

**ESTUDO DO EFEITO DA ATMOSFERA MODIFICADA SOBRE
FRUTOS TROPICAIS UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA
FOTOACÚSTICA E TÉCNICAS CONVENCIONAIS**

SAVIO FIGUEIRA CORRÊA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO 2010**

**ESTUDO DO EFEITO DA ATMOSFERA MODIFICADA SOBRE
FRUTOS TROPICAIS UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA
FOTOACÚSTICA E TÉCNICAS CONVENCIONAIS**

SAVIO FIGUEIRA CORRÊA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais”

Orientador: Prof. Marcelo Gomes da Silva
Co-orientador: Jurandi Gonçalves de Oliveira

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO 2010**

ESTUDO DO EFEITO DA ATMOSFERA MODIFICADA SOBRE
FRUTOS TROPICAIS UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA
FOTOACÚSTICA E TÉCNICAS CONVENCIONAIS

SAVIO FIGUEIRA CORRÊA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais”

Aprovado em 25 de fevereiro de 2010.

Comissão Examinadora:

Prof. Norberto Cella (Doutor, Física) – UERJ

Prof. Marcelo Silva Sthel (Doutor, Física) – UENF

Profa. Maria Priscila Pessanha de Castro (Doutora, Física) – UENF

Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira (Doutor, Agronomia) – UENF
Co-Orientador

Prof. Marcelo Gomes da Silva (Doutor, Física) – UENF
Orientador

“La carità è il metro con il quale il Signore ci giudicherà tutti.”

San Pio da Pietrelcina

Dedico à Cecília, que muito contribuiu com seu amor e com palavras de incentivo e compreensão nas horas difíceis, e ao Antônio, pela graça de sua vida.

Em memória do meu avô Amadeu Teixeira Corrêa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me guiar e conduzir sempre os meus caminhos.

Aos meus pais e irmãs, pelo amor, carinho e educação que me deram.

Ao Professor Marcelo Gomes pelo seu caráter, pelo compromisso com seu papel de orientador, por ter acreditado e incentivado minhas atividades acadêmicas e pela amizade durante este tempo de formação.

Ao professor Jurandi, pelo apoio, pelo auxílio e pela sua paciência durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Helion Vargas, pela sua confiança depositada, por sua experiência, dinamismo e liderança, a quem tenho muito respeito e admiração.

Aos professores Andras e Judit e aos colegas Martin e Zlatko, pelo excelente convívio profissional em Stuttgart.

Ao professor Marcelo da Silva Sthel pelo companheirismo de todas as horas.

Aos amigos de laboratório Ana Paula, Anderson, Elaine, Flávio, Gustavo, Israel, Luisa, Luiz Antônio, Milton, Paulo Sérgio, Thaís, Talita e Wily, pela amizade e valioso auxílio.

Aos meus sobrinhos, pelas alegrias de todos os momentos.

Ao meu sogro, à minha sogra e aos meus cunhados que muito contribuem na formação familiar.

Aos professores e funcionário do LCFIS e do LMGV.

Aos estudantes do Fraunhofer-Institut für Bauphysik.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para este trabalho.

ÍNDICE

Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xv
Lista de Símbolos e Abreviaturas	xvi
Resumo	xviii
Abstract	xix
CAPÍTULO 1	01
1. Introdução	01
Referências Bibliográficas	03
CAPÍTULO 2	05
2. Objetivos	05
CAPÍTULO 3	06
3. Revisão bibliográfica	06
3.1. <i>Fotoacústica</i>	06
3.2. <i>Ciclo do etileno</i>	11
3.3. <i>Respiração</i>	12
3.4. <i>Fotossíntese</i>	13
3.4.1. <i>Emissão da fluorescência da Clorofila a</i>	15
3.5. <i>Características fisiológicas das amostras a serem estudadas</i>	16
3.5.1. <i>Abacate</i>	16
3.5.2. <i>Maracujá</i>	17
3.5.3. <i>Mamão</i>	19
3.6. <i>Atmosfera controlada e atmosfera modificada</i>	22
3.7. <i>Ozônio</i>	24

3.7.1. Ozônio: estratosfera e troposfera	24
3.7.2. Indicadores de ação do ozônio nas plantas	26
3.7.2.1. Suscetibilidade de Cloroplastos à indução por ozônio	26
3.7.2.2. Etileno como indicador de estresse provocado em plantas por ozônio	27
Referência Bibliográfica	28
CAPITULO 4	35
Testes de um novo espectrômetro fotoacústico compacto para determinação de etileno em sistemas biológicos.	35
Resumo	35
Introdução	35
Materiais e Método	37
<i>Amostras</i>	37
<i>Espectrômetro fotoacústico</i>	38
<i>Aplicações do espectrômetro fotoacústico</i>	40
Resultados e discussão	41
<i>Limite de detecção do espectrômetro fotoacústico</i>	41
<i>Experimento com atmosfera modificada: alto nível de CO₂</i>	45
<i>Experimento com atmosfera modificada: uso de etileno na atmosfera</i>	44
Conclusão	48
Referências bibliográficas	49
CAPÍTULO 5	52
Aplicação da espectroscopia fotoacústica no monitoramento da emissão de C₂H₄ e CO₂ em maracujá armazenado sob diferentes atmosferas	52
Resumo	52
Introdução	52
Material e Métodos	53

<i>Amostra Vegetal</i>	53
<i>Tratamentos com atmosfera modificada</i>	54
<i>Monitoramento das taxas de emissão de C₂H₄ e CO₂</i>	54
<i>Coloração da casca do fruto</i>	56
<i>Medidas de massa</i>	56
Resultados e discussão	57
Conclusão	69
Referências Bibliográficas	69
CAPÍTULO 6	72
Estresse abiótico em mamão provocado por ozônio	72
Resumo	72
Introdução	72
Material e Métodos	73
<i>Amostras Vegetal</i>	73
<i>Uso de atmosfera modificado com ozônio</i>	73
<i>Experimento I: avaliação das taxas de emissão de etileno e de CO₂ com a coloração da casca do fruto</i>	74
<i>Experimento II: Espectrômetro Fotoacústico para análise de coloração da casca do fruto</i>	76
<i>Experimento III: Correlação entre as variáveis da fluorescência da clorofila a e os parâmetros de cor da casca dos frutos.</i>	77
Resultados e discussão	78
<i>Avaliação das taxas de emissão de etileno e de CO₂ com a coloração da casca do fruto</i>	78
<i>Espectrômetro Fotoacústico para análise de coloração da casca do fruto</i>	81
<i>Correlação entre as variáveis da fluorescência da clorofila a e os parâmetros de cor da casca dos frutos.</i>	86

Conclusão	90
Referências bibliográficas	90
CAPÍTULO 7	93
7. Conclusões	93
APÊNDICE A	95
Escala de classificação de mamão	95
APÊNDICE B	96
Método de separação de fases	96
Referências bibliográficas	99
APÊNDICE C	100
Calibração da concentração de pigmentos com os parâmetros de cor do espaço Hunter	100
Introdução	100
Material e Métodos	101
Resultados	102
Conclusão	106
Referências bibliográficas	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Diagrama dos processos físicos que ocorrem no gás, a começar pela excitação e terminando na detecção do som por microfones (Shimid, 2006).	9
Figura 3.2 – Rota da biossíntese do etileno e o ciclo de regeneração da metionina (Abeles <i>et al.</i> , 1992).	11
Figura 3.3 – Foto de quatro amostras de abacate.	17
Figura 3.4 – Foto do maracujá amarelo.	18
Figura 3.5 – Foto de mamão cv. Golden no estágio 0 de maturação	21
Figura 4.1 – Diagrama do espectrômetro fotoacústico.	38
Figura 4.2 – Esboço da célula fotoacústica diferencial	39
Figura 4.3 - O gráfico (A) mostra a curva de calibração de óxido nitroso utilizando o espectrômetro fotoacústico. O gráfico (B) mostra como mais detalhe o limite de detecção de 170 ppbV de óxido nitroso. Barras verticais indicam o erro em desvio padrão.	43
Figura 4.4 – O gráfico (A) mostra a curva de calibração de etileno utilizando o espectrômetro fotoacústico. O gráfico (B) mostra como mais detalhe o limite de detecção de 40 ppbV de etileno. Barras verticais indicam o erro em desvio padrão.	44
Figura 4.5 – O gráfico mostra a evolução temporal das taxas de emissão de etileno de abacates submetidos à atmosfera de ar sintético (controle) e de abacates submetidos à atmosfera modificada de 30% de CO ₂ , 14% de O ₂ 3 56% de N ₂ em fluxo de 3 L.h ⁻¹ (AM). Barras verticais indicam o erro em desvio padrão.	46
Figura 4.6 - O gráfico mostra a evolução temporal das taxas de emissão de etileno de abacates submetidos à atmosfera de ar sintético (controle) e de	48

abacates submetidos à atmosfera modificada 1ppm de C_2H_4 em fluxo de $3 L.h^{-1}$ (AM). Barras verticais indicam o erro em desvio padrão.

Figura 5.1 – Desenho esquemático da montagem experimental para monitoramento das taxas de emissão de etileno e dióxido de carbono utilizando um espectrômetro fotoacústico e um URAS. A montagem mostra o uso de duas câmaras com frutos de maracujá amarelo para os grupos controle e grupo tratado por diferentes tipos de atmosfera modificada. 55

Figura 5.2 – O gráfico A mostra a taxa de emissão de etileno para frutos submetidos à atmosfera modificada de 100% de N_2 e 0% de O_2 (AM1) e dos frutos controle, em função do tempo. O gráfico B mostra a taxa respiratória para a mesma condição experimental. Barras verticais indicam o erro em desvio padrão. 58

Figura 5.3 – O gráfico A mostra a taxa de emissão de etileno para frutos submetidos à atmosfera modificada de 97% de N_2 e 3% de O_2 (AM2) e dos frutos controle, em função do tempo. O gráfico B mostra a taxa respiratória para a mesma condição experimental. Barras verticais indicam o erro em desvio padrão. 60

Figura 5.4 – O gráfico A mostra a taxa de emissão de etileno para frutos submetidos à atmosfera modificada de 94% de N_2 e 6% de O_2 (AM3) e dos frutos controle, em função do tempo. O gráfico B mostra a taxa respiratória para a mesma condição experimental. Barras verticais indicam o erro em desvio padrão. 62

Figura 5.5 – Variação do parâmetro de cor *a* em função do tempo para os frutos do grupo controle comparados com os frutos das três condições de atmosfera modificada: A) atmosfera modificada com 100% de N_2 e 0% de O_2 (AM1); B) atmosfera modificada com 97% de N_2 e 3% de O_2 (AM2); C) atmosfera modificada com 94% de N_2 e 6% de O_2 (AM3). Barras verticais indicam o erro em desvio padrão. 64

Figura 5.6 – Variação do parâmetro de cor *b* em função do tempo para os frutos do grupo controle comparados com os frutos das três condições de atmosfera modificada: A) atmosfera modificada com 100% de N_2 e 0% de O_2 (AM1); B) atmosfera modificada com 97% de N_2 e 3% de O_2 (AM2); C) atmosfera modificada com 94% de N_2 e 6% de O_2 (AM3). Barras verticais 65

indicam o erro em desvio padrão.

Figura 5.7 – Variação do ângulo *hue* ($^{\circ}$ h) em função do tempo para os frutos do grupo controle comparados com os frutos das três condições de atmosfera modificada: A) atmosfera modificada com 100% de N_2 e 0% de O_2 (AM1); B) atmosfera modificada com 97% de N_2 e 3% de O_2 (AM2); C) atmosfera modificada com 94% de N_2 e 6% de O_2 (AM3). Barras verticais indicam o erro em desvio padrão. 66

Figura 6.1 – Diagrama da montagem experimental do espectrômetro fotoacústico usado para obtenção de espectro de absorção. 76

Figura 6.2 – Taxa de emissão de etileno (A) e de CO_2 (B) durante a pós-colheita de frutos. As curvas (\circ) representam a média de três amostras não tratadas e as curvas (\blacksquare) representam a média de três amostras tratadas com 6 ppm de ozônio em ar durante 24h. 79

Figura 6.3 – Evolução temporal da diferença de coloração total da casca dos frutos do grupo controle (A) e dos frutos do grupo tratado (B). As linhas pretas na vertical representam o meio-tempo da variação da coloração da casca dos frutos. 80

Figura 6.4 - Espectro da casca de frutos de mamão do grupo tratado com ozônio (linhas tracejadas) e controle (linhas contínuas). 82

Figura 6.5 - Espectros de absorção da cutícula cerosa da casca do mamão do grupo tratado com ozônio (linhas tracejadas) e controle (linhas contínuas) em função da evolução temporal de amostras com melhor apresentação (0, 24, 48, 72 e 96 horas após o término do tratamento). 84

Figura 6.6 – São apresentados 5 espectros de absorção dos pigmentos fotossintetizantes da casca do mamão do grupo tratado com ozônio (linhas tracejadas) e controle (linhas contínuas) em função da evolução temporal (0, 24, 48, 72 e 96 horas após o término do tratamento). 85

Figura 6.7 - Gráfico (A) mostra a variação média da fluorescência mínima (F_0) dos grupos controle (\circ) e tratado (\blacksquare) e função do tempo. Gráfico (B) mostra a variação média da fluorescência máxima (F_m) dos grupos controle (\circ) e tratado (\blacksquare) e função do tempo. Gráfico (C) mostra a variação média da fluorescência 88

variável (F_v) dos grupos controle (\circ) e tratado (\blacksquare) e função do tempo. Gráfico (D) mostra a variação média do rendimento quântico máximo (F_v/F_m) dos grupos controle (\circ) e tratado (\blacksquare) e função do tempo.

Figura 6.8 – Gráficos das variações médias dos parâmetros de cor da casca do fruto (L gráfico A, a gráfico B, b gráfico C e $^{\circ}h$ gráfico D) dos grupos controle (\circ) e tratado (\blacksquare) e função do tempo. 89

Figura B.1 – Vetor do sinal fotoacústico S_F em função do comprimento de onda λ , pode ser representado por um vetor no plano complexo de intensidade $S_F(\lambda)$ e fase θ_F . 97

Figura B.2 – O gráfico ilustra os sinais das camadas e suas separações. São mostrados os sinais S_A e S_B de duas camadas distintas, cuja soma fornece o sinal fotoacústico S_F medido. Através do método de separação de fases pode-se identificar a fase θ_A em que está o sinal S_A , a partir da composição na fase θ_2 na qual todas as características espectrais de S_A desaparecem. O mesmo procedimento é aplicado para o sinal S_B . 98

Figura C.1 – Esquema representativo do espaço de cor de Hunter (Coulter, 2004). 101

Figura C.2 - Gráficos das variações dos pigmentos do cloroplasto em função dos parâmetros de cor da casca do fruto (L, a, b). 104

Figura C.3 - Gráficos das variações dos pigmentos do cloroplasto em função do ângulo *hue*. 105

LISTA DE TABELAS

- Tabela 5.1** – Dados de perda de massa para as três condições experimentais 68
são comparadas com os do grupo controle. Os valores são expressos em % de
perda de massa.
- Tabela 6.1** - Relação entre o pico climatérico de frutos testemunhas e de frutos 81
tratados com 6 ppm de ozônio em ar durante 24h com seus respectivos meio-
tempo de saturação da coloração da casca.
- Quadro A.1** – Escala de classificação de mamão de acordo com a coloração 95
da casca.
- Tabela C.1** – Equações relacionando a quantidade de pigmentos do cloroplasto 106
em função dos parâmetros de cor do espaço de coloração Hunter.

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

cv	Cultivar
OPC	célula fotoacústica aberta
QCL	laser de casca quântica
MF	modulação em frequência
MA-TTL	modulação em amplitude com sinal TTL
MW	modulação em comprimento de onda
TTL	sinal transistor-transistor logic
R	razão entre sinal-ruído
S_F	sinal de maior pico de absorção
S_{Bg}	sinal de ruído
AM	atmosfera modificada
AC	atmosfera controlada
ΔE	diferença da coloração total
L	Luminosidade do espaço de Hunter
a; b	dimensões de coloração do espaço de Hunter
F_0	fluorescência mínima
F_m	fluorescência máxima
F_v	fluorescência variável

F_v/F_m	eficiência quântica potencial do fotossistema II
S_F	intensidade do sinal fotoacústico
θ_F	fase do sinal fotoacústica
S_0	sinal em fase
S_{90}	sinal em quadratura
θ_A	fase da camada A
θ_B	fase da camada B

RESUMO

CORRÊA, Savio Figueira; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, fevereiro de 2010; Estudo do efeito da atmosfera modificada sobre frutos tropicais utilizando a espectroscopia fotoacústica e técnicas convencionais; Prof. Orientador Marcelo Gomes da Silva, Prof. Co-orientador Jurandi Gonçalves de Oliveira.

No Brasil, a fruticultura é uma importante atividade econômica e social. Essa atividade é de grande importância nas regiões rurais, evitando uma emigração de pessoas do campo para os grandes centros, onde a condição de vida é mais difícil. Junto à produção dos frutos, os estudos em pós-colheita têm importante papel no sentido de garantir bons produtos para os consumidores. Neste contexto, o trabalho trata da aplicação de técnicas fototérmicas, como a espectroscopia fotoacústica, no estudo das taxas de emissões de etileno e de dióxido de carbono em frutos tropicais, como abacate, maracujá e mamão (*Carica papaya* L.), submetidos a diferentes atmosferas modificadas. Esta técnica se baseia na detecção de ondas mecânicas de pressão, gerados pelo decaimento não-radiativo do material, após a sua excitação por luz modulada. Na primeira parte deste trabalho foi apresentado um novo espectrômetro fotoacústico utilizando modulação em comprimento de onda em um laser de cascata quântica para avaliação da taxa de emissão de etileno em frutos de abacate. Na segunda parte foram avaliadas as taxas de emissões de etileno e de dióxido de carbono de frutos de maracujá amarelo submetidos a diferentes atmosferas modificadas (1: 100% de N₂ e 0% de O₂; 2: 97% de N₂ e 3% de O₂; 3: 94% de N₂ e 6% de O₂). Na terceira parte estudou-se o estresse de frutos de mamão submetidos a atmosfera modificada com ozônio analisando a variação da taxa de emissão de etileno e de dióxido de carbono e o efeito sobre as cascas dos mesmos (coloração e fluorescência). Os resultados mostraram que a espectroscopia fotoacústica é uma excelente ferramenta para análise de sistemas biológicos em situações de estresse.

ABSTRACT

CORRÊA, Savio Figueira; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, fevereiro de 2010; Estudo do efeito da atmosfera modificada sobre frutos tropicais utilizando a espectroscopia fotoacústica e técnicas convencionais; Prof. Orientador Marcelo Gomes da Silva, Prof. Co-orientador Jurandi Gonçalves de Oliveira.

In Brazil, the fruit crop is an important economical and social activity. This activity has great relevance to rural regions for avoiding people emigration from the field into big centers, where the life condition is worse for those people. Together with, next to the production of fruits, the postharvest studies have an important role, in a way to guarantee good products for the consumers. Keeping in mind this point of view, this work is concerned with the application of photoacoustic spectroscopy in the study of ethylene and carbon dioxide emissions tropical fruit, in such as avocado, passion fruit and papaya (*Carica papaya* L.), put under condition of different modified atmospheres. This technique is based on the detection of mechanical pressure waves, which are produced by non-radiative decay of the material, after its excitation by modulated light. In the first part of this work was presented a new photoacoustic spectrometer making use of wavelength modulated mode for a quantum cascade laser to assess the rate of ethylene production in fruits of avocado. In the second part of this work, we evaluate the emission rates of ethylene and carbon dioxide from yellow passion fruit put under condition different modified atmospheres conditions (1: 100% de N_2 e 0% de O_2 ; 2: 97% de N_2 e 3% de O_2 ; 3: 94% de N_2 e 6% de O_2). In the third part of this work, a study on the stress of papaya fruit submitted to a modified atmosphere with ozone was made with analysis of variation in the rate of ethylene production and carbon dioxide and the effect on the skins of the same (color and fluorescence). The results showed that photoacoustic spectroscopy is an excellent tool for analysis of biological systems under stress.

CAPÍTULO 1

1. Introdução

Na agricultura, como na produção de frutos, faz-se necessário o uso da tecnologia exigindo constante reciclagem do conhecimento para atender as exigências do mercado produtor, que se torna cada vez mais competitivo e exigente. Obviamente, para o fruticultor o objetivo é obter uma fruta de qualidade com maior facilidade de comercialização e melhores preços.

Os frutos são de fundamental importância na alimentação humana e seu mercado se torna cada vez mais abrangente no mundo. O hábito de poder consumir um fruto ao pé da planta fica cada vez mais distante de grande parte da população que tem acesso ao fruto somente através do mercado e assim desconhece a quantidade de técnicas aplicadas na cultura da mesma, por exemplo, as práticas de armazenamento que visam a manutenção da qualidade por um maior período (Abbott, 1999). A fruticultura, uma das principais atividades sócio-econômicas da agricultura, é uma excelente opção na geração de produtos rurais, proporcionando a valorização da terra, uma redução do fluxo migratório do meio rural para o meio urbano com o aumento na geração de emprego e renda no campo (Kluge *et al.*, 2002). Neste contexto, a Física vem auxiliar na montagem de novas técnicas para o monitoramento de

frutos na fase pós-colheita, como o uso de espectrômetros fotoacústicos no monitoramento da taxa de emissão de etileno em frutos.

A Espectroscopia Fotoacústica pertence a um grupo de técnicas fototérmicas que se baseiam na conversão de energia óptica absorvida em calor. Nas últimas décadas as técnicas fototérmicas têm alcançado um grande desenvolvimento na caracterização de propriedades térmicas, ópticas, estruturais, qualitativa e quantitativa de diferentes materiais e meios biológicos. As técnicas fototérmicas vêm sendo aplicadas não somente em física como também em áreas da ciência como: química, biologia, medicina, agronomia e engenharias (Vargas e Miranda, 2003).

Atualmente, nos estudos das ciências agrárias há uma significativa participação da física. Em função do desenvolvimento de técnicas bem específicas, como a fotoacústica, tornou-se viável, por exemplo, o monitoramento em tempo real da quantidade de etileno emitida por um fruto (da Silva *et al.*, 2001; Azevedo *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2009). Além da Espectroscopia Fotoacústica ter um caráter não destrutivo, permitindo estudos *in vivo* de frutos durante toda sua fase de amadurecimento, possui a vantagem de ser seletiva à espécie química gasosa de interesse e, para alguns casos, permite a detecção de concentrações muito baixas em níveis de partes por trilhão (ppt) (Persijn, 2001).

Durante a pós-colheita boa parte da produção de frutos é perdida devido a ações patogênicas e a fatores físicos, tais como variação de temperatura e injúrias (Martins e Costa, 2003), representando uma menor vida útil dos frutos, chegando muitos a serem perdidos já durante o transporte.

Outro grande problema que afeta a produção agrícola se refere à poluição atmosférica. Estando na lista dos principais poluentes, o ozônio troposférico é responsável por gerar danos em plantas, deixando-as mais sensíveis a estresses ambientais, tais como seca, calor excessivo, ataque de pragas, que resultam em perdas consideráveis à atividade agropecuária (Martins e Rodrigues, 2001).

No Capítulo 2 serão apresentados os objetivos da presente Tese de doutorado. No Capítulo 3, encontra-se a revisão bibliográfica, com as considerações relevantes da espectroscopia fotoacústica, do efeito fotoacústico e das aplicações da fotoacústica na detecção de etileno. Serão abordados

conceitos de ciclo metabólico de etileno, respiração e fotossíntese. Serão descritas as características fisiológicas e comerciais das amostras em estudos (abacate, maracujá e mamão). Conceitos de atmosfera controlada e atmosfera modificada também serão abordados. Por fim, será apresentado o efeito oxidante do ozônio sobre as plantas. No Capítulo 4 serão apresentados montagem e testes de um novo espectrômetro fotoacústico compacto para detecção de etileno em sistemas biológicos. No Capítulo 5 serão apresentados os resultados referentes à aplicação do espectrômetro fotoacústico no monitoramento da taxa de emissão de etileno em frutos de maracujá amarelo submetidos a diferentes tipos de atmosfera modificada sob condições de estresse. No Capítulo 6 serão apresentados os resultados do estresse intensificado pela presença de ozônio em frutos de mamão. No Capítulo 7 serão apresentadas as conclusões da Tese. No final do texto encontram-se três apêndices: A) Escala de classificação de mamão de acordo com a coloração da casca; B) descrição do método de separação de fase para espectroscopia fotoacústica de absorção; C) determinação das curvas de calibração entre os parâmetros de cor do espaço Hunter e a concentração de pigmentos fotossintéticos extraídos da casca do mamão.

Referências Bibliográficas

- ABBOTT, J.A. Quality measurement of fruits and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, 15: 207-225., 1999.
- AZEVEDO, I. G.; OLIVEIRA, J. G.; CORRÊA, S. F.; da SILVA, M. G.; PEREIRA, T.; VARGAS, H.; FAÇANHA, A. R. P-type H⁺-ATPases activity, membrane integrity, and apoplastic pH during papaya fruit ripening. **Postharvest Biology and Technology** , v.48, p.242 - 247, 2008.
- da SILVA, M. G.; LIMA, J.A. P.; SHEL, M. S.; MARÍN, E.; GATTS, C. E. N.; CARDOSO, S. L.; CAMPOSTRINI, E.; PEREIRA, M. G.; CAMPOS, A. C.; MASSUNAGA, M. S. O.; VARGAS, H. Ethylene and CO₂ emissions rates in tropical fruits investigated by infrared absorption techniques. **Analytical Science**, Japan, 17: 534-537, 2001.

- KLUGE, R. A.; NACHTIGAL, J. C.; FACHINELLO, J. V.; BILHALVA, A. B.;
Fisiologia e manejo pós-colheita de frutas de clima temperado.
Livraria e Editora Rural, Campinas, 2 ed., 2002, 214p.
- MARTINS, D.dos S.; COSTA, A. de F. S. da (eds.). **A cultura do mamoeiro:
tecnologias de produção**, Vitória, ES: Incaper, 2003, 497p.
- MARTINS, R. A. e RODRIGUES, G. S. Efeitos potenciais do ozônio
troposférico sobre plantas cultivadas e o biomonitoramento ambiental. In..;
Mudanças Climáticas Globais e a Agricultura Brasileira, **Embrapa**, pp. 143-
165. 2001.
- PERSIJN, S.T. **Photoacoustic trace gas sensing; Applications to fruit and
insects**. Tese (Doutorado) – Universiteit Nijmegen – Holanda. 2001 102p.
- SOUZA, M. S.; OLIVEIRA, J. G.; AZEVEDO, I. G.; CORRÊA, S. F.; da SILVA,
M. G.; PEREIRA, M. G. Resposta da aplicação do 1-MCP em frutos de
mamoeiro 'Golden' em diferentes estágios de maturação. **Revista
Brasileira de Fruticultura** , v.31, p.693 - 700, 2009.
- VARGAS, H.; MIRANDA, L. C. M.; Photothermal techniques applied to
thermophysical properties measurements (plenary), **Review of Scientific
Instruments**, 74 (1): 794-799, 2003.

CAPÍTULO 2

2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é de contribuir para a criação e desenvolvimento de técnicas que possibilitem estudar e monitorar gases em sistemas biológicos, como em frutos tropicais em ambientes de estresse, como a emissão de etileno e dióxido de carbono.

Neste contexto, o presente trabalho tem os seguintes objetivos específicos:

- testar um novo espectrômetro fotoacústico utilizando modulação em comprimento de onda em um laser de cascata quântica para avaliação da taxa de emissão de etileno em frutos do abacateiro;
- avaliar as taxas de emissões de etileno e de dióxido de carbono de frutos de maracujazeiro amarelo submetidos a diferentes atmosferas modificadas;
- estudar o estresse de frutos de mamoeiro submetidos a atmosfera modificada com ozônio analisando a variação da taxa de emissão de etileno e de dióxido de carbono e o efeito sobre a concentração e a atividade dos pigmentos cloroplastídicos da casca dos mesmos.

CAPÍTULO 3

3. Revisão bibliográfica

No presente capítulo serão abordados temas bibliográficos relevantes para o desenvolvimento da presente Tese, tais como os conceitos do efeito fotoacústico e da espectroscopia fotoacústica. Também será apresentado uma revisão do processo bioquímico de produção de etileno, respiração e fotossíntese, características da fisiologia pós-colheita do maracujá, do abacate e do mamão, atmosfera controlada e modificada e o efeito do ozônio sobre as plantas.

3.1. Fotoacústica

A Espectroscopia Fotoacústica é uma técnica que deriva da interação da radiação eletromagnética com a matéria através de um fenômeno conhecido como efeito fotoacústico. A primeira notícia do efeito fotoacústico, que é o mais antigo entre os fenômenos fototérmicos, data de 1880. Este fenômeno foi descoberto por Alexander G. Bell em suas experiências com o fotofone (Almond e Patel, 1996). O efeito fotoacústico foi redescoberto no início da década de 70 com o aparecimento do laser, e o desenvolvimento da eletrônica, como novos microfones e amplificadores. Com o surgimento do modelo RG,

conhecido como a teoria de Rosencwaig e Gersho (Rosencwaig,1980; Almond e Patel, 1996), na década de 70, descreveu-se o efeito fotoacústico e o conceito de ondas térmicas, conduzindo a um número extraordinariamente grande de novos esquemas experimentais de detecção com várias aplicações (Sigrist, 1994; Miklós e Hess, 2000; Sigrist *et al.*, 2001; Vargas e Miranda; 2003).

As primeiras análises gasosas utilizando a espectroscopia fotoacústica foram realizadas por Viengerov (1938) e posteriormente por Luft (1943), permitindo a análise de gases com concentrações na faixa de ppm (parte por milhão) (Sigrist, 1994). A teoria da geração e detecção fotoacústica de gases foi esboçada principalmente por Kerr, Atwood e Kreuzer citados por Sigrist (1994). Desde então, os aspectos do efeito fotoacústico têm sido revisados por diversos autores (Meyer e Sigrist, 1990; Miklós e Hess, 2000; Sigrist *et al.*, 2001; Thöny e Sigrist, 2001; Vargas e Miranda; 2003).

Um sistema fototérmico é constituído basicamente por quatro componentes: uma fonte de excitação, um modulador, um detector e um processador de sinal. Para produzir a excitação, podem ser utilizadas fontes de radiação incoerentes, como lâmpadas de arco-voltaico e lâmpadas de filamentos metálico e/ou cerâmico; ou coerentes, como lasers de CO₂, de CO, de hélio-neônio, de argônio, entre outros. O modulador pode ser mecânico, utilizando um disco circular com furos; elétrica direta, onde um circuito altera diretamente a corrente do laser; ou modulação por um componente eletro-óptico, onde o feixe de laser passa por um cristal não-linear que funciona como um polarizador onde é aplicado um campo elétrico modulado. O nome da técnica de detecção depende, geralmente, do tipo de detector. Por exemplo, quando um microfone é utilizado a técnica é denominada fotoacústica.

Para o processamento do sinal necessita-se de um sistema que permita extrair dados de qualidade, otimizando a relação sinal-ruído. Geralmente um amplificador “Lock-in” é utilizado, fornecendo um sinal vetorial de saída que contém a amplitude e a fase do sinal fototérmico em relação a uma frequência de referência (Miklós *et al.*, 2001).

A ciência fototérmica abrange uma vasta quantidade de técnicas e fenômenos que se baseiam na conversão da energia de excitação em calor. A onda eletromagnética incidente sobre a amostra interage com seus átomos ou

moléculas excitando estados elétricos ou vibracionais (Almold e Patel, 1996). O decaimento para o estado fundamental envolve uma série de emissões radiativas e não radiativas (Figura 3.1). Os decaimentos não radiativos resultam, geralmente, em um aquecimento do material.

Assim esse processo de aquecimento, denominado de efeito fototérmico, é a base de diferentes técnicas. Entre as técnicas fototérmicas, pode-se acentuar a espectroscopia fotoacústica, primeira da família das técnicas fototérmicas; consistindo-se na geração de um sinal acústico dentro de uma câmara fechada (célula fotoacústica) devido à absorção de radiação modulada (ou pulsada) por uma amostra colocada no interior célula. A absorção da radiação modulada causa um aquecimento periódico da amostra (Rosencwaig, 1980; Haisch e Niessner, 2002). O aquecimento periódico causa, por sua vez, uma expansão local do volume que passa a ser tratada como uma onda de pressão com intensidade proporcional à quantidade de amostra. Por fim, utilizando um microfone bastante sensível no interior da célula, é possível detectar a onda mecânica gerada no processo fotoacústico. A Figura 3.1 resume as etapas pelas quais o gás passa até a detecção das ondas acústicas.

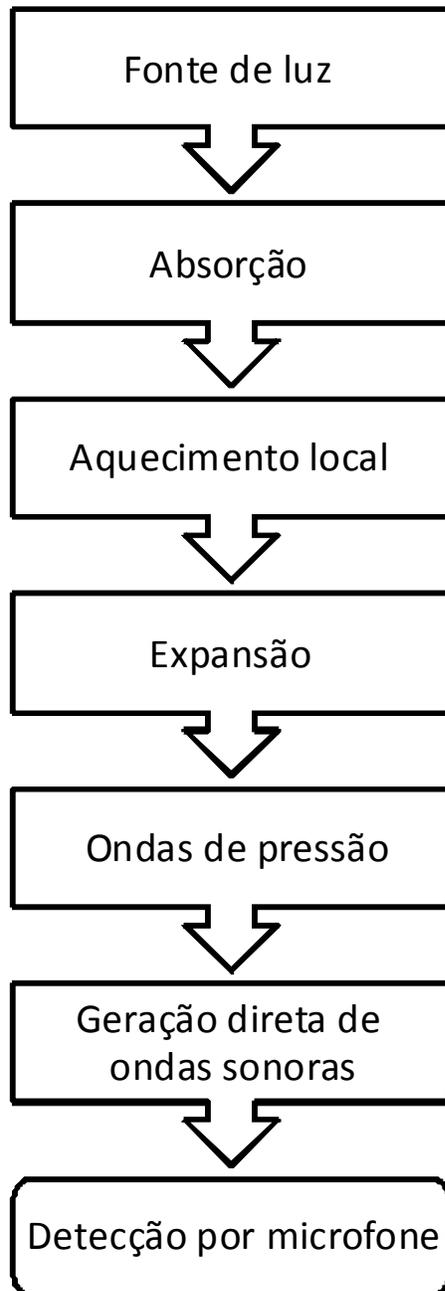


Figura 3.1 – Diagrama dos processos físicos que ocorrem no gás, a começar pela excitação e terminando na detecção do som por microfones (Shimid, 2006).

De acordo com o tipo de amostra a ser analisada, usa-se determinado tipo de célula. Por exemplo, no caso de análise de materiais sólidos, a célula fotoacústica aberta (OPC) é muito empregada, possibilitando a caracterização de propriedades termofísicas intrínsecas dos materiais de maneira muito eficaz

(Marquezini *et al.*, 1991). Na análise de gases, utiliza-se em particular células fotoacústicas ressonantes. A célula fotoacústica ressonante é projetada de modo a garantir alta sensibilidade, rápida resposta e baixos níveis de ruídos eletrônicos e acústicos, estes provocados pelo fluxo de gás (Bijnen *et al.*, 1996; Nägele e Sgrist, 2000; Miklós *et al.*, 2001; Sgrist *et al.*, 2001; Persijn *et al.*, 2002).

Uma grande aplicação da espectroscopia fotoacústica de gases é a medição da taxa de emissão de etileno e de CO₂ em órgãos vegetais. Para tais aplicações, têm-se utilizado como fonte de radiação a luz laser de CO₂ e de CO (Oomens *et al.*, 1998; da Silva *et al.*, 2001; Persijn, 2001). São encontrados na literatura trabalhos sobre o comportamento da taxa de emissão de etileno e CO₂ em frutos como tomate, pêra, maçã e cereja (de Vries, 1994; de Vries *et al.*, 1995; de Vries *et al.*, 1996; Zuckermann *et al.*, 1997). Também é encontrado na literatura trabalhos que utilizam a espectroscopia fotoacústica na análise respiratória e na taxa de emissão de etileno em sementes de feijão germinadas em soluções de insulina (Baptista-Filho *et al.*, 2005).

Deve-se destacar também estudos realizados na área de pós-colheita, por exemplo, o efeito do tratamento térmico nas taxas de emissão de etileno e de dióxido de carbono na espécie *Carica papaya* L., durante a fase de amadurecimento do fruto. O tratamento térmico é uma exigência do mercado externo, onde o mamão é submetido a um tratamento térmico a partir de sua imersão em água quente (49° C), e posteriormente, em água fria (12° C) para eliminar a infestação de larvas de mosca-das-frutas, controle de antracnose e podridão peduncular. Este tratamento pode apresentar uma redução do “tempo de prateleira” dos frutos, na antecipação da ocorrência do pico climatérico (da Silva *et al.*, 2003). Outro aspecto importante é a influência do etileno na qualidade fisiológica de sementes de mamão (da Silva *et al.*, 2004a). A fim de reduzir o efeito autocatalítico durante o amadurecimento de mamão, tem sido utilizado o permanganato de potássio (KMnO₄), que é um absorvedor de etileno. O monitoramento da taxa de emissão de etileno, através da espectroscopia fotoacústica, em frutos de mamão expostos ao permanganato de potássio mostra resultados importantes para possíveis aplicações em atmosfera modificada (Corrêa *et al.*, 2005).

3.2. Ciclo do etileno

O etileno é um hormônio gasoso existente em plantas. Este hormônio tem como precursor primário o aminoácido metionina, como intermediário o SAM (S-adenosilmetionina) e como precursor imediato o ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) (Abeles *et al.*, 1992). A etapa que converte o ACC em etileno é catalizada pela enzima ACC oxidase. O aumento na produção de etileno na fase climatérica ocorre porque a ACC oxidase é ativada, havendo conversão do ACC em etileno. Este etileno produzido, por sua vez, induz uma maior atividade da síntese de ACC, caracterizando, assim, a produção autocatalítica de etileno, característica nos frutos climatéricos. A maior produção de etileno deve-se também à reciclagem da metionina durante o período climatérico através do ciclo de Yang (Yang e Hoffman, 1984) (Figura 3.2). Esta reciclagem contribui para um aumento na produção de etileno (Abeles *et al.*, 1992).

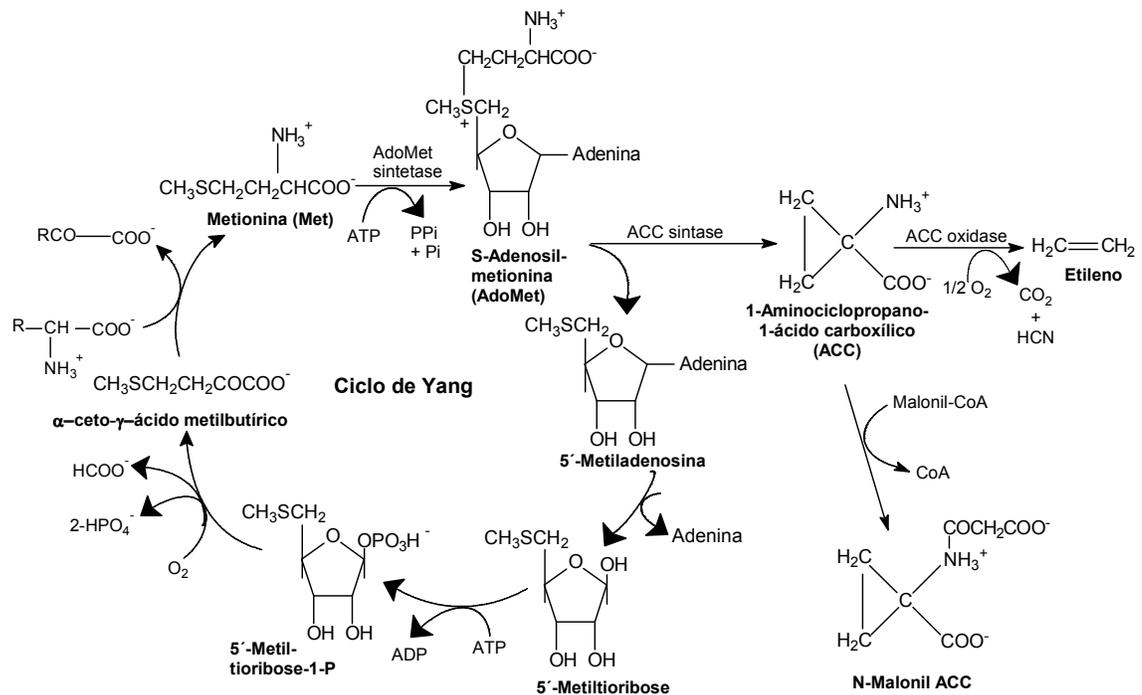


Figura 3.2 – Rota da biossíntese do etileno e o ciclo de regeneração da metionina (Abeles *et al.*, 1992).

O etileno está presente em muitos órgãos dos vegetais superiores, sendo a sua concentração dependendo do estágio de desenvolvimento da planta. O etileno regula o amadurecimento de frutos e também está associado a processos como a senescência e abscisão de frutos e flores, desenvolvimento de pêlos radiculares, crescimento de plântulas e a abertura de gancho plumular. O etileno também regula a expressão de vários genes, incluindo aqueles relacionados ao amadurecimento e a defesa de patógenos (Lieberman, 1979; Kende, 1993).

3.3. Respiração

A respiração é o principal processo fisiológico que ocorre após a colheita de frutos. A respiração consiste na decomposição oxidativa de substâncias complexas presentes nas células, como polissacarídeos (amido), açúcares simples (glicose e frutose), ácidos orgânicos, proteínas e lipídeos em moléculas simples, CO₂ e H₂O, com produção de energia (Taiz e Zeiger, 2006).

O tipo e a intensidade de atividade fisiológica pós-colheita determinam, em grande extensão, a longevidade do fruto durante o armazenamento na etapa pós-colheita. As mudanças químicas, após a colheita dos frutos são direta ou indiretamente relacionadas com atividades oxidativas e fermentativas, designadas como oxidações biológicas (Kluge *et al.*, 2002).

Um fator determinante na longevidade do fruto na fase pós-colheita é o tipo ou padrão respiratório apresentado por esse. Os frutos podem ser classificados como climatéricos ou não climatéricos em função do padrão respiratório. Os frutos climatéricos são aqueles que apresentam, em determinada etapa do seu desenvolvimento, um aumento rápido e acentuado na atividade respiratória, com amadurecimento imediato. Podem amadurecer na planta ou fora dela, se colhidos após a maturidade fisiológica. Os frutos não climatéricos apresentam atividade respiratória relativamente baixa, com ligeiro declínio após a colheita. Esses frutos não são capazes de completar o processo de amadurecimento, mesmo sendo colhidos maduros fisiologicamente, devendo se colhidos quando atingir a máxima qualidade na planta. Após a colheita, o fruto apresenta um metabolismo independente da

planta mãe e usa, como substrato para suas funções vitais, as reservas acumuladas durante seu desenvolvimento (Wachowicz e Carvalho, 2002).

3.4. Fotossíntese

A etimologia da palavra fotossíntese significa “síntese através da luz”. A fotossíntese é o único processo biológico capaz de captar a luz solar e convertê-la em outras formas de energia com a relevância para o balanço de carbono na atmosfera. A fotossíntese envolve basicamente a captação da luz solar, a oxidação da molécula da água com a concomitante liberação de oxigênio e a redução de dióxido de carbono atmosférico em compostos orgânicos, especialmente carboidratos (Taiz e Zeiger, 2006).

Todas as plantas superiores e algas, juntamente com certas espécies de bactérias, são capazes de converter energia luminosa em energia química por meio da fotossíntese. O tecido fotossintético mais ativo das plantas superiores é o mesofilo. As células do mesofilo possuem muitos cloroplastos, os quais contêm os pigmentos verdes especializados na absorção da luz, as clorofilas. Os cloroplastos constituem a unidade funcional do processo de fotossíntese, constituída por uma membrana dupla de natureza protéica que circunda uma matriz fluida rica em enzimas, o estroma. A membrana pode sofrer invaginações para a região interna do cloroplasto, dando origem aos tilacóides, que contêm os centros de reação, os complexos pigmentos-proteínas do sistema antena e a maior parte das enzimas carregadoras de elétrons (Wachowicz e Carvalho, 2002).

As clorofilas, os carotenóides e as bacterioclorofilas (pigmentos encontrados em algumas bactérias) são os pigmentos típicos dos organismos fotossintéticos. As clorofilas *a* e *b* são abundantes nas cores verdes. A clorofila *a* apresenta picos máximos de absorção aos 665 nm e 465 nm, enquanto a clorofila *b* apresenta picos máximos de absorção aos 642 nm e 453 nm devido. Os carotenóides imprimem uma coloração alaranjada, pois possuem bandas de absorção na região dos 400 nm a 500 nm (Taiz e Zeiger, 2006).

A fotossíntese pode ser didaticamente dividida em duas fases distintas. A fotoquímica, responsável pela produção de compostos ricos em energia e a

fase bioquímica, responsável pela incorporação do CO_2 proveniente da atmosfera em compostos orgânicos (Kluge *et al.*, 2002).

O primeiro evento que ocorre na fase fotoquímica da fotossíntese é a captação de energia solar por pigmentos. Uma parte da energia luminosa absorvida pelas clorofilas e carotenóides é armazenada na forma de energia bioquímica por meio de compostos ricos em energia como ATP (adenosina trifosfato) e o NADPH_2 (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido). A conversão de energia luminosa em energia química é um processo complexo que depende da cooperação de um grande número de pigmentos e um grande número de proteínas que realizam a transferência de elétrons. A maior parte dos pigmentos funciona como um sistema antena, captando energia luminosa e transferindo esta parte para um centro de reação onde ocorrem reações químicas que resultam na formação de compostos ricos em energia (Wachowicz e Carvalho, 2002).

Os centros de reações e a maior parte dos complexos antena são compostos integrais dos complexos fotossistema I (PSI) e fotossistema II (PSII). O fotossistema I absorve preferencialmente luz na faixa do vermelho-distante com comprimento de onda próximo de 700 nm; o fotossistema II absorve preferencialmente a luz na faixa do vermelho com comprimento de onda de 680 nm e é muito fracamente estimulado pelo vermelho-distante (Taiz e Zeiger, 2006).

A fase escura da fotossíntese é caracterizada por reações bioquímicas dependentes da temperatura e de concentrações endógenas de CO_2 . A fase bioquímica emprega poder redutor na forma de NADPH_2 e energia química na forma de ATP para redução de CO_2 atmosférico. O NADP reduzido, assim como o ATP, requeridos pela fase bioquímica, são gerados pela fase fotoquímica. As reações bioquímicas responsáveis pela fixação do CO_2 são catalisadas por enzimas hidrossolúveis encontradas no estroma (Kluge *et al.*, 2002).

A produção de energia pela fotossíntese e sua utilização pelo processo respiratório são eventos primordiais do metabolismo vegetal. Na fase pós-colheita de frutos, a fotossíntese torna-se limitada (mas presente) e os órgãos de armazenamento, se maduros, utilizam suas reservas metabólicas para a manutenção das reações de síntese (Wachowicz e Carvalho, 2002).

3.4.1. Emissão da fluorescência da Clorofila a

As moléculas de clorofila absorvem a energia luminosa (fótons) e alteram temporariamente as suas configurações eletrônicas de um estado basal para um estado de mais alta energia muito mais instável e de vida curta (aproximadamente de 8 a 10 nanosegundos). Essas moléculas tendem a dissipar a energia recebida por meio de algumas vias como:

- *Dissipação Fotoquímica*: utilização da energia luminosa para os processos fotoquímicos (doação do elétron proveniente da molécula de água para um aceptor oxidado denominado NADP^+ - Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato oxidado);
- *Dissipação Não-Fotoquímica*: produção de calor na forma de radiação infravermelha;
- *Fluorescência*: emissão de radiação na região do visível (vermelho) (Maxweel e Johnson, 2000);
- *Interconversões*: transferência de energia entre as moléculas dos pigmentos por ressonância.

A fluorescência emitida pelas clorofilas do complexo antena do PSII pode ser dividida em dois componentes constantes e um variável. Os componentes constantes são a fluorescência mínima (F_0), medida quando todos os centros de reação estão abertos e a fluorescência máxima (F_m), medida quando todos os centros de reação estão fechados (ambas em adaptação ao escuro). O componente variável é a fluorescência variável (F_v), a qual é determinada pelo estado do centro de reação, e é definida como a diferença entre F_m e F_0 . Através destes componentes é possível ainda determinar o rendimento quântico do PSII, dado pela razão F_v/F_m , a qual expressa a capacidade do sistema de converter a energia luminosa em energia química (Van Kooten e Snel, 1990).

As variáveis acima descritas podem ser medidas utilizando-se técnicas de fluorescência modulada. Tais técnicas fornecem informações dos transientes que ocorre, na escala de segundos, consistindo em aplicar um feixe de luz modulada de baixa intensidade para excitar as moléculas de clorofila a do PSII. A fluorescência induzida por esta luz é seletiva, sendo detectada

através de um sistema de detecção por resolução de fase. A fluorescência detectada quando somente a luz modulada de baixa intensidade é aplicada, corresponde a F_0 . Para determinar F_m , aplica-se um pulso de luz de alta intensidade, ou seja, um pulso de luz saturada, de forma que todos os centros de reação sejam fechados (Maxweel e Johnson, 2000).

3.5. Características fisiológicas das amostras estudadas

3.5.1. Abacate

O abacateiro é uma planta da família Laureaceae originário da América tropical, tendo como centro de origem o México e a América Central. Seu cultivo se estende em quase todas as zonas tropicais e subtropicais, porém, seu cultivo tem importância econômica apenas no Brasil, Estados Unidos da América, África do Sul, Havaí, Austrália e Israel (Gomes, 2007). O abacateiro chegou ao Brasil em 1809 através da Guiana Francesa, mas só teve uma importância econômica a partir de 1920 com a introdução de variedades vindas dos Estados Unidos. Em 2007, a produção de abacate foi de 154.096 toneladas em todo o Brasil. Os estados que obtiveram maior produção naquele ano foram São Paulo, Minas Gerais e Paraná, respectivamente (IBRAF, 2009).

Pertencente ao gênero *Persea*, duas espécies mais cultivadas são as *Persea americana* Mill e *Persea americana* var. *drymifolia*. Entre as variedades mais cultivadas destacam-se: Pollock, Linda, Wagner, Collinson, Prince, Simmonds, Fortuna, Quintal e Fuerte. A Fuerte é muito cultivada nos Estados Unidos e Israel, sendo este o principal fornecedor de abacate para o mercado consumidor europeu (Simão, 1998). A Figura 3.3 mostra foto de abacates.



Figura 3.3 – Foto de quatro amostras de abacate.

O fruto do abacateiro é uma drupa exibindo grande variação na forma, no tamanho e na cor. Em relação à forma podem ser arredondados, oblongos, obovados, piriformes e ovolados. A cor da casca pode variar de verde-claro, verde, verde-escuro, verde-pardo a avermelhado ou arroxeado. A casca pode ser fina e delicada como também pode ser espessa e lenhosa. A polpa tem consistência amanteigada, de cor verde creme, envolvendo uma semente grande. A polpa apresenta teor entre 5 e 25% de óleo, dependendo da espécie. É potencialmente rica em sais minerais, com conteúdo elevado de proteínas e teor variável de vitaminas, sendo as mais importantes as do complexo B, as vitaminas A e E, e com baixo teor de vitamina C (Tongo *et al.*, 2004).

3.5.2. Maracujá

O maracujá, do tupi *mara kuya*, que significa “fruto que se serve em cuia”, é um fruto pertencente a família Passifloraceae que está largamente

distribuída pelas regiões tropicais. A maioria das 530 espécies catalogadas tem como origem a América Tropical, sendo o Brasil um dos principais centros de diversidade genética dessa família, contando com mais de 150 espécies nativas. O gênero com maior número de espécies e com o maior número de espécies cultivadas no mundo é o *Passiflora* (Nascimento *et al.*, 1999).

A espécie mais cultivada e comercializada no Brasil é o maracujá amarelo (*Passiflora edulis*), também conhecido como maracujá azedo (Figura 3.4). Essa espécie é amplamente consumida em todo o país, devido a sua qualidade na produção de suco ácido, de coloração amarelada, rico em vitaminas, minerais e fibras, sendo bastante apreciado pelo sabor e aroma agradável. Além dos frutos serem bastante comercializado *in natura*, também tem um alto valor comercial para processamento, para preparo de refrescos, sorvetes e conservantes e é também utilizado na indústria de cosméticos (Durigan *et al.*, 2004).



Figura 3.4 – Foto do maracujá amarelo.

O Brasil é um dos maiores exportadores de maracujá. O Brasil junto com Colômbia, Equador e Peru são responsáveis por 90% da exportação de suco concentrado. Segundo o IBRAF (2009), a produção de maracujá amarelo no Brasil foi de 664.286 toneladas em 2007. Podendo, porém, ter sido considerado o número total de frutos maior ainda, uma vez que é difícil contabilizar o total de frutos devido ao fato da produção estar ligada a pequenas propriedades (Gomes, 2007).

Devido às boas condições de plantio nas regiões tropicais e subtropicais, que favorecem o desenvolvimento do fruto, a cultura do maracujazeiro amarelo é explorada comercialmente de Norte a Sul no território brasileiro. Isso representa 95% da produção desta espécie no Brasil, enquanto os demais 5% são destinados as espécies de maracujá roxo e maracujá doce (Bernacci *et al.*, 2003).

O fruto do maracujazeiro amarelo é uma baga, de formato que varia entre ovalado e redondo, com uma grande variação de tamanho. A casca do maracujá amarelo tem a textura coreácea, e durante o amadurecimento sofre mudança de cor verde para amarela (Cunha *et al.*, 2004). Esta espécie possui cerca de 200 a 300 sementes recobertas pelo arilo carnosos, onde se encontra retido um suco amarelo, aromático e nutritivo (Ruggiero *et al.*, 1996). Sua polpa é constituída por carboidratos, proteínas, lipídios, minerais e vitaminas. Destacam-se entre os minerais o cálcio, o fósforo, e o ferro. Entre as vitaminas, pode-se destacar o retinol, a tiamina, a riboflavina, a niacina e o ácido L-ascórbico (Nascimento *et al.*, 1999).

3.5.3. Mamão

O mamoeiro pertence à classe Dicotyledoneae, subclasse Archichlamydeae, ordem Vitales, subordem Caricineae, família Caricaceae e gênero *Carica*. A família Caricaceae possui cinco gêneros e 34 espécies, nativas da zona neotropical, excetuando-se apenas duas da África Equatorial. O gênero *Carica* possui duas seções: seção *Carica* (*C. papaya* L.) e seção *Vasconcella* (Martins e Costa, 2003).

Dentro do gênero *Carica*, a espécie *C. papaya* L. é a única conhecida comercialmente. Entretanto, algumas outras espécies possuem características

valiosas, que poderiam ser úteis em programas de melhoramento genético de mamoeiro da espécie *C. papaya* L (Lobo e Cano, 1998).

Conforme o tamanho e a origem dos frutos, as plantas hermafroditas podem ser classificadas em dois grupos distintos, o grupo Solo e o grupo Formosa. Os genótipos que têm sido mais utilizados nas regiões produtoras no país são: Sunrise Solo, Improved Sunrise Solo (ISS) Line 72/12, Baixinho de Santa Amália, Golden e Taiwan do grupo Solo; Tainung nº 1 do grupo Formosa e o híbrido UENF/Caliman 01 (Martins e Costa, 2003; da Silva *et al.*, 2007).

A cv. Golden é proveniente da seleção massal de plantas, realizadas em campos de produção de 'Sunrise Solo'. Possui fruto hermafrodita de formato piriforme, cor da polpa rosa-salmão, cavidade interna estrelada, casca lisa, tamanho uniforme, com peso médio de 450 g e excelente aspecto visual (Martins e Costa, 2003). No estágio verde apresenta cor da casca verde mais claro que a variedade que lhe deu origem. Tem boa aceitação no mercado internacional, porém com o teor de sólidos solúveis dos frutos e produtividade inferiores ao 'Sunrise Solo' (Lobo e Cano, 1998).

A figura 3.5 mostra o exemplo de um mamão cv. Golden no estágio 0 (de acordo com a tabela apresentada no apêndice C) de amadurecimento.

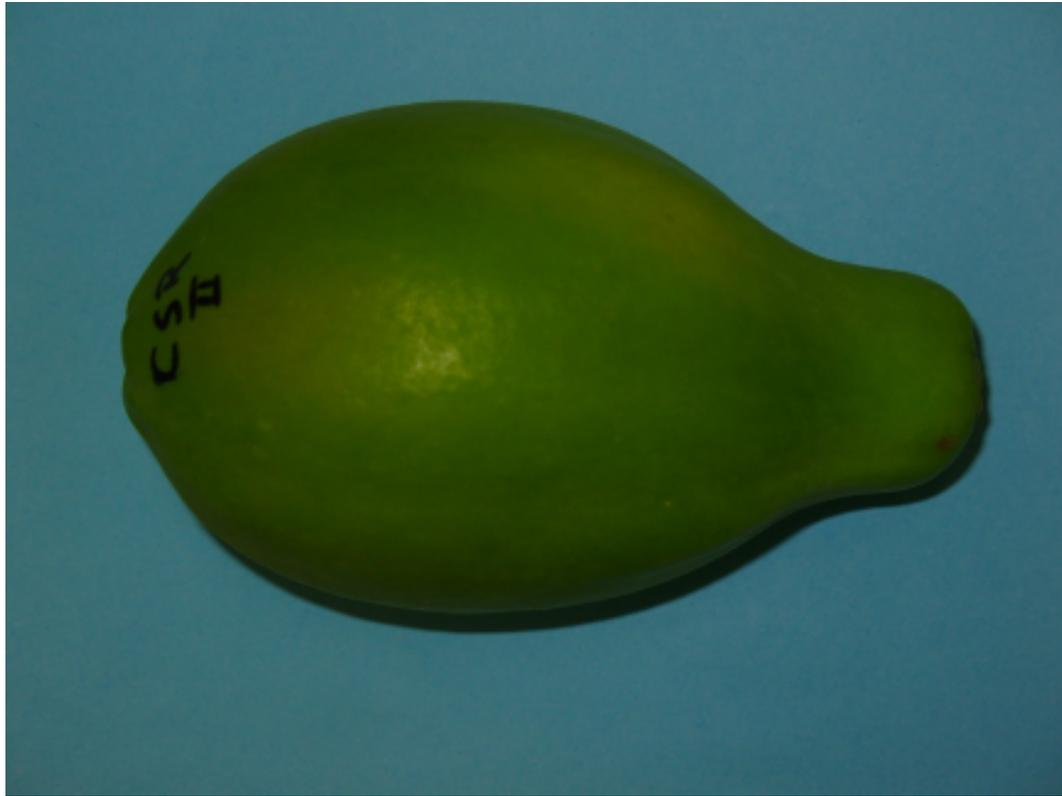


Figura 3.5 – Foto de mamão cv. Golden no estágio 0 de maturação.

O mamão é cultivado em todos os Estados da Federação. Na região Sudeste e no sul da Bahia a cultura apresenta um rendimento muito elevado e é assim considerada a região de maior produção de fruto por área. Destaca-se nesta região o rendimento das lavouras do Estado do Espírito Santo nos municípios de Pinheiros como o maior produtor de mamão Formosa e Linhares com o mamão Solo. Uma das razões da alta produtividade do mamão no Espírito Santo é o alto nível tecnológico aplicado em suas lavouras (Martins e Costa, 2003). Em 2007 o Brasil exportou cerca $3,2 \times 10^7$ Kg de mamão e $3,0 \times 10^7$ Kg em 2008 (IBRAF, 2009).

Durante a etapa de pós-colheita é de vital importância o conhecimento da fisiologia do desenvolvimento do mamão para determinar o ponto ideal de colheita. O mamão é um fruto que se caracteriza por uma vida pós-colheita relativamente curta, completando o seu amadurecimento em média de 8 a 15 dias, dependendo da cultivar; sendo também sujeito a perdas pós-colheita devido a patógenos ou por fatores abióticos (EMBRAPA, 1994). É necessária uma definição prévia sobre o melhor estágio de maturação no momento da

colheita, levando em consideração o meio de transporte e as exigências de exportação para atender as necessidades do mercado consumidor (EMBRAPA, 2002). Assim, alguns caracteres dos frutos devem ser considerados, tais como: tamanhos uniformes, ausência de manchas, casca amarelo-claro quando maduro; polpa grossa com cavidade interna pequena; alto teor de açúcares, ausência do odor almiscarado e longevidade pós-colheita (Abbott, 1999).

Como o mamão é um fruto climatérico, um aspecto importante é a determinação das taxas de emissão de etileno (C_2H_4) e de dióxido de carbono (CO_2) no período pós-colheita.

3.6. Atmosfera controlada e atmosfera modificada

O uso de elevadas concentrações de CO_2 em ambientes de armazenamento de frutos e hortaliças tem efeito positivo na redução de danos provocados por insetos e microorganismos. O acúmulo de CO_2 na atmosfera de armazenamento, provocado pela própria respiração do fruto (ou hortaliça), pode retardar o processo fisiológico de armazenamento e não deixando resíduos tóxicos no ambiente ou no fruto (ou hortaliça). Entretanto, alguns frutos e hortaliças são sensíveis a níveis elevados de CO_2 , onde sintomas de desordens fisiológicas são apresentadas (Chitarra e Chitarra, 2005).

Combinação de níveis de CO_2 acima do limite de tolerância com tempo de exposição em temperaturas específicas pode resultar em estresse (Smock, 1979). A manifestação de estresse ocorre com o aparecimento dos seguintes sintomas: aumento da taxa de emissão de etileno; amadurecimento irregular ou ausente; inibição e, ou, agravamento de desordens fisiológicas; aumento da suscetibilidade a doenças (Chitarra e Chitarra, 2005).

Nem sempre o elevado nível de CO_2 no ambiente de armazenamento pode variar a taxa de emissão de etileno em frutos, o que depende da espécie e das condições físicas e químicas do presente ambiente. Para que haja o aumento na produção de etileno em frutos, durante e/ou após a exposição ao CO_2 , é necessário que a concentração desse elemento seja alta o suficiente para que mudanças parciais das condições aeróbicas e anaeróbicas ocorram, ou por outros mecanismos de vias metabólicas (Brackman e Chitarra, 2000).

O aumento da emissão de etileno provocado pelo CO₂ geralmente é resultado da ativação de enzimas envolvidas no processo de biossíntese do etileno, como o estímulo tanto a síntese da ACC sintase (ACS) como da ACC oxidase (ACO), os quais são enzimas-chaves na produção de etileno (Abele *et al.*, 1992).

As concentrações de CO₂ que geralmente podem causar estresse variam entre 5% a 25% ou mais (Brackman e Chitarra, 2000). Produtos como pepino e cogumelo são extremamente resistentes, superando concentrações de até 50% de CO₂ (Chitarra e Chitarra, 2005). Já o kiwi é sensível a presença de CO₂ no ambiente de armazenagem, porém tolera concentrações de 5%. Para que efeitos positivos ocorram no armazenamento de produtos agrícolas faz-se necessário o estudo de atmosferas modificada e controlada com variações de CO₂ e O₂.

O uso no armazenamento de frutos e hortaliças pela atmosfera controlada (AC) consiste basicamente no prolongamento da vida pós-colheita desses produtos, através da modificação e controle dos gases no meio de armazenagem. Sendo a composição natural da atmosfera de 78% de nitrogênio, 21% de oxigênio, 0,04% de dióxido de carbono e pequenas porcentagens de outros gases, a AC tem como princípio o controle das concentrações de O₂ e CO₂. Seu princípio básico é diminuir a concentração de oxigênio e aumentar a concentração de dióxido de carbono, de acordo com as respostas metabólicas de cada produto armazenado na AC (Brackman e Chitarra, 2000).

O armazenamento pela atmosfera modificada (AM) baseia-se geralmente na alteração da atmosfera ambiente, permitindo que a concentração de CO₂ proveniente do próprio produto aumente e a concentração de O₂ diminua, à medida que ele é utilizado pelo processo respiratório. Neste tipo de armazenagem, as concentrações de oxigênio e de dióxido de carbono não são controladas, variando com o tempo, temperatura e tipo de embalagem utilizada para o armazenagem. Outro exemplo de atmosfera modificada é a aplicação permanganato de potássio (KMnO₄) ou produtos a base dessa espécie química com o objetivo de absorver o etileno dentro da câmara de armazenagem, evitando, assim, um amadurecimento precoce dos frutos (Chitarra e Chitarra, 2005).

3.7. Ozônio

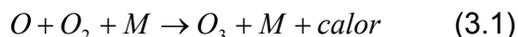
3.7.1. Ozônio: estratosfera e troposfera

Os principais componentes da atmosfera terrestre, desconsiderando o vapor de água, são 78% composto de moléculas de nitrogênio, 21% formado por moléculas de oxigênio, 1% de argônio e 0,04% de dióxido de carbono. Contudo, outras moléculas presentes na atmosfera estão relacionadas a muitos processos químicos importantes que ocorrem no ar, do ponto de vista ambiental. Uma dessas moléculas é o ozônio, que exerce diferentes papéis de acordo com sua localização na atmosfera (Bair, 2002).

De acordo com a evidência experimental, a estrutura do ozônio é dobrada, com simetria semelhante à molécula de água, com distância entre cada átomo de O (O – O) de 1,272 Å e ângulo (O - O – O) de 116,78 Å (Tanaka & Morino, 1970). Ozônio é uma molécula polar com um momento de dipolo 0,5337 D. O ponto de ebulição do ozônio é de -111,9 °C (161,3 K) com uma cor azul escuro e o ponto de fusão do ozônio é de -192,5 °C (80,7 K), com uma cor negro-violeta (Mack & Muentner, 1977).

Na estratosfera, região da atmosfera entre 15km e 50km de altitude, o ozônio é importante para a proteção da vida presente na superfície terrestre. Nesta região, o ozônio é responsável pela formação da camada de ozônio que contribui no processo de filtrar os raios ultra-violeta (UV) nocivos provenientes do Sol antes que esses possam atingir a superfície da Terra, que causaria danos à vida terrestre (Baird, 2002).

Na estratosfera, a maioria dos átomos de oxigênio produzidos pela decomposição fotoquímica do ozônio ou do O₂ reage subsequentemente com moléculas de O₂ intactos para formar novamente ozônio:

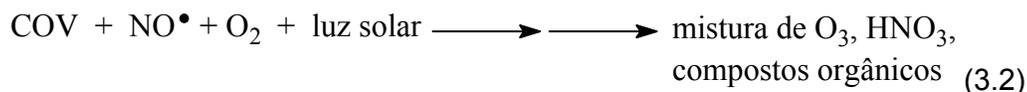


Uma terceira molécula designada como M na equação 3.1, geralmente N₂, é necessária para retirar a energia térmica gerada na colisão entre o oxigênio atômico e a molécula de O₂ (Baird, 2002).

Na troposfera, região da atmosfera que se estende da superfície terrestre até 15km de altura, o ozônio exerce a função de um dos principais forçantes para o efeito estufa e de poluente. A ocorrência de poluição em áreas urbanas no mundo é decorrente, muitas das vezes, do alto nível de ozônio troposférico.

O ozônio troposférico é formado por reações envolvendo compostos orgânicos encontrados na natureza e a partir de reações envolvendo gases provenientes da queima de combustíveis fósseis induzidos pela luz. Este último fenômeno é denominado de *smog* fotoquímico. A palavra *smog* é uma combinação de *smoke* (fumaça) e *fog* (neblina), caracterizado como “uma camada de ozônio no lugar errado” (Baird, 2002). O processo de formação do *smog* abrange centenas de reações diferentes, envolvendo um número indeterminado de reações químicas que ocorrem simultaneamente. Os reagentes originais mais importantes nas ocorrências de *smog* fotoquímico são o óxido nítrico, NO[•], e os hidrocarbonetos, que são poluentes emitidos no ar, provenientes da queima incompleta dos motores de combustão interna e de outras fontes. Os hidrocarbonetos gasosos também estão presentes no ar urbano como resultado de combustíveis líquidos, da evaporação de solventes e outros compostos orgânicos. De forma geral, os hidrocarbonetos e seus derivados que vaporizam facilmente são denominados de compostos orgânicos voláteis (COVs) (Baird, 2002). Entre os COVs mais reativos são os hidrocarbonetos que apresentam dupla ligação entre os carbonos como, por exemplo, a molécula de etileno (Souza e Carvalho, 2001).

A luz solar também é um fator importante no processo *smog* fotoquímico, aumentando a concentração de radicais livres que participam deste processo. Os produtos finais do processo do *smog* fotoquímico são o ácido nítrico, compostos orgânicos parcialmente oxidados e o ozônio, exemplificado por:



Substâncias como NO[•], hidrocarbonetos e outros COVs que são emitidos inicialmente no ar são classificados como poluentes primários e os

poluentes secundários são aqueles que são gerados, como o ozônio e o HNO_3 (Baird, 2002). O fato de poluentes primários e secundários serem facilmente transportados por correntes de ar a longas distâncias, muitas áreas que apresentam emissões esporádicas encontram-se sujeitas a casos regulares de alto nível de ozônio troposférico, como é o caso de meios rurais (Martins e Rodrigues, 2001).

3.7.2. Indicadores de ação do ozônio nas plantas

As plantas têm diferentes respostas à ação do ozônio. Este pode gerar danos nas atividades enzimáticas, redução da fotossíntese, aumento do processo metabólico do etileno, aceleração da senescência foliar, morte celular, entre outros (Pell *et al.*, 1997; Black *et al.*, 2000). Entretanto, dependendo da concentração de ozônio na atmosfera e de características genéticas, determinadas plantas podem apresentar tolerância ao ozônio. Para uma melhor compreensão do efeito do estresse abiótico provocado pelo ozônio, faz-se necessário uma revisão da suscetibilidade de cloroplastos e a degradação de clorofilas a e b à ação pelo ozônio e a reação deste com etileno.

3.7.2.1. Suscetibilidade de Cloroplastos à indução por ozônio

A exposição de plantas e frutos ao ozônio pode provocar resultado em inibição da fotossíntese, o que se reflete nas alterações na atividade do cloroplasto ou na síntese de proteínas. Em várias plantas, a exposição crônica ao ozônio reduz a abundância da enzima ribulose1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO) na maturidade, mas não em tecidos imaturos de folhas. Esta perda de RuBisCO é o resultado do aumento da degradação de carboidratos (Glick *et al.*, 1995).

Os efeitos do ozônio sobre cloroplasto têm sido observados em várias espécies e em uma ampla gama de condições. A partir desses estudos, puderam-se analisar perdas de uma ou mais capacidade fotossintética, como: redução da atividade do sistema fotossintético I e II, declínio e redução do CO_2 pelo RuBisCO, e, possivelmente, fotoinibição. Esse efeito danoso no cloroplasto

pode ser observado pela degradação das clorofilas (Soja e Soja, 1995; Clark *et al.*, 2000; Herbinger *et al.*, 2002; Degl'innocenti *et al.*, 2003; Calatayud & Barreno, 2004).

3.7.2.2. Etileno como indicador de estresse provocado em plantas por ozônio

Um dos estresses causados pela poluição do ar é a ação tóxica do ozônio que está ligada à produção de etileno nas folhas e nos frutos. O primeiro sinal danoso da reação do ozônio com etileno é a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). O estresse oxidativo provocado por ERO resulta em condições que promovem danos ou morte celular, facilitando a ação de infecção de patógenos e a morte precoce da planta (Mehlhorn *et al.*, 1990; Buchanan *et al.*, 2000; Navabpour *et al.*, 2000; Langebartels *et al.*, 2002). Porém, a presença de H₂O₂, um dos produtos resultantes da reação entre ozônio e etileno, aumenta a produção de ácido salicílico, podendo gerar resistência das plantas aos agentes patógenos (Pell *et al.*, 1997).

O ozônio também pode aumentar de forma direta as atividades da ACC oxidase e da ACC sintase estimulando uma maior produção de etileno (rota da biossíntese de etileno na seção 3.2) (Mehlhorn e Wellburn, 1987; Buchanan *et al.*, 2000). Superprodução de etileno pode acarretar em morte celular levando a senescência foliar e aceleração na maturação de frutos (Smilanick *et al.*, 1999; Black *et al.*, 2000; Achen e Yousef, 2001).

Nos estudos realizados até o momento sobre a ação do ozônio sobre diversas espécies foi observado que o etileno tem a resposta bioquímica mais rápida (Mehlhorn e Wellburn, 1987; Buchanan *et al.*, 2000). São encontrados na literatura trabalhos que apresentam uma maior produção de etileno em tomates expostos ao ozônio. Isso ocorre devido indução do ozônio no aumento da atividade da enzima ACC oxidase, aumentando a produção de etileno e também a formação de radicais livres (entre o ozônio e o etileno) causando morte celular (Nakajima *et al.*, 2001). Também foi observado um aumento na produção de etileno em laranjeiras da espécie *Citrus clementina* Hort. ex Tna. com três anos de idade submetidas ao ataque de ozônio numa concentração

de 2 a 5 ppm de 10 a 15 horas durante 5 dias, sendo observado senescência foliar nessas plantas (Iglesias *et al.*, 2006).

Porém, trabalhos com morango e frutos cítricos como limão siciliano e laranja armazenadas a baixas temperaturas associados à exposição de baixas concentrações de ozônio demonstraram uma boa alternativa no prolongamento da vida pós-colheita desses frutos (Palou *et al.*, 2001; Nadas *et al.*, 2003; Allende *et al.*, 2007). Com isso, condições nas quais o ozônio é aplicado pode, além de provocar estresse oxidativo nos meio biológicos, ser usado no tratamento de conservação pós-colheita de frutos.

Referência Bibliográfica

- ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALTVEIT Jr., M. E. **Ethylene in Plant Biology**, 2ed., San Diego, USA: Academic Press, 1992, 414p.
- ABBOTT, J.A. Quality measurement of fruits and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, 15: 207-225., 1999.
- ACHEN M.; YOUSEF, A. E. Efficacy of ozone against *Escherichia coli* O157:H7 on apples. **Journal of Food Science**, v. 66, p. 1380-1384, 2001.
- ALLENDE, A.; MARÍN, A.; BUENDÍA, B.; TOMÁS-BARBERÁN, F.; GIL, M. I. Impact of combined postharvest treatments (UV-C Light, gaseous O₃, superatmospheric O₂ and high CO₂) on health promoting compounds and shelf-life of strawberries. **Postharvest Biology and Technology**, v. 46, p. 201-211, 2007.
- ALMOND, D.P., PATEL, P. M. (1996) **Photothermal Science and Techniques**, 5. ed. London, UK: Chapman & Hall, 1996, 241p.
- BAIRD, C. **Química Ambiental**, 2 ed. Porto Alegre, BR: Bookman, 2002, 622p.
- BAPTISTA-FILHO, M.; CORRÊA, S.F; da SILVA, L.B.; XAVIER-FILHO, J.; de OLIVEIRA, J.G.; VARGAS, H. Photoacoustic study of ethylene emission and respiration rate of carbon dioxide from insulin germinated beans (*Phaseolus vulgaris* L.) **J. Phys. IV France**, 125: 861-864, 2005
- BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D. Maracujá-doce: o autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2 p. 355-356, 2003.

- BIJNEN, F.G.C.; REUSS, J.; HARREN, F.J.M. Geometrical optimization of a longitudinal resonant photoacoustic cell for sensitive and fast trace gas detection. **Rev. Sci. Instrum.**, 67 (8): 2914-2923, 1996.
- BLACH, V. J.; BLACK, C. R.; ROBERTS, J. A. e STEWART, C. A Impacto f ozone on the reproductive development of plants, **New Phytologia**, Vol. 147, pp. 421-447, 2000.
- BRACKMAN, A.; CHITARRA, A. B. Atmosfera controlada e atmosfera modificada. In: BORÉM, f. m.; CHITARRA, A. B.; **Armazenamento e processamento de produtos agrícolas**. Ed. UFLA, Lavras, p. 133-170,1998.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. USA: American Society of Plant Physiologists, 2000, 1367p.
- CALATAYUD, A.; BARRENO, E. Response to ozone in two lettuce varieties on chlorophyll a fluorescence, photosynthetic pigments and lipid peroxidation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 549-555, 2004.
- CHITARRA M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças**. Ed UFLA, 2d., 2005, 783p.
- CORRÊA, S.F.; BAPTISTA FILHO, M.; SILVA, M.G.; OLIVEIRA, J.G.; AROUCHA, E.M.M.; SILVA, R.F.; PEREIRA, M.G. e VARGAS, H. Effect of the potassium permanganate during papaya fruit ripening: ethylene production. **J. Phys. IV France**, 125:869-871, 2005.
- COULTATE, T.P. **Alimentos: a química de seus componentes**, 3 ed. Porto Alegre: Artimed, 2004, 368p.
- CUNHA, M A. P.; BARBOSA, L. V.; FARIA, G. A. Botânica. In: In: Lima, A. de A.: Cunha, M. A. P. da. **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. p. 13-35, 2004
- da SILVA, M.G.; AROUCHA, E.M.M.; OLIVEIRA, J.G.; CORRÊA, S.F.; BAPTISTA FILHO, M.; da SILVA, R.F.; PEREIRA, M.G. E VARGAS, H. Influência da emissão de etileno na qualidade fisiológica de sementes de mamão (*Carica papaya L.*), **II Reu. de Pes. Do Frutimamão**, Campos dos Goytacaze, 255-261, 2004.
- da SILVA, M. G.; LIMA. J.A. P.; SHEL, M. S.; MARÍN, E.; GATTS, C. E. N.; CARDOSO, S. L.; CAMPOSTRINI, E.; PEREIRA, M. G.; CAMPOS, A. C.;

- MASSUNAGA, M. S. O.; VARGAS, H. Ethylene and CO₂ emissions rates in tropical fruits investigated by infrared absorption techniques, **Analytical Science**, Japan, 17: 534-537, 2001.
- da SILVA, M. G.; SANTOS, E. O.; SHEL, M. S.; CARDOSO, S. L.; CAVALLI, A.; MONTEIRO, A. R.; de OLIVEIRA, J. G.; PEREIRA, M. G.; VARGAS, H. (2003) Effect of heat treatment on ethylene and CO₂ emissions rates during papaya (*Carica papaya*, L.) fruit ripening, **Review of Scientific Instruments**, 74, (1), USA, 2003.
- DURIGAN, J. F.; SGRIST, J. M. M.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C.; VIEIRA, G. Qualidade e tecnologia pós-colheita do maracujá. In: Lima, A. de A.; Cunha, M. A. P. da. **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. p. 283-303, 2004.
- DEGL'INNOCENTI, E.; VACCÀ, C.; GUIDI, L.; SOLDATINI, G. F. CO₂ photoassimilation and chlorophyll fluorescence in two clover species showing different response to O₃. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p. 485-493, 2003.
- EMBRAPA **Mamão Pós-colheita**. 1 ed. Brasília, DF, 2002, 59p.
- EMBRAPA **Mamão para exportação: aspectos técnicos da produção**. 1 ed. Brasília, DF, 1994 52p.
- GOMES, R. P. **Fruticultura brasileira**. Ed. Nobel, São Paulo, 2007 446p.
- GLICK, R. E.; SCHLAGNHAUFER, C. D.; ARTECA, R. N.; PELL, E. J. Ozone-induced ethylene emission accelerates the loss of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and nuclear-encoded mRNAs in senescing potato leaves. **Plant Physiology**, v. 109, p. 891-898, 1995.
- HAISCH, C.; NIESSNER, R. Light and sound-photoacoustic spectroscopy. **Spectroscopy Europe**, 14 (5): 10-15, 2002.
- HERBINGER, K.; TAUSZ, M.; WONISCH, A.; SOJA, G.; SORGER, A.; GRILL, D. Complex interactive effects of drought and ozone stress on the antioxidant defence systems of two wheat cultivars. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 691-696, 2002.
- IBRAF, Estatísticas, Disponível em:<<http://www.ibraf.org.br>>, acesso em Dezembro de 2009.
- IGLESIAS, D. J.; CALATAYUD, A.; BARRENO, E.; PRIMO-MILLO, E.; TALON, M. Responses of citrus plants to ozone: leaf biochemistry, antioxidant

- mechanisms and lipid peroxidation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 125-131, 2006.
- KENDE, H. Ethylene Biosynthesis. **Rev. Plant Physiol**, 44: 283-307, 1993.
- KLUGE, R. A.; NACHTIGAL, J. C.; FACHINELLO, J. V.; BILHALVA, A. B.;
Fisiologia e manejo pós-colheita de frutas de clima temperado. Livraria e Editora Rural, Campinas, 2 ed., 2002, 214p.
- LANGEBARTELS, C.; WOHLGEMUTH, H.; KSCHIESCHAN, S.; GRÜN, S.; SANDERMANN, H. Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 567-575, 2002.
- LIEBERMAN, M. Biosynthesis and action of ethylene. **Rev. Plant Physiol**, 30: 533-591, 1979.
- LOBO, M.G.; CANO, M.P. Preservation of hermaphrodite and female papaya fruits (*Carica papaya* L., Cv Sunrise, Solo group) by freezing: physical, physico-chemical and sensorial aspects. **Z Lebensm Unters Forsch A**, 206: 343-349, 1998.
- MACK, K. M.; MUENTER, J. S. Stark and Zeeman properties of ozone from molecular beam spectroscopy. **Journal of Chemical Physics**, 66, 5278–5283, 1977.
- MARQUEZINI, M.V.; CELLA, N.; MANSANARES, A.M.; VARGAS, H.; MIRANDA, L.C.M. Open photoacoustic cell spectroscopy. **Meas. Sci. Technol.** 2: 396-401, 1991.
- MARTINS, D.dos S.; COSTA, A. de F. S. da (eds.) **A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção**, Vitória, ES: Incaper, 2003, 497p.
- MARTINS, R. A. e RODRIGUE, G. S. Efeitos potenciais do ozônio troposférico sobre plantas cultivadas e o biomonitoramento ambiental. In.; **Mudanças Climáticas Globais e a Agricultura Brasileira**, Embrapa, pp. 143-165, 2001.
- MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N.; Chlophyll fluorescence – a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, 51 (345): 659-668, 2000.
- MEHLHORN, H.; WELLBURN, A. R. Stress ethylene formation determines plant sensitivity to ozone. **Nature**, v. 327, n.4, p. 417-418, 1987.
- MEHLHORN, H.; TABNER, B. J.; WELLBURN, A. Electron spin resonance evidence for the formation of free radicals in plants exposed to ozone. **Physiologia Plantarum**, v. 79, p. 377-383, 1990.

- MEYER, P.L.; SIGRIST, M.W. Atmospheric pollution monitoring using CO₂-laser photoacoustic spectroscopy and other techniques. **Rev. Sci. Instrum.** 61 (7): 1779-1807, 1990.
- MIKLÓS, A.; HESS, P. Modulated and Pulsed Photoacoustics in Trace Gas Analysis. **Analytica Chemistry**, 72 (1): 30A-37A, 2000.
- MIKLÓS, A.; HESS, P.; BOZÓKI, Z. Application of acoustic resonators in photoacoustic trace gas analysis and metrology. **Review of Scientific Instruments**, 72 (4): 1937-1955, 2001.
- NADAS, A.; OLMO, M.; GARCÍA, J. M. Growth of botrytis cinérea and strawberry quality in ozone-enriched atmospheres. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 1798-1802, 2003.
- NÄGELE, M.; SIGRIST, M.W. Mobile laser spectrometer with novel resonant multipass photoacoustic cell for trace-gas sensing. **Applied Physics B**, 70: 895-901, 2000.
- NAKAJIMA, N.; MATSUYAMA, T.; TAMAOKI, M.; SAJI, H.; AONO, M.; KUBO, A.; KONDO, N. Effects of ozone exposure on the gene expression of ethylene biosynthetic enzymes in tomato leaves. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 993-998, 2001.
- NASCIMENTO, T. B.; RAMOS, J. D.; MENEZES, J. B. Características físicas do maracujá-amarelo produzido em diferentes épocas. **Pesquisa Agropecuária**. Brasília: v. 34, n. 12, p. 2353-2358, 1999.
- NAVABPOUR, S.; MORRIS, K.; ALLEN, R.; HARRISON, E.; A-H-MACKERNESS, S.; BUCHANAN-WOLLASTON, V. Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 391, pp. 2285-2292, 2003.
- OOMENS, J.; ZUCKERMAN, H.; PERSIJN, S.; PARKER, D.H.; HARREN, F.J.M. CO-laser-based photoacoustic trace-gas detection: applications in postharvest physiology. **Applied Physics B**, 67: 459-466, 1998.
- PALOU, L.; SMILANICK, J. L.; CRISOSTO, C. H.; MANSOUR, M. Effect of gaseous ozone exposure on the development of green and blue molds on cold stored citrus fruit. **Plant disease**, v. 85, p. 632-638, 2001.
- PELL, E. J.; SCHLAGNHAUFER, C. D.; ARTECA, R. N. Ozone-induced oxidative stress: mechanisms of action and reaction. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 264-273, 1997.

- PERSIJN, S.T. **Photoacoustic trace gas sensing; Applications to fruit and insects**. Tese (Doutorado) – Universiteit Nijmegen – Holanda. 2001 102p.
- PERSIJN, S.T.; SANTOSA, E.; HARREN, F.J.M. A versatile photoacoustic spectrometer for sensitive trace-gas analysis in the mid infrared wavelength region (5.1-8.0 and 2.8-41 μ m). **Applied Physics B**, 75: 335-342, 2002.
- ROSENCWAIG, A. Photoacoustic Spectroscopy. **Annual Review of Biophysisc and Bioengineering**, v. 09, p.31-54, 1980.
- RUGGIERO, C.; SÃO JOSÉ, A. R.; VOLPE, C. A.; OLIVEIRA, J. C.; DURIGAN, J. F.; BAUGARTNER, J. G.; SILVA, J. R.; NAKAMURA, K.; FERREIRA, M. E.; KAVATI, R.; PEREIRA, V. P. **Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção**. EMBRAPA-FRUPLEX, 1996 19p.
- SIGRIST, M.W. **Air Monitoring by Spectroscopic Techniques**, New York, USA: Wiley Interscience, 1994, 531p.
- SIGRIST, M.W.; BOHREN, A.; LERBER, T.V.; NÄGELE, M.; ROMANN, A. Environmental Applications of Laser-Based Photoacoustic Spectroscopy. **Analytical Sciences**, 17 (Special Issue): s511-s514. 2001.
- SCHMID, T. Photoacoustic spectroscopy for process analysis, **Anal. Bal. Chem.**, '384, 1071 – 1086, 2006.
- SMILANICK, J. L.; CRISOSTO, C.; MLIKOTA, F. Postharvest use of ozone on fresh fruit. **Perishables Handling Quarterly Issue**, v. 99, p. 10-14, 1999.
- SIMÃO, S. **Tratado de fruticultura**. Ed. FEALQ, Piracicaba, 1998 760p.
- SOJA, G.; SOJA, A. M. Ozone effects on dry matter partitioning and chlorophyll fluorescence during plant development of wheat. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 85, n. 3, 1995
- SOUZA, S. R.; CARVALHO, L. R. F. Origem e implicações dos ácidos carboxílicos na atmosfera. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 60-67, 2001.
- TAIZ, T.; ZEIGER, E.; **Fisiologia vegetal**. Ed. Artmed, Porto Alegre, 3 ed., 2006, 719p.
- TANAKA, T.; Morino, Y. Coriolis interaction and anharmonic potential function of ozone from the microwave spectra in the excited vibrational states. **Journal of Molecular Spectroscopy**, V. 33, 538-551p, 1970.

- TANGO, J. S.; CARVALHO, C. R. L.; SOARES, N. B. Caracterização física e química de frutos de abacate visando a seu potencial para extração de óleo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, p. 17-23, 2004.
- THÖNY, A.; SIGRIST, M. W., New Developments in CO₂-LASER Photoacoustic Monitoring of Trace Gases, **Infrared Phys. Technol.**, 36 (2): 585-615, 1995.
- VAN KOOTEN, O.; SNEL, J. F. H.; The used of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, 25: 147-150, 1990.
- VARGAS, H.; MIRANDA, L. C. M.; Photothermal techniques applied to thermophysical properties measurements (plenary), **Review of Scientific Instruments**, 74 (1): 794-799, 2003.
- WACHOWICZ, C. M.; CARVALHO, R. I. N.; **Fisiologia vegetal**. Ed. Champagnat, Curitiba, 1 ed., 2002, 424p.
- YANG, S.F.; HOFFMAN, N.E. Ethylene Biosynthesis and its regulation in higher plants. **Rev. Plant Physiol.**, 35: 155-189, 1984.

CAPÍTULO 4

Testes de um novo espectrômetro fotoacústico compacto para determinação de etileno em sistemas biológicos.

Resumo

O presente capítulo compara três modos de operação do laser de cascata quântica (QCL) para etileno e para óxido nitroso: 1) modulação em frequência (MF); 2) modulação em amplitude com sinal TTL (MA-TTL); modulação em comprimento de onda (MW). Curvas de calibração para óxido nitroso e etileno foram determinadas obtendo limites de detecção de 170 ppb para o óxido nitroso e 40 ppb para o etileno. Posteriormente, se fez a aplicação do sistema no monitoramento de etileno em frutos de abacates submetidos duas condições de estresse. Através da calibração e do resultado da taxa de emissão de etileno dos abacates submetidos a condições adversas, pode-se verificar que o equipamento é eficaz para aplicações em meios biológicos.

Palavras chaves: abacate, espectrômetro fotoacústico, etileno, modulação em comprimento de onda

Introdução

Um das aplicações da Espectroscopia Fotoacústica é no estudo de sistemas biológicos, especialmente na área pós-colheita de frutos tropicais. Normalmente, a detecção de etileno ajuda a compreender o comportamento padrão dos frutos, principalmente quando são submetidos a condições de estresse. Encontram-se na literatura trabalhos com a aplicação da espectroscopia fotoacústica utilizando laser de CO₂ em mamão, como o efeito do tratamento térmico nos frutos e o uso atmosfera modificado com etileno (Corrêa, 2005; Santos *et al.*, 2009.).

Uma nova geração de lasers semicondutores, denominada de diodo laser de cascata quântica, do inglês *Quantum Cascade Laser (QCL)*, trouxe

várias vantagens, comparadas às outras fontes de laser, para a espectroscopia fotoacústica na detecção de gases. Dentre essas vantagens estão a estabilidade, a largura da linha, o funcionamento à temperatura ambiente, a durabilidade (Gmachl *et al.*, 2001). Os diodos lasers são fontes de radiação compactas e, junto com a célula fotoacústica, também compacta, permitem uma montagem experimental portátil e robusta.

O QCL tem seu funcionamento baseado em dois fenômenos quânticos: aprisionamento em poços quânticos e o tunelamento. Poços quânticos são produzidos a partir da deposição alternada de dois tipos de semicondutores (InGaAs-AlInAs/InP), tendo em média um total de 32 camadas (Gmachl *et al.*, 2001). Isso representa uma grande vantagem quando comparado aos diodos lasers bipolares tradicionais que têm comprimento de onda limitado ao tamanho do *gap* óptico do semicondutor. Outra característica é que pode-se variar o comprimento de onda do laser com a temperatura.

Recentemente, depois de avanços significativos na tecnologia de laser semicondutores, tem-se empregado uma forma alternativa à modulação em intensidade, a modulação em frequência (Schilt e Thevenaz, 2006; Angelmahr *et al.*, 2008). Lasers semicondutores podem ser modulados eletronicamente, ou seja, por meio da sua corrente. Esta característica vem sendo utilizada para o funcionamento de modulação em frequência ou comprimento de onda, que oferecem vantagens entre elas, aumento de sensibilidade e redução do sinal de fundo (background).

Em um laser semicondutor, a modulação da corrente resulta na modulação simultânea da potência óptica (modulação em amplitude - AM) e do comprimento de onda do laser. As metodologias MW e MF tem vantagem nas propriedades de modulação em comprimento de onda, de forma que o sinal obtido da transmissão da luz pela amostra apresenta-se derivado, ou seja, livre do sinal de fundo proveniente da absorção das janelas e da parede (Miklós e Hess, 2000; Schilt e Thevenaz, 2006).

Na espectroscopia fotoacústica, ao aplicarmos uma metodologia de modulação em frequência, devido à natureza da técnica, a modulação WM fica vinculada à modulação em intensidade, funcionando como um misto das metodologias. No sistema de modulação em intensidade, um sinal de onda quadrada é enviado do lock-in ao gerador de pulso do laser modulando os

pulsos do laser na frequência de ressonância da célula fotoacústica. Já na modulação em comprimento de onda, não temos um sinal modulando os pulsos do laser diretamente, mas um sinal senoidal, de frequência igual à frequência de ressonância da célula fotoacústica, porém de baixa amplitude. A modulação em comprimento de onda é detectado o segundo harmônico do sinal fotoacústico (Angelmahr *et al.*, 2008).

O objetivo do trabalho foi avaliar o desempenho de QCLs com diferentes regimes de modulações, e depois com QCL para calibração com óxido nitroso e etileno. Uma das vantagens de se usar o óxido nitroso para caracterizar a eficiência dos modos de modulação do QCL é a largura estreita ($\Delta\kappa=2,21 \text{ cm}^{-1}$) dos picos de transição quântica correspondentes às absorções. Após a definição de funcionamento do espectrômetro fotoacústico, foram realizadas aplicações no monitoramento de etileno em frutos de abacate (*Persea americana*).

Este trabalho fez parte do projeto PROBRAL CAPES/DAAD (nº 299/08) de intercâmbio entre professores e estudantes do Laboratório de Ciências Físicas (LCFIS) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) com Fraunhofer-Institut für Bauphysik. Este trabalho foi realizado durante o doutorado sanduíche no período de 02 de dezembro de 2008 a 31 de março de 2009 na cidade de Stuttgart, Alemanha.

Materiais e Método

Amostras

Para a determinação do melhor modo de modulação foram usados amostras padrão de óxido nitroso (52,2 ppm de óxido nitroso em nitrogênio) e etileno (1 ppm de etileno em nitrogênio). Após definido o melhor modo de modulação e o limite de detecção, a montagem experimental compacta para o etileno foi testada para o sistema biológico sob diferentes condições de estresse. Para esse fim, foram utilizados frutos de abacate (*Persea americana*), cultivar Fuerte, oriundos de Israel, comprado no mercado local da cidade de Stuttgart, Alemanha.

Espectrômetro fotoacústico

A Figura 4.1 mostra um diagrama da montagem experimental utilizada para a detecção de etileno. Essa montagem contém os seguintes componentes: célula fotoacústica (1), medidor de potência (2), pré-amplificador (3), lock-in (4), computador (5), osciloscópio (6), controlador do laser de diodo (7), laser de cascas quântica (8) e luz modulada (9).

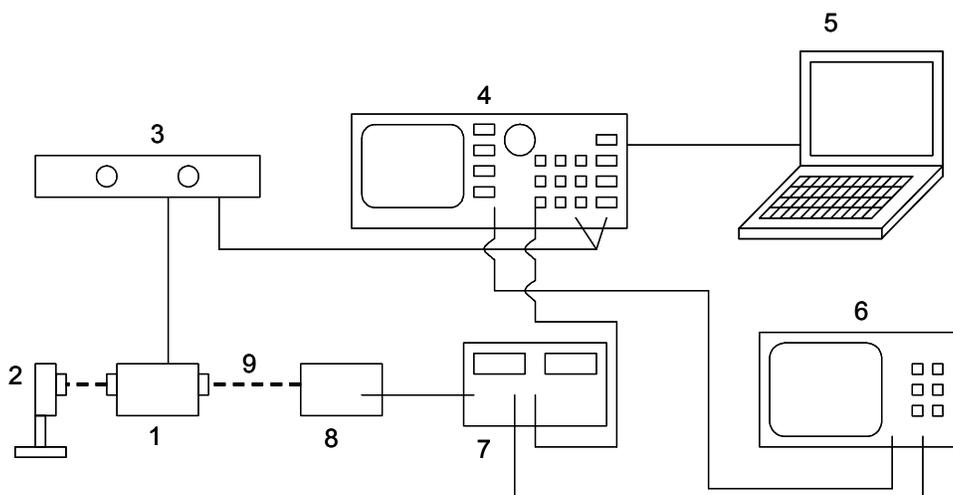


Figura 4.1 – Diagrama do espectrômetro fotoacústico.

Na célula fotoacústica, devido ao efeito fotoacústico, mudanças de pressão provocadas pelo sinal fotoacústico são detectadas por um microfone colocado no interior de um tubo ressonador através do qual flui a amostra de ar que contém as moléculas sob investigação. Neste trabalho foi utilizada uma célula fotoacústica diferencial (Figura 4.2), que tem como características uma rápida resposta no tempo de medida, baixo ruído acústico e elétrico e alta sensibilidade. Existem dois tubos ressonadores acústicos em seu interior, em formatos cilíndricos com 5,5 cm de comprimento. O gás analisado flui através dos dois tubos, mas a luz do laser modulada passa somente por um dos tubos. Desta forma, com a diferença dos sinais detectados em cada um dos tubos ressonadores, ruídos provenientes da absorção da radiação pelas janelas, ou externos, são reduzidos. Um conjunto de quatro atenuadores acústicos está

conectado aos tubos ressonadores, com a finalidade de reduzir o ruído ambiente externo.

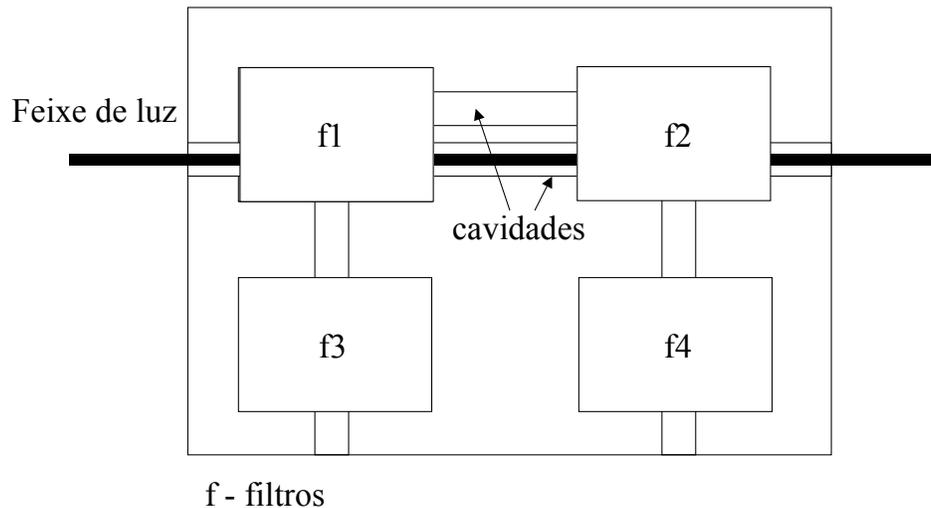


Figura 4.2 – Esboço da célula fotoacústica diferencial.

Foi utilizado um laser de cascata quântica de 5mW de potência para medidas de óxido nítrico, cobrindo a faixa espectral de $1299,36\text{ cm}^{-1}$ a $1296,29\text{ cm}^{-1}$, quando a temperatura é variada de $-1,92^{\circ}\text{C}$ até $29,20^{\circ}\text{C}$. Outro laser de cascata quântica de 4 mW de potência para medidas de etileno, cobrindo a faixa espectral de $946,51\text{ cm}^{-1}$ a $950,80\text{ cm}^{-1}$, quando a temperatura é variada de $-1,90^{\circ}\text{C}$ até $29,40^{\circ}\text{C}$. Ambos os lasers foram fabricados pela Alpes Lasers. O laser testado em três modos diferentes de operação: 1) modulação em frequência (MF); 2) modulação em amplitude com sinal TTL, ou seja, sinal transistor-transistor logic, (MA-TTL); 3) modulação em comprimento de onda (MW). Para variar o comprimento de onda, foram feitas rampas de temperatura do QCL variando de 0°C a 30°C .

Os lasers utilizados neste trabalho operaram no modo pulsado com duração de pulso de 50 ns com a frequência de repouso do diodo 400 kHz (período de tempo que não tem corrente no diodo). Esses valores foram determinados para obter um melhor ciclo de “performance”, ou seja, razão

entre o tempo que a corrente passa através do diodo laser pelo tempo que nenhuma corrente passa por cada ciclo.

Comparando os espectros para cada tipo de modulação, definiu-se o melhor tipo de operação, através da melhor razão sinal/ruído, e o limite de detecção de etileno do sistema foi determinado. O gás foi conduzido em fluxo constante de 3 L.h^{-1} através da célula fotoacústica por tubos de teflon com 5 mm de diâmetro. O fluxo foi controlado utilizando dois fluxômetros eletrônicos montados em paralelo, sendo um para o gás a ser diluído (óxido nitroso ou etileno) e outro para gás nitrogênio puro.

Aplicações do espectrômetro fotoacústico

Foram elaboradas duas situações de estresse em abacates para avaliar a aplicação do espectrômetro fotoacústico em sistemas biológicos. A primeira aplicação foi avaliar o efeito estressante à exposição de um grupo de 4 frutos de abacate (grupo tratado) dentro uma câmara com atmosfera modificada com 30% de CO_2 , 14% de O_2 e 56% de N_2 em fluxo de 3 L.h^{-1} durante 22h. Os resultados foram comparados simultaneamente com outro grupo de 4 frutos de abacate sem tratamento (grupo controle). Os frutos do grupo controle foram expostos, em uma câmara, a uma atmosfera contínua de ar sintético com fluxo de 3 L.h^{-1} durante 22h. As condições de pressão, temperatura e umidade relativa foram, respectivamente de 1 atm, $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e $55 \pm 5 \%$. Foi feita também a leitura inicial da taxa natural de emissão de etileno de cada fruto antes da exposição a suas respectivas atmosferas. Após o tratamento, a taxa de emissão de etileno foi monitorada por 102 horas.

A segunda aplicação foi o estresse provocado em um grupo de 4 abacates expostos, em uma câmara, a uma atmosfera contínua de 1ppm de etileno em nitrogênio com fluxo de 3 L.h^{-1} durante 22h (grupo tratado). Outro grupo de 4 frutos de abacate sem tratamento foram usados como controle. Os frutos do grupo controle foram expostos, em uma câmara, a uma atmosfera contínua de ar sintético com fluxo de 3 L.h^{-1} durante 22h. As condições de pressão, temperatura e umidade relativa foram, respectivamente de 1 atm, $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e $55 \pm 5 \%$. Foi feita também a leitura inicial da taxa natural de emissão de

etileno de cada fruto antes da exposição aos 1 ppm de etileno. Após o tratamento, a taxa de emissão de etileno foi monitorada por 96 horas.

As taxas de emissão de etileno foram normalizadas pela massa dos frutos que foram medidas antes e depois da detecção de etileno, usando o valor médio. Para essas medidas foi utilizada uma balança comercial (KS38 da Beurer GmbH).

Resultados e discussão

Limite de detecção do espectrômetro fotoacústico

Com as respectivas montagens experimentais, foram obtidos espectros de absorção de cada uma das substâncias químicas (N_2O e C_2H_4) utilizando os três tipos de modulação (MA-TTL, MF MW). A relação entre o sinal do maior pico de absorção e sinal de fundo (ruído) foi utilizado como critério para determinar o melhor tipo de modulação, ou seja, razão sinal/ruído. Essa relação foi calculada entre a razão (R) do sinal de maior pico de absorção (S_F) e o sinal de ruído (S_{Bg}), ou seja:

$$R = \frac{S_F}{S_{Bg}} \quad (4.1)$$

O sinal de fundo foi obtido com um fluxo de nitrogênio com o laser funcionando a mesma temperatura que se obteve o maior pico de absorção.

O número de onda correspondente ao maior pico de absorção obtido com o QCL de óxido nitroso foi de $1298,79 \text{ cm}^{-1}$. Analisando esses valores, pôde-se observar que a melhor razão sinal/ruído foi obtida para o modo de operação do laser em MW ($285,77 \pm 1,81 \text{ u.a.}$), comparado com os demais modos de operação (MA-TTL = $37,02 \pm 4,96 \text{ u.a.}$; MF = $69,28 \pm 2,24 \text{ u.a.}$). Pôde-se observar, também, que o laser utilizado para análise de etileno teve uma melhor relação sinal-ruído operando em MW (MW = $58,71 \pm 2,52$; MA-TTL = $17,25 \pm 5,02$; MF = $28,19 \pm 3,43$). O número de onda correspondente ao maior pico de absorção obtido com o QCL de etileno foi de $949,48 \text{ cm}^{-1}$. Em função dos resultados serem melhores para MW, as curvas de calibração para

cada uma das substâncias químicas foram realizadas utilizando esse modo (Anglermahr *et al*, 2008; Germer e Wolff, 2009).

A Figura 4.3 mostra a calibração do espectrômetro fotoacústico para o óxido nitroso. Usando dois fluxômetros eletrônicos, foi possível diluir inicialmente os 52,2 ppmV de óxido nitroso para concentrações inferiores a 1 ppmV aumentando a vazão de nitrogênio. Pode-se observar na Figura 4.3A a linearidade entre o sinal fotoacústico e a concentração de óxido nitroso. O limite inferior de detecção encontrado para o óxido nitroso foi de 170 ppb (Figura 4.3B).

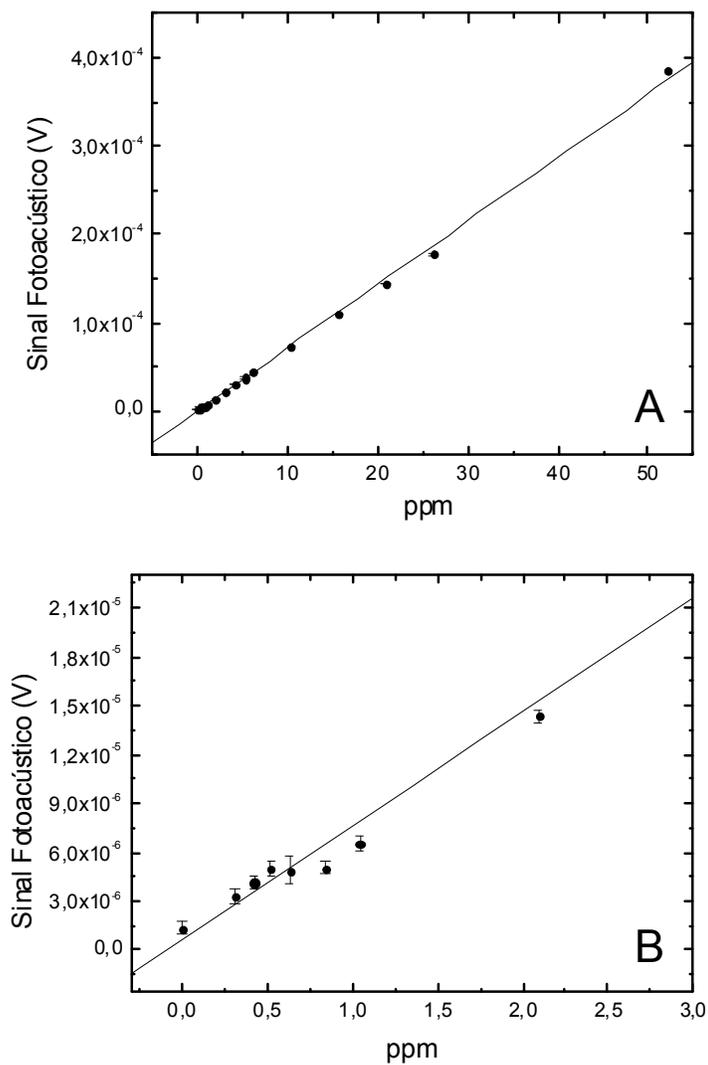


Figura 4.3 - O gráfico (A) mostra a curva de calibração de óxido nítrico utilizando o espectrômetro fotoacústico. O gráfico (B) mostra com mais detalhe o limite de detecção de 170 ppbV de óxido nítrico. Barras verticais indicam o erro em desvio padrão.

A Figura 4.4 mostra a calibração do espectrômetro fotoacústico para o etileno. Usando dois fluxômetros eletrônicos, foi possível diluir inicialmente os 1 ppmV de etileno para concentrações inferiores a 100 ppbV aumentando a vazão de nitrogênio. Pode-se observar na Figura 4.4A a linearidade entre o

sinal fotoacústico e a concentração de etileno. O limite inferior de detecção encontrado para o etileno foi de 40 ppb (Figura 4.4B).

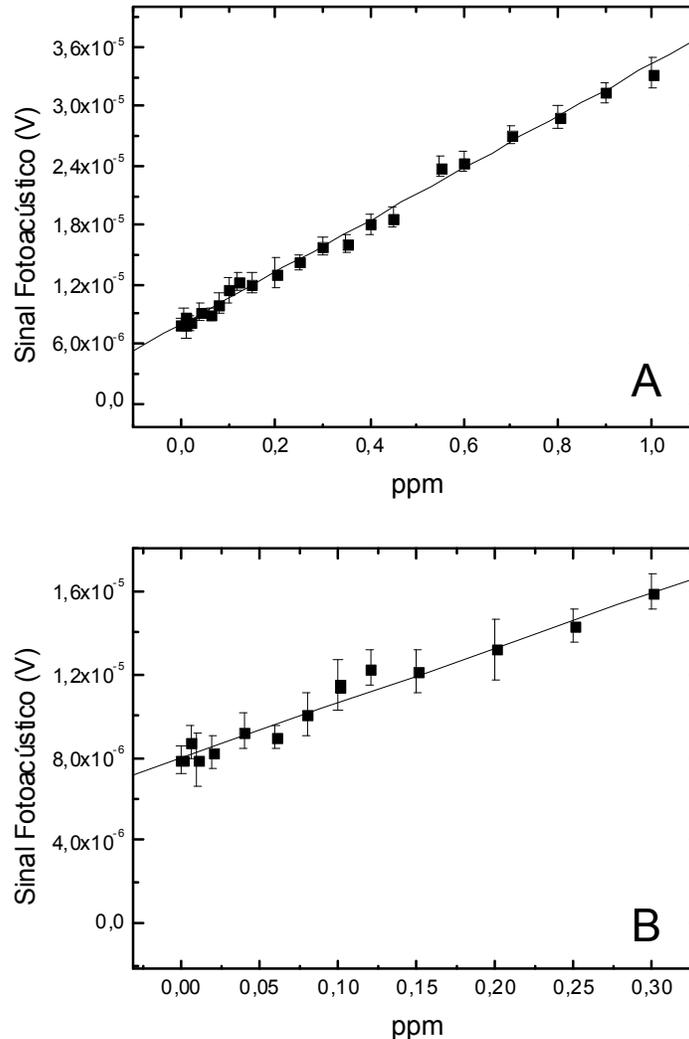


Figura 4.4 – O gráfico (A) mostra a curva de calibração de etileno utilizando o espectrômetro fotoacústico. O gráfico (B) mostra com mais detalhe o limite de detecção de 40 ppbV de etileno. Barras verticais indicam o erro em desvio padrão.

Os resultados aqui mostrados indicam que os lasers à gás podem ser trocados pelos mais versáteis e compactos lasers de cascata quântica, quando a potência destes se tornarem mais alta (por exemplo, cerca de 100 mW), pois

com os lasers a gás, como de CO₂, pode-se obter limites de detecção até 6 ppt (parte por trilhão) utilizando potências próximas de 80 W (de Vries, 1994; de Vries *et al.*, 1995; de Vries *et al.*, 1996). Assim, considerando a baixa potência usada e alta sensibilidade atingida, os resultados claramente mostram que facilmente uma sensibilidade de sub-ppbV seria atingida se o laser de cascata quântica tivesse a potência de 100 mW. Isso também pode ser confirmado na literatura com trabalhos mostrando a aplicação com QCL na detecção de amônia e ozônio (Baptista-Filho *et al.*, 2006; Claps *et al.*, 2001; da Silva, *et al.*, 2004). Pois, considerando a baixa potência usada e alta sensibilidade atingida, os resultados claramente mostram que facilmente uma sensibilidade de sub-ppbV seria atingida se o laser de cascata quântica tivesse a potência de 100 mW, tanto para medidas de óxido nítrico como para etileno (Namjou *et al.*, 1998; Colombelli *et al.*, 2001). Assim, com uma montagem experimental relativamente simples, diodos QCL combinados com a célula fotoacústica diferencial, permitiriam o desenvolvimento de sensores portáteis de aplicação no monitoramento in situ de etileno na agricultura.

Experimento com atmosfera modificada: alto nível de CO₂

A montagem experimental usando o QCL de etileno mostrou-se sensível o suficiente (limite inferior de 40 ppbV) para estudar a emissão de etileno de alguns sistemas biológicos. Assim, o uso da montagem experimental é viável. Medidas com abacate submetidos a condições de estresse, que tem emissões de taxa de etileno em torno de 1 ppm, foram realizadas com o intuito de viabilização da nova montagem experimental.

Os resultados do uso de atmosfera modificada com alto nível de dióxido de carbono estão representados na Figura 4.5. Cada ponto na curva representa a média de 4 repetições (4 amostras de abacate) para seu respectivo grupo (controle e tratado). O primeiro ponto de cada curva é referente às medidas iniciais naturais da taxa de emissão de etileno (frutos antes de ficarem expostos 22 h dentro das câmaras).

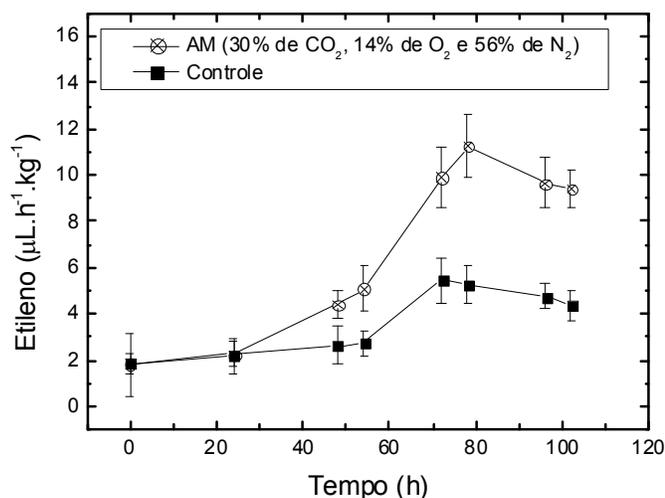


Figura 4.5 – O gráfico mostra a evolução temporal das taxas de emissão de etileno de abacates submetidos à atmosfera de ar sintético (controle) e de abacates submetidos à atmosfera modificada de 30% de CO₂, 14% de O₂ e 56% de N₂ em fluxo de 3 L.h⁻¹ (AM). Barras verticais indicam o erro em desvio padrão.

Pode-se observar que logo após o tratamento, a taxa de emissão de etileno dos frutos do grupo tratado não apresentou nenhuma variação significativa comparada com os frutos do grupo controle. Porém, a partir de 48 horas após o início do experimento, observou-se que o grupo tratado apresentou um aumento da taxa de emissão de etileno. Este aumento teve sua maior variação no tempo de 78 horas após o início do monitoramento, que foi de 618,13% (de 1,82 µL.h⁻¹.kg⁻¹ para 11,25 µL.h⁻¹.kg⁻¹). Os frutos não tratados apresentaram um aumento máximo em 72 h após o início do monitoramento, que foi de 296,74 % (de 1,84 µL.h⁻¹.kg⁻¹ para 5,46 µL.h⁻¹.kg⁻¹). Este estresse se deve ao uso de 30% de CO₂ na atmosfera modificada, que foi acima do nível tolerável de 15% (Chitarra e Chitarra, 2005). Mesmo com esse aumento da taxa de emissão de etileno nos frutos tratados, não foi observada alteração considerável na posição do pico climatérico em relação ao controle. O fato de não ter ocorrido variação da posição do pico climatérico pode estar relacionado ao estágio avançado de maturação dos frutos (Kluge *et al.*, 2002). Assim, o

estresse provocado pela AM pode ser classificado como leve, sem muitos danos fisiológicos (Brackman e Chitarra, 1998).

Experimento com atmosfera modificada: uso de etileno na atmosfera

Os resultados da taxa de emissão de etileno em abacates submetidos a um fluxo contínuo de 1 ppm de etileno em fluxo de 3 L.h⁻¹ durante 22 h são demonstrados na Figura 4.6. Cada ponto na curva representa a média de 4 repetições (4 amostras de abacate) para seu respectivo grupo (controle e tratado). O primeiro ponto de cada curva é referente às medidas iniciais naturais da taxa de emissão de etileno (frutos antes de ficarem expostos 22 h dentro das câmaras). Após as 22 horas de tratamento, a taxa de emissão de etileno dos frutos tratados estava 21,05% maior que os frutos não tratados (grupo controle = 0,57 µL.h⁻¹.kg⁻¹; grupo tratado = 0,69 µL.h⁻¹.kg⁻¹). Este aumento foi gradativo, obtendo-se uma maior diferença entre as taxas de emissão de etileno dos dois grupos no tempo de 72 horas (grupo controle = 0,96 µL.h⁻¹.kg⁻¹; grupo tratado = 1,42 µL.h⁻¹.kg⁻¹). Pode-se observar também que não houve diferença temporal do pico climatérico entre os grupos. Era de se esperar que houvesse uma diferença na posição do pico climatérico com a diminuição do tempo de prateleira dos frutos tratados.

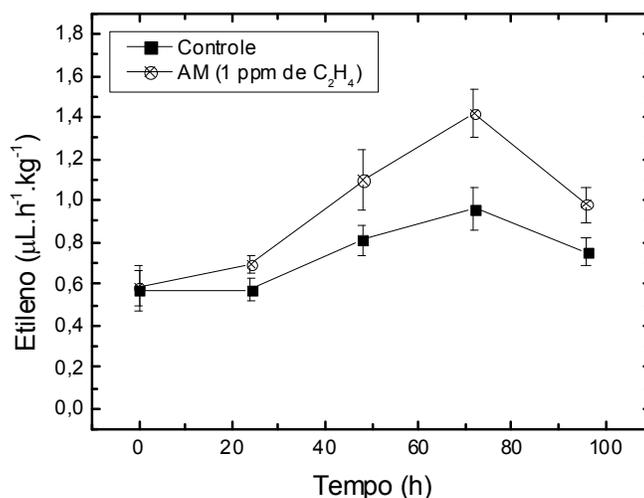


Figura 4.6 - O gráfico mostra a evolução temporal das taxas de emissão de etileno de abacates submetidos à atmosfera de ar sintético (controle) e de abacates submetidos à atmosfera modificada 1ppm de C₂H₄ em fluxo de 3 L.h⁻¹ (AM). Barras verticais indicam o erro em desvio padrão.

Recente trabalho mostra o estresse provocado em mamão ‘Golden’ submetidos a um fluxo de 2 L.h⁻¹ de 1 ppm de etileno durante 24 h, o qual os frutos induzidos apresentaram uma antecipação do pico climatérico de 3 dias comparados com frutos testemunhas (Abeles *et al.*, 1992).

O mesmo comportamento não foi obtido para amostras aqui tratadas, provavelmente devido ao fato dos frutos estarem em estágio avançado de amadurecimento. A aplicação exógena de etileno provoca um amadurecimento precoce dos frutos quando aplicado no estágio inicial de amadurecimento. Porém o efeito não é significativo quando o fruto está num estágio mais avançado de amadurecimento (Abeles *et al.*, 1992), o que justifica o comportamento dos abacates expostos a atmosfera modificada com etileno.

Conclusão

Analisando o desempenho do espectrômetro fotoacústico utilizando o laser de estado sólido frente às condições de modulação, calibração e

aplicação no monitoramento de frutos mostrou uma excelente ferramenta para detecção de gases. Com uma melhor relação entre o sinal fotoacústico e o ruído, a modulação em comprimento de onda e o uso da célula diferencial permitem que o espectrômetro fotoacústico com laser de cascata quântica se tornou uma excelente ferramenta no monitoramento de gases em meios biológicos, podendo ser utilizado em medidas de campo por ser compacto.

Os resultados obtidos submetendo o abacate a duas condições diferentes de atmosfera modificada mostram a sensibilidade da montagem experimental detectando as variações da taxa de etileno emitida devido aos estresses.

Referências bibliográficas

- ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALTVEIT Jr., M. E. **Ethylene in Plant Biology**, 2ed., San Diego, USA: Academic Press. 1992,414p.
- ANGELMAHR, M.; MIKLÓS, A.; HESS, P. Wavelength- and amplitude-modulated photoacoustics: comparison of simulated and measured spectra of higher harmonics. **Applied Optics**, Vol. 47, No. 15. pp.2806-12, 2008.
- BAPTISTA-FILHO, M., DA SILVA, M.G., STEHL, M.S., SCHRAMM, D.U., VARGAS, H., MIKLÓS, A., HESS, P. Ammonia detection by using quantum-cascade laser photoacoustic spectroscopy. **Applied Optics**, 45(20), p. 4966-4971, 2006.
- BRACKMAN, A.; CHITARRA, A. B. Atmosfera controlada e atmosfera modificada. In: BORÉM, f. m.; CHITARRA, A. B.; **Armazenamento e processamento de produtos agrícolas**. Ed. UFLA, Lavras, p. 133-170, 1998.
- CLAPS, R., ENGLISH, F. V., LELEUX, D., RICHTER, D., TITTEL, F. K., CURL, R. F. Ammonia detection by use of near-infrared diode laser-based overtone spectroscopy, **Applied Optics**, 40, 4387-4394, 2001.
- COLOMBELLI, R., CAPASSO, F., GMACHL, C., HUTCHINSON, A.L., SIVCO, D.L., TREDICUCCI,A., WANKE, M.C., SERGENT, A.M., CHO, A.Y. Far infrared surface Plasmon quantum cascade LASERs at 21.5_μm and 24_μm wavelengths, **Applied Physics Letters**, 78, 2620-2622, 2001.

- CORRÊA, S. F. (2005) Utilização de técnicas fototérmicas no estudo da pós-colheita do mamão (Carica papaya L.). Mestrado. Campos dos Goytacazes, UENF, 63p.
- da SILVA, F. F.; PEREIRA, M. G.; DAMASCENO-Jr., P. C.; DAHER, R. F.; PEREIRA, T. N. S.; de SOUZA-FILHO, G. A.; VIANA, A. P.; FERREGUETTI, G. A. Monitoring of the genetic variability in papaya parent 'Formosa' of 'UENF/CALIMAN01' hybrid via RAPD. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 7, p. 36-42, 2007.
- da SILVA, M.G., VARGAS, H., MIKLÓS, A., HESS, P. Photoacoustic detection of ozone using a quantum cascade LASER, **Applied Physics B - LASER and Optics**, 78(6), 677-680, 2004.
- de VRIES, H. S. M.(1994) *Local trace gas measurements by laser photothermal detection; physics meets physiology*, Tese (Doutorado) Universiteit Nijmegen, Nijmegen, Holanda.
- de VRIES, H.S.M.; HARREN, F.J.M.; REUSS, J. In situ, real-time monitoring of wound-induced ethylene in cherry tomatoes by two infrared laser-driven systems. **Postharvest Biology and Technology**, 6: 275-285, 1995.
- de VRIES, H. S. M. ; WASONO, M. A. J. ; HARREN, F. J. M.; WOLTERING, E. J. ; van der VALK, H. C. P. M.; REUSS, J. Ethylene CO₂ emission rates and pathways in harvested fruits investigated, in situ, by laser photothermal deflection and photoacoustic techniques, **Post, Biology and Technology**, 8: 1-10, 1996.
- GERMER, M.; WOLFF, M. Quantum cascade laser linewidth investigations for high resolution photoacoustic spectroscopy. **Applied Optics** v. 48 Issue: 4 Pages: B80-6 (2009).
- GMACHL, C., CAPASSO, F., SIVCO, D.L., CHO, A.Y. Recent progress in quantum cascade LASERS and applications, **Reports Progress in Physics**, 64, 1533-1601, 2001.
- KASYUTICH, V. L.; HOLDSWORTH, R. J.; MARTIN, P. A. Mid-infrared laser absorption spectrometers based upon all-diode laser difference frequency generation and a room temperature quantum cascade laser for the detection of CO, N₂O and NO. **Appl. Phys. B**, 92, 271–279, 2008.

- KLUGE, R. A.; NACHTIGAL, J. C.; FACHINELLO, J. V.; BILHALVA, A. B. **Fisiologia e manejo pós-colheita de frutas de clima temperado**. Livraria e Editora Rural, Campinas, 2 ed., 2002 214p.
- MIKLÓS, A.; HESS, P. Modulated and Pulsed Photoacoustics in Trace Gas Analysis. **Analytica Chemistry**, 72 (1): 30A-37A, 2000.
- NAMJOU, K., CAI, S., WHITTAKER, E.A., FAIST, J., GMACHL, C., CAPASSO, F. SIVCO, D.L., CHO, A.Y. Sensitive adsorption spectroscopy with a room-temperature distributed-feedback quantum-cascade LASER. **Optics Letters**, 23, 210-221, 1998.
- SCHILT, S.; THEVENAZ, L. Wavelength modulation photoacoustic spectroscopy: Theoretical description and experimental results. **Infrared Physics & Technology**. 48, 154–162, 2006.
- SCHMID, T. Photoacoustic spectroscopy for process analysis, **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 384, 1071 – 1086, 2006.

CAPÍTULO 5

Aplicação da espectroscopia fotoacústica no monitoramento da emissão de C_2H_4 e CO_2 em maracujá armazenado sob diferentes atmosferas

Resumo

O presente capítulo mostra a aplicação do espectrômetro fotoacústico no monitoramento da taxa de emissão de etileno em maracujá amarelo submetido a diferentes tipos de atmosfera sob condições de estresse. Foram utilizados três tipos de atmosfera modificada: 100% de N_2 e 0% de O_2 (AM1), 97% de N_2 e 3% de O_2 (AM2) e 94% de N_2 e 6% de O_2 (AM3). Os resultados permitiram avaliar que atmosferas com concentrações abaixo de 3% de oxigênio causam danos aos frutos de maracujá, como fermentação da casca e presença de fungos na casca, e que concentrações de 6% de oxigênio tiveram o aumento do tempo de prateleira por dois dias. A taxa respiratória e parâmetros da casca do espaço Hunter (a , b e h^0) foram monitorados e correlacionados com a taxa de emissão de etileno. A perda de massa também foi avaliada.

Palavras chaves: atmosfera modificada, espectrômetro fotoacústico, etileno, maracujá amarelo, coloração média da casca

Introdução

O maracujá amarelo (*Passiflora edulis*), ou maracujá azedo, é um dos principais frutos produzidos e consumidos no Brasil. Segundo o IBRAF 2009, a produção de maracujá amarelo no Brasil foi de 664.286 toneladas em 2007. Rico em vitaminas A, C, B2 e B3, o maracujá também é rico em fibras e sais minerais, como cálcio, ferro e fósforo (Nascimento *et al*, 1999). Seu tempo de vida pós-colheita é curto devido à grande perda de massa (Durigan *et al*, 2004). Isto justifica os estudos na conservação desse fruto visando, assim, prolongar seu tempo de prateleira. Uma das alternativas é o uso de atmosfera controlada ou atmosfera modificada.

Atmosfera controlada (AC) refere-se ao controle contínuo da atmosfera ao qual o fruto ou hortaliças estão submetidos durante os processos de embalagem, estocagem e distribuição. Já a atmosfera modificada (AM) refere-se ao acondicionamento de frutos ou hortaliças sob uma atmosfera que se modifica gradualmente devido ao metabolismo do produto, sem que ocorra uma correção, como a atmosfera controlada, que tem como objetivo manter o controle dos valores de nitrogênio, oxigênio, dióxido de carbono, vapor d'água e temperatura da atmosfera (Chitarra e Chitarra, 2005).

Para se avaliar a resposta dos frutos acondicionados sob AC ou AM é necessário o monitoramento das taxas de emissão de etileno e dióxido de carbono. O etileno, hormônio relacionado ao desenvolvimento dos frutos (Abeles *et al*, 1992), e o dióxido de carbono, resultante da respiração do fruto, são excelentes indicadores do estágio de maturação de frutos climatéricos (Wachowicz e Carvalho, 2002). Trabalhos recentes têm utilizado a espectroscopia fotoacústica no monitoramento das taxas de emissão de etileno e de dióxido de carbono em frutos tropicais (da Silva *et al*, 2001; da Silva *et al*, 2003; da Silva *et al*, 2004; Corrêa *et al*, 2005). Esta técnica se baseia no efeito fotoacústico em gases, que consiste na conversão da luz em som através da incidência de uma radiação modulada numa mistura gasosa.

Este trabalho tem como objetivo monitorar as taxas de emissão de etileno e dióxido de carbono em frutos de maracujá amarelo submetidos a diferentes atmosferas modificadas sob condições de estresse utilizando técnicas fototérmicas.

Material e Métodos

Amostra Vegetal

Foram utilizados para esse trabalho, frutos de maracujazeiro amarelo (*P. edulis*) oriundos da Escola Técnica Estadual Agrícola Antônio Sarlo, no município de Campos dos Goytacazes-RJ, localizadas nas coordenadas geográficas de 21° 42' 49" de latitude sul e 41° 20' 33" de longitude oeste, cedidas pelo professor Alexandre Pio Viana (UENF-CCTA-LMGV). Os frutos no

momento da colheita apresentavam 90% de cor verde e 10% de cor amarela na casca.

Tratamentos com atmosfera modificada

Frutos de maracujá amarelo foram submetidos a três tipos de atmosferas modificadas, variando a composição dos gases oxigênio (O₂) e nitrogênio (N₂) na obtenção das atmosferas. Foram utilizados, de forma não-destrutiva, 30 frutos de maracujá amarelo no total do experimento. Foram feitos três experimentos, onde em cada experimento um grupo controle de cinco frutos de maracujá amarelo ficou exposto diariamente numa câmara a uma atmosfera com fluxo de 2L.h⁻¹ de ar ambiente e outro grupo (atmosfera modificada) de cinco frutos de maracujá amarelo em outra câmara a uma determinada atmosfera modificada, também diariamente. No primeiro experimento foi utilizado como gás de arraste um fluxo de 2L.h⁻¹ de 100% de nitrogênio e 0% de oxigênio como atmosfera modificada (AM1). No segundo experimento foi utilizado como gás de arraste um fluxo de 2L.h⁻¹ de 97% de nitrogênio e 3% de oxigênio como atmosfera modificada (AM2). No terceiro experimento foi utilizado como gás de arraste um fluxo de 2L.h⁻¹ de 94% de nitrogênio e 6% de oxigênio como atmosfera modificada (AM3). Os fluxômetros utilizados foram Brooks Instrument B.V., modelo 5850S. A pressão dentro das câmaras foi de 1atm, com uma temperatura de 25 ± 2 °C e 92 ± 4 % de umidade relativa do ar.

Taxas de emissão de etileno e de CO₂ foram monitorados diariamente, durante 2 horas para cada grupo. Medidas de coloração da casca dos frutos (*a*, *b*, °*h*) e perda de massa foram monitoradas a cada dois dias, retirando os frutos de suas respectivas câmaras por um período de 30 minutos.

Monitoramento das taxas de emissão de C₂H₄ e CO₂

A Figura 5.1 esboça o sistema de medição de etileno que consiste de um espectrômetro fotoacústico (da Silva *et al.*, 2003), com sensibilidade de medição de concentrações de etileno da ordem de 0,30 nL/L. Neste

espectrômetro um laser de CO₂ é utilizado e a célula fotoacústica se encontra no interior da cavidade do laser favorecendo a sensibilidade do espectrômetro.

O etileno emitido pelo fruto, colocado na câmara de amostra, foi transferido para a célula fotoacústica usando ar ambiente como gás de arraste, ou a atmosfera composta com as concentrações propostas de oxigênio e nitrogênio, a um fluxo constante de 2 L h⁻¹ (controlado por fluxômetros eletrônicos). O uso da própria atmosfera modificada como gás de arraste permitiu a avaliação em tempo real do efeito da atmosfera sobre as amostras. Filtros químicos foram empregados para eliminar CO₂ e água e, antes de entrar na célula fotoacústica, o gás de análise passou através de uma armadilha de N₂ líquido, para evitar a interferência de traços de vapor d'água e hidrocarbonetos. O sistema foi calibrado diariamente usando uma amostra de etileno em nitrogênio, padrão comercial, na concentração de 1 ppmV.

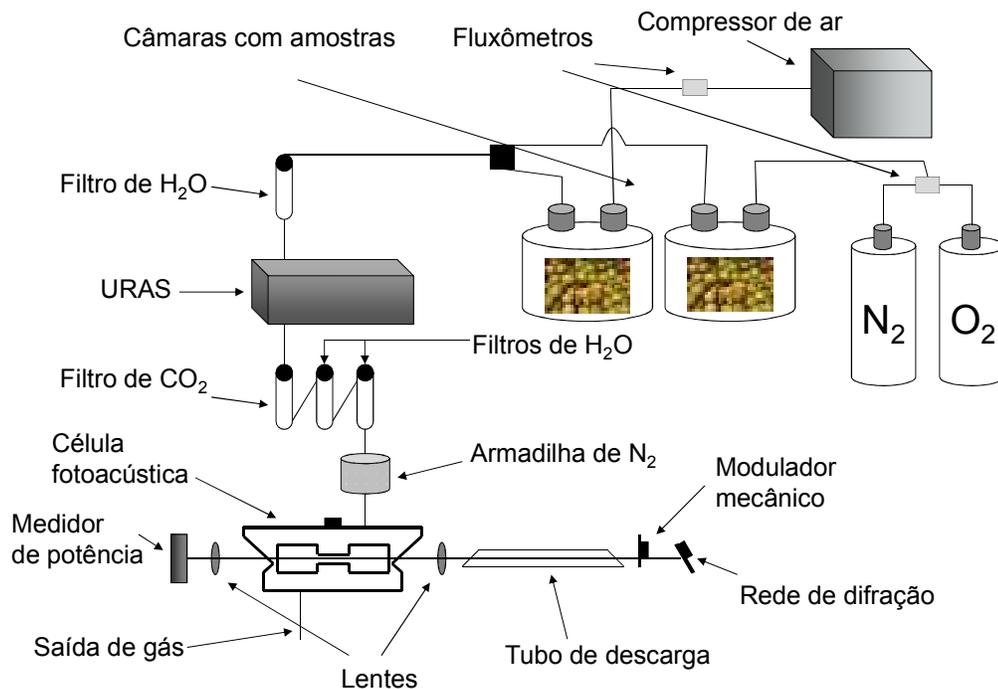


Figura 5.1 – Desenho esquemático da montagem experimental para monitoramento das taxas de emissão de etileno e dióxido de carbono utilizando um espectrômetro fotoacústico e um URAS. A montagem mostra o uso de duas câmaras com frutos de maracujá amarelo para os grupos controle e grupo tratado por diferentes tipos de atmosfera modificada.

A taxa de emissão de CO₂ foi monitorada usando um analisador comercial de gás no infravermelho (Hartman & Braun modelo URAS 14). O princípio de detecção se baseia na medição da queda relativa da intensidade da radiação infravermelha de uma fonte (filamento incandescente) após passar por caminhos óticos em paralelo, sendo um preenchido pela amostra gasosa em fluxo e outra por nitrogênio (selada). Após passar pelos dois caminhos óticos, cada um dos feixes de radiação passa individualmente por duas câmaras preenchidas com CO₂ (100%). Essas câmaras com CO₂ isoladas entre si por uma membrana capacitiva que permite determinar a diferença de pressão entre as duas devido ao decaimento não-radiativo das moléculas de CO₂ excitadas (de Vries *et al*, 1996). O analisador de CO₂ foi montado em série ao espectrômetro fotoacústico antes do filtro de CO₂.

Coloração da casca do fruto

A mudança de coloração da casca dos frutos foi monitorada diariamente usando um colorímetro digital portátil (Chroma Meter, modelo CR-300, Minolta). Medidas foram realizadas em três pontos equidistantes na região equatorial dos frutos e os resultados foram expressos por meio do ângulo de cor *hue* e dos parâmetros de cor de Hunter *a* e *b*. Nesta escala, o índice *a* varia da cor verde (sinal negativo) ao vermelho (sinal positivo) e *b* do azul (sinal negativo) ao amarelo (sinal positivo). Valores de *a* e *b* iguais a zero corresponde à cor cinza. O ângulo *hue* (h°) define a coloração básica, onde 0° = vermelho, 90° = amarelo, 180° = verde e 270° = azul (Coultrate, 2004).

Medidas de massa

A fim de normalizar a taxa de emissão de etileno com a massa da matéria fresca do fruto, a massa de cada fruto foi medida a cada dois dias antes e depois da determinação da taxa de emissão de etileno. Uma balança comercial, Coleman modelo JB-1500, foi utilizada para este fim. O valor médio das duas medidas foi usado na normalização. A perda de massa dos frutos também foi monitorada ao longo do experimento.

Resultados e discussão

A Figura 5.2A mostra os resultados da taxa de emissão de etileno para frutos submetidos à AM de 100% de N₂ e 0% de O₂ (AM1) comparados com grupos controle. A Figura 5.2B mostra a taxa respiratória para os mesmos frutos.

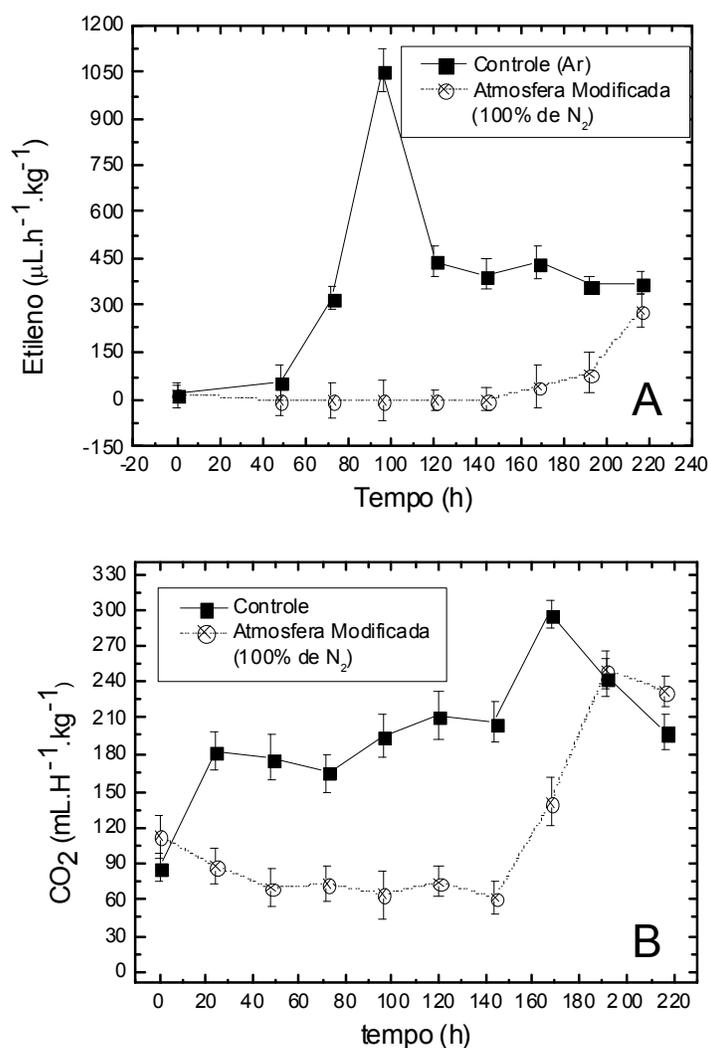


Figura 5.2 – O gráfico (A) mostra a taxa de emissão de etileno para frutos submetidos à atmosfera modificada de 100% de N₂ e 0% de O₂ (AM1) e dos frutos controle, em função do tempo. O gráfico (B) mostra a taxa respiratória para a mesma condição experimental. Barras verticais indicam o erro em desvio padrão.

Os frutos de maracujá amarelo submetidos a AM apresentaram uma taxa de emissão de etileno muito baixo comparado com frutos do grupo controle. Enquanto os frutos do grupo controle apresentaram uma taxa máxima de emissão de etileno de 1056,07 μL.h⁻¹.kg⁻¹ no tempo de 96 h, os frutos submetidos a AM apresentaram uma taxa de 0,38 μL.h⁻¹.kg⁻¹ para o mesmo

tempo. Após 144 h de experimento, os frutos submetidos a AM ficaram sob as mesmas condições do grupo controle e apresentaram um início do aumento de emissão de etileno. Nesta etapa, 3 dos 5 os frutos submetidos a AM já se encontravam em fase de senescência apresentando aspectos de fermentação e presença de fungos. Foi por esse motivo que os frutos sob AM foram armazenados sob a mesma condição que os frutos do grupo controle até o final das medidas (216 h), a fim de observar o comportamento final daqueles frutos em condições normais de atmosfera. Observou-se no final do experimento (tempo de 216h) que todos os frutos submetidos inicialmente a AM1 encontravam-se em aspecto de fermentação e com presença de fungos na casca. Porém, não foram apresentados tais sintomas nos frutos do grupo controle.

O comportamento da taxa respiratória para os frutos submetidos a AM1 foi decrescente até chegar ao tempo de 144 h ($113,41 \text{ mL.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ no tempo 0 e $61,99 \text{ mL.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ no tempo 144 h). Após este período, onde os frutos tratados encontravam-se nas mesmas condições de atmosfera do grupo controle. A taxa de emissão dióxido de carbono apresentou um valor máximo de $249,87 \text{ mL.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ para o tempo de 192 h. Para o tempo de 192 h, os frutos do grupo controle apresentaram uma elevação máxima da taxa respiratória de $297,21 \text{ mL.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$.

As baixas taxas emissão de etileno e de dióxido de carbono podem ser explicadas pela falta de oxigênio no ambiente, prejudicando, assim, o metabolismo respiratório do fruto acarretando à morte devido às condições de fermentação apresentadas pelos mesmos (Kende, 1993).

A Figura 5.3A mostra os resultados da taxa de emissão de etileno para frutos submetidos a AM de 97% de N_2 e 3% de O_2 (AM2), comparados com grupos controle e a Figura 5.3B mostra a taxa respiratória para os mesmos frutos.

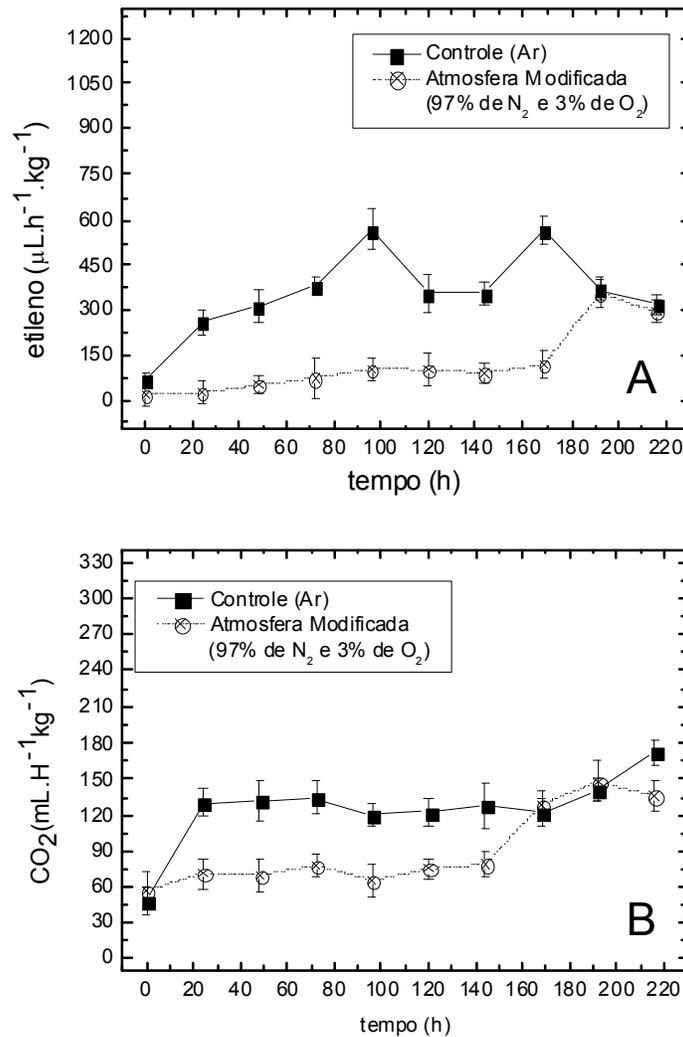


Figura 5.3 – O gráfico (A) mostra a taxa de emissão de etileno para frutos submetidos à atmosfera modificada de 97% de N₂ e 3% de O₂ (AM2) e dos frutos controle, em função do tempo. O gráfico (B) mostra a taxa respiratória para a mesma condição experimental. Barras verticais indicam o erro em desvio padrão.

Os frutos de maracujá amarelo submetidos à AM2 também mostraram uma taxa de emissão de etileno muito baixo comparado com frutos do grupo controle. Enquanto os frutos do grupo controle apresentaram dois pontos de alta taxa de emissão de etileno (568,04 μL.h⁻¹.kg⁻¹ no tempo de 96 h e 568,41 μL.h⁻¹.kg⁻¹ no tempo de 168 h), os frutos submetidos à AM apresentaram uma

taxa de $104,77 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ no tempo 96 h. Após 144 h de experimento, os frutos tratados com 97% de N_2 e 3% de O_2 também ficaram sob as mesmas condições do grupo controle, para que sofressem o mesmo procedimento experimental dos frutos submetidos a AM1. No tempo de 144 h, apenas um fruto do grupo submetido a AM2 apresentou sinais de fungo na casca. Sob a atmosfera com ar ambiente, os frutos previamente tratados pela AM2 tiveram um aumento na taxa de emissão de etileno e passaram a ter o valor de $357,96 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$. Observou-se no final do experimento (tempo de 216h) que 4 de 5 dos frutos submetidos inicialmente a AM2 tiveram um comportamento similar aos frutos tratados sob a AM1, apresentando aspectos de fermentação e presença de fungos. Porém, não foram apresentados tais aspectos nos frutos do grupo controle.

O comportamento da taxa respiratória para os frutos submetidos a AM2 foi praticamente constante entre as 24 h e as 144 h de medidas ($90,71 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ no tempo 144 h). Após este período, onde os frutos tratados encontravam-se nas mesmas condições de atmosfera do grupo controle, a taxa de emissão dióxido de carbono apresentou um valor máximo de $191,01 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ para o tempo de 192 h. Este comportamento indica que a exposição à AM com 3% de oxigênio não foi suficiente para o fruto ter um bom padrão respiratório (Chitarra e Chitarra, 2005).

A Figura 5.4A mostra os resultados da taxa de emissão de etileno para frutos submetidos à AM de 94% de N_2 e 6% de O_2 (AM3) comparados com grupos controle. A Figura 5.4B mostra a taxa respiratória para os mesmos frutos.

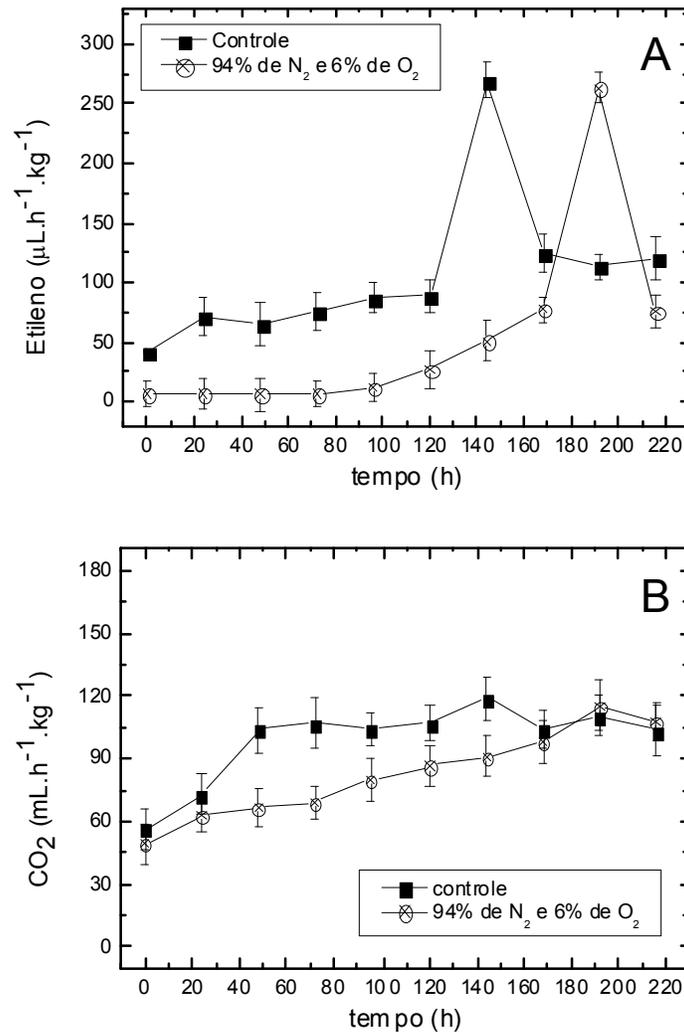


Figura 5.4 – O gráfico (A) mostra a taxa de emissão de etileno para frutos submetidos à atmosfera modificada de 94% de N₂ e 6% de O₂ (AM3) e dos frutos controle, em função do tempo. O gráfico (B) mostra a taxa respiratória para a mesma condição experimental. Barras verticais indicam o erro em desvio padrão.

Os frutos sob à AM3 tiveram uma baixa taxa de emissão de etileno comparados aos frutos submetidos à atmosfera natural do laboratório (controle). Porém, após as 144 h de experimento ficando sob atmosfera de ar ambiente (para que tivessem o mesmo procedimento experimental dos frutos submetidos a AM1 e AM2), estes frutos tiveram um aumento da taxa de

emissão de etileno, apresentando um perfil de pico climatérico. Os frutos sob AM3 tiveram um baixo crescimento da taxa de emissão de etileno, obtendo um valor de $51,01 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ ao final da exposição da AM3 no tempo de 144 h. Após estes frutos ficarem expostos ao ar ambiente, a taxa de emissão de etileno apresentou um pico em 192 h de $263,31 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$. Esta curva representa um comportamento de fruto climatérico (Abeles *et al*, 1992), pois os frutos desse tratamento apresentaram boas condições de consumo sem a presença de fermentação e de fungos na casca. Os frutos do grupo controle neste experimento tiveram um máximo da taxa de emissão de etileno em 144 h de $269,81 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, o que representa um amadurecimento com 48 h de antecedências comparado com os frutos do grupo tratado. Os frutos do grupo controle também não apresentaram aspectos de fermentação e de fungos na casca no final do experimento.

Enquanto os frutos do grupo controle tiveram um comportamento praticamente constante na taxa de emissão de dióxido de carbono a partir de 48 h de experimento, os frutos do grupo tratado sob AM3 tiveram um crescimento linear até 144 h, e após este período (sob atmosfera do ar ambiente) a taxa respiratória continuou a subir até 192 h ($115,37 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$). Isso indica que os frutos de maracujá amarelo tiveram uma boa tolerância sob atmosfera com 6% de O_2 , pois encontravam-se em boas condições de consumo ao término do experimento.

Os índices de cor a e b e o ângulo hue (h°) foram utilizados para validação da descrição visual da evolução da coloração da casca. As Figuras 5.5, 5.6 e 5.7 mostram respectivamente a dependência dos parâmetros a , b e h° com o tempo para as três condições de atmosfera modificada.

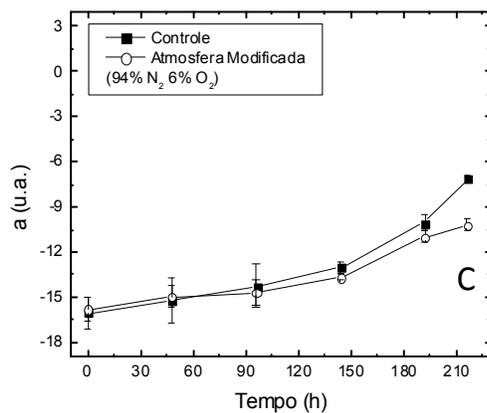
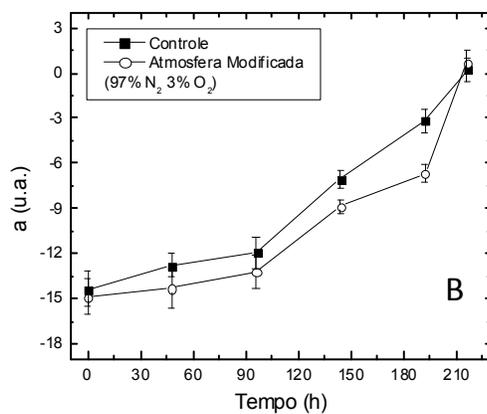
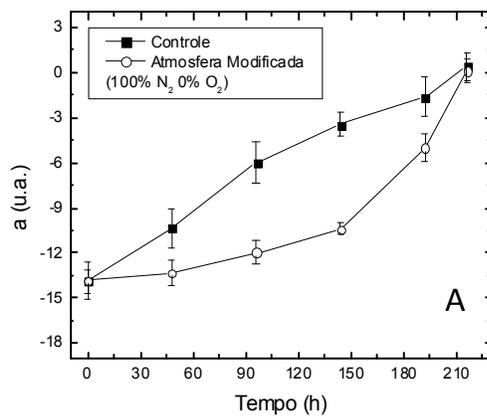


Figura 5.5 – Variação do parâmetro de cor *a* em função do tempo para os frutos do grupo controle comparados com os frutos das três condições de atmosfera modificada: (A) atmosfera modificada com 100% de N₂ e 0% de O₂ (AM1); (B) atmosfera modificada com 97% de N₂ e 3% de O₂ (AM2); (C) atmosfera modificada com 94% de N₂ e 6% de O₂ (AM3). Barras verticais indicam o erro em desvio padrão.

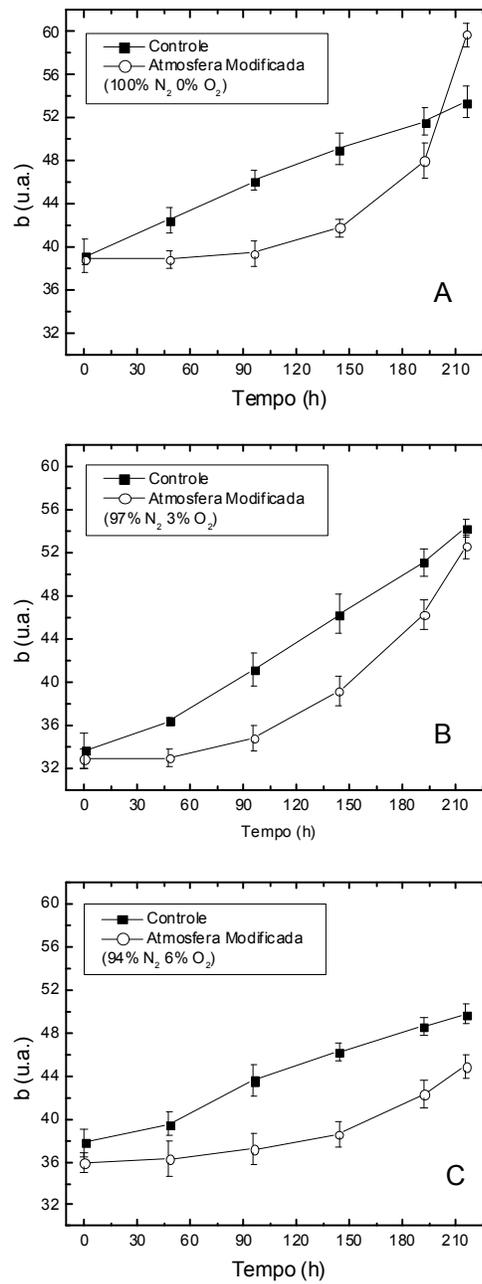


Figura 5.6 – Variação do parâmetro de cor b em função do tempo para os frutos do grupo controle comparados com os frutos das três condições de atmosfera modificada: (A) atmosfera modificada com 100% de N₂ e 0% de O₂ (AM1); (B) atmosfera modificada com 97% de N₂ e 3% de O₂ (AM2); (C) atmosfera modificada com 94% de N₂ e 6% de O₂ (AM3). Barras verticais indicam o erro em desvio padrão.

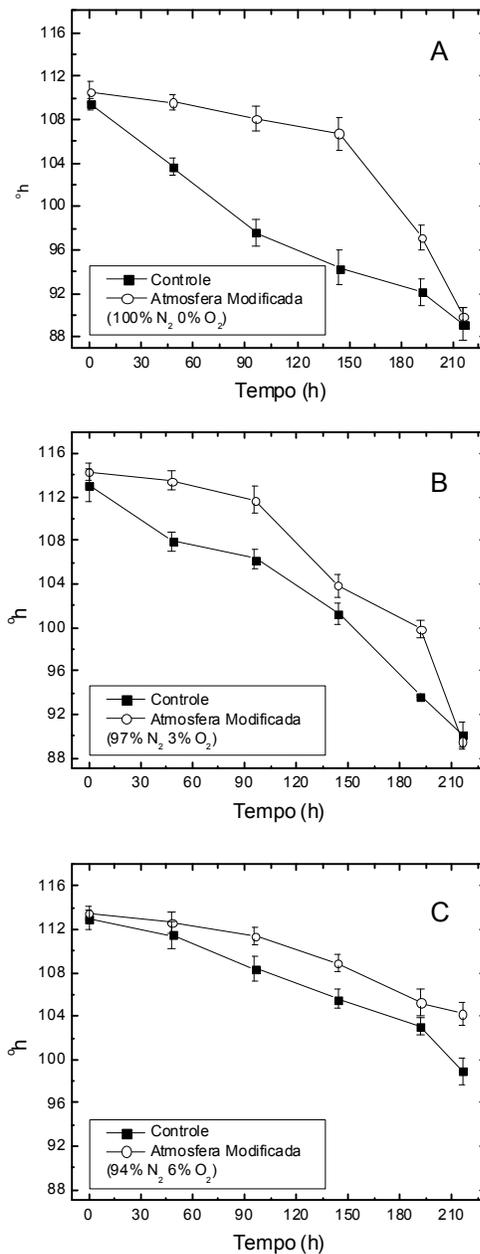


Figura 5.7 – Variação do ângulo *hue* (°h) em função do tempo para os frutos do grupo controle comparados com os frutos das três condições de atmosfera modificada: (A) atmosfera modificada com 100% de N₂ e 0% de O₂ (AM1); (B) atmosfera modificada com 97% de N₂ e 3% de O₂ (AM2); (C) atmosfera modificada com 94% de N₂ e 6% de O₂ (AM3). Barras verticais indicam o erro em desvio padrão.

Pode-se observar que os valores dos parâmetros a e b para os frutos submetidos a AM1 e a AM2 tiveram uma aceleração no aumento de seus valores após 144 h, justamente quando os frutos saíram das condições de AM e ficaram sob atmosfera do ar ambiente. Os valores de $^{\circ}h$ para AM1 e AM2 também apresentaram um comportamento similar. Tiveram uma aceleração na queda de seus valores também após 144h de experimento. Esta mudança mais brusca dos valores de a , b e h° após o tempo de 144h para ambos os experimentos representa um amarelecimento muito rápido da casca devido ao processo de fermentação e do aparecimento de fungo em alguns frutos após saírem de suas respectivas AM.

Os resultados para os frutos submetidos a AM com 94% de N_2 e 6% de O_2 (AM3) apresentaram um comportamento diferente dos frutos submetidos a outras AM (AM1 e AM2). Após a retirada dos frutos sob AM3 e postos sob atmosfera de ar ambiente, os frutos não apresentaram nenhuma mudança brusca nas variações dos parâmetros a , b e $^{\circ}h$. Na verdade, os parâmetros de cor da casca dos frutos tratados inicialmente com AM3 indicam que esses frutos tiveram um amarelecimento posterior aos frutos do grupo controle. Isso pode ser visto uma vez que os valores médios de a e b dos frutos do grupo tratado foram menores comparados com o dos frutos do grupo controle no decorrer do experimento (exemplo, no tempo 216 h os valores médios de a e b do grupo tratado foram -10,22 u.a. e 44,88 u.a. e os valores médio de a e b do grupo controle foram -7,14 u.a. e 49,72 u.a., respectivamente). Os valores médios para $^{\circ}h$ dos frutos do grupo tratado foram maiores comparados com o dos frutos do grupo controle no decorrer do experimento (exemplo, no tempo 216 h o valores médio de $^{\circ}h$ do grupo tratado de 104,24 h° e o valor médio de $^{\circ}h$ do grupo controle de 98,94 h°). Os resultados dos parâmetros de cor Hunter deste trabalho são compatíveis a descrição fisiológica pós-colheita do maracujá amarelo feita por Silva (2008).

A Tabela 5.1 mostra a perda de massa para os frutos de cada experimento, expresso em %. Segundo a análise estatística, usando teste de Tukey com 0,1% de probabilidade, mostrou que não houve nenhuma variação significativa entre os frutos tratados com os respectivos frutos do grupo controle. Estes resultados mostram que, mesmo estando em níveis inferiores a 10 % (porcentagem necessária para que ocorra um efeito positivo na redução

da respiração), a redução da taxa respiratória não influenciou na perda de massa dos frutos de maracujá (Chitarra e Chitarra, 2005).

Tabela 5.1 – Dados de perda de massa para as três condições experimentais são comparadas com os do grupo controle. Os valores são expressos em % de perda de massa.

	AM1 (100% N ₂ 0% O ₂)	AM2 (97% N ₂ 3% O ₂)	AM3 (94% N ₂ 6% O ₂)
Grupo Controle (%)	4,62 ± 0,39 %a	3,31 ± 0,16 %a	3,05 ± 0,34 %a
Grupo Tratado (%)	4,05 ± 0,57 %a	3,54 ± 0,23 %a	3,53 ± 0,39 %a

Médias seguidas pelas mesmas letras, nos lotes, não diferem entre si a 0,1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Os resultados demonstram que com baixo nível de oxigênio ocorre a fermentação do maracujá amarelo. Essa falta de oxigênio interfere diretamente no processo respiratório do fruto, acarretando em danos fisiológicos, como a fermentação (Brackman e Chitarra, 1998). Os resultados obtidos estão em concordância com o esperado, ou seja, altos níveis de dióxido de carbono e baixos níveis de oxigênio podem provocar estresse nos frutos (Chitarra e Chitarra, 2005). Foi observado que concentrações acima de 5% de dióxido de carbono podem provocar sabor e odor desagradáveis em laranjas (Peretz *et al*, 2001). Manga e limão expostos a concentrações de dióxido de carbono acima de 10% apresentam perdas de qualidades fisiológicas e hortaliças como pepino e cogumelo não suportam concentrações de dióxido de carbono acima de 50% (Katrodia, 1988, Leguizamon *et al*, 2001). Contudo, o uso de baixa concentração de oxigênio e alta concentração de dióxido de carbono também produz bons efeitos na conservação de frutos como maçã e tomate (Moretti *et al*, 1998). Também, o uso de controle de gases na atmosfera também auxilia no controle de insetos (como a mosca da fruta) em frutos, hortaliças e grãos (Resende e Machado, 2002). Resultados com banana prata (Finger *et al*, 1995) mostraram que o uso elevado da concentração de dióxido de carbono e a diminuição de etileno, com o uso de absorvedores, resultou em um bom efeito na conservação do fruto. De forma similar, estudo envolvendo atmosfera modificada com absorção de etileno juntamente com uso de baixa temperatura

(12 °C) mostrou resultados significativos na conservação de mamão (Pereira, 2008).

Conclusão

Pode-se concluir que o monitoramento da taxa de emissão de etileno, através da espectroscopia fotoacústica, permitiu avaliar em tempo real o amadurecimento de frutos do maracujazeiro amarelo submetidos a baixas concentrações de oxigênio. Concentrações abaixo de 3% de O₂ prejudicam o processo respiratório do fruto, causando danos como o não amadurecimento. Contudo, o uso de concentração de 6% de O₂ não apresentou danos aos frutos do maracujazeiro, como fermentação e fungos na casca, e mostrou um retardo de dois dias no pico climatérico, comparado aos frutos submetidos à atmosfera com ar ambiente.

Referências Bibliográficas

- ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALTVEIT Jr., M. E. **Ethylene in Plant Biology**, 2ed., San Diego, USA: Academic Press. 1992, 414p.
- BRACKMAN, A.; CHITARRA, A. B. Atmosfera controlada e atmosfera modificada. In: BORÉM, f. m.; CHITARRA, A. B.; **Armazenamento e processamento de produtos agrícolas**. Ed. UFLA, Lavras, p. 133-170, 1998.
- CHITARRA M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças**. Ed UFLA, 2d., 2005, 783p.
- CORRÊA, S.F.; BAPTISTA FILHO, M.; SILVA, M.G.; OLIVEIRA, J.G.; AROUCHA, E.M.M.; SILVA, R.F.; PEREIRA, M.G. e VARGAS, H. Effect of the potassium permanganate during papaya fruit ripening: ethylene production. **J. Phys. IV France**, 125:869-871, 2005.
- COULTATE, T.P. **Alimentos: a química de seus componentes**, 3 ed. Porto Alegre: Artimed, 2004, 368p.
- da SILVA, M.G.; AROUCHA, E.M.M.; OLIVEIRA, J.G.; CORREA, S.F.; BAPTISTA FILHO, M.; da SILVA, R.F.; PEREIRA, M.G. E VARGAS, H. Influência da emissão de etileno na qualidade fisiológica de sementes de

- mamão (*Carica papaya* L.), **II Rev. de Pes. Do Frutimamão**, Campos dos Goytacaze, 255-261, 2004.
- da SILVA, M. G.; LIMA, J.A. P.; SHEL, M. S.; MARÍN, E.; GATTS, C. E. N.; CARDOSO, S. L.; CAMPOSTRINI, E.; PEREIRA, M. G.; CAMPOS, A. C.; MASSUNAGA, M. S. O.; VARGAS, H. Ethylene and CO₂ emissions rates in tropical fruits investigated by infrared absorption techniques, **Analytical Science**, Japan, 17: 534-537, 2001.
- da SILVA, M. G.; SANTOS, E. O.; SHEL, M. S.; CARDOSO, S. L.; CAVALLI, A.; MONTEIRO, A. R.; de OLIVEIRA, J. G.; PEREIRA, M. G.; VARGAS, H. Effect of heat treatment on ethylene and CO₂ emissions rates during papaya (*Carica papaya*, L.) fruit ripening, **Review of Scientific Instruments**, 74, (1), USA, 2003.
- de VRIES, H. S. M. ; WASONO, M. A. J. ; HARREN, F. J. M.; WOLTERING, E. J. ; van der VALK, H. C. P. M.; REUSS, J. Ethylene CO₂ emission rates and pathways in harvested fruits investigated, in situ, by laser photothermal deflection and photoacoustic techniques, **Post, Biology and Technology**, 8: 1-10, 1996.
- DURIGAN, J. F.; SGRIST, J. M. M.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C.; VIEIRA, G. Qualidade e tecnologia pós-colheita do maracujá. In: Lima, A. de A.; Cunha, M. A. P. da. **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. p. 283-303, 2004.
- FINGER, F. L.; PUSCHMANN, R.; BARROS, R. S. Effects of water loss on respiration, ethylene production and ripening of banana fruit. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 2, n.1, p. 115-120, 1995.
- KATRODIA, J. S. Spongy tissue in mango-cause and control measures. **Acta Horticulturae**, v. 231, p. 815-826, 1988.
- KENDE, H. Ethylene Biosynthesis. **Rev. Plant Physiol**, 44: 283-307, 1993.
- LEGUIZAMON, C.; LENTHERIC, I.; PONTÓN, E.; VELTMAN, R. H.; JAGER, A.; STREIF, J. High CO₂ level affects ascorbate metabolism in controlled – atmosphere stored pears. **Acta Horticulturae**, v. 553, p.639-641, 2001.
- MORETTI, C. L.; SARGENT, S. A.; HUBER, D. J. Chemical composition, and physical properties of pericarp, locule and placental tissues of tomatoes with internal bruising. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 123, n. 4, p. 656-660, 1998.

- NASCIMENTO, T. B.; RAMOS, J. D.; MENEZES, J. B. Características físicas do maracujá-amarelo produzido em diferentes épocas. **Pesquisa Agropecuária. Brasília**, v. 34, n. 12, p. 2353-2358, 1999.
- PEREIRA, T. **Contribuição de técnicas fototérmicas ao estudo pós-colheita de mamão: difusão gasosa e armazenamento em atmosfera modificada**. Tese (Doutorado), UENF, Campos dos Goytacazes, 2008, 117p.
- PERETZ, J.; MORAN, R.; LAVIE, B.; YEHOSHUA, S. B. Postharvest treatment of high relative humidity (RH) and low temperature reduce the incidence of superficial flavedo necrosis (noxan) of 'Shamouti' orange. **Acta Horticulturae, Leuven**, v. 553, p. 301-302, 2001.
- RUGGIERO, C.; SÃO JOSÉ, A. R.; VOLPE, C. A.; OLIVEIRA, J. C.; DURIGAN, J. F.; BAUGARTNER, J. G.; SILVA, J. R.; NAKAMURA, K.; FERREIRA, M. E.; KAVATI, R.; PEREIRA, V. P. Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção. **EMBRAPA-FRUPEX**, 1996, 19p.
- SILVA, T. V. **Fisiologia do desenvolvimento dos frutos do maracujazeiro amarelo e maracujazeiro doce**. Tese (Doutorado), UENF, Campos dos Goytacazes, 2008, 155p.
- WACHOWICZ, C. M.; CARVALHO, R. I. N. **Fisiologia vegetal**. Ed. Champagnat, Curitiba, 1 ed., 2002, 424p.

CAPÍTULO 6

Estresse abiótico em mamão provocado por ozônio

Resumo

O presente capítulo trata do estresse provocado pelo ozônio sobre frutos do mamoeiro. Este estresse foi identificado pelo monitoramento das taxas de emissões de etileno e dióxido de carbono, variação da cor da casca do fruto e de parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, a partir da casca dos frutos. Medidas de coloração da casca e de concentrações de etileno e de dióxido de carbono foram realizadas utilizando a técnica fototérmica. Para as condições usadas de exposição ao ozônio (fluxo $2\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ de 6ppm durante 24 horas), ocorreu uma antecipação de dois dias do pico climatérico das amostras, em comparação com as não tratadas. O estresse provocado pelo ozônio também provocou uma variação rápida da coloração da casca dos frutos e um declínio do rendimento quântico da fluorescência da clorofila *a* presente na casca dos frutos.

Palavras chaves: espectroscopia fotoacústica, etileno, fluorescência da clorofila *a*, pigmentos fotossintéticos

Introdução

Um grande problema que afeta a produção agrícola se refere à poluição atmosférica. Estando na lista dos principais poluentes, o ozônio troposférico é responsável por gerar danos em plantas, deixando-as mais sensíveis a estresses ambientais, tais como seca, temperaturas elevadas, ataque de pragas, que resultam em perdas consideráveis à atividade agropecuária (Martins e Rodrigues, 2001).

O ozônio é um dos gases responsáveis pelo efeito estufa, pois possui três átomos de oxigênio com ligações que vibram em frequência da faixa do infravermelho situada em torno de $9,6\ \mu\text{m}$ favorecendo a absorção da radiação

infravermelha refletida pela superfície terrestre e atenuando o efeito estufa (Baird, 2002).

O O₃ troposférico é considerado um dos principais poluentes atmosféricos. O aumento do ozônio troposférico resulta em problemas respiratórios, irritação nos olhos, agressão ao cabelo e à pele, bem como à arborização urbana, danos a monumentos e edificações e comprometimento da produção agrícola (Martins e Rodrigues, 2001). Danos foliares causados pelo ozônio podem favorecer o desenvolvimento de doenças fúngicas, facilitando e acelerando a infecção e a produção de esporos, além de facilitar o ataque de insetos e outros artrópodes (Black *et al*, 2000).

Entretanto, além da senescência verifica-se que existem poucos estudos envolvendo a ação do estresse abiótico em frutos provocados pelo ozônio e suas conseqüências. Sabe-se que ozônio pode acelerar o processo de amadurecimento em frutos (LANGEBARTELS *et al.*, 1991; DIZENGREMEL, 2001; Salvador *et al.*, 2006; ref). Obviamente, essa aceleração acarreta numa diminuição do tempo de prateleira dos frutos gerando prejuízos pós-colheita para o produtor. Sendo assim, faz-se necessário um estudo das conseqüências do ataque do ozônio sobre o amadurecimento de frutos de grande importância econômica para o Brasil como o mamão.

O objetivo deste capítulo foi avaliar o estresse provocado em mamão (*Carica papaya* L. cv. Golden) pela ação do ozônio.

Material e Métodos

Amostra vegetal

Foram utilizados para esse trabalho, frutos de mamão cv. Golden no estágio 0 de amadurecimento (de acordo com a tabela apresentada no apêndice A) fornecidos pela Empresa Caliman Agrícola S/A (Linhares, ES).

Uso de atmosfera modificada com ozônio

Para avaliar o efeito do estresse provocado por 6 ppm de ozônio em ar, durante 24 horas, três experimentos foram realizados: monitoração das

variações das taxas de emissão de etileno e de dióxido de carbono do mamão utilizando a Espectroscopia Fotoacústica e correlacionando essas emissões com a coloração da casca do fruto; análise de espectros de absorção da casca do fruto no visível e ultravioleta utilizando um espectrômetro fotoacústico; e análise da correlação das variáveis da fluorescência da clorofila *a* com os parâmetros de cor da casca dos frutos. Nos três experimentos foram separados dois grupos com amostras de mamão 'Golden' no estágio 0 de maturação. Um grupo foi colocado dentro de uma câmara e mantido a uma atmosfera típica de laboratório, usando um fluxo constante de 2L/h de ar durante 24 horas (grupo controle). O segundo grupo, também colocado dentro de uma segunda câmara, foi submetido a uma atmosfera contendo 6 ppm de ozônio em ar, sob fluxo de 2L/h, durante 24 horas (grupo tratado). Para a produção de 6 ppm de ozônio em ar foi utilizado um gerador de ozônio considerando 21% de oxigênio no ar ambiente (da Silva *et al.*, 2004).

Experimento I: avaliação das taxas de emissão de etileno e de CO₂ com a coloração da casca do fruto

Para este experimento foram utilizadas três amostras para cada grupo, totalizando seis frutos.

As medições de etileno foram realizadas utilizando um espectrômetro fotoacústico (da Silva *et al.*, 2003), com sensibilidade de medição de concentrações de etileno da ordem de 0,30 nL/L (Figura 5.1). Neste espectrômetro um laser de CO₂ é utilizado e a célula fotoacústica se encontra no interior da cavidade do laser, favorecendo a relação sinal-ruído. O etileno emitido pelo fruto, colocado na câmara de amostra, foi transferido continuamente para a célula fotoacústica usando ar como gás de arraste a um fluxo constante de 2 L h⁻¹, controlado por fluxômetros eletrônicos. Filtros químicos foram empregados para eliminar o CO₂ e a água e, antes de entrar na célula fotoacústica, o gás de análise passou através de uma armadilha de N₂ líquido, para evitar a interferência de traços de vapor d'água e hidrocarbonetos. O sistema foi calibrado diariamente usando uma amostra de etileno em nitrogênio, padrão comercial, na concentração de 1 parte por milhão em volume (1 ppmV).

A taxa de emissão de CO₂ foi monitorada usando um analisador comercial de gás no infravermelho (Hartman & Braun modelo URAS 14). O princípio de detecção se baseia na medição da queda relativa da intensidade da radiação infravermelha de uma fonte (filamento incandescente) após passar por caminhos óticos em paralelo, sendo um preenchido pela amostra gasosa em fluxo e outra por nitrogênio (selada). Após passar pelos dois caminhos óticos, cada um dos feixes de radiação passa individualmente por duas câmaras preenchidas com CO₂ (100%). Essas câmaras com CO₂ isoladas entre si por uma membrana capacitiva que permite determinar a diferença de pressão entre as duas devido ao decaimento não-radiativo das moléculas de CO₂ excitadas (de Vries *et al*, 1996). O analisador de CO₂ foi montado em série ao espectrômetro fotoacústico antes do filtro de CO₂.

A mudança de coloração da casca dos frutos foi monitorada diariamente usando um colorímetro digital portátil (Chroma Meter, modelo CR-300, Minolta). Medidas foram realizadas em três pontos equidistantes na região equatorial dos frutos e os resultados foram expressos por meio do ângulo de cor *hue* e dos parâmetros de cor de Hunter (*L*, *a* e *b*). Nesta escala, o índice de cor *L* refere-se a luminosidade, virando de 0 (para amostras perfeitamente preta) a 100 (para amostra perfeitamente branca); já o índice *a* varia da cor verde (sinal negativo) ao vermelho (sinal positivo) e *b* do azul (sinal negativo) ao amarelo (sinal positivo). Valores de *a* e *b* iguais a zero corresponde à cor cinza. O ângulo *hue* (*h*^o) define a coloração básica, onde 0^o = vermelho, 90^o = amarelo, 180^o = verde e 270^o = azul (Coultate, 2004).

A partir dos parâmetros de cor de Hunter pode-se determinar a diferença de coloração total ΔE . Este parâmetro é obtido pela seguinte expressão:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2} \quad (1)$$

onde $\Delta L = L_n - L_0$, sendo *L* luminosidade; $\Delta a = a_n - a_0$ e $\Delta b = b_n - b_0$, sendo *a* e *b* dimensões de coloração. O índice “0” refere-se ao tempo inicial (tempo 0) e “*n*” a um tempo qualquer dentro do período de maturação.

Experimento II: Espectrômetro Fotoacústico para análise de espectros de absorção de coloração da casca do fruto

Foram utilizados 10 frutos de mamão 'Golden' no estágio 0 divididos em 5 amostras para dois grupos (grupos controle e grupo tratado com ozônio). Após as 24 horas de tratamento, foi selecionado um fruto de cada grupo por dia para análise de absorção da casca dos frutos no visível, num total de 5 dias (tempo 0, 24, 48, 72 e 96 h). Em cada fruto, foram retirados 3 discos com 5mm de diâmetro e 1,5mm de espessura. Este experimento foi realizado 3 vezes (3 repetições), com total de 30 amostras no final.

A montagem experimental para a medição do espectro de absorção na faixa do visível baseado efeito fotoacústico está esquematizada na Figura 6.1.

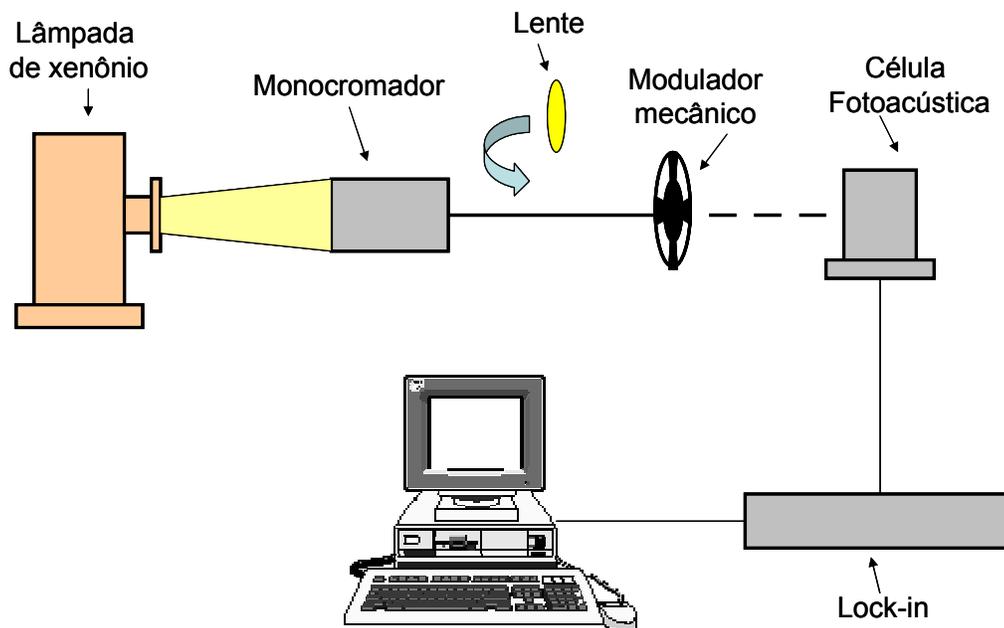


Figura 6.1 – Diagrama da montagem experimental do espectrômetro fotoacústico usado para obtenção de espectro de absorção.

Uma lâmpada de xenônio com potência usada de 1000 W da Oriel Corporation foi utilizada como fonte de luz operando com 500 W de potência. A luz gerada pela lâmpada passa por um monocromador tendo o seu espectro

decomposto nos comprimentos de onda entre 300 nm a 750 nm. Posteriormente, o comprimento de onda selecionado passa por um modulador mecânico (“chopper”), modulando o feixe em 17 Hz. Faz necessário o uso de um filtro amarelo após 580 nm para cortar a difração de segunda ordem da rede de difração. Após a modulação, o feixe atinge a célula fotoacústica (Model 300, da MTEC), onde a luz é absorvida pela amostra, gerando o sinal fotoacústico que é detectado pelo microfone acoplado a célula. O sinal é amplificado por um amplificador sintonizado na frequência de modulação (“lock-in”). Todo o sistema está automatizado permitindo a obtenção direta do espectro de absorção. Como procedimento de calibração do sistema, e com o propósito de eliminar variações espectrais da fonte de iluminação, o sinal fotoacústico é dividido pelo sinal obtido de uma amostra padrão (carvão) fornecida pela MTEC.

Experimento III: Correlação entre as variáveis da fluorescência da clorofila a e os parâmetros de cor da casca dos frutos.

Para a análise da emissão de fluorescência da clorofila a em frutos de mamão submetidos ao estresse de ozônio foi utilizado um fluorímetro portátil (Mini PAM, WALZ - Alemanha). As medidas foram feitas sobre a casca do fruto em seis pontos equidistantes para cada amostra. Foram feitas medidas antes (tempo 0) e após o tratamento, acompanhando a evolução temporal das amostras até 6 dias após o início do tratamento.

Como pré-tratamento dos frutos para a medição da fluorescência da clorofila a, os frutos ficaram acondicionados durante 30 minutos em uma câmara escura. Em seguida, uma luz branca de intensidade de $\sim 5000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ foi incidida sobre a casca dos frutos a uma distância pré-determinada dentro da câmara. Após o pulso de luz branca foram registrados as seguintes variáveis: fluorescência mínima (F_0), fluorescência máxima (F_m), fluorescência variável (F_v) e eficiência quântica potencial do fotossistema II (F_v/F_m). Após essas medidas de fluorescência, medidas de coloração da casca dos frutos (L, a, b e °h) foram realizadas para serem correlacionadas com essa, utilizando um colorímetro digital portátil (Chroma Meter, modelo CR-300, Minolta). As leituras

dos parâmetros de cor foram feitas nos mesmos pontos da casca dos frutos onde foram realizadas as medidas de fluorescência da clorofila *a*.

Resultados e discussão

Avaliação das taxas de emissão de etileno e de CO₂ com a coloração da casca do fruto

As Figuras 6.2A e 6.2B mostram, respectivamente, a evolução temporal da taxa de emissão de etileno e de CO₂ dos dois grupos analisados, onde cada curva representa a média de três amostras. Os resultados mostram que o pico climatérico para os frutos tratados com ozônio foi antecipado em dois dias em relação à posição do pico climatérico das amostras não tratadas. Isso provavelmente ocorreu devido ao aumento da atividade da enzima ACC sintase provocado pela presença do ozônio (Langebartels et al., 2002).

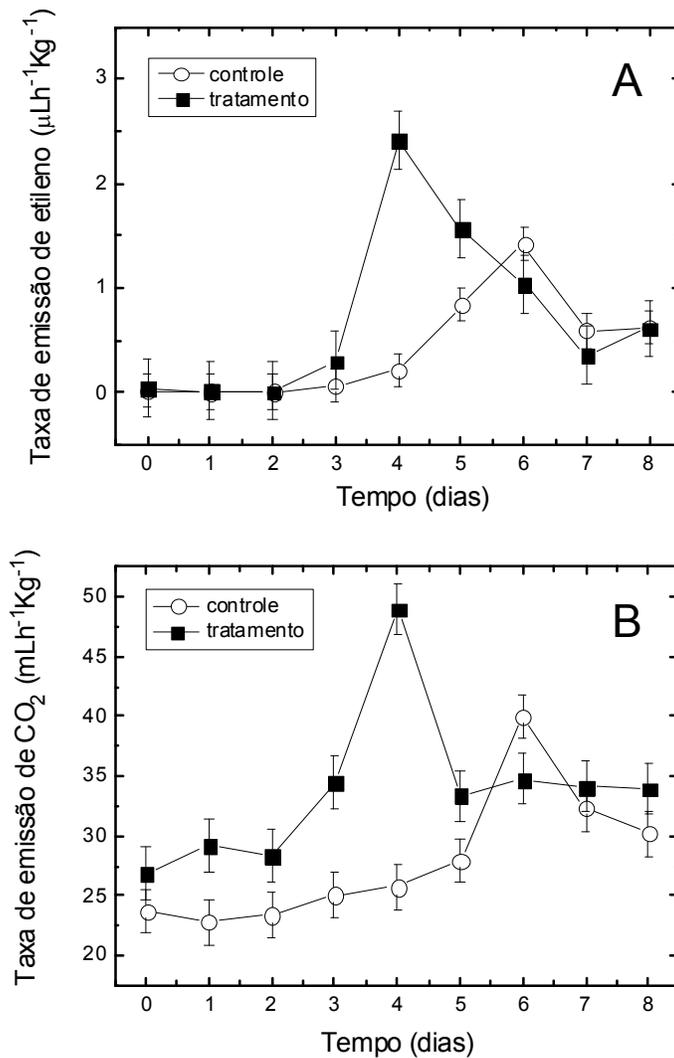


Figura 6.2 – Taxa de emissão de etileno (A) e de CO₂ (B) durante a pós-colheita de frutos. As curvas (○) representam a média de três amostras não tratadas e as curvas (■) representam a média de três amostras tratadas com 6 ppm de ozônio em ar durante 24h.

Os resultados referentes à variação da coloração da casca dos frutos apresentaram uma tendência semelhante. Na Figura 6.3A é mostrada a evolução temporal da diferença de coloração total para o grupo controle. Na Figura 6.3B é mostrada a evolução temporal da diferença de coloração total para o grupo tratado. Os valores obtidos para o meio-tempo de saturação da cor da casca do grupo controle são praticamente os mesmos entre os frutos do

grupo ($5,90 \pm 0,3$ dia). Os frutos do grupo tratado também apresentaram valores de meio-tempo de saturação da cor da casca próximos entre si, porém antes dos frutos do grupo controle ($4,13 \pm 0,4$). Essa coincidência entre o meio-tempo de saturação dos frutos 'Golden' são explicados pela uniformidade genética do cultivar, o que poderia ser esperado pois existe uma maior uniformidade nas plantas, conseqüentemente, também nos frutos (Corrêa, 2005).

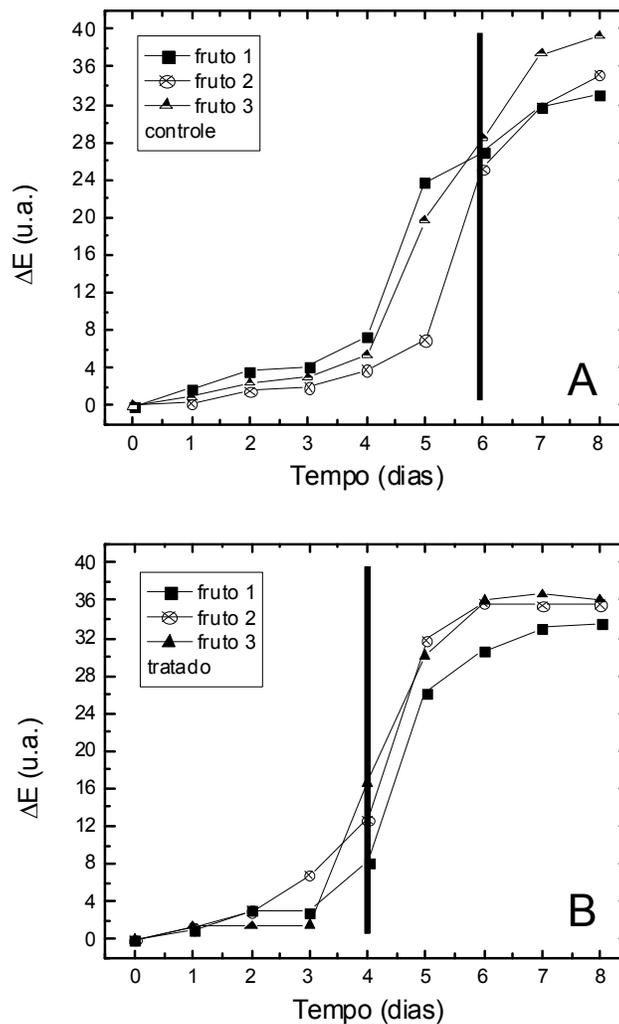


Figura 6.3 – Evolução temporal da diferença de coloração total da casca dos frutos do grupo controle (A) e dos frutos do grupo tratado (B). As linhas pretas na vertical representam o meio-tempo da variação da coloração da casca dos frutos.

O meio-tempo da variação da coloração da casca dos frutos foi comparado com o tempo do pico climatérico de cada amostra (Corrêa, 2005). Na Tabela 6.1 pode-se observar que o meio-tempo da variação da coloração da casca dos frutos do grupo controle coincidiu com seus picos climatéricos, da mesma forma para as amostras do grupo tratado com ozônio. Tal coincidência entre a posição do pico climatérico e o meio-tempo da coloração da casca já foi verificada anteriormente para diferentes estádios de amadurecimento de frutos de mamão ‘Golden’ e ‘formosa’ (Corrêa, 2005). Essa coincidência mostra que além da antecipação da taxa de emissão de etileno, os frutos submetidos à atmosfera com ozônio apresentaram um amarelecimento da casca antes dos frutos do grupo controle. Esse comportamento da coloração da casca também indica a sensibilidade ao estresse causado pela ação do ozônio em frutos de mamão ‘Golden’.

Tabela 6.1 - Relação entre o pico climatérico de frutos testemunhas e de frutos tratados com 6 ppm de ozônio em ar durante 24h com seus respectivos meio-tempo de saturação da coloração da casca.

	Grupo Controle			Grupo Tratado		
Tempo do pico climatérico (dias)	$6 \pm 0,3$	$6 \pm 0,3$	$6 \pm 0,3$	$4 \pm 0,4$	$4 \pm 0,4$	$4 \pm 0,4$
Tempo médio de saturação da ΔE (dias)	$5,9 \pm 0,3$	$5,9 \pm 0,3$	$5,9 \pm 0,3$	$4,1 \pm 0,4$	$4,2 \pm 0,4$	$4,1 \pm 0,4$

Espectrômetro Fotoacústico para análise de coloração da casca do fruto

Na Figura 6.4 são apresentados espectros de absorção da casca do fruto do mamoeiro tratados com ozônio (linhas tracejadas) e não tratados (linhas contínuas) no tempo 0 h após o término do tratamento. Conforme esperado, cada espectro revela a existência de três bandas de absorção características que estão relacionadas à cutícula cerosa (320-450 nm), carotenóides (400-550 nm) e clorofilas (420-480 nm e 650-700 nm) (Nery *et al.*, 1987).

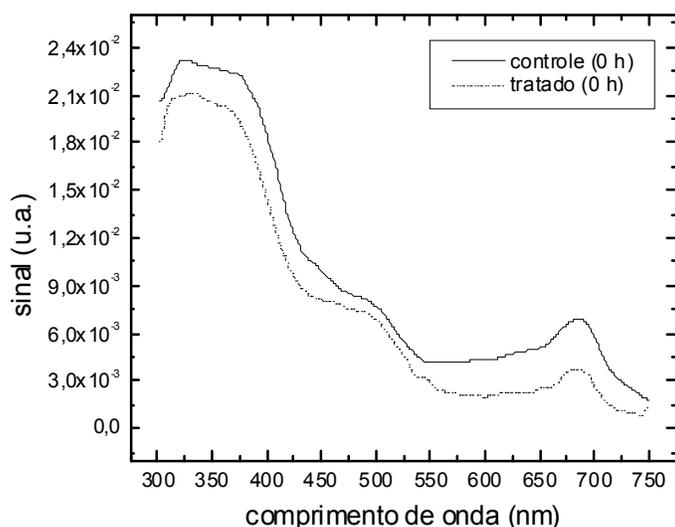


Figura 6.4 - Espectro da casca de frutos de mamão do grupo tratado com ozônio (linhas tracejadas) e controle (linhas contínuas).

Para uma melhor avaliação da degradação dos pigmentos fotossintetizantes, os espectros de absorção referentes à absorção da cutícula cerosa foram separados dos espectros de absorção dos pigmentos fotossintetizantes (carotenóides e clorofilas) utilizando o método de separação de fases, apresentado no apêndice B. Através desta separação, pôde ser feita uma análise do perfil em profundidade dos espectros da casca dos frutos do grupo tratado com frutos do grupo controle. Nery (1987) mostrou a separação de espectros de absorção dos pigmentos fotossintetizante da cutícula cerosa em folhas de café tratados com herbicidas, retratando uma excelente aplicação desta técnica para análise de degradação dos pigmentos fotossintetizantes.

As Figuras 6.5 e 6.6 mostram espectros de absorção isolados da cutícula cerosa e dos pigmentos fotossintetizantes, respectivamente. Nas mesmas figuras são mostradas a dependência temporal dessas absorções para os tempos: 0, 24, 48, 72 e 96 horas após o tratamento.

Os espectros de absorção da cutícula cerosa estão na fase $\theta_1 = 105^\circ$ e os espectros de absorção dos pigmentos fotossintetizantes estão na fase $\theta_2 = -40^\circ$. Considerando que o ângulo θ_1 reproduz o espectro da camada da cutícula cerosa, sabe-se que o sinal da camada dos pigmentos fotossintetizantes está

na fase $\theta_B = -40^\circ + 90^\circ = 50^\circ$. Analogamente, considerando que o ângulo θ_2 reproduz o espectro da camada dos pigmentos fotossintetizantes, sabe-se que o sinal da camada da cutícula cerosa está na fase $\theta_A = 105^\circ - 90^\circ = 15^\circ$. Sendo assim, a diferença de fase entre o sinal devido à cutícula cerosa e o sinal devido aos pigmentos fotossintetizantes é de $\varphi = 35^\circ$.

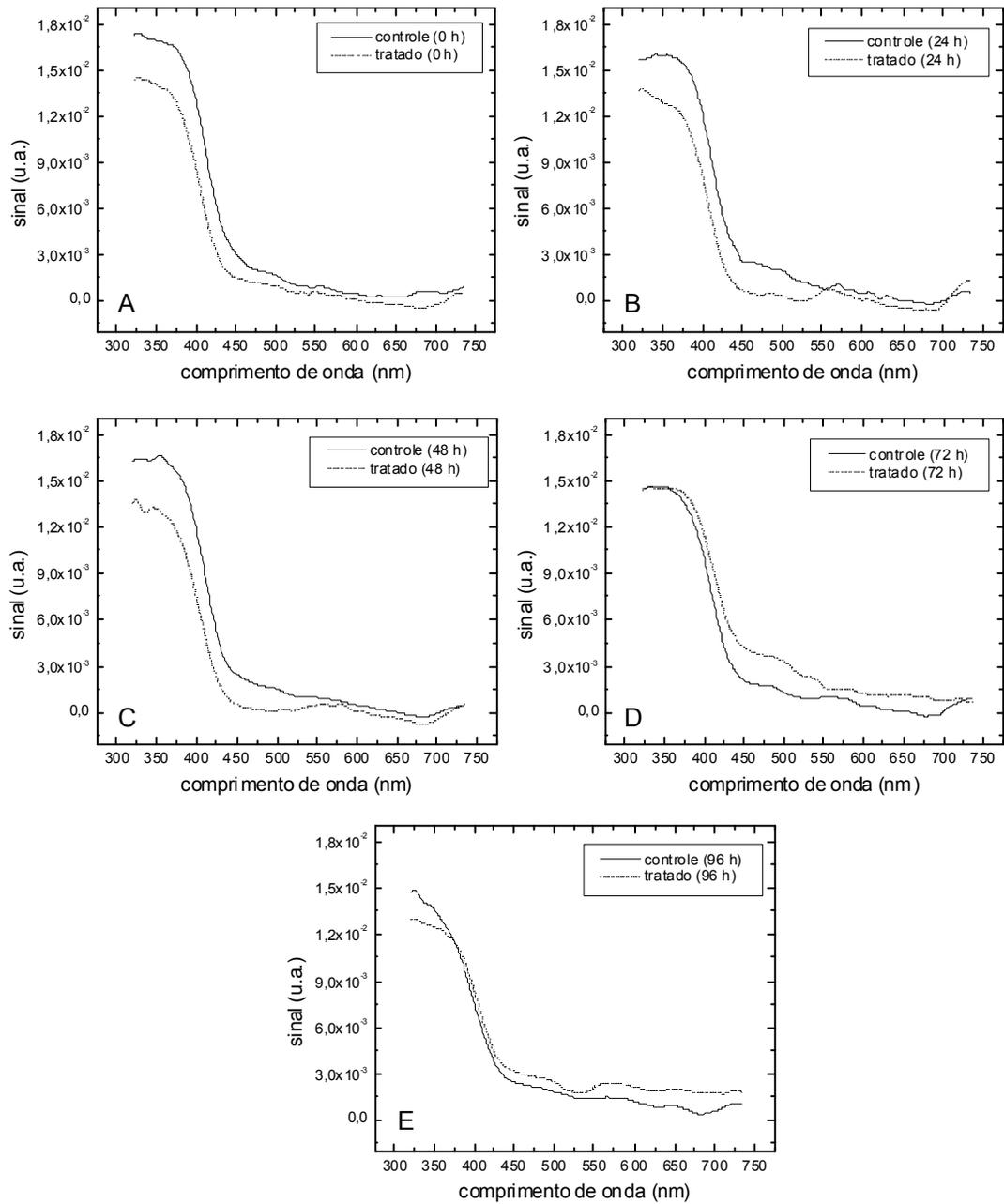


Figura 6.5 – Espectros de absorção da cutícula cerosa da casca do mamão do grupo tratado com ozônio (linhas tracejadas) e controle (linhas contínuas) em função da evolução temporal de amostras com melhor apresentação (0, 24, 48, 72 e 96 horas após o término do tratamento).

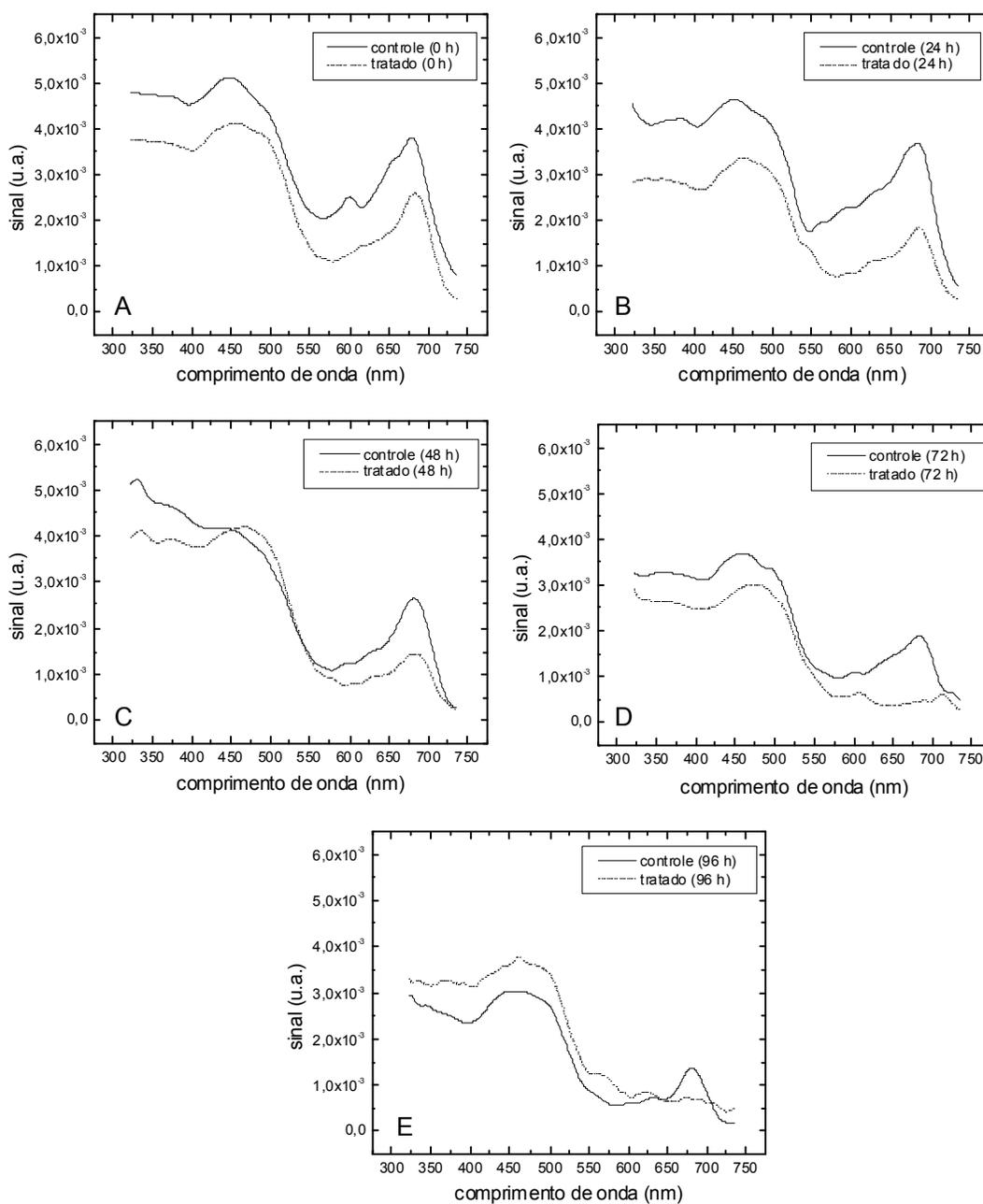


Figura 6.6 - São apresentados 5 espectros de absorção dos pigmentos fotossintetizantes da casca do mamão do grupo tratado com ozônio (linhas tracejadas) e controle (linhas contínuas) em função da evolução temporal (0, 24, 48, 72 e 96 horas após o término do tratamento).

Os resultados revelam que o tratamento com ozônio provoca a degradação imediata da cutícula cerosa. No tempo 0 h (Figura 6.5.A), a

intensidade de absorção para a banda que se encontra na faixa entre 320 a 450 nm é menor para as amostras tratadas e diminui gradativamente com o tempo, porém numa taxa menor para as amostras não tratadas. Após 72 horas (Figura 6.5.D), as intensidades de absorção da banda referente a cutícula cerosa para as amostras tratadas e não tratadas são, dentro do erro experimental, praticamente iguais. Esse efeito, já observado por outros autores, leva a um amarelecimento da casca devido ao ozônio (Calatayud & Barreno, 2001).

Foi observada a redução da absorção referente às clorofilas, bandas 420-480 nm e 650-700 nm, com o tempo (Figura 6.6.A). Também pôde-se observar a degradação de carotenóides na banda entre 400 nm e 550 nm. Esse comportamento é típico devido ao processo de maturação do fruto, porém para as amostras tratadas com ozônio esse processo foi acelerado com uma redução total da absorção de clorofilas para 72 horas após o tratamento (Figura 6.6.D). Para o mesmo tempo de 72 h os frutos do grupo controle ainda apresentaram absorção de clorofilas.

Esse efeito danoso no cloroplasto pode ser observado pela diminuição de clorofilas a e b e na atividade fotossintetizante, conforme trabalhos encontrados na literatura (Degl'Innocenti *et al.*, 2003; Calatayud & Barreno, 2004). A degradação dos pigmentos fotossintetizantes observada neste trabalho vem a confirmar a aceleração do processo de amadurecimento em frutos devido ao estresse submetido pelo ozônio, conforme mostram os resultados relacionados à taxa de emissão de etileno (experimento I) e em concordância com a literatura (Langebartels *et al.*, 1991; Dizengremel, 2001; Salvador *et al.*, 2006). Obviamente, essa aceleração acarreta numa diminuição do tempo de prateleira dos frutos gerando prejuízos pós-colheita para o produtor.

Correlação entre as variáveis da fluorescência da clorofila a e os parâmetros de cor da casca dos frutos.

A Figura 6.7A mostra a variação média temporal da fluorescência mínima para cada grupo controle (■) e tratado (○). A F_0 variou em média durante o experimento de $267,2 \pm 3,4$ à $182,7 \pm 4,7$ em u.a.. Foi observado que

os valores de F_0 para ambos os tratamentos decaíram até 48 horas de experimento, ficando praticamente constante até o final do experimento, sem sofrer nenhuma variação significativa. Não foi detectada nenhuma diferença estatística entre as amostras do grupo controle e as amostras do grupo tratado. O decaimento nesse valor mostra uma possível redução na transferência de energia do complexo antena para o centro de reação do fotossistema II, devido a degradação da clorofila a com o amadurecimento dos frutos (Guidi *et al.*, 1997; Iglesias *et al.*, 2006; Lui *et al.*, 2007).

A Figura 6.7B mostra a variação média da fluorescência máxima para os frutos tratados e não tratados. Esta variável indica a completa redução da quinona (Q_A) a partir da incidência de um pulso de luz no centro de reação do fotossistema II. Os resultados mostram que a partir de 72 horas de experimento ocorreu um decaimento dos valores médio da F_m dos frutos tratados. Houve uma diferença nos valores de F_m dos frutos do grupo tratado comparado aos frutos do grupo controle que apresentaram valores superiores de F_m . Esse decaimento da F_m dos frutos tratados significa que o centro antena foi afetado pela presença de ozônio na atmosfera devido a uma mudança na estrutura da membrana dos tilacóides e/ou danos irreversíveis para o PSII (Garcia *et al.*, 2003).

A Figura 6.7C mostra a variação média da fluorescência variável dos dois grupos. A F_v fornece a diferença entre F_m e F_0 . Como esperado, os valores da F_v foram decaindo durante a fase de amadurecimento dos frutos tratados em relação aos frutos do grupo controle, apresentando uma variação inicial a partir do tempo de 72 horas. A redução da F_v mais acentuada nos frutos tratados reflete alterações na variável F_m afetadas pela presença do ozônio, sugerindo que o centro de captação de energia (sistema antena) da casca do fruto não possui sua capacidade em condições ideais de funcionamento (Saitanis *et al.*, 2001).

A Figura 6.7D mostra a variação média do rendimento quântico máxima dos dois grupos. Os valores do rendimento quântico máximo do grupo controle foram praticamente constantes, indicando que, esses frutos não estavam sujeitos a estresse. Já os valores do F_v/F_m revelam o nível de estresse provocado pelo ozônio nos frutos do grupo tratado. Os valores do rendimento quântico máximo dos frutos tratados diminuem no decorrer do amadurecimento

dos frutos, refletindo um decaimento do fluxo de elétrons entre os fotossistemas.

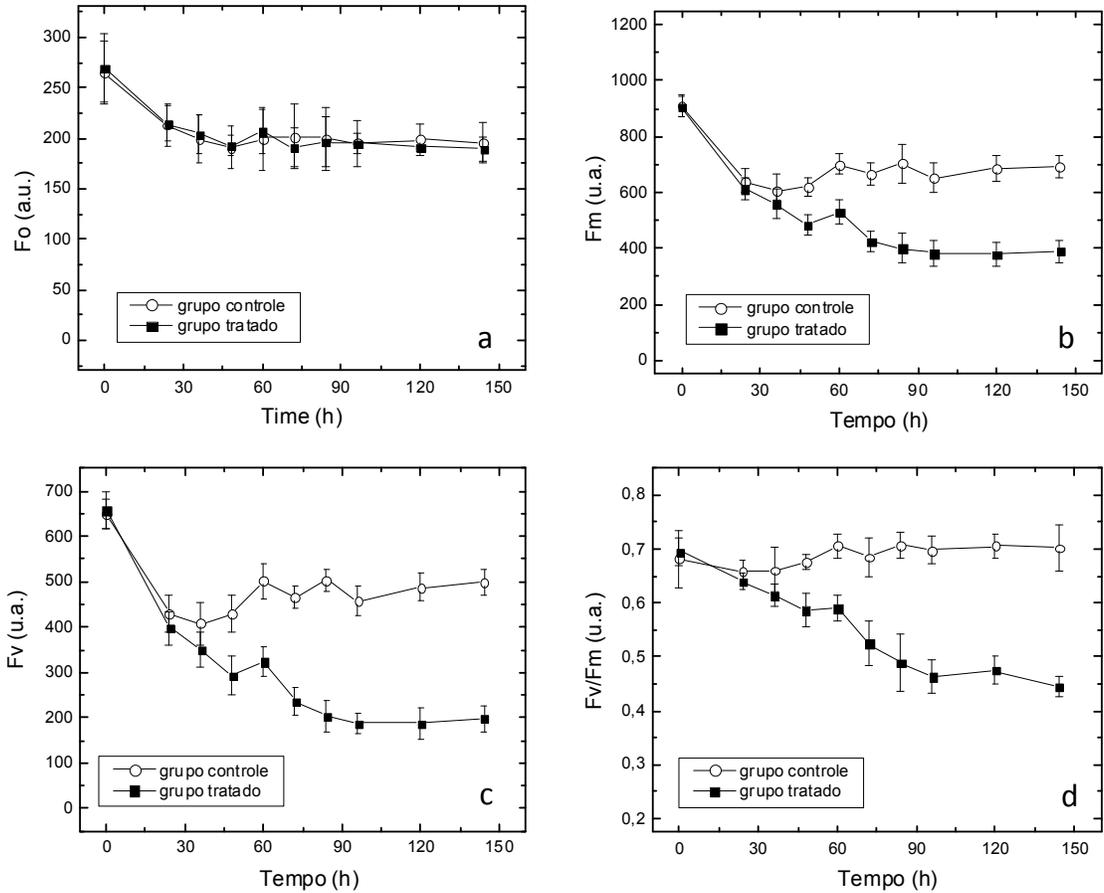


Figura 6.7 – Gráfico (A) mostra a variação média da fluorescência mínima (F_0) dos grupos controle (○) e tratado (■) e função do tempo. Gráfico (B) mostra a variação média da fluorescência máxima (F_m) dos grupos controle (○) e tratado (■) e função do tempo. Gráfico (C) mostra a variação média da fluorescência variável (F_v) dos grupos controle (○) e tratado (■) e função do tempo. Gráfico (D) mostra a variação média do rendimento quântico máximo (F_v/F_m) dos grupos controle (○) e tratado (■) e função do tempo.

A Figura 6.8 mostra os parâmetros de cor da casca (L, a, b e °h). Observa-se que os valores de L, a e b do grupo tratado têm um crescimento mais acentuado comparados com os frutos do grupo controle. Para o tempo 144 horas, os valores do grupo tratado de L, a e b foram de 70,76 u.a., -1,49

u.a. e 61,11 u.a., respectivamente, e para o grupo controle foram 61,66 u.a., - 11,98 u.a. e 45,65 u.a., respectivamente. Os valores de $^{\circ}h$ foi 91,01 $^{\circ}h$ para amostras tratadas e 103,48 $^{\circ}h$ para o controle, para $t= 144$ horas. Estes valores dos parâmetros de cor da casca dos frutos refletem o amarelecimento mais acentuado dos frutos tratados com ozônio ao longo do tempo.

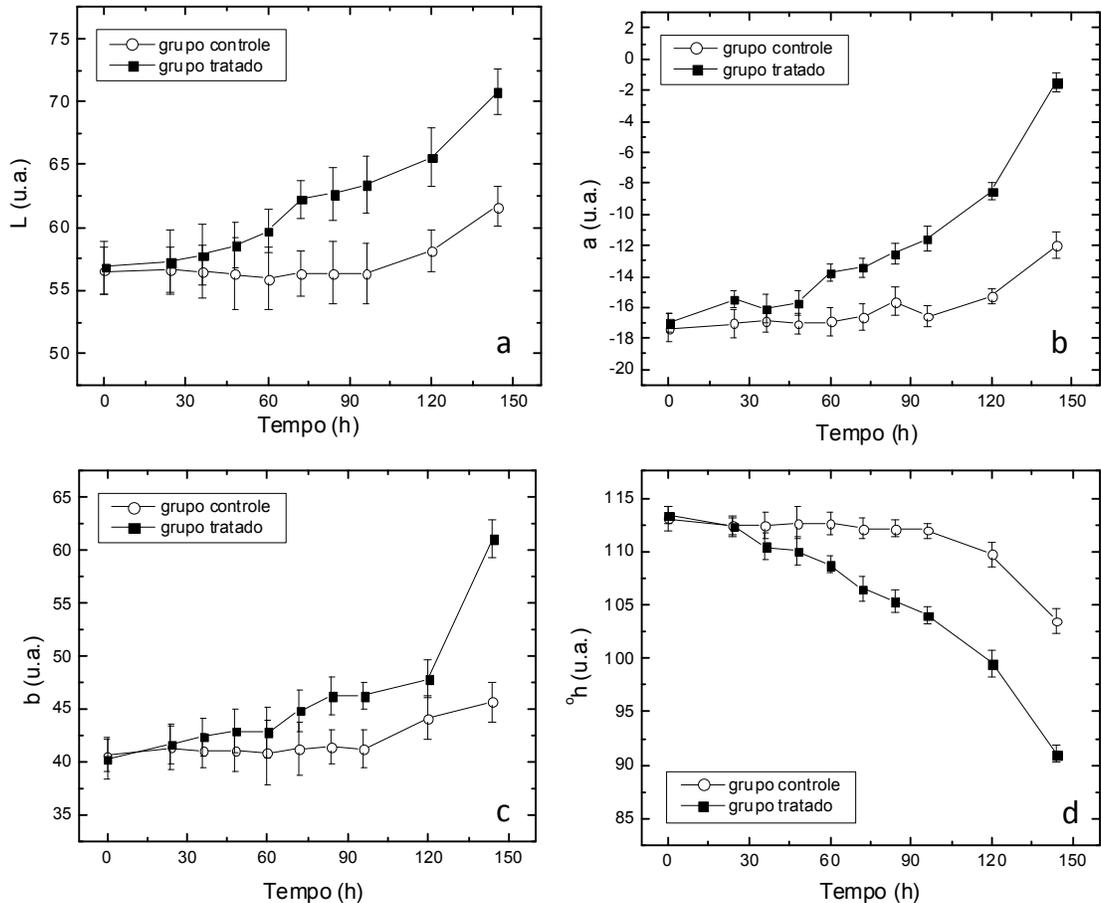


Figura 6.8 - Gráficos das variações médias dos parâmetros de cor da casca do fruto (L gráfico A, a gráfico B, b gráfico C e $^{\circ}h$ gráfico D) dos grupos controle (○) e tratado (■) e função do tempo.

A partir das equações empíricas de correlação entre os parâmetros de cor do espaço Hunter (L, a, b e $^{\circ}h$) e pigmentos fotossintéticos (clorofila a, clorofila b e carotenóides) presentes no apêndice C, pode-se determinar a quantidade de pigmentos a partir dos parâmetros de cor. Considerando os

valores iniciais e finais do ângulo *hue* dos frutos dos dois grupos (Figura 6.9D) determinou a porcentagem da degradação dos pigmentos dos frutos dos dois grupos. Enquanto os frutos do grupo tratado com ozônio tiveram uma degradação de 83,68% de clorofila *a*, 84,84% de clorofila *b* e 32,23% de carotenóides ao final do experimento os frutos do grupo controle tiveram uma degradação de 52,63% de clorofila *a*, 55,37% de clorofila *b* e 20,53% de carotenóides para o mesmo período. Essa diferença na degradação dos pigmentos confirma o menor tempo de prateleira dos frutos tratados, provocados pelo ozônio, em relação ao grupo controle. Essa degradação dos pigmentos vem a confirmar a ação do estresse abiótico provado pelo ozônio em frutos (Blach *et al*, 2000; Clark *et al*,2000; Calatayud e Barreno, 2001)

Conclusão

Pode-se concluir com os experimentais que os frutos de mamão são sensíveis ao estresse causado pela aplicação de 6 ppm de ozônio, acarretando numa antecipação do amadurecimento dos frutos em 48h.

Os frutos de mamão são sensíveis ao estresse causado pela aplicação do ozônio, tendo como indicador a degradação antecipada da cutícula cerosa e da clorofila na casca dos frutos. A espectroscopia fotoacústica no visível se mostra bastante adequada para avaliar qualitativamente o efeito direto do ozônio sobre o estágio do fruto.

O estresse abiótico do ozônio foi confirmado com os resultados da fluorescência apresentados. O declínio do rendimento quântico nos frutos tratados confirma o estresse provocado pelo ozônio.

Referências bibliográficas

- BAIRD, C. **Química Ambiental**, 2 ed. Porto Alegre, BR: Bookman, 2002, pp. 622.
- BLACH, V. J.; BLACK, C. R.; ROBERTS, J. A. e STEWART, C. A Impacto f ozone on the reproductive development of plants, **New Phytologia**, Vol. 147, pp. 421-447, 2000.

- CALATAYUD, A.; BARRENO, E. Chlorophyll *a* fluorescence, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in tomato in response to ozone and benomyl. **Environmental Pollution**, v. 115, p. 283-289, 2001.
- CALATAYUD, A.; BARRENO, E. Response to ozone in two lettuce varieties on chlorophyll *a* fluorescence, photosynthetic pigments and lipid peroxidation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 549-555, 2004.
- CLARK, A. J.; LANDOLT, W.; BUCHER, J. B.; STRASSER, R. J. Beech (*Fagus sylvatica*) response to ozone exposure assessed with a chlorophyll *a* fluorescence performance index. **Environmental Pollution**, v. 109, p. 501-507, 2000.
- CORRÊA, S. F. **Utilização de técnicas fototérmicas no estudo da pós-colheita do mamão (*Carica papaya* L.)**. Dissertação (Mestrado). Campos dos Goytacazes, UENF, 2005, 63p.
- COULTATE, T.P. **Alimentos: a química de seus componentes**, 3 ed. Porto Alegre: Artimed, 2004, 368p.
- da SILVA, M. G.; SANTOS, E. O.; SHEL, M. S.; CARDOSO, S. L.; CAVALLI, A.; MONTEIRO, A. R.; de OLIVEIRA, J. G.; PEREIRA, M. G.; VARGAS, H. (2003) Effect of heat treatment on ethylene and CO₂ emissions rates during papaya (*Carica papaya*, L.) fruit ripening, **Review of Scientifics Instruments**, 74, (1), USA, 2003.
- da SILVA, M.G., VARGAS, H., MIKLÓS, A., HESS, P., , Photoacoustic detection of ozone using a quantum cascade LASER, **Applied Physics B - LASER and Optics**,78(6), 677-680, 2004.
- DEGL'INNOCENTI, E.; VACCÀ, C.; GUIDI, L.; SOLDATINI, G. F. CO₂ photoassimilation and chlorophyll fluorescence in two clover species showing different response to O₃. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p. 485-493, 2003.
- DIZENGREMEL, P. Effects of ozone on the carbon metabolism of forest trees. **Plant Physiology Biochemical**, v. 39, p. 729-742, 2001.
- GARCIA, A.; MOUNT, J. R.; DAVIDSON, P. M. Ozone and chlorine treatment of minimally processed lettuce. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 9, p. 2747-2751, 2003.
- GUIDI, L.; NALI, C.; CIOMPI, S.; LORENZINI, G.; SOLDATINI, G. F. The use of chlorophyll fluorescence and leaf gas exchange as methods for studying the

- different responses to ozone of two bean cultivars. **Journal of Experimental Botany**, v.48, n. 1, p. 173-179, 1997.
- IGLESIAS, D. J.; CALATAYUD, A.; BARRENO, E.; PRIMO-MILLO, E.; TALON, M. Responses of citrus plants to ozone: leaf biochemistry, antioxidant mechanisms and lipid peroxidation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 125-131, 2006.
- KHADRE, M.A.; YOUSEF, A. E.; KIM, J. G. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 9, p. 1242-1252, 2001.
- LANGEBARTELS, C.; WOHLGEMUTH, H.; KSCHIESCHAN, S.; GRÜN, S.; SANDERMANN, H. Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 567-575, 2002.
- LIU, D., ZOU, J., WANG, M., JIANG, W. Hexavalent chromium uptake and its effects on mineral uptake, antioxidant defence system and photosynthesis in *Amaranthus viridis* L. **Bioresour. Technol.**, v.99, p.2628-2636, 2007.
- MARTINS, R. A. e RODRIGUE, G. S. Efeitos potenciais do ozônio troposférico sobre plantas cultivadas e o biomonitoramento ambiental. In.; **Mudanças Climáticas Globais e a Agricultura Brasileira**, Embrapa, pp. 143-165, 2001.
- NERY, J. W.; PESSOA JR., O.; VARGAS, H.; REIS, F. A. M.; GABRIELLI, A. C.; MIRANDA, L. C. M.; VINHA, C. A. Photoacoustic spectroscopy for depth-profile analysis and herbicide monitoring in leaves. **Analyst**, v. 112, 1487 – 1490, 1987.
- SAITANIS, C. J.; RIGA-KARANDINOS, A. N.; KARANDINOS, M. G. Effects of ozone on chlorophyll and quantum yield of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) varieties. Effects of ozone on chlorophyll and quantum yield of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) varieties. **Chemosphere**, v. 41, p. 945-953, 2001.
- SALVADOR, A.; ABAD, I.; ARNAL, L.; MARTÍNEZ-JÁVEGA, J. M. Effect of ozone on postharvest quality of persimmon. **Journal of Food Science**, v. 71, p. 443-446, 2006.
- SMILANICK, J. L.; CRISOSTO, C.; MLIKOTA, F. Postharvest use of ozone on fresh fruit. **Perishables Handling Quarterly Issue**, v. 99, p. 10-14, 1999.

CAPÍTULO 7

7. Conclusões

A partir da análise dos dados e a interpretação dos resultados, a principal conclusão foi que os espectrômetros fotoacústicos utilizados no presente trabalho apresentaram uma excelente ferramenta para análise de sistemas biológicos, como a análise de frutos sob condições de estresse. Pode-se concluir também que:

- O funcionamento do espectrômetro fotoacústico utilizando um laser de cascata quântica operando em modulação de comprimento de onda mostrou-se excelente desempenho para detecção de gases em partes por bilhão.
- A montagem compacta do espectrômetro fotoacústico torna-se eficaz no monitoramento de sistemas biológicos.
- O espectrômetro fotoacústico utilizando o laser de CO₂ foi eficiente na detecção da emissão de gases e, principalmente, no monitoramento do amadurecimento de frutos submetidos em atmosfera modificada em tempo real atingindo limite de detecção de partes por bilhão.
- O uso de atmosfera modificada com concentrações abaixo de 3% de oxigênio apresentou estresse.
- O uso de concentração de 6% de O₂ mostrou satisfatório na conservação dos frutos, aumentando o tempo de vida dos frutos em dois

dias, comparados com os frutos submetidos a atmosfera com ar ambiente.

- Frutos de mamão 'Golden' aumentam a taxa de emissão de etileno e a taxa respiratória quando submetidos a uma atmosfera com 6 ppm de ozônio em ar durante 24 horas.
- A espectroscopia fotoacústica no visível mostrou ser eficaz na análise da degradação dos pigmentos fotossintetizantes de frutos de mamão 'Golden' submetidos a uma atmosfera com 6 ppm de ozônio em ar durante 24 horas, utilizando o método de separação de fases.
- O estresse provocado pelo ozônio em frutos de mamão 'Golden' foi observado na redução da atividade da clorofila *a* através da fluorescência e da análise dos parâmetros de cor de Hunter da casca dos frutos.

APÊNDICE A

Escala de classificação de mamão

Tabela A.1 – Escala de classificação de mamão de acordo com a coloração da casca.

Estádios de maturação	Descrição
0	Fruto completamente desenvolvido, casca 100% verde.
1	A cor amarela não cobre mais de 15% da superfície da casca. O restante da casca apresenta coloração verde clara.
2	$\frac{1}{4}$ maduro. Fruto com até 25% da superfície da casca amarela, rodeada de verde claro.
3	$\frac{1}{2}$ maduro. Fruto com até 50% da superfície da casca amarela, com áreas próximas do verde claro.
4	$\frac{3}{4}$ maduro. Fruto com 50-75% da superfície da casca amarela, com áreas próximas em verde claro.
5	Maduro. Fruto com 76-100% da superfície da casca amarela. Somente a extremidade próxima ao pedúnculo é verde.

Fonte: Adaptado do programa de exportação de papaya brasileiro. Ministério da Agricultura, Pecuária e Meio Ambiente (Papaya Brasil).

APÊNDICE B

Método de separação de fases

O método de separação de fases tem como finalidade analisar e separar os espectros de absorção de diferentes camadas (camadas A e B) de uma determinada amostra. Sendo o sinal fotoacústico representado através de um vetor (Figura B.1), pode-se escrever (Nery *et al.*, 1987):

$$S_F^2(\lambda) = S_A^2(\lambda) + S_B^2(\lambda) \quad (\text{B.1})$$

e

$$\theta_F(\lambda) = \tan^{-1} \frac{S_B(\lambda)}{S_A(\lambda)} \quad (\text{B.2})$$

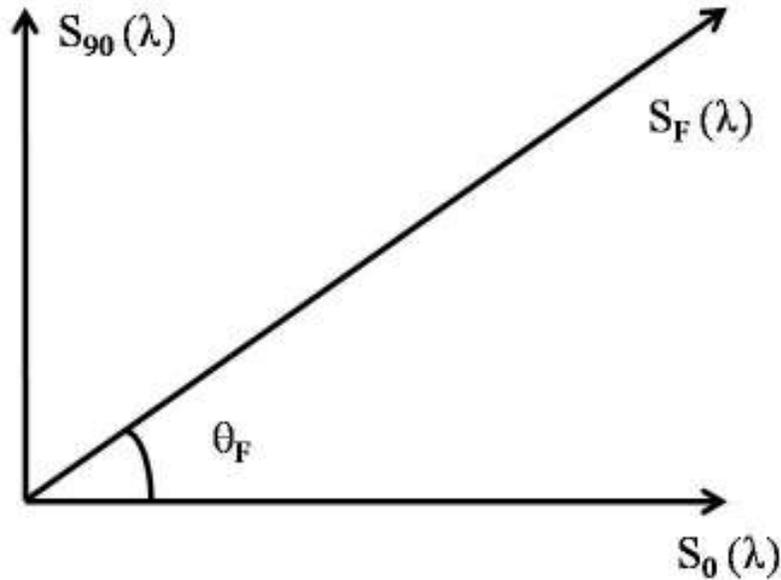


Figura B.1 – Vetor do sinal fotoacústico S_F em função do comprimento de onda λ , pode ser representado por um vetor no plano complexo de intensidade $S_F(\lambda)$ e fase θ_F .

Sendo S_F é a intensidade do sinal fotoacústico e θ_F a fase do sinal fotoacústica o método de separação de fases parte da medida de dois sinais em quadratura, um sinal em fase $S_0(\lambda)$ e outro em quadratura $S_{90}(\lambda)$, que por convenção estão nas fases 0° e 90° .

Supondo que se conheçam os espectros individuais de cada camada A e B, é possível efetuar a composição dos espectros para várias fases θ através da seguinte equação:

$$S_F(\lambda) = S_0 \cos \theta + S_{90} \sin \theta \quad (\text{B.3})$$

Usando programação computacional, introduzam-se os valores dos ângulos para calcular as fases do sinal fotoacústico e traçando espectros fotoacústicos referentes à fase calculada. De acordo com o perfil de cada curva obtida referente a cada fase calculada é possível selecionar quais fases θ_1 e θ_2 que correspondem os espectros das camadas individuais.

Se no ângulo θ_1 , o espectro da camada A é reproduzido, sabe-se então que o sinal da camada B estará na fase $\theta_B = \theta_1 \pm 90^\circ$. De forma análoga, se o ângulo θ_2 obtêm-se o espectro da camada B, significa que o sinal da camada A estará na fase $\theta_A = \theta_2 \pm 90^\circ$. Este método permite determinar as fases dos sinais de cada camada, e portanto a diferença de fase Φ entre eles, podendo ser visto na figura B.2.

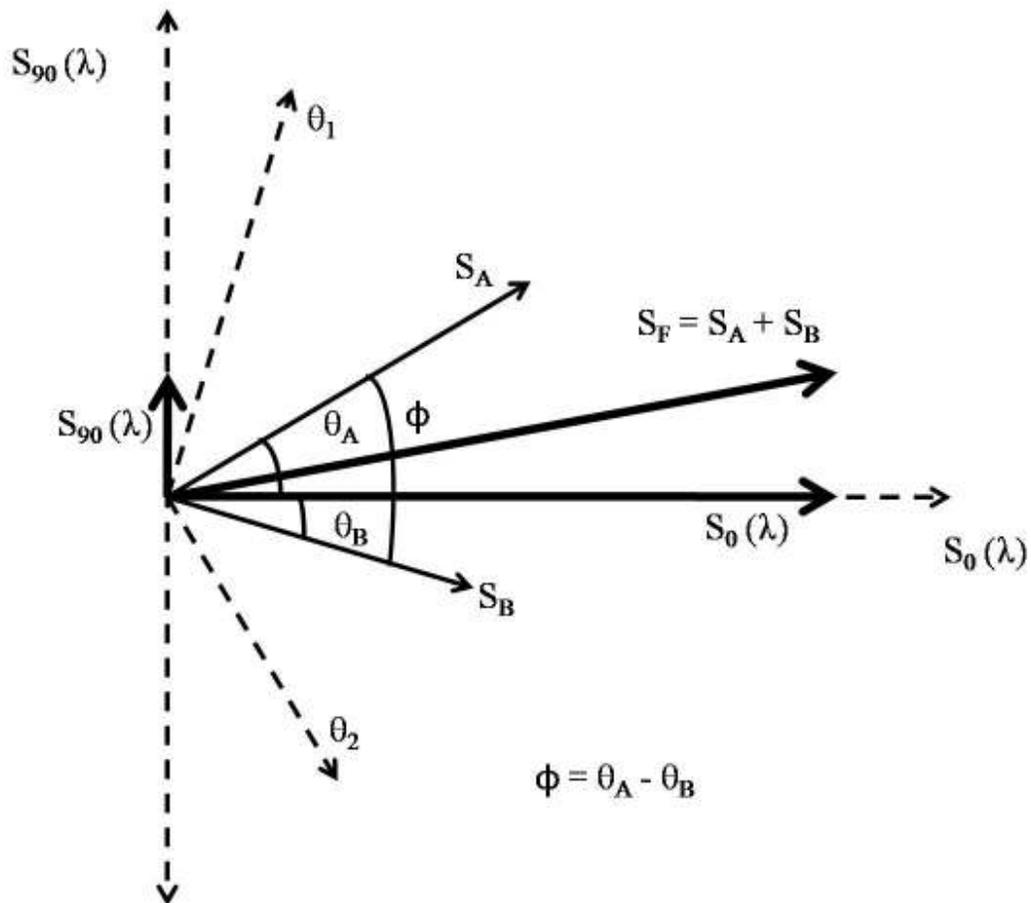


Figura B.2 – O gráfico ilustra os sinais das camadas e suas separações. São mostrados os sinais S_A e S_B de duas camadas distintas, cuja soma fornece o sinal fotoacústico S_F medido. Através do método de separação de fases pode-se identificar a fase θ_A em que está o sinal S_A , a partir da composição na fase θ_2 na qual todas as características espectrais de S_A desaparecem. O mesmo procedimento é aplicado para o sinal S_B .

Contudo, o sinal fotoacústico é visto como sendo a soma vetorial das contribuições de A e B com um ângulo θ entre eles, efetuando uma variação de

fase no sinal é possível observar a contribuição de cada sinal em separado. A fase do sinal fotoacústico é, portanto, uma média ponderada das fases de todos os pontos dentro do comprimento de difusão térmica (Pessoa Jr., 1985).

Referências Bibliográficas

PESSOA Jr, O. **Aplicações de medidas de fase do efeito fotoacústico**. Tese (Doutorado), UNICAMP, Campinas, p.93, 1985.

NERY, J. W.; PESSOA JR., O.; VARGAS, H.; REIS, F. A. M.; GABRIELLI, A. C.; MIRANDA, L. C. M.; VINHA, C. A. Photoacoustic spectroscopy for depth-profile analysis and herbicide monitoring in leaves. **Analyst**, v. 112, 1487 – 1490, 1987.

APÊNDICE C

Calibração da concentração de pigmentos com os parâmetros de cor do espaço Hunter

Introdução

Um fator de importante na manutenção da qualidade dos frutos é a determinação do grau de maturação dos mesmos ao longo de todo processo de comercialização do fruto, determinando, de certa forma, a distância e o tempo em que esse produto poderá percorrer até a mesa do consumidor. Os primeiros sinais da coloração, determinada pelos carotenóides, surgem na casca do fruto em forma de faixas longitudinais amareladas. A transformação dos pigmentos verdes em pigmentos amarelo-alaranjados é um evento que acompanha o processo de amadurecimento dos frutos de maneira geral (Aziz-Abou *et al*, 1975). Essa transformação é facilmente observada e quantificada de forma indireta através de medidas de reflectometria (Miller & McDonald, 1999) empregando-se para isso equipamentos como o colorímetro de Hunter, sem a necessidade da retirada de amostra do tecido.

Esse equipamento atribui índices de cor (L, a, b e h°) à coloração da amostra (fruto) a partir de uma escala de cor (espaço Hunter) (McGuire, 1992). Nesta escala, o índice de cor L refere-se a luminosidade, virando de 0 (para amostras perfeitamente preta) a 100 (para amostra perfeitamente branca); já o

índice a varia da cor verde (sinal negativo) ao vermelho (sinal positivo) e b do azul (sinal negativo) ao amarelo (sinal positivo) (Figura C.1). Valores de a e b iguais a zero corresponde à cor cinza. O ângulo *hue* (h°) define a coloração básica, onde $0^\circ =$ vermelho, $90^\circ =$ amarelo, $180^\circ =$ verde e $270^\circ =$ azul (Coultate, 2004).

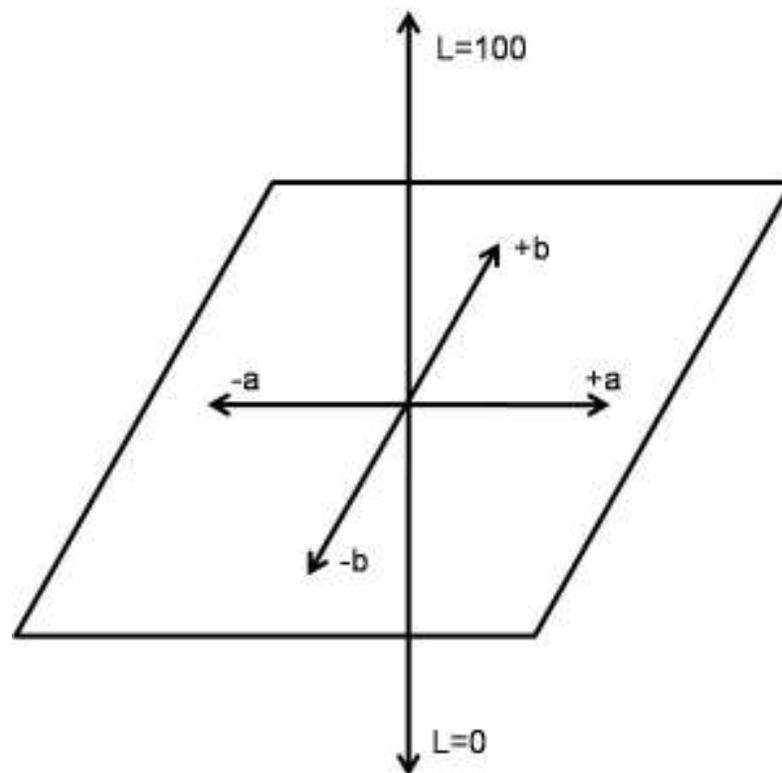


Figura C.1 – Esquema representativo do espaço de cor de Hunter (Coultate, 2004).

Este apêndice tem como objetivo apresentar a calibração do colorímetro de Hunter para estimar o conteúdo de pigmentos na casca de frutos de mamão 'Golden'.

Material e Métodos

A mudança de coloração da casca dos frutos foi monitorada diariamente usando um colorímetro comercial (Chroma Meter, modelo CR-300, Minolta). Medidas foram realizadas em três pontos equidistantes na região equatorial

dos frutos e os resultados foram expressos por meio do ângulo de cor *hue* e dos parâmetros de cor de Hunter L, a e b.

Para quantificação dos pigmentos fotossintéticos foram cortados três discos de 1,0 cm de diâmetro do tecido da casca do mamão. Os discos foram retirados dos mesmos locais onde foram feitas as medidas dos parâmetros de cor de Hunter. Os discos foram cortados em tiras e colocados em frascos contendo 3 mL do solvente orgânico DMSO (Dimetilsulfoxido). Os frascos foram envolvidos em papel alumínio, para que não houvesse interferência da luz na concentração dos pigmentos. Após 72 horas, em repouso, as amostras foram lidas em um espectrofotômetro UV/VIS (SP-2000UV, Spectrum) nos comprimentos de onda de 665, 649 e 480 nm e o conteúdo dos pigmentos, cloroplastídicos, obtidos de acordo com o procedimento descrito por Wellburn (1994).

Resultados

Os resultados mostraram uma correlação entre o conteúdo de clorofila a, clorofila b e carotenóides em função da variação dos parâmetros de cor do espaço Hunter (L, a, b e h°). A figura C.2 mostra as concentrações de clorofila a, clorofila b e carotenóides em função dos parâmetros de cor e a figura C.3 mostra os valores de clorofila a, clorofila b e carotenóides em função do ângulo *hue*.

Com a degradação da clorofila a da casca do fruto, durante o amadurecimento, o parâmetro a variou de -20,63 u.a. para 9,68 u.a., correspondendo a variação no conteúdo das clorofilas a em torno de 586,19 mg.Kg⁻¹ para 6,88 mg.Kg⁻¹. O parâmetro b apresentou valores variando de 35,54 u.a. para 65,28 u.a. com a queda no conteúdo de clorofila a, representando um aumento, relativo, no conteúdo dos carotenóides cuja coloração predominante – amarelado – corresponde a valores de b crescentes. O parâmetro L aumenta com o amadurecimento do fruto, variando de 49,64 u.a. para 75,29 u.a..

O ângulo *hue* foi o que apresentou um decaimento de seus valores (de 120,5 h^o para 80,4 h^o) de acordo com a degradação da clorofila a. Esse índice diminuiu com a queda no conteúdo de clorofila a por consequência do aumento

na coloração amarelada com o processo de amadurecimento (Schaper e Chacko, 1991).

O mesmo padrão de resposta foi observado com o conteúdo de clorofila *b* quando se correlacionou os parâmetros de cor de Hunter. Os resultados mostram um aumento nos valores de L, a e b e uma diminuição dos valores de ângulo *hue* à medida que há queda nas concentrações de clorofila *b*, fato devido à degradação desses pigmentos durante o amadurecimento do fruto. Dessa forma, os parâmetros mostraram, também, uma boa correlação com os valores de clorofila *b*.

Os conteúdos de carotenóides apresentaram o mesmo perfil de correlação que o conteúdo das clorofilas *a* e *b* com os parâmetros de cor L, a e b e o ângulo *hue*, obtendo mesmo padrão de resposta.

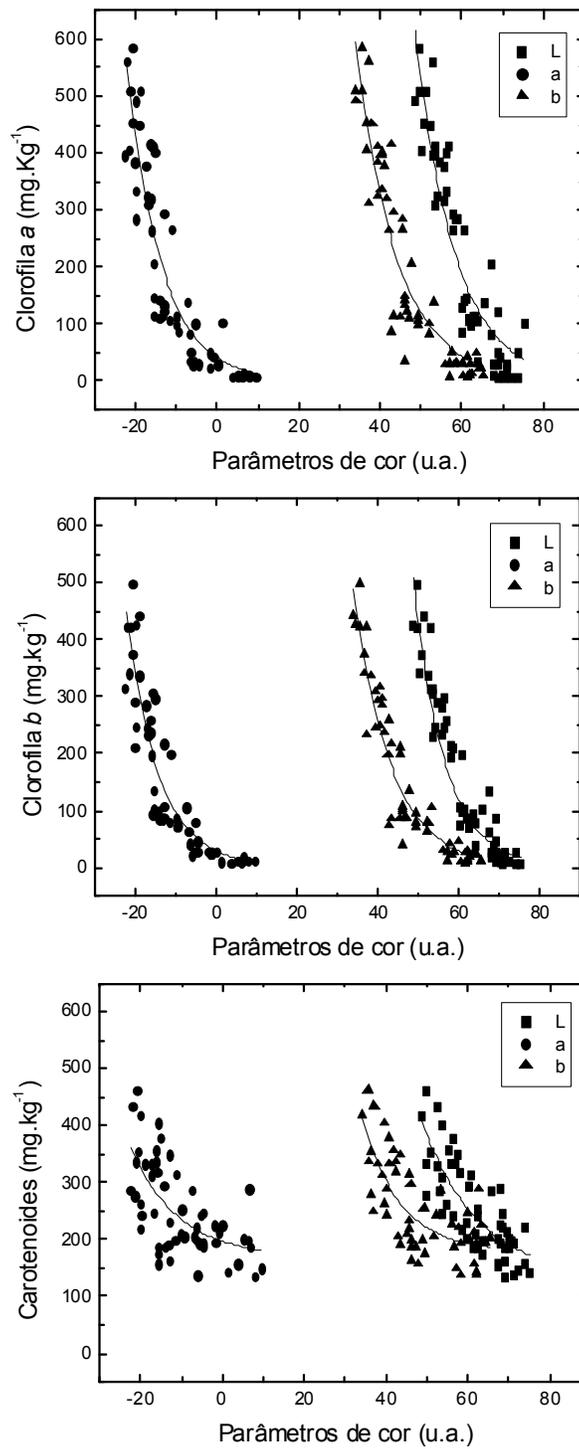


Figura C.2 - Gráficos das variações dos pigmentos do cloroplasto em função dos parâmetros de cor da casca do fruto (L, a, b).

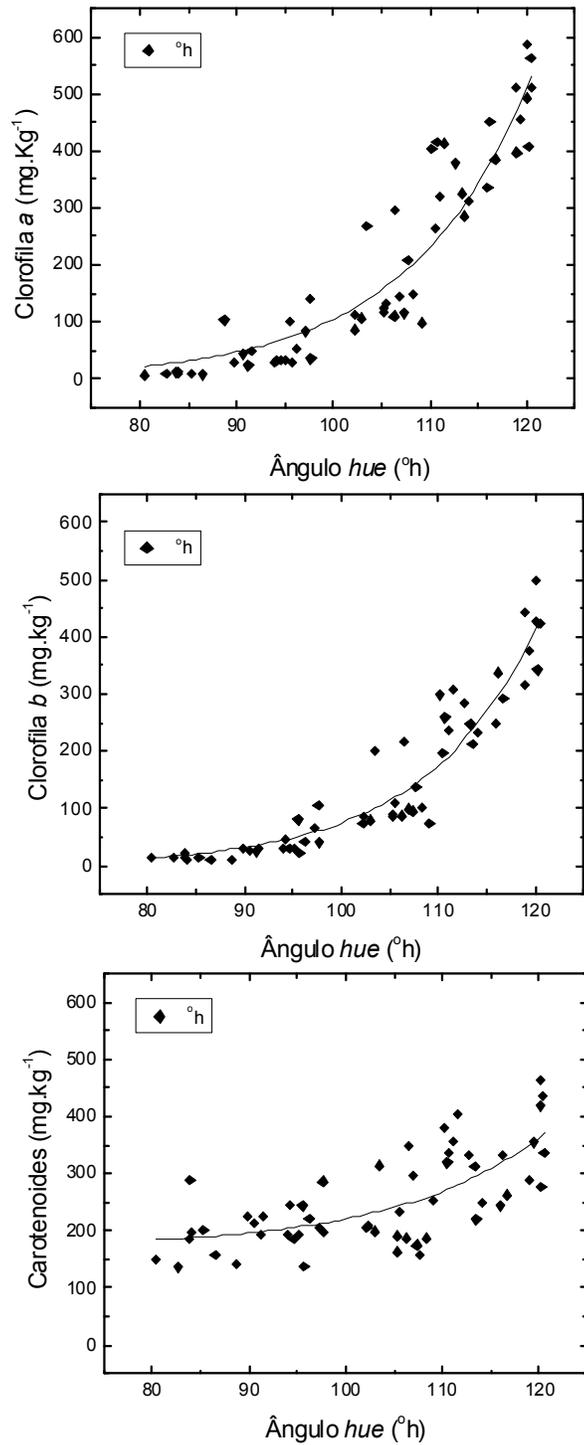


Figura C.3 - Gráficos das variações dos pigmentos do cloroplasto em função do ângulo *hue*.

A partir destes gráficos, equações foram determinadas com a finalidade de obter uma calibração para correlacionar as quantidades de pigmentos da casca dos frutos em função dos respectivos parâmetros de cor. A partir destas equações pode-se determinar qual a porcentagem da degradação dos pigmentos em frutos de mamão 'Golden'. A tabela B.1 mostra essas equações.

Tabela C.1 – Equações relacionando a quantidade de pigmentos do cloroplasto em função dos parâmetros de cor do espaço de coloração Hunter.

	Clorofila a (y)	Clorofila b (y)	Carotenóides (y)
L (x)	$y = 9,43 \times 10^4 e^{-x/9,65}$	$y = 2,58 \times 10^5 e^{-x/7,8}$	$y = 1,33 \times 10^2 + 9,72 \times 10^3 e^{-x/13,68}$
a (x)	$y = 4,20 \times 10^1 e^{-x/8,65}$	$y = 2,88 \times 10^1 e^{-x/8,15}$	$y = 1,69 \times 10^2 + 2,72 \times 10^1 e^{-x/11,45}$
b (x)	$y = 1,73 \times 10^4 e^{-x/10,07}$	$y = 1,98 \times 10^4 e^{-x/9,18}$	$y = 1,73 \times 10^2 + 9,28 \times 10^3 e^{-x/9,29}$
°h (x)	$y = 0,04 e^{x/12,7}$	$y = 0,01 e^{x/11,69}$	$y = 1,71 \times 10^2 + 0,06 e^{x/14,85}$

Conclusão

Conclui-se que a determinação de curvas de calibração de correlação entre as quantidades de pigmentos com os parâmetros de cor de Hunter (L, a, b e h°) tornam-se ferramentas essenciais no estudo do amadurecimento pós-colheita de frutos de mamão 'Golden'.

Referências bibliográficas

- AZIZ-ABOU, A. B., EL-NABAWY, S.M. & ZAKI, H.A. Effects of different temperatures on the storage of papaya fruits and respirational activity during storage. **Sci. Hortic.** 3:173-177, 1975.
- MCGIRE, R. A. Reporting of Objective Color Measurements. **HortScience.** 27(12): 1224-1225, 1992.
- MILLER, W.R. & MCDONALD, R.E. Irradiation, stage of maturity at harvest, and storage temperature during ripening affect papaya fruit quality. **HortScience.** 34(6):1112-1115, 1999.
- SCHAPER, H. & CHACKO, E.K. Relation between extractable chlorophyll and portable chlorophyll meter readings in leaves of eight tropical and subtropical fruit-tree species. **Plant Physiol.** 138:674-677, 1991.

WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **J. Plant Physiol.** 144:307-313, 1994.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

24/2010

Corrêa, Savio Figueira

Estudo do efeito da atmosfera modificada sobre frutos tropicais utilizando a espectroscopia fotoacústica e técnicas convencionais / Savio Figueira Corrêa. – Campos dos Goytacazes, 2010.

xix, 107 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências Naturais) --Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Físicas. Campos dos Goytacazes, 2010.

Orientador: Marcelo Gomes da Silva.

Co-orientador: Jurandi Gonçalves de Oliveira.

Área de concentração: Química e Física do Meio Ambiente.

Bibliografia: f. 106-107.

1. Estresse abiótico 2. Fluorescência 3. Etileno 4. Efeito fotoacústico 5. Ozônio I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Físicas II. Título.

CDD 535.84