/>. Acessado em: 22 jan. 2012.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book, 1940. 523p.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138, 1965.

LIU, Y.; SHI, Z.; MAXIMOVA, S.; PAYNE, M.J; GUILTINAN, M.J. Proanthocyanidin synthesis in *Theobroma cacao*: genes encoding anthocyanidin synthase, anthocyanidin reductase, and leucoanthocyanidin reductase. **BMC Plant Biology**, London, v. 13, n. 202, p. 1-19, 2013.

MARTINI, M.H.; FIGUEIRA, F.; LENCI, C.G.; TAVARES, D.Q. Polyphenolic cells and their interrelation with cotyledon cells in seven species of *Theobroma* (Sterculiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 425-431, 2008.

MATSUO, T.; ITOO, S. A model experiment for de-astringency of persimmon fruit with high carbón dioxide treatment: in vitro gelation of kaki-tannin by reacting with acetaldehyde. **Agricultural Biology Chemistry**, Tokyo, v. 46, n. 3, p. 683-689, 1982.

MUELLER, W.C.; BECKMAN, C.H. Ultra structure of the phenol storing cells in roots of banana. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 4, n. 1, p. 187–188, 1974.

NAKATA, P.A. Advances in our understanding of calcium oxylate crystals formed in plants. **Plant Science**, Amsterdam, v. 164, n. 6, p. 901-909, 2003.

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain for electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 17, p. 208-212, 1963.

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, Baltimore, v. 48, n. 5, p. 247-249, 1973.

STRASBURGER, E. **Handbook of practical botany**. New York: The MacMillan, 1924, 118 p.

TAIRA, S. Adstringency in persimmon. **Modern Methods of Plants Analysis**, Berlin, v. 18, p. 97-110, 1996.

YANG, Y.; RUAN, X.; WANG, R.; LI, G. Morphological characteristics under microscope of tannin cells in persimmon fruit. **Acta Horticulturae**, Jinju, n. 685, p. 135-141, 2005.

YONEMORI, K.; MATSUSHIMA, J. Property of development ofthe tannin cells in non-astringent type fruits of Japanese persimmon (*Diospyros kaki*) and its relationship to natural deastringency. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v. 54, p. 201-208, 1985.

_____. Changes in tannin cell morphology with growth and development of Japanese persimmon fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 112, n. 5, 817-821, 1987a.

_____. Morfological characteristics of tannin cells in japonese persimmon fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 112, n.5, p. 812-817, 1987b.

YONEMORI, K.; OSHIDA, M.; SUGIURA. Fine structure of tannin cells in fruit and callus tissues of persimmon. **Acta Horticulturae**, Chang Mai, n. 436, p. 403-416, 1997.

ZHAO, J., PANG, Y., DIXON, R.A. The mysteries of proanthocyanidin transport and polymerization. **Plant Physiolology**, Rockville, v. 153, p. 437-443, 2010.

3 O PROCESSO DE MATURAÇÃO DE FRUTOS DE CAQUIZEIROS ADSTRIGENTES E NÃO ADSTRINGENTES E SUA RELAÇÃO COM AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E ESTRUTURAIS

Resumo

O objetivo deste estudo foi analisar frutos de caquizeiros adstringentes (PVA): „Rojo Brillante' e „Giombo' e não adstringentes (PCNA): 'Fuyu' e 'Hana Fuyu', na busca do entendimento das relações entre as características físico-químicas e estruturais e o processo de maturação dos frutos adstringentes e não adstringentes. Os frutos foram colhidos em sete estádios de maturação e submetidos a análises físico-químicas de diâmetro, peso fresco, coloração da casca, firmeza de polpa, sólidos solúveis, taninos solúveis e capacidade antioxidante. As análises anatômicas foram realizadas ao microscópio de luz (ML) e ao microscópio eletrônico de varredura a baixas temperaturas (Cryo-SEM). Não houve relação entre a redução da firmeza e a perda natural da adstringência nas cultivares PCNA. Nas cultivares PVA ocorreu redução da firmeza e dos taninos solúveis durante o avanço da maturação em „Rojo Brillante', enquanto em „Giombo', o teor de taninos solúveis permaneceu elevado mesmo com firmeza de polpa próxima a zero. Os sólidos solúveis, os taninos solúveis e a capacidade antioxidante apresentaram resultados diferenciados para cada grupo. A redução da capacidade antioxidante verificada nas cultivares PCNA pode estar relacionada à oxidação dos taninos durante a perda natural da adstringência. Nas células taníferas, o conteúdo do vacúolo se apresentava homogêneo ou com o aspecto alveolar. Este padrão parece estar associado à polimerização dos taninos, pois foi mais evidente quando as cultivares começaram a apresentar redução na porcentagem de taninos solúveis.

Palavras-chave: Adstringência; Caquis; Célula tanífera; Cryo-SEM; Maturação

Abstract

The aim of this study was to analyze the fruits of astringent persimmon (PVA): „Rojo Brillante' and „Giombo' and non-astringent (PCNA): 'Fuyu' e 'Hana Fuyu', seeking to understand the relations between the physicochemical and structural characteristics and maturation process of astringent and non-astringent fruits. The fruits were harvested in seven maturity stages and submitted to physicochemical analysis in diameter, fresh weight, skin color, pulp firmness, soluble solids, soluble tannins and antioxidant capacity. The anatomical analyzes were performed by Light Microscopy (LM) and Cryo Scanning Electron Microscopy (Cryo-SEM). There was no relation between reduced firmness and natural astringency loss in PCNA cultivars. In PVA cultivars occurred reduced firmness and soluble tannins during advance of ripening of „Rojo Brillante', while in „Giombo', the soluble tannins remained high even with firmness of flesh next to zero. Soluble solids, soluble tannins and antioxidant capacity showed different results for each group. The reduction in antioxidant capacity found in PCNA cultivars may be related to oxidation of tannins during natural loss of astringency. In tannin cells the vacuole content is presented with the alveolus or homogeneous appearance. This pattern appears to be associated with the tannins polymerization, since it was more evident when the cultivars started showing reduction in soluble tannins percentage.

Keywords: Astringency; Cryo-SEM; Maturation; Persimmons; Tannin cells

3.1 Introdução

As cultivares de caquizeiros (*Diospyros kaki* L.) são classificadas em quatro grupos, de acordo com a adstringência e com as mudanças de cor da polpa devido à presença de sementes (YONEMORI et al., 2003; SUGIURA, 1983; KITAGAWA; GLUCINA, 1984). Os grupos são de polinização constante (PC), em que a cor da polpa dos frutos não muda quando polinizados; e polinização variável (PV), os frutos apresentam polpa clara, quando não polinizados (sem sementes), e escura (vermelho-acastanhada), quando polinizados (com sementes). Os dois grupos são subdivididos em Adstringentes (A), os frutos só perdem a adstringência quando muito maduros e moles ou comercialmente necessitam de tratamentos para remoção da adstringência e Não adstringentes (NA), quando os frutos perdem sua adstringência durante a maturação e se tornam aptos para consumo (SUGIURA, 1983).

Embora alguns autores mencionem que a principal causa da perda natural da adstringência em frutos PCNA seja a interrupção precoce do desenvolvimento das células taníferas no pericarpo e a condensação dos taninos durante a maturação (YONEMORI; MATSUSHIMA, 1985, 1987), o mecanismo de perda da adstringência neste grupo ainda não foi esclarecido completamente (BESADA et al., 2012b). Já nos frutos PVA com ausência total de sementes persistem altos índices de taninos solúveis nos estádios finais da maturação.

Os taninos solúveis (hidrolisáveis), responsáveis pela adstringência, incluem os galotaninos e os elagitaninos, enquanto os taninos insolúveis (condensados) são formados pela polimerização de unidades de catequina e epicatequina (HANDIQUE; BARUAH, 2002). Os taninos solúveis possuem elevada capacidade antioxidante (BERNARDES et al., 2011; PAIVA et al., 2002), e estudos com caquis revelam que esta é diferenciada entre cultivares adstringentes e não adstringentes (JANG et al., 2011) e após a destanização ocorre a redução drástica da capacidade antioxidante devido à polimerização dos taninos solúveis (BESADA et al., 2012a).

Além da variação nos teores de taninos solúveis e insolúveis e da capacidade antioxidante, durante o amadurecimento dos frutos, há modificações de coloração devido à degradação da clorofila e ao aumento do conteúdo de pigmentos carotenoides, aumento dos sólidos solúveis (KRAMMES et al., 2007; CHITARRA; CHITARRA, 2005), bem como a redução da firmeza devido à desestruturação da parede celular (SALVADOR et al., 2007).

Neste contexto, o objetivo foi analisar frutos de caquizeiros PVA, „Rojo Brillante' e „Giombo', e PCNA, 'Fuyu' e 'Hana Fuyu', na busca do entendimento das relações entre as características físico-químicas e estruturais e o processo de maturação dos frutos adstringentes e não adstringentes.

Desenvolvimento

3.2 Material e métodos

Material vegetal

Frutos de caquizeiros (*Diospyros kaki* L.) adstringentes (PVA): 'Rojo Brillante' (RB) e 'Giombo' (Gi) e não adstringentes (PCNA): 'Fuyu' (Fu) e 'Hana Fuyu' (HF) (Figura 1) foram colhidos em sete estádios durante a maturação em Valencia, Espanha, de setembro de 2012 a janeiro de 2013. Os frutos foram coletados em intervalos médios de 15 dias. Foi utilizado como parâmetro de maturação a evolução da cor da casca (índice de cor na primeira coleta em torno de -10: verde) e firmeza do mesocarpo, até estádios em que os frutos atingiram firmeza reduzida. Após as coletas os frutos foram levados para o laboratório de pós-colheita do Instituto Valenciano de Investigações Agrarias (IVIA) para as avaliações. As análises estruturais foram realizadas no laboratório de Microestrutura da Universidade Politécnica de Valencia.

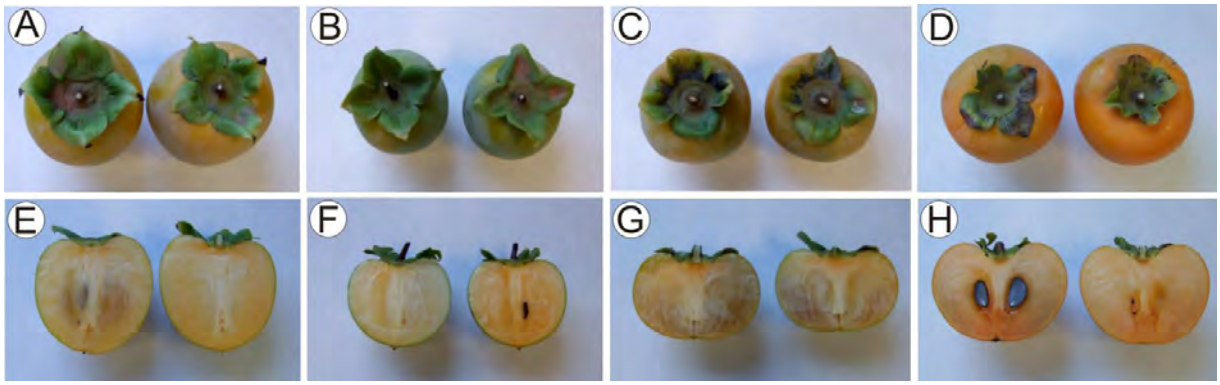

Figura 1 - Frutos de caquizeiros. A-E. 'Rojo Brillante', B-F. 'Giombo', C-G.'Fuyu' e D-H. 'Hana Fuyu' coletados em outubro de 2012, correspondendo ao estádio três de maturação (E3)

O delineamento para as coletas foi inteiramente casualizado com três frutos para as análises fisiológicas e dois para as análises estruturais. Os frutos foram divididos longitudinalmente em três amostras, sendo uma delas utilizada para determinar sólidos

solúveis e as outras duas congeladas para posterior quantificação de taninos solúveis e capacidade antioxidante.

Medidas de tamanho

O peso dos frutos foi determinado em balança analítica e o diâmetro dos frutos medidos com auxílio de paquímetro Digimatic Absolute (Mitutoyo 500-171-20).

Índice de cor

A cor da casca foi avaliada usando um colorímetro Minolta (Modelo CR-300, de Ramsey, Nova Iorque, EUA), na zona equatorial, em lados opostos do fruto. Os parâmetros de Hunter L *, a * e b* foram medidos e os resultados expressos como índice de cor (IC= 1000 a/L.b), como descrito por Jiménez-Cuesta et al. (1981).

Firmeza de polpa

Determinada através de texturômetro (Instron Corp., mod. 4301, Canton, Mass., U.S.A.) com ponteira de 8mm. Foram realizadas duas leituras por fruto após a retirada da casca e os valores médios expressos em Newtons (N).

Sólidos solúveis

Amostra do fruto foi macerada em graal e filtrada para a medição de sólidos solúveis. Foi utilizado um refratômetro (Atagomod. PR1) com duas medições por suco. Os resultados foram expressos em °Brix.

Taninos solúveis

Determinado pelo o método de Folin-Denis (TAIRA, 1995) como descrito por Arnal e Del Rio (2004), onde 5g de polpa foi homogeneizada com metanol 80% para a preparação do extrato (100 mL). Em tubos de ensaio adicionou-se 1 mL de amostra diluída, 7,5 mL de água destilada, 0,5 mL de reagente de Folin Ciocalteau 50%, 1 mL de Na_2CO_3 supersaturado e homogeneizado em agitador. Depois de 1 hora, no escuro, a absorbância foi lida em leitor de microplacas, (Labsystem Multiscan MS, Tiilitie, Vantaa, Finlândia) a 725nm, com seis replicatas e os resultados expressos em porcentagem de peso fresco (% pf).

Capacidade antioxidante

Determinada pelo método de Brand-Williams et al. (1995). Este método baseia-se na captura do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) por antioxidantes, o que produz uma diminuição na absorção a 515 nm. Quando uma solução de DPPH é misturada com uma substância que pode doar um átomo de hidrogênio, a forma reduzida do radical gerado é acompanhada de perda de cor (ALI et al., 2009). Para obtenção do extrato foi utilizado 2 g de polpa e metanol 100 % para volume de 50 mL. As amostras foram preparadas em microplacas usando 300 µl de metanol 100 % para o branco, 300 µl de DPPH (25ppm) para o controle e 30 µl DPPH (25 ppm) + 270µl extrato para as amostras, com seis repetições para cada amostra. Uma primeira leitura foi realizada a 515 nm em Espectro Multiskan (Thermo Fisher Scientific N ° 51.118.650). Depois as amostras foram incubadas a 25˚C durante 30 minutos, e uma segunda leitura realizada. O cálculo da atividade antioxidante foi realizado através da fórmula: % Inibição = $(A_{DPPH} - A_{Extr})/A_{DPPH})*100$, onde A_{DPPH} é a absorbância da solução de DPPH e A_{Extr} é a absorbância da amostra em solução.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias das amostras comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade através do programa estatístico SASM-Agri (CANTERI et al., 2001). Tabela de comparação de médias apresentada em anexos (Tabela 2).

Análise estrutural ao Cryo-SEM

Para a análise ao microscópio eletrônico de varredura a baixas temperaturas (Cryo-SEM), os cubos foram cortados na zona equatorial ($3mm^3$), perpendicular ao eixo principal do pericarpo dos frutos, com uma lâmina de aço inoxidável. Esses cubos foram então imersos em nitrogênio (-210˚C) e, em seguida, transferidos para o cryo-trans (CT 15000C da Oxford Instruments, Oxford, Inglaterra), ligado a um microscópio eletrônico de varredura JEOLJSM 5410 (JEOL, Tóquio, Japão), que opera a uma temperatura inferior a -130˚C. As amostras foram fraturadas a -180˚C e sublimadas a -90˚C. As observações ao microscópio foram realizados a 15 kV e a uma distância de trabalho de 15 mm.

Análise ao microscópio de luz

Para análise ao microscópio de luz, foram realizadas secções de tecido fresco da porção equatorial dos frutos com auxílio de lâmina inoxidável. As secções foram colocadas sobre lâminas histológicas, coradas com vanilina em ácido clorídrico a 10%, como um indicativo da solubilidade dos taninos, e cobertas com lamínula. Para o controle utilizou-se secções sem coloração. As imagens foram capturadas ao microscópio de luz Nikon Eclipse E800 V-PS100E (Nikon, Tokyo, Japão).

3.3 Resultados e discussão

Neste estudo, os frutos ‘Hana Fuyu' e ‘Rojo Brillante' apresentaram maior diâmetro transversal (Figura 2A), maior peso fresco (Figura 2C) e diâmetro longitudinal (Figura 2B), indicando o tamanho superior ao das outras cultivares. Também se verificou, principalmente para estas duas cultivares, uma diminuição destes parâmetros a partir do estádio E5, ocorrido em função da perda de água devido ao avançado estágio de maturação (Figura 2C), evidenciado pelo aspecto desidratado dos frutos. Os frutos ‘Giombo', seguido de ‘Fuyu', apresentaram baixo incremento de peso e tamanho ao longo de todo período, resultando em frutos menores. De acordo com Kays (1991), o peso de um fruto está relacionado linearmente com o seu grau de desenvolvimento e/ou amadurecimento, exceto quando se encontra em estádio avançado de maturação, quando apresenta tendência a perder massa fresca em decorrência do maior teor de umidade e de maior permeabilidade da casca. As diferenças de tamanho e peso aqui observadas refletiram as características varietais, sendo o tamanho e a forma atributos determinantes na classificação de categorias para comercialização e importantes na escolha do produto pelo consumidor (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Em conjunto com o aumento do tamanho dos frutos, ocorreu a evolução da coloração. No primeiro estádio (E1), todas as cultivares apresentaram coloração verde, com valores entre -9,44 a -7,71 para índice de cor (Figura 2D). A partir do segundo estádio (E2), os frutos das cultivares iniciaram a mudança de coloração. ‘Hana Fuyu' obteve o maior incremento no índice de cor em todos os estádios e ao final da maturação obteve índice de cor de 52,28, enquanto que as demais cultivares obtiveram valores em torno de 43,00.

Os frutos ‘Giombo' apresentaram o menor incremento de cor ao longo do tempo, com valor significativamente maior nos últimos dois estádios, o que era esperado para uma cultivar de colheita tardia. Segundo Salvador et al. (2006) o ponto de colheita de caquis é determinado pela coloração externa dos frutos a qual reflete as mudanças físico-químicas que ocorrem durante a maturação. Além disso, diferenças na coloração entre as cultivares refletiram a

associação entre o ganho de cor durante a maturação e as características genéticas da cultivar conforme descrito (BORRÁS, 2012).

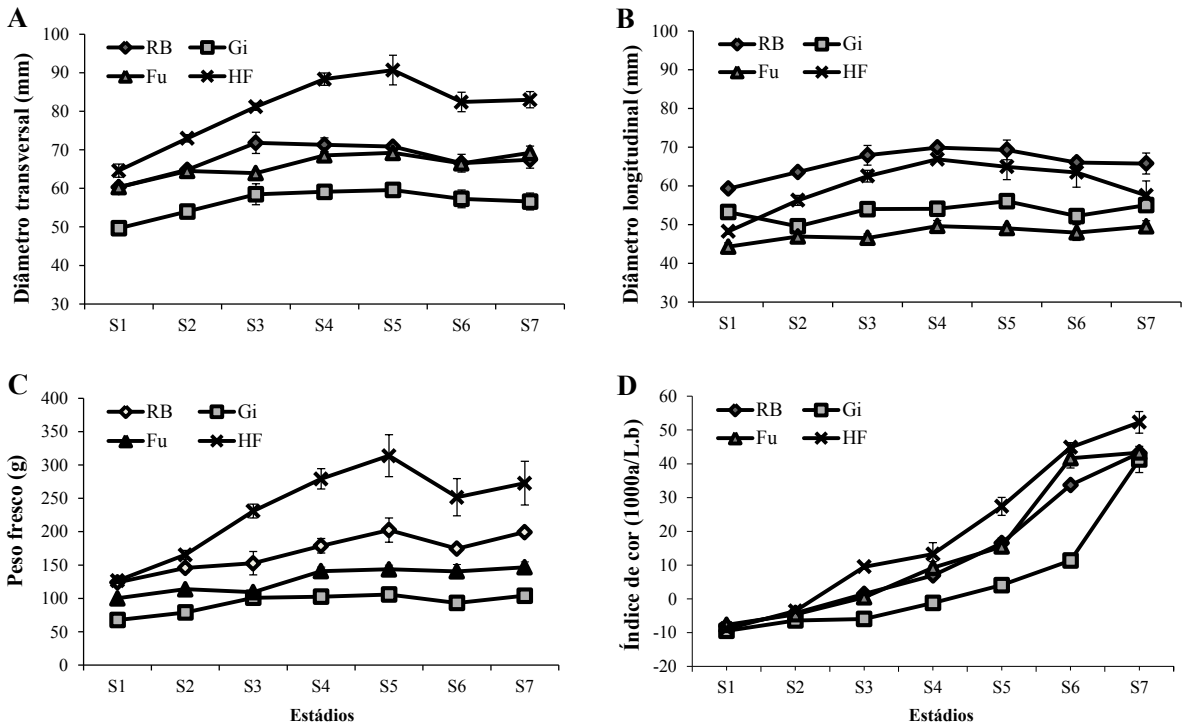

Figura 2 - Diâmetro transversal (A), longitudinal (B), peso fresco (C) e índice de cor (D) de frutos de caquizeiros ‘Rojo Brillante' (RB), ‘Giombo' (Gi), ‘Fuyu' (Fu) e ‘Hana Fuyu' (HF) em sete estádios de maturação. As barras verticais representam o erro padrão da média (n=3)

Em relação à firmeza, no primeiro estádio (E1), as duas cultivares não adstringentes, ‘Fuyu' e ‘Hana ‘Fuyu', apresentaram valores mais elevados (90,45 e 91,32 N), oscilando durante o avanço da maturação (Figura 3A). A diminuição da firmeza em ‘Hana Fuyu' ocorreu de forma mais drástica a partir do E4 e atingiu valores abaixo do mínimo exigido comercialmente em E5 (menor que 10 N), pois o estádio de maturação estava mais avançado que nas demais cultivares. ‘Rojo Brillante' obteve valores intermediários e, no E6, ainda apresentou firmeza próxima a 20 N. Comparando todas as cultivares, ‘Giombo' e ‘Fuyu' mantiveram valores de firmeza mais elevados até E6 com decréscimo após este período, o que poderia ser explicado pelo fato de serem cultivares com maturação mais tardia (BORRÁS, 2012). A manutenção da firmeza de polpa é dos mais importantes atributos, principalmente para frutos que são armazenados e destinados para o mercado externo.

Nos frutos adstringentes ‘Rojo Brillante' e ‘Giombo' os valores se mantiveram estáveis, enquanto os frutos não adstringentes, inicialmente os valores foram mais baixos,

com 13,1˚Brix em ‘Fuyu' e 14,7˚Brix em ‘Hana Fuyu' e ao final da maturação atingiram valores de 20,8˚Brix e 17,6˚Brix, respectivamente (Figura 3B). O fato das cultivares adstringentes apresentarem valores mais elevados de açúcares que as cultivares não adstringentes pode estar relacionada à quantificação de taninos solúveis juntamente com os açúcares (CHITARRA; ALVES, 2001). De acordo com os autores, apesar de os açúcares serem os mais representativos, a exatidão da medida também é afetada pela presença de outras substâncias que se encontram dissolvidas no conteúdo celular como, vitaminas, compostos fenólicos, pectinas, ácidos orgânicos, entre outras.

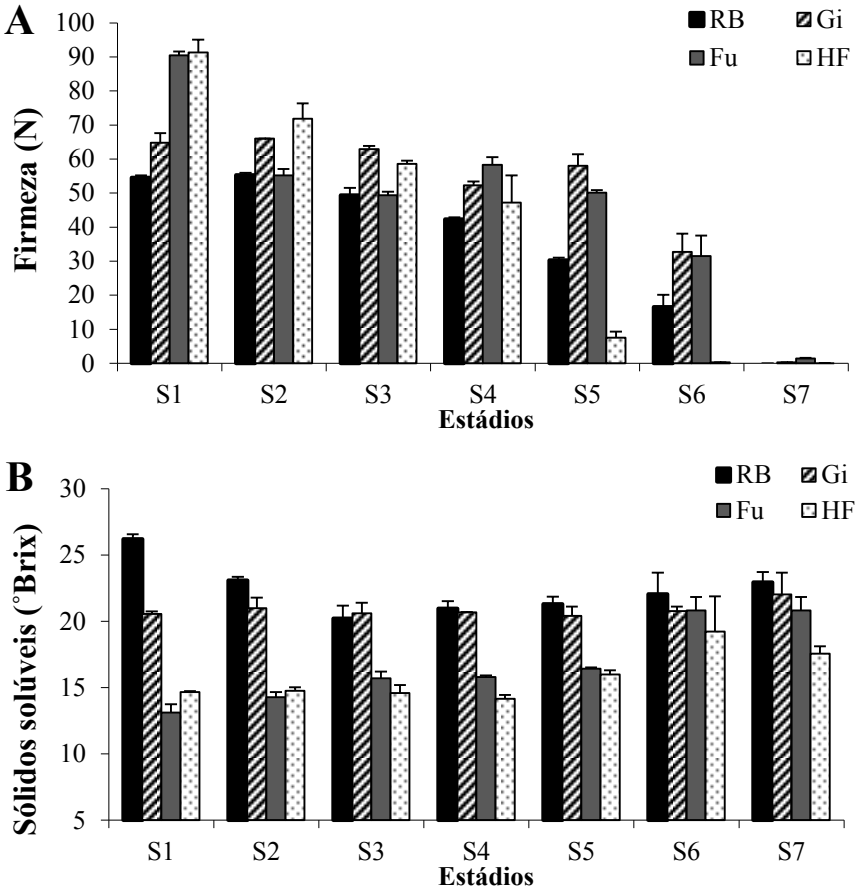

Figura 3 - Firmeza de polpa (A) e sólidos solúveis (ºBrix) (B) para frutos de caquizeiros ‘Rojo Brillante' (RB),‘Giombo' (Gi), ‘Fuyu' (Fu) e ‘Hana Fuyu' (HF) em sete estádios de maturação. As barras verticais representam o erro padrão da média (n=3)

Os taninos solúveis resultaram em valores bastante superiores nas cultivares do grupo PVA, caracterizando frutos adstringentes (Figura 4A). ‘Rojo Brillante' apresentou em E1 2,09% e em E7 0,04%, enquanto que ‘Giombo' obteve 1,87% e 0,48% de taninos solúveis, respectivamente. A persistência dos taninos solúveis em „Giombo’ comparado ao ‘Rojo Brillante' se deve provavelmente à sua maturação tardia. Em ‘Giombo', mesmo com a maturação avançada e firmeza de polpa próxima à zero, a porcentagem de taninos solúveis se manteve elevada. Nas cultivares PVA também ocorreu a redução da adstringência

naturalmente, mas para chegar a níveis aceitáveis para consumo, os frutos atingiram valores de firmeza próximos à zero, o que inviabilizaria a sua comercialização. Por isso, são necessários tratamentos de remoção da adstringência em frutos PVA que preservem a textura dos mesmos.

As cultivares do grupo PCNA, 'Fuyu' e 'Hana Fuyu', obtiveram valores baixos de taninos solúveis desde o primeiro estádio (0,29% e 0,27%) chegando a níveis muito baixos no último estádio (0,05% e 0,07%), confirmando a perda natural da adstringência durante a maturação (Figura 4A).

A perda da adstringência tanto natural está relacionada com a produção de voláteis pelas sementes (etanol e acetaldeído) os quais se ligam aos taninos solúveis, polimerizando-os (SUGIURA et al., 1979). O segundo mecanismo, constatado em frutos de cultivares do tipo PCNA, corresponde à interrupção precoce do desenvolvimento das células taníferas no pericarpo, ao menor tamanho dessas células (YONEMORI; MATSUSHIMA, 1985; 1987), ao baixo peso molecular e à menor reatividade dos taninos (TAYLOR, 1993). O menor número de células taníferas no grupo PCNA quando comparado ao grupo PVA foi confirmada nas análises quantitativas por Tessmer et al. (2012) durante o desenvolvimento de caquis „Giombo' e „Fuyu'.

A capacidade antioxidante obteve mesmo perfil para as cultivares de mesmo grupo. As cultivares 'Rojo Brillante' e 'Giombo' (PVA) obtiveram valores iniciais elevados, 82,03% e 95,86% em E1, praticamente se mantiveram constantes durante o avanço da maturação, resultando no estádio E7 em 73,02% e 81,19%. As cultivares 'Fuyu' e 'Hana Fuyu' (PCNA) obtiveram um decréscimo ao longo do período, 82,7% a 18,7% em E1 e 58,2% a 1,72% em E7 (Figura 4B).

Os resultados de capacidade antioxidante em caquis dos dois grupos indicam que pode haver relação com a perda natural da adstringência, visto que os valores decresceram ao longo do tempo somente nas cultivares PCNA. Besada et al, (2012**b**) atribuem a redução da capacidade antioxidante em caqui 'Rojo Brillante' à polimerização dos taninos solúveis após destanização.

Ainda nas cultivares PCNA foram observadas células taníferas de coloração escura (marron-avermelhada) no mesocarpo, também relatadas por Novillo et al. (2014) associadas ao estresse oxidativo dos taninos solúveis após destanização de caquis adstringentes. Os autores sugerem que as células taníferas escuras em cultivares não adstringentes também podem ocorrer devido a oxidação dos taninos solúveis durante a maturação de frutos.

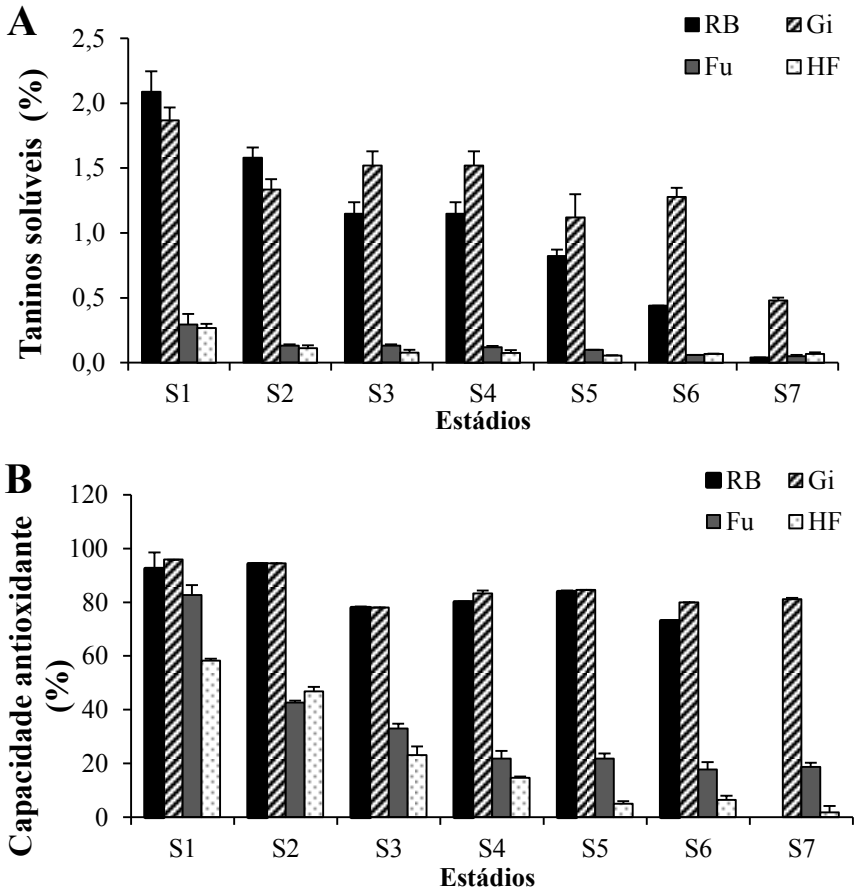

Figura 4 - Porcentagem de taninos solúveis (A) e capacidade antioxidante (B) em frutos de caquizeiros „Rojo Brillante' (RB), 'Giombo' (Gi), 'Fuyu' (Fu) e 'Hana Fuyu' (HF) emsete estádios de maturação. As barras verticais representam o erro padrão da média (n=3)

Na análise ao Cryo-SEM, nas quatro cultivares verificou-se células taníferas com conteúdo compacto e denso (Figura 5A, C, G, J, K, L) e outras com conteúdo vacuolar de aspecto alveolar (Figura 5B, D, E, F, I). Este último padrão foi mais evidente nas cultivares não adstringentes nos primeiros estádios analisados (E1 a E3), sendo que nas cultivares adstringentes, ocorreu somente a partir de E3 durante o avanço da maturação.

Mesmo em estádios avançados de maturação, como o E6 e E7, em que os frutos já se encontravam com a firmeza reduzida e fora do padrão de colheita comercial, os diferentes aspectos dos taninos ainda eram verificados. Nestes estádios avançados de maturação era evidente a desestruturação celular com rompimento da parede das células do parênquima, separação entre o tonoplasto e a membrana celular em células taníferas (Figura 5J), presença de espaços intercelulares ampliados (Figura 5K, L) e preenchimento destes espaços com materiais resultantes da degradação celular (Figura 5H, K). Também foram encontradas células taníferas com mais de um vacúolo na célula (Figura 5F).

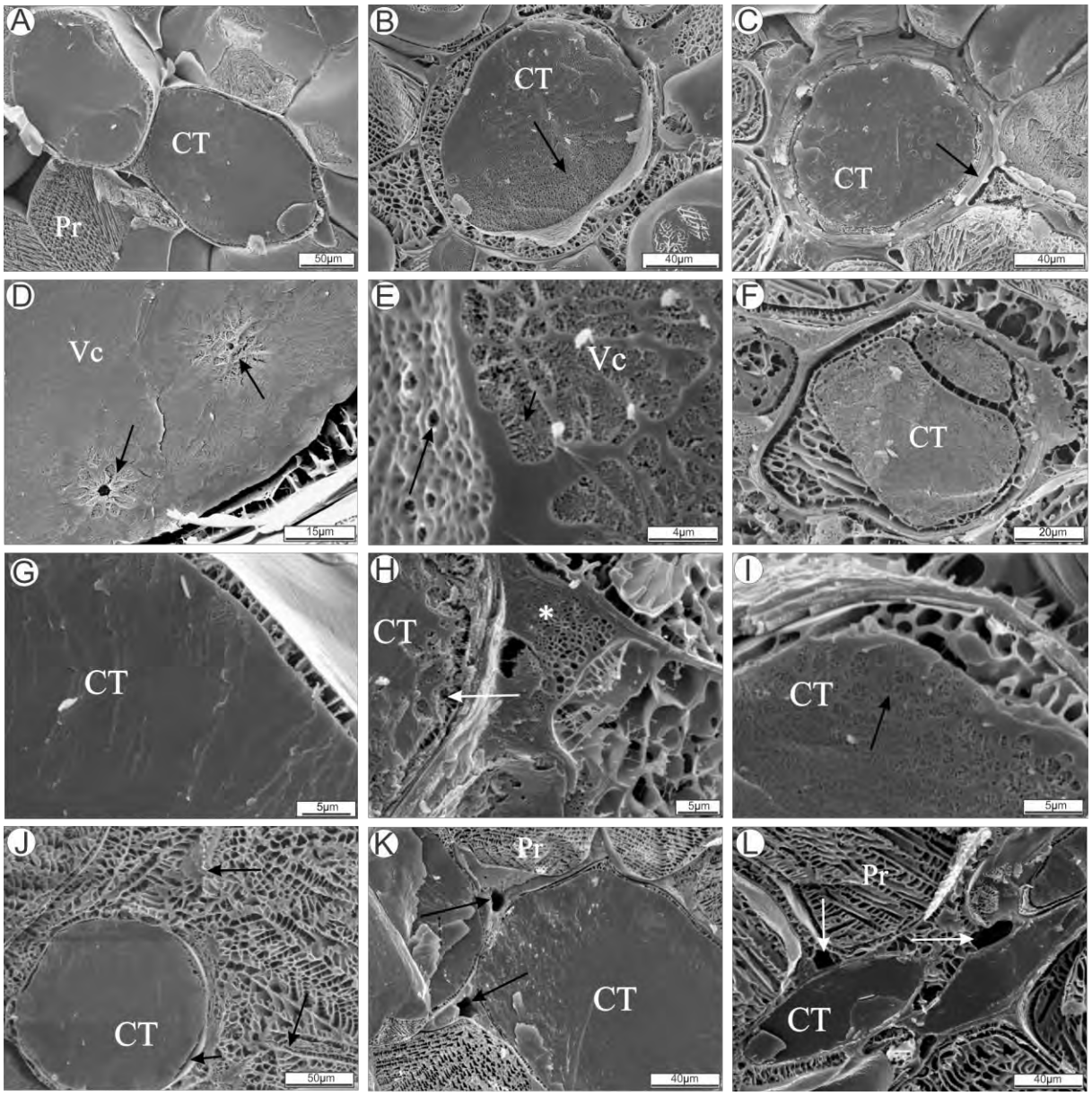

Figura 5 - Estrutura do mesocarpo de frutos de caquizeiros 'Rojo Brillante' (RB), „Giombo' (Gi), 'Fuyu' (Fu) e 'Hana Fuyu' (HF). A. Célula tanífera com conteúdo denso e compacto em RB-E1. B. Célula tanífera com conteúdo de aspecto alveolar (seta) em Fu-E1. C. Célula tanífera com conteúdo denso e compacto e parede celular espessa (seta) em HF-E1. D. Vacúolo com conteúdo de aspecto alveolar mais evidente ao redor de áreas arredondadas não preenchidas (setas) em RB-E3. E. Visão lateral do vacúolo com conteúdo tanífero e espaços com conteúdo de aspecto alveolar (seta menor) em Gi-E3. Notar a presença de poros no tonoplasto (seta maior). F. Célula tanífera com dois vacúolos em Fu-E3. G. Célula tanífera com conteúdo denso em RB-E6. H. Alteração do conteúdo tanífero na periferia do vacúolo (seta) e acúmulo de substâncias no espaço intercelular (*). I. Célula tanífera com conteúdo de aspecto alveolar (seta) em HF-E6. J. Célula tanífera com conteúdo denso e separação entre o tonoplasto e a membrana plasmática (seta menor) e rompimento das células do parênquima (setas maiores) em RB-E7. K. Célula tanífera com conteúdo denso e homogêneo e conteúdo no espaço intercelular (setas) Gi-E7. L. Célula tanífera com conteúdo denso e compacto em Fu-E7. Observar os espaços intercelulares (setas). CT= Célula Tanífera, E=Estádios de maturação, Pr= Parênquima, Vc= Vacúolo

Nas cultivares não adstringentes, as células de coloração marrom avermelhada verificadas ao ML, são verificadas ao cryo-SEM, com parede espessa e conteúdo altamente denso e compacto (Figura 5C), geralmente sem espaço entre o tonoplasto e a membrana plasmática (Figura 5L). Células taníferas com este padrão não foram encontradas nas cultivares adstringentes. O conteúdo com aspecto de "rede" visualizado nas células parenquimáticas (Figura 5A, J) resultou, provavelmente, do congelamento como também observado em caquis e em morangos analisados ao cryo-SEM por Salvador et al. (2007) e Moreno et al. (2000), respectivamente.

Na sexta coleta (E6), as células taníferas das cultivares adstringentes ainda apresentavam extravasamento de conteúdo (Figura 6I, J), principalmente em „Giombo' (Figura 6J). No entanto, nas cultivares não adstringentes o conteúdo se apresentou delimitado às células taníferas praticamente desde o primeiro estádio (Figuras 6C, D, G, H, K, L, O, P), o que indicou ter havido a rápida polimerização dos taninos solúveis, também confirmada pelos baixos teores de taninos solúveis durante todo o período de maturação (Figura 4A).

No último estádio de maturação (E7), as células parenquimáticas estavam totalmente alteradas (lise e colapso), porém as células taníferas estavam integras e dispersas no mesocarpo aquoso (Figura 6M-P). Este fato sugere que a parede das células taníferas difere das células do parênquima. Embora nas cultivares adstringentes o conteúdo tanífero estivesse restrito às células taníferas (Figura 6M, N), o teor de taninos solúveis ainda conferia adstringência aos frutos com valores de 0,44% para 'Rojo Brillante' e 1,28% para 'Giombo'. É interessante observar que as células taníferas nestas cultivares são maiores (Figura 6M, N) que aquelas das cultivares não adstringentes (Figura 6O, P) confirmando as observações de Taylor (1993).

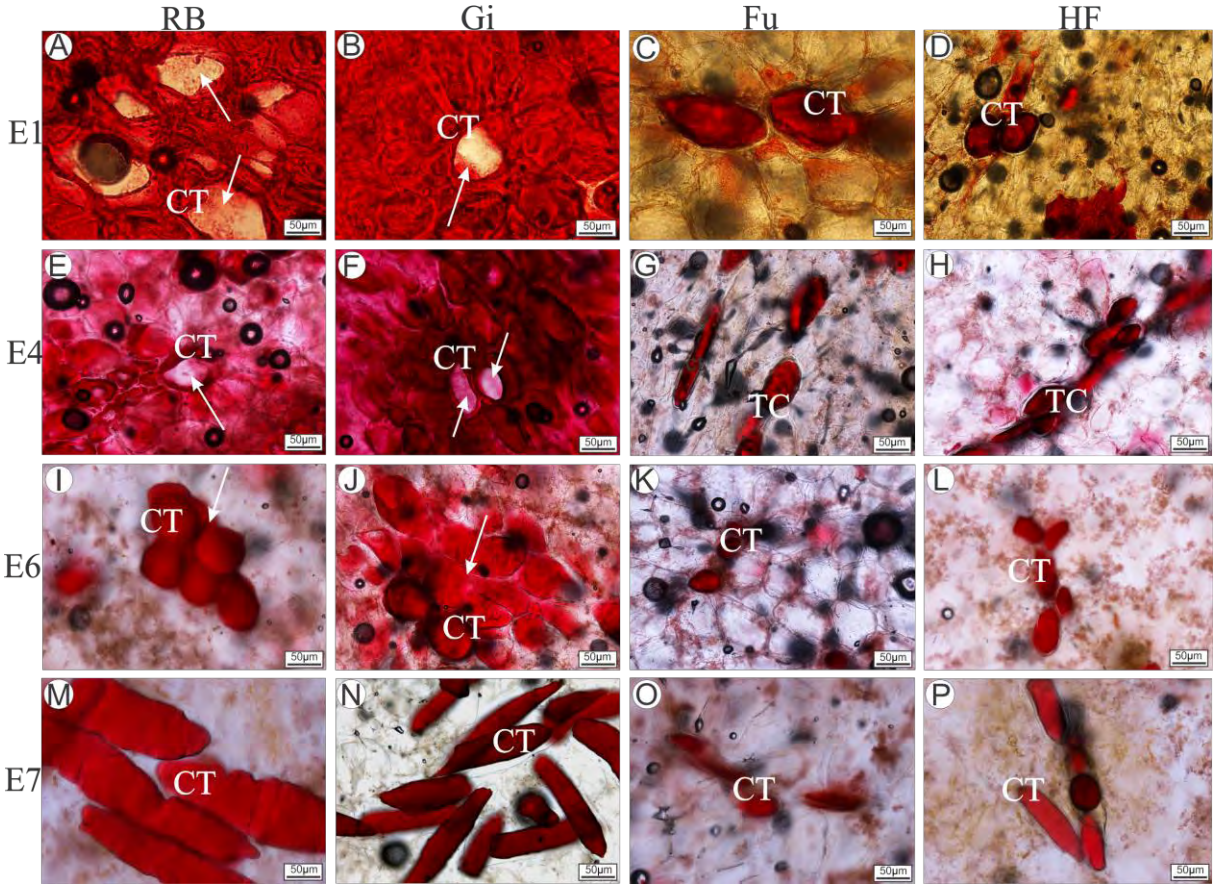

Figura 6 - Reação positiva dos taninos com vanilina clorídrica. Colunas verticais: Cultivares 'Rojo Brillante' (RB), 'Giombo' (Gi), 'Fuyu' (Fu) e 'Hana Fuyu' (HF). Colunas horizontais: Estádios de maturação (E). A, B, E, F. Células taníferas com conteúdo extravasado e vacúolos vazios (setas). C, D, H. Células taníferas com conteúdo. Observar o menor extravasamento. G, K. Células taníferas com conteúdo delimitado. I. Acúmulo de tanino próximo às células taníferas (seta). J. Células taníferas com conteúdo parcialmente extravasado (seta). L-P: Células taníferas íntegras e dispersas no parênquima profundamente alterado. Observar o maior tamanho das células taníferas nas cultivares adstringentes. CT= Célula Tanífera

3.4 Conclusões

Não houve relação entre a redução da firmeza e a perda natural da adstringência nas cultivares PCNA. Nas cultivares PVA ocorreu redução da firmeza e dos taninos solúveis durante o avanço da maturação em „Rojo Brillante', enquanto em „Giombo', o teor de taninos solúveis permaneceu elevado mesmo com firmeza de polpa próxima a zero. Por outro lado, a capacidade antioxidante e o teor de sólidos solúveis em caquis dos dois grupos indicam que pode haver relação com a perda natural da adstringência, visto que os valores decresceram ao longo do tempo somente nas cultivares não adstringentes durante a maturação. Do ponto de vista estrutural, os taninos delimitados às células taníferas no teste com vanilina clorídrica, e o

conteúdo do vacúolo com aspecto alveolar observado ao Cryo-SEM podem estar relacionados à polimerização dos taninos durante o amadurecimento dos frutos.

Referências

ALI, S. S.; KASOJU, N.; LUTHRA, A.; SINGH, A.; SHARANABASAVA, H.; SAHU, A.; BORA, U.Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. **Food Research International**, Barking, v. 41, p. 1-15, 2009.

BERNARDES, N.R.; GLÓRIA, L.L.; NUNES, C.R.; PESSANHA, F.F.; MUZITANO, M.F.; OLIVEIRA, D.B. Quantificação dos teores de taninos e fenóis totais e avaliação da atividade antioxidante dos frutos de Aroeira. **Vértices**, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 117-128, 2011.

BESADA, C.; SANCHEZ, G.; SALVADOR, A.; GRANELL, A. Volatile compounds associated to the loss of astringency in persimmon fruit revealed by untargeted GC–MS analysis. **Metabolomics**, Reino Unido, v. 9, n. 1, p. 157-172, 2012a.

BESADA, C., SALVADOR, A., VÁZQUEZ-GUTIÉRREZ, J. L., HERNANDO, I., PÉREZ-MUNUERA, I. Involvement of antioxidant activity in flesh browning of astringent persimmon. **Acta Horticulturae**, Lisboa, n. 934, p. 713–718, 2012b.

BORRÁS, D.P.N. **Caracterización fisiológica durante el crecimiento y maduración del fruto de diferentes variedades de caqui**. 2012. 81p. Dissertación (Master en Calidad y Seguridad Alimentaria) - Universidad de Valencia, Valencia, 2012.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 28, p. 25-30, 1995.

CANTERI, M.G.; ALTHAUS, R.A.; VIRGENS FILHO, J.S.; GIGLIOTI, E.A.; GODOY, C.V. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, Ponta Grossa, v. 1, p. 18-24, 2001.

CHITARRA, A.B.; ALVES, R.E. **Tecnologia de pós-colheita para frutas tropicais.** Fortaleza: Instituto Frutal, Sindifruta, 2001. v. 1, 314 p.

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

HANDIQUE, J.G.; BARUAH, J.B. Polyphenolic compounds: an overview. **Reactive and Functional Polymers**, Amsterdam, v. 52, p. 163–188, 2002.

JANG, I.C.; OH, W.G.; AHN, G.H.; LEE, J.H.; LEE, S.C. The antioxidant activity of 4 cultivars of persimmon. **Food Science and Biotechnology**, Malden, v. 20, n. 1, p. 71-77, 2011.

JIMÉNEZ-CUESTA, M.; CUQUERELLA, J.; MARTÍNEZ-JÁVEGA, J.M. Determination of a color index for citrus fruit degreening. **Proceedings International Society of Citriculture**, v. 2, p. 750-753, 1981.

KAYS, S.J. **Postharvest physiology of perishable plant products**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 532p.

KITAGAWA, H.; GLUCINA, P.G. Shoot growth, flowering, pollination, and fruit development. In: RUSCOE, Q.W. **Persimmon culture in New Zealand**. Wellington: DSIR, Science Information Publishing Centre, 1984. p. 19-27.

KRAMMES, J.G.; ARGENTA, L.C.; VIEIRA, M.J.; BACARIN, M. A. Estabelecimento de índices de maturação para o ponto de colheita de frutos de caqui „Fuyu'. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 20, n. 3, p. 62-66, 2007.

MORENO, J.; CHIRALT, A.; ESCRICHE, I.; SERRA, J.A. Efect of blanching/osmotic dehydration combined methods on quality and stability of minimally processed strawberries. **Food Research International**, Barking, v. 33, p. 609-616, 2000.

NOVILLO, P.; ALEJANDRA SALVADOR, A.; LLORCA, E.; HERNANDO, I.; BESADA, C. Effect of CO_2 deastringency treatment on flesh disorders induced by mechanical damage in persimmon. Biochemical and microstructural studies. **Food Chemistry**, London, v. 145, p. 454–463, 2014.

PAIVA, S.R.; HERINGER, A.P.; FIGUEIREDO, M.R.; KAPLAN, M.A.C. Taninos condensados de espécies de *Plumbaginaceae*. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 1, p. 153-157, 2002.

SALVADOR, A.; ARNAL, L.; CAROT, J.M.; CARVALHO, C.P.; JABALOYES, J.M. Influence of different factors on firmness and color evolution during the storability of persimmon cv. „Rojo Brillante'. **Journal of Food Science**, Malden, v. 71 n. 2, p. 169-175, 2006.

SALVADOR, A.; ARNAL, L.; BESADA, C.; LARREA, V.; QUILES, A.; PÉREZ-MUNUERA, I. Physiological and structural changes during ripening and desastringency treatment of persimmon fruit 'Rojo Brillante'. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. 181-188, 2007.

SUGIURA, A. Origin in varietal differentiation in Japanese persimmon. **Recent Advances in Plant Breeding**, Kyoto, v. 25, p. 29-37, 1983.

SUGIURA, A.; YONEMORI, K.; HARADA, H.; TOMANA, T. Changes in the ethanol and acetaldehyde contents of Japanese persimmon fruits in relation to natural loss of astringency. **Studies from the Institute of Horticulture**, Kyoto, v. 9, p. 41-47, 1979.

TAIRA, S. Astringency in persimmon. In: LINSKENS, H.F.; JACKSON, J.F. (Ed.). **Fruit analysis**. Hannover: Springer, 1995. p. 97-110.

TAYLOR, J.E. Exotics. In: SEYMOUR, G.B.; TAYLOR, J.E.; TUCKER, G.A. **Biochemistry of fruit ripening**. Cambridge: Chapman Hall, 1993. p. 151-187.

TESSMER, M.A.; KLUGE, R.A.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B. Characterization of tannin in ‘Giombo' and ‘Fuyu' persimmons during fruit development. In: INTERNATIONAL POSTHARVEST SYMPOSIUM, 7., 2012, Kuala Lumpur. **Anais…** Kuala Lumpur: International Postharvest Symposium, 2012, p. 103.

YONEMORI, K.; MATSUSHIMA, J. Property of development ofthe tannin cells in non-astringent type fruits of Japanese persimmon (*Diospyros kaki*) and its relationship to natural deastringency. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v. 54, p. 201-208, 1985.

_____. Changes in tannin cell morphology with growth and development of Japanese persimmon fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 112, n. 5, 817-821, 1987.

YONEMORI, K.; IKEGAMI, A.; KANZAKI, S.; SUGIURA, A. Unique features of tannin cells in fruit of pollination constant non-astringent persimmons. **Acta Horticulturae**, Queensland, v. 601, p. 31-35, 2003.

4 DESTANIZAÇÃO DE FRUTOS DE CAQUIZEIROS „GIOMBO' EM DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO AO ETANOL

Resumo

O caquizeiro 'Giombo' (PVA) é uma das cultivares mais produzidas no Brasil; apresenta colheita tardia e necessita de tratamentos para remoção da adstringência. O objetivo do estudo foi determinar o tempo mais eficiente de exposição com etanol para remoção da adstringência em caquis 'Giombo', no fim e início da safra, através de análises fisiológicas (teores de taninos solúveis e totais, índice de adstringência, produção de etanol e acetaldeído) estruturais. Foram realizados dois experimentos com cinco tratamentos com a dosagem de etanol 1,70 mL Kg^{-1} nos seguintes tempos de exposição: 12 (T1), 24 (T2), 36 (T3), 48 (T4) horas e controle sem etanol (T5). Em julho de 2011 (fim de safra), a avaliação foi feita após 5 dias de armazenamento a 22 ± 1˚C e, em abril de 2012 (início de safra), após 3 dias a 22 ± 1˚C. Em frutos de fim de safra, o tratamento mais eficiente foi de 24 horas, o que resultou em teores mais baixos e aceitáveis de taninos solúveis e índice de adstringência, e maior produção de etanol e acetaldeído. Em frutos de início de safra, o tratamento mais eficiente foi 36 horas. As análises estruturais usando vanilina clorídrica também indicaram a polimerização dos taninos nestes tratamentos, confirmadas pela ausência de extravasamento de conteúdo tanífero do vacúolo celular. Também houve acúmulo de substâncias pécticas no vacúolo das células e nos espaços intercelulares do parênquima.

Palavras-chave: Acetaldeído; **A**dstringência; **C**élula tanífera; *Diospyros kaki* L.; Etanol

Abstract

'Giombo' (PVA) is one of the persimmon cultivars most produced in Brazil; it presents late harvest and requires treatment for astringency removal. The aim of this study was to determine the most efficient time of exposure to ethanol for astringency removal in 'Giombo' persimmon at early and late harvest period, through physiological (total and soluble tannins, astringency index, ethanol and acetaldehyde production) and structural analyses. Two experiments were conducted with five treatments each with an ethanol dose of 1.70 mL kg^{-1} in the following exposure times: 12 (T1), 24 (T2), 36 (T3), 48 (T4) hours and control without ethanol (T5). In July 2011 (late harvest), the evaluation was performed after 5 days of storage at 22 ± 1ºC, and in April 2012 (early harvest), after 3 days at 22 ± 1ºC. In early harvested fruits, the most effective treatment was 24 hours, which resulted in lower and acceptable levels of soluble tannins and astringency index, and higher production of ethanol and acetaldehyde. In the late harvested ones, the most effective treatment was 36 hours. Structural analyzes using vanillin hydrochloric also indicated the polymerization of tannins in these treatments, confirmed by the absence of extravasation tannin content of cell vacuole. There was also pectin accumulation in the cells vacuole and in intercellular spaces of the parenchyma.

Keywords: Acetaldehyde; Astringency; *Diospyros kaki* L.; Ethanol; Soluble tannins

4.1 Introdução

O Brasil ocupa a posição de quarto produtor mundial de caquis com produção de 164.495 t na safra de 2010 em área plantada de 8.652 hectares (IBGE, 2010). Dentre as cultivares mais produzidas está „Giombo', a qual pertence ao grupo de polinização variável e adstringente (PVA), sendo necessário realizar tratamento de remoção da adstringência nos frutos antes de seu consumo.

A adstringência em caquis é promovida por taninos localizados no vacúolo de células diferencidas presentes no pericarpo dos frutos. Os taninos são substâncias fenólicas com massa molecular entre 500 a 3000 Daltons, e que apresentam habilidade de formar complexos insolúveis com proteínas da mucosa bucal causando a sensação de adstringência (MELLO; SANTOS, 2004; ITTAH, 1993). São classificados em dois grupos, de acordo com sua estrutura química: 1) Taninos Hidrolisáveis ou solúveis, formados principalmente a partir de ácido gálico (galotaninos) e ácido hexahidrodifênico (elagitaninos) esterificados a um poliol, normalmente a D-glicose e 2) Taninos Condensados ou insolúveis, constituídos por unidades flavanol: flava-3-ols (catequina) ou flavan 3,4-diols (leucoantocianinas) (HANDIQUE; BARUAH, 2002).

A perda artificial da adstringência deve-se à coagulação, condensação ou polimerização dos taninos presentes no fruto, tornando-os insolúveis e, portanto, incapazes de formarem complexos (HASLAN, 1996). A polimerização se deve a reações das moléculas de taninos com etanol e acetaldeído, que são produzidos por indução da respiração anaeróbia, através da aplicação de etanol ou altas concentrações de CO_2.

No Brasil, os produtores tem utilizado basicamente etanol para destanização de caqui, devido ao seu custo reduzido e eficiência na remoção da adstringência (ANTONIOLLI et al., 2000; TERRA et al., 2014), no entanto, podem gerar consequências indesejáveis como a redução da firmeza da polpa (EDAGI et al., 2009) e alteração do sabor e do aroma dos frutos (PESIS, 2005). Vários fatores podem influenciar o processo de destanização como estádio de maturação, período da safra, doses do agente destanizados, tempo de exposição e temperatura. Poucos registros são encontrados sobre a época de colheita sobre o teor de taninos solúveis e a destanização dos frutos são encontrados (VITTI, 2009).

Neste contexto, o objetivo do estudo foi determinar o tempo mais eficiente de exposição com etanol para remoção da adstringência de caquis 'Giombo' no início e final de safra, através da caracterização fisiológica e anatômica.

Desenvolvimento

4.2 Material e métodos

Coleta do material e tratamentos

Frutos da cultivar Giombo foram colhidos em pomar comercial localizado em Mogi das Cruzes-SP (23°31'S46°11'O) a 742m de altitude em 2011 e 2012. Após a colheita, os frutos foram transportados para o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Pós-Colheita, ESALQ/USP, sendo submetidos a uma rigorosa seleção, obtendo um lote homogêneo quanto ao tamanho, coloração e presença de danos mecânicos.

Foram realizados dois experimentos em épocas diferentes de safra. O primeiro experimento foi realizado em julho de 2011 (fim de safra), quando os frutos estavam com maturação mais avançada, com a coloração predominantemente alaranjada do epicarpo. O segundo experimento foi realizado em abril de 2012 (início de safra), com os frutos apresentando cor predominantemente amarela (Figura 1- Anexo). Em ambos os experimentos foi utilizada a dosagem de etanol de 1,70 mL Kg^{-1} e os tempos de exposição de 12 (T1), 24 (T2), 36 (T3) e 48 (T4) horas, além do controle sem etanol (T5). O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 5 tratamentos e 3 repetições de 4 frutos.

Para a aplicação de etanol foram colocadas placas de Petri na parte inferior de caixas herméticas de 0,50 x 0,80 x 0,47m, de forma a evitar o contato direto com os frutos. Em seguida, as caixas foram fechadas hermeticamente para promover a mistura gasosa e mantidos a 22 ± 1˚C durante os tratamentos.

Os frutos, após receberem os tratamentos, foram mantidos juntamente com o controle a 22 ± 1˚C por cinco dias (fim de safra) e três dias (início de safra). A escolha da dosagem de etanol 1,70 mL Kg^{-1} foi baseada em outros estudos pelo favorecimento da manutenção da qualidade dos frutos, principalmente a firmeza de polpa (MONTEIRO, 2011; EDAGI et al., 2009; TERRA et al., 2014).

Os frutos foram avaliados imediatamente após a colheita (caracterização) e ao final dos dois experimentos quanto às análises estruturais e de índice de adstringência. Porções foram congeladas para a quantificação de taninos solúveis e totais e de etanol e acetaldeído.

Microscopia de luz (ML)

No experimento de fim de safra (2011), foram retiradas porções transversais da região equatorial dos frutos, fixados em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965), submetido à bomba de vácuo para a retirada do ar, desidratado em série etílica até 100% e infiltradas em

resina para a confecção dos blocos. Os blocos foram seccionados em micrótomo rotativo a 5-6 μm de espessura. As secções foram coradas com azul de toluidina (SAKAI, 1973) para as análises histológicas usuais e montadas em lâminas com resina sintética "Entellan". A técnica utilizada permitiu verificar alterações estruturais, porém não foi possível diferenciar as células contendo taninos solúveis e insolúveis. Portanto, no experimento início de safra (2012), foram realizadas secções de tecido fresco da porção equatorial dos frutos com auxílio de lâmina inoxidável. As secções foram colocadas sobre lâminas histológicas, coradas com vanilina clorídrica 10% para reação com taninos e cobertas com lamínula. As imagens foram capturadas em microscópio trinocular Leica DM LB acoplado na câmara de vídeo Leica DC 300 F e processadas em computador para confecção das ilustrações.

Índice de adstringência

Determinado através do método proposto por Campo-Dall'orto et al. (1996), no qual se avalia a impressão de uma das faces dos frutos cortados na região equatorial em papel filtro, previamente preparado com solução de cloreto férrico ($FeCl_3$) a 5%. O tanino, na forma solúvel, reage com o cloreto férrico, tornando-se escurecido. As impressões foram avaliadas através da escala de notas: 1=não taninoso; 2=ligeiramente taninoso; 3=mediamente taninoso; 4=taninoso; 5=muito taninoso.

Teor de taninos solúveis e totais

Os teores de taninos solúveis e totais foram determinados espectrofotometricamente utilizando-se o reagente de Follin-Ciocalteau (50%), segundo técnica recomendada por Taira et al. (1996), na qual utilizou-se 1g de polpa triturada para volume final de 100 mL de extrato, do qual retirou-se uma alíquota de 1 mL. A esta alíquota adicionou-se reagente de Follin-Ciocalteau (50%) e 1,0 mL de solução de carbonato de sódio supersaturado e 7,5 mL de água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro marca Biochrom, modelo Libra S22 com absorbância a 725 nm. Os resultados foram expressos em gramas por 100g de polpa (g $100g^{-1}$).

Produção de acetaldeído e etanol

Para medir teores de acetaldeído e etanol foi utilizada a metodologia de Davis e Chace (1969), onde 1 g de polpa triturada foi lacrada em frasco de vidro de 40 mL e mantida em freezer a -26ºC, até o momento da análise. Os frascos permaneceram em banho-maria por 30 minutos a 50ºC e, após este período, foi coletado amostra de ar de 1 mL do frasco e injetado

no cromatógrafo a gás marca Thermofinigan, modelo Thermoquest GC Trace 2000 com detector de ionização de chama (FID) com coluna Porapak N. Os resultados foram expressos em µg de acetaldeído e etanol por grama de material vegetal (µg g^{-1}).

Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, através do programa SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

4.3 Resultados

Nos frutos do final da safra de 2011, após os tratamentos de destanização, o índice de adstringência apresentou nota 1,4, para 24 horas de tratamento (Figura 1A). Houve redução dos taninos solúveis em todos os tratamentos realizados, com valores significativamente menores (0,045 g $100g^{-1}$) para exposição durante 24 horas (Figura 1B), corroborando com o índice de adstringência. Houve diminuição dos taninos totais em comparação com os teores encontrados antes dos tratamentos, com valores mais reduzidos para 24 horas de exposição também (Figura 1B). A produção de etanol e acetaldeído apresentaram aumento em todos os tempos de exposição com etanol, mas superiores estatisticamente em 24 horas (Figura 1C-D).

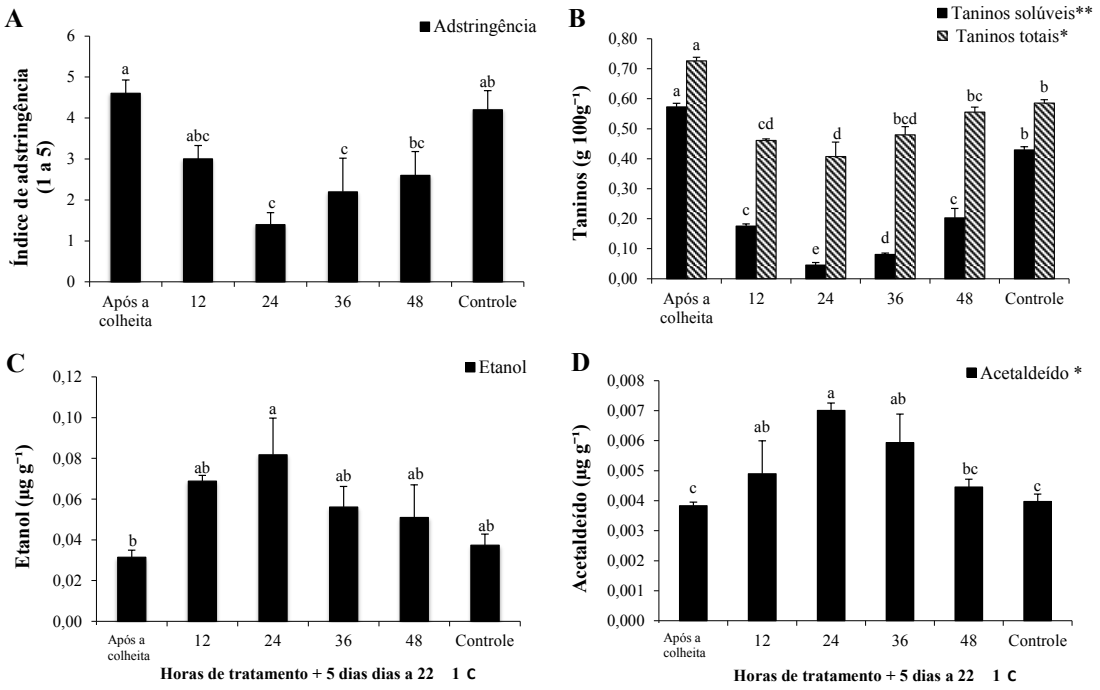

Figura 1 - Índice de adstringência (A), taninos solúveis totais (B), teor de etanol (C) e acetaldeído (D) em caquis „Giombo' colhidos em fim de safra (julho de 2011) em função de diferentes tempos de destanização (12 a 48 horas). Os frutos foram avaliados após 5 dias a 22 ± 1˚C Notas do índice de adstringência: 1=não taninoso; 2=ligeiramente taninoso; 3=mediamente taninoso; 4=taninoso; 5=muito taninoso. Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão da média (n=3). * Dados transformados em raiz quadrada, k=0. ** Dados transformados em Log x na base 1

Nos frutos do início da safra de abril de 2012, o índice de adstringência apresentou valores mais reduzidos para 36 horas de exposição com etanol, com nota 1,4 (Figura 2A). Os teores de taninos solúveis e totais apresentaram inicialmente 0,621 g $100g^{-1}$ e 0,674 g $100g^{-1}$ de polpa, respectivamente. Não houve diferença estatística entre 36 e 48 horas de exposição ao etanol, no entanto em 36 horas o valor de taninos solúveis foi significamente menor (0,169 g $100g^{-1}$) (Figura 2B).

Os teores de taninos totais também foram reduzidos quando comparados ao tempo zero e ao controle, mas com valores mais reduzidos em 36 horas (Figura 2B). Os teores de etanol e acetaldeído foram mais elevados em 36 horas de tratamento atingindo valor de 0,1179 µg g^{-1}. O acetaldeído também obteve valores maiores em 36 horas de tratamento (0,006574 µg g^{-1}) (Figura 2C-D).

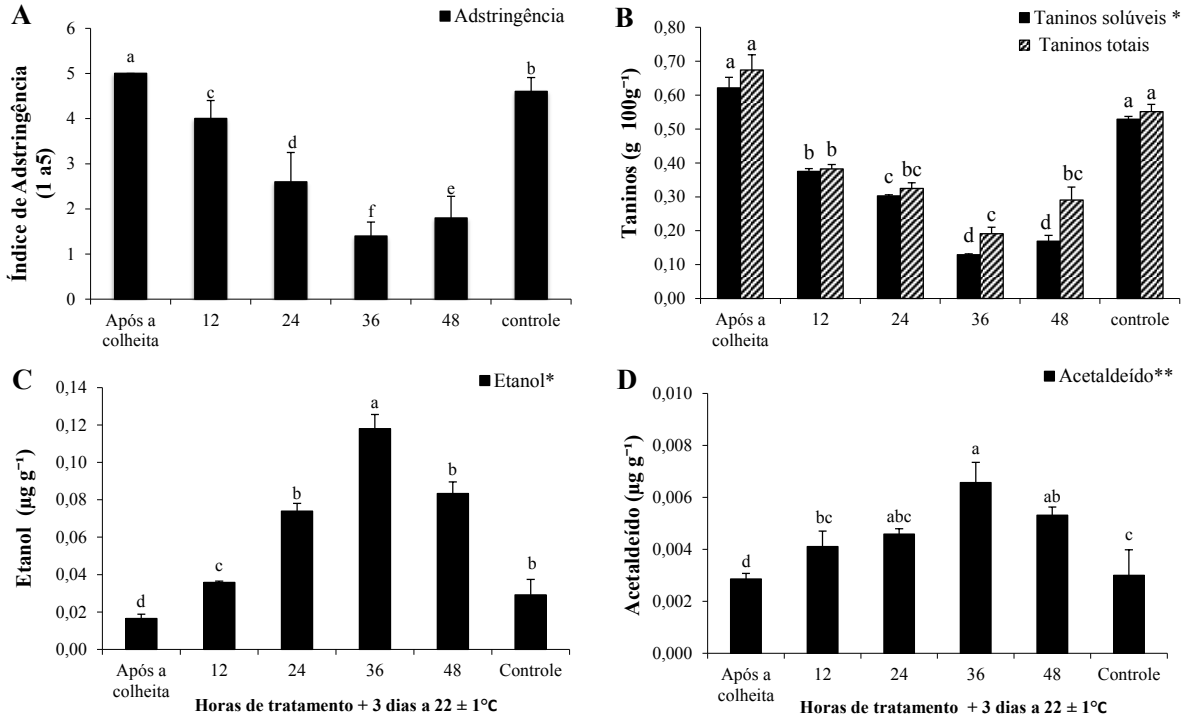

Figura 2 – Índice de adstringência (A), taninos solúveis totais (B), teor de etanol (C) e acetaldeído (D) em caquis „Giombo' colhidos em início de safra (abril de 2012) em função de diferentes tempos de destanização (12 a 48 horas). Os frutos foram avaliados após 3 dias a 22 ± 1˚C. Notas do índice de adstringência: 1=não taninoso; 2=ligeiramente taninoso; 3=mediamente taninoso; 4=taninoso; 5=muito taninoso. Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão da média (n=3). * Dados transformados em raiz quadrada, k = 0. ** Dados transformados em Log x na base 10

Na análise ao microscópio de luz, nas amostras dos frutos da safra 2011 preparado em resina, não foi possível diferenciar taninos solúveis e insolúveis (Figura 3A-C). Imediatamente após a colheita verifica-se células taníferas e parenquimáticas integras e com acúmulo de conteúdo tanífero em alguns espaços intercelulares (Figura 3A).

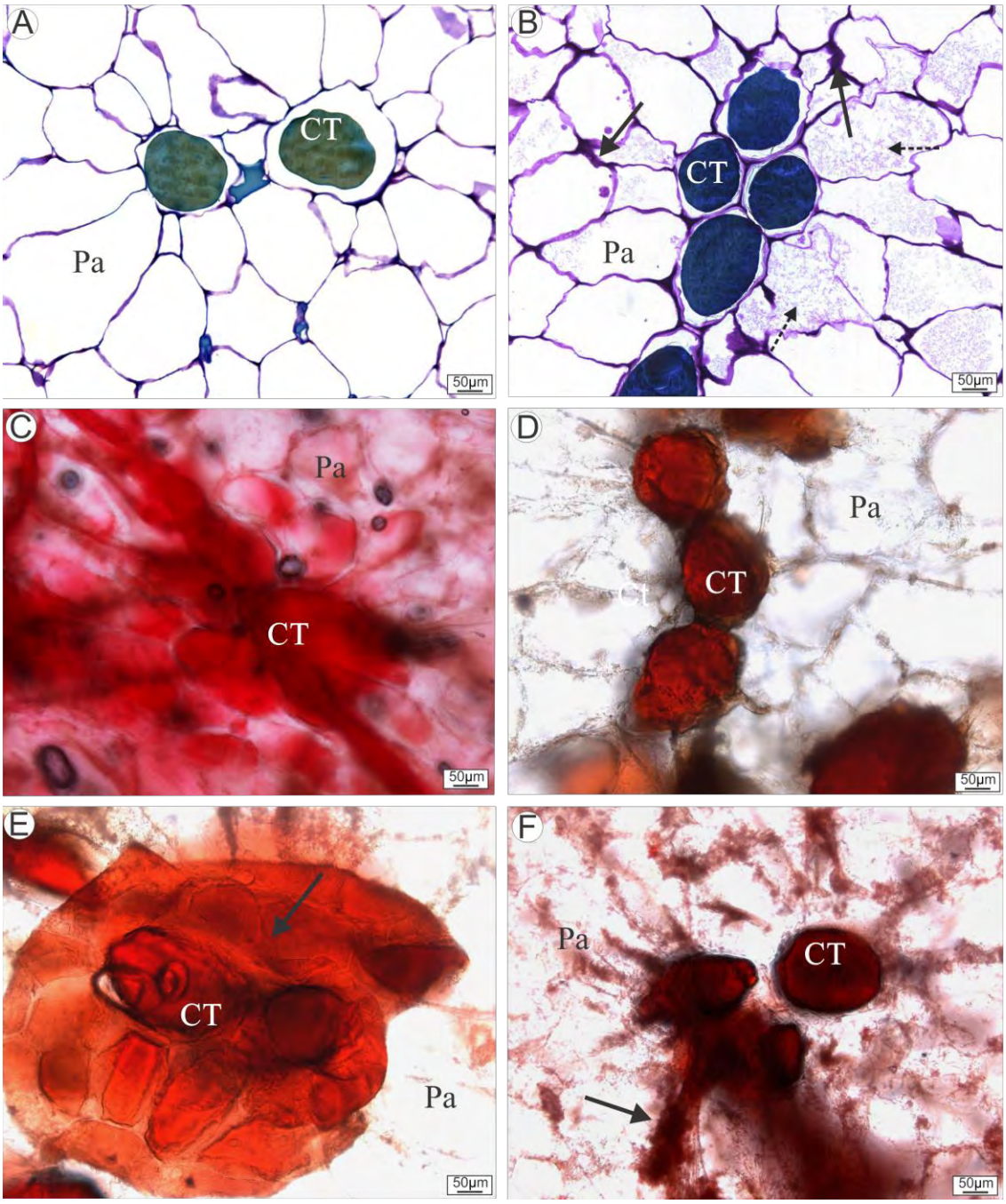

Figura 3 – Secções transversais do pericarpo de caquis 'Giombo' no fim da safra (A-B) e início da safra (D-F). A. Frutos recém-colhidos não destanizados. B. Frutos submetidos por 24 horas de exposição ao etanol. Observar substâncias pécticas no interior das células do parênquima (setas pontilhadas) e acúmulo de conteúdo nos espaços intercelulares (setas linha). C. Taninos solúveis, corados pela vanilina clorídrica, dispersos no parênquima de frutos recém-colhidos. D. Taninos insolubilizados, corados pela vanilina clorídrica, restritos ao vacúolo celular em frutos submetidos por 36 horas de exposição ao etanol. E-F. Estágios intermediários de insolubilidade dos taninos. CT=Célula Tanífera, Pa=Parênquima

Nos frutos destanizados são observadas substâncias no interior das células (Figura 3B) e substâncias pécticas acumuladas nos espaços intercelulares (Figura 3C); mais evidentes em frutos tratados com 24 horas de exposição com etanol.

Nos frutos da safra 2012, houve reação positiva da vanilina clorídrica com os taninos em secções de tecido fresco. Quando na forma solúvel, os taninos extravasaram do interior do vacúolo da célula tanífera e permanecem dispersos sobre a secção, com coloração vermelha intensa (Figura 3D e I). O teste com vanilina também confirma taninos mais insolubilizados em 36 horas de exposição com etanol, pois o conteúdo tanífero do vacúolo está delimitado às células (Figura 3G). Nos demais tratamentos se encontram estágios intermediários de insolubilidade (Figura 3E, F, H).

4.3.1 Discussão

Nesse trabalho ficou demonstrado que são necessários tempos diferentes de exposição com etanol para a remoção da adstringência em função da época de colheita. Os frutos do fim e início de safra obtiveram índice de adstringência e teores de taninos solúveis adequados para consumo com os tratamentos de etanol durante 24 e 36 horas, respectivamente.

A diferença de tempo para remoção da adstringência dos frutos deve estar relacionada ao estádio de maturação, pois no fim da safra de 2011, os frutos se encontravam em estágio mais avançado de maturação quando comparados aos do início da safra 2012, permitindo a remoção da adstringência em menor tempo. O mesmo foi observado por Edagi et al. (2009) em frutos „Giombo' e por Vitti (2009) em 'Rama-Forte'. No entanto, Taira et al. (1990) indicaram que a destanização ocorre mais rapidamente em frutos 'Hiratanenashi' imaturos.

A exposição dos frutos 'Giombo' ao etanol levou ao aumento da produção de etanol e acetaldeído e à polimerização dos taninos solúveis. Sabe-se que a aplicação de etanol promove o aumento da atividade da enzima álcool dehidrogenase devido ao deslocamento do equilíbrio entre etanol/acetaldeído (PESIS, 2005), o qual induz a polimerização das moléculas solúveis de taninos, tornando-as insolúveis e não adstringentes (HASLAN, 1996).

Embora Taira et al. (1990) tenham correlacionado significativamente o período de colheita e o teor de tanino solúvel sugerindo que a atividade metabólica de produção de acetaldeído é reduzida à medida que a temperatura diminui, no presente estudo observou-se o contrário. Os frutos apresentaram maior produção de acetaldeído no fim da safra, os quais se apresentavam em estágio de maturação mais avançado, correspondente ao período com

temperaturas mais baixas, quando comparado ao início da safra, o que provavelmente conferiu o menor teor de tanino solúvel em frutos recém-colhidos e a necessidade de tempo de exposição menor (24 horas) para a remoção da adstringência. Pesis (2005) também relata que há acúmulo natural de acetaldeído causado pelo amadurecimento dos frutos, juntamente com o aumento na produção de etileno.

De acordo com Yamada et al. (2002) e Antoniolli et al. (2000), tratamentos de destanização são eficientes quando promovem a redução dos taninos solúveis para níveis abaixo de 0,10% e índice de adstringência entre 1,0 e 2,0, valores que foram alcançados com 24 horas de exposição ao etanol no final da safra e com 36 horas no início da safra. Nestes tratamentos observou-se que os taninos ficavam restritos ao vacúolo das células indicando a sua polimerização pela formação de precipitados conforme descrito por Vásquez-Gutiérrez et al. (2011) que também utilizou o teste com vanilina clorídrica em caquis 'Rojo Brillante'.

Os frutos de „Giombo' com teores mais elevados de etanol e acetaldeído e menores valores de adstringência apresentaram acúmulo de substâncias pécticas no vacúolo das células e nos espaços intercelulares do parênquima similares ao descrito por Bron et al. (2002) em frutos lanosos de pessegueiros com redução da firmeza da polpa. Sabe-se que frutos de caquizeiros destanizados apresentam menores valores de firmeza (ANTONIOLLI et al., 2000; TERRA, 2014) o que poderia explicar as alterações estruturais acima descritas.

4.4 Conclusões

O tempo mais eficiente de exposição ao etanol com dosagem de 1,70 mL Kg^{-1} para remoção da adstringência de caquis 'Giombo' foi distinto no início e fim de safra. No fim da safra os frutos obtiveram índice de adstringência e teores de taninos solúveis adequados para consumo em 24 horas e, no início da safra, em 36 horas.

Referências

ANTONIOLLI, L.R.; CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; SCARPARE FILHO, J.A. Remoção da adstringência de frutos de caqui „Giombo' sob diferentes períodos de exposição ao vapor de álcool etílico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 10, p. 2083-2091, 2000.

BRON, I.U.; JACOMINO, A.P.; BEATRIZ APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Alterações anatômicas e físico-químicas associadas ao armazenamento refrigerado de pêssegos „Aurora-

1' e „Dourado-2'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1349-1358, 2002.

CAMPO-DALL'ORTO, F.A.; OJIMA, M.; BARBOSA, W.; ZULLO, M.A.T. Novo processo de avaliação da adstringência dos frutos no melhoramento do caquizeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 55, n. 2, p. 237-243, 1996.

CANTERI, M.G.; ALTHAUS, R.A.; VIRGENS FILHO, J.S.; GIGLIOTI, E.A.; GODOY, C.V. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, Ponta Grossa, v. 1, n. 2, p. 18-24, 2001.

DAVIS, P.L; CHACE, W.G. Jr. Determination of alcohol in citrus juice by gas chromatographic analysis of headspace. **HortScience**, Alexandria, v. 4, p. 117-119, 1969.

EDAGI, F.K.; CHIOU, D.G. TERRA, F.A.M.; SESTARI, I.; KLUGE, R.A. Remoção da adstringência de caquis „Giombo' com subdosagens de etanol. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 7, p. 2022-2028, 2009.

HANDIQUE, J.G.; BARUAH, J.B. Polyphenolic compounds: an overview. **Reactive and Functional Polymers**, Amsterdam, v. 52, p. 163–188, 2002.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 59, p. 205-215, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/>. Acesso em: 22 jan. 2012.

ITTAH, Y. Sugar content changes in persimmon fruits (*Diospyros kaki* L.) during artificial ripening with CO_2: a possible connection to deastringency mechanisms. **Food Chemistry**, London, v. 48, n. 1, p. 25-29, 1993.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138, 1965.

MELLO, J.C.P.; SANTOS, S.C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2004. p.615-656.

MONTEIRO, M.F. **Técnicas de remoção da adstringência e refrigeração de caqui 'Giombo'**. 2011. 75 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidadede São Paulo, Piracicaba, 2011.

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

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue. **Stain Technology**, Baltimore, v. 48, p. 247-249, 1973.

TAIRA, S. Adstringency in persimmon. **Modern Methods of Plants Analysis,** Berlin, v. 18, p. 97-110, 1996.

TAIRA, S.; ITAMURA, H.; ABE, K.; OOI, K.; WATANABE, S. Effects of harvest maturity on removal of astringency in Japanese persimmon (*Diospyros kaki*) „Hiratanenashi' fruits. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v. 58, n. 4, p. 813-818, 1990.

TERRA, F.A.M.; EDAGI, F.K.; SASAKI, F.F.C.; FRASSETTO FILHO, M.E.; SILVA, M.M. GIRO, B.; BERNO, N.D.; KLUGE, R.A. Aplicação do 1-metilciclopropeno e sua influência no processo de remoção da adstringência com etanol em caqui „Giombo' refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 2, p. 210-216, 2014.

VÁZQUEZ-GUTIÉRREZ, J.L.; QUILES, A.; HERNANDO, I.; PÉREZ-MUNUERA, I. Changes in the microstructure and location of some bioactive compounds in persimmons treated by high hydrostatic pressure. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 61, p. 137–144, 2011.

VITTI, D.C.C**. Destanização e armazenamento refrigerado de caqui 'Rama Forte' em função da época de colheita**. 2009, 123 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

YAMADA, M.; TAIRA, S.; OHTSUKI , M.; SATO, A.; IWANAMIA, H.; YAKUSHIJI, H.; WANG, R.;YANG, Y.; LI, G. Varietal differences in the ease of astringency removal by carbon dioxide gás and ethanol vapor treatments among oriental astringent persimmons of japanese and chinese origin. **Scientia Horticulturae**, Amsterdan, v. 94, n. 1/2, p. 63-72, 2002.

5 INFLUÊNCIA DAS PECTINAS NA REMOÇÃO DA ADSTRINGÊNCIA DE CAQUIS 'GIOMBO' DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO

Resumo

O objetivo do trabalho foi analisar caquis „Giombo' após a destanização com etanol e aplicação de 1-metilciclopropeno (1-MCP), a fim de verificar a influência das pectinas na remoção da adstringência durante o armazenamento refrigerado através de análises fisiológicas e estruturais. Foram utilizados os tratamentos: T1: controle, T2: 1-MCP (1000 nL L^{-1}) /12 horas, T3: etanol (1,70 mL Kg^{-1})/12 horas e T4: etanol (1,70 mL Kg^{-1})/12 horas + 1-MCP (1000 nL L^{-1})/12 horas. Após os tratamentos os frutos foram mantidos em armazenamento refrigerado a 5 ± 1˚C e 90 ± 5% UR, com retiradas de 30 e 60 dias, seguida de simulação comercial por 5 dias. Foram realizadas análises anatômicas, firmeza de polpa, quantificação de taninos solúveis e totais, índice de adstringência, pectinas solúveis e solubilização, produção de etanol e acetaldeído. A dose de etanol 1,70 mL Kg^{-1} por 12 horas foi eficiente para a remoção da adstringência. Houve maior redução da firmeza e aumento da solubilização das pectinas, nos frutos destanizados. Em frutos destanizados ou não, o 1-MCP manteve a firmeza dos frutos mais elevada, confirmando o seu efeito na repressão da maturação. Não foi possível relacionar a interação das pectinas com os taninos solúveis na remoção da adstringência, pois mesmo com a redução da firmeza de polpa e aumento da solubilização das pectinas, o índice de adstringência e o teor de taninos solúveis permaneceram elevados nos frutos controle. Em frutos com polpa amolecida, as células do parênquima encontravam-se degradadas e as células taníferas íntegras e dispersas, principalmente em frutos destanizados com etanol. O armazenamento de caquis „Giombo' a 5˚C até 60 dias não é recomendável, pois a firmeza de polpa atingiu valores abaixo do mínimo recomendado para a comercialização (10 N).

Palavras-chave**:** Degradação celular; *Diospyros kaki* L.; Pectinas solúveis; Taninos; 1-MCP

Abstract

The objective of this study was to analyze persimmons „Giombo' after deastringency with ethanol and application of 1-methylcyclopropene (1-MCP) in order to verify the influence of pectin in the removal of astringency during refrigerated storage by physiological and structural analyzes. The treatments used were: T1: Control, T2: 1-MCP (1000 nL L^{-1})/12 hours, T3: ethanol (1.70 mL kg^{-1})/12 hours and T4: ethanol (1.70 mL kg $^{-1}$)/12 hours + 1-MCP (1000 nL L^{-1})/12 hours. After treatments, the fruits were kept in cold storage at 5 ± 1˚C and 90 ± 5% RH, with 30 and 60 days withdraws, followed by commercial simulation for 5 days. Analyses of anatomy, flesh firmness, total and soluble tannins quantification, astringency index, soluble and solubilization of pectin, and ethanol and acetaldehyde production were made. The ethanol dose of 1.70 mL kg^{-1} for 12 hours was effective for removing the astringency. Higher reduction of firmness and increased solubilization of pectin were verifyed in fruits deastringed. In deastringed fruit or not, 1-MCP maintained fruit firmness higher, confirming its effect in repressing maturation. It was not possible to relate pectin interaction with soluble tannins astringency removal, because even with flesh firmness decreaseand increased pectin solubilization, the index of astringency and soluble tannins

remained elevated in control fruits. In soft fruit pulp parenchyma cells became damaged while tanniferous cells wereintactand dispersed, especially fruits deastringed with ethanol. The storage of persimmons „Giombo' at 5˚C for until 60 days is not recommended once the firmness reached values below the minimum recommended for marketing (10 N).

Keywords: **C**ellular degradation; *Diospyros kaki* L.; Soluble pectins; Tannins; 1-MCP

5.1 Introdução

A cultura do caqui vem se expandindo nos últimos anos devido a boa aceitação do fruto no mercado. Atualmente o Brasil é o quarto produtor mundial de caquis com produção de 164.495 toneladas no ano de 2010 (IBGE, 2010). Porém, a concentração da colheita num curto período de tempo, tratamentos inadequados para remoção da adstringência e curto período de conservação dos frutos acarretam perdas de qualidade e no sistema de comercialização.

O caquizeiro 'Giombo' pertence ao grupo de polinização variável (PV), ou seja, apresenta adstringência e polpa clara, quando ocorre desenvolvimento partenocárpico do fruto (CAMPO-DALL'ORTO et al., 1996). Apresenta período de colheita tardia e comercialmente, estes frutos necessitam de remoção da adstringência para consumo.

A adstringência é promovida pelos taninos que são classificados em taninos hidrolisáveis ou solúveis, formados principalmente a partir de ácido gálico (galotaninos) e ácido hexahidrodifênico (elagitaninos) esterificados a um poliol, normalmente a D-glicose e taninos condensados ou insolúveis ou proantocinidinas, constituídos por unidades flava-3-ols (catequina) ou flavan 3,4-diols (leucoantocianinas) (HANDIQUE; BARUAH, 2002).

Os produtores tem utilizado basicamente etanol para remoção da adstringência em caqui, por ser um método de baixo custo e eficiente no processo. A aplicação de etanol promove o aumento da atividade da enzima alcooldehidrogenase que desloca o equilíbrio entre etanol e acetaldeído (PESIS, 2005), o qual induz a polimerização das moléculas solúveis de taninos, tornando-as insolúveis e não adstringentes (HASLAN, 1996).

A absorção de quantidades elevadas de etanol, e consequente formação de acetaldeído, podem afetar a estrutura celular promovendo a degradação de pectinas da parede celular. Estas pectinas solúveis podem sofrer interações não covalentes com as moléculas de tanino, realizando uma função similar ao acetaldeído, polimerizando os taninos solúveis, removendo a adstringência dos frutos (TAIRA; MATSUMOTO, 1997). Como consequência, ocorre a

aceleração da perda da firmeza da polpa, inviabilizando precocemente a comercialização dos frutos (ANTONIOLLI et al., 2000).

No intuito de preservar as características dos frutos, principalmente a firmeza de polpa, e estender o período de oferta no mercado, tem-se utilizado armazenamento refrigerado e o uso do 1-metilciclopropeno (1-MCP), o qual apresenta função de bloquear o sítio de ação do etileno, retardando o amadurecimento e o processo de senescência (BLANKENSHIP; DOLE, 2003).

O objetivo do trabalho foi analisar caquis „Giombo' após a destanização com etanol e aplicação de 1-metilciclopropeno (1-MCP), a fim de verificar a influência das pectinas na remoção da adstringência durante o armazenamento refrigerado através de análises fisiológicas e estruturais.

Desenvolvimento

5.2 Material e métodos

Coleta do material e tratamentos

Caquis „Giombo' foram colhidos em pomar comercial localizado em Mogi das Cruzes-SP (23°31'S46°11'O) a 742m de altitude em abril de 2012. Após a colheita, os frutos foram transportados para o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Pós-Colheita, ESALQ/USP, e submetidos a uma rigorosa seleção quanto ao tamanho, coloração e presença de danos mecânicos.

Os seguintes tratamentos foram realizados: T1) Controle (Frutos não tratados); T2) Frutos tratados com 1-MCP 1000 nL L^{-1} por 12 horas; T3) Frutos tratados com etanol 1,70 mL Kg^{-1} durante 12 horas; T4) Frutos tratados com etanol 1,70 mL Kg^{-1} durante 12 horas e posteriormente tratados com 1-MCP 1.000 nL L^{-1} durante 12 horas.

Para a aplicação de etanol e de 1-MCP (SmartFresh^{TM}), os frutos foram acondicionados em caixas plásticas vazadas, e estas no interior de caixa de plástico com medidas de 0,50 x 0,80 x 0,47m (Figura 2 - anexo). O etanol e o 1-MCP foram colocados em placas de Petri na parte inferior da caixa. As caixas foram fechadas hermeticamente para promover a mistura gasosa e mantidas a 22 ± 1˚C.

Após os tratamentos, os frutos foram acondicionados em bolsas plásticas específicas para caqui (Xten® Fresh Prod. Packaging Technology) e mantidos sob refrigeração (AR) a 5

± 1˚C e 90 ± 5% UR sendo retirados desta condição aos 30 e 60 dias e mantidos a temperatura ambiente durante 5 dias para simulação comercial a temperatura ambiente.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 4 tratamentos e 4 repetições de 5 frutos. Os frutos foram avaliados antes do tratamento (caracterização do fruto ou dia zero) e ao final de cada período de simulação comercial quanto às variáveis.

Firmeza de polpa

Determinada utilizando-se um penetrômetro digital, marca Sammar, modelo 85261.0472 TR, com ponteira plana de 8 mm de diâmetro. Foram efetuadas duas leituras por fruto, em lados opostos da região equatorial dos mesmos, após a remoção de uma pequena parte da casca. Os resultados foram expressos em Newtons (N).

Teste com Vanilina Clorídrica

Foram realizadas secções de tecido fresco da porção equatorial dos frutos com auxílio de lâmina inoxidável. As secções foram colocadas sobre lâminas histológicas, corados com Vanilina em ácido clorídrico a 10%, para identificação de taninos, e cobertas com lamínula. As imagens foram capturadas em microscópio trinocular Leica DM LB acoplado na câmara de vídeo Leica DC 300 F e processadas em computador para confecção das ilustrações.

Índice de adstringência

Determinado através do método proposto por Campo-Dall'Orto et al. (1996), no qual se avalia a impressão de uma das faces dos frutos cortados na região equatorial em papel filtro, previamente preparado com solução de cloreto férrico ($FeCl_3$) a 5%. O tanino, na forma solúvel, reage com o cloreto férrico, tornando-se escurecido. As impressões foram avaliadas através da escala de notas: 1=não taninoso; 2=ligeiramente taninoso; 3=mediamente taninoso; 4=taninoso; 5=muito taninoso.

Teor de taninos solúveis e totais

Os teores de taninos solúveis e totais foram determinados espectrofotometricamente utilizando-se o reagente de Follin-Ciocalteau (50%), segundo técnica recomendada por Taira et al. (1996), na qual utilizou-se 1g de polpa triturada para volume final de 100 mL de extrato, do qual retirou-se uma alíquota de 1 mL. A esta alíquota adicionou-se reagente de Follin-Ciocalteau (50%) e 1,0 mL de solução de carbonato de sódio supersaturado e 7,5 mL de água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro marca Biochrom, modelo Libra S22

com absorbância a 725 nm. Os resultados foram expressos em gramas por 100g de polpa (g $100g^{-1}$).

Teor de pectina solúvel e solubilização de pectinas

As pectinas solúveis e totais foram extraídas segundo a metodologia descrita por McCready e Mccomb (1952), utilizando 2 g de polpa congelada para o preparo do extrato e a determinação, segundo a técnica descrita por Bitter e Muir (1962), na qual se utiliza 1 mL de extrato, 3,6 mL de solução de H_2SO_4 contendo 0,0125M de borato de sódio e acrescentado 60 µl de 3-phenylphenol (90%). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 520 nm e comparadas com uma curva-padrão de ácido galacturônico. A solubilização de pectinas foi obtida através da equação: % solubilização = (teor de pectina solúvel/teor de pectina total)*100.

Produção de etanol e acetaldeído

Os teores de etanol e acetaldeído foram medidos pela metodologia de Davis e Chace (1969), onde 1 g de polpa triturada foi lacrada em frasco de vidro de 40 mL e mantida em freezer a -26ºC, até o momento da análise. Os frascos permaneceram em banho-maria por 30 minutos a 50ºC e, após este período, foi coletado amostra de ar de 1 mL do frasco e injetado no cromatógrafo a gás marca Thermofinigan, modelo Thermoquest GC Trace 2000 com detector de ionização de chama (FID) com coluna Porapak N. Os resultados foram expressos em µg de acetaldeído e etanol por grama de material vegetal (µg g^{-1}).

Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foi utilizado o programa SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

5.3 Resultados e discussão

Conforme observado em outros estudos com „Giombo' (EDAGI et al., 2009; MONTEIRO, 2011), a dose de etanol 1,70 mL Kg^{-1} por 12 horas foi efetiva para remoção da

adstringência, pois os frutos apresentaram índice de adstringência 1,0 (Figura 1A) e teor de taninos solúveis em torno de 0,050 g $100g^{-1}$ (Figura 1B) na avaliação de 30 e 60 dias, após simulação comercial. Nos frutos não destanizados (controle), o índice de adstringência e o teor taninos solúveis, embora tenham apresentado redução, mantiveram-se elevados ao final de 30 e 60 dias de armazenamento (Figura 1B). Nos frutos tratados somente com 1-MCP, não houve redução significativa de taninos solúveis e o índice de adstringência manteve-se elevado, provavelmente devido ao efeito repressor no metabolismo normal do amadurecimento dos frutos impedindo a sua destanização natural. Terra (2010) também verificou que o 1-MCP, quando aplicado isoladamente, retarda o amadurecimento e a remoção natural da adstringência de caqui.

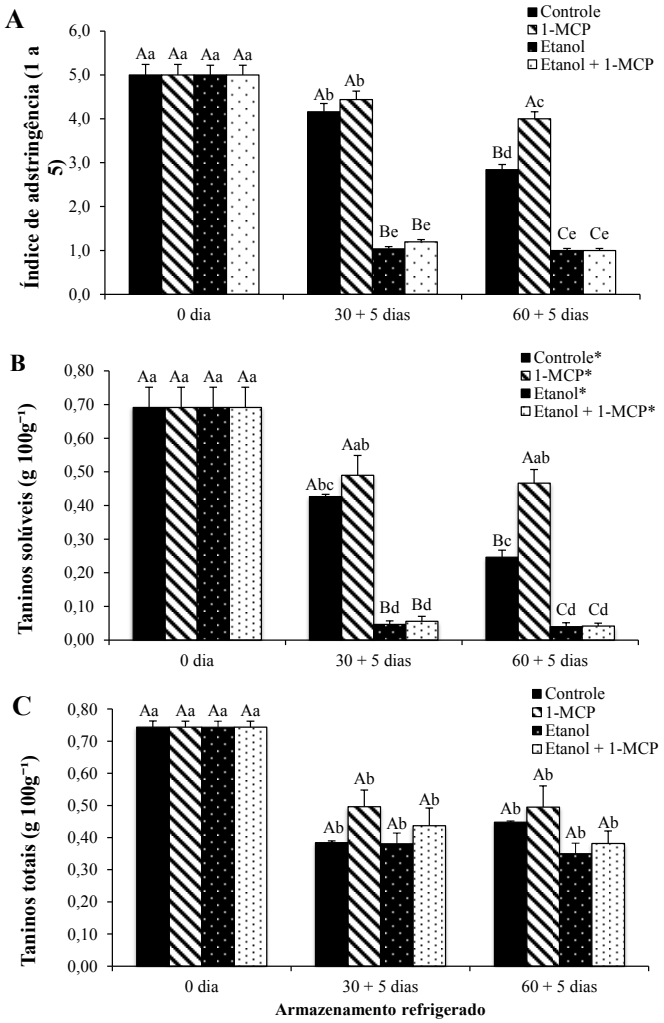

Figura 1 - Índice de adstringência (A), taninos solúveis (B) e taninos totais (C) em caqui 'Giombo' armazenados a 5 ± 1ºC e 90 ± 5% UR 60 dias + 5 dias de simulação comercial. Dia 0: caracterização dos frutos. Índice de adstringência: 1=não taninoso; 2=ligeiramente taninoso; 3=mediamente taninoso; 4=taninoso; 5=muito taninoso. Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada período avaliado e as letras minúsculas comparam o efeito dos tratamentos durante o período de armazenamento. As letras iguais indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão da média (n=4). *Dados transformados em raiz quadrada, k=0

O teor de taninos totais nos frutos diminuiu significativamente após a aplicação dos tratamentos, mas não diferiu entre os tratamentos e ao longo do tempo (Figura 1C). Também Taira et al. (1990) verificaram teores de taninos solúveis reduzidos em torno de 0,30% em caqui 'Hiratanenashi' tratados com etanol e CO_2, enquanto os taninos totais mantiveram valores praticamente constantes.

Em 'Giombo', frutos que não apresentam sementes, o processo de remoção da adstringência não ocorre naturalmente, visto que a concentração de etanol e acetaldeído é muito baixa, como verificado logo após a colheita (Figuras 2A e B), necessitando da aplicação exógena de etanol para que o processo de destanização ocorra. O etanol, ao ser absorvido pelos tecidos do fruto, é transformado em acetaldeído pela ação da enzima álcool desidrogenase (OSHIDA et al., 1996). O acetaldeído reage com os taninos solúveis, causando sua polimerização e reduzindo a adstrinência (ITO, 1971).

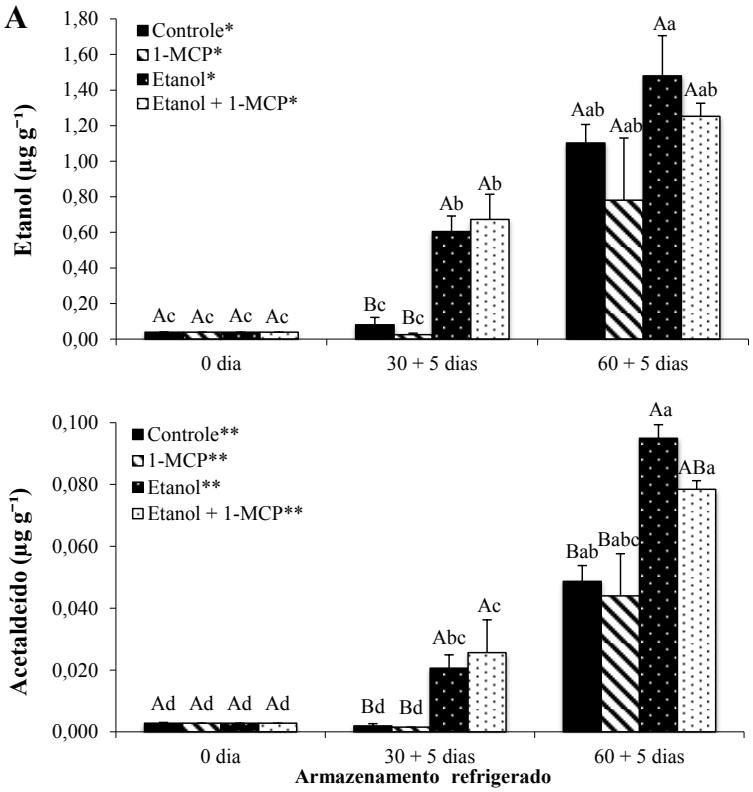

Figura 2 - Teores de etanol (A) e acetaldeído (B) em caquis 'Giombo' tratados e armazenados a 5 ± 1ºC e 90 ± 5% UR 60 dias + 5 dias de simulação comercial. Dia 0: caracterização dos frutos. Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada período avaliado e as letras minúsculas comparam o efeito dos tratamentos durante o período de armazenamento. As letras iguais indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão da média (n=4). *Dados transformados em raiz quadrada, k=0. **Dados transformados em Log X na base 10

Na primeira avaliação (30 dias em AR e 5 dias de SC), os teores de etanol e acetaldeído nos frutos destanizados elevaram significativamente (Figuras 2A e B), sendo efetivos para a completa destanização dos frutos. Nos frutos controle, houve pequeno acréscimo na produção de etanol e acetaldeído, o que não ocorreu nos frutos tratados somente com 1-MCP. Aos 60 dias de armazenamento, houve aumento na produção de etanol e acetaldeído em todos os tratamentos (Figuras 2A e B). No entanto, nos tratamentos controle e apenas com 1-MCP a elevação nos teores desses gases não foi efetiva para reduzir a adstringência, pois os frutos ainda apresentaram elevados teores de taninos solúveis e índice de adstringência. Os resultados indicam que a produção de etanol e acetaldeído ocorreu, provavelmente, após a elevação da temperatura devido à retirada do fruto da condição de armazenamento refrigerado para a condição ambiente, que também foi verificado em melão (CHOI et al., 2001) e lichia (PESIS et al., 2002). Outro fator que pode ter contribuído para a elevada produção de etanol e acetaldeído nos frutos não destanizados foi o estágio avançado de maturação e senescência após 60 dias de armazenamento refrigerado, alterando o metabolismo, resultando no amolecimento dos frutos.

Os frutos recém-colhidos apresentaram firmeza de 44,62 N e, após os tratamentos e durante o período de armazenamento, ocorreu uma diminuição gradativa da firmeza de polpa em todos os tratamentos (Figura 3A). Valores decrescentes de firmeza de polpa também foram obtidos por Antoniolli et al. (2000) em caqui „Giombo' tratados com etanol a 3,85 mL Kg^{-1} por 24, 36 ou 48 horas e armazenados por 10 dias a 25ºC.

Tanto nos frutos destanizados quanto nos não destanizados, o 1-MCP preservou a firmeza, sendo que aos 60 dias os frutos tratados somente com 1-MCP apresentaram valores acima de 10 N. Terra (2010) também verificou que frutos 'Giombo' destanizados e não destanizados e tratados com 1-MCP apresentaram maior firmeza de polpa ao final de 30 dias a 5ºC e 15 dias de simulação, em relação àqueles tratados apenas com etanol.

A redução da firmeza de polpa ocorrida, principalmente nos frutos destanizados, está relacionada às pectinas. Durante o armazenamento houve um acréscimo significativo das pectinas solúveis somente nos frutos destanizados tratados ou não com 1-MCP aos 60 dias (Figura 3B). A porcentagem de solubilização das pectinas, que leva em consideração a quantidade de pectinas solúveis e totais, apresentou maior aumento nos frutos somente destanizados aos 60 dias de armazenamento (Figura 3C).

De acordo com Taira et al. (1997) as pectinas solúveis podem formar ligações covalentes e não covalentes com as moléculas de taninos solúveis, formando polímeros de taninos, tornando-os insolúveis e, assim, removendo a adstringência dos frutos. Porém, nos

tratamentos controle e 1-MCP isolado, não houve aumento significativo da solubilização das pectinas, o índice de adstringência permaneceu elevado e o teor de taninos solúveis apresentou uma pequena redução a qual pode ter sido influenciada pela produção de etanol e de acetaldeído aos 60 dias.

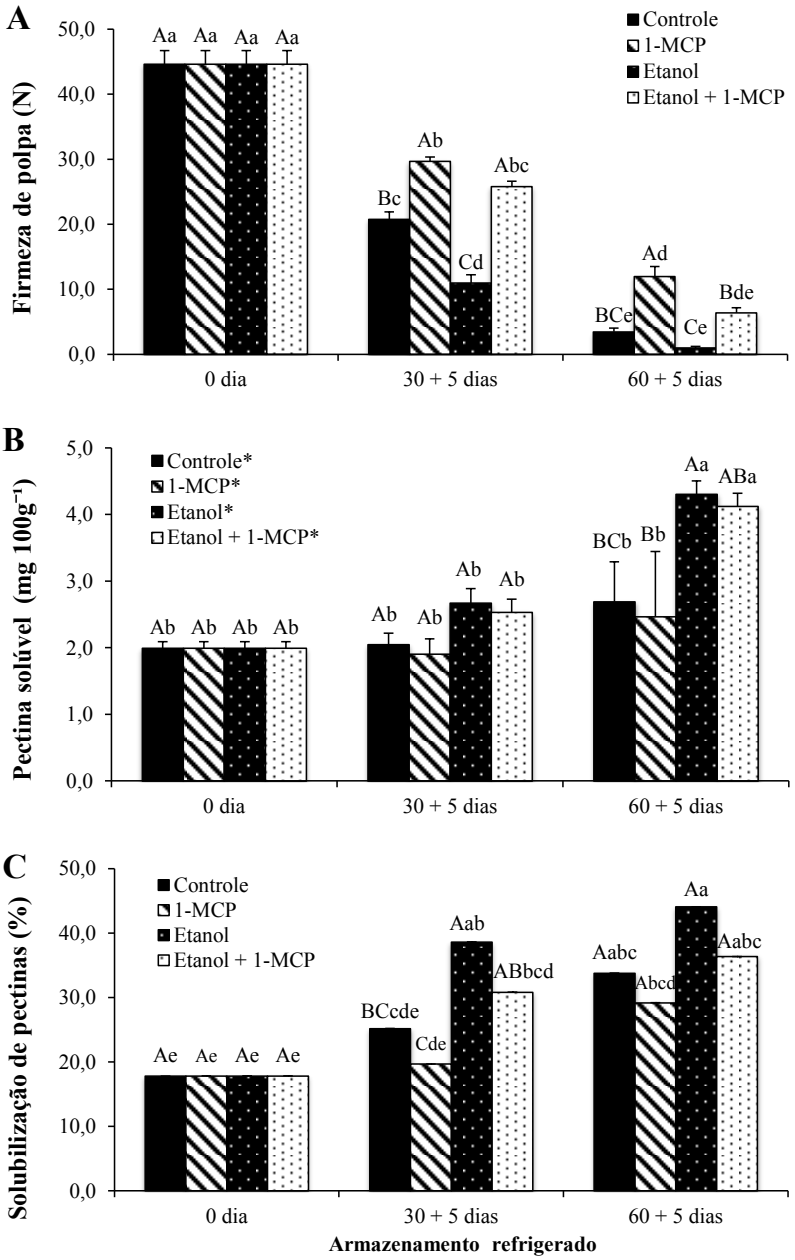

Figura 3 - Firmeza de polpa (A), pectina solúvel (B) e solubilização de pectinas (C) em caquis 'Giombo' tratados e armazenados a 5 ± 1ºC e 90 ± 5% UR 60 dias +5 dias de simulação comercial. Dia 0: caracterização dos frutos. Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada período avaliado e as letras minúsculas comparam o efeito dos tratamentos durante o período de armazenamento. As letras iguais indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão da média (n=4). *Dados transformados em raiz quadrada, k = 0

As análises estruturais com vanilina clorídrica confirmou os resultados quantitativos de taninos. Antes de aplicar os tratamentos, a secção submetida ao teste conferiu coloração vermelha intensa em toda área (Figura 4A). Mesmo após 30 dias de armazenamento em frutos não destanizados e tratados com 1-MCP, no momento da secção, os taninos solúveis extravasaram do vacúolo, indicando a presença de taninos não polimerizados ainda (Figura 4B e C), sendo observados da mesma forma aos 60 dias, com menos intensidade. Por outro lado, nos frutos destanizados o conteúdo tanífero é visualizado apenas no vacúolo das células taníferas o que indica a sua completa insolubilização (Figura 4D-I). Em relação ao parênquima do pericarpo as células se mantém integras aos 30 dias (Figura 4D) e, em frutos destanizados e tratados com 1-MCP aos 60 dias de armazenamento e simulação comercial (Figura 4E). No entanto, os frutos destanizados, os quais apresentaram maior perda de firmeza do pericarpo e polpa com aspecto translúcido em secções frescas, as células parenquimáticas aparecem desestruturadas (Figura 4F). Distúrbios fisiológicos pelo frio podem causar redução da firmeza e polpa translúcida ou farinhenta (MACRAE, 1987) similares ao observado em grande parte dos frutos após a retirada da câmara mantida a 5˚C, principalmente em frutos destanizados. Portanto, é provável que tenha ocorrido danos por frio no presente estudo.

Embora as secções tenham sido transversais ao pericarpo, devido à perda de estrutura do parênquima, a maioria das células taníferas apresentava-se íntegra e dispersa no parênquima (Figuras 4F e G). Em algumas células taníferas havia projeções da parede celular acompanhada pelo vacúolo (Figuras 4G-H) e outras com a parede íntegra (Figura 4I). Estas projeções nas células taníferas foram mais evidentes em frutos destanizados e devem estar relacionadas ao efeito mecânico no tonoplasto gerado pela polimerização dos taninos ao processo de destanização devido à polimerização do conteúdo (SALVADOR et al., 2007).

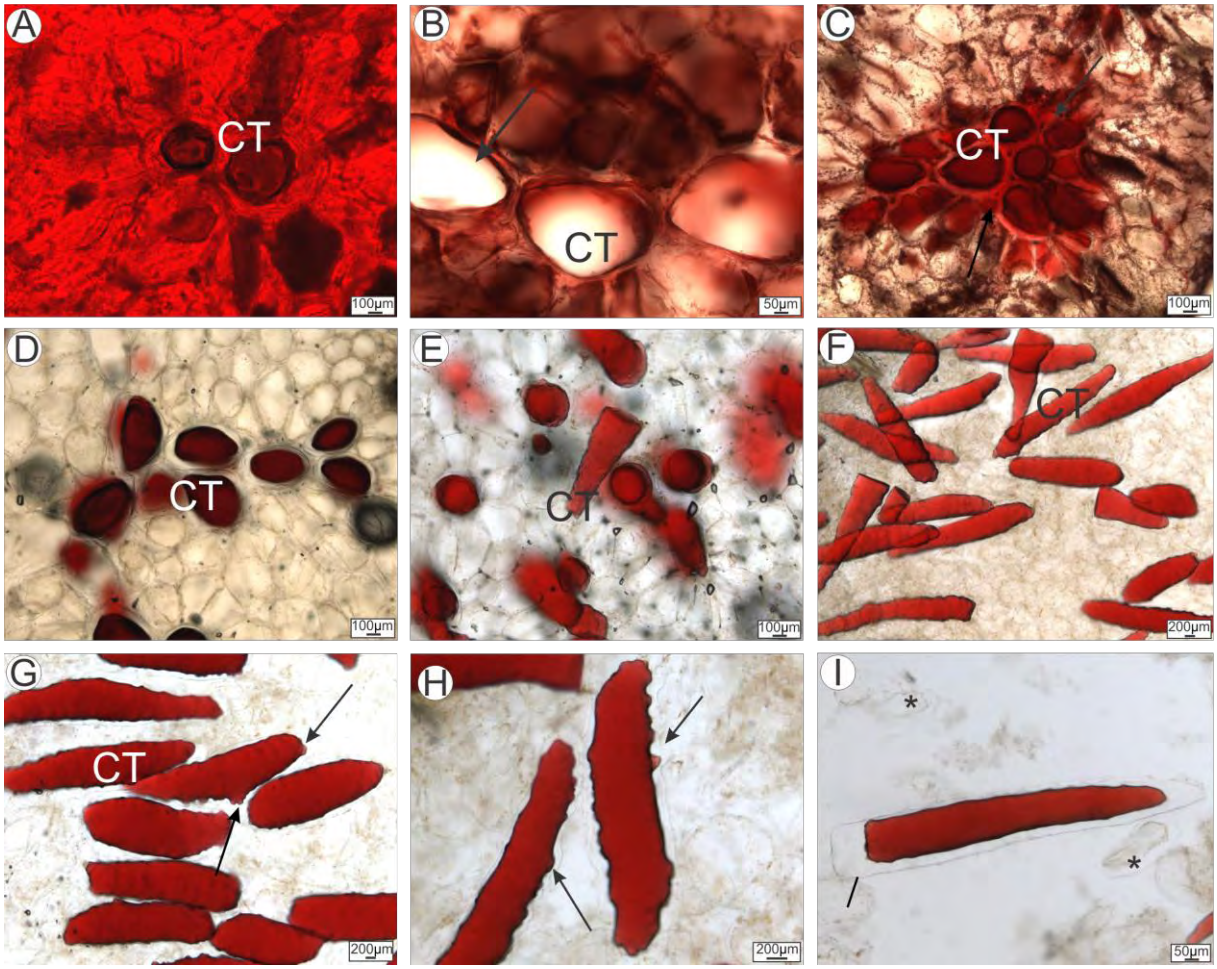

Figura 4 - Teste com vanilina clorídrica em secções transversais do mesocarpo de caquis 'Giombo' tratados e armazenados a 5 ± 1ºC 90 ± 5% UR por 60 dias + 5 dias de SC. T1: controle; T2: 1-MCP 1000 nL L^{-1}/12 horas; T3: etanol 1,70 mL Kg^{-1}/12 horas e T4: etanol 1,70 mL Kg^{-1}/12 horas + 1-MCP 1000 nL L^{1}/12 horas. A: Antes do tratamento de destanização. B: Células taníferas com taninos extravasado do vacúolo (seta) em T1 aos 30 dias. C: Células taníferas e conteúdo tanífero extravasado ao redor (seta) em T2 aos 30 dias. D: Taninos insolubilizados e delimitados na célula tanífera em T3 aos 30 dias. E: Taninos insolubilizados e delimitados na célula em T4 aos 60 dias. F: Células taníferas íntegras e em posição longitudinal e dispersas no parênquima em degradação em frutos com polpa amolecida em T3 aos 60 dias. G-H: Células taníferas com projeções da parede celular acompanhada pelo vacúolo com taninos (setas) em T3 aos 60 dias. I: Célula tanífera com parede celular íntegra e vacúolo preenchido com tanino (seta) e células parenquimáticas rompidas (*) em T4 aos 60 dias. SC: Simulação Comercial, CT= Célula Tanífera

5.4 Conclusões

A exposição dos frutos ao etanol (1,70 mL Kg^{-1}) por 12 horas foi eficiente para remoção da adstringência em caqui 'Giombo', com níveis aceitáveis de índice de adstringência e taninos solúveis. O tratamento de destanização com etanol reduz a firmeza dos frutos, e o 1-MCP preserva, tanto em frutos destanizados quanto não destanizados. O aumento da solubilização das pectinas não pode ser relacionado com o índice de adstringência e com o teor de taninos solúveis

Referências

ANTONIOLLI, L.R.; CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; SCARPARE FILHO, J.A. Remoção da adstringência de frutos de caqui „Giombo' sob diferentes períodos de exposição ao vapor de álcool etílico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 10, p. 2083-2091, 2000.

BITTER, T.; MUIR, H.M. A modified uronic acid carbazole reaction. **Analytical Chemistry**, London, v. 34, p. 330-334, 1962.

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

CAMPO-DALL'ORTO, F.A.; OJIMA, M.; BARBOSA, W.; ZULLO, M.A.T. Novo processo de avaliação da adstringência dos frutos no melhoramento do caquizeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 55, n. 2, p. 237-243, 1996.

CANTERI, M.G.; ALTHAUS, R.A.; VIRGENS FILHO, J.S.; GIGLIOTI, E.A.; GODOY, C.V. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, Ponta Grossa, v. 1, n. 2, p. 18-24, 2001.

CHOI, H.K.; PARK, S.M.; YOO, K.C.; JEONG, C.S. Effects of shelf temperature on the fruit quality of muskmelon after storage. **Korean Journal of Horticultural Science and Technology**, Korean, v. 19, n. 2, p. 135–139, 2001.

DAVIS, P.L; CHACE, W.G.Jr. Determination of alcohol in citrus juice by gas chromatographic analysis of headspace. **HortScience**, Alexandria, v. 4, p. 117-119, 1969.

EDAGI, F.K.; CHIOU, D.G. TERRA, F.A.M.; SESTARI, I.; KLUGE, R.A. Remoção da adstringência de caquis „Giombo' com subdosagens de etanol. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 7, p. 2022-2028, 2009.

HANDIQUE, J.G.; BARUAH, J.B. Polyphenolic compounds: an overview. **Reactive and Functional Polymers**, Amsterdam, v. 52, p. 163–188, 2002.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 59, p. 205-215, 1996.

ITO, S. The persimmon. In: HULME, A.C. **The biochemistry of fruits and their products**. London: Academic Press, 1971. v. 2, chap. 8, p. 281-301.

MCCREADY, R.M.; MCCOOMB, E.A. Extraction and determination of total pectin materials in fruits. **Analytical Chemistry**, Chapel Hill, v. 24, n. 12, p. 1586-1588, 1952.

MCRAE, E.A. Development at chilling injury in New Zeland grow **'**Fuyu**'** persimmon during storage**. New Zealand Jornoul of Experimental Agriculture**, New Zealand, v. 15, p. 333-334, 1987.

MONTEIRO, M.F. **Técnicas de remoção da adstringência e refrigeração de caqui 'Giombo'**. 2011. 75 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidadede São Paulo, Piracicaba, 2011.

OSHIDA, M.; YONEMORI, K.; SUGIURA, A. On the nature of coagulated tannins in astringency-type persimmon fruit after an artificial treatment of astringency removal. **Postharvest Biology and Technology,** Amsterdam, v. 8, n. 4, p. 317-327, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/>. Acesso em: 22 jan. 2012.

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

PESIS, E.; DVIR, O.; FEYGENBERG, O.; BEN-ARIE, R.; ACKERMAN, M.; LICHTER, A. Production of acetaldehyde and ethanol during maturation and modified atmosphere storage of litchi fruit. **Postharvest Biology and Technology,** Amsterdam, v. 26, p. 157–165, 2002.

SALVADOR, A.; ARNAL, L.; BESADA, C.; LARREA, V.; QUILES, A.; PEREZ-MUNUERA, I. Physiological and structural changes during ripening and deastringency treatment of persimmon fruit cv. 'Rojo Brilhante'. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. 181-188, 2007.

TAIRA, S. Adstringency in persimmon. **Modern Methods of Plants Analysis,** Berlin, v. 18, p. 97-110, 1996.

TAIRA, S.; ONO, M.; MATSUMOTO, N. Reduction of persimmon astringency by complex formation between pectin and tannins. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdan, v. 12, p. 265–271, 1997.

TAIRA, S.; SHIMOMURA, M.; OBA, S.; WATANABE, S. Changes in soluble and total tannin content during fruit development and their relation to removal of astringency in Japanese persimmon (*Diospyrus kaki* Thunb.). In: XXIII CONGRESS INTEGRATION HORTICULTURE, 23., 1990, Firenze. **Abstracts...** Firenze: XXIII Congress Integration Horticulture, 1990. v. 2, p. 3279.

TERRA, F.A.M. **Métodos combinados para a destanização e conservação pós-colheita de caquis 'Giombo'**. 2010. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

6 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO NA QUALIDADE DE CAQUIS „GIOMBO'

Resumo

O armazenamento refrigerado reduz o metabolismo dos frutos após a colheita e, por isso, pode ser considerado o fator mais importante na manutenção da qualidade de caquis. No entanto, frutos subtropicais e tropicais são sensíveis às baixas temperaturas de armazenamento e podem induzir danos por frio. Este estudo teve como objetivo estudar diferentes temperaturas de armazenamento refrigerado em caquis „Giombo' destanizados e com aplicação de 1-MCP e verificar a qualidade dos frutos e se há ocorrência de danos por frio. Foram utilizados três tratamentos: T1: controle, T2: etanol 1,70 mL Kg^{-1}/12 horas e T3: etanol 1,70 mL Kg^{-1}/12 horas + 1-MCP 1000 nL L^{-1}/12 horas. Os frutos foram submetidos a três temperaturas de armazenamento refrigerado: 1, 5 e 10 ± 1ºC + 90± 5% UR e retirados desta condição aos 15, 25 e 35 dias de armazenamento, com 5 dias de simulação comercial à temperatura ambiente para cada retirada. Foram realizadas análises de firmeza de polpa, cor de polpa, sólidos solúveis, taninos solúveis, índice de adstringência e análise estrutural ao microscópio de luz. Frutos não destanizados mantêm altos índices de taninos solúveis e adstringência independente da temperatura de armazenamento. Os sólidos solúveis são influenciados pelo processo de remoção da adstringência. Caquis 'Giombo' não destanizados e destanizados com e sem 1-MCP armazenados a 1ºC por 35 dias preservam mais a firmeza de polpa. A temperatura de 5ºC parece tornar os frutos mais susceptíveis a danos por frio com redução drástica da firmeza, geleificação da polpa e alterações estruturais.

Palavras-chave: Dano por frio; Destanização; *Diospyros kaki* L.;Temperatura; 1-MCP

Abstract

Cold storage reduces the metabolism of fruits after harvesting and therefore can be considered the most important factor in maintaining the quality of persimmons. However, subtropical and tropical fruits are sensitive to low storage temperatures which can induce chilling injury. This study aimed to study different temperatures of refrigerated storage deastringenced persimmons „Giombo' and application of 1-MCP in order to check the quality of the fruit and if there is chilling injury occurrence. Three treatments were used: T1: Control, T2: 1.70 mL ethanol Kg^{-1}/12 hours and T3: 1.70 mL ethanol Kg^{-1}/12 hours + 1 - MCP 1000 nL L^{-1}/12 hours. The fruits were exposed to three temperatures of refrigerated storage: 1, 5 and 10 ± 1ºC + 90 ± 5 % RH and removed from this condition at 15, 25 and 35 days of storage, with 5 days for commercial simulation at room temperature for each withdraw. Analyzes of firmness, pulp color, soluble solids, soluble tannins, astringency index and structural analysis by light microscopy were performed. Deastringenced fruits did not maintain high levels of soluble tannins and astringency independent of storage temperature. Soluble solids were influenced by the process of removing the astringency. Not deastringenced and deastringenced persimmons „Giombo', with and without 1-MCP and stored at 1ºC for 35 days preserved more the pulpfirmness. The temperature of 5 ºC seems to make the fruit more susceptible to chilling injury presentingdrastic reduction in firmness, pulp gelling and structural changes.

Keywords: Chilling injury; Detannization; *Diospyros kaki* L.; Temperature; 1-MCP

6.1 Introdução

Dentre as frutas que merecem destaque no mercado nacional, encontra-se o caqui, o qual apresenta grande importância pra o setor de frutas para o Brasil (FACHINELLO et al., 2011), com produção de 173,3 mil toneladas (FAO, 2011).

A cultivar „Giombo' é adstringente (PVA), sendo os taninos solúveis os responsáveis pela adstringência, os quais são polimerizados através da interação de moléculas de etanol e acetaldeído produzidas após tratamentos anaeróbios com etanol ou CO_2, que promovem polímeros insolúveis e não adstringentes (MATSUO; ITO, 1982).

A remoção da adstringência, sem perda de firmeza é um dos principais objetivos para a qualidade pós-colheita de caquis (PÉREZ-MUNUERA et al., 2009) e a redução da temperatura tem sido o método mais utilizado e eficiente para manter a qualidade de frutos e prolongar seu período de comercialização (KLUGE et al., 2002).

Estudos de conservação em caquis foram realizados com armazenamento refrigerado (EDAGI et al., 2009; ANTONIOLLI et al., 2001), atmosfera controlada (MORAIS, 2012) e modificada (MONTEIRO, 2011). No entanto, a conservação da qualidade de caquis após a colheita é limitada pela sua susceptibilidade a desordens fisiológicas inclusive a danos por frio (chilling injury) (PÉREZ-MUNUERA et al., 2009; SARGENT et al., 1993; BEM-ARIE; ZUTKHI, 1992).

De acordo com Arnal e Del Río (2004), os danos por frio resultam do desequilíbrio do metabolismo e da perda da compartimentação celular em temperaturas sub-ótimas. Os danos ocorrem em um intervalo de temperaturas baixas, mas não congelantes para o produto e o desenvolvimento depende da temperatura de armazenamento e do tempo que o fruto é exposto. Os sintomas aparecem, geralmente, quando o produto é removido da temperatura de refrigeração para uma temperatura mais elevada (WILLS et al., 1998).

As características de danos por frio são descritas como redução drástica da firmeza de polpa (PÉREZ-MUNUERA et al., 2009), geleificação da polpa (ARNAL; Del RÍO, 2004), degenerescência interna generalizada que resultam em frutos aguados ou translúcidos (CRISOSTO et al., 2008; KRAMMES et al., 2006). Contudo, a perda de firmeza prematura dos frutos não pode ser confundida com o amolecimento causado naturalmente pelo seu amadurecimento, já que não existem limites claros para diferenciá-los (REDPATH et al., 2009).

Embora os sintomas e características de danos por frio já tenham sido bem estabelecidos por estes autores, poucos estudos estruturais para verificar as alterações causadas por este tipo dano foram realizados em caqui. Pérez-Munuera et al. (2009) relaciona a redução da firmeza com a perda da integridade da parede celular e a perda da adesão intercelular com danos por frio. Em pêssegos são relatadas alterações consequentes de danos por frio como a separação das células do parênquima do mesocarpo, aumento dos espaços intercelulares e acúmulo de substâncias pécticas (LUZA et al., 1992).

Além da refrigeração, outra forma de retardar o amadurecimento e reduzir os danos por frio é através da aplicação de 1-MCP conjuntamente com o armazenamento refrigerado. O 1-MCP tem a habilidade de se ligar no mesmo sítio ativo do etileno, porém, sendo incapaz de promover as respostas fisiológicas desencadeadas por ele (FENG et al., 2004).

Estudos indicam que o 1-MCP preserva a estrutura celular durante o armazenamento refrigerado e reduz danos por frio em abacate (HERSHKOVITZ et al., 2005), pêra (LARRIGAUDIERE et al., 2004) e melão espanhol (VALDENEGRO et al., 2005). Em caquis „Rojo Brillante' armazenados a 1ºC, o 1-MCP reduziu os danos pelo frio e retardou o amolecimento da polpa (SALVADOR et al., 2004).

Diante da necessidade de prolongar a conservação de caquis „Giombo', este estudo teve como objetivo estudar diferentes temperaturas de armazenamento refrigerado em caquis „Giombo' destanizados e com aplicação de 1-MCP e verificar se há ocorrência de danos por frio.

Desenvolvimento

6.2 Material e métodos

Coleta do material e tratamentos

A colheita de caquis „Giombo' foi realizada em pomar comercial localizado em Guararema-SP, em maio de 2013. Após a colheita, os frutos foram transportados para o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Pós-Colheita, ESALQ/USP, e selecionados quanto ao tamanho, coloração e presença de danos mecânicos.

Foram utilizados três tratamentos: T1) Controle, T2) etanol 1,70 mL Kg^{-1}/12 horas e T3) etanol 1,70 mL Kg^{-1}/12 horas + 1-MCP 1000 nL L^{-1}/12 horas. Para a aplicação de etanol e de 1-MCP (SmartFreshTM) os frutos foram acondicionados em contentores plásticos

vazados e colocados em caixa de plástico com medidas de 0,50 x 0,80 x 0,47 m. Em seguida, as caixas foram fechadas hermeticamente para promover a mistura gasosa e mantidos a 22 ± 1ºC. Após os tratamentos, os frutos foram acondicionados em bolsas plásticas específicas para caqui (Xten® Fresh Prod. Packaging Technology) e encaminhados para refrigeração nas temperaturas de 1, 5 e 10 ± 1ºC + 90 ± 5% UR.

Os frutos foram avaliados antes dos tratamentos (dia zero), após os tratamentos ou entrada nas condições de armazenamento (dia 1), após as retiradas de cada condição de armazenamento aos 15, 25 e 35 dias e após a simulação comercial a temperatura ambiente por 5 dias (15+5, 25+5, 35+5). Foram utilizadas 4 repetições de 5 frutos para cada tratamento. Os frutos foram avaliados quanto as variáveis:

Firmeza de polpa

Determinada utilizando-se um penetrômetro digital, marca Sammar, modelo 85261.0472 TR, com ponteira plana de 8 mm de diâmetro. Foram efetuadas duas leituras por fruto, em lados opostos da região equatorial dos mesmos, após a remoção de uma pequena parte da casca. Os resultados foram expressos em Newtons (N).

Coloração da polpa

Foram realizadas duas leituras da casca na região equatorial do fruto e duas leituras em posições opostas na polpa, através de colorímetro, marca Minolta, modelo Chroma Meter CR-400. Foram realizadas leituras de L* (luminosidade), a* (variação entre a cor verde e a vermelha) e b* (variação entre a cor azul e a amarela). O índice de cor é calculado através da fórmula IC = (1000 x a*)/(L* x b*) e varia entre -20 a +20, sendo que quanto mais positivo, mais alaranjada será sua cor.

Índice de adstringência

Foi determinado através do método proposto por Campo-Dall'Orto et al. (1996), no qual se avalia a impressão de uma das faces dos frutos cortados na região equatorial em papel filtro, previamente preparado com solução de cloreto férrico ($FeCl_3$) a 5%. O tanino, na forma solúvel, reage com o cloreto férrico, tornando-se escurecido. As impressões foram avaliadas através da escala de notas: 1=não taninoso; 2=ligeiramente taninoso; 3=mediamente taninoso; 4=taninoso; 5=muito taninoso.

Teor de sólidos solúveis

Determinado colocando-se uma gota do suco extraído da polpa em refratômetro digital marca ATAGO, modelo PR-101, com correção automática de temperatura para 20ºC. Os resultados foram expressos em ºBrix.

Teor de taninos solúveis

Os teores de taninos solúveis foram determinados espectrofotometricamente utilizando-se o reagente de Follin-Ciocalteau (50%), segundo técnica recomendada por Taira et al. (1996), na qual utilizou-se 1g de polpa triturada para volume final de 100 mL de extrato, do qual retirou-se uma alíquota de 1 mL. A esta alíquota adicionou-se reagente de Follin-Ciocalteau (50%) e 1 mL de solução de carbonato de sódio supersaturado e 7,5 mL de água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro marca Biochrom, modelo Libra S22 com absorbância a 725 nm. Os resultados foram expressos em gramas por 100g de polpa (g $100g^{-1}$).

Análise anatômica ao microscópio (ML)

Foram retiradas porções da região equatorial dos frutos, fixados em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965), submetido à bomba de vácuo para a retirada do ar, desidratado em série etílica até 100% e infiltradas em resina para a confecção dos blocos. Os blocos foram seccionados em micrótomo rotativo a 5-6 µm de espessura. As secções foram coradas com azul de toluidina (SAKAI, 1973) para análises usuais e montadas em lâminas com resina sintética "Entellan". As imagens foram capturadas em microscópio trinocular Leica DM LB acoplado na câmara de vídeo Leica DC 300 F e processadas em computador para confecção das ilustrações.

Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (3 x 3 x 4), sendo os fatores: tratamentos (controle, etanol e etanol + 1-MCP); temperatura de armazenamento (1ºC, 5ºC, e 10ºC) e tempo de armazenamento (0, 15, 25 e 35 dias). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância com a utilização do programa SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

6.3 Resultados e discussão

Com base nos resultados da análise de variância para os parâmetros amostrados, houve interação entre os fatores tratamentos, temperatura e tempo de armazenamento em caquis „Giombo' (p<0,01) (Tabela 3-Anexo). O tratamento com 1,70 mL Kg^{-1} etanol por 12 horas foi eficiente para a remoção da adstringência, pois o índice de adstringência e os taninos solúveis apresentaram valores reduzidos após 2 dias de tratamento, menos expressivo nos frutos destanizados e tratados com 1-MCP, devido a sua ação repressora no metabolismo do fruto, tornando o processo de destanização mais lento (Figuras 1A-B).

Aos 15 dias, na primeira retirada dos frutos das três condições de armazenamento refrigerado, com exceção dos frutos controle, os frutos tratados com etanol com e sem 1-MCP estavam destanizados de maneira similar, indicando que a aplicação de 1-MCP não interferiu na remoção da adstringência com etanol em caquis „Giombo' como já verificado por Terra (2010). Os frutos controle, embora tenham obtido uma pequena redução do índice de adstringência e taninos solúveis comparados aos valores nos frutos recém-colhidos, estes se mantiveram elevados durante os 35 dias, nas três condições de armazenamento (Figuras 1A-B). Também Terra (2010) verificou que os frutos não destanizados se mantiveram adstringentes, sob refrigeração a 5°C, durante 30 dias e 15 dias de simulação comercial.

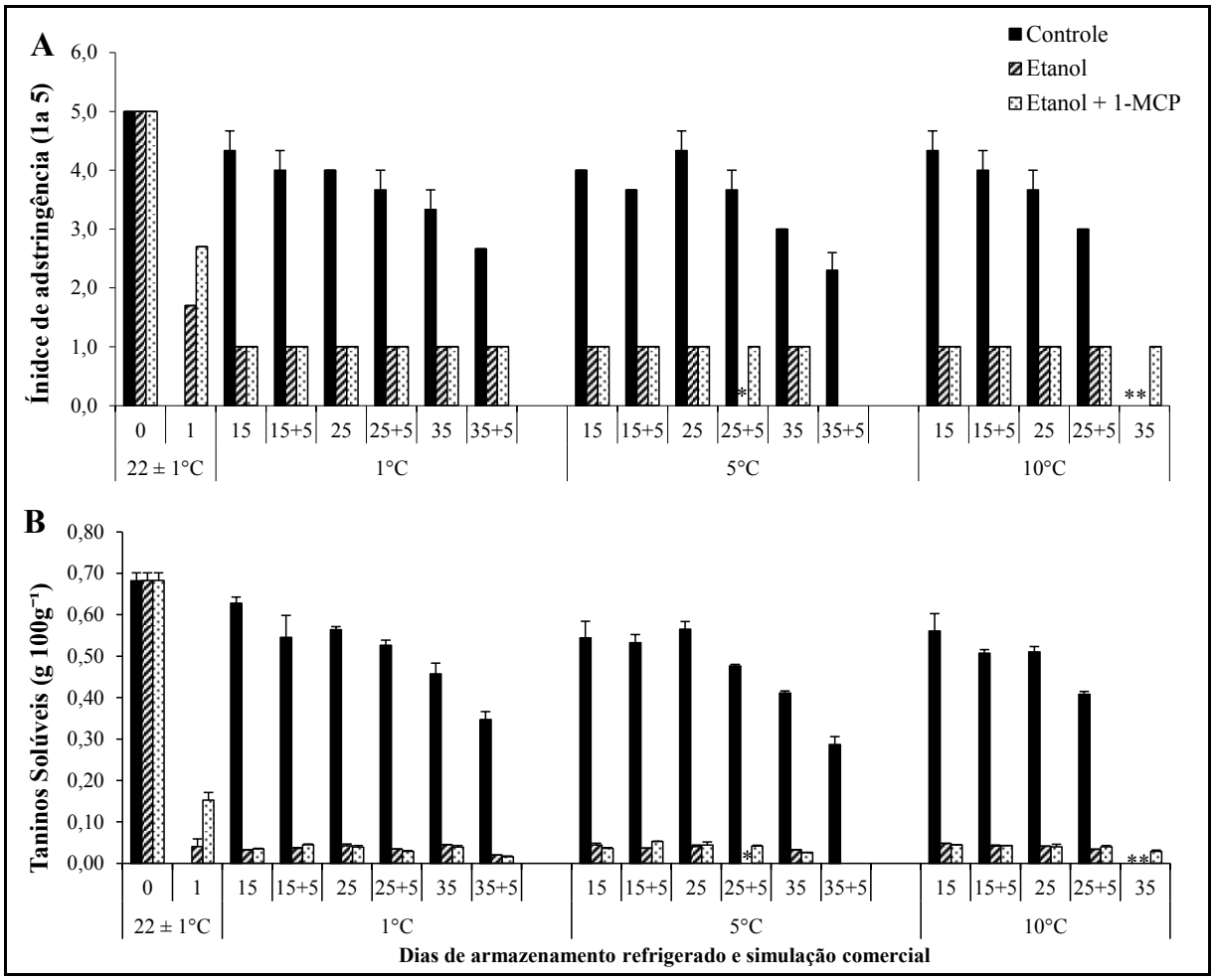

Figura 1 - Índice de adstringência (A) e teor de taninos solúveis (B) em caqui 'Giombo' tratados com etanol e 1-MCP e armazenados a 1, 5 e 10 ± 1ºC e 90 ± 5% UR por 15, 15 e 35 dias + 5 dias de simulação comercial. Índice de adstringência: 1=não taninoso; 2=ligeiramente taninoso; 3=mediamente taninoso; 4=taninoso; 5=muito taninoso. Dia 0: antes dos tratamentos. Dia 1: após tratamentos e entrada no AR. Parcelas descartadas (*). As barras verticais representam o erro padrão da media (n=4)

A redução da firmeza de polpa como consequência do processo de destanização em caqui foi evidente, inclusive dois dias após a destanização já havia ocorrido uma pequena redução da firmeza (Figura 2). Praticamente em todas as saídas de câmara e simulação comercial, nas três temperaturas de armazenamento, os frutos controle mantiveram a firmeza de polpa mais elevada.

No armazenamento a 10ºC os frutos destanizados estavam dentro dos padrões de comercialização somente até 15 dias de armazenamento e cinco dias de simulação comercial. Com 25 dias de armazenamento somente os frutos destanizados tratados com 1-MCP obtiveram 10N de firmeza, sendo que após a simulação comercial os três tratamentos não atingiram padrões mínimos de qualidade. A redução da firmeza em curto período de tempo no

armazenamento a 10ºC pode ter ocorrido pelo maior metabolismo dos frutos e não como resposta a danos por frio.

No armazenamento a 5ºC, durante a permanência dos frutos na câmara por 35 dias, a firmeza permaneceu dentro dos padrões em todos os tratamentos, mas durante o período de simulação comercial, somente os frutos controle e os destanizados com aplicação de 1-MCP obtiveram firmeza acima de 10N. Os frutos somente destanizados apresentaram firmeza reduzida já na simulação após 15 dias de armazenamento.

Na simulação comercial após 25 dias, os frutos destanizados foram descartados e após 35 dias somente os frutos controle resistiram. A drástica redução da firmeza observada nas três simulações comerciais após o armazenamento a 5ºC pode ser consequência de danos por frio (Figura 3-anexo) como verificado em caqui 'Rojo Brilhante' exposto a temperaturas inferiores a 8ºC (SALVADOR et al., 2004). Wills et al. (1998) também relatam que os sintomas de danos por frio geralmente aparecem quando o produto é removido da temperatura de refrigeração para uma temperatura mais elevada.

A firmeza dos frutos foi mais preservada na temperatura de 1ºC durante o armazenamento até 35 dias. Somente nesta temperatura os frutos tratados com 1-MCP obtiveram firmeza mais elevada que o controle nos três períodos de simulação comercial, o que indica que a combinação da temperatura de 1ºC e aplicação de 1-MCP promovem a manutenção da firmeza de caquis 'Giombo'.

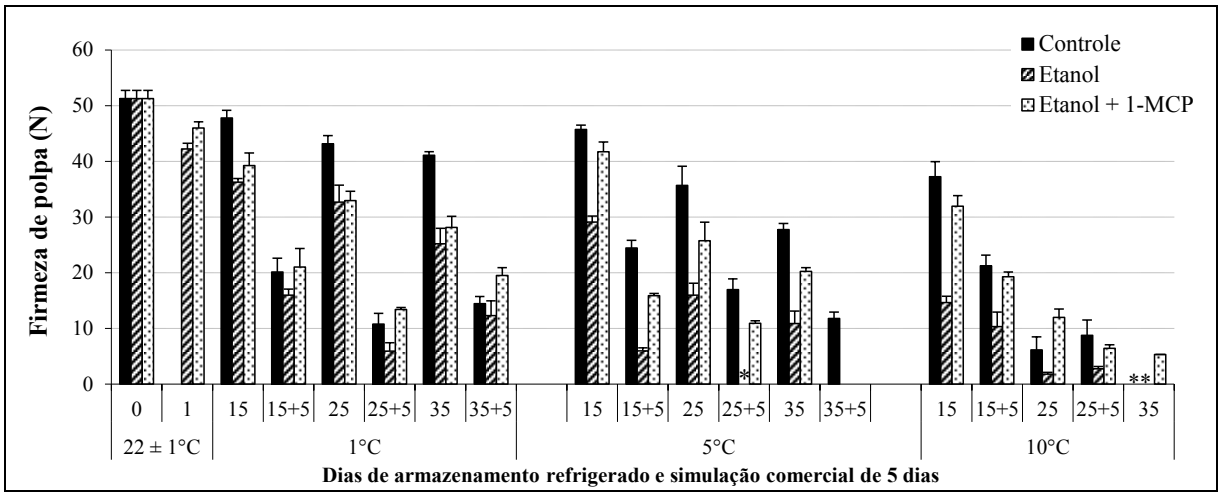

Figura 2 - Firmeza de polpa em caqui 'Giombo' tratados com etanol e 1-MCP e armazenados a 1, 5 e 10 ± 1ºC e 90 ± 5% UR por 15, 15 e 35 dias + 5 dias de simulação comercial a temperatura ambiente. Dia 0: firmeza após a colheita. Dia 1: após tratamentos e entrada no AR. Parcelas descartadas (*). As barras verticais representam o erro padrão da media (n=4)

Portanto, a temperatura intermediária estudada tornou os frutos mais susceptíveis a danos por frio, pois a firmeza foi mais reduzida a 5°C depois da passagem para temperatura ambiente como verificado Arnal e Del Río (2004) em caquis 'Rojo Brillante. Estes autores

também relacionam o aumento de sólidos solúveis nos frutos armazenados em temperaturas intermediárias (8°C e 11°C) com os danos por frio como já havia sido verificado em caqui „Suruga' (COLLINS; TISDELL, 1995).

No presente estudo, após a colheita, os frutos obtiveram sólidos solúveis em torno de 20 ºBrix com imediata redução após os tratamentos de destanização (Figura 3). Os frutos controle obtiveram um incremento, enquanto que os frutos destanizados e tratados com 1-MCP mantiveram valores estáveis durante todo período de armazenamento. Portanto, a relação entre o aumento de sólidos solúveis e danos por frio (ARNAL; DEL RÍO, 2004; COLLINS; TISDELL, 1995) não foi verificada nas condições analisadas.

A redução no teor de sólidos solúveis observada após os tratamentos de destanização com etanol também foi verificada em caqui „Rojo Brillante' após tratamento de destanização com CO_2 (SALVADOR et al., 2007). O teor de açúcares em frutos de caquizeiro diminui depois dos tratamentos para a eliminação da adstringência, sem causar a perda do sabor, e que o tanino solúvel interage com os açúcares, causando assim a diminuição dos sólidos solúveis (ITTAH, 1993).

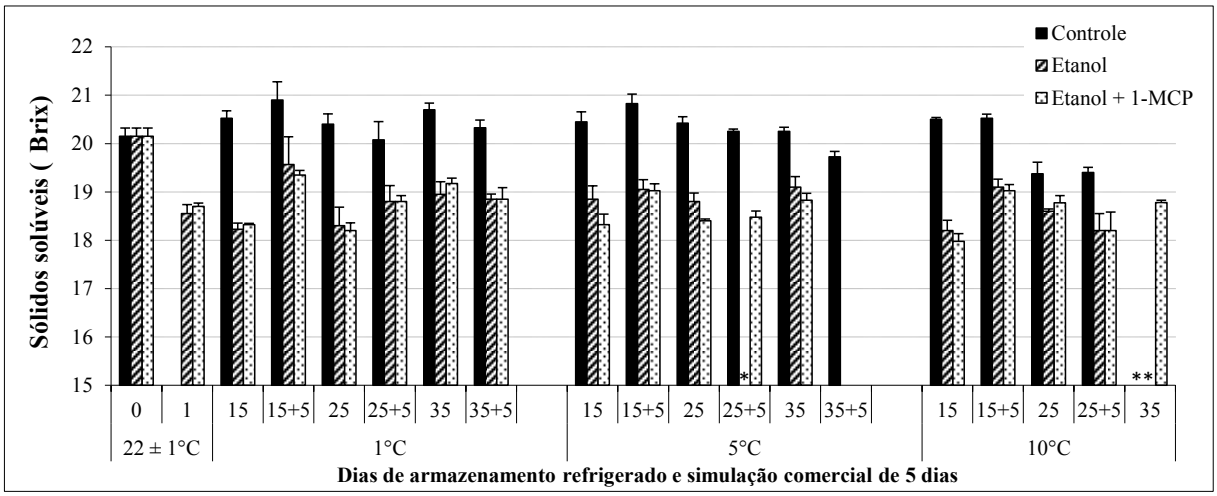

Figura 3 - Sólidos solúveis em caqui 'Giombo' tratados com etanol e 1-MCP e armazenados a 1, 5 e 10 ± 1ºC e 90 ± 5% UR por 15, 15 e 35 dias + 5 dias de simulação comercial. Dia 0: sólidos solúveis após a colheita. Dia 1: após tratamentos e entrada no AR. Parcelas descartadas (*). As barras verticais representam o erro padrão da média (n=4)

A aceleração da maturação e senescência influenciam na coloração da polpa. Após a colheita, os frutos apresentaram índice de cor de polpa em torno de 1, com acréscimo no período de 2 dias após o tratamento de destanização. Houve variação de índice de cor de polpa entre os três tratamentos, com valores mais elevados nos primeiros 15 dias, nas três

temperaturas de armazenamento refrigerado (Figura 4). Também Edagi et al., (2009) obtiveram resultados variáveis de índice de cor polpa em frutos controle e destanizados, armazenados a 1ºC por 20 dias e 14 dias de simulação comercial. No entanto, Monteiro (2011) relatou que frutos 'Giombo' tratados com etanol apresentaram valores de índice de cor de polpa mais baixos que os frutos controle armazenados a 1ºC por 20 dias o que não foi observado no presente estudo.

As variações de cor de polpa entre os tratamentos devem estar relacionadas ao amadurecimento dos frutos e ao metabolismo, pois nos frutos destanizados que receberam a aplicação de 1-MCP os valores foram mais reduzidos, na maioria dos períodos avaliados, provavelmente em função da redução do metabolismo. Woolf et al. (1997) obtiveram uma diminuição no índice de cor como consequência de danos por frio em caqui „Fuyu' armazenados a 0ºC, seguido de 3 dias a 20ºC. No presente estudo, não foi possível estabelecer uma relação da cor da polpa com os danos por frio nos frutos armazenados a 5ºC.

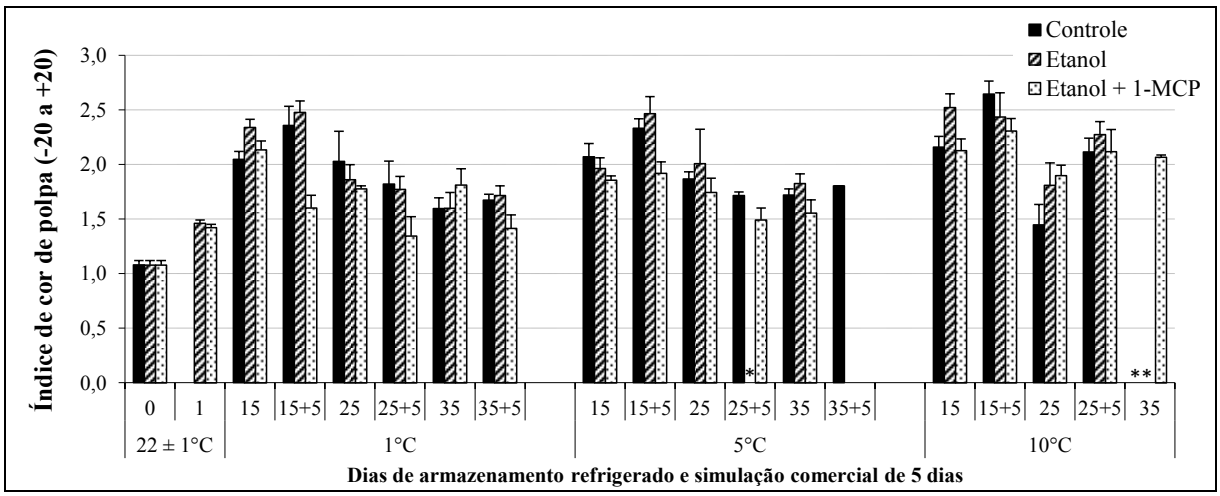

Figura 4 - Índice de cor de polpa em caqui 'Giombo' tratados com etanol e 1-MCP e armazenados a 1, 5 e 10 ± 1ºC e 90% UR por 15, 15 e 35 dias + 5 dias de simulação comercial. Dia 0: índice de cor de polpa após a colheita. Dia 1: após tratamentos e entrada no AR. As barras verticais representam o erro padrão da media (n=4)

As características físicas e químicas alteraram durante o armazenamento, e estas se refletiram na estrutura do pericarpo dos frutos.

Após a colheita, o mesocarpo dos frutos apresentaram células parenquimáticas isodiamétricas de tamanhos distintos e com alguns espaços intercelulares contendo substâncias pécticas (Figura 5A). Após os tratamentos e antes do armazenamento refrigerado, o mesocarpo dos frutos destanizados apresentou substâncias pécticas no interior das células (Figura 5B), ampliação dos espaços intercelulares com acúmulo de substâncias pécticas

(Figura 5C). Nos frutos destanizados tratados com 1-MCP, o mesocarpo apresentava estrutura anatômica similar ao controle com o acúmulo de conteúdo péctico nos espaços intercelulares um pouco mais pronunciado em relação ao controle (Figura 5D).

Após 15 dias de armazenamento e simulação comercial, nos frutos somente destanizados são encontradas mais células com conteúdo péctico no seu interior e nos espaços intercelulares em relação aos demais tratamentos, em especial, sob refrigeração a 5ºC (Figura 5E). A presença de substâncias pécticas no interior das células parenquimáticas pode resultar de alterações estruturais no pericarpo em razão de danos por frio (BRON et al., 2002).

O mesocarpo dos frutos destanizados armazenados a 5ºC por 25 dias e simulação comercial apresentou o tecido parenquimático desestruturado com células colapsadas e rompidas (Figura 5F) e da perda de adesão intercelular. Tais alterações estão relacionadas à redução drástica da firmeza do mesocarpo verificada neste tratamento o qual não apresentou as condições mínimas necessárias para a sua análise, sendo que o aspecto gelatinoso ou aguado (Figura D-E. anexo x) observado vem sendo relacionado ao dano por frio (PÉREZ-MUNUERA et al., 2009). Nesta mesma condição de armazenamento os frutos destanizados tratados com 1-MCP não apresentaram este tipo de alteração no mesocarpo, enquanto os frutos controle apresentaram paredes sinuosas e acumulo de substâncias pécticas no interior das células (Figura 5G). A preservação do mesocarpo em caquis tratados com 1-MCP também foi verificada por Pérez-Munuera et al. (2009).

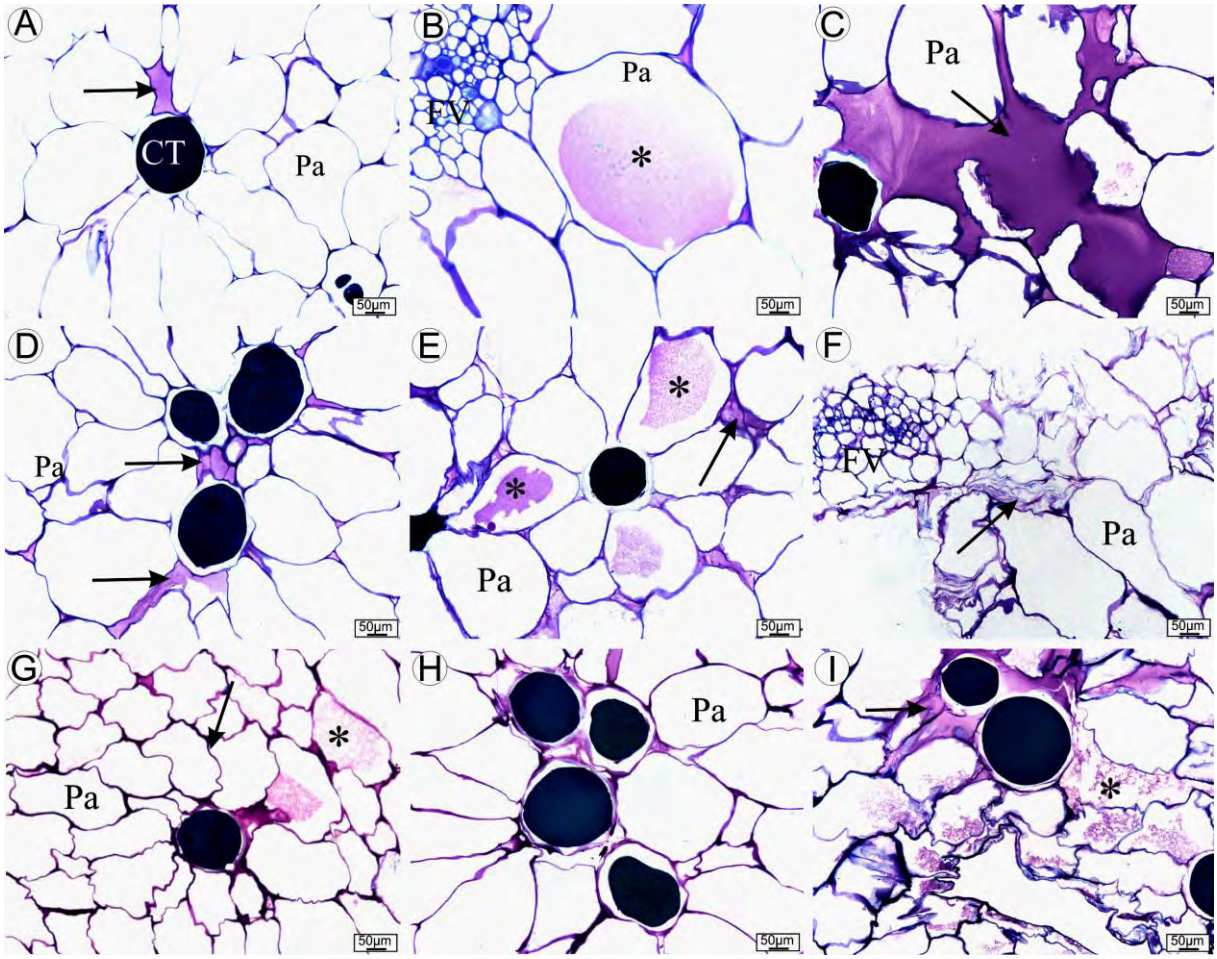

Figura 5 - Secções transversais do mesocarpo de caqui 'Giombo' tratados com etanol e 1-MCP e armazenados a 1, 5 e 10 ± 1ºC e 90% UR por 15, 15 e 35 dias + 5 dias de SC. A. Frutos recém-colhidos e antes dos tratamentos. B-C. Frutos logo após a destanização. Substâncias pécticas no interior da célula parenquimática (*) e nos espaços intercelulares (seta). D. Frutos logo após a destanização e aplicação de 1-MCP. Notar o acúmulo de substâncias pécticas nos espaços intercelulares (seta). E. Frutos destanizados e armazenados a 5ºC por 15 dias e 5 dias de SC. Notar o aumento do número de células com conteúdo péctico no seu interior (*) e nos espaços intercelulares (seta). F. frutos destanizados e armazenados a 5ºc por 25 dias e 5 dias sc. notar o parênquima desestruturado e as células colapsadas (seta). G. Frutos controle armazenados a 5ºC por 25 dias e 5 dias de SC. Notar paredes sinuosas (seta) e acúmulo de substâncias pécticas no interior das células (*). H. Frutos destanizados tratados com 1-MCP armazenados a 1ºC por 35 dias e 5 dias de SC. Notar o mesocarpo mais preservado. I. Frutos destanizados e armazenados a 10ºC por 35 dias e 5 dias de SC. Notar a desestruturação celular, acúmulo de conteúdo péctico nos espaços intercelulares (seta) e no interior das células (*). CT= célula tanífera, FV= feixe vascular, Pa= parênquima, SC= simulação comercial.

O mesocarpo dos frutos armazenados a 1ºC até 35 dias de armazenamento e simulação comercial não mostraram alterações além daquelas descritas logo após os tratamentos (Figura 5H) o que poderia explicar a manutenção da firmeza acima de 10 N em todos os tratamentos. Por outro lado, nos frutos armazenados a 10ºC houve alterações drásticas no mesocarpo já a partir dos 15 dias de armazenamento (Figura 5I) devido ao processo natural de avanço da maturação dos frutos e aumento do metabolismo nesta temperatura.

6.4 Conclusões

A qualidade dos caquis 'Giombo' foi melhor preservada quando os frutos foram destanizados e tratados com 1-MCP e armazenados a 1ºC por até 35 dias. Os frutos que foram apenas destanizados tiveram a estrutura celular do mesocarpo e a firmeza mais alteradas em todas as temperaturas analisadas. A temperatura de 5ºC torna os frutos mais susceptíveis a danos por frio com redução drástica da firmeza, geleificação da polpa e alterações estruturais.

Referências

ANTONIOLLI, L.R.; CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; SCARPARE FILHO, J.A. Influência da embalagem de polietileno na remoção da adstringência e na qualidade de (*Diospyros kaki* L.), cv. Giombo, armazenados sob refrigeração**. Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 293-297, 2001.

ARNAL, L.; DEL RÍO, M.A. Effect of cold storage and removal astringency on quality of persimmon fruit (*Diospyros kaki*, L.) cv. Rojo Brillante. **Journal of Food Science; Technology International**, Malden, v. 10, p. 179–185, 2004.

BEN-ARIE, R.; ZUTKHI, Y. Extending the storage life of „Fuyu' persimmon by modified atmosphere packaging. **Hortscience**, Alexandria, v. 27, n. 7, p. 811-813, 1992.

BRON, I.U.; JACOMINO, A.J.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Alterações anatômicas e físico-químicas associadas ao armazenamento refrigerado de pêssegos „Aurora-1' e „Dourado-2'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1349-1358, 2002.

CAMPO-DALL'ORTO, F.A.; OJIMA, M.; BARBOSA, W.; ZULLO, M.A.T. Novo processo de avaliação da adstringência dos frutos no melhoramento do caquizeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 55, n. 2, p. 237-243, 1996.

CANTERI, M.G.; ALTHAUS, R.A.; VIRGENS FILHO, J.S.; GIGLIOTI, E.A.; GODOY, C.V. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, Ponta Grossa, v.1, n.2, p.18-24, 2001.

COLLINS R.J.; TISDELL J.S. The influence of storage time and temperature on chilling injury in „Fuyu' and „Suruga' persimmon (*Diospyros kaki* L.) grown in subtropical Australia. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 6, n. 1/2, p. 149–157, 1995.

CRISOSTO, C.H.; MITCHAM, E.J.; KADER, A.A. **Persimmon:** recommendations for maintaining postharvest quality, 2008. Disponível em: <http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Fruit/persimmon.shtml>. Acesso em 18 out. 2013.

EDAGI, F.K.; CHIOU, D.G. TERRA, F.A.M.; SESTARI, I.; KLUGE, R.A. Remoção da adstringência de caquis „Giombo' com subdosagens de etanol. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 7, p. 585-594, 2009.

FAO. 2011. Disponível em <http://www.fao.org/inicio.htm>. Acesso em: 20 jan. 2013.

FACHINELLO, J.C.; PASA, M.S.; SCHMTIZ, J.D.; BETEMPS, D.L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. especial, p. 109-120, 2011.

FENG, X.; APELBAUM, A.; SISLER, E.C.; GOREN, R. Control of ethylene activity in various plant systems by structural analogue of 1-methylcyclopropene. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 42, n. 1, p. 29-38, 2004.

HERSHKOVITZ, V.; SAGUY, S.I.; PESIS, E. Postharvest application of 1-MCP to improve the quality of various avocado cultivars. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 37, p. 252–64, 2005.

ITTAH, Y. Sugar content changes in persimmon fruits (*Diospyros kaki* L.) during artificial ripening with CO_2: a possible connection to deastringency mechanisms. **Food Chemistry**, London, v. 48, n. 1, p. 25-29, 1993.

KARNOVSKY, M.J.A. Formaldehyde–glutaraldehy de fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138, 1965.

KLUGE, R.A.; NACHTIGAL, J.C.; FACHINELLO, J.C.; BILHALVA, A.B. **Fisiologia e manejo pós-colheita de frutas de clima temperado**. Pelotas: Livraria e Editora Rural, 2002. 214 p.

KRAMMES, J.G.; ARGENTA, L.C.; VIEIRA, M.J. Influences of methylcyclopropeno on quality of persimmon fruit cv. „Fuyu' after cold storage. **Acta Horticulturae**, Saltillo, n. 727, p. 513-518, 2006.

LARRIGAUDIERE, C.; VILAPLANA, R.; SORIA, Y.; RECASENS, I. Oxidative behaviour of Blanquilla pears treated with 1-methylcyclopropene during cold storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, p. 1871-1877, 2004.

LUZA, J.G.; VAN GORSEL, R.; POLITO, V.S.; KADER, A.A. Chilling injury in peaches: a cytochemical and ultrastructural cell wall study. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 117, p. 114-118, 1992.

MATSUO, T.; ITOO, S. A model experiment for de-astringency of persimmon fruit with high carbon dioxide treatment: in vitro gelation of kaki-tannin by reacting with acetaldehyde. **Agricultural Biological Chemistry**, Tokyo, v. 46, p. 683-689, 1982.

MONTEIRO, M.F. **Técnicas de remoção da adstringência e refrigeração de caqui 'Giombo'**. 2011. 75 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidadede São Paulo, Piracicaba, 2011.

MORAES, M.R. **Atmosfera modificada e aplicação de cloreto de cálcio em caqui 'Giombo'**. 2012. 64 p. Dissertação (Mestrado em Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2012.

PÉREZ-MUNUERA, I.; QUILES, A.; LARREA, V.; ARNAL, L., BESADA, C.; SALVADOR, A. Microstructure of persimmon treated by hot water to alleviate chilling injury. **Acta Horticulturae**, Firenze, n. 833, p. 251–256, 2009.

PEREZ-MUNUERA, I.; HERNANDO, I.; LARREA, V.; BESADA, C.; ARNAL, L.; ALEJANDRA SALVADOR, A. Microstructural study of chilling injury alleviation by 1-Methylcyclopropene in persimmon. **Hortscience**, Alexandria, v. 44, n. 3, p. 742–745, 2009.

REDPATH, S.; GEORGE, A.P.; HOFMAN, P.; PREÇO, S.; NISSEN, R.J. Premature fruit softening, a major physiological problem of persimmon in subtropical Australia. **Acta Horticulturae**, Firenze, n. 833, p. 289-294, 2009.

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue. **Stain Technology**, Baltimore, v. 48, p. 247-249, 1973.

SARGENT, S.A.; CROCKER, T.E.; ZOELLNER, J. Storage characteristics „Fuyu' persimmons. **Proceedings of the Florida State Society for Horticultural Science**, Tallahassee, v. 106, p. 131-134, 1993.

SALVADOR, A.; ARNAL, L.; BESADA, C.; LARREA, V.; QUILES, A.; PÉREZ-MUNUERA, I. Physiological and structural changes during ripening and deastringency treatment of persimmon fruit cv. Rojo Brillante. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 46, p. 181–188, 2007.

SALVADOR, A.; ARNAL, L.; MONTERDE, A.; CUQUERELLA, J. Reduction of chilling injury symptoms in persimmon fruit cv. Rojo Brillante by 1-MCP. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 33, p. 285–291, 2004.

TAIRA, S. Adstringency in persimmon. **Modern Methods of Plants Analysis**, Berlin, v. 18, p. 97-110, 1996.

TERRA, F.A.M. **Métodos combinados para a destanização e conservação pós-colheita de caquis 'Giombo'**. 2010. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

VALDENEGRO, M.; FLORES, F.B.; ROMOJARO, F.; RAMÍREZ, M.; MARTINEZ-MADRID, M.C. Susceptibility of Spanish melon fruits to chilling injury during cold storage. **Acta Horticulturae,** Wageningen, n. 682, p. 1219–1225, 2005.

WILLS, R.; McGLASSON, B.; GRAMHAM, D.; JOYCE, D. **Postharvest:** an introduction to the physiology and handling of fruits, vegetables and ornamentals. Sydney: UNSW Press, 1998. 262 p.

WOOLF, A.; BOLA, S.; SPOONER , K.J.; LAY-YEE, M.; FERGUSON, I.B.; WATKINS, C.B.; GUNSON, A.; FORBES, S.K. Reduction of chilling injury in the sweet persimmon „Fuyu' during storage by dry air heat treatments. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 11, n. 3, p. 155-164, 1997.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados dos estudos anatômicos e fisiológicos de frutos de caquizeiro auxiliaram no entendimento da adstringência dos grupos PVA e PCNA.

A diferença anatômica encontrada entre as cultivares dos dois grupos relacionada com a adstringência foi a densidade e o tamanho de células taníferas. Além disso, foi possível verificar que os taninos quando polimerizados ficam delimitados às células taníferas no teste com vanilina clorídrica e que há diferenças entre as cultivares PVA e PCNA. Embora não tenha sido previsto o estudo detalhado a nível subcelular, as análises preliminares realizadas ao microscópio eletrônico de transmissão permitiram verificar o intenso processo de vesiculação no início do acumulo de taninos. Estudos futuros nesta área poderão esclarecer a participação de organelas no processo de biossíntese de tanino, bem como a compreensão de diferenças parietais entre as células taníferas e as demais células do mesocarpo.

Em outubro (após antese e queda da corola), ambas as cultivares aprentaram elevado teor de taninos solúveis, no entanto, após este período o número de células se tornou estável e os taninos solúveis foram reduzidos gradativamente na cultivar não adstringente „Fuyu'. Embora trabalhos moleculares atuais sobre a polimerização tenham evoluído na elucidação deste processo, ainda são necessários estudos que esclareçam este processo completamente. Foi verificado que a redução da adstringência durante o desenvolvimento e maturação de caquis PCNA não está relacionada somente com a redução dos taninos solúveis, mas sim com o número de células taníferas, bem como seu tamanho. O estudo do desenvolvimento e maturação forneceu informações importantes para a seleção de cultivares e para os futuros tratamentos de remoção da adstringência.

Os frutos das cultivares PVA mantiveram a adstringência elevada até estádios avançados de maturação, indicando que devem ser colhidos em estádios de maturação comercial e submetidos a tratamentos para a remoção da adstringência, prática já realizada pelos produtores. A época de colheita na safra também influenciou no processo de remoção da adstringência, pois frutos de fim de safra foram destanizados mais rapidamente comparado aos de início de safra.

A dosagem de etanol 1,70 mL Kg^{-1} por 12 horas é adequada para a remoção da adstringência, principalmente para frutos que são armazenados, pois a combinação de baixa dose e curto período de tempo de exposição ao agente destanizante reduz as consequências do processo de destanização. Foi verificado neste trabalho, através das análises fisiológicas e

estruturais, que a destanização com etanol afeta principalmente a estrutura celular do mesocarpo.

Como o tratamento de destanização é inevitável para o consumo de caquis „Giombo', as suas consequências negativas, como a redução na firmeza de polpa, podem ser amenizadas com a aplicação de 1-MCP e armazenamento refrigerado.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, a temperatura de armazenamento mais adequada para „Giombo' foi a de 1ºC por até 35 dias e 5 dias de simulação comercial. A temperatura de 10ºC permitiu a conservação dos frutos por um curto período de tempo devido ao avanço da maturação e, em 5ºC, foi observada uma rápida redução da firmeza após a retirada da condição refrigerada para a temperatura ambiente. As análises indicaram o que já havia sido relatado na literatura para outras cultivares, ou seja, caquis „Giombo' são susceptíveis a danos por frio a 5ºC.

Espera-se que os resultados deste trabalho possam contribuir com o produtor na decisão da dosagem de etanol/tempo de exposição de acordo com a época de colheita para a remoção da adstringência, pois praticamente todos produtores da região de São Paulo utilizam etanol como agente destanizante devido ao baixo custo e fácil aplicação. Também possa orientá-los na escolha da temperatura de armazenamento de acordo com o período que se deseja conservar os frutos, evitando danos por frio.

A experiência durante o estágio no exterior realizado em Valencia, região produtora de caquis na Espanha, permitiu conhecer outro cenário sobre a cultura. O mercado é abastecido basicamente com uma cultivar adstringente, „Rojo Brillante', que apresenta boa qualidade na colheita, a qual é mantida após tratamento de destanização e armazenamento. Em Valencia, a destanização com etanol foi totalmente substituida pelo tratamento com CO_2, em razão da manutenção da firmeza dos frutos e outros atributos de qualidade. Visto que a aplicação do tratamento com CO_2 exige alto investimento em câmaras para o processo, a destanização é realizada em sistema de cooperativa entre os produtores para redução de custos. No Brasil, a implementação deste sistema ainda é dificultado devido ao custo elevado, pois a maior parte da produção de caquis é realizada por pequenos produtores.

Nesse período de estudos, tive a oportunidade de aprofundar o conhecimento em pesquisa, proporcionado pelos professores e a Universidade, além da possibilidade de contato com os produtores de caquis, que permitiu verificar as reais necessidades de estudos com a cultura. Dessa forma, a associação da ciência com a sua aplicação, contribuiu significativamente para a minha formação.

ANEXOS

Tabela 1 - Resumo da análise de variância para o índice e densidade de células taníferas para frutos de caquizeiros „Giombo' e „Fuyu', ao longo do desenvolvimento (capítulo 2)

Causas da variação	**GL**	**Quadrado médio**	
		Índice (%)	Densidade (n°/mm²)
Cultivar (C)	1	106,4248*	48,62 *
Tempo (T)	5	30,3297*	496,682 *
Interação C x T	5	52,0048*	35,6197 *
Resíduo	33	3,69	0,0033
C.V. (%)	-	21,59	24,28

* e ** valor significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade de erro, pelo teste F
GL = graus de liberdade, $CV_{exp.}$= coeficiente de variação experimental
Dados não transformados

Tabela 2 - Valores médios de diâmetro equatorial, diâmetro longitudinal, peso fresco, índice de cor, firmeza, sólidos solúveis, capacidade antioxidante e taninos solúveis das cultivares: RB: Rojo Brillante, Giombo, Fuyu e HF: Hana Fuyu em sete estádios de maturação (capítulo3)

	ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO						
CULTIVARES	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
	Diâmetro Equatorial (mm)						
RB	56,25 b	64,83 ab	71,81 a	71,33 a	70,84 a	66,54 a	67,44 aa
Giombo	49,66 c	54,01 bc	58,46 ab	59,12 ab	59,58 a	57,29 ab	56,59 ab
Fuyu	60,32 d	64,53 bcd	63,97 cd	68,56 ab	69,22 a	66,48 abc	69,24 a
HF	64,60 c	72,99 bc	81,18 ab	88,34 a	90,68 a	82,41 ab	83,00 ab
	Diâmetro Longitudinal (mm)						
RB	59,30 b	63,57 ab	67,91 a	69,90 a	69,29 a	66,05 ab	65,76 ab
Giombo	53,25 ab	49,56 b	54,00 ab	54,08 ab	56,03 a	52,23 ab	55,04 a
Fuyu	44,27 ab	46,91 a	46,55 a	49,63 a	49,06 a	47,94 a	49,54 a
HF	48,22 b	56,26 ab	62,53 a	66,86 a	64,93 a	63,49 a	57,52 ab
	Peso Fresco (g)						
RB	124,05 c	145,71 bc	152,70 abc	178,83 ab	202,47 a	174,59 abc	199,43 ab
Giombo	67,56 c	78,96 bc	101,03 ab	102,64 a	105,83 a	93,12 ab	104,14 a
Fuyu	100,24 d	113,83 bcd	109,44 cd	140,87 abc	143,60 ab	140,49 abc	146,66 a
HF	126,07 c	165,29 bc	231,00 abc	279,23 ab	313,85 a	251,61 abc	272,68 ab
	Índice de cor (IC)						
RB	-8,12 g	-4,19 f	1,45 e	6,90 d	16,50 c	33,68 b	43,20 a
Giombo	-9,44 e	-6,39 de	-5,95 de	-1,20 cd	4,10 bc	11,35 b	41,27 a
Fuyu	-7,71 d	-4,59 cd	0,45 c	9,23 b	15,46 bc	41,64 a	43,33 a
HF	-8,89 d	-3,58 d	9,49 c	13,24 cd	27,37 b	44,85 a	52,28 a
	Firmeza (N)						
RB *	54,55 a	55,33 a	49,33 a	42,30 ab	30,30 b	16,53 c	0,00 d
Giombo	64,82 ab	66,03 a	62,98	52,33 b	58,07 ab	32,75 c	0,27 d
Fuyu*	90,45 a	55,25 b	49,38 b	58,27 b	50,15 b	31,48 c	1,45 d
HF	91,32 a	71,92 b	58,63 bc	47,25 c	7,53 d	0,31 d	0,02 d
	Sólidos solúveis (°Brix)						
RB	26,20 a	23,08 ab	20,22 b	20,97 b	21,30 b	22,03 b	22,95 ab
Giombo	20,55 a	21,00 ab	20,60 a	20,68 a	20,42 a	20,78 a	22,03 a
Fuyu	13,10 c	14,27 bc	15,68 bc	15,80 bc	16,42 b	20,82 a	20,82 a
HF*	14,67 a	14,77 ab	14,58 a	14,15 a	16,00 a	19,23 a	17,57 a
	Capacidade Antioxidante (% sequestro de DPPH)						
RB	92,46 b	94,30 a	77,90 b	80,06 b	83,90 ab	73,02 b	12,60 c
Giombo*	95,86 a	94,51 a	78,08 e	83,31 bc	84,61 b	80,00 de	81,19 dc
Fuyu	82,65 a	42,64 b	32,96 c	21,80 d	21,80 d	17,70 de	18,69 d
HF	58,22 a	46,80 b	23,05 c	14,62 cd	5,01 e	6,39 de	1,72 e
	Taninos Solúveis (%)						
RB	2,09 a	1,58 b	1,15 c	1,15 c	0,82 c	0,44 d	0,04 d
Giombo	1,87 a	1,34 b	1,52 ab	1,52 ab	1,28 b	1,12 b	0,48 c
Fuyu*	0,29 a	0,13 b	0,13 b	0,12 b	0,10 bc	0,06 cd	0,05 d
HF	0,27 a	0,11 b	0,08 b	0,08 b	0,06 b	0,07 b	0,07 b

Média seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade
** Dados originais: transformados em "Log x" na base 10
Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% ($P < 0,05$)
* Dados originais: transformados e Log x na base 10

Tabela 3 - Resumo da análise de variância para firmezade polpa, sólidos solúveis, índice de cor de polpa, índice de adstringência e tanino solúvel em função dos tratamentos (A), temperatura (B) e tempo de armazenamento (C) em caquis „Giombo' em 2013 (capítulo 6)

Causas da variação	GL	**Quadrado médio**				
		Firmeza	**Sólidos solúveis**	**Índice cor**	**Índice de adstringência**	**Tanino solúvel**
		(N)	(ºBrix)	(1000.*a*)/(*L.b*)	(1, 2, 3,4,5)	(g $100g^{-1}$)
Após retiradas do armazenamento refrigerado						
Tratamentos (A)	2	697,59*	35,25*	0,34*	48,0*	1,27*
Temperatura (B)	2	3143,49*	162,53*	0,95*	1,69*	0,04*
Tempo (C)	3	8998,70*	156,49*	8,04*	73,73*	1,76*
Interação A x B	4	167,80*	57,85*	0,70*	0,19*	0,02*
Interação A x C	6	235,93*	56,23*	0,59*	6,54*	0,17*
Interação B x C	6	524,71*	151,40*	1,14*	1,42*	0,02*
Inter. A x B x C	12	168,11*	53,13*	0,49*	0,14*	0,01*
Resíduo	105	11,27	0,780	0,05	0,04	0,01
C.V. (%)		10,82	4,81	14,22	8,37	8,67
Após retiradas do armazenamento refrigerado e simulação comercial de 5 dias						
Tratamentos (A)	2	497,81*	199,38*	1,66*	30,88*	1,01*
Temperatura (B)	2	375,41*	393,94*	1,65*	2,21*	0,02*
Tempo (C)	3	15585,43*	1026,31*	16,47*	94,70*	1,97*
Interação A x B	4	117,89*	123,17*	1,10*	0,45*	0,02*
Interação A x C	6	83,18*	68,79*	0,63*	5,78*	0,16*
Interação B x C	6	163,76*	304,76*	3,37*	1,36*	0,01*
Inter. A x B x C	12	25,07*	64,37*	0,63*	0,29*	0,01*
Resíduo	105	8,87	0,155	0,04	0,07	0,01
C.V. (%)		14,31	2,41	15,15	11,24	8,54

* e ** valor significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade de erro, pelo teste F
GL = graus de liberdade, $CV_{exp.}$= coeficiente de variação experimental
Dados não transformados

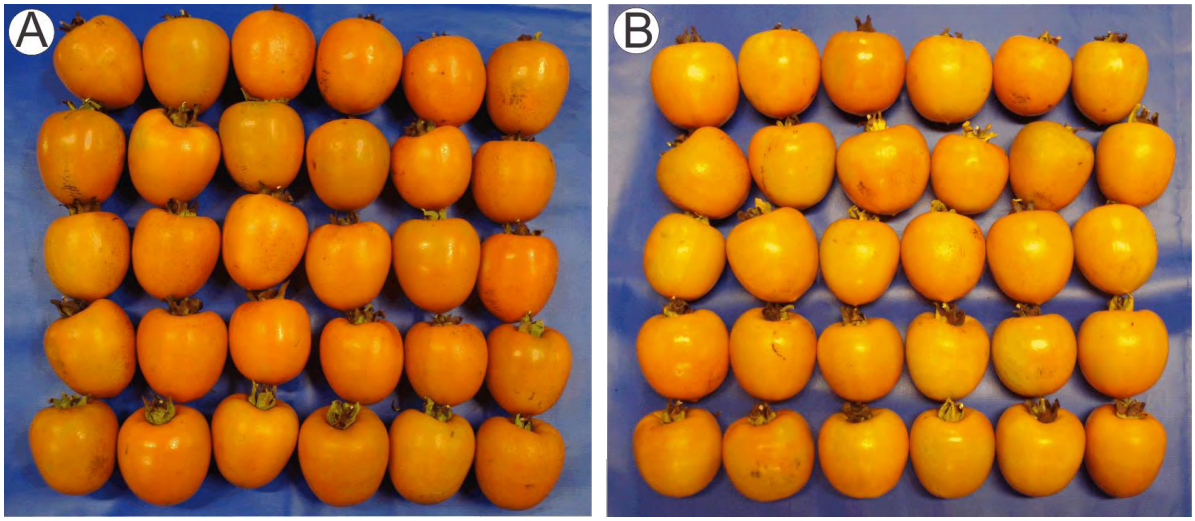

Figura 1 - Caquis „Giombo' colhidos em fim de safra (julho de 2011) (A) e início de safra (abril de 2012) (B) antes dos tratamentos de destanização com etanol em diferentes tempos de exposição (capítulo 4).

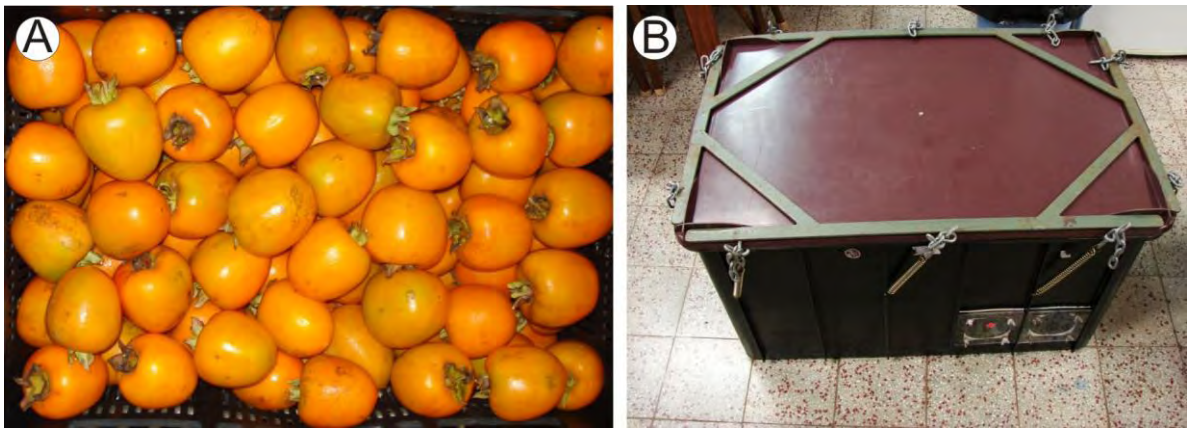

Figura 2 - Caquis 'Giombo' após a colheita em maio de 2012 (A) e caixa hermética utilizada para aplicação de etanol e 1-MCP (B) (capítulo 5)

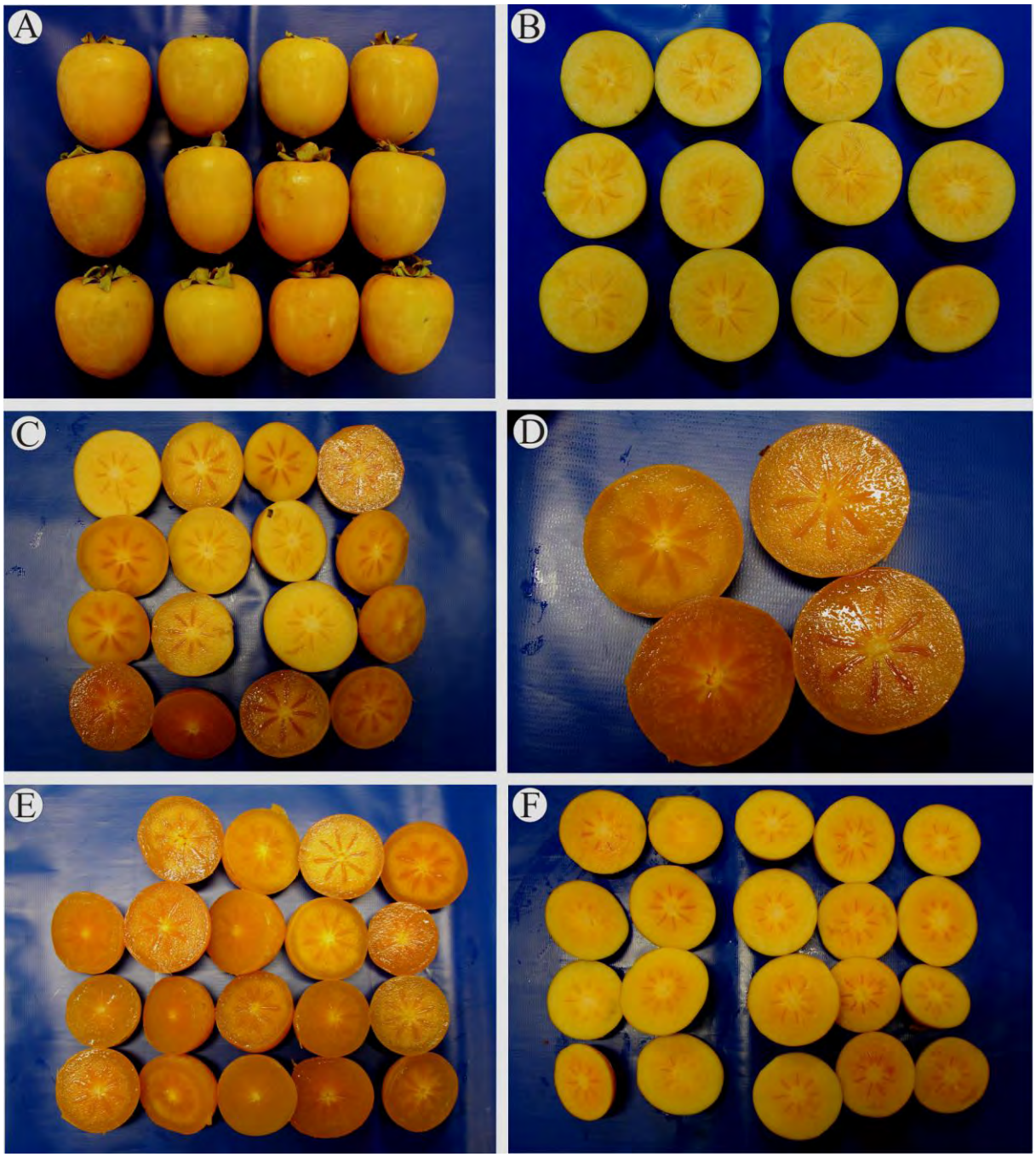

Figura 3 - Caquis 'Giombo' tratados com etanol e 1-MCP e armazenados a 1, 5 e 10 ± 1ºC e 90% UR por 15, 25 e 35 dias + 5 dias de SC em 2013. A-B. Frutos recém-colhidos. C. Frutos somente destanizados e armazenados a 5ºC por 15 dias e SC de 5 dias com evidência de danos por frio. D. Detalhe de C. E. Frutos somente destanizados e armazenados a 5ºC por 25 dias e SC de 5 dias com evidência de danos por frio. F. Frutos destanizados e tratados com 1-MCP e armazenados a 1ºC por 35 dias após a retirada da câmara. SC= simulação comercial (capítulo 6)