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

Conservação pós-colheita e métodos de destanização de frutos de cambucizeiro (*Campomanesia phaea*)

Yane Caroline dos Anjos Bezerra

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2021

Yane Caroline dos Anjos Bezerra
Engenheira Agrônoma

Conservação pós-colheita e métodos de destanização de frutos de cambucizeiro (*Campomanesia phaea*)

Orientador:
Prof. Dr. **RICARDO ALFREDO KLUGE**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2021

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

Bezerra, Yane Caroline dos Anjos

Conservação pós-colheita e métodos de destanização de frutos de cambucizeiro (*Campomanesia phaea*) / Yane Caroline dos Anjos Bezerra. - - Piracicaba, 2021.

93 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Frutas nativas 2. Adstringência 3. Armazenamento 4. Myrtceae 5. Proantocianidinas 6. Etileno 7. Etanol 8. Embalagem I. Título

Dedico

Aos produtores de frutas nativas brasileiras, que assumem o importante papel de preservar e propagar as riquezas da nossa flora.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda força, sabedoria e discernimento.

À minha família, por entender a minha ausência, por todo apoio, incentivo e confiança.

Aos meus pais, Andrea Carolina dos Anjos Farias e Nax Charles Farias Bezerra, e à minha irmã Alice Maria dos Anjos Farias, por todo amor e esforços sem medidas para que eu chegasse até aqui.

Ao Ricardo Bordignon Medina, por todo amor, apoio, compreensão e motivação para a realização deste trabalho. Por ser meu porto seguro e por tornar os meus dias mais leves e felizes.

Aos meus sogros, Herculano Penna Medina Filho e Rita Bordignon, por todo carinho, apoio e ajuda nesta jornada.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-graduação em Fitotecnia pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Alfredo Kluge, pela confiança, orientação e ensinamentos ao longo desta etapa.

Ao produtor Paulo Nakanish e família, por abrirem as portas da sua propriedade para a ciência, pela gentileza e pela amizade.

A equipe PColheit, por toda a ajuda desde a elaboração, análises e conclusão deste trabalho. Agradeço a todos os estagiários que tive contato durante o meu Doutorado, e a todos os pós-graduandos do grupo. Vocês foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

À Magda Andréia Tessmer, pelas contribuições valorosas desde a concepção até o término deste trabalho, pelo auxílio com as análises cromatográficas, bioquímicas e anatômicas, pelo apoio e amizade.

À Profa. Dra. Jaqueline Visioni Tezotto-Uliana, por toda ajuda desde a elaboração deste trabalho, troca de experiências e pela amizade ao longo desses anos.

Ao Prof. Dr. Angelo Pedro Jacomino, pela parceria no projeto temático de frutas nativas da Mata Altântica e por ceder seu laboratório para as análises de cromatografia líquida.

À Profa. Dra. Beatriz Appezzato-da-Glória por ceder seu laboratório para as análises anatômicas que compõem esta tese.

À Profa. Giuseppina Pace Pereira Lima, pelas orientações e auxílio em análises bioquímicas.

Ao Prof. Dr. Eduardo Purgatto, pelas orientações e debates enriquecedores sobre frutas nativas.

À Claire de Luca Sarantópoulos, pelo auxílio com as análises dos filmes plásticos utilizados neste trabalho e pelos debates enriquecedores.

À Luciane Toledo, Maria Solizete Silva, Angela Silva, Davilmar Collevatti e Silvana Oliveira pelos anos de amizade e orientações de apoio à pós-graduação.

Ao Técnico Agrícola Éder de Araújo Cintra, pela amizade e ensinamentos durante minha jornada na ESALQ.

À Bruna Isadora Trennepohl, por todo companheirismo e amizade, por compartilhar comigo todos os momentos do Doutorado.

Aos amigos que fiz durante minha passagem pela ESALQ, em especial à Beatriz, Bruna (Teen), Caio, Catherine, Jackeline, Lucas, Márcia, Marina, Matheus, Rachel, Rodolfo e Thais, por toda amizade, apoio e boas risadas.

Aos amigos que Piracicaba me deu de presente, Isabela, Karol e Gabriel, por entenderem a minha ausência e por tornar pequenos momentos muito especiais.

Aos meus amigos de Maceió, em especial a Kátia e Caio, por sempre se fazerem presentes independente da distância.

Aos meus amigos conterrâneos Ana Paula, Gabriela e Paul, que tive o prazer de estarem perto de mim durante esses anos.

Aos meus queridos professores da graduação Eurico Eduardo Pinto de Lemos, Leila de Paula Rezende e Renan Cantalice de Souza por se fazerem presentes na minha vida até os dias de hoje. Por toda a amizade, carinho e bons conselhos doados.

À Eliana Garcia, pela revisão e formatação desta tese.

À Capes pela bolsa de estudo a mim concedidas.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos a mim concedida.

Aos colegas de pós-graduação, docentes e funcionários da ESALQ/USP que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Os países investem em ciência por que são ricos
ou são ricos por que investem em ciência?

Autor desconhecido

SUMÁRIO

RESUMO 10
ABSTRACT 12
1. INTRODUÇÃO GERAL 15
Referências 18
2. CARACTERÍSTICAS MORFOANATÔMICAS DE FRUTOS DE CAMBUCIZEIRO (*Campomanesia phaea*) E PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO EM EMBALAGENS PLÁSTICAS 21
Resumo 21
Abstract 21
2.1 Introdução 22
2.2 Material e Métodos 23
2.2.1 Material vegetal 23
2.2.2 Tratamentos 24
2.2.3 Determinações 25
2.2.3.2 Atividade respiratória e produção de etileno 25
2.2.3.3 Produção de acetaldeído 25
2.2.3.4 Teor de proantocianidinas 26
2.2.3.5 Teor de compostos fenólicos 26
2.2.3.6 Atividade antioxidante 27
2.2.3.7 Teor de ácido ascórbico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 27
2.2.3.8 Parâmetros físico-químicos 27
2.2.3.9 Microscopia de luz 28
2.2.3.10 Microscopia eletrônica de varredura 28
2.2.4 Análises estatísticas 29
2.3 Resultados e Discussão 29
2.4 Conclusão 38
Referências 39
3. APLICAÇÃO DE ETILENO EM FRUTOS DE CAMBUCIZEIRO (*Campomanesia phaea*) EM PÓS-COLHEITA: ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS 43
Resumo 43
Abstract 43
3.1 Introdução 43

3.2 Material e Métodos 45
3.2.1 Material vegetal 45
3.2.2 Tratamentos 46
3.2.3 Determinações 46
3.2.3.1 Atividade respiratória e produção de etileno 46
3.2.3.2 Produção de etanol e acetaldeído 47
3.2.3.3 Teor de proantocianidinas 47
3.2.3.4 Teor de compostos fenólicos 47
3.2.3.5 Teor de ácido ascórbico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 48
3.2.3.6 Atividade antioxidante 48
3.2.3.7 Parâmetros físico-químicos 49
3.2.4 Análise estatística 49
3.3 Resultados e Discussão 50
3.4 Conclusão 59
Referências 59
4. TRATAMENTO COM VAPOR DE ETANOL EM PÓS-COLHEITA REDUZ A ADSTRINGÊNCIA DE FRUTOS DE CAMBUCIZEIRO 65
Resumo 65
Abstract 65
4.1 Introdução 66
4.2 Material e Métodos 67
4.2.1 Material vegetal 67
4.2.2 Tratamentos 67
4.2.3 Determinações 68
4.2.3.1 Teor de proantocianidinas 68
4.2.3.2 Produção de etanol e acetaldeído 69
4.2.3.3 Atividade respiratória e produção de etileno 69
4.2.3.4 Teor de compostos fenólicos 70
4.2.3.5 Atividade antioxidante 70
4.2.3.6 Teor de ácido ascórbico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 71
4.2.3.7 Parâmetros físico-químicos 71
4.2.4 Análise estatística 71
4.3 Resultados e Discussão 72
4.4 Conclusão 88

Referências 89
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS 93

RESUMO

Conservação pós-colheita e métodos de destanização de frutos de cambucizeiro (*Campomanesia phaea*)

O cambuci (*Campomanesia phaea*) é um fruto nativo da Mata Atlântica, com alto potencial para uso na gastronomia por seu sabor marcante e intenso. Contudo, o elevado teor de taninos dos frutos confere uma sensação desagradável de adstringência quando consumido *in natura*. O objetivo dessa tese foi estudar a interação da atmosfera modificada passiva através do uso de embalagens, atmosferas ricas em etileno ou vapor de etanol na remoção da adstringência e as consequências na fisiologia e bioquímica do cambuci no período pós-colheita. Para tal, além das análises físico-químicas e bioquímicas do cambuci antes e após os tratamentos, foi realizado um estudo anatômico da casca desses frutos para entender este componente de interface entre a atmosfera circundante e o interior do fruto. Esta tese foi apresentada em três experimentos. No primeiro, foram avaliados cambucis armazenados por 12 dias em embalagens recobertas por filmes plásticos (PVC, PEBD e BOPP) com diferentes permeabilidades aos gases para criação de atmosfera modificada passiva. As atmosferas geradas pelo uso das embalagens não influenciaram o teor de compostos fenólicos totais, proantocianidinas e capacidade antioxidante. O uso de embalagens promoveu a redução da perda de massa e o aumento no teor de acetaldeído na polpa, principalmente em frutos embalados com filme BOPP, que proporcionou também a menor redução do teor de ácido ascórbico. Observou-se que o cambuci possui casca composta por uma camada epidérmica desprovida de estômatos e lenticelas, cutícula fina e hipoderme com várias camadas de células justapostas. Essas características parecem dificultar a interação da atmosfera circundante com a polpa dos frutos. No segundo experimento, frutos de cambucizeiro foram expostos ao etileno nas doses de 0, 10, 100, 250 e 500 ppm por 12 horas e avaliados quanto aos parâmetros físico-químicos e bioquímicos da casca e polpa por 5 dias de armazenamento. Os tratamentos aplicados não alteraram o padrão respiratório, a produção de etileno, teor de compostos fenólicos, capacidade antioxidante e conteúdo de ácido ascórbico. Frutos submetidos à atmosfera com 500 µL de etileno L^{-1} apresentaram maior produção de etanol e acetaldeído, e menores teores de proantocianidinas, em comparação a frutos não tratados. Os teores de sólidos solúveis, acidez titulável e a coloração da casca dos frutos não foram influenciados pelos tratamentos nem pelos dias de armazenamento. O terceiro experimento é composto de duas partes, avaliando a eficiência de tratamentos com vapor de etanol, sendo a primeira com quatro doses (0,0; 3,5; 7,0 e 14,0 mL de etanol por kg de fruta) e 12 horas de exposição. A segunda etapa foi realizada com doses menores e dois tempos de exposição, sendo 0,0; 1,5; 3,0; 6,0 mL de etanol por kg de fruta, durante 12 e 24 horas de exposição. Os frutos foram avaliados quanto aos parâmetros físico-químicos e bioquímicos da casca e polpa. Os teores de etanol e acetaldeído na casca e polpa aumentaram, ao passo que as proantocianidinas diminuíram conforme o aumento das doses de etanol aplicadas. Porém, os ganhos em termos de redução de proantocianidinas em doses acima de 7,0 mL kg^{-1} são pequenos em contraste ao grande aumento das doses. Ademais, os resultados de perda de massa, cor da casca, acidez e conteúdo de compostos fenólicos indicam possíveis danos metabólicos em cambucis expostos a altas doses de vapor de etanol. Para a segunda parte, a dose de 6,0 mL kg^{-1} por 12 horas de exposição reduziu os compostos fenólicos, a atividade antioxidante e o ácido ascórbico, mas foi mais eficiente na redução de proantocianidinas na casca e polpa. Os resultados permitem concluir que o uso da técnica de atmosfera modificada passiva em cambucis levou à redução da perda de massa, mas não foi eficiente para reduzir teores de proantocianidinas de cambucis. A aplicação pós-colheita de etileno na dose de 500 µL L^{-1} aumenta a produção de etanol e acetaldeído e reduz os teores de proantocianidinas dos

frutos. Altas doses de vapor de etanol promovem alta produção endógena de etanol e acetaldeído e reduções significativas no teor de proantocianidinas, mas causam danos aos frutos. A dose de 6,0 mL kg^{-1} por 12 horas de exposição é mais adequada na redução de teores de proantocianidinas sem causar danos aos frutos.

Palavras-chave: Frutas nativas, Adstringência, Armazenamento, Myrtceae, Proantocianidinas, Etileno, Etanol, Embalagem

ABSTRACT

Postharvest conservation and astringency removal of cambuci fruits (*Campomanesia phaea*)

The cambuci fruit (*Campomanesia phaea*) is native to the Atlantic Forest and has high potential use in haute cuisine dishes because of its striking and intense flavor. However, the high tannin content of this fruit gives an unpleasant astringent sensation when consumed fresh. The objective of this thesis was to study the interaction of the passive modified atmosphere through the use of packaging, the rich ethylene or ethanol vapor atmosphere in the astringency removal, and its results in the physical, chemical, and biochemical aspects of cambuci fruits during storage. In addition to physical, chemical, and biochemical parameters tested before and after treatments, an anatomical study of the peel was performed to understand the interface between the surrounding atmosphere and the interior of the fruit. In the first experiment, cambucis stored for 12 days in packages covered with plastic films (PVC, LDPE, and BOPP) with different gas permeabilities to create a passive modified atmosphere were evaluated. The atmospheres created by the packaging did not influence the content of total phenolic compounds, proanthocyanidins, and antioxidant capacity. The use of packaging promoted a reduction in weight loss and increased the acetaldehyde content in the pulp, especially in fruits packed with BOPP film, which also showed the smallest reduction in the ascorbic acid content. It was observed that cambucis have no stomata and lenticels in the epidermal layer of the peel, with thin cuticle and hypodermis having several layers of juxtaposed cells. These characteristics seem to hinder the interaction of the surrounding atmosphere with the fruit pulp. In the second experiment, cambuci fruits were exposed to ethylene at doses of 0, 10, 100, 250, and 500 ppm for 12 hours and investigated for physical-chemical and biochemical parameters of the peel and pulp for 5 days of storage. The applied treatments did not affect the respiration pattern, endogenous ethylene production, phenolic compounds, antioxidant capacity, and ascorbic acid content. Fruits subjected to the atmosphere with 500 µL of ethylene L^{-1} showed higher ethanol, and acetaldehyde production, and lower proanthocyanidins contents, compared to untreated fruits. The soluble solids, titratable acidity and peel color of the fruits were not affected by the treatments or by the days of storage. The third experiment was divided into two stages evaluating the efficacy of treatments with ethanol vapor, in which the first had four doses (0.0; 3.5; 7.0 and 14.0 mL of ethanol per kg of fruit) and 12 hours of exposure. The second stage was carried out with lower doses and two exposure times, being 0.0; 1.5; 3.0; 6.0 mL of ethanol per kg of fruit, during 12 and 24 hours of exposure. Fruits were evaluated for physical, chemical, and biochemical parameters of peel and pulp. The levels of ethanol and acetaldehyde in the peel and pulp increased, while the proanthocyanidins decreased with increasing doses of ethanol applied. However, the gains in terms of reduction of proanthocyanidins at doses above 7.0 mL kg^{-1} are small in contrast to the large increase of ethanol doses. Furthermore, the results of weight loss, peel color, acidity, and content of phenolic compounds indicate possible metabolic damage in cambucis exposed to high doses of ethanol vapor. For the second stage, the dose of 6.0 mL kg^{-1} for 12 hours of exposure reduced phenolic compounds, antioxidant activity, and ascorbic acid, but was more efficient in reducing proanthocyanidins in cambucis peel and pulp. The results allow us to conclude that the passive modified atmosphere reduces weight loss, but it is not efficient to reduce the levels of proanthocyanidins in cambucis. The postharvest application of ethylene at the dose of 500 µL L^{-1} enhances the endogenous ethanol and acetaldehyde and reduces the proanthocyanidin content of the fruits. High doses of ethanol vapor promote high ethanol and acetaldehyde production and reduce the

proanthocyanidin content, but promote fruit damage. The dose of 6.0 mL kg^{-1} for 12 hours of exposure is more indicated for reducing proanthocyanidin levels without damaging the fruit.

Keywords: Brazilian fruit, Astringency, Storage, Myrtaceae, Proanthocyanidins, Ethylene, Ethanol, Packaging

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um dos países mais ricos em biodiversidade do mundo, abrigando cerca de 18% de toda a biodiversidade vegetal do planeta (Biazotto et al., 2019). Dentre os biomas brasileiros, a Mata Atlântica se destaca tanto pela sua riqueza biológica quanto por ser um dos biomas mais ameaçados do planeta (Forzza et al., 2012). Originalmente, a Mata Atlântica abrangia uma área de 1,3 milhões de km^2, porém, após o início das explorações das terras brasileiras, com a substituição de ecossistemas naturais por sistemas de produção e o crescimento populacional acelerado, essa área foi fortemente degradada. Hoje, restam somente cerca de 13% de fragmentos e remanescentes florestais, em comparação à extensão territorial original da mata (Ribeiro et al., 2009; Silva et al., 2016).

Estima-se que a Mata Atlântica possua cerca de 20 mil espécies vegetais, o que representa em torno de 47% das espécies existentes no Brasil, e mais de duas mil espécies animais, demonstrando a grande importância desse bioma (Forzza et al., 2012). Estes valores são apenas estimativas, pois mesmo após muita investigação científica, ainda devem existir espécies não conhecidas (Silva; Casteleti, 2003).

Muitas espécies vegetais nativas da Mata Atlântica possuem frutos comestíveis com grande potencial nutricional e funcional, sendo consumidos por humanos e animais (Silva et al., 2014; Donado-Pestana et al., 2015). Embora o consumo desses frutos ainda seja restrito aos locais de ocorrência natural, eles apresentam características peculiares e interessantes para a industrialização, exploração econômica agroindustrial, gastronômica, farmacológica e em cosméticos, principalmente considerando suas características nutracêuticas, sabor e aroma intrínsecos (Kawasaki; Landrum, 1997; Silva et al., 2014; Donado-Pestana et al., 2015).

A família botânica Myrtaceae é uma das mais importantes e representativas do Brasil, englobando algumas espécies nacionalmente conhecidas, como a goiaba (*Psidium guajava*), a pitanga (*Eugenia uniflora*) e a jabuticaba (*Plinia trunciflora*), além de outras conhecidas somente em seus locais de ocorrência natural, como a uvaia (*Eugenia pyriformis*), o araçá (*Psidium cattleianum*), a cereja-do-rio-grande (*Eugenia involucrata*), a grumixama (*Eugenia brasiliensis*) e o cambuci (*Campomanesia phaea*).

O cambucizeiro, *Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum, é uma das espécies endêmicas brasileiras de mirtáceas com frutos comestíveis. Atualmente, o cambucizeiro é cultivado por pequenos produtores da região da Serra do Mar paulista, que cultivam plantas provenientes de sementes. Por ser uma planta ainda não domesticada, existe uma grande variabilidade genética, que se observa nas plantas com características de produtividade,

tamanho e qualidade de frutos variáveis. Se por um lado a variabilidade genética é positiva do ponto de vista ambiental, sob o ponto de vista comercial isso dificulta os tratos culturais em pré e pós-colheita (Tokairin et al., 2018).

Os cambucis possuem formato romboide com uma crista horizontal, característica marcante da espécie. Quando maduros, são extremamente aromáticos e apreciados pelas populações locais, onde são utilizados no preparo de sucos, sorvetes, molhos e bebidas alcoólicas, possuindo também grande potencial como agente flavorizante em alimentos e bebidas (Vallilo et al., 2005; Tokairin et al., 2018). São frutos com elevada acidez e um aroma doce marcante, que o torna muito atrativo, além de conter altos teores de ácido ascórbico e compostos bioativos, em sua maioria compostos fenólicos, responsáveis pela elevada capacidade antioxidante desses frutos (Vallilo et al., 2005).

Os taninos são o principal grupo de compostos fenólicos presentes em cambucis (Donado-Pestana et al., 2015). Tais compostos podem ser classificados de acordo com a estrutura de suas moléculas como taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos) e não hidrolisáveis (taninos condensados, também chamados de proantocianidinas) (Combs, 2016). Os taninos hidrolisáveis são ésteres de açúcares (principalmente glicose) ou álcoois polihídricos e ácidos fenólicos, que são formados a partir da via do chiquimato. Podem ser divididos em galotaninos, quando são formados a partir do ácido gálico, e em elagitaninos, quando formados a partir do ácido hexaidroxidifenílico e seus derivados. Como o próprio nome indica, esses taninos são facilmente hidrolisados por ácidos, bases e certas enzimas (Chung et al., 1998; Monteiro et al., 2005). Os taninos condensados são estruturalmente mais complexos, sendo formados pela polimerização de duas a 50 unidades de catequinas (flavan-3-ol), leucoantocianidinas (flavan-3,4-diol), ou uma combinação entre essas duas moléculas (Chung et al., 1998). Altos teores de taninos condensados são responsáveis pelo caráter adstringente dos alimentos, por formarem complexos insolúveis com as proteínas salivares e de tecidos bucais, podendo ser encontrados em frutas (caju, caqui, banana, pitanga, uva, pêssego, maçã, pera, etc.) e bebidas (vinho, cidra, chá, cerveja, etc.) (Deshpande et al., 1986; Chung et al., 1998; Manach et al., 2004; Edagi; Kluge, 2009).

Em frutos, a adstringência conferida por taninos condensados sofre alterações ao longo do amadurecimento. Em algumas espécies, a redução da adstringência nos frutos ocorre de forma natural ao longo do amadurecimento. Dessa forma, podem ser totalmente insolubilizados até o ponto de maturação completo do fruto, deixando de conferir caráter adstringente, como é o caso da banana, ou ainda podem permanecer solúveis causando

adstringência, como é o caso de algumas cultivares de caqui, caju e cambuci (Carvalho et al., 1989; Manach et al., 2004).

O princípio básico para a remoção ou redução da adstringência é a indução da síntese de acetaldeído. Essa substância é capaz de polimerizar as moléculas de taninos, tornando-as insolúveis e incapazes de reagir com as proteínas salivares, diminuindo assim o caráter adstringente dos alimentos (Edagi et al.; 2009; Edagi; Kluge, 2009). Dessa maneira, os métodos mais utilizados para a remoção artificial da adstringência de frutas frescas envolvem: (a) promoção de um ambiente anóxico, induzindo assim a produção de acetaldeído pela transformação do piruvato em uma reação catalisada pela enzima piruvato descarboxilase; (b) aceleração do amadurecimento, com consequente produção de compostos voláteis como o acetaldeído; e (c) aplicação de vapor de etanol, cujo princípio se baseia na ativação da enzima álcool desidrogenase, gerando acúmulo de acetaldeído e consequente redução da adstringência (Edagi et al.; 2009; Edagi; Kluge, 2009).

O acetaldeído é um composto sintetizado e acumulado naturalmente durante o amadurecimento de frutas. A síntese desse composto pode ocorrer em condições aeróbicas, porém, pode ocorrer em maior grau em condições parcial ou totalmente anaeróbicas. Condições parcialmente anaeróbicas ocorrem frequentemente durante o armazenamento, por meio do uso de revestimentos, embalagens, atmosferas modificadas e controladas (Pesis, 2005). Dessa forma, a criação de atmosferas com diferentes níveis de oxigênio além de promover a redução da perda de umidade e maior vida útil aos frutos, podem gerar efeitos secundários como a redução da adstringência (Pesis; Benarie, 1986; Edagi et al.; 2009).

Outra forma de induzir a síntese de acetaldeído é através da exposição dos frutos ao hormônio vegetal etileno, que possui influência comprovada em diferentes aspectos do amadurecimento de frutos climatéricos e não climatéricos (Gao et al., 2020). O etileno age diretamente na produção de etanol e acetaldeído, que estão diretamente relacionados ao processo de redução da adstringência (Pesis, 2005).

A redução da adstringência utilizando vapor de etanol é uma técnica amplamente estudada para frutos como caqui (Yamada et al., 2002), e recentemente, caju (Tezotto-Uliana et al., 2018). Uma vez em contato com os frutos, o vapor de etanol pode ser absorvido e no interior das células, sofre ação da enzima álcool desidrogenase, que atua na conversão do etanol em acetaldeído, podendo também fazer uma reação reversa, de forma a equilibrar as concentrações de etanol e acetaldeído nas células dos frutos (Edagi et al., 2009).

Apesar do conhecimento dos processos para redução da adstringência de frutos, esses processos ainda não foram estudados para frutos de cambucizeiro. Diante disso, este estudo

visou investigar a interação da aplicação de tratamentos com atmosfera modificada passiva através do uso de embalagens, atmosferas ricas em etileno e vapor de etanol para a remoção da adstringência e as consequências na fisiologia e bioquímica do cambuci no período pós-colheita.

Nesta tese, diferentes tipos de embalagens e métodos de destanização de frutos de cambucizeiro com o uso de etileno e vapor de etanol foram estudados, avaliando-se parâmetros morfoanatômicos, físico-químicos e bioquímicos a fim de verificar a viabilidade destes métodos na vida útil pós-colheita, redução da adstringência e manutenção da qualidade dos frutos. Para esclarecer esses temas, a Tese foi dividida em três capítulos como se pretende publicar:

Capítulo 2: Características morfoanatômicas de frutos de cambucizeiro (*Campomanesia phaea*) e parâmetros fisiológicos durante o armazenamento refrigerado em embalagens plásticas

Capítulo 3: Aplicação de etileno em frutos de cambucizeiro em pós-colheita: aspectos físico-químicos e bioquímicos.

Capítulo 4: Tratamento com vapor de etanol em pós-colheita reduz a adstringência de frutos de cambucizeiro.

Referências

Biazotto, K. R., Mesquita, L. M. S., Neves, B. V., Braga, A. R. C., Tangerina, M. M. P., Vilegas, W., Mercadante, A. Z. & De Rosso, V. V. (2019). Brazilian biodiversity fruits: discovering bioactive compounds from underexplored sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(7), 1860-1876.

Carvalho, H. A., Chitarra, M. I. F., de Carvalho, H. S., Chitarra, A. B., & de Carvalho, V. D. (1989). Qualidade de banana 'prata' previamente armazenada em filme de polietileno, amadurecida em ambiente com umidade relativa elevada. 3. Acidez, sólidos solúveis, taninos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, *24*(5), 495-501.

Chung, K. T., Wong, T. Y., Wei, C. I., Huang, Y. W., & Lin, Y. (1998). Tannins and human health: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, *38*(6), 421-464.

Combs, C. A. (Ed.). (2016). *Tannins: biochemistry, food sources and nutritional properties*. Nova Science Publishers.

Deshpande, S. S., Cheryan, M., Salunkhe, D. K., & Luh, B. S. (1986). Tannin analysis of food products. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, *24*(4), 401-449.

Donado-Pestana, C. M., Belchior, T., Festuccia, W. T., & Genovese, M. I. (2015). Phenolic compounds from cambuci (*Campomanesia phaea* O. Berg) fruit attenuate glucose intolerance and adipose tissue inflammation induced by a high-fat, high-sucrose diet. *Food Research International*, *69*, 170-178.

Edagi, F. K., Chiou, D. G., Terra, F. D. A. M., Sestari, I., & Kluge, R. A. (2009). Remoção da adstringência de caquis 'Giombo' com subdosagens de etanol. *Ciência Rural*, *39*, 2022-2028.

Edagi, F. K., & Kluge, R. A. (2009). Remoção de adstringência de caqui: um enfoque bioquímico, fisiológico e tecnológico. *Ciência Rural*, *39*, 585-594.

Forzza, R. C., Baumgratz, J. F. A., Bicudo, C. E. M., Canhos, D. A., Carvalho Jr, A. A., Coelho, M. A. N., Costa, A. F., Costa, D. P., Hopkins, M. G., Leitman, P. M., Lohmann, L. G., Lughadha, E. N., Maia, L. C., Martinelli, G., Menezes, M., Morin, M. P., Peixoto, A. L., Pirani, J. R., Prado, J., Queiroz, L. P., Souza, S., Souza, V. C., Stehmann, J. R., Sylvestre, L. S., Walter, B. M. T., & Zappi, D. C. (2012). New Brazilian floristic list highlights conservation challenges. *BioScience*, *62*(1), 39-45.

Gao, J., Zhang, Y., Li, Z., & Liu, M. (2020). Role of ethylene response factors (ERFs) in fruit ripening. *Food Quality and Safety*, *4*(1), 15-20.

Kawasaki, M. L., & Landrum, L. R. (1997). A rare and potentially economic fruit of Brazil, *Campomanesia pheaea* (Myrtaceae). *Economic Botany*, *51*(4), 403-405.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, *79*(5), 727-747.

Monteiro, J. M., Albuquerque, U. P. D., Araújo, E. D. L., & Amorim, E. L. C. D. (2005). Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, *28*, 892-896.

Pesis, E., & Ben-Arie, R. (1986). Carbon dioxide assimilation during postharvest removal of astringency from persimmon fruit. *Physiologia Plantarum*, *67*(4), 644-648.

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

Ribeiro, M. C., Metzger, J. P., Martensen, A. C., Ponzoni, F. J., & Hirota, M. M. (2009). The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological conservation*, *142*(6), 1141-1153.

Silva, R. F., Batistella, M., & Moran, E. F. (2016). Drivers of land change: Human-environment interactions and the Atlantic Forest transition in the Paraíba Valley, Brazil. *Land Use Policy*, *58*, 133-144.

Silva, J. M. C., & Casteleti, C. H. M. (2003). Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. *The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook. CABS and Island Press, Washington*, 43-59.

Silva, N. A. D., Rodrigues, E., Mercadante, A. Z., & de Rosso, V. V. (2014). Phenolic compounds and carotenoids from four fruits native from the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(22), 5072-5084.

Tezotto-Uliana, J. V., de Paula, J. T., Tessmer, M. A., & Kluge, R. A. (2018). Ethanol vapor is efficient for reduction of astringency compounds in cashew apple. *Postharvest Biology and Technology*, *145*, 117-124.

Tokairin, T. D. O., Silva, A. P. G. D., Spricigo, P. C., Alencar, S. M. D., & Jacomino, A. P. (2018). Cambuci: a native fruit from the Brazilian Atlantic Forest showed nutraceutical characteristics. *Revista Brasileira de Fruticultura*, *40*.

Vallilo, M. I., Garbelotti, M. L., Oliveira, E. D., & Lamardo, L. C. A. (2005). Características físicas e químicas dos frutos do cambucizeiro (*Campomanesia phaea*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, *27*, 241-244.

Yamada, M., Taira, S., Ohtsuki, M., Sato, A., Iwanami, H., Yakushiji, H., Wang, R., Yang, Y., & Li, G. (2002). Varietal differences in the ease of astringency removal by carbon dioxide gas and ethanol vapor treatments among Oriental astringent persimmons of Japanese and Chinese origin. *Scientia Horticulturae*, *94*(1-2), 63-72.

2. CARACTERÍSTICAS MORFOANATÔMICAS DE FRUTOS DE CAMBUCIZEIRO (*Campomanesia phaea*) E PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO EM EMBALAGENS PLÁSTICAS

Resumo

Nativo da Mata Atlântica brasileira, o cambucizeiro (*Campomanesia phaea*) produz frutos carnosos e aromáticos que apresentam grande potencial econômico devido ao seu sabor e riqueza em compostos com potencial nutracêutico. Para que esse potencial seja alcançado, torna-se necessário o conhecimento sobre a fisiologia pós-colheita desses frutos para viabilizar sua adequada comercialização. Entre as estratégias utilizadas para aumentar o período de vida útil de frutos destaca-se o armazenamento refrigerado e o uso filmes plásticos. O uso de embalagens para promover uma atmosfera modificada passiva possibilita aumentar a vida útil de vegetais frescos, além de promover a manutenção da qualidade. Este trabalho teve como objetivo estudar as características morfoanatômicas da casca e da polpa dos frutos e suas possíveis interações com as atmosferas geradas em diferentes embalagens durante o armazenamento refrigerado. Para isso, foram testados três diferentes filmes (policloreto de vinila, polietileno de baixa densidade e polipropileno de camada biorientada) com distintas permeabilidades ao oxigênio e vapor de água, caracterizando-se as modificações dos gases no interior das embalagens e parâmetros fisiológicos dos frutos como teores de O_2 e CO_2, produção de acetaldeído, proantocianidinas, compostos fenólicos, ácido ascórbico, sólidos solúveis e acidez titulável, bem como aspectos anatômicos da casca e da polpa dos frutos através de microscopia de luz e de varredura. As atmosferas geradas pelo uso das embalagens não influenciaram no teor de compostos fenólicos totais, proantocianidinas e capacidade antioxidante. O uso de embalagens promoveu a redução da perda de massa e aumento no teor de acetaldeído na polpa, principalmente em frutos embalados com filme de polipropileno de camada biorientada, que proporcionou também a menor redução do teor de ácido ascórbico durante o armazenamento. Através da análise da estrutura anatômica dos frutos, pôde-se observar que o cambuci possui casca composta por uma camada epidérmica desprovida de estômatos e lenticelas, cutícula fina e hipoderme com várias camadas de células justapostas. Essas características parecem estar relacionadas com o modo de interação dos frutos com a atmosfera ao seu redor.

Palavras-chave: Armazenamento refrigerado; filmes plásticos; atmosfera modificada passiva; compostos bioativos; anatomia de frutos.

Abstract

Native to the Brazilian Atlantic Forest, cambuci (*Campomanesia phaea*) has flavorful and fleshy fruits with great economic potential due to its flavor and richness in nutraceutical compounds. To realize this potential, studies in post-harvest and fruit physiology are needed to boost market and business. Among strategies for such, the technique of modified passive atmosphere created by plastic film packaging associated with cold storage has been known as a good alternative to maintain quality and extend the shelf life. This study aimed at evaluate morphoanatomical, physical-chemical and biochemical characteristics of cambuci peel and pulp, and the interactions with passive modified atmosphere created by packaging films

during storage. Three different plastic films (polyvinyl chloride, low density polyethylene, and biaxially oriented polypropylene) with distinct permeability to O_2 and water vapor were tested. It was analyzed the modification of gases inside the packages as well as physiological parameters of fruits such as the level of O_2 and CO_2, acetaldehyde, proanthocyanidins, phenolics content, ascorbic acid, soluble solids, and titratable acidity. It was also investigated the peel and the pulp of the fruits through light and scanning microscopies. Plastic films had little influence in total phenolic content, proanthocyanidins, and antioxidant capacity favoring, however, a reduction in weight loss and increasing the acetaldehyde in the pulp, mainly by biaxially oriented polypropylene film, which showed also the least reduction of ascorbic acid during 12 days of storage. The anatomy investigations revealed that the fruit epidermis has no stomata and lenticels with a thin cuticle and hypoderm with several layers of densely packed cells with epicuticular wax. This characteristic may be related to the mode of interaction of the fruit pulp to the surrounding environment.

Keywords: Cold storage; plastic films; passive modified atmosphere; bioactive compounds; fruit anatomy

2.1 Introdução

Campomanesia phaea (O. Berg) Landrum é uma das espécies endêmicas brasileiras da família botânica Myrtaceae com frutos comestíveis. Esta espécie ocorre na região da Serra do Mar paulista e estados vizinhos, onde é popularmente conhecida como cambuci, sendo encontrado em pomares de pequenos produtores e reservas naturais (Kawasaki; Landrum, 1997; Tokairin et al., 2018a). Os cambucis são frutos carnosos com formato romboide e uma crista horizontal, característica marcante da espécie (Lorenzi, 1992). Suas características anatômicas ainda não foram descritas.

O cambuci é um fruto suculento, com alto rendimento de polpa, poucas sementes, e com atributos bem característicos como o aroma doce e o sabor ácido e adstringente (Tokairin et al., 2018a; Tokairin et al., 2018b). A adstringência é devida às proantocianidinas ou taninos condensados, que são polifenóis resultantes da polimerização de unidades de flavon-3-ols (catequinas) e flavon-2,4-diol (leucoantocianidinas) (Dixon; Paiva, 1995). São frutos ricos em fibras, minerais, vitamina C e compostos fenólicos, que possuem propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (Silva et al., 2014; Donado-Pestana et al., 2015).

Por possuir elevado potencial nutricional e econômico, o cambuci vêm sendo estudado quanto à sua fisiologia do desenvolvimento, ponto de colheita, perecibilidade e outros comportamentos pós-colheita para consumo *in natura* (Azevedo et al., 2016; Tokairin et al., 2018b; Spricigo et al., 2021). Os cambucis são colhidos após sua abscisão natural, ponto de

colheita considerado ideal pelos produtores da região, e comercializados congelados. Porém, estudos atuais apontam que esses frutos podem ser colhidos maduros quando ainda nos ramos, antes da abscisão natural, sem prejudicar seus atributos de qualidade (Tokairin et al., 2018b). Quanto à pós-colheita, a fisiologia, bioquímica e padrão respiratório desses frutos ainda são pouco conhecidos. Tais informações tornam-se necessárias para viabilizar a adequação e aplicação de técnicas para a manutenção da qualidade por um período satisfatório de vida útil (Belay et al., 2019).

O armazenamento refrigerado e as embalagens plásticas são meios utilizados para reduzir o metabolismo, retardar o amadurecimento e senescência, levando a um maior período de vida útil pós-colheita com a manutenção da qualidade dos frutos (Brizzolara et al., 2020). A atmosfera modificada passiva (AMP) é amplamente utilizada para o armazenamento de frutas e vegetais sendo comprovadamente eficaz na manutenção da qualidade desses produtos (Ben-Yehoshua et al., 2005; Siddiqui, 2016). A técnica da AMP consiste no acondicionamento de alimentos em embalagens herméticas onde a atmosfera formada no interior destas é modulada pela atividade respiratória dos frutos e pela interação com as características físicas das embalagens utilizadas (Siddiqui, 2016). Essa técnica visa obter, no interior das embalagens, uma atmosfera mais favorável para aumentar a vida útil, mantendo a qualidade dos alimentos (Kader, 1986; Ben-Yehoshua et al., 2005).

Devido à escassez de informações sobre as características morfoanatômicas dos frutos, que são sabidamente associados ao armazenamento pós-colheita, nessa investigação estudaram-se as características morfoanatômicas da casca e da polpa dos frutos e suas possíveis interações com as atmosferas geradas em diferentes embalagens durante o armazenamento refrigerado.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Material vegetal

Os frutos estudados foram obtidos em um pomar comercial localizado no município de Natividade da Serra – SP (23° 31’ 17’’ S e 45° 27’ 03’’ O, altitude 712 m), colhidos manualmente quando apresentavam coloração verde-amarelada, região equatorial levemente arredondada e se desprendiam facilmente quando tocados. Nesta fase, os frutos se apresentavam maduros, porém antes da abscisão natural, ponto de colheita adotado pelos produtores (Tokairin, 2017). Acondicionados em caixas de papelão sem sobreposição, foram transportados em caixas térmicas refrigeradas até o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica

Pós-colheita, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) em Piracicaba-SP. No laboratório, os frutos foram selecionados quanto ao tamanho e ausência de danos mecânicos ou por pragas e doenças. Foram em seguida sanitizados com ácido tricloroisocianúrico (3,00% p/p) (5 g L^{-1} de StartClor®) por 10 min, secos sobre papel absorvente à temperatura ambiente e agrupados para constituir os tratamentos.

2.2.2 Tratamentos

Para a aplicação dos tratamentos, os frutos foram acondicionados em bandejas de polietileno tereftalato (PET) e envolvidos por diferentes filmes plásticos com as seguintes especificações: T1: filme esticável de policloreto de vinila (PVC) 15 µm (tratamento controle); T2: polietileno de baixa densidade (PEBD) 25 µm; T3: polipropileno de camada biorientada (BOPP) 50 µm. Para o filme esticável de PVC, as bandejas foram envolvidas pelo filme e seladas na parte inferior. Já para os filmes de PEBD e BOPP, as bandejas foram acondicionadas em embalagens de 18 x 26 cm e devidamente seladas. As taxas de permeabilidade das embalagens ao oxigênio e ao vapor d'água estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Taxa de permeabilidade ao oxigênio (TPO_2) a 23 °C a seco e 1 atm de gradiente de pressão parcial de oxigênio, e taxa de permeabilidade ao vapor d'água (TPVA) a 38 °C sob gradiente de 90% UR.

Filmes	**TPO_2 (mL (CNTP) m^{-2} dia^{-1})**	**TPVA (g água m^{-2} dia^{-1})**
PVC	7.299,8	303,0
PEBD	7.446,2	13,2
BOPP	716,0	2,3

As embalagens foram armazenadas sob refrigeração (5±1 °C e 90% UR) por 12 dias. A determinação da temperatura de armazenamento foi baseada em testes preliminares (dados não mostrados). As avaliações foram realizadas no dia da montagem do experimento (dia 0 - dia da colheita, correspondendo à caracterização dos frutos), dia 1 (12 horas após o selamento das embalagens), e aos 3, 6, 9 e 12 dias de armazenamento. Amostras de casca e polpa foram congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente liofilizadas em liofilizador modelo L108 (Liobras, São Carlos, Brasil) para a realização das análises bioquímicas. O delineamento

experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 6 (filmes plásticos x dias de análise). Foram utilizadas 3 repetições de 4 frutos por tratamento.

2.2.3 Determinações

2.2.3.1 Composição gasosa no interior das embalagens

A composição gasosa no interior das embalagens foi determinada diretamente por um analisador de gases CheckMate 9900 (PBI Dansensor, Ringsted, Dinamarca), que coleta amostra gasosa do interior das embalagens por meio de um septo de silicone. Os resultados foram expressos em porcentagem de O_2 e CO_2.

2.2.3.2 Atividade respiratória e produção de etileno

As determinações da atividade respiratória (produção de CO_2) e produção de etileno foram realizadas a partir de quatro frutos que foram acondicionados individualmente em frascos de vidro herméticos de 600 mL e fechados por no mínimo uma hora para análise do CO_2, e duas horas para análise de etileno. Em seguida, foram coletados 0,5 mL de gás do espaço livre dos frascos através de um septo de silicone, e injetados em um cromatógrafo a gás modelo Trace GC Ultra (Thermo Scientific, Milão, Itália), com detector de ionização de chama (FID) e coluna Porapak N, com as seguintes especificações: forno 110 °C durante 120 e 60 segundos para CO_2 e etileno, respectivamente, injetor 150 °C, detector 180 °C, pressão 25 kPa (constante) e fluxo de N_2 de 70 mL min^{-1} (calibração com padrões de CO_2 e etileno). O hidrogênio foi usado como gás de arraste e os resultados foram expressos em mL CO_2 kg^{-1} h^{-1} e μL C_2H_4 kg^{-1} h^{-1}.

2.2.3.3 Produção de acetaldeído

Foram determinadas de acordo com a metodologia de Davis e Chace (1969) com as seguintes modificações: 1 g de polpa triturada foi armazenada em frasco de vidro de 15 mL e congelada a -20 °C. No momento da análise, os frascos foram colocados em banho-maria em equipamento TE-0541 (Tecnal, Piracicaba, Brasil) a 50 °C, por 30 min e em seguida, 0,5 mL

do gás do espaço livre do frasco foi coletado e injetado no cromatógrafo a gás modelo Trace GC Ultra (Thermo Scientific, Milão, Itália), com detector de ionização de chama (FID) e coluna Porapak N. Os valores de acetaldeído determinados foram expressos em µg g^{-1} de polpa.

2.2.3.4 Teor de proantocianidinas

O teor de proantocianidinas (taninos condensados) foram determinados em amostras de casca e de polpa, separadamente. Para isto, foi determinado pelo método da Vanilina-HCl de Nakamura et al. (2003). Os extratos foram obtidos a partir de 25 mg de amostra de casca e polpa liofilizadas. Em tubos de ensaio, foram adicionados 1 mL de amostra (extraída com metanol P.A.), 2,5 mL de uma solução de vanilina a 1% em metanol e 2,5 mL de HCl 9 N em metanol. A mistura foi incubada por 20 min a 30 °C e as leituras da absorbância a 500 nm realizadas em espectrofotômetro modelo Libra S22 (Biochrom, Cambridge, Inglaterra). A Catequina foi usada como padrão e os resultados expressos em miligrama de Equivalentes de Catequina (EC) por grama de massa seca de amostra (mg EC g^{-1} ms).

2.2.3.5 Teor de compostos fenólicos

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado usando o reativo de Folin-Ciocalteu, conforme metodologia de Singleton e Rossi (1965), com modificações. Os extratos foram obtidos a partir de 5 mg de amostra liofilizada, adição de 10 mL de metanol 80%, e armazenados em temperatura ambiente, protegidas de luz, durante 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas em centrifuga (Jouan BR4i, Paris, France), a 3220 xg, a 4 °C, durante 20 minutos, e o sobrenadante coletado constituindo o extrato fenólico. Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,2 mL de extrato, 1,5 mL de água destilada e 0,1 mL de reagente Follin-Ciocalteu e, após 5 minutos, 0,2 mL de carbonato de cálcio 20%. A reação foi encubada ao abrigo da luz pelo período de 30 minutos e, em seguida foram realizadas as leituras em espectrofotômetro modelo Libra S22 (Biochrom, Cambridge, Inglaterra) a 765 nm. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (padrão) por grama de massa seca (mg EAG g^{-1} ms).

2.2.3.6 Atividade antioxidante

Para a análise da atividade antioxidante pela redução do radical ABTS (2,2'- azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammoninum salt), foi utilizada a metodologia descrita por Re et al. (1999), onde 3 mL do radical ABTS foram adicionados à 30 µL de extrato, homogeneizados e mantidos ao abrigo da luz. Após 6 minutos cronometrados de reação, a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro modelo Libra S22 (Biochrom, Cambridge, Inglaterra) a 734 nm. Para o cálculo da porcentagem da atividade antioxidante foram realizadas leituras do branco (3 mL do radical ABTS foram adicionados à 30 µL de metanol 80%). Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de sequestro do radical ABTS, de acordo com a fórmula:

$$\%\ \boldsymbol{de\ sequestro\ do\ radical\ ABTS} = \frac{(\boldsymbol{Abs\ branco} - \boldsymbol{Abs\ amostra})\ \boldsymbol{x}\ \mathbf{100}}{\boldsymbol{Abs\ branco}}$$

2.2.3.7 Teor de ácido ascórbico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O teor de ácido ascórbico foi determinado de acordo com Pasternak et al. (2005). Amostras de 50 mg de polpa liofilizada foram extraídas em 1,5 mL de ácido metafosfórico 3%, centrifugadas a 8.000 rpm por 20 minutos a 4 °C, e filtrado em PTFE de 0,45 µm. Em seguida, foi adicionado ditiotreitol (DTT) para a redução do ácido dehidroascórbico. A identificação e quantificação foi realizada por CLAE, em cromatógrafo modelo Hewlett-Packard 1100 (Agilent, Waldbronn, Alemanha) em coluna Atlantis dC18 5 µm (150mm x 4,6 mm i.d., Waters, Dublin, Irlanda). A fase móvel foi constituída de solução de KCl (2 mM, pH 2,5) com fluxo de 0,8 mL min^{-1} e a detecção realizada em comprimento de onda de 254 nm. A identificação do composto foi feita a partir do tempo de retenção e perfil do espectro. Os resultados foram expressos em mg 100 g^{-1} de ácido ascórbico (base úmida).

2.2.3.8 Parâmetros físico-químicos

A perda de massa fresca foi determinada em balança analítica modelo AG 200 (Gehaka, São Paulo, Brasil) pela diferença, em porcentagem, entre a massa inicial (dia 0) e a massa das amostras em cada dia de avaliação até a avaliação final (dia 12). Para esta análise, os

tratamentos foram comparados com frutos não embalados submetidos às mesmas condições. A cor da casca foi determinada com um colorímetro modelo CR-400 (Konica Minolta, Tóquio, Japão). Quatro leituras foram realizadas em diferentes pontos dos frutos, sendo dois em cada face. O teor de sólidos solúveis foi determinado com uso de refratômetro digital modelo Palette 101 (Atago, Tóquio, Japão) e expresso em °Brix. A acidez titulável (AT) foi determinada em pHmetro digital modelo Tec-2 (Tecnal, Piracicaba, Brasil). Para a determinação da acidez titulável utilizou-se titulação potenciométrica com NaOH a 1,0 N. Os resultados foram expressos em porcentagem de ácido cítrico.

2.2.3.9 Microscopia de luz

Porções da casca das faces superior e inferior e da polpa de 5 frutos foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965), submetidas à bomba de vácuo para retirada do ar dos espaços intercelulares, e desidratadas em uma série etílica crescente. As amostras foram infiltradas com historesina Leica® (Heraeus Kulzer, Hanau, Alemanha) para preparo dos blocos e seccionadas transversalmente em micrótomo rotativo Leica RM 2045 (Leica, Wetzlar, Alemanha) na espessura de 5 µm. Os cortes foram dispostos em lâminas histológicas e corados com azul de toluidina 0,05% em tampão fosfato e ácido cítrico em pH 4,5 (Sakai, 1973) para coloração padrão. Para detecção do conteúdo de compostos fenólicos foi utilizado cloreto férrico (Johansen, 1940) e Sudan IV para a delimitação dos lipídios da cutícula (Jensen, 1962). As fotomicrografias foram realizadas em microscópio trinocular Leica DM LB (Leica, Wetzlar, Alemanha) ligado à câmera de vídeo Leica DC 300 F com software LAS 4.0 usado para análise de imagens. Foram realizadas 45 medições da espessura da cutícula dos frutos em diferentes pontos utilizando o software ImageJ (Rasband, 2018).

2.2.3.10 Microscopia eletrônica de varredura

Para caracterização da epiderme, amostras da casca de frutos foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965), desidratadas em série etílica (10, 30, 50, 70, 90 e 100%), secas pelo método do ponto crítico de CO_2 (Horridge; Tamm, 1969), montadas sobre suportes de alumínio e revestidas com uma camada de ouro (30–40 nm) no equipamento modelo MED

010 (Balzers, Carlsbad, EUA). As análises e a digitalização das imagens foram obtidas usando um microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP (Zeiss, Oberkochen, Alemanha), operado a 20 kV, com as escalas impressas diretamente nas eletromicrografias.

2.2.4 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P<0,05$), utilizando-se o software estatístico R Studio (R Core Team, 2018 - Versão 1.2.5033).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Atividade respiratória e produção de etileno de cambucis em resposta à atmosfera gasosa formada com filmes plásticos

Embalagens com filmes plásticos modificam a atmosfera ao redor dos frutos. Diferenças significativas na porcentagem de gases no interior das embalagens ocorreram a partir do terceiro dia de armazenamento (Figura 1A-B). Dentre os tratamentos avaliados, o tratamento com BOPP promoveu a maior modificação na composição gasosa no interior das embalagens, elevando a 13% o teor de CO_2, e reduzindo os níveis de O_2 a 8% entre o sexto e o nono dia de armazenamento. Os tratamentos com PVC e PEBD pouco modificaram a composição gasosa e não apresentaram diferenças entre si, mantendo os níveis de CO_2 em torno de 3%, e os níveis de O_2 próximos a 18% desde o terceiro dia até o 12º dia de armazenamento. Esses resultados estão de acordo com as especificações de TPO_2 desses filmes apresentados na tabela 1.

Ao isolar produtos vegetais de respiração ativa dentro de embalagens é natural observar a redução de O_2, assim como o aumento de CO_2, gerando gradientes de força motriz através da barreira do filme em relação às concentrações atmosféricas. Esses gradientes forçam o movimento de O_2 para dentro da embalagem e a migração de CO_2 para fora da embalagem. À medida que os frutos respiram, os gradientes de pressão aumentam, permitindo que ocorra a movimentação de gases para dentro e para fora da embalagem em quantidades semelhantes às taxas de troca de gases respiratórios dos frutos, resultando em uma atmosfera de equilíbrio (Ben-Yehoshua et al., 2005).

Uma atmosfera de equilíbrio com maiores diferenças em relação à atmosfera externa ocorre conforme a permeabilidade das embalagens. Por isso, de acordo com a TPO_2, a embalagem de BOPP promoveu maiores alterações na concentração de gases devido a menor taxa de permeabilidade ao oxigênio e consequentemente ao gás carbônico. A taxa de permeabilidade ao oxigênio da embalagem de BOPP correspondeu à aproximadamente 10% da taxa de permeabilidade conferida pelas embalagens de PVC e PEBD.

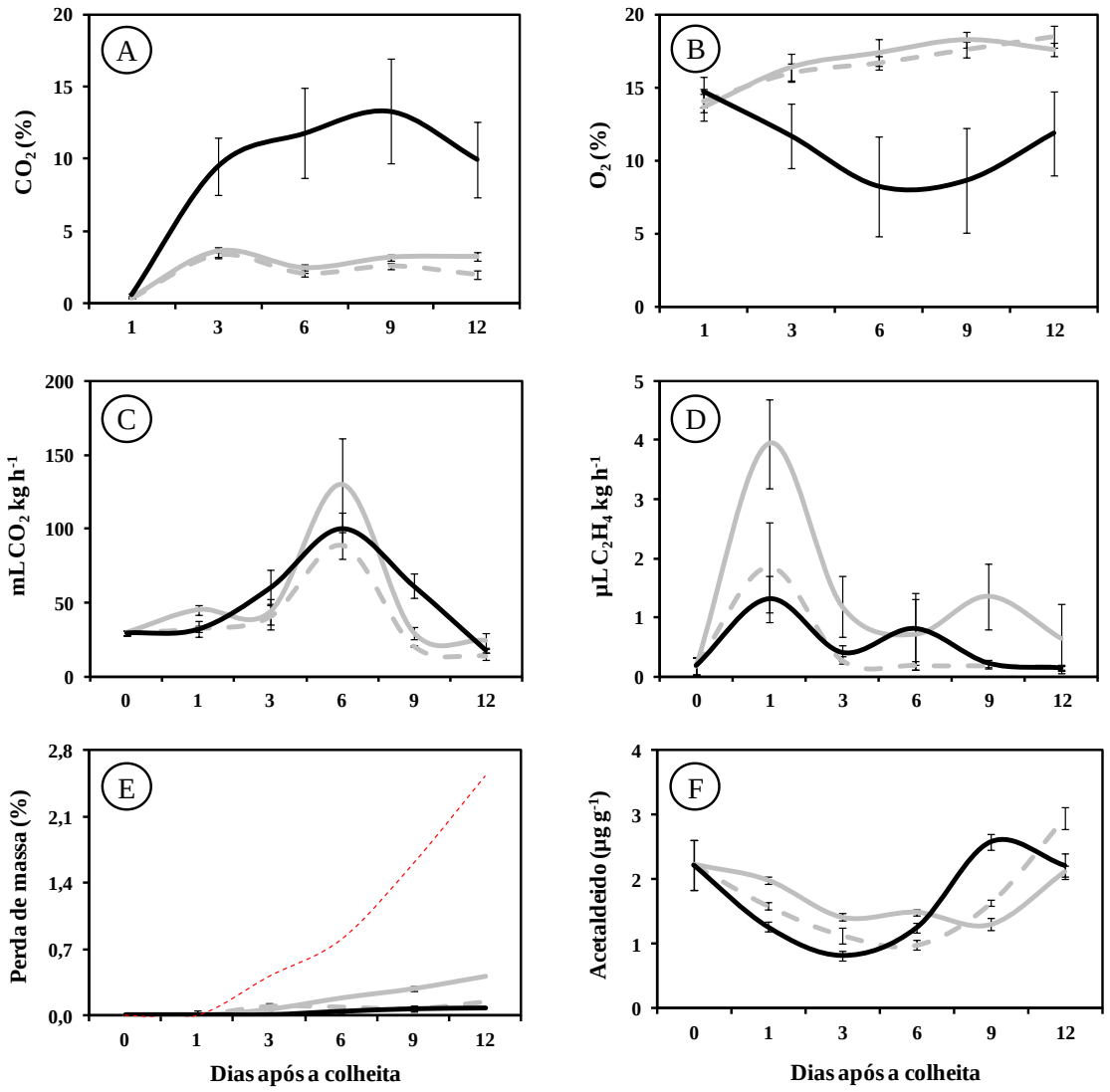

Figura 1. Porcentagem de CO_2 (A) e O_2 (B) no interior das embalagens; Produção de CO_2 (C) e etileno (D) pelos frutos; Perda de massa fresca (E); e produção de acetaldeído (F) de cambucis armazenadas a 5±1 °C e 90% de UR, por 12 dias. : PVC (policloreto de vinila), : PEBD (polietileno de baixa densidade), : BOPP (polipropileno de camada biorientada), : Sem embalagem. As barras verticais representam o erro padrão da média (n=4).

Os cambucis apresentaram atividade respiratória com um leve acréscimo desde o dia da colheita até o terceiro dia de armazenamento para todos os tratamentos, iniciando com

média de 29,5 mL CO_2 kg^{-1} h^{-1}, até 46,7 CO_2 kg^{-1} h^{-1} no terceiro dia de armazenamento (Figura 1C). Logo após, observou-se um pico respiratório no 6º dia de armazenamento para todos os tratamentos. Frutos embalados em PVC obtiveram as maiores taxas respiratórias, atingindo média de 130,1 mL CO_2 kg^{-1} h^{-1}. Os tratamentos com PEBD e BOPP diferiram do tratamento com PVC, obtendo resultados semelhantes, com produções de 88,7 e 100,4 mL CO_2 kg^{-1} h^{-1}, respectivamente. Após o pico respiratório, houve queda drástica na atividade respiratória para todos os tratamentos até o último dia analisado (Figura 1C).

Analisando-se a produção de etileno (Figura 1D), observou-se a ocorrência de um pico de produção no primeiro dia de armazenamento, aumentando em 7 vezes a produção de etileno para o tratamento com BOPP, 10 vezes para o tratamento com PEBD e 22 vezes para o tratamento com PVC em relação ao dia da colheita (Dia 0). Após o pico de produção houve decréscimo para todos os tratamentos, que se mantiveram sem diferença significativa até último dia de análise, com taxa de produção média de 0,5 µL C_2H_4 kg^{-1} h^{-1}.

As taxas iniciais de produção de CO_2 e etileno encontradas corroboram com os resultados obtidos por Azevedo et al. (2016) para cambucis em mesmo estádio de maturação utilizados no presente estudo. Essa semelhança foi notada somente na avaliação inicial, pois no primeiro dia de armazenamento foi possível observar a modificação das concentrações dos gases no interior das embalagens com os diferentes filmes, e consequentemente a modificação no comportamento respiratório e de produção de etileno. Apesar das diferenças no comportamento respiratório e produção de etileno dos frutos nos diferentes tratamentos, não houve mudanças físico-químicas significativas entre eles, tendo os frutos apresentado os mesmos padrões para cor da casca, teor de sólidos solúveis e firmeza (dados não mostrados).

A menor síntese de etileno pelos frutos envolvidos pelo filme de BOPP pode estar relacionada ao aumento da concentração de CO_2 no interior da embalagem. Em altas concentrações, o CO_2 age como um inibidor natural da síntese de etileno. Muitos estudos foram realizados com o objetivo de entender os mecanismos de ação envolvidos na inibição da síntese de etileno na presença de altas concentrações de CO_2. Os mais recentes indicam que a provável ação do CO_2 ocorre durante a conversão de S-adenosil-metionina (SAM) em Ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), precursor direto do etileno (Wild et al., 2005).

2.3.2 As atmosferas geradas ao redor dos cambucis promoveram a redução da perda de massa e o aumento na produção de acetaldeído pelos frutos

Durante o armazenamento, as maiores perdas de massa ocorreram nos frutos embalados em PVC (Figura 1E) e as menores nas embalagens de BOPP, com cerca de 0,08% ao final de 12 dias. Apesar das evidentes diferenças entre as embalagens testadas, as perdas de massa obtidas nesse trabalho podem ser consideradas muito pequenas para o período avaliado. Na figura 1E é demonstrada a vantagem do uso de embalagens ao comparar os tratamentos com frutos não embalados (linha vermelha). Frutos não embalados atingiram perdas de até 2,5% ao final dos 12 dias de armazenamento. Os tratamentos aplicados proporcionaram, portanto, uma significativa redução da perda de massa de 87% a 97%.

No geral, frutos em AMP mantém a matéria fresca devido ao aumento da umidade relativa do ar no interior da embalagem, saturando a atmosfera ao redor do fruto, o que leva à diminuição do déficit de pressão do vapor de água destes em relação ao ambiente. Resultados semelhantes foram encontrados em outros frutos submetidos a diferentes filmes plásticos (Silva et al., 2009; Yamashita et al., 2001; Sousa et al., 2002; Antoniolli et al., 2001; Kluge et al., 1999).

Além da conservação dos parâmetros de qualidade, a modificação da atmosfera ao redor dos frutos pode ter efeitos secundários no seu metabolismo, como a indução da síntese de acetaldeído, composto responsável pela polimerização de taninos e consequente redução da adstringência dos frutos (Ben-Yehoshua et al., 2005; Pesis, 2005; Edagi et al.; 2009; Edagi; Kluge, 2009). Observou-se que os frutos submetidos à atmosfera criada pelo filme de BOPP apresentou um pico de produção de acetaldeído no nono dia de armazenamento (Figura 1F). É possível que o acúmulo de acetaldeído pelos frutos embalados com filme de BOPP esteja relacionado aos mecanismos de reação à redução do oxigênio livre na atmosfera circundante dos frutos, pois sabe-se que, em ambientes com baixo teor de oxigênio, os vegetais iniciam os processos de respiração anaeróbica e um dos produtos desse processo é o acetaldeído (Kennedy et al., 1992; Pesis, 2005). Parece razoável conjecturar que esse acúmulo de acetaldeído tenha resultado em um aumento nos teores de proantocianidinas na casca e na polpa dos frutos.

2.3.3 A casca e a polpa de cambucis apresentaram teor diferenciado de fenólicos totais, proantocianidinas e capacidade antioxidante

Observou-se que o perfil das proantocianidinas, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante da casca dos frutos sofrem mais alterações em resposta aos tratamentos do que a polpa desses frutos, que mantém o mesmo perfil de conteúdo durante os dias avaliados, parecendo não interagir com a nova atmosfera a que foram submetidos (Figura 2A-D).

Os frutos apresentaram teor médio de 74 mg g^{-1} e 7,0 mg g^{-1} de proantocianidinas na casca e na polpa no dia 0, respectivamente. Ao longo do armazenamento, as proantocianidinas da casca dos frutos foram reduzidas em todos os tratamentos, sendo que o BOPP apresentou redução final de aproximadamente 45% do teor de proantocianidinas em relação ao conteúdo inicial (Figura 2A). Diferentemente, a polpa manteve estes compostos em média de 9 mg g^{-1} durante o armazenamento. A redução das proantocianidinas seria esperada se considerarmos que um aumento da concentração de CO_2 no interior das embalagens teria uma ação destanizante.

No entanto, a redução no teor das proantocianidinas na casca de cambucis não foi suficiente para redução da adstringência a níveis perceptíveis ao paladar. Em caqui, fruto com alto teor de proantocianidinas, é adotado como padrão teores abaixo de 0,1% do total inicial para ser considerado um fruto destanizado (Taira, 1996). Em pseudofrutos de caju foi verificado comportamento similar ao cambuci, com teor 9 vezes maior de proantocianidinas na casca em comparação a polpa no momento da colheita (Tezotto-Uliana et al., 2018). Ainda neste estudo, mesmo com aplicação de tratamento de destanização com etanol, as proantocianidinas não foram reduzidas a valores menores de 0,1%.

O teor de compostos fenólicos totais na casca dos frutos apresentou tendência de decréscimo para todos os tratamentos ao longo dos dias de armazenamento (Figura 2C). Ao final dos 12 dias de armazenamento, houve uma redução de cerca de 50% do conteúdo de compostos fenólicos totais. Na polpa dos frutos, houve uma leve tendência de acréscimo e oscilações para todos os tratamentos (Figura 2D). No 12º dia de armazenamento os teores foram de 33,3 mg EAG g^{-1} para o tratamento com PVC, 35,5 mg EAG g^{-1} nos frutos envolvidos por filme de PEBD, e 41,1 mg EAG g^{-1} para o tratamento com BOPP, que diferiu significativamente dos demais tratamentos. Tokairin et al. (2018b) estudaram cinquenta e nove acessos de cambuci e determinaram teores de compostos fenólicos totais entre 330,5 mg GAE 100 g^{-1} a 3.526,04 mg GAE 100 g^{-1}. Os compostos fenólicos são variáveis nos frutos em

função das condições climáticas dos locais de produção e a fatores de estresse a que são submetidos, sendo um importante composto bioativo para frutos consumidos *in natura* ou processados.

Ao longo dos dias de armazenamento, a capacidade antioxidante dos frutos seguiu o mesmo padrão encontrado para a análise de compostos fenólicos totais para todos os tratamentos avaliados, com redução de valores de 21,0 para 13,0% na casca e mantiveram-se entre 4,1 e 9,6 na polpa (Figura 2E-F). A redução da capacidade antioxidante da casca está relacionada à redução dos compostos responsáveis pela ação antioxidante, como as proantocianidinas, fenólicos totais e ácido ascórbico observados neste estudo.

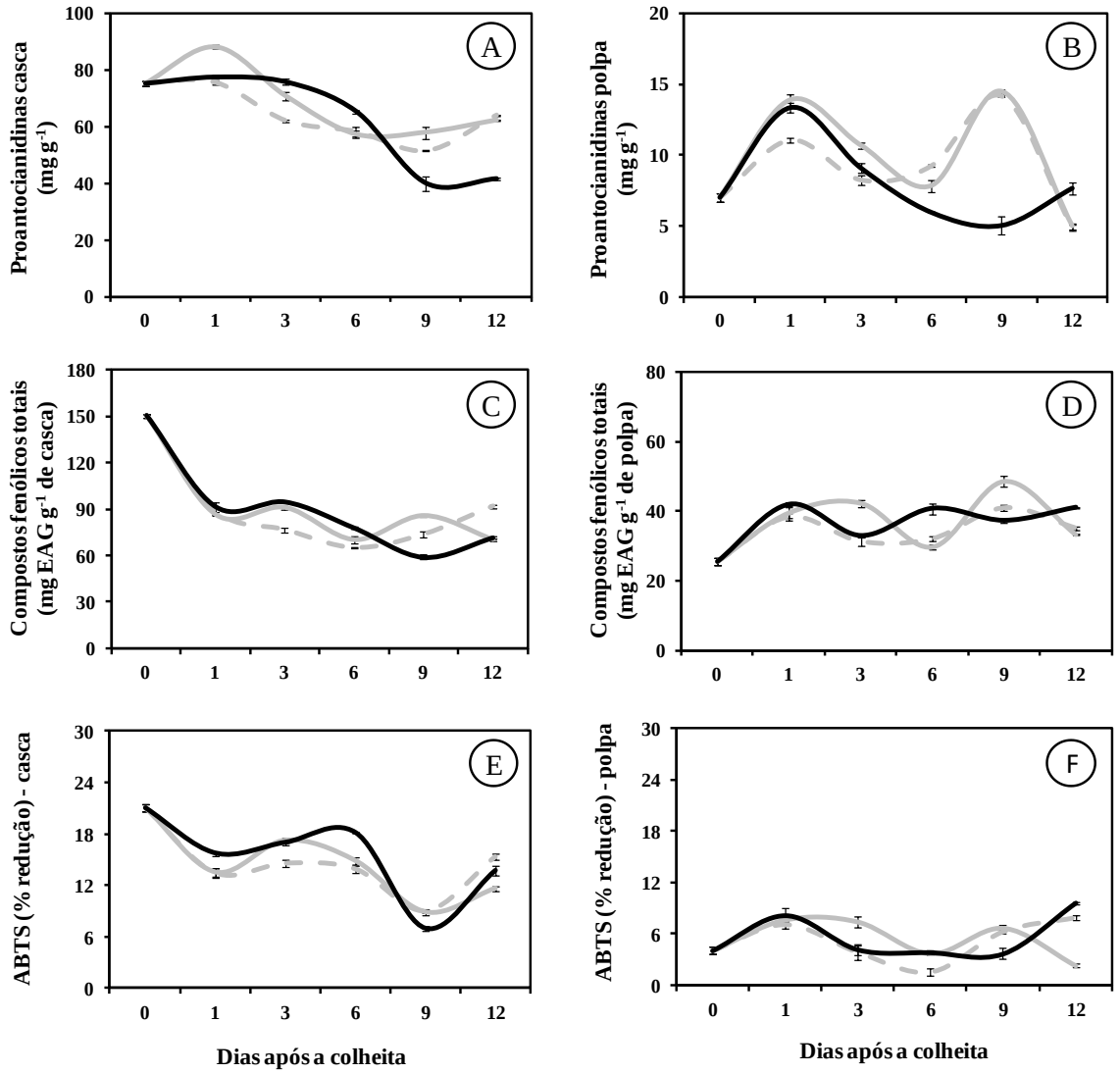

Figura 2. Teor de proantocianidinas em casca (A) e polpa (B); Teor de compostos fenólicos totais em casca (C) e polpa (D); Atividade antioxidante pelo método de redução do radical ABTS para casca (E) e polpa (F) de cambucis submetidos a diferentes embalagens e armazenados a 5±1 °C e 90% de UR, por 12 dias. ▬: PVC (policloreto de vinila), ▬ ▬: PEBD (polietileno de baixa densidade), ━: BOPP (polipropileno de camada biorientada). As barras verticais representam o erro padrão da média (n=4).

2.3.4 A estrutura anatômica do cambuci reduz a interação com as atmosferas geradas ao seu redor

Frutos de cambucizeiro em ponto de colheita (Figura 3A) apresentam polpa formada por tecido parenquimático com elevado número de células com conteúdo fenólico denso ou granular no vacúolo (incluindo as proantocianidinas) (Figura 3B), feixes vasculares e esclereídes (Figura 3B e E), distribuídos aleatoriamente na polpa. As células esclereídicas conferem rigidez e estrutura à polpa.

Abaixo da epiderme são encontradas em torno de oito camadas de células hipodérmicas de tamanho menor que as parenquimáticas com vacúolos preenchidos de conteúdo fenólico, paredes espessas e justapostas (Figura 3C). Ainda na região mais periférica do fruto estão presentes os canais secretores, possivelmente com produção de secreção mista (Figura 3D). Nesta imagem, o conteúdo fenólico das células e do canal secretor é confirmado pelo teste positivo com cloreto férrico.

Em frutos carnosos, a casca é geralmente composta pela epiderme coberta pela cutícula e camadas subepidérmicas subjacentes (Konarska, 2014; Tafolla-Arellano et al., 2017). O teor de proantocianidinas, e consequentemente a adstringência, é maior na casca dos frutos do que na polpa. Isso se justifica pelas numerosas camadas de células com conteúdo fenólico. Em pseudofrutos de caju foi verificada estrutura anatômica similar, bem como maior teor de proantocianidinas e elevada adstringência (Tezotto-Uliana et al., 2018).

A epiderme é unisseriada formada por células de tamanhos irregulares, mais largas do que altas, com afastamento entre as paredes decorrente da expansão do fruto (Figura 3F). Tricomas estavam presentes em algumas regiões (Figura 3G e H), e em outras foram visualizadas apenas cicatrizes de suas bases (Figura 3H e I). Estômatos e lenticelas não foram encontrados. Essas estruturas são as principais responsáveis pelas trocas gasosas e controle da transpiração. A maioria dos frutos já estudados anatomicamente apresenta estômatos e/ou lenticelas (Konarska, 2013; Konarska, 2014; Tessmer et al., 2014; Tezotto-Uliana et al., 2018).

As ceras epicuticulares apresentaram regiões com ornamentações (Figura 3H) e outras regiões compactadas (Figura 3I). A cutícula apresentou flanges, que são prolongamentos formados entre as paredes anticlinais da epiderme, as quais foram evidenciadas com Sudan IV para lipídeos (Figura 3F). Em frutos de caquizeiro em ponto de maturação também é verificado o afastamento das células epidérmicas e a formação de flanges (Tessmer et al., 2014). A cutícula apresentou espessura média de 3,70 µm na face superior e 3,55 µm na face

inferior. A espessura observada nos cambucis é considerada fina comparada a frutos como maçãs, que apresentam cutícula com espessura entre 10 e 20 µm (Konarska, 2014; Tessmer et al., 2012), e peras (± 9,0µm) (Konarska, 2013). Entretanto, estudos recentes indicam que, na pós-colheita, o papel da cutícula em frutos ainda não é totalmente esclarecido, e que fatores como a composição e propriedades biomecânicas da cutícula podem influenciar mais do que a espessura (Lara et al., 2014; Domínguez et al. 2011).

Os resultados desses estudos anatômicos revelaram que a casca dos frutos de cambucizeiro é composta por uma camada de células epidérmicas desprovidas de estômatos e lenticelas, com cutícula delgada e hipoderme densa, com células altamente justapostas e com acúmulo de conteúdo fenólico. Desta forma, sendo a casca a interface de contato com a atmosfera ao redor do fruto, essas características da cutícula podem ser os fatores responsáveis, pelo menos em parte, pela pouca interação da atmosfera gasosa com a porção interna do fruto, mantendo assim os teores de proantocianidinas, fenólicos totais e capacidade antioxidante em níveis pouco alterados.

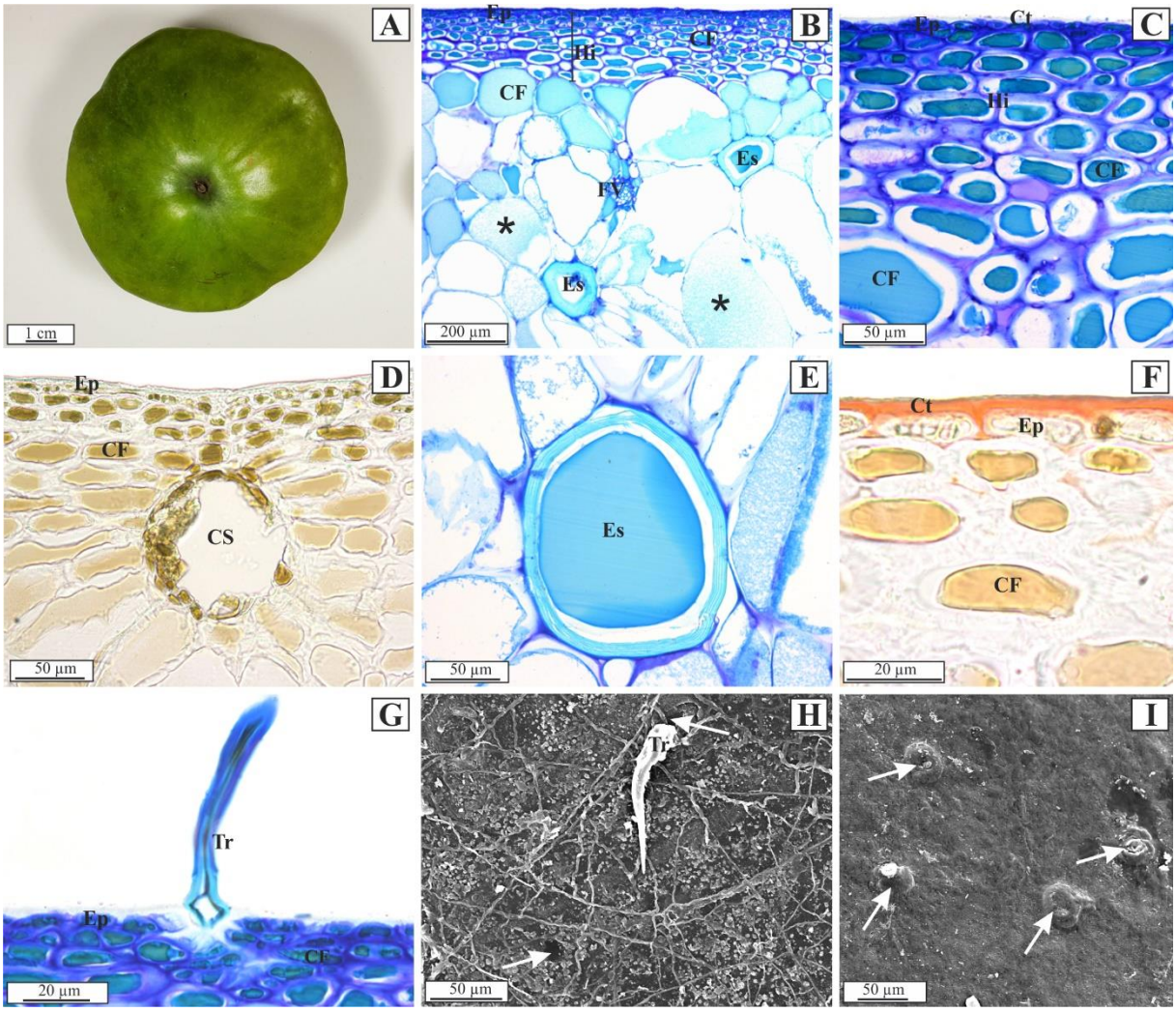

Figura 3. A: Fruto de cambucizeiro. B: Secções transversais da casca e polpa de frutos de cambucizeiro: Visão geral da casca e polpa com células de conteúdo fenólico preenchendo o vacúolo e outras com aspecto granular (*). C: Epiderme e hipoderme composta por camadas de células justapostas e acúmulo de conteúdo fenólico. D: Presença de canal secretor na periferia do fruto. Coloração com cloreto férrico evidenciando células e canal secretor com acúmulo de compostos fenólicos. E: Presença de esclereídes distribuídas aleatoriamente na polpa. Cutícula e epiderme composta por uma camada de células. Cutícula evidenciada com Sudan IV na cor alaranjada (F). Presença de tricomas na epiderme (G). Ornamentações da ceras epicuticulares, tricomas e cicatrizes após sua eliminação (seta brancas) (H) e cicatrizes dos tricomas (I). CF: Célula com conteúdo fenólico, Ct: Cutícula, CS: Canal Secretor, Es: Esclereíde, Ep: Epiderme, FV: Feixe Vascular, Hi: Hipoderme, Seta branca: Cicatriz deixada pela queda do tricoma, Tr: Tricoma.

2.3.5 Teor de ácido ascórbico e acidez titulável sob as diferentes atmosferas

Presente em grande quantidade nos frutos de cambucizeiro, o ácido ascórbico (AA) é um importante composto bioativo benéfico à saúde humana. Naturalmente, o teor desses compostos sofrem alterações ao longo do desenvolvimento e senescência dos frutos. Observou-se uma tendência de decréscimo desse composto no decorrer do armazenamento em todos os tratamentos com reduções de 28% do conteúdo total para a embalagem de BOPP e

50% para a embalagem de PVC. O filme de PEBD apresentou redução intermediária, porém não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos (Figura 4A).

Além da modificação da atmosfera ao redor dos frutos gerados pelas embalagens, o armazenamento refrigerado pode influenciar diversos processos metabólicos indicando uma forma de adaptação dos frutos às condições ambientais do armazenamento. Assim, a modificação atmosférica aliada ao armazenamento refrigerado pode reduzir as mudanças fisiológicas e químicas de frutas e vegetais, preservando a qualidade e estendendo o período de armazenamento. Lee e Kader (2000) relatam diversos exemplos onde perdas do conteúdo de AA podem ser reduzidas armazenando diferentes vegetais em atmosferas com oxigênio e temperatura reduzidos.

Mesmo havendo decréscimo do teor de AA durante o armazenamento, os conteúdos após 12 dias foram satisfatórios para todos os tratamentos. Considerando cambucis armazenados durante 12 dias, o consumo de 200 g de fruto poderia contribuir com 66–90 % e 79–112 % das Recomendações de Doses Alimentares (RDA) de AA para adultos do sexo masculino e feminino por dia, respectivamente (Amaya-Farfan et al., 2001).

A acidez titulável variou ao longo dos dias de armazenamento em todos os tratamentos, ficando entre 1,95 e 2,86, com leve tendência de decréscimo, até o último dia analisado (Figura 4B).

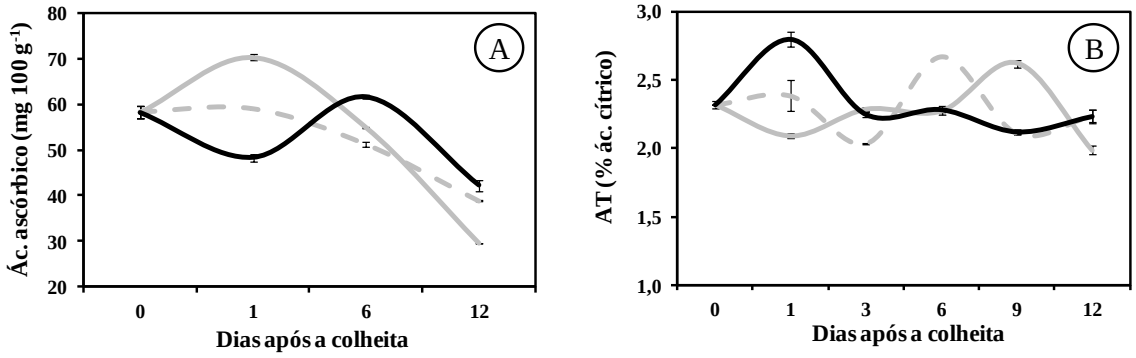

Figura 4. Teor de ácido ascórbico (A) e acidez titulável AT (B) de frutos de cambucizeiro submetidos a diferentes embalagens e armazenados a 5±1 °C e 90% de UR, por 12 dias. PVC = policloreto de vinila, PEBD = polietileno de baixa densidade, e BOPP = polipropileno de camada biorientada. : PVC (policloreto de vinila), : PEBD (polietileno de baixa densidade), : BOPP (polipropileno de camada biorientada). As barras verticais representam o erro padrão da média (n=4).

2.4 Conclusão

O filme BOPP é recomendado para cambuci por atuar como maior barreira, mantendo uma maior concentração de CO_2 e menor de O_2 na embalagem. Esta concentração de gases nas embalagens promoveu a redução do conteúdo de proantocianidinas, maior teor de ácido

ascórbico e capacidade antioxidante ao final do armazenamento, além de não afetar os parâmetros de sabor.

As alterações foram mais evidentes na casca do que na polpa dos frutos, região onde está concentrado o maior número de células com conteúdo fenólico. Os estudos anatômicos indicam que a casca promove uma barreira da atmosfera gasosa no interior do fruto devido às características anatômicas da cutícula, ausência de estômatos e lenticelas e hipoderme formada por várias camadas de células justapostas.

As embalagens não afetam parâmetros de qualidade associados ao sabor.

Referências

Amaya-Farfan, J., Domene, S. M. Á., & Padovani, R. M. (2001). DRI: Síntese comentada das novas propostas sobre recomendações nutricionais para antioxidantes. *Revista de Nutrição*, *14*, 71-78.

Antoniolli, L. R., Castro, P. R. D. C. E., Kluge, R. A., & Scarpare Filho, J. A. (2001). Influência da embalagem de polietileno na remoção da adstringência e na qualidade de caquis (*Diospyrus kaki* L.), cv. Giombo, armazenados sob refrigeração. *Revista Brasileira de Fruticultura*, *23*, 293-297.

Azevedo, M. C. S., Silva, R. R. E., Jacomino, A. P., & Genovese, M. I. (2016). Physicochemical variability of cambuci fruit (*Campomanesia phaea*) from the same orchard, from different locations and at different ripening stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *97*(2), 526-535.

Belay, Z. A., Caleb, O. J., & Opara, U. L. (2019). Influence of initial gas modification on physicochemical quality attributes and molecular changes in fresh and fresh-cut fruit during modified atmosphere packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, *21*, 100359.

Ben-Yehoshua, S., Beaudry, R. M., Fishman, S., Jayanty, S., & Mir, N. (2005). Modified atmosphere packaging and controlled atmosphere storage. *Environmentally friendly technologies for agricultural produce quality. Ben-Yehoshua, S. Ed. Taylor and Francis Group LLC. Boca Raton, FL, USA*, 51-73.

Brizzolara, S., Manganaris, G. A., Fotopoulos, V., Watkins, C. B., & Tonutti, P. (2020). Primary metabolism in fresh fruits during storage. *Frontiers in plant science*, *11*, 80.

Davis, P. L., & Chace, W. G. (1969). Determination of alcohol in citrus juice by gas chromatographic analysis of headspace. *HortScience*, 4, 117-119.

Dixon, R. A., & Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell*, *7*(7), 1085-1097.

Domínguez, E., Cuartero, J., & Heredia, A. (2011). An overview on plant cuticle biomechanics. *Plant Science*, *181*(2), 77-84.

Donado-Pestana, C. M., Belchior, T., Festuccia, W. T., & Genovese, M. I. (2015). Phenolic compounds from cambuci (*Campomanesia phaea* O. Berg) fruit attenuate glucose intolerance and adipose tissue inflammation induced by a high-fat, high-sucrose diet. *Food Research International*, *69*, 170-178.

Edagi, F. K., & Kluge, R. A. (2009). Remoção de adstringência de caqui: um enfoque bioquímico, fisiológico e tecnológico. *Ciência Rural*, *39*, 585-594.

Edagi, F. K., Chiou, D. G., Terra, F. D. A. M., Sestari, I., & Kluge, R. A. (2009). Remoção da adstringência de caquis' Giombo' com subdosagens de etanol. *Ciência Rural*, *39*, 2022-2028.

Horridge, G. A., & Tamm, S. L. (1969). Critical point drying for scanning electron microscopic sthdy of ciliary motion. *Science*, *163*(3869), 817-818.

Jensen, W. A. (1962). Botanical histochemistry: principles and practice. San Francisco: W. H. Freeman, CA, USA. 1962. 408 p

Johansen, D. A. (1940). *Plant microtechnique.* McGraw-Hill Book Company: New York, NY, USA.

Kader, A. A. (1986). Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. *Food technology (USA)*.

Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. cell Biol*, *27*, 1A-149A.

Kawasaki, M. L., & Landrum, L. R. (1997). A rare and potentially economic fruit of Brazil, *Campomanesia pheaea* (Myrtaceae). *Economic Botany*, *51*(4), 403-405.

Kennedy, R. A., Rumpho, M. E., & Fox, T. C. (1992). Anaerobic metabolism in plants. *Plant Physiology*, *100*(1), 1-6.

Konarska, A. (2014). Morphological, histological and ultrastructural changes in fruit epidermis of apple *Malus domestica* cv. Ligol (Rosaceae) at fruit set, maturity and storage. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*, *56*(2), 35-38.

Konarska, A. (2013). The relationship between the morphology and structure and the quality of fruits of two pear cultivars (*Pyrus communis* L.) during their development and maturation. *The Scientific World Journal*, *2013*.

Kluge, R. A., Scarpare Filho, J. A., Jacomino, A. P., & Marques, C. (1999). Embalagens plásticas para pêssegos ‘Flordaprince’ refrigerados. *Scientia Agricola*, *56*, 843-850.

Lara, I., Belge, B., & Goulao, L. F. (2014). The fruit cuticle as a modulator of postharvest quality. *Postharvest Biology and Technology*, *87*, 103-112.

Lee, S. K., & Kader, A. A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest biology and technology*, *20*(3), 207-220.

Lorenzi, H. (1992). Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 252p.

Nakamura, Y., Tsuji, S., & Tonogai, Y. (2003). Analysis of proanthocyanidins in grape seed extracts, health foods and grape seed oils. *Journal of health science*, *49*(1), 45-54.

Pasternak, T., Potters, G., Caubergs, R., & Jansen, M. A. (2005). Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *Journal of experimental botany*, *56*(418), 1991-2001.

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

Rasband, W. S. (2018). Image J. Maryland: Bethesda, United States National Institute of Health. Disponível em: http://rsb.info.nih.gov/ij/. Acesso em: 12 fev. 2020.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, *26*(9-10), 1231-1237.

Sakai, W. S. (1973). Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. *Stain technology*, *48*(5), 247-249.

Siddiqui, M. W. (Ed.). (2016). *Eco-friendly technology for postharvest produce quality*. Academic Press, 326 p.

Silva, A. V. C., Andrade, D. G. D., Yaguiu, P., Carnelossi, M. A. G., Muniz, E. N., & Narain, N. (2009). Uso de embalagens e refrigeração na conservação de atemóia. *Food Science and Technology*, *29*, 300-304.

Silva, N. A. D., Rodrigues, E., Mercadante, A. Z., & de Rosso, V. V. (2014). Phenolic compounds and carotenoids from four fruits native from the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(22), 5072-5084.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144-158.

Sousa, J. P. D., Praça, E. F., Alves, R. E., Bezerra Neto, F., & Dantas, F. F. (2002). Influência do armazenamento refrigerado em associação com atmosfera modificada por filmes plásticos na qualidade de mangas ‘Tommy Atkins’. *Revista Brasileira de Fruticultura*, *24*(3), 665-668.

Spricigo, P. C., Correia, B. S. B., Borba, K. R., Taver, I. B., Machado, G. D. O., Wilhelms, R. Z., Queiroz Junior, L. H. K., Jacomino, A. P., & Colnago, L. A. (2021). Classical food quality attributes and the metabolic profile of cambuci, a Native Brazilian Atlantic Rainforest Fruit. *Molecules*, *26*(12), 3613.

Taira, S. (1996). Astringency in persimmon. In *Fruit analysis* Springer, Berlin, Heidelberg, 18, pp. 97-110.

Tafolla-Arellano, J. C., Zheng, Y., Sun, H., Jiao, C., Ruiz-May, E., Hernández-Oñate, M. A., Gonzales-Leon, A., Baéz-Sañudo, R., Fei, Z., Domozych, D., Rose, J., & Tiznado-Hernández, M. E. (2017). Transcriptome analysis of mango (*Mangifera indica* L.) fruit epidermal peel to identify putative cuticle-associated genes. *Scientific reports*, *7*(1), 1-13.

Tessmer, M. A., Kluge, R. A., & Appezzato-da-Glória, B. (2014). The accumulation of tannins during the development of ‘Giombo’ and ‘Fuyu’ persimmon fruits. *Scientia Horticulturae*, *172*, 292-299.

Tessmer, M. A., Antoniolli, L. R., & Appezzato-da-Glória, B. (2012). Cuticle of ‘Gala’ and ‘Galaxy’ apples cultivars under different environmental conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *55*(5), 709-714.

Tezotto-Uliana, J. V., de Paula, J. T., Tessmer, M. A., & Kluge, R. A. (2018). Ethanol vapor is efficient for reduction of astringency compounds in cashew apple. *Postharvest Biology and Technology*, *145*, 117-124.

Tokairin, T. D. O. (2017). *Caracterização e conservação pós-colheita de cambuci, fruto nativo da Mata Atlântica* (Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo).

Tokairin, T. D. O., Neto, H. B., & Jacomino, A. P. (2018a). Cambuci - *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum. In *Exotic Fruits* (pp. 91-95). Academic Press.

Tokairin, T. D. O., Silva, A. P. G. D., Spricigo, P. C., Alencar, S. M. D., & Jacomino, A. P. (2018b). Cambuci: a native fruit from the Brazilian Atlantic Forest showed nutraceutical characteristics. *Revista Brasileira de Fruticultura*, *40*.

Wild, H. P., Balk, P. A., Fernandes, E. C., & Peppelenbos, H. W. (2005). The action site of carbon dioxide in relation to inhibition of ethylene production in tomato fruit. *Postharvest biology and technology*, *36*(3), 273-280.

3. APLICAÇÃO DE ETILENO EM FRUTOS DE CAMBUCIZEIRO (*Campomanesia phaea*) EM PÓS-COLHEITA: ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

Resumo

O cambuci (*Campomanesia phaea*) é uma fruta ácida, aromática e adstringente, muito utilizado na preparação de sucos, sorvetes e bebidas alcoólicas. A redução da adstringência desses frutos seria comercialmente benéfica para viabilizar o consumo *in natura*. O objetivo do experimento foi gerar informações acerca das respostas dos frutos de cambucizeiro ao tratamento com etileno para induzir a redução da adstringência a fim de impulsionar o consumo desses frutos. Para isso, frutos de cambucizeiro foram submetidos a diferentes concentrações de etileno por 12 horas, e posteriormente armazenados por cinco dias a 5 °C e 90% de umidade. Os tratamentos aplicados não alteraram o padrão respiratório e a produção de etileno dos frutos. O mesmo se verificou para o conteúdo de compostos fenólicos em casca e polpa, capacidade antioxidante e conteúdo de ácido ascórbico. Frutos submetidos à atmosfera com 500 µL de etileno L^{-1} apresentaram maior produção de etanol e acetaldeído, e menores teores de proantocianidinas, em comparação a frutos não tratados. Os teores de sólidos solúveis, acidez titulável e a coloração da casca dos frutos não sofreram influência dos tratamentos nem dos dias de armazenamento. Este último fator influenciou apenas a perda de massa média de 7,4% no quinto dia, independente dos tratamentos. Estudos futuros com doses e tempos de exposição ao etileno exógeno são recomendados para respostas mais efetivas.

Palavras-chave: Maturação; proantocianidinas; etanol; acetaldeído; compostos fenólicos; antioxidantes, compostos nutracêuticos.

Abstract

Cambuci (*Campomanesia phaea*) is an acidic, aromatic, and astringent fruit used for juices, ice creams and liquors. The reduction of the astringency of such fruit would be commercially helpful to boost *in natura* consumption. The objective of this experiment was to study the effects of ethylene application in cambuci fruits for reducing its astringency. Different concentrations of ethylene were applied for 12 hours and fruits were stored for 5 days at 5 °C, and 90% RH. Treatments did not affect the respiration rate, endogenous ethylene production, phenolics content in the peel and pulp, antioxidant capacity, and ascorbic acid content. Compared to the untreated control, the fruits subjected to 500 µL of ethylene L^{-1} produced more ethanol and acetaldehyde, and reduced the proanthocyanidins content. Soluble solids, titratable acidity, and peel color were not altered either by doses of ethylene or days of storage. This last factor affected only the weight loss, that was 7.4% in the fifth day of storage. Further investigations of the dosage and duration of ethylene application are recommended seeking more effective responses

Keywords: Ripening; proanthocyanidins; ethanol; acetaldehyde; phenolics compounds; antioxidant, nutraceutical compounds.

3.1 Introdução

O cambucizeiro (*Campomanesia pheae*) é uma espécie nativa da Mata Atlântica pertencente à família Myrtaceae (Lorenzi et al., 2006; Tokairin et al., 2018a). Os frutos são

bagas lisas, de formato romboide, casca fina, coloração verde mesmo depois de maduros e, a princípio, classificados como frutos não climatéricos (Tokairin et al., 2018b). Na maturidade, os cambucis possuem elevada acidez e um aroma doce marcante, que o torna atrativo, além de altos teores de ácido ascórbico e compostos bioativos, em sua maioria compostos fenólicos responsáveis pela elevada capacidade antioxidante (Vallilo et al., 2005; Tokairin et al., 2018b). Devido à sua composição, o cambuci se apresenta como boa alternativa nutricional no combate a doenças associadas aos estresse oxidativo, como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, distúrbios inflamatórios, entre outros (Donado-Pestana et al., 2015; Tokairin et al., 2018a).

Os principais compostos fenólicos presentes em cambucis são os taninos (Donado-Pestana et al., 2015). Embora seja um grupo heterogêneo de polifenóis encontrados em diversas espécies vegetais e de importância para a proteção contra patógenos e herbivoria, os taninos são responsáveis pelo caráter adstringente de frutos e produtos vegetais (Dixon et al., 2004; Combs, 2016). São moléculas bioativas de alto peso molecular com capacidade de formar ligações cruzadas com proteínas e outras macromoléculas, formando polímeros tridimensionais de alto peso molecular (Chung et al., 1998; Combs, 2016). Dessa forma, são capazes de se ligar a proteínas bucais, causando assim a sensação de adstringência (Edagi; Kluge, 2009).

De acordo com a estrutura de suas moléculas, os taninos podem ser classificados como taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos) e não hidrolisáveis (taninos condensados, também chamados de taninos solúveis ou proantocianidinas) (Combs, 2016). As proantocianidinas representam cerca de 25% do conteúdo total de compostos fenólicos encontrados em cambuci (Donado-Pestana et al., 2015). O acúmulo de proantocianidinas também pode ser observado em frutos como caju (*Anacardium occidentale*) (Tezotto-Uliana et al., 2018) e algumas cultivares de caqui (*Diospyros kaki*) (Akagi et al., 2011). Esses frutos vêm sendo muito estudados quanto aos tratamentos para redução da adstringência e viabilização do consumo *in natura*, uma vez que a presença destes compostos compromete a palatabilidade (Akagi et al., 2011).

Em frutos, a adstringência conferida pelas proantocianidinas pode reduzir ao longo do amadurecimento. Essas moléculas podem ser totalmente insolubilizadas por meio de interações com componentes presentes no citosol até o ponto de maturação completo do fruto, deixando de conferir caráter adstringente, como ocorre em bananas (*Musa* spp.) (Maduwanthi; Marapana, 2017), ou ainda, podem permanecer solúveis ocasionando a adstringência, como

em algumas cultivares de caqui (Akagi et al., 2011), do caju (Emelike; Ebere, 2016) e do cambuci.

Tecnologias pós-colheita são bastante utilizadas e continuadamente experimentadas com o intuito de remover ou reduzir a adstringência em frutos (Persic et al., 2018). O princípio básico para a remoção ou redução da adstringência é a indução da síntese de acetaldeído. Esse composto é capaz de polimerizar as moléculas de taninos, tornando-as insolúveis e pouco reativas com as proteínas salivares e de mucosas, reduzindo a sensação desagradável adstringente dos frutos (Tanaka et al., 1994).

Diferentes técnicas têm sido utilizadas para redução da adstringência, como a indução do processo de amadurecimento pela exposição de frutos ao etileno exógeno (Edagi; Kluge, 2009). Esta técnica se baseia no princípio de que ao induzir o amadurecimento, o etileno induz a síntese de compostos voláteis como etanol e acetaldeído, que estão diretamente ligados ao processo de redução da adstringência dos frutos (Pesis, 2005). Estudos recentes relatam a participação de fatores de resposta ao etileno em diferentes aspectos do amadurecimento de frutos climatéricos e não climatéricos (Gao et al., 2020).

Ao longo do tempo, os procedimentos e técnicas para remoção da adstringência foram sendo validados para cultivares de caqui (Edagi et al. 2009; Amorim et al. 2020) e caju (Tezotto-Uliana et al., 2018), o que permitiu maior diversificação de usos, aceitação e desenvolvimento de mercado. Entretanto, para o cambuci são necessários ainda mais estudos a respeito das respostas a tratamentos pós-colheita a fim de reduzir a adstringência e, desta forma, impulsionar o consumo e expandir o mercado desta fruta nativa.

Nesta pesquisa, estudaram-se as respostas dos frutos de cambucizeiro ao tratamento com etileno para induzir a redução da adstringência a fim de impulsionar o consumo desses frutos.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material vegetal

Os frutos estudados foram obtidos em um pomar comercial localizado no município de Natividade da Serra – SP (23° 31’ 17’’ S e 45° 27’ 03’’ O, altitude 712 m), colhidos manualmente quando apresentavam coloração verde-amarelada, região equatorial levemente arredondada e se desprendiam facilmente quando tocados. Nesta fase, os frutos apresentavam maduros, porém antes da abscisão natural, ponto de colheita adotado pelos produtores (Tokairin, 2017). Acondicionados em caixas de papelão sem sobreposição, foram

transportados em caixas térmicas refrigeradas até o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Pós-colheita, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) em Piracicaba-SP. No laboratório, os frutos foram selecionados quanto ao tamanho e ausência de danos mecânicos ou por pragas e doenças. Foram em seguida sanitizados com StartClor® (5 g L^{-1}) por 10 min, secos sobre papel absorvente à temperatura ambiente e agrupados para constituir os tratamentos.

3.2.2 Tratamentos

Para a aplicação dos tratamentos, os frutos foram acondicionados em caixas plásticas herméticas de 54,5 L onde foram expostos a diferentes concentrações de Etil – 5 (5% de etileno). Foram utilizadas as concentrações de 0, 10, 100, 250 e 500 µL de etileno L^{-1} de atmosfera. Na tampa de cada caixa foi fixado ventilador portátil para auxiliar no processo de evaporação do etileno, ventilação e homogeneização do ar no interior da caixa. As caixas herméticas foram mantidas a 20 °C por 12 horas e, imediatamente após a sua abertura, foram ventiladas e os cambucis armazenados a 5 °C e 90% UR, por 5 dias. As avaliações foram realizadas no dia da colheita (dia -1), após a aplicação dos tratamentos (dia 0), e aos 1, 3 e 5 dias de armazenamento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 5 (5 concentrações de etileno x 5 dias de análise). Foram utilizadas 3 repetições de 5 frutos por tratamento.

3.2.3 Determinações

3.2.3.1 Atividade respiratória e produção de etileno

As determinações da atividade respiratória (produção de CO_2) e produção de etileno foram realizadas a partir de quatro frutos acondicionados individualmente em frascos de vidro herméticos de 600 mL e fechados por no mínimo uma hora para análise da atividade respiratória (CO_2), e duas horas para análise de produção de etileno. Em seguida, foram coletados 0,5 mL de gás do espaço livre dos frascos através de um septo de silicone, e injetados em um cromatógrafo a gás modelo Trace GC Ultra (Thermo Scientific, Milão, Itália), com detector de ionização de chama (FID) e coluna Porapak N, com as seguintes configurações: forno 110 °C durante 120 e 60 segundos para CO_2 e etileno, respectivamente,

injetor 150 °C, detector 180 °C, pressão 25 KPa (constante) e fluxo de N_2 de 70 mL min^{-1} (calibração com padrões de CO_2 e etileno). O hidrogênio foi usado como gás de arraste e os resultados foram expressos em mL CO_2 kg^{-1} h^{-1} e µL C_2H_4 kg^{-1} h^{-1}.

3.2.3.2 Produção de etanol e acetaldeído

Foram determinadas de acordo com Davis e Chace (1969) com as seguintes modificações: 1 g de polpa triturada foi armazenada em frasco de vidro de 15 mL e congelada a -20 °C. No momento da análise, os frascos foram colocados em banho-maria em equipamento TE-0541 (Tecnal, Piracicaba, Brasil) a 50 °C, por 30 min e, em seguida, 1,0 mL do gás do espaço livre do frasco foi coletado e injetado no cromatógrafo a gás modelo Trace GC Ultra (Thermo Scientific, Milão, Itália) com detector de ionização de chama (FID) e coluna Porapak N. Os resultados foram expressos em µg g^{-1} de polpa.

3.2.3.3 Teor de proantocianidinas

Os teores de proantocianidinas (taninos condensados) foram determinados em amostras de casca e de polpa, separadamente. Para isto, foi utilizado o método da Vanilina-HCl de Nakamura et al. (2003). Os extratos foram obtidos a partir de 25 mg de amostra de casca e polpa liofilizadas. Em tubos de ensaio, foram adicionados 1 mL de amostra (extraída com metanol P.A.), 2,5 mL de uma solução de vanilina a 1% em metanol e 2,5 mL de HCl 9 N em metanol. A mistura foi incubada por 20 min a 30 °C e as leituras da absorbância a 500 nm realizadas em espectrofotômetro modelo Libra S22 (Biochrom, Cambridge, Inglaterra). Catequina foi usada como padrão e os resultados expressos em miligrama de equivalentes de catequina (EC) por grama de massa seca de amostra (mg EC g^{-1} ms).

3.2.3.4 Teor de compostos fenólicos

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado usando o reativo de Folin-Ciocalteu conforme metodologia de Singleton e Rossi (1965), com modificações. Os extratos foram obtidos a partir de 5 mg de amostra liofilizada, adição de 10 mL de metanol 80%,

armazenados em temperatura ambiente e protegidas de luz, durante 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3.220 xg (Jouan BR4i, Paris, Franca) a 4 °C, durante 20 minutos, e o sobrenadante coletado, constituindo o extrato fenólico. Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,2 mL de extrato, 1,5 mL de água destilada e 0,1 mL de reagente Follin-Ciocalteu e, após 5 minutos, 0,2 mL de carbonato de cálcio 20%. A reação foi encubada ao abrigo da luz pelo período de 30 minutos e, em seguida foram realizadas as leituras em espectrofotômetro modelo Libra S22 (Biochrom, Cambridge, Inglaterra) a 765 nm. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de massa seca (mg EAG g^{-1} ms).

3.2.3.5 Teor de ácido ascórbico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O teor de ácido ascórbico foi determinado de acordo com Pasternak et al. (2005). As amostras (50 mg de amostra liofilizada) foram extraídas em 1,5 mL de ácido metafosfórico 3% e centrifugadas a 8.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. O extrato obtido foi filtrado em filtro politetrafluoretileno (PTFE) de 0,45 µm. Em seguida, foi adicionado ditiotreitol (DTT) para a redução do ácido dehidroascórbico. A identificação e quantificação foi realizada por CLAE, em cromatógrafo modelo Hewlett-Packard 1100 (Agilent, Waldbronn, Alemanha) em coluna Atlantis dC18 5 µm (150mm x 4,6 mm i.d., Waters, Dublin, Irlanda). A fase móvel foi constituída de solução de KCl (2 mM, pH 2,5) com fluxo de 0,8 mL min^{-1} e a detecção realizada em comprimento de onda de 254 nm. A identificação do composto foi feita a partir do tempo de retenção e perfil do espectro. Os resultados foram expressos em mg 100 g^{-1} de ácido ascórbico (base úmida).

3.2.3.6 Atividade antioxidante

Para a análise da atividade antioxidante pela redução do radical ABTS (2,2'- azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammoninum salt), foi utilizada a metodologia descrita por Re et al. (1999), onde 3 mL do radical ABTS foram adicionados à 30 µL de extrato, homogeneizados e mantidos ao abrigo da luz. Após 6 minutos cronometrados de reação, a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro modelo Libra S22

(Biochrom, Cambridge, Inglaterra) a 734 nm. Para o cálculo da porcentagem da atividade antioxidante foram realizadas leituras do branco (3 mL do radical ABTS foram adicionados à 30 µL de metanol 80%). Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de sequestro do radical ABTS, de acordo com a fórmula:

$$\%\ \boldsymbol{de\ sequestro\ do\ radical\ ABTS} = \frac{(\boldsymbol{Abs\ branco} - \boldsymbol{Abs\ amostra})\ \boldsymbol{x}\ \mathbf{100}}{\boldsymbol{Abs\ branco}}$$

3.2.3.7 Parâmetros físico-químicos

A perda de massa fresca foi determinada em balança analítica modelo AG 200 (Gehaka, São Paulo, Brasil) pela diferença em porcentagem (%), entre a massa inicial (dia -1) e a massa das amostras em cada dia de avaliação até a avaliação final (dia 5). A cor da casca (hue) foi determinada com um colorímetro modelo CR-400 (Konica Minolta, Tóquio, Japão). Quatro leituras foram realizadas em diferentes pontos dos frutos, sendo dois em cada face. O teor de sólidos solúveis foi determinado com uso de refratômetro digital modelo Palette 101 (Atago, Tóquio, Japão) e expresso em °Brix. A acidez titulável (AT) foi determinada em pHmetro digital modelo Tec-2 (Tecnal, Piracicaba, Brasil). Para a determinação da acidez titulável utilizou-se titulação potenciométrica com NaOH a 1,0 N. Os resultados foram expressos em porcentagem de ácido cítrico.

3.2.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P<0,05$), utilizando-se o software estatístico R Studio (R Core Team, 2018 - Versão 1.2.5033).

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 O tratamento com etileno não alterou o padrão respiratório e de produção de etileno dos frutos

A natureza do processo de amadurecimento e a ação do etileno sobre o amadurecimento de frutos não climatéricos como o cambuci ainda não é bem conhecida (Liu et al., 2015). Cambucis submetidos a atmosferas com diferentes concentrações de etileno demonstraram ter padrão respiratório e produção de etileno semelhantes ao tratamento controle (0 µL L^{-1}) ao longo do armazenamento a 5±1 °C (Figura 1).

Não houve diferença significativa entre os tratamentos aplicados tanto para a atividade respiratória quanto para a produção de etileno. Porém, para a atividade respiratória, houve diferença entre os dias de armazenamento, destacando o aumento da taxa respiratória logo no primeiro dia de armazenamento até o terceiro dia, quando foi observada a maior taxa de produção de CO_2 pelos frutos, atingindo média geral de 85,6 µL de CO_2 Kg^{-1} h^{-1} (Figura 1A). De acordo com a classificação proposta por Ben-Yehoshua e Weichmann (1987), os cambucis podem ser classificados como frutos com alta atividade respiratória (>30 mL CO_2 Kg^{-1} h^{-1}). Comportamento respiratório semelhante foi observado por Azevedo et al. (2016) em cambucis em ponto de maturação equivalente aos utilizados no presente estudo, sugerindo a existência de um pico climatérico.

Por outro lado, não houve diferenças entre a produção de etileno de frutos expostos aos tratamentos e ao longo dos dias de armazenamento. Embora a grande variabilidade dos dados não tenha permitido identificar diferenças entre os tratamentos avaliados, foi observada uma redução da produção de etileno logo após a aplicação dos tratamentos, seguido de aumento um dia após a exposição dos frutos ao etileno exógeno, inclusive para o tratamento controle (Figura 1 B).

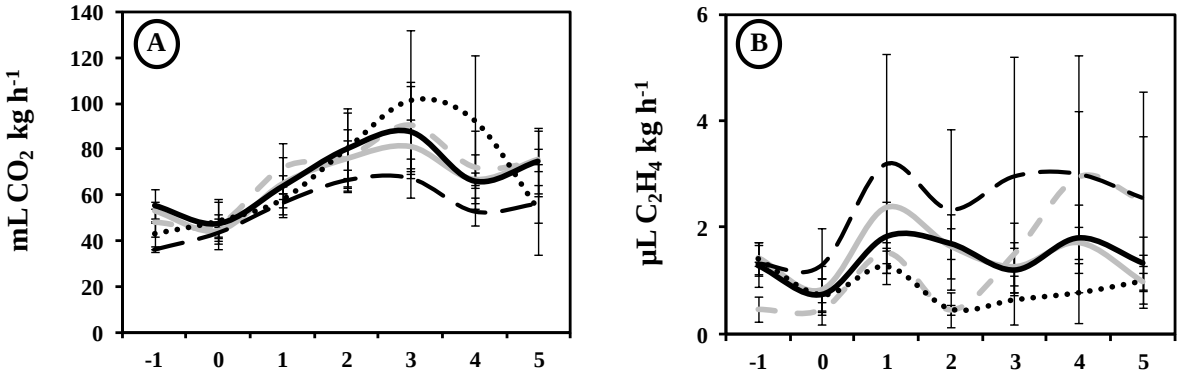

Figura 1. Atividade respiratória (A) e etileno (B) de frutos de cambucizeiro submetidos a diferentes concentrações de etileno e armazenados a 5±1 °C e 90% de UR, por 5 dias. : 0 µL L^{-1}, : 10 µL L^{-1}, : 100 µL L^{-1}, : 250 µL L^{-1}, : 500 µL L^{-1}. Barras verticais representam o erro padrão da média (n=4).

3.3.2 A produção de etanol, acetaldeído e o conteúdo de proantocianidinas foram influenciados pelas concentrações de etileno

Etanol e acetaldeído são compostos voláteis produzidos naturalmente por vegetais ao longo do amadurecimento, podendo ser encontrados em pequenas ou grandes concentrações, dependendo da espécie e das condições a que esses vegetais foram submetidos ao longo do desenvolvimento e após a colheita. Além do aroma, esses compostos estão envolvidos diretamente com processos de polimerização de taninos solúveis, reduzindo assim a adstringência de frutos (Tanaka et al., 1994; Pesis, 2005).

Os resultados aqui obtidos demonstraram o aumento na produção de etanol e acetaldeído em cambucis ao longo do armazenamento. O comportamento dos frutos foi diferente para cada tratamento, não havendo relação diretamente proporcional entre a concentração de etileno a que os frutos foram submetidos e a produção de etanol e acetaldeído. Contudo, o tratamento com 500 µL L^{-1} apresentou maior produção desses dois compostos ao final do armazenamento (Figura 2A-B). Esse resultado corrobora a redução do teor de proantocianidinas (Figura 3) ao longo do armazenamento para este mesmo tratamento, evidenciando a ação do etileno na indução da produção de etanol e acetaldeído, e consequentemente na redução da adstringência de cambucis. Frutos tratados com as demais concentrações de etileno apresentaram aumento na produção de etanol e acetaldeído até o último dia de armazenamento, porém em menores quantidades (Figura 2A-B).

O etileno controla a maioria dos eventos associados ao processo de amadurecimento de frutos (Pech et al., 1992). Embora a via de ação do etileno ainda não esteja totalmente

esclarecida, estudos relatam o aumento ou redução da atividade de diversas enzimas envolvidas em respostas a aplicação de etileno exógeno em frutos que variam para cada espécie (Chaves; Mello-Farias, 2006). Estudos recentes indicam que, em frutos não climatéricos como o cambuci, o etileno desencadeia uma rede de vias de sinalização, que influencia interações com outros hormônios vegetais e fatores de transcrição (Kou et al., 2021).

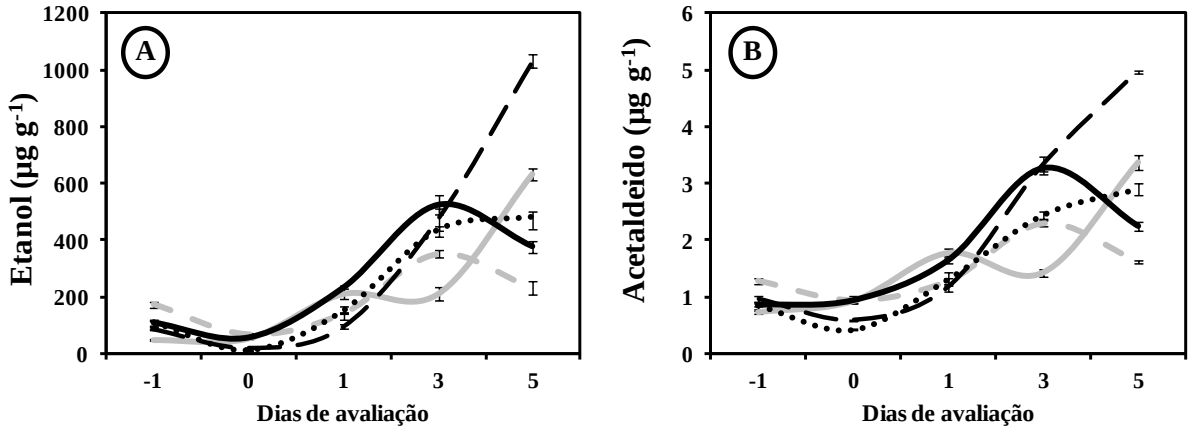

Figura 2. Teor de etanol (A) e acetaldeído (B) em polpa de frutos de cambucizeiro submetidos a diferentes concentrações de etileno e armazenados a 5±1 °C e 90% de UR, por 5 dias. : 0 µL L^{-1}, : 10 µL L^{-1}, : 100 µL L^{-1}, : 250 µL L^{-1}, : 500 µL L^{-1}. Barras verticais representam o erro padrão da média (n=4).

Os tratamentos com etileno promoveram redução do conteúdo de proantocianidinas (Figura 3). Houve tendência de decréscimo do conteúdo total de proantocianidinas até o último dia de armazenamento, tanto para casca quanto para polpa dos frutos. Os teores de proantocianidinas na casca variaram de 77,0 a 28,8 mg g^{-1}, e em polpa de 32,0 a 9,8 mg g^{-1}. Esses resultados demonstram que o teor de proantocianidinas na casca é pelo menos 2,5 vezes maior do que encontrado na polpa dos cambucis. Esta maior concentração de proantocianidinas na casca se deve ao acúmulo desses compostos nas camadas de células abaixo da epiderme, como demonstrado na figura 3 do capítulo 2.

Para amostras de casca, observou-se que os tratamentos com 500 e 100 µL L^{-1} proporcionaram ao final do experimento uma maior redução no teor de proantocianidinas, correspondente a 55% e 53% do conteúdo de proantocianidinas em relação ao conteúdo inicial, respectivamente (Figura 3A). Os demais tratamentos também apresentaram redução do teor de proantocianidinas, porém em quantidades inferiores. Para as amostras de polpa, as maiores reduções nos teores de proantocianidinas foram observadas nos tratamentos com 500 µL L^{-1} (62%), 250 µL L^{-1} (55%), e no tratamento controle (55%) (Figura 3B).

A produção de etanol e acetaldeído e a consequente redução do teor de proantocianidinas no tratamento controle (0 µL L^{-1}) pode ter ocorrido devido ao fato de os frutos terem sido submetidos às mesmas condições dos frutos tratados com as demais doses, em caixa hermética sem trocas gasosas. O CO_2 e etileno produzidos naturalmente pelos frutos (Azevedo et al., 2016) e represados na caixa hermética podem ter levado à criação de uma atmosfera com concentrações de CO_2 e etileno superiores à atmosfera normal. Modificações nas concentrações de CO_2 e/ou etileno em contato com a interface dos frutos podem estimular a produção de etanol e acetaldeído (Wild et al., 2005), como demonstrado no experimento com AMP para cambucis (Capítulo 2) e no atual trabalho.

A utilização de etileno em pós-colheita vêm sendo bastante estudada obtendo-se diferentes respostas em frutos climatéricos e não climatéricos, entre elas, a destanização (Saltveit, 1999; Gao et al., 2020). Del Bubba et al. (2009) obtiveram redução de 52 a 60% do conteúdo de taninos solúveis em cultivares de caqui aplicando tratamentos com atmosfera rica em etileno. Min et al. (2012) observaram redução de aproximadamente 60% de taninos solúveis aplicando tratamento com atmosfera de 100 µL L^{-1} em caquis.

Ao avaliar tratamentos de destanização de jambolão (*Syzygium cumini*), Severo et al. (2010) verificaram aumento no teor de acetaldeído e redução no conteúdo de taninos solúveis com a aplicação de 100 µL L^{-1}, confirmando a ação do etileno neste fruto não climatérico, assim como o cambuci.

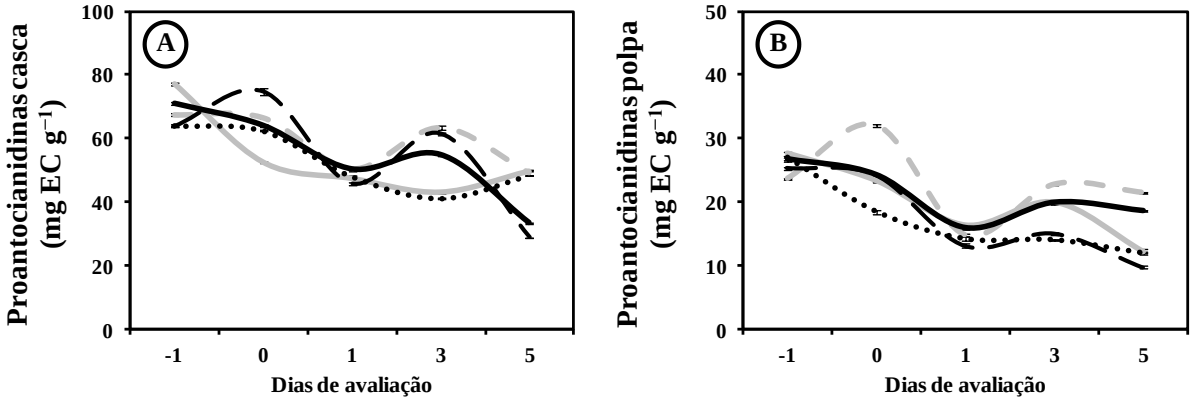

Figura 3. Teor de proantocianidinas em casca (A) e polpa (B) de frutos de cambucizeiro submetidos a diferentes concentrações de etileno e armazenados a 5±1 °C e 90% de UR, por 5 dias. : 0 µL L^{-1}, : 10 µL L^{-1}, : 100 µL L^{-1}, : 250 µL L^{-1}, : 500 µL L^{-1}. Barras verticais representam o erro padrão da média (n=4).

3.3.3 O etileno aplicado não alterou o conteúdo de compostos fenólicos totais, ácido ascórbico, capacidade antioxidante e aspectos físico-químicos

Verificou-se que o maior conteúdo de compostos fenólicos totais em cambucis encontra-se na casca dos frutos, com média de 50,7 mg EAG g^{-1} ms, em comparação à polpa, com média de 35,7 mg EAG g^{-1} ms. A alta correlação entre teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante das frutas demonstrado por Kevers et al. (2007) evidencia o papel desta classe de metabólitos no sequestro de radicais livres. Os dados observados no presente estudo corroboram essa informação, já que a maior capacidade de redução do radical ABTS foi observada na casca dos frutos (9,9%), onde estão presentes os maiores teores de compostos fenólicos em relação a amostras de polpa (6,2%) (Tabela 1). O teor de compostos fenólicos apresentou respostas variadas ao longo do armazenamento, ocorrendo estabilidade ou aumento no conteúdo desses compostos após cinco dias de armazenamento (Tabela 1). Os compostos fenólicos são os produtos do metabolismo secundário mais abundante das plantas, sendo considerados necessários para a sobrevivência das plantas no meio ambiente (Cheynier et al., 2013). Apesar das proantocianidinas serem os principais fenólicos em cambuci, a redução de seus teores com a aplicação dos tratamentos não implicou na redução de compostos fenólicos totais, uma vez que as proantocianidinas passaram por um processo de polimerização de suas moléculas, ficando em sua forma insolúvel, não sendo mais detectada como proantocianidina, embora continuem compondo os teores de compostos fenólicos totais (Persic et al., 2018).

Mesmo não sendo considerado um fruto climatérico, algumas alterações como o aumento ou manutenção dos teores de compostos fenólicos e de ácido ascórbico possivelmente se devem ao fato de os frutos terem sido colhidos em estádio de maturação intermediário, o que corresponde a frutos ainda na matriz, apresentando coloração verde-amarelada e região equatorial levemente arredondada, ponto determinado por Tokairin (2017), atingindo maiores teores desses compostos ao longo do armazenamento, quando completamente maduros. Estudos realizados por De Paula (2017) com pedúnculos de caju mostraram aumento nos teores de ácido ascórbico durante os primeiros dias de armazenamento, decaindo nos dias seguintes. A redução do ácido ascórbico está relacionada ao aumento da atividade da enzima ascorbato oxidase, que apresenta atividade na parede celular, local de maior acúmulo deste ácido (Figueiredo et al. 2007; Moura et al. 2010). À medida que a maturação progride, aumenta a degradação da parede celular culminando em redução do teor de ácido ascórbico. Este fato não foi observado neste experimento com frutos

de cambucizeiro, nos quais ocorreram poucas mudanças em relação à maturação como mudança de cor, teor de sólidos solúveis e acidez (Tabela 2), o que indica baixa atividade da enzima ascorbato oxidase e pouca degradação do ácido ascórbico. Kevers et al. (2007) relatam uma relativa estabilidade do teor de ácido ascórbico ao longo do armazenamento para a maioria das espécies de frutas, legumes e verduras. Independentemente do dia de armazenamento, a dose de 500 µL L^{-1} promoveu aumento nos teores de ácido ascórbico em comparação com frutos não tratados com etileno.

Tabela 1. Conteúdo de compostos fenólicos em casca e polpa, teor de ácido ascórbico e capacidade antioxidante em casca e polpa de frutos de cambucizeiro submetidos a diferentes concentrações de etileno e armazenados a 5±1 °C e 90% de UR, por 5 dias.

Concentrações de etileno	**Dias de avaliação**				
	-1	**0**	**1**	**3**	**5**
Compostos fenólicos (mg g^{-1}) - Casca					
0 µL L^{-1}	48,5 aC	50,5 bBC	38,4 bD	64,3 Aa	55,6 bB
10 µL L^{-1}	48,5 aC	62,5 aA	53,1 aBC	55,5 bB	62,1 aA
100 µL L^{-1}	48,5 aB	47,7 bB	55,2 aA	48,1 cB	48,9 cB
250 µL L^{-1}	48,5 aB	29,1 cD	41,8 bC	56,9 bA	41,8 dC
500 µL L^{-1}	48,5 aB	48,7 bB	50,9 aB	51,4 bcB	61,9 aA
Compostos fenólicos (mg g^{-1}) - Polpa					
0 µL L^{-1}	34,9 aC	47,4 aA	35,0 bC	38,6 aB	34,9 bC
10 µL L^{-1}	34,9 aBC	35,7 cdBC	34,7 bC	37,9 aAB	39,2 aA
100 µL L^{-1}	34,9 aA	37,1 bcA	35,0 bA	35,9 aA	29,6 cB
250 µL L^{-1}	34,9 aA	33,8 dAB	31,9 bAB	31,3 bB	31,4 cB
500 µL L^{-1}	34,9 aC	39,0 bB	45,5 aA	29,0 bD	35,0 bC
Ácido ascórbico (mg 100 g^{-1})					
0 µL L^{-1}	43,4 aB	47,3 cB	43,6 cB	-	52,8 bA
10 µL L^{-1}	43,4 aC	51,1 bcB	57,3 aA	-	35,1 dD
100 µL L^{-1}	43,4 aBC	39,4 dC	47,9 bcAB	-	51,3 bA
250 µL L^{-1}	43,4 aC	59,2 aA	53,1 abB	-	40,7 cC
500 µL L^{-1}	43,4 aC	53,7 bB	51,3 bB	-	88,7 aA
ABTS (% redução) - Casca					
0 µL L^{-1}	10,7 aB	12,4 aA	5,3 dC	9,3 aB	9,7 cB
10 µL L^{-1}	10,7 aB	12,4 aA	7,1 bcC	9,4 aB	10,6 bcB
100 µL L^{-1}	10,7 aB	13,1 aA	8,3 bC	8,1 aC	12,4 aA
250 µL L^{-1}	10,7 aB	12,6 aA	13,6 aA	8,6 aC	9,5 cBC
500 µL L^{-1}	10,7 aA	5,1 bC	6,4 cdC	8,9 aB	11,7 abA
ABTS (% redução) - Polpa					
0 µL L^{-1}	5,5 aBC	7,7 aA	4,9 cC	6,8 bcAB	5,0 bC
10 µL L^{-1}	5,5 aC	5,5 cC	6,5 abBC	8,5 aA	7,1 aAB
100 µL L^{-1}	5,5 aB	7,3 abA	5,5 bcB	8,2 abA	5,3 bB
250 µL L^{-1}	5,5 aA	5,3 cA	6,2 bcA	6,3 cA	6,1 abA
500 µL L^{-1}	5,5 aBC	6,1 bcB	7,7 aA	4,3 dC	5,9 abB

Letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

As doses de etileno aplicadas não influenciaram a perda de massa dos frutos (Tabela 2). Os maiores valores de redução da massa (7,8%) foram observados no quinto dia de armazenamento, não havendo diferença entre frutos tratados e não tratados. A perda de água tem grande impacto na qualidade e deterioração dos frutos, podendo causar alteração de textura, cor, turgescência, firmeza, sabor e valores nutricionais (Nunes; Emond, 2007). Além das perdas de qualidade, a diminuição de peso pode impactar em perdas econômicas quando o fruto é comercializado por peso. Estudos indicam que perdas de massa de 3 a 10% podem inviabilizar a comercialização de diversas culturas hortícolas (Robinson et al., 1975), indicando a necessidade do uso de técnicas pós-colheita que reduzam a perda de massa de cambucis.

A cor da casca dos cambucis não foi afetada pelas concentrações de etileno aplicadas, embora a maior dose tenha apresentado menores valores do ângulo hue em comparação com frutos não tratados (Tabela 2). Os valores encontrados para este parâmetro variaram de 100,4 a 106,3, característicos da coloração verde e de acordo com os descritos na literatura para cambuci (Silva et al., 2012). Os menores valores para o ângulo de cor (hue) foram observados em frutos tratados com a maior concentração de etileno, indicando que a matiz, embora verde, apresentou leves tons de amarelados (Lancaster; Lister, 1997). A diferença da cor da casca para este tratamento indica uma possível resposta à aplicação do etileno na maturação dos frutos.

Em frutos com comportamento climatérico, o etileno atua sobre aspectos do amadurecimento a nível transcricional através de fatores de resposta do etileno (FREs), que regulam genes relacionados ao amadurecimento como mudança de cor, firmeza, aroma, sabor e vida útil pós-colheita (Liu et al., 2015). Em frutos não climatéricos, os FREs parecem modular diferentes mecanismos de regulação do amadurecimento. Apesar dos mecanismos de ação do etileno ainda não serem bem esclarecidos, sabe-se que ele desencadeia uma rede de vias de sinalização, que influencia interações com outros hormônios vegetais e fatores de transcrição (Kou et al., 2021).

Tabela 2. Perda de massa e cor da casca de frutos de cambucizeiro submetidos a diferentes concentrações de etileno e armazenados a 5±1 °C e 90% de UR, por 5 dias.

Concentrações de etileno	**Dias de avaliação**					
	-1	**0**	**1**	**3**	**5**	
	Perda de massa					**Média**
0 µL L^{-1}	0,0	0,4	1,9	4,3	7,2	2,8 a
10 µL L^{-1}	0,0	0,3	2,0	4,7	7,8	3,0 a
100 µL L^{-1}	0,0	0,3	1,9	4,5	7,5	2,8 a
250 µL L^{-1}	0,0	0,4	1,9	4,5	7,2	2,8 a
500 µL L^{-1}	0,0	0,3	1,8	4,5	7,1	2,7 a
Média	0,0 D	0,3 D	1,9 C	4,5 B	7,4 A	
	Cor da casca (Hue)					**Média**
0 µL L^{-1}	101,8	105,1	106,3	104,9	101,1	103,9 a
10 µL L^{-1}	100,4	104,4	103,2	102,8	101,3	102,4 ab
100 µL L^{-1}	102,9	104,0	103,5	102,2	100,7	102,7 ab
250 µL L^{-1}	103,1	104,9	104,2	102,2	101,2	103,1 ab
500 µL L^{-1}	102,0	103,4	102,6	102,0	100,4	102,1 b
Média	102,0 BC	104,4 A	103,9 A	102,8 AB	100,9 C	

Letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Os teores de sólidos solúveis dos frutos variaram de 10,7 a 12,1 °Brix, não sendo possível estabelecer uma relação explícita com os tratamentos aplicados (Tabela 3). Os valores não demonstraram tendência de aumento ou decréscimo ao longo do armazenamento. Desta forma, é possível inferir que a aplicação de etileno não altera os teores de sólidos solúveis de cambucis. O teor de sólidos solúveis é uma característica de alta herdabilidade genética para diversas frutíferas (Einhardt, 2017; Kultur et al., 2001). A variação não relacionada aos tratamentos nem aos dias de armazenamento pode ser explicada pela variabilidade genética dos frutos, que são provenientes de cambucizeiros de pé franco (plantas provenientes de sementes), o que garante recombinação genética dos parentais, gerando indivíduos geneticamente diferentes, expressando características distintas que podem incluir o teor de sólidos solúveis nos frutos (Einhardt, 2017; Kultur et al., 2001).

Os tratamentos com etileno não alteraram a acidez titulável dos cambucis, que apresentaram valores entre 3,8 e 4,5% de ácido cítrico. Estes valores estão de acordo com os observados por Azevedo et al. (2016) com frutos coletados em quatro localidades brasileiras, que apresentaram valores médios entre 2,2 e 4,2%. A acidez dos cambucis se manteve com poucas modificações ao longo do armazenamento (Tabela 3).

Tabela 3. Teor de sólidos solúveis e acidez titulável de frutos de cambucizeiro submetidos a diferentes concentrações de etileno e armazenados a 5±1 °C e 90% de UR, por 5 dias.

Concentrações de etileno	**Dias de avaliação**				
	-1	**0**	**1**	**3**	**5**
			Sólidos solúveis (°Brix)		
0 µL L^{-1}	11,4 aC	11,9 bA	11,2 cC	11,3 bC	11,6 bB
10 µL L^{-1}	11,4 aB	11,1 dC	11,4 bcB	11,7 aA	11,2 cC
100 µL L^{-1}	11,4 aB	11,0 dC	11,8 aA	11,8 aA	10,7 dD
250 µL L^{-1}	11,5 aC	12,1 aA	11,7 aB	11,2 bD	11,7 bB
500 µL L^{-1}	11,3 aD	11,3 cD	11,5 bC	11,8 aB	12,1 aA
			Acidez titulável (%)		
0 µL L^{-1}	4,0 aC	4,1 bB	4,0 dC	4,3 aA	3,8 eD
10 µL L^{-1}	4,0 aC	4,1 bB	4,1 cB	3,9 cD	4,4 bA
100 µL L^{-1}	4,0 aC	4,1 bB	4,2 bB	4,0 bC	4,5 aA
250 µL L^{-1}	4,0 aC	4,2 aB	4,4 aA	3,9 bcC	4,3 cB
500 µL L^{-1}	3,9 aB	3,8 cC	4,2 bcA	3,9 bcB	4,0 dB

Letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

3.4 Conclusão

A aplicação de etileno na concentração de 500 µL L^{-1} por 12 horas estimula a produção de etanol e acetaldeído pelos frutos e reduz os teores de proantocianidinas da casca e polpa de frutos de cambucizeiro.

A aplicação de etileno nas concentrações de 10 a 500 µL L^{-1} por 12 horas não altera substancialmente as características físico-químicas de frutos de cambucizeiro. Além disso, compostos fenólicos totais, ácido ascórbico e atividade antioxidante se mantém em níveis elevados.

Estes resultados indicam o potencial de aplicação do etileno exógeno em frutos de cambucizeiro.

Referências

Akagi, T., Katayama-Ikegami, A., & Yonemori, K. (2011). Proanthocyanidin biosynthesis of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit. *Scientia Horticulturae*, *130*(2), 373-380.

Amorim, C., Alves Filho, E. G., Rodrigues, T. H. S., Bender, R. J., Canuto, K. M., Garruti, D. S., & Antoniolli, L. R. (2020). Volatile compounds associated to the loss of astringency in 'Rama Forte' persimmon fruit. *Food Research International*, *136*, 109570.

Azevedo, M. C. S., Silva, R. R. E., Jacomino, A. P., & Genovese, M. I. (2016). Physicochemical variability of cambuci fruit (*Campomanesia phaea*) from the same orchard, from different locations and at different ripening stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *97*(2), 526-535.

Ben-Yehoshua, S., & Weichmann, J. (1987). Postharvest physiology of vegetables.

Chaves, A. L. S., & Mello-Farias, P. C. D. (2006). Ethylene and fruit ripening: from illumination gas to the control of gene expression, more than a century of discoveries. *Genetics and Molecular Biology*, *29*, 508-515.

Cheynier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., & Martens, S. (2013). Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, *72*, 1-20.

Chung, K. T., Wong, T. Y., Wei, C. I., Huang, Y. W., & Lin, Y. (1998). Tannins and human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *38*(6), 421-464.

Combs, C. A. (Ed.). (2016). *Tannins: biochemistry, food sources and nutritional properties*. Nova Science Publishers.

Davis, P. L., & Chace, W. G. (1969). Determination of alcohol in citrus juice by gas chromatographic analysis of headspace. *HortScience*.

De Paula, J. T. D. (2017). *Métodos de conservação pós-colheita de pedúnculos de caju* (Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo).

Del Bubba, M., Giordani, E., Pippucci, L., Cincinelli, A., Checchini, L., & Galvan, P. (2009). Changes in tannins, ascorbic acid and sugar content in astringent persimmons during on-tree growth and ripening and in response to different postharvest treatments. *Journal of Food Composition and Analysis*, *22*(7-8), 668-677.

Dixon, R. A., Xie, D. Y., & Sharma, S. B. (2005). Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research?. *New Phytologist*, *165*(1), 9-28.

Donado-Pestana, C. M., Belchior, T., Festuccia, W. T., & Genovese, M. I. (2015). Phenolic compounds from cambuci (*Campomanesia phaea* O. Berg) fruit attenuate glucose intolerance and adipose tissue inflammation induced by a high-fat, high-sucrose diet. *Food Research International*, *69*, 170-178.

Edagi, F. K., & Kluge, R. A. (2009). Remoção de adstringência de caqui: um enfoque bioquímico, fisiológico e tecnológico. *Ciência Rural*, *39*, 585-594.

Edagi, F. K., Sestari, I., Terra, F. A. M., Chiou, D. G., Kluge, R. A., & Antoniolli, L. R. (2009). Effect of ripening stage on astringency removal of 'Rama Forte' persimmon. *Acta Horticulturae*, *833*, 269-274.

Einhardt, P. M. (2017). *Herdabilidade da massa e do teor de sólidos solúveis de amora-preta (Rubus sp.) e conservação pós-colheita* (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pelotas).

Emelike, N. J. T., & Ebere, C. O. (2016). Effect of treatments on the tannin content and quality assessment of cashew apple juice and the kernel. *European Journal of Food Science and Technology*, *4*(3), 25-36.

Figueiredo, R. W., Lajolo, F. M., Alves, R. E., Figueiras, H. A. C., Maia, G. A., & de Sousa, P. H. M. (2007). Quality of cashew pseudofruits treated with calcium at postharvest and stored under refrigeration. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 42*(4), 475-482.

Gao, J., Zhang, Y., Li, Z., & Liu, M. (2020). Role of ethylene response factors (ERFs) in fruit ripening. *Food Quality and Safety*, *4*(1), 15-20.

Kevers, C., Falkowski, M., Tabart, J., Defraigne, J. O., Dommes, J., & Pincemail, J. (2007). Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(21), 8596-8603.

Kou, X., Feng, Y., Yuan, S., Zhao, X., Wu, C., Wang, C., & Xue, Z. (2021). Different regulatory mechanisms of plant hormones in the ripening of climacteric and non-climacteric fruits: a review. *Plant Molecular Biology*, 1-21.

Kultur, F., Harrison, H. C., & Staub, J. E. (2001). Spacing and genotype affect fruit sugar concentration, yield, and fruit size of muskmelon. *HortScience*, *36*(2), 274-278.

Lancaster, J. E., Lister, C. E., Reay, P. F., & Triggs, C. M. (1997). Influence of pigment composition on skin color in a wide range of fruit and vegetables. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *122*(4), 594-598.

Liu, M., Pirrello, J., Chervin, C., Roustan, J. P., & Bouzayen, M. (2015). Ethylene control of fruit ripening: revisiting the complex network of transcriptional regulation. *Plant Physiology*, *169*(4), 2380-2390.

Lorenzi, H. (2006). Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas (De Consumo *In Natura*). *Nova Odessa: Plantarum*.

Maduwanthi, S. D. T., & Marapana, R. A. U. J. (2017). Biochemical changes during ripening of banana: A review. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 2(5), 166-169.

Min, T., Yin, X. R., Shi, Y. N., Luo, Z. R., Yao, Y. C., Grierson, D., Ferguson, I. B., & Chen, K. S. (2012). Ethylene-responsive transcription factors interact with promoters of ADH and PDC involved in persimmon (*Diospyros kaki*) fruit de-astringency. *Journal of Experimental Botany*, *63*(18), 6393-6405.

Moura, C. F. H., Figueiredo, R. W. D., Alves, R. E., Silva, E. D. O., Araújo, P. G. L. D., & Maciel, V. T. (2010). Increasing shelf life of early dwarf cashew tree peduncle through reduction of storage temperature. *Ciência e Agrotecnologia*, *34*(1), 140-145.

Nakamura, Y., Tsuji, S., & Tonogai, Y. (2003). Analysis of proanthocyanidins in grape seed extracts, health foods and grape seed oils. *Journal of Health Science*, *49*(1), 45-54.

Nunes, C. N., & Emond, J. P. (2007). Relationship between weight loss and visual quality of fruits and vegetables. In *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* (Vol. 120, pp. 235-245).

Pasternak, T., Potters, G., Caubergs, R., & Jansen, M. A. (2005). Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *Journal of Experimental Botany*, *56*(418), 1991-2001.

Pech, J. C., Latché, A., & Balagué, C. (Eds.). (1992). *Cellular and Molecular Aspects of the Plant Hormone Ethylene* (Vol. 16). Springer Science & Business Media.

Persic, M., Jakopic, J., & Hudina, M. (2019). The effect of post-harvest technologies on selected metabolites in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*(2), 854-860.

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

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*(9-10), 1231-1237.

Robinson, J. E., Browne, K. M., & Burton, W. G. (1975). Storage characteristics of some vegetables and soft fruits. *Annals of Applied Biology*, *81*(3), 399-408.

Saltveit, M. E. (1999). Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, *15*(3), 279-292.

Severo, J., Santos, R. S. D., Casaril, J., Tiecher, A., Silva, J. A., & Rombaldi, C. V. (2010). Destanização e conservação de frutos de jambolão. *Ciência Rural*, *40*, 976-982.

Silva, I. G., Correia, A. D. F. K., Bigaran, J. T., Baptista, C. P., Do Carmo, L. F., & Spoto, M. H. F. (2012). Estudo de caracterização do fruto cambuci [*Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum] e sua aplicação no processamento de geleia. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, *30*(1).

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144-158.

Tanaka, T., Takahashi, R., Kouno, I., & Nonaka, G. I. (1994). Chemical evidence for the de-astringency (insolubilization of tannins) of persimmon fruit. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (20), 3013-3022.

Tezotto-Uliana, J. V., de Paula, J. T., Tessmer, M. A., & Kluge, R. A. (2018). Ethanol vapor is efficient for reduction of astringency compounds in cashew apple. *Postharvest Biology and Technology*, *145*, 117-124.

Tokairin, T. D. O. (2017). *Caracterização e conservação pós-colheita de cambuci, fruto nativo da Mata Atlântica* (Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo).

Tokairin, T. D. O., Neto, H. B., & Jacomino, A. P. (2018a). Cambuci — *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum. In *Exotic Fruits* (pp. 91-95). Academic Press.

Tokairin, T. D. O., Silva, A. P. G. D., Spricigo, P. C., Alencar, S. M. D., & Jacomino, A. P. (2018b). Cambuci: a native fruit from the Brazilian Atlantic Forest showed nutraceutical characteristics. *Revista Brasileira de Fruticultura*, *40*.

Vallilo, M. I., Garbelotti, M. L., Oliveira, E. D., & Lamardo, L. C. A. (2005). Características físicas e químicas dos frutos do cambucizeiro (*Campomanesia phaea*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, *27*, 241-244.

Wild, H. P., Balk, P. A., Fernandes, E. C., & Peppelenbos, H. W. (2005). The action site of carbon dioxide in relation to inhibition of ethylene production in tomato fruit. *Postharvest biology and technology*, *36*(3), 273-280.

4. TRATAMENTO COM VAPOR DE ETANOL EM PÓS-COLHEITA REDUZ A ADSTRINGÊNCIA DE FRUTOS DE CAMBUCIZEIRO

Resumo

De aroma e sabor agradáveis, os frutos do cambucizeiro geralmente são consumidos de forma processada em sucos, sorvetes, geleias e bebidas alcoólicas, mas pouco consumidos *in natura* devido à persistente adstringência, mesmo após a completa maturação. Essa característica é consequência dos altos teores de proantocianidinas que são passíveis à polimerização através de tratamentos pós-colheita com vapor de etanol, visando à redução da adstringência. O objetivo do trabalho foi avaliar a efetividade do método de destanização com vapor de etanol pra frutos de cambucizeiro, avaliando-se aspectos físico-químicos e bioquímicos da casca e polpa. Para este estudo, foram realizados dois experimentos, sendo o primeiro com 4 doses (0,0; 3,5; 7,0 e 14,0 mL de etanol por kg de fruta) e 12 horas de exposição. O segundo experimento foi realizado com doses menores e dois tempos de exposição, sendo 0,0; 1,5; 3,0; 6,0 mL de etanol por kg de fruta, por 12 e 24 horas de exposição. Os tratamentos com vapor de etanol reduziram o conteúdo de proantocianidinas de cambucis. A dose de 14,0 mL kg^{-1} proporcionou a maior redução do teor de proantocianidinas dos frutos, porém ocasionou maior perda de massa, frutos mais ácidos e com danos na casca. Utilizando doses menores de etanol observou-se que o tratamento com 6,0 mL kg^{-1} por 12 horas de exposição promoveu redução do conteúdo de compostos fenólicos, atividade antioxidante e ácido ascórbico, mas foi mais eficiente na redução de proantocianidinas na casca e polpa de cambucis sem causar danos aos frutos.

Palavras-chave: *Campomanesia phaea*; destanização; adstringência; proantocianidinas; acetaldeído; vida útil; compostos fenólicos; ácido ascórbico.

Abstract

Fruits of cambuci have a good aroma and flavor. They are usually processed into juices, ice creams, jams, or liquors, but rarely consumed fresh due to their astringency, persistent even after complete ripening. This characteristic is largely a consequence of the high levels of proanthocyanidins. This compound is, however, able to be polymerized with postharvest treatments of the ethanol vapor thus reducing the astringency. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of ethanol vapor method for cambuci astringency removal and its implications in physical, chemical, and biochemical parameters of the peel and pulp of the fruits. Two stages were set up, the first with 4 doses (0.0; 3.5; 7.0, and 14.0 mL of ethanol kg^{-1} of fruit) subjected to 12 hours of ethanol vapor exposure. In the second stage, lower doses of ethanol were used (0.0; 1.5; 3.0; 6.0 mL kg^{-1}) for 12 and 24 hours of exposure. The ethanol vapor treatments diminished the proanthocyanidins content of the fruits. The higher reduction was observed with 14.0 mL kg^{-1}, but it caused a higher loss of fruit weight, peel bruises and more acidic pulp. The dose of 6.0 mL kg^{-1} of ethanol for 12 hours resulted in the reduction of phenolic compounds, antioxidant activity, ascorbic acid, but was more effective in the reduction of proanthocyanidins in the peel and pulp, without any bruising.

Keywords: *Campomanesia phaea*; astringency; proanthocyanidins; acetaldehyde; shelf life; phenolic compounds; ascorbic acid.

4.1 Introdução

O cambuci (*Campomanesia phaea*) é um fruto pertencente à família Myrtaceae. Possui coloração verde da casca após atingir a completa maturação, formato romboide, aroma doce característico da espécie, elevada acidez e adstringência. A adstringência dos cambucis é conferido pelo alto teor de taninos condensados nestes frutos (Azevedo et al., 2016).

Taninos condensados, também chamados de proantocianidinas, são moléculas complexas formadas pela polimerização de duas a 50 unidades de catequinas (flavan-3-ol), leucoantocianidinas (flavan-3,4-diol), ou uma combinação entre essas duas moléculas (Chung et al. 1998). As proantocianidinas são os polifenóis mais abundantes em cambuci (Donado-Pestana et al., 2015), ocorrendo em diferentes estádios de maturação, permanecendo em elevado teor mesmo após a completa maturação dos frutos (Azevedo et al., 2016).

Os taninos possuem alta capacidade de ligação com proteínas e macromoléculas, particularidade que caracteriza as principais propriedades adversas dos taninos, tanto a nível sensorial causada pela adstringência, quanto agindo antinutricionalmente pela interação com proteínas alimentares ou mesmo enzimas endógenas (Combs, 2016). Esses compostos são encontrados em frutas como o caju, caqui, banana, pitanga, uva, pêssego, maçã, pera, e bebidas como o vinho, cidra, chá e cerveja (Deshpand et al., 1986; Chung et al., 1998; Manach et al., 2004). A remoção da adstringência em frutos é feita por meio da indução da produção de acetaldeído de forma artificial (Matsuo; Itoo, 1982). Esse composto é capaz de polimerizar as moléculas de taninos, tornando-as insolúveis e pouco reativas com as proteínas bucais, diminuindo assim a adstringência dos alimentos (Edagi et al., 2009; Edagi; Kluge, 2009). O acetaldeído é um composto volátil formado naturalmente por frutos no processo de maturação (Pesis, 2005) e sua produção pode ser estimulada artificialmente por diferentes processos como a utilização de vapor de etanol. Uma vez absorvido pelos frutos, o etanol é transformado em acetaldeído pela enzima álcool desidrogenase, que possui a função de equilibrar os teores de etanol e acetaldeído nas células (Edagi et al., 2009; Edagi; Kluge, 2009).

Devido à elevada adstringência e alta perecibilidade, os frutos de cambucizeiro não são comumente apreciados *in natura*, mas geralmente encontrados congelados ou na forma processada em sucos, sorvetes e bebidas alcoólicas (Azevedo et al., 2016; Spricigo et al.,

2021). Nesta investigação avaliou-se o vapor de etanol como método de destanização e seus efeitos sobre aspectos físico-químicos e bioquímicos de cambucis durante o armazenamento.

4.2 Material e Métodos

O presente estudo foi realizado em duas etapas. Na primeira, avaliou-se o método de destanização com vapor de etanol para frutos de cambucizeiro utilizando-se altas doses. Na segunda etapa, foram avaliadas doses menores de etanol com base nos resultados da primeira.

4.2.1 Material vegetal

Frutos de cambucizeiro foram obtidos em um pomar comercial localizado no município de Natividade da Serra – SP (23° 31’ 17’’ S e 45° 27’ 03’’ O, altitude 712 m), colhidos com cor verde-amarelada, com a região equatorial levemente arredondada e que se desprendiam facilmente. Posteriormente, foram acondicionados em caixas de papelão sem sobreposição e transportados em caixas térmicas refrigeradas até o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Pós-colheita, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) em Piracicaba-SP. Frutos sadios, íntegros e sem danos por pragas e doenças foram então selecionados por tamanho e sanitizados com ácido tricloroisocianúrico (3,00% p/p) (5 g L^{-1} de StartClor®) por 10 min e à temperatura ambiente.

4.2.2 Tratamentos

Os frutos foram acondicionados em caixas plásticas herméticas de 54,5 L com placas de Petri abertas no fundo de cada caixa contendo quantidades específicas de etanol (99,9%) (Figura 1). Para o primeiro experimento, foram utilizadas as doses de 0,00 (controle); 3,50; 7,00 e 14,00 mL kg^{-1} de cambuci, o que corresponde às concentrações de 0,0; 0,064; 0,128 e 0,256 mL L^{-1}, respectivamente. Para o segundo experimento foram utilizadas doses menores de etanol e dois períodos de exposição aos tratamentos: 0,00 (controle); 1,5; 3,0; e 6,0 mL kg^{-1} de frutos, correspondendo às concentrações de 0,0; 0,027; 0,055; e 0,110 mL L^{-1}, respectivamente, por 12 ou 24 horas de exposição ao etanol.

Na tampa de cada caixa foi fixado um ventilador portátil para auxiliar no processo de evaporação do etanol e homogeneização do ar no interior da caixa. As caixas herméticas foram mantidas em condições ambientais (25 °C e 60% UR) por 12 ou 24 horas.

Imediatamente após a abertura das caixas, os cambucis foram acondicionados em bandejas de polietileno tereftalato (PET) e envolvidos por filme esticável de policloreto de vinila (PVC) de 15 µm a fim de se reduzir a perda de massa dos frutos. Em seguida, procedeu-se com o armazenamento a 5 °C e 90% UR, por 12 dias.

Figura 1. Método de aplicação dos tratamentos com vapor de etanol em cambucis. A: placa de petri no interior da caixa; B: caixa hermética com ventilador interno.

No primeiro experimento, as avaliações foram realizadas no dia 0 - dia da colheita, logo após a aplicação dos tratamentos (dia 1), e aos 4, 8 e 12 dias de armazenamento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 5 (doses de etanol x dias de análise). Foram utilizadas 4 repetições de 4 frutos por tratamento.

O segundo experimento foi avaliado aos 0, 1, 3, 6, 9 e 12 dias após a exposição ao vapor de etanol. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 6 (doses de etanol x dias de análise). Foram utilizadas 4 repetições de 4 frutos por tratamento. Para comparar os tempos de exposição aos tratamentos, os dados do 12º dia de armazenamento foram analisados em esquema fatorial 4 x 2 (doses de etanol x tempo de exposição).

4.2.3 Determinações

4.2.3.1 Teor de proantocianidinas

O teor de proantocianidinas (taninos condensados) na polpa e na casca dos frutos foi determinado pelo método Vanilina-HCl, de acordo com Nakamura et al. (2003). Em tubos de ensaio, foram adicionados 1 mL de amostra (extraída com metanol P.A.), 2,5 mL de uma

solução de vanilina a 1% em metanol e 2,5 mL de HCl 9 N em metanol. A mistura foi incubada por 20 min a 30 °C e a absorbância a 500 nm determinada em espectrofotômetro modelo Libra S22 (Biochrom, Cambridge, Inglaterra). Catequina foi usada como padrão, e o resultado foi expresso em miligramas de Equivalentes de Catequina (EC) por grama de massa seca de amostra (mg EC g^{-1} ms).

4.2.3.2 Produção de etanol e acetaldeído

Foram determinadas de acordo com Davis e Chace Jr. (1969) com as seguintes modificações: 1 g de polpa triturada foi armazenada em frasco de vidro de 15 mL e congelada a -20 °C. No momento da análise, os frascos foram colocados em banho-maria TE-0541 (Tecnal, Piracicaba, Brasil) a 50 °C, por 30 min e, em seguida, 0,5 mL do gás do espaço livre do frasco foi coletado e injetado no cromatógrafo a gás modelo Trace GC Ultra (Thermo Scientific, Milão, Itália), com detector de ionização de chama (FID) e coluna Porapak N, sendo os resultados expressos em µg g^{-1} de polpa.

4.2.3.3 Atividade respiratória e produção de etileno

As determinações da atividade respiratória (produção de CO_2) e produção de etileno foram realizadas com quatro frutos colocados individualmente em frascos de vidro de 600 mL e fechados por uma hora para análise do CO_2, e duas horas para análise de etileno. Em seguida, 0,5 mL de gás do espaço livre dos frascos foram coletados através de um septo de silicone, e injetados em um cromatógrafo a gás modelo Trace GC Ultra (Thermo Scientific, Milão, Itália), com detector de ionização de chama (FID) e coluna Porapak N, conforme as seguintes especificações: forno 110 °C durante 120 e 60 segundos para CO_2 e etileno, respectivamente, injetor 150 °C, detector 180 °C, pressão 25 KPa (constante) e fluxo de N_2 de 70 mL min^{-1} (calibração com padrões de CO_2 e etileno). Hidrogênio foi usado como gás de arraste e os resultados foram expressos em mL CO_2 kg^{-1} h^{-1} e µL C_2H_4 kg^{-1} h^{-1}.

4.2.3.4 Teor de compostos fenólicos

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado usando o reativo de Folin-Ciocalteu, conforme metodologia de Singleton e Rossi (1965), com modificações. Os extratos foram obtidos a partir de 5 mg de amostra liofilizada, com adição de 10 mL de metanol 80%, e armazenados em temperatura ambiente, protegidas de luz, durante 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (Jouan BR4i, Paris, France), a 3220 xg, à temperatura de 4 °C, durante 20 minutos, e o sobrenadante coletado, constituindo o extrato fenólico. Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,2 mL de extrato, 1,5 mL de água destilada e 0,1 mL de reagente Follin-Ciocalteu e, após 5 minutos, 0,2 mL de carbonato de cálcio 20%. A reação foi encubada ao abrigo da luz por 30 minutos e, em seguida, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro modelo Libra S22 (Biochrom, Cambridge, Inglaterra) a 765 nm. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (padrão) por grama de massa seca (mg EAG g^{-1} ms).

4.2.3.5 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pelo método ABTS a partir dos extratos obtidos para análise do teor de compostos fenólicos totais. Para esta análise foi utilizada a metodologia descrita por Re et al. (1999), na qual 3 mL do radical ABTS foram adicionados à 30 µL de extrato, homogeneizados e mantidos ao abrigo de luz. Após 6 minutos cronometrados de reação, a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro modelo Libra S22 (Biochrom, Cambridge, Inglaterra) a 734 nm. Para o cálculo da porcentagem da atividade antioxidante foram realizadas leituras do branco com 3 mL do radical ABTS adicionados à 30 µL de metanol 80%. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de sequestro do radical ABTS, pela fórmula:

$$\%\ \boldsymbol{de\ sequestro\ do\ radical\ ABTS} = \frac{(\boldsymbol{Abs\ branco} - \boldsymbol{Abs\ amostra})\ \boldsymbol{x}\ \mathbf{100}}{\boldsymbol{Abs\ branco}}$$

4.2.3.6 Teor de ácido ascórbico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O teor de ácido ascórbico foi determinado de acordo com Pasternak et al. (2005) onde amostras liofilizadas de 50 mg foram extraídas em 1,5 mL de ácido metafosfórico 3% e centrífugadas a 8.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Ao extrato filtrado em filtro PTFE de 0,45 µm foi adicionado ditiotreitol (DTT) para a redução do ácido dehidroascórbico. A identificação e quantificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) modelo Hewlett-Packard 1100 (Agilent, Waldbronn, Alemanha) em coluna Atlantis dC18 5 µm (150mm x 4,6 mm i.d., Waters, Dublin, Irlanda). A fase móvel foi constituída de solução de KCl (2 mM, pH 2,5) com fluxo de 0,8 mL min^{-1} e a detecção realizada em comprimento de onda de 254 nm. A identificação do composto foi feita a partir do tempo de retenção e perfil do espectro. Os resultados em base úmida foram expressos em mg 100 g^{-1} de ácido ascórbico.

4.2.3.7 Parâmetros físico-químicos

A cor da casca foi determinada com um colorímetro modelo CR-400 (Konica Minolta, Tóquio, Japão). Quatro leituras foram realizadas em diferentes pontos dos frutos, sendo dois em cada face. A partir dos parâmetros L*a*b* obtidos, foi determinada a cromaticidade pela fórmula: C* = $\sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$. O teor de sólidos solúveis foi determinado com uso de refratômetro digital modelo Palette 101 (Atago, Tóquio, Japão), sendo realizadas duas leituras por repetição. Os resultados foram expressos em ºBrix. O pH e a acidez tituável (AT) foram determinados em pHmetro digital modelo Tec-2 (Tecnal, Piracicaba, Brasil). Para a determinação da AT utilizou-se titulação potenciométrica com NaOH a 1,0 N. Os resultados foram expressos em porcentagem de ácido cítrico. A perda de massa fresca foi determinada em balança analítica pela diferença em porcentagem, entre a massa inicial (dia 0) e a massa final (dia 12) das repetições avaliadas para cada tratamento.

4.2.4 Análise estatística

Realizaram-se as análises de variância (ANOVA) com auxílio do software estatístico R Studio (R Core Team, 2018 - Versão 1.2.5033) sendo as médias comparadas pelo teste de

Tukey (*P*<0,05). Relações entre doses e respectivos efeitos foram testadas pela correlação de Pearson.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Experimento I

4.3.1.1 O vapor de etanol induz o acúmulo de acetaldeído e reduz o teor de proantocianidinas em frutos de cambucizeiro

Os tratamentos com vapor de etanol influenciaram nos teores de proantocianidinas da casca e da polpa de frutos de cambucizeiro (Figura 2A e B). Houve redução no conteúdo de proantocianidinas para todos os tratamentos avaliados ao longo do armazenamento. Frutos sem aplicação de vapor de etanol (0,0 mL kg^{-1}) reduziram em 10,6% os teores de proantocianidinas da casca no 12º dia de armazenamento. As reduções observadas para as doses de 3,5, 7,0 e 14,0 mL kg^{-1} foram de 61,5%, 81,7% e 88,5%, respectivamente (Figura 2A). O mesmo ocorreu para a polpa dos frutos, onde a menor redução da proantocianidinas foi observada em frutos sem a aplicação de vapor de etanol (47,7%), e as maiores reduções observadas em frutos tratados (57,7%, 76,4%, 76,1%), respectivamente às doses crescentes de etanol (Figura 2B).

Embora pequena, a redução do teor de proantocianidinas em casca e polpa dos frutos não tratados pode ter ocorrido devido ao fato de os frutos terem sido submetidos a ambiente hermético sem trocas gasosas, o que pode ter desencadeando alterações bioquímicas devido à alteração da atmosfera no interior da caixa hermética, à semelhança do que ocorreu com frutos submetidos a ambiente hermético conforme discutido no capítulo 3 desta tese.

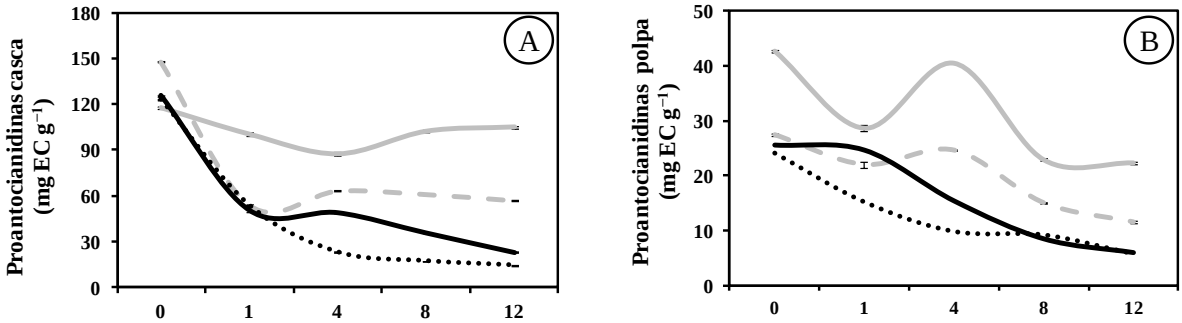

Figura 2. Proantocianidinas da casca (A) e da polpa (B) de cambucis tratados com diferentes doses de etanol (mL de etanol por kg de fruto) e armazenadas a 5±1 °C e 90% de UR, por 12 dias. ▬: 0,0 mL kg^{-1}, ▬ ▬ : 3,5 mL kg^{-1}, ▬▬: 7,0 mL kg^{-1}, • • • • •: 14,0 mL kg^{-1}. Barras verticais representam o erro padrão da média (n=4).

A correlação de Pearson entre as doses de etanol aplicadas e os teores de proantocianidinas na casca, polpa e produção de acetaldeído no 12º dia de armazenamento foram, respectivamente, -0,89, -0,84 e 0,99, indicando forte correlação negativa entre doses de etanol e teor de proantocianidinas na casca e polpa, e forte correlação positiva entre as doses de etanol e a produção de acetaldeído nos frutos. A produção endógena de acetaldeído teve resposta linear e crescente, diretamente proporcional às doses de etanol testadas (Figura 3C). Contudo, essa relação linear observada para o acetaldeído endógeno não foi diretamente proporcional à redução dos teores de proantocianidinas de casca e polpa dos frutos (Figura 3A e B), o que significa que o teor de proantocianidinas não reduz proporcionalmente à adição de etanol.

Ao final do armazenamento, a aplicação dos tratamentos proporcionou a redução de 45,9%, 79,0% e 86,5% do teor de proantocianidinas em frutos tratados com 3,5, 7,0 e 14,0 mL kg^{-1}, respectivamente, em relação ao tratamento controle. Esses resultados demonstram que ocorreram maiores reduções do teor de proantocianidinas entre as menores doses, enquanto que de 7,0 para 14,0 mL de etanol kg^{-1} (aumento de 100% da dose) a redução das proantocianidinas foi de apenas 7,5 pontos percentuais.

Além disso, os dados indicam pouco ou nenhum incremento na redução de proantocianidinas da polpa de cambucis em doses acima de 6 mL de etanol kg^{-1} de fruto (Figura 3B). Estes resultados indicam uma resposta peculiar do cambuci em relação à destanização quando comparado ao comportamento de cajus que, tratados com doses de 1,75 a 14,0 mL de etanol kg^{-1} de fruto, reduziram as concentrações das proantocianidinas conforme o aumento das doses (Tezotto-Uliana et al., 2018).

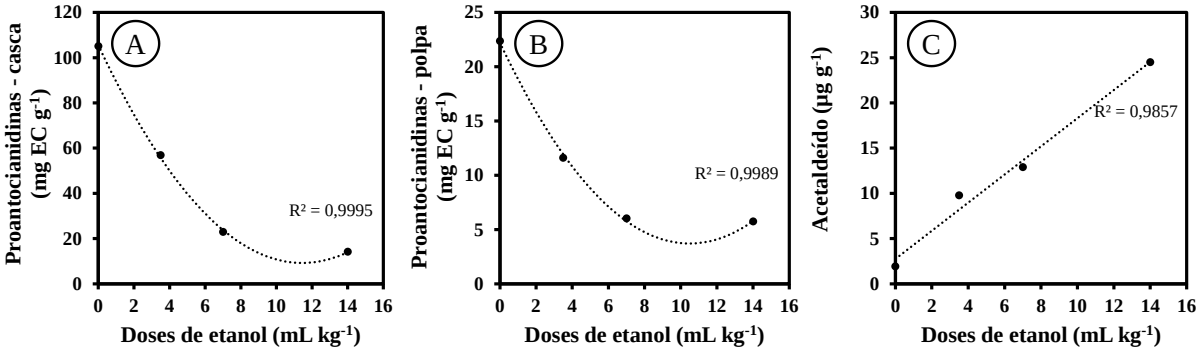

Figura 3. Efeito das doses de etanol sobre as variáveis resposta proantocianidinas em casca (A) e polpa (B) e produção de acetaldeído (C) em frutos de cambucizeiros.

Ao submeter os frutos em uma atmosfera rica em vapor de etanol, este é absorvido pelo fruto através da superfície da casca. Quanto maior a concentração de etanol na atmosfera ao redor dos frutos, maior é a proporção de absorção e o aumento da concentração de etanol intracelular (Edagi; Kluge, 2009). Essa resposta foi observada para os cambucis tratados com vapor de etanol neste estudo. A produção de etanol endógena dos frutos teve um pico acentuado logo após a aplicação dos tratamentos em frutos tratados com etanol exógeno e se manteve estável durante o período de armazenamento, diferentemente dos frutos sem tratamento, que apresentaram um aumento na produção de etanol a partir do 4º até o 8º dia de armazenamento, se mantendo até o final do experimento (Figura 4A).

As duas maiores doses de etanol aplicadas corresponderam às duas maiores taxas de produção de etanol e acetaldeído pelos frutos (Figura 4). Para a produção de etanol, frutos tratados com a menor dose não diferiram de frutos sem tratamento nos últimos dias de armazenamento. Estes resultados estão de acordo com os encontrados na literatura para o caju, pseudofruto nativo com alto teor de proantocianidinas, em que tratamentos com aplicação de vapor de etanol estimularam a produção endógena de etanol e acetaldeído proporcional às doses, com consequente redução da adstringência de frutos (Tezotto-Uliana et al., 2018).

Altas concentrações de etanol no interior das células induzem a ação da enzima álcool desidrogenase, que atua na conversão do excesso de etanol em acetaldeído, promovendo o equilíbrio desses compostos nas células (Edagi; Kluge, 2009). Além de ser um composto volátil natural que compõe o aroma de frutos, o acetaldeído possui propriedades de polimerização das proantocianidinas, tornando-as compostos insolúveis, portanto não adstringentes (Amorim et al. 2020).

Em estudos com frutos de cajueiro (*Anacardium occidentale*) submetidos a diferentes doses de etanol, Tezotto-Uliana et al. (2018) observaram um grande acúmulo de etanol e acetaldeído nos frutos proporcionalmente aos tratamentos aplicados. Cajus tratados com altas doses de etanol (7,0 e 14,0 mL kg^{-1}) apresentaram produções de etanol até duas vezes maiores que os cambucis no presente estudo. Alta concentração de etanol em cajus resultou em fermentação, elevada perda de massa, redução da firmeza e descoloração dos pseudofrutos. Os autores indicam a dose de 3,5 mL kg^{-1} para reduzir os teores de compostos de adstringência sem causar danos à qualidade dos frutos.

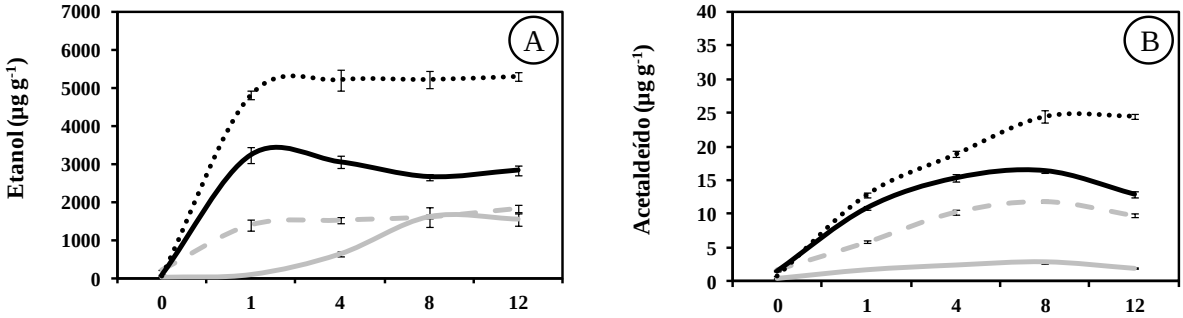

Figura 4. Produção de etanol (A) e acetaldeído (B) de cambucis tratados com diferentes doses de etanol (mL de etanol por kg de fruto), por 12 horas e armazenados a 5±1 °C e 90% de UR, por 12 dias. ▬: 0,0 mL kg^{-1}, ▬ : 3,5 mL kg^{-1}, ▬: 7,0 mL kg^{-1}, •••••: 14,0 mL kg^{-1}. Barras verticais representam o erro padrão da média (n=4).

Os cambucis produzem etanol e acetaldeído naturalmente ao longo do amadurecimento (Spricigo et al., 2021), o que foi verificado no presente estudo para o tratamento controle (Figura 4). Porém, essas concentrações não foram suficientes para reduzir os teores de proantocianidinas a níveis consideráveis (Figura 2). Com a aplicação exógena de etanol, observou-se o aumento dos teores de etanol e acetaldeído endógenos sem causar odor alcoólico, característico do processo fermentativo. Tezotto-Uliana et al. (2018) citam que produções de etanol endógeno acima de 6000 µg g^{-1} são indicativos de fermentação em frutos de cajueiro. No presente estudo, mesmo as maiores doses de etanol aplicadas em cambuci não desencadearam produção endógena desse composto acima do limite prejudicial verificado por Tezotto-Uliana et al. (2018).

4.3.1.2 Influência do vapor de etanol na taxa respiratória e produção de etileno exógeno de cambucis

As taxas respiratórias dos frutos submetidos às diferentes concentrações de vapor de etanol foram similares entre si, havendo um acentuado decréscimo da taxa respiratória logo após a aplicação dos tratamentos. As taxas médias de produção de CO_2 foram de 32,2 mL de CO_2 kg^{-1} h^{-1}, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos até o final do período de armazenamento (Figura 5A).

A produção de etileno foi influenciada pela aplicação de vapor de etanol. Frutos do tratamento controle, sem aplicação de etanol, mantiveram o padrão de produção de etileno com média de 0,9 µL de C_2H_4 kg^{-1} h^{-1}, diferindo dos demais tratamentos. Esses resultados estão compatíveis aos padrões de produção de etileno da espécie de acordo com Azevedo et al. (2016) para frutos no mesmo estádio de maturação aos utilizados neste trabalho. Observou-se uma acentuada redução da produção de etileno endógeno em frutos que receberam os tratamentos com vapor de etanol, permanecendo em valores próximos de zero até o final do armazenamento (Figura 5B). A maior dose de etanol (14,0 mL kg^{-1}) promoveu redução da produção de etileno, apresentando 0,0 µL de C_2H_4 kg^{-1} h^{-1} logo após a aplicação do tratamento. A redução da produção de etileno nos frutos submetidos à dose de 7,0 mL kg^{-1} foi gradual, ocorrendo desde a aplicação até o quarto dia de armazenamento, quando atingiu média de 0,05 µL de C_2H_4 kg^{-1} h^{-1}. O tratamento com 3,5 mL kg^{-1} reduziu a produção de etileno em níveis intermediários, com média de 0,44 de C_2H_4 kg^{-1} h^{-1}, não diferindo dos demais tratamentos.

Estudos pós-colheita relatam o efeito de tratamentos com vapor de etanol para inibir a ação do etileno e retardar a decomposição de diversos vegetais (Asoda et al., 2009; Liu et al., 2012; Jin et al., 2013; França et al., 2018). As altas concentrações de etanol e acetaldeído endógenas observadas no presente trabalho e induzidas pelos tratamentos com vapor de etanol podem ter desempenhado um papel fundamental de retardar a senescência, reduzir a produção de etileno, evitar lesão por frio, além de agir como agente polimerizante de taninos (Pesis, 2005). A inibição da produção de etileno pela ação de vapor de etanol também foi observada em melões (Liu et al., 2012; Jin et al., 2013) e bananas (França et al., 2018).

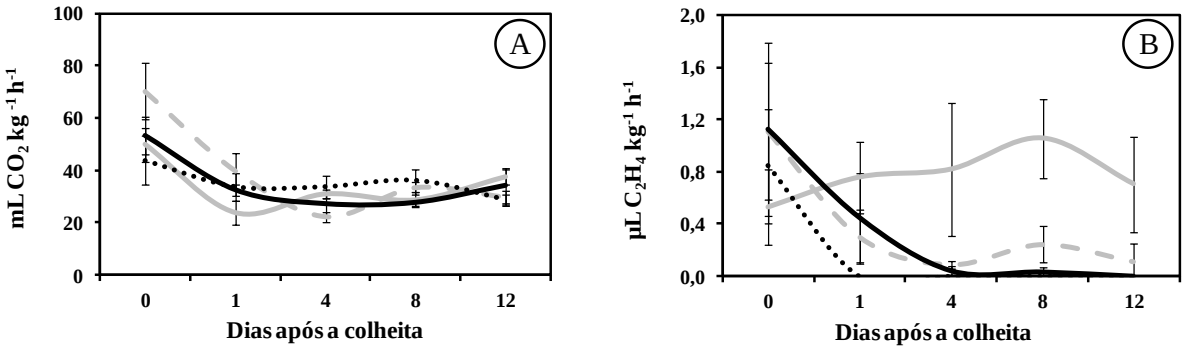

Figura 5. Produção de CO_2 (A) e etileno (B) de cambucis tratados com diferentes doses de etanol (mL de etanol por kg de fruto), por 12 horas e armazenados a 5±1 °C e 90% de UR, por 12 dias. ▬▬: 0,0 mL kg^{-1}, ▬ ▬: 3,5 mL kg^{-1}, ▬▬: 7,0 mL kg^{-1}, •••••: 14,0 mL kg^{-1}. Barras verticais representam o erro padrão da média (n=4).

4.3.1.3 O vapor de etanol influenciou o conteúdo de compostos fenólicos totais e na capacidade antioxidante dos frutos

Os maiores teores de compostos fenólicos de cambucis foram observados nas cascas dos frutos (Tabela 1). Os tratamentos com vapor de etanol promoveram a redução do conteúdo de compostos fenólicos ao longo do armazenamento. Ao final do armazenamento, o conteúdo na casca de cambucis tratados com 3,5, 7,0 e 14,0 mL kg^{-1} tiveram reduções de 62,0%, 60,5% e 78,2% em relação ao tratamento controle, respectivamente. O conteúdo de fenólicos em polpa foi bastante variável, não apresentando uma relação direta com os tratamentos aplicados (Tabela 1).

A redução do conteúdo fenólico dos cambucis tratados com vapor de etanol durante o armazenamento refrigerado possivelmente ocorreu devido à degradação desses compostos decorrente da atividade enzimática de peroxidases, polifenoloxidases e catalases induzidas após o processo de colheita, transporte, manuseio e o estresse causado pelos tratamentos aplicados (Azevedo et al., 2016).

A capacidade antioxidante dos frutos de cambucizeiro variou ao longo dos dias de armazenamento. Para a casca dos frutos, órgão que é a interface de contato direto com os tratamentos aplicados, a atividade antioxidante foi reduzida conforme o aumento nas doses de etanol aplicadas.

Tabela 1. Conteúdo de compostos fenólicos e capacidade antioxidante em casca e polpa de cambucis tratados com diferentes concentrações de vapor de etanol (mL de etanol por kg de fruto), por 12 horas e armazenados a 5±1 °C e 90% de UR, por 12 dias.

Doses de etanol	**Dias após a colheita**				
	0	**1**	**4**	**8**	**12**
	Compostos fenólicos (mg A.G. g^{-1}) - casca				
0,0 mL kg^{-1}	90,7 aB	75,6 cC	140,7 aA	69,3 dD	141,9 aA
3,5 mL kg^{-1}	90,7 aC	56,3 dD	111,6 bA	95,9 bB	53,0 bD
7,0 mL kg^{-1}	90,7 aB	81,5 bC	97,0 cA	82,9 cC	56,1 bD
14,0 mL kg^{-1}	90,7 aB	88,8 aB	39,7 dC	136,4 aA	31,0 cD
	Compostos fenólicos (mg A.G. g^{-1}) - polpa				
0,0 mL kg^{-1}	53,2 aB	46,4 cC	52,0 bB	79,2 aA	53,7 bB
3,5 mL kg^{-1}	53,2 aC	67,1 aB	81,7 aA	36,2 bD	25,7 cE
7,0 mL kg^{-1}	53,2 aC	60,5 bB	48,5 cD	27,3 dE	115,9 aA
14,0 mL kg^{-1}	53,2 aA	43,1 dB	55,1 bA	32,9 cC	56,3 bA
	ABTS (% redução) - casca				
0,0 mL kg^{-1}	16,6 aC	14,5 bD	25,0 aB	15,1 cD	26,8 aA
3,5 mL kg^{-1}	16,6 aB	11,7 cC	20,4 bA	17,2 bB	10,3 bD
7,0 mL kg^{-1}	16,6 aB	16,0 aB	19,5 bA	14,6 cC	10,8 bD
14,0 mL kg^{-1}	16,6 aB	16,3 aB	10,3 cC	25,9 aA	7,4 cD
	ABTS (% redução) - polpa				
0,0 mL kg^{-1}	11,7 aB	11,1 cB	8,2 bcC	16,2 aA	9,9 bBC
3,5 mL kg^{-1}	11,7 aA	13,5 abA	11,4 aA	6,0 bB	5,2 cB
7,0 mL kg^{-1}	11,7 aB	11,8 bcB	6,9 cC	5,5 bC	21,7 aA
14,0 mL kg^{-1}	11,7 aB	14,1 aA	9,5 abB	6,9 bC	10,9 bB

Letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

4.3.1.4 Influência do vapor de etanol na perda de massa e aspectos físico-químicos de cambucis

A perda de massa ao final do armazenamento foi maior em frutos tratados com 14,0 mL kg^{-1} (3,5%) em comparação a aqueles que não receberam o vapor de etanol (2,5%) (Tabela 2). A perda de massa ocorre pela perda de água dos frutos, que está intimamente ligada ao processo de senescência (Nunes; Emond, 2007), indicando um processo de senescência mais acelerado em frutos submetidos às maiores doses de etanol. A perda de massa observada para frutos submetidos às maiores doses de vapor de etanol estão acima do limite inferior descrito por Robinson et al. (1975), podendo inviabilizar a comercialização.

A acidez dos frutos observados neste experimento variou de 2,71 a 3,45% de ácido cítrico e estão de acordo com valores de acidez de cambucis observados por Azevedo et al.

(2016). Os frutos não tratados e os que receberam as menores doses de etanol tiveram um pico de acidez logo após a abertura das caixas, ao passo que frutos submetidos às duas maiores doses de etanol tiveram seus picos no 8º e 4º dia do armazenamento, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Perda de massa fresca, acidez titulável, sólidos solúveis e teor de ácido ascórbico de cambucis tratados com diferentes concentrações de vapor de etanol (mL de etanol por kg de fruto), por 12 horas e armazenados a 5±1 °C e 90% de UR, por 12 dias.

Doses de etanol	**Dias após a colheita**				
	0	**1**	**4**	**8**	**12**
			Perda de massa (%)		
0,0 mL kg^{-1}	0,0 aC	0,0 aC	0,4 aC	1,6 bB	2,5 bA
3,5 mL kg^{-1}	0,0 aC	0,0 aC	0,5 aC	1,9 abB	3,0 abA
7,0 mL kg^{-1}	0,0 aC	0,0 aC	0,5 aC	1,9 abB	3,0 bA
14,0 mL kg^{-1}	0,0 aD	0,0 aD	0,9 aC	2,3 aB	3,5 aA
			Acidez titulável (% ácido cítrico)		
0,0 mL kg^{-1}	2,93 cD	3,34 bA	3,26 bB	2,84 cE	3,11 cC
3,5 mL kg^{-1}	2,95 cB	3,45 aA	2,85 cC	2,71 dD	2,84 dC
7,0 mL kg^{-1}	3,22 bC	3,15 cC	2,78 cD	3,85 aA	3,32 aB
14,0 mL kg^{-1}	3,36 aB	3,13 cD	3,45 aA	2,98 bE	3,25 bC
			Sólidos solúveis (°Brix)		
0,0 mL kg^{-1}	9,2 dD	9,3 cC	9,9 dB	10,2 cA	9,4 dC
3,5 mL kg^{-1}	10,2 cB	9,7 bC	10,1 cB	10,4 bA	9,6 cD
7,0 mL kg^{-1}	10,6 bA	10,1 aC	10,6 aA	10,2 cB	10,2 bB
14,0 mL kg^{-1}	11,4 aA	10,1 aE	10,5 aD	10,7 aC	11,3 aB
			Ácido ascórbico (mg 100 g^{-1})		
0,0 mL kg^{-1}	95,5 aA	65,0 cB	93,3 aA	-	65,4 aB
3,5 mL kg^{-1}	95,5 aA	63,1 cB	58,5 cB	-	52,6 bcB
7,0 mL kg^{-1}	95,5 aA	92,2 aA	63,6 cB	-	43,9 cC
14,0 mL kg^{-1}	95,5 aA	76,6 bB	79,0 bB	-	59,6 abC

Letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

Os cambucis submetidos à maior dose de vapor de etanol apresentaram maior teor de sólidos solúveis em todos os dias de armazenamento, em comparação aos frutos não tratados. Frutos tratados com vapor de etanol apresentaram decaimento dos teores de ácido ascórbico, independente da dose aplicada, ao passo que frutos não tratados variaram ao longo dos dias de armazenamento (Tabela 2). Essa redução ocorre devido à ação da enzima ascorbato oxidase,

que atua oxidando o ácido ascórbico na parede celular quando o tecido está sob estresse e sob senescência (Figueiredo et al. 2007; Moura et al. 2010; Dalal et al., 2020).

Os frutos de cambucizeiros submetidos às diferentes doses de etanol apresentaram ângulo Hue entre 100,5 a 105,9, o que corresponde a matiz verde, coloração típica da casca desses frutos. Não foram observadas diferenças entre as doses aplicadas até o 8º dia de armazenamento, sendo que, no 12º dia, a maior dose de etanol reduziu o valor do ângulo hue em comparação ao tratamento controle. Esta redução corresponde a uma mudança na matiz da casca dos frutos, se tornando mais amarelada para frutos tratados com 14,0 mL kg^{-1}. Em concordância com este resultado, a cromaticidade também foi menor nos frutos submetidos à maior dose de etanol (Tabela 3). A cromaticidade é um parâmetro que indica a intensidade da cor (Lancaster; Lister, 1997). A alteração da matiz e cromaticidade da casca dos frutos são parâmetros indicativos de transformações físico-químicas que ocorrem no amadurecimento ou degradação dos frutos (Lancaster; Lister, 1997), o que sugere que cambucis são afetados pela aplicação de altas doses de etanol.

Tabela 3. Ângulo Hue e cromaticidade de cambucis tratados com diferentes concentrações de vapor de etanol (mL de etanol por kg de fruto), por 12 horas e armazenados a 5±1 °C e 90% de UR, por 12 dias.

Doses de etanol	**Dias após a colheita**				
	0	**1**	**4**	**8**	**12**
			Hue (°)		
0,0 mL kg^{-1}	104,8 aA	104,7 aA	105,9 aA	103,4 aA	103,9 aA
3,5 mL kg^{-1}	103,4 aB	106,8 aA	105,2 aAB	103,8 aB	103,6 aB
7,0 mL kg^{-1}	104,1 aAB	105,9 aA	103,9 aAB	104,6 aA	101,7 abB
14,0 mL kg^{-1}	103,1 aBC	106,2 aA	104,6 aAB	102,5 aBC	100,5 bC
			Cromaticidade		
0,0 mL kg^{-1}	37,0 aA	34,6 aA	35,4 aA	39,2 aA	35,6 aA
3,5 mL kg^{-1}	36,9 aA	31,6 aB	33,8 aAB	37,8 abA	36,5 aA
7,0 mL kg^{-1}	34,6 aA	32,8 aA	33,8 aA	34,1 bcA	32,5 abA
14,0 mL kg^{-1}	38,1 aA	32,9 aB	33,5 aB	30,2 cB	31,2 bB

Letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

Respostas à aplicação de etanol dependem de diversos fatores como a fisiologia da espécie, cultivar e maturidade do fruto, além da dosagem e duração da exposição ao etanol. O tempo de exposição e a sensibilidade da espécie ao etanol são fatores que podem afetar

respostas de estresse oxidativo e causar danos às células (Pesis 2005), levando ao escurecimento (Jin et al. 2013) e desenvolvimento de mudanças de sabor no órgão da planta (Plotto et al. 2003). No presente estudo, frutos tratados com a dose mais alta (14,0 mL kg^{-1}) apresentaram depressões e manchas escuras na casca, indicando que a dose mais alta aplicada causa danos oxidativos na casca de cambucis, sendo necessários mais estudos sobre doses e tempos de exposição dos frutos ao etanol (Figura 6).

Figura 6. Frutos de cambucizeiro com danos na casca após tratamento com 14,0 mL de etanol kg^{-1} de fruto.

4.3.2 Experimento II

4.3.2.1 Subdoses de etanol tiveram efeito sob a redução do conteúdo de proantocianidinas de cambucis

Os teores de proantocianidinas na casca e polpa de cambucis foram influenciados pelos tratamentos com vapor de etanol (Figura 7A-D). As maiores doses de vapor de etanol apresentaram os menores teores de proantocianidinas em cascas e polpas, e em ambos os tempos de exposição. Ao final do período de armazenamento (12º dia), frutos não tratados apresentaram redução de 2,7% e 23,4% do teor de proantocianidinas da casca após 12 e 24 horas de exposição, respectivamente. Doses de 1,5, 3,0, e 6,0 mL kg^{-1} promoveram reduções de 45,0%, 49,6% e 67,3% nos teores de proantocianidinas da casca após 12 horas de exposição aos tratamentos, e 41,9%, 39,3% e 46,0% após 24 horas de exposição (Figura 7A e B).

Na polpa dos frutos, a exposição por 12 horas promoveu as maiores reduções dos teores de proantocianidinas, chegando a valores próximos de zero em frutos tratados com as duas maiores doses de vapor de etanol. As reduções foram de 56,3%, 53,1%, 98,2% e 92,0 %, respectiva às doses crescentes de vapor de etanol (Figura 7C). Para os tratamentos com 24

horas de exposição, observamos que um maior conteúdo de proantocianidinas persistiu ao final do armazenamento (Figura 7D).

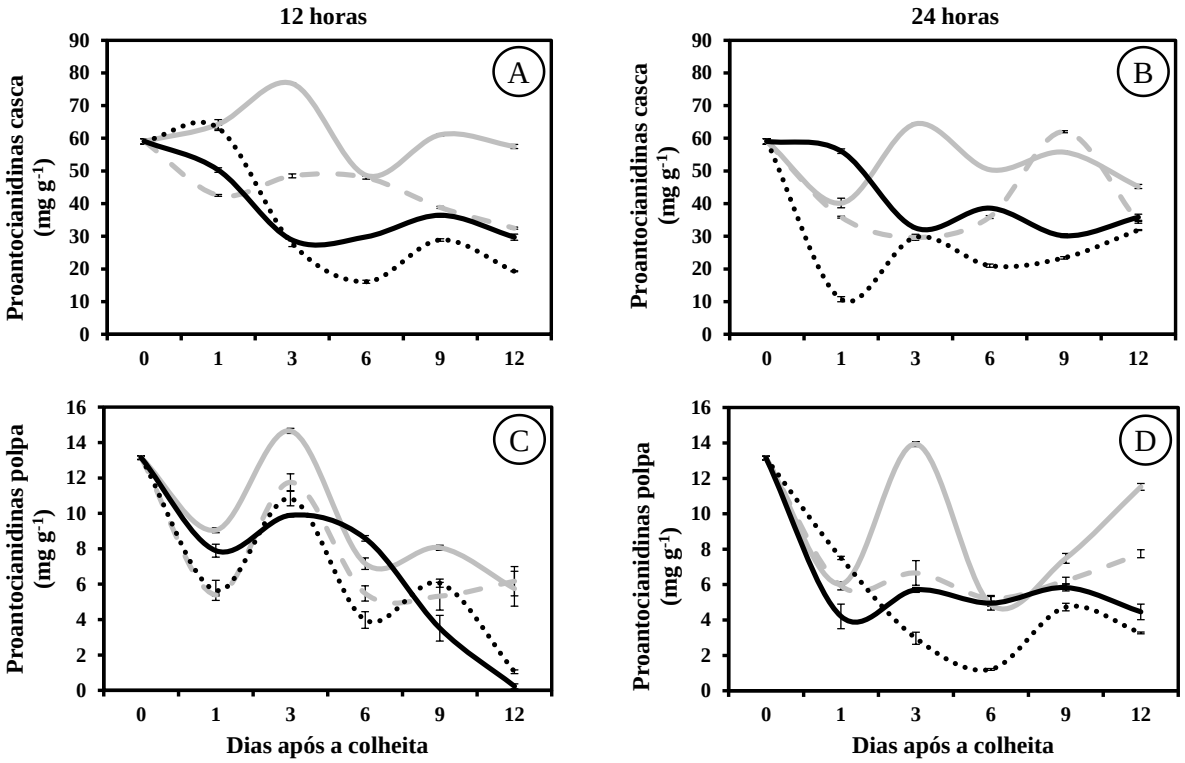

Figura 7. Proantocianidinas da casca (A e B) e da polpa (C e D) de cambucis tratados com diferentes doses de etanol (mL de etanol por kg de fruto) por 12 horas (A e C) e 24 horas (B e D) e armazenados a 5±1 °C e 90% de UR, por 12 dias. ▬: 0,0 mL kg^{-1}, ▭: 1,5 mL kg^{-1}, ▬: 3,0 mL kg^{-1}, •••••: 6,0 mL kg^{-1}. Barras verticais representam o erro padrão da média (n=4).

A absorção do vapor de etanol da atmosfera promoveu o aumento do conteúdo de etanol e acetaldeído endógenos. O acetaldeído atua diretamente na polimerização de moléculas de proantocianidinas, transformando-as em moléculas insolúveis e com menor capacidade de reação com as proteínas salivares (Edagi; Kluge, 2009). O aumento dos teores de etanol e acetaldeído endógenos foram observados neste experimento para ambos os tempos de exposições aos tratamentos (Figura 8A-D). O teor de acetaldeído foi maior quanto maior a dose de etanol aplicada, sendo que os valores obtidos para frutos expostos aos tratamentos por 12 horas foram maiores que os frutos tratados 24 horas. De acordo com os resultados obtidos, o teor de etanol, acetaldeído e o conteúdo de proantocianidinas foram mais influenciados pelas diferentes doses de etanol aplicadas do que pelos tempos de exposição desses tratamentos. Contudo, 12 horas de exposição parece ser o suficiente para obter as repostas bioquímicas de interesse nesse estudo.

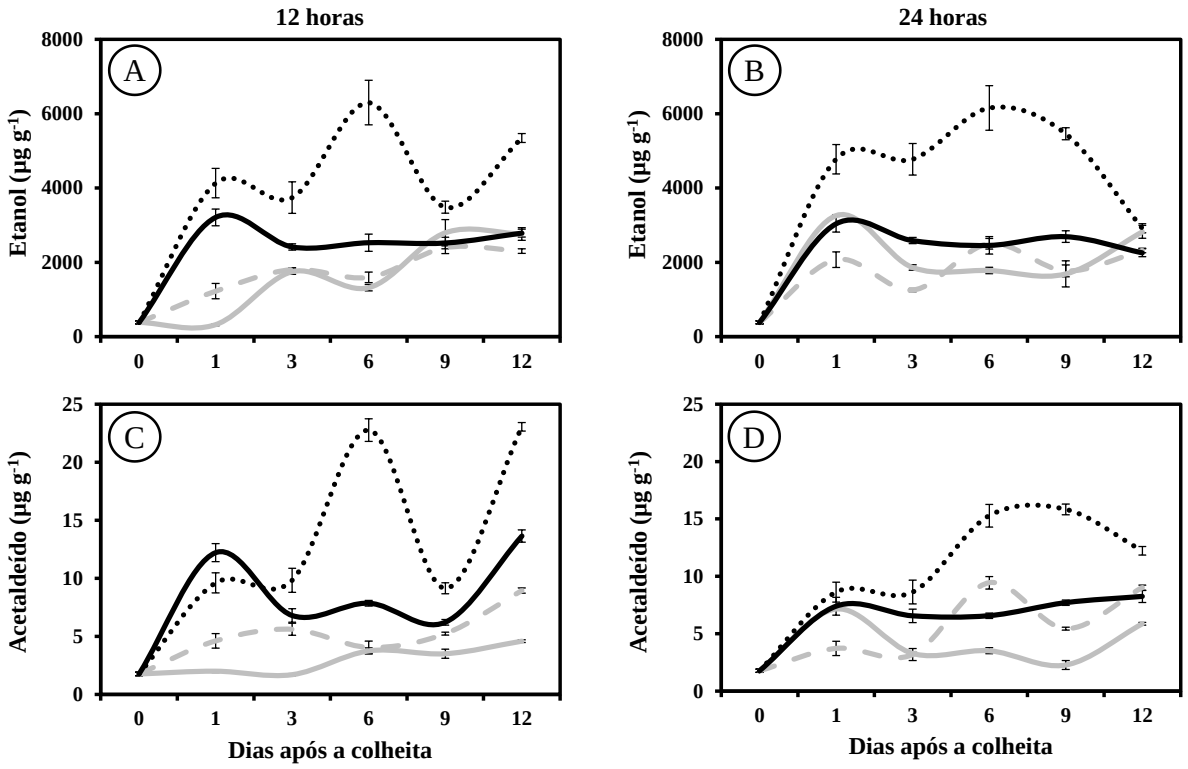

Figura 8. Teor de etanol (A e B) e acetaldeído (C e D) de cambucis tratados com diferentes doses de etanol (mL de etanol por kg de fruto) por 12 horas (A e C) e 24 horas (B e D) e armazenados a 5±1 °C e 90% de UR, por 12 dias. ▬: 0,0 mL kg^{-1}, ▬ : 1,5 mL kg^{-1}, ▬: 3,0 mL kg^{-1}, •••••: 6,0 mL kg^{-1}. Barras verticais representam o erro padrão da média (n=4).

4.3.2.2 A taxa respiratória e a produção de etileno foram influenciadas pelo vapor de etanol e tempos de exposição

A taxa respiratória dos frutos apresentou redução até o 6º dia de armazenamento para ambos os tempos de exposição aos tratamentos (Figura 9A e B). Frutos submetidos aos tratamentos com 3,5 e 6,0 mL kg^{-1} apresentaram as menores taxas respiratórias quando expostos aos tratamentos por 12 horas. Frutos expostos aos tratamentos durante 24 horas apresentaram padrão respiratório semelhante ao longo do armazenamento, havendo diferenças somente ao final do armazenamento, quando frutos não tratados apresentaram as menores taxas respiratórias. A produção de CO_2 dos cambucis durante o armazenamento se manteve dentro dos padrões da espécie (Azevedo et al., 2016).

As doses e tempos de exposição ao vapor de etanol também influenciaram as taxas de produção de etileno (Figura 9C e D). Foi observada uma redução nesses valores a partir do terceiro dia após a aplicação dos tratamentos. Em frutos expostos aos tratamentos por 12 horas, houve diferença significativa entre a produção de etileno em frutos tratados e não tratados. Para frutos tratados com vapor de etanol por 24 horas não houve diferença entre os tratamentos avaliados. Aplicações exógenas de etanol podem influenciar na permeabilidade

da dupla camada lipídica das membranas, onde acredita-se ser o sítio de ação do etileno. Essas modificações podem ocasionar a inibição da síntese de etileno (Podd; Van Staden, 1998).

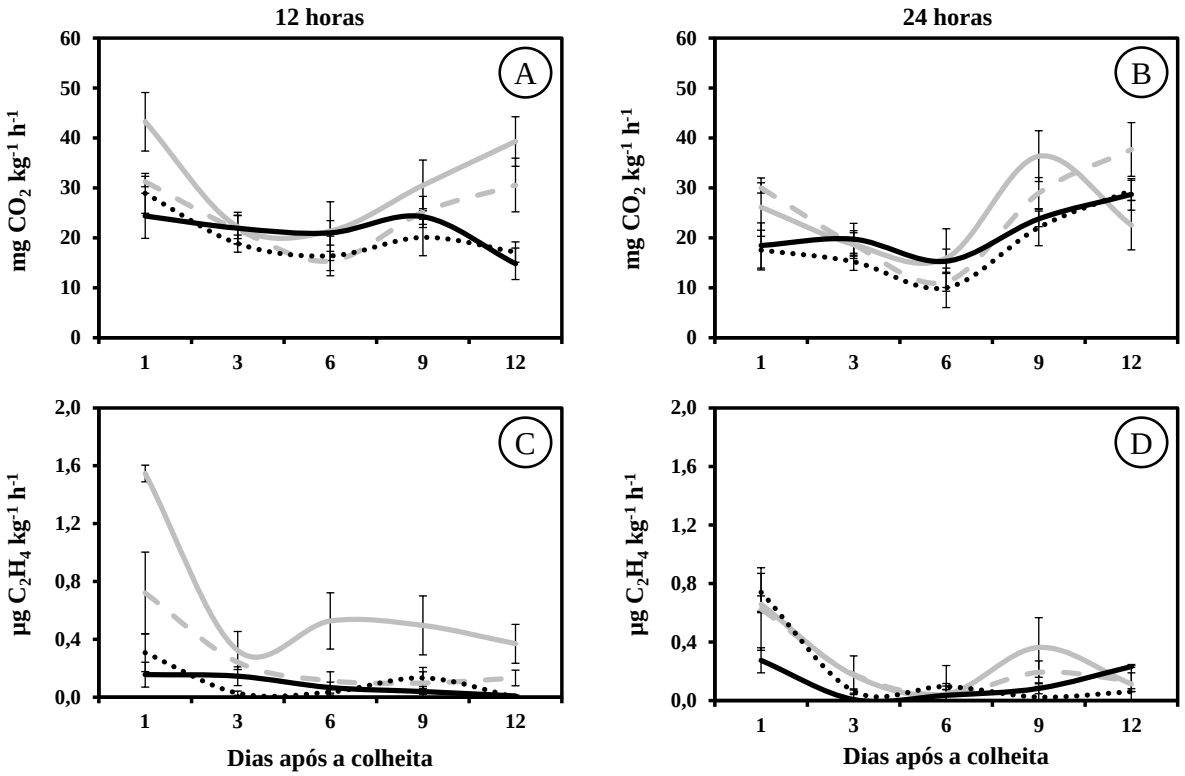

Figura 9. Atividade respiratória (A e B) e produção de etileno (C e D) de cambucis tratados com diferentes doses de etanol (mL de etanol por kg de fruto) por 12 horas (A e C) e 24 horas (B e D) e armazenados a 5±1 °C e 90% de UR, por 12 dias. ——: 0,0 mL kg^{-1}, - - -: 1,5 mL kg^{-1}, ▬▬: 3,0 mL kg^{-1}, • • • • •: 6,0 mL kg^{-1}. Barras verticais representam o erro padrão da média (n=4).

4.3.2.3 Tratamento com subdoses de etanol não modificaram a coloração da casca dos cambucis

Não houve interação significativa entre os fatores doses de etanol x dias após a colheita para os parâmetros de ângulo Hue e cromaticidade da casca. Também não houve diferenças entre as doses aplicadas. Frutos expostos aos tratamentos com vapor de etanol por 12 horas apresentaram os resultados de ângulo Hue e cromaticidade estáveis durante o armazenamento, indicando que não houve alteração de matiz e intensidade da cor da casca ao longo dos dias (Tabela 4). Para frutos expostos aos tratamentos por 24 horas, os valores de ângulo Hue e cromaticidade foram crescentes ao longo dos dias, mas se mantiveram na faixa da cor verde, tendendo para uma coloração verde mais intensa, sem indícios de degradação de pigmentos (Tabela 4).

Tabela 4. Ângulo Hue e cromaticidade de cambucis tratados com diferentes concentrações de vapor de etanol (mL de etanol por kg de fruto), por 12 e 24 horas e armazenados a 5±1 °C e 90% de UR, por 12 dias.

Exposição ao etanol	**Dias após a colheita**					
	0	**1**	**3**	**6**	**9**	**12**
	Hue (°)					
12 horas	105,6 A	105,6 A	104,5 AB	103,7 AB	103,2 B	104,2 AB
24 horas	101,6 C	101,6 C	105,0 A	103,3 B	103,4 AB	103,9 AB
	Cromaticidade					
12 horas	26,2 A	26,2 A	26,6 A	27,5 A	26,8 A	25,2 A
24 horas	26,4 B	26,4 B	25,0 B	25,4 B	26,2 B	28,6 A

Letras maiúsculas na linha representam diferenças significativas pelo teste de Tukey (P<0,05).

4.3.2.4 O conteúdo de compostos fenólicos de cambucis foi modificado após os tratamentos com vapor de etanol

Os maiores teores de compostos fenólicos em cambucis foram observados na casca em comparação à polpa (Tabela 5). As doses e tempos de exposição ao vapor de etanol influenciaram os teores de compostos fenólicos de cambucis. Os maiores teores desses compostos foram observados em casca e polpa não tratadas, e os menores, em casca e polpa tratadas com a maior dose de etanol (Tabela 5). O tempo de 12 horas de exposição reduziu os teores de casca e polpa, em comparação com exposições de 24 horas.

Tabela 5. Conteúdo de compostos fenólicos e capacidade antioxidante em casca e polpa de cambucis tratados com diferentes concentrações de vapor de etanol (mL de etanol por kg de fruto), por 12 e 24 horas e armazenados a 5±1 °C e 90% de UR, por 12 dias.

Doses de etanol	**Tempo de exposição**	
	12 h	**24 h**
	Compostos fenólicos (mg A.G. g^{-1}) - casca	
0,0 mL kg^{-1}	61,8 aA	62,3 aA
1,5 mL kg^{-1}	50,2 cB	54,8 bA
3,0 mL kg^{-1}	52,9 bB	55,6 bA
6,0 mL kg^{-1}	47,9 dB	50,0 cA
	Compostos fenólicos (mg A.G. g^{-1}) - polpa	
0,0 mL kg^{-1}	37,1 aB	38,7 aA
1,5 mL kg^{-1}	35,1 bB	34,8 bA
3,0 mL kg^{-1}	35,5 bB	36,8 bA
6,0 mL kg^{-1}	32,8 cB	33,0 cA
	ABTS (% redução) - casca	
0,0 mL kg^{-1}	12,5 aA	12,3 aB
1,5 mL kg^{-1}	11,1 bA	10,9 bB
3,0 mL kg^{-1}	12,0 bA	10,9 bB
6,0 mL kg^{-1}	9,7 cA	9,6 cB
	ABTS (% redução) - polpa	
0,0 mL kg^{-1}	6,6 abB	7,1 bcA
1,5 mL kg^{-1}	6,1 bB	7,4 abA
3,0 mL kg^{-1}	6,6 aB	7,8 aA
6,0 mL kg^{-1}	6,7 aA	6,8 cA

Letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

4.3.2.5 Influência do vapor de etanol na perda de massa e em parâmetros físico-químicos de cambucis

A perda de massa dos frutos variou de 0,15% a 0,18%, não havendo diferenças entre os tratamentos e tempos de exposição avaliados. Os baixos valores observados para perda de massa podem ser considerados insignificantes, principalmente quando considerado o tempo de armazenamento. Perdas abaixo de 3% não inviabilizam a comercialização de diversas culturas hortícolas (Robinson et al., 1975). A embalagem de policloreto de vinila (PVC)

utilizada neste experimento auxiliou na redução da perda de umidade dos frutos sem interferir em parâmetros físico-químicos como estudado no capítulo 2 dessa tese.

As doses de etanol influenciaram a acidez dos cambucis. Frutos submetidos às maiores doses foram mais ácidos do que os frutos do tratamento controle. Independente da dose aplicada, a acidez dos frutos variou de 2,68% a 2,96% de ácido cítrico e estão de acordo com os valores observados por Azevedo et al. (2016) em cambucis. O teor de sólidos solúveis foi influenciado pelas doses de etanol e pelos tempos de exposição, sendo que frutos submetidos às maiores doses por 12 horas apresentaram-se com maior acúmulo de sólidos solúveis. Frutos submetidos aos tratamentos por 12 horas de exposição apresentaram redução dos teores de ácido ascórbico conforme o aumento da dose, o que não foi observado para frutos expostos por 24 horas, em que o tratamento controle não diferiu da maior dose aplicada.

Tabela 6. Perda de massa fresca, acidez titulável, sólidos solúveis e teor de ácido ascórbico de cambucis tratados com diferentes concentrações de vapor de etanol (mL de etanol por kg de fruto), por 12 e 24 horas e armazenados a 5±1 °C e 90% de UR, por 12 dias.

Doses de etanol	**Tempos de exposição**	
	12 h	**24 h**
	Perda de massa (%)	
0,0 mL kg^{-1}	0,15 aA	0,18 aA
1,5 mL kg^{-1}	0,15 aA	0,15 aA
3,0 mL kg^{-1}	0,15 aA	0,16 aA
6,0 mL kg^{-1}	0,18 aA	0,16 aA
	Acidez titulável (% ácido cítrico)	
0,0 mL kg^{-1}	2,78 bA	2,68 bB
1,5 mL kg^{-1}	2,80 bB	2,94 aA
3,0 mL kg^{-1}	2,95 aA	2,91 aA
6,0 mL kg^{-1}	2,90 aA	2,96 aA
	Sólidos solúveis (°Brix)	
0,0 mL kg^{-1}	9,8 bA	9,6 bB
1,5 mL kg^{-1}	9,8 bA	9,8 aA
3,0 mL kg^{-1}	10,1 aA	9,3 cB
6,0 mL kg^{-1}	10,1 aA	9,6 bB
	Ácido ascórbico (mg 100 g^{-1})	
0,0 mL kg^{-1}	81,0 aA	78,1 bA
1,5 mL kg^{-1}	81,9 aA	76,0 bA
3,0 mL kg^{-1}	74,3 bB	101,0 aA
6,0 mL kg^{-1}	70,6 cB	80,1 bA

Letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

4.4 Conclusão

Os tratamentos com vapor de etanol são eficientes para a redução do conteúdo de proantocianidinas em frutos de cambucizeiro.

A dose de 14,0 mL kg^{-1} por 12 horas de exposição causa danos às cascas dos frutos, como depressões, rachaduras e modificação da cor da casca.

A dose de 6,0 mL kg^{-1} por 12 horas de exposição é eficiente para reduzir o conteúdo de proantocianidinas sem causar dano aos cambucis.

Exposição ao vapor de etanol por 12 horas é mais eficiente na redução do teor de proantocianidinas do que 24 horas.

Referências

Amorim, C., Alves Filho, E. G., Rodrigues, T. H. S., Bender, R. J., Canuto, K. M., Garruti, D. S., & Antoniolli, L. R. (2020). Volatile compounds associated to the loss of astringency in 'Rama Forte' persimmon fruit. *Food Research International*, *136*, 109570.

Asoda, T., Terai, H., Kato, M., & Suzuki, Y. (2009). Effects of postharvest ethanol vapor treatment on ethylene responsiveness in broccoli. *Postharvest Biology and Technology*, *52*(2), 216-220.

Azevedo, M. C. S., Silva, R. R. E., Jacomino, A. P., & Genovese, M. I. (2016). Physicochemical variability of cambuci fruit (*Campomanesia phaea*) from the same orchard, from different locations and at different ripening stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *97*(2), 526-535.

Chung, K. T., Wong, T. Y., Wei, C. I., Huang, Y. W., & Lin, Y. (1998). Tannins and human health: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, *38*(6), 421-464.

Combs, C. A. (Ed.). (2016). *Tannins: biochemistry, food sources and nutritional properties*. Nova Science Publishers.

Dalal, N., Siddiqui, S., & Phogat, N. (2020). Post-harvest quality of sunflower microgreens as influenced by organic acids and ethanol treatment. *Journal of Food Processing and Preservation*, *44*(9), e14678.

Davis, P. L., & Chace, W. G. (1969). Determination of alcohol in citrus juice by gas chromatographic analysis of headspace. *HortScience*.

Donado-Pestana, C. M., Belchior, T., Festuccia, W. T., & Genovese, M. I. (2015). Phenolic compounds from cambuci (*Campomanesia phaea* O. Berg) fruit attenuate glucose intolerance and adipose tissue inflammation induced by a high-fat, high-sucrose diet. *Food Research International*, *69*, 170-178.

Edagi, F. K., Chiou, D. G., Terra, F. D. A. M., Sestari, I., & Kluge, R. A. (2009). Remoção da adstringência de caquis 'Giombo' com subdosagens de etanol. *Ciência Rural*, *39*, 2022-2028.

Edagi, F. K., & Kluge, R. A. (2009). Remoção de adstringência de caqui: um enfoque bioquímico, fisiológico e tecnológico. *Ciência Rural*, *39*, 585-594.

Figueiredo, R. W., Lajolo, F. M., Alves, R. E., Figueiras, H. A. C., Maia, G. A., & de Sousa, P. H. M. (2007). Quality of cashew pseudofruits treated with calcium at postharvest and stored under refrigeration. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, *42*(4), 475-482.

França, D. L. B., Braga, G. C., Laureth, J. C. U., Dranski, J. A. L., & de Andrade Moura, C. (2018). Physiological response, antioxidant enzyme activities and conservation of banana treated with ethanol vapor. *Journal of food science and technology*, *56*(1), 208-216.

Jin, Y. Z., Liu, W. W., Qi, H. Y., & Bai, X. H. (2013). Ethanol vapor treatment maintains postharvest storage quality and inhibits internal ethylene biosynthesis during storage of oriental sweet melons. *Postharvest Biology and Technology*, *86*, 372-380.

Lancaster, J. E., Lister, C. E., Reay, P. F., & Triggs, C. M. (1997). Influence of pigment composition on skin color in a wide range of fruit and vegetables. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *122*(4), 594-598.

Liu, W. W., Qi, H. Y., Xu, B. H., Li, Y., Tian, X. B., Jiang, Y. Y., & Xu, X. F. (2012). Ethanol treatment inhibits internal ethylene concentrations and enhances ethyl ester production during storage of oriental sweet melons (*Cucumis melo* var. makuwa Makino). *Postharvest Biology and Technology*, *67*, 75-83.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, *79*(5), 727-747.

Matsuo, T., & Itoo, S. (1982). 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 and Biological Chemistry*, *46*(3), 683-689.

Moura, C. F. H., Figueiredo, R. W. D., Alves, R. E., Silva, E. D. O., Araújo, P. G. L. D., & Maciel, V. T. (2010). Increasing shelf life of early dwarf cashew tree peduncle through reduction of storage temperature. *Ciência e Agrotecnologia*, *34*(1), 140-145.

Nakamura, Y., Tsuji, S., & Tonogai, Y. (2003). Analysis of proanthocyanidins in grape seed extracts, health foods and grape seed oils. *Journal of health science*, *49*(1), 45-54.

Nunes, C. N., & Emond, J. P. (2007). Relationship between weight loss and visual quality of fruits and vegetables. In *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* (Vol. 120, pp. 235-245).

Pasternak, T., Potters, G., Caubergs, R., & Jansen, M. A. (2005). Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *Journal of experimental botany*, *56*(418), 1991-2001.

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

Plotto, A., Baigorria, J., Baldwin, E. A., & Brecht, J. K. (2003, December). Effect of pretreatment of intact ‘kent’ and ‘tommy atkins’ mangoes with ethanol vapor, heat or 1-methylcyclopropene on quality and shelf life of fresh-cut slices. In *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* (Vol. 116, pp. 394-400).

Podd, L. A., & Van Staden, J. (1998). The role of ethanol and acetaldehyde in flower senescence and fruit ripening–a review. *Plant growth regulation*, *26*(3), 183-189.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, *26*(9-10), 1231-1237.

Robinson, J. E., Browne, K. M., & Burton, W. G. (1975). Storage characteristics of some vegetables and soft fruits. *Annals of Applied Biology*, *81*(3), 399-408.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144-158.

Spricigo, P. C., Correia, B. S. B., Borba, K. R., Taver, I. B., Machado, G. D. O., Wilhelms, R. Z., Queiroz Junior, L. H. K., Jacomino, A. P., & Colnago, L. A. (2021). Classical Food Quality Attributes and the Metabolic Profile of Cambuci, a Native Brazilian Atlantic Rainforest Fruit. *Molecules*, *26*(12), 3613.

Tezotto-Uliana, J. V., de Paula, J. T., Tessmer, M. A., & Kluge, R. A. (2018). Ethanol vapor is efficient for reduction of astringency compounds in cashew apple. *Postharvest Biology and Technology*, *145*, 117-124.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ainda de consumo restrito aos locais de ocorrência e mercados especializados, o cambuci possui grande potencial de consumo principalmente devido às suas características de aroma, sabor e conteúdo de compostos bioativos. Os frutos com cheiro adocicado surpreendem com sua acidez e adstringência, sendo aproveitados para compor bebidas, pratos da alta gastronomia e sobremesas. A versatilidade do cambuci vai além do preparo de sucos, bebidas alcoólicas, molhos e doces, sendo aproveitado desde a casca até o bagaço devido à sua rica composição.

Apesar da alta atratividade de seus frutos, o cultivo do cambucizeiro carrega consigo uma gama de dificuldades que se inicia desde a produção de mudas até a forma de colheita, armazenamento em pós-colheita e consumo. Comumente consumidos de forma processada, a sensação de adstringência dos cambucis causada pelo alto teor de taninos é reduzida por meio da diluição desses compostos em água e a associação com açúcares, quando no preparo de sucos, ou ainda por meio da exposição a altas temperaturas, como no preparo de molhos e geleias, não sendo consumidos na sua forma *in natura*.

Nos últimos anos, o projeto Frutas nativas da Mata Atlântica, financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo 14/12606-3) e coordenado pelo prof. Dr. Angelo Pedro Jacomino, vem alcançando avanços sobre aspectos da genética, propagação, produção, composição, conservação e tratamentos pós-colheita de cambucis. O projeto conta com o auxílio de profissionais de diversas áreas de estudo com o intuito de gerar informações que contribuam para o conhecimento acerca do verdadeiro potencial desses frutos, bem como desenvolver técnicas que embasem toda a cadeia produtiva. Os resultados aqui apresentados demonstram a potencialidade do uso de técnicas como a atmosfera modificada passiva, aplicação de etileno e vapor de etanol, abordando aspectos relacionados à fisiologia e bioquímica de cambucis em pós-colheita, fornecendo ferramentas para viabilizar o consumo *in natura* e aumentar o período de vida útil pós-colheita. Adicionalmente, para respostas mais efetivas, recomendamos mais estudos com etileno em frutos mantidos em temperatura ambiente e tratados com o bloqueador da sua ação (1-Metilciclopropeno).