

Quantificação da respiração e de etileno em vegetais por cromatografia gasosa com detectores em série



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Meio Ambiente
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

DOCUMENTOS 117

Quantificação da respiração e de etileno em vegetais por cromatografia gasosa com detectores em série

*Rosa Toyoko Shiraishi Frighetto
Daniel Terao
Fabiana Fumi Cerqueira Sasaki
Thales Sandoval Cerqueira*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Meio Ambiente
Rodovia SP-340, Km 127,5, Tanquinho Velho
Caixa Postal 69, CEP: 13918-110, Jaguariúna, SP
Fone: +55 (19) 3311-2610
Fax: +55 (19) 3311-2640
www.embrapa.br/meio-ambiente/
SAC: www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Meio Ambiente

Presidente
Ana Paula Contador Packer

Secretário-Executivo
Cristina Tierni Shoyama

Membros
*Rodrigo Mendes, Ricardo A. A. Pazianotto, Maria
Cristina Tordin, Daniel Terao, Victor Paulo Marques
Simão, Joel Leandro de Queiroga, Vera Lucia
Ferracini, Marco Antonio Gomes*

Revisão de texto
Nilce Chaves Gattaz

Normalização bibliográfica
Victor Paulo Marques Simão

Tratamento das ilustrações
Silvana Cristina Teixeira

Projeto gráfico
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Silvana Cristina Teixeira

Foto da capa
Daniel Terao

1ª edição eletrônica (2018)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Meio Ambiente

Quantificação da respiração e de etileno em vegetais por cromatografia gasosa
com detectores em série / Rosa Toyoko Shiraishi Frighetto... [et al.]. –
Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2018.

24 p. il. color ; 21,0 cm x 14,8 cm. – (Documentos / Embrapa Meio Ambiente,
ISSN 1516-4961; 117).

1. Análise química. 2. Cromatografia gasosa. 3. Respiração vegetal. 4. Etileno.
I. Frighetto, Rosa Toyoko Shiraishi. II. Série.

CDD (21.ed.) 543.0486

Victor Paulo Marques Simão (CRB-8/5139)

© Embrapa, 2018

Autores

Rosa Toyoko Shiraishi Frighetto

Química, doutora em Química Orgânica, pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

Daniel Terao

Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

Fabiana Fumi Cerqueira Sasaki

Engenharia-agrônoma, doutora em Ciências, pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

Thales Sandoval Cerqueira

Engenheiro-agrônomo, doutor em Ciências, autônomo, Cruz das Almas, BA.

Apresentação

Todos os tecidos vivos, sejam de origem animal, vegetal ou de micro-organismos respiram (consomem O_2 e liberam CO_2). Para os tecidos vegetais, esse processo é um parâmetro importante na caracterização fisiológica das plantas, sendo a atividade respiratória um dos principais fatores determinantes do potencial de longevidade de vegetais na fase pós-colheita.

Os tecidos vegetais sintetizam etileno (C_2H_4), que se difunde na fase gasosa através dos espaços intercelulares e fora dos tecidos. Suas concentrações variam entre as diferentes estruturas morfológicas e estádios de desenvolvimento. O etileno é um composto volátil produzido endogenamente por todas as plantas e é considerado o principal hormônio do amadurecimento, apesar de não ser o único. Em concentrações tão baixas quanto $0,1 \mu L L^{-1}$ (0,1 ppb), o etileno pode induzir uma série de respostas fisiológicas, incluindo amadurecimento, senescência e desordens fisiológicas.

Diante da importância de quantificação destes gases para o avanço e desenvolvimento de novas tecnologias e formas de tratamentos de vegetais nas áreas de fisiologia e da pós-colheita, o presente documento descreve as modificações propostas na coleta, as injeções e a modernização do equipamento para mensuração, com foco na quantificação mais rápida e eficiente

Marcelo Boechat Morandi
Chefe-geral da Embrapa Meio Ambiente

Sumário

Introdução.....	7
Considerações preliminares	8
Importância da respiração e produção de etileno em pós-colheita	8
Importância da temperatura na respiração e produção de etileno	9
Sistema de coleta de amostras	11
Propostas de modificação na metodologia.....	12
Modificações nas configurações do cromatógrafo gasoso	12
Modificações no sistema de coleta e processamento de amostras	16
Estudo de caso do uso do cromatógrafo com detectores em série na quantificação de CO ₂ e de etileno na pós-colheita de mamões	17
Considerações finais	18
Agradecimentos.....	19
Referências	19
Anexo: Detalhes dos cálculos envolvidos na estimativa da taxa de respiração e da produção de etileno.....	23

Introdução

Os tecidos vegetais vivos respiram (consomem O_2 e liberam CO_2) e sintetizam etileno (C_2H_4) que se difundem na fase gasosa através dos espaços intercelulares para fora dos tecidos. Esses gases podem ser produzidos por bactérias, fungos, algas e plantas vasculares como angiospermas (Colli, 2004). O etileno é produzido por todas as partes das plantas superiores, mas os tecidos meristemáticos e regiões nodais apresentam maior produção (Kader, 1987; Saltveit, 1999; Colli, 2004). Estes gases são parâmetros importantes na caracterização fisiológica das hortaliças e das frutas, pois sua produção varia entre os diferentes órgãos vegetais, estádios de desenvolvimento e maturação (Kader, 1987). A determinação destes parâmetros permite o estabelecimento de condições adequadas, como a temperatura, embalagem e o controle de gases como O_2 e CO_2 na atmosfera de armazenamento dos produtos.

No laboratório, a respiração e a biossíntese de etileno são estimadas através da mensuração por cromatografia gasosa. Na maioria das publicações relativas a esse tema, as mensurações são feitas por cromatografia gasosa com pelo menos duas injeções separadamente, em duas colunas (Gunes et al., 2000; Arruda et al., 2008; Cornje et al., 2011) e uma válvula de troca/mudança que pode ser de seis, dez ou doze vias conforme a necessidade (Agilent..., 2013). Os gases mais leves são separados de compostos mais pesados em uma coluna do tipo peneira molecular ("*molecular sieve*") e reenviado ("*backflushed*") para uma segunda coluna, adequada para separação dos demais componentes na mistura. Essa configuração apresenta uma coluna para análise de CO_2 por detector de condutividade térmica (TCD) e outra para etileno por detector de ionização de chama (FID), e um tipo de coluna para cada gás a ser analisado.

As análises também são realizadas em dois cromatógrafos distintos (Gunes et al., 2000; Lima et al., 2005; Ghasemnezhad et al., 2008; Cronje et al., 2011; Domínguez et al., 2016), ou em um cromatógrafo com dois detectores e uma única coluna para ambos os gases (Kiferle et al., 2014), ou um detector e uma coluna (Fuentealba et al., 2017). Zhu et al. (2001) usaram um cromatógrafo com detector de captura de elétrons (ECD), duas colunas em série, e uma válvula tipo 2VICI para controlar o direcionamento do fluxo de gás, permitindo-se assim analisar simultaneamente O_2 e CO_2 , separados de N_2 .

O histórico da evolução de tecnologias de mensuração e de monitoramento de gases em áreas de armazenagem de produtos, como casas de embalagens (*packinghouse*) e contêineres de navios para transporte em longa distância, mostra a importância do controle da produção de etileno durante o armazenamento dos produtos (Sklorz et al., 2013; Zaidi et al., 2017). Assim fica novamente evidente a importância da determinação da atividade respiratória e da biossíntese de etileno de forma precisa e rápida, para a pesquisa sobre a fisiologia vegetal e o desenvolvimento de tecnologias alternativas de pós-colheita.

Diante disso, o objetivo desta publicação é propor uma nova metodologia para coleta e processamento de amostras e quantificação da respiração e da produção de etileno, baseada na adaptação de um método utilizado em outra área do conhecimento, para tornar os procedimentos de análises mais ágeis e práticos na área de pós-colheita de vegetais.

Considerações preliminares

Alguns conhecimentos preliminares deverão ser considerados na tomada de decisão para implementar as modificações propostas neste documento, por serem fatores que atuam diretamente no metabolismo da fruta.

Importância da respiração e produção de etileno em pós-colheita

A respiração é uma reação de quebra oxidativa de substratos mais complexos encontrados nas células, como amidos, açúcares e ácidos orgânicos, transformando-os em moléculas mais simples como dióxido de carbono e água (CO_2 e H_2O), com consumo de O_2 , produção de energia (ATP e calor) e outras moléculas que podem ser usadas pelas células para reações de síntese (Chitarra, Chitarra, 2005; Taiz et al., 2017). Estas reações metabólicas são essenciais para a manutenção da organização celular e a integridade das membranas nas células vivas (Saltveit, 1997, 1999).

A atividade respiratória é um dos principais fatores determinantes do potencial de longevidade de vegetais na fase pós-colheita (Kader, 1986; Chitarra; Chitarra, 2005; Cerqueira, 2012), e pode ser afetada por vários fatores, sejam eles internos ou externos. Como fatores internos, os vegetais em geral diferem muito uns dos outros, em tipo e em genótipo, estágio de desenvolvimento na colheita, e na composição química (Kader, 1987). Como fatores externos, a temperatura em conjunto com a composição atmosférica e o estresse físico são importantes (Saltveit, 2016).

A razão entre a produção de CO_2 e o consumo de O_2 é conhecida como quociente de respiração (do inglês RQ), e é assumido como igual à unidade (1,0) se o substrato é um carboidrato (Fonseca et al., 2002). Para oxidação total de um mol de hexose (p.ex. a glicose), essa reação pode ser representada pela equação 1 (Ryall et al., 1979; Ryall; Pentzer, 1982):



Na equação acima, todos os substratos e produtos da reação foram usados na determinação da taxa de respiração, onde um mol de hexose (180 g) consome seis mols de O_2 (192 g) e formam seis mols de CO_2 (264 g). A água produzida fica retida nos tecidos, mas o CO_2 escapa e resulta em perda de certa quantidade de peso do produto. Quando um mol de hexose é oxidado, formam-se cerca de 38 mols de ATP (adenosina trifosfato, cada mol contendo 32 kJ de energia). Esse número representa cerca de 42% de troca de energia livre e o restante, que representa em torno de 57%, é dissipado na forma de calor (Powrie; Skura, 1991). A remoção rápida desse calor é desejável para redução do metabolismo do produto.

O etileno, composto volátil de dois carbonos (C_2H_4), é considerado principal hormônio do amadurecimento, apesar de não ser o único. O etileno é produzido endogenamente por todas as plantas. Em concentrações tão baixas quanto $0,1 \mu\text{L L}^{-1}$, o etileno pode induzir uma série de respostas fisiológicas, incluindo amadurecimento, senescência e desordens fisiológicas (Watada, 1986). No início da via metabólica de síntese do etileno, o aminoácido metionina é convertido a S-adenosil-L-metionina (SAM) pela ação da SAM sintetase (EC 2.5.1.6), numa reação que consome energia na forma de ATP. A conversão de SAM ao aminoácido cíclico ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) é catalisada pela enzima ACC sintase (S-adenosil-L-metionina metiltioadenosinaliase) (EC 4.4.1.14). Na etapa subsequente, o ACC é convertido a etileno, pela ação da ACC oxidase (EC 1.4.3). Além do etileno, a oxidação do ACC pela ACC oxidase gera CO_2 , cianeto (HCN) e água (Yang; Hoffman, 1984).

Estudos têm comprovado o envolvimento do etileno no processo de amadurecimento e o mecanismo elucidado através da inibição da síntese de etileno, resultando em redução ou inibição do amadurecimento (Picton et al., 1993; Ayub et al., 1996; Silva et al., 2004). Em outro estudo foi verificado que as plantas que apresentam o comprometimento da síntese normal de etileno apresentam padrões anormais de amadurecimento (Stepanova; Ecker, 2000). Apesar do efeito evidente do etileno na regulação da maturação de frutos climatéricos, acredita-se que mecanismos reguladores moleculares dependentes e independentes de etileno coexistam nesses frutos (Lelièvre et al., 1997; Alexander; Grierson, 2002), o que torna esse processo, como um todo, ainda mais complexo.

Com base nos parâmetros da respiração e produção de etileno, as frutas podem ser classificadas em climatéricas e não-climatéricas (Tabela 1). Os frutos climatéricos são aqueles que apresentam, em determinada etapa do ciclo vital, um aumento rápido e acentuado na atividade respiratória e produção de etileno, culminando no amadurecimento, que pode acontecer na planta ou fora dela, desde que colhidos fisiologicamente maduros. Por outro lado, os frutos não-climatéricos apresentam atividade respiratória relativamente baixa e constante, com ligeiro declínio após a colheita, esses frutos não são capazes de completar o processo de amadurecimento fora da planta-mãe, devendo ser colhidos maduros (Chitarra; Chitarra, 2005).

Tabela 1. Classificação geral de algumas frutas segundo as taxas de respiração.

Frutas climatéricas		Frutas não-climatéricas	
Ameixa	Maracujá	Abacaxi	Morango
Abacate	Melancia	Azeitona	Pepino
Banana	Muskmelon ^a	Cacau	Pimenta
Damasco	Nectarina	Caju	Tamarindo
Figo	Papaya	Cereja	Uva
Goiaba	Pera	Grapefruit	
Kiwi	Pêssego	Limão verde	
Maçã	Tomate	Limão amarelo	
Manga		Laranja	

Fonte: Saltveit (2016) e Suslow et al. (2017). Obs: ^aMuskmelon engloba honeydew, crenshaw, Persian, casaba e outros "mixed melons".

Importância da temperatura na respiração e produção de etileno

A temperatura é o fator mais importante a ser considerado para a qualidade pós-colheita, por afetar significativamente a velocidade das reações biológicas (Kader; Saltveit, 2003; Jobling, 2009). A regra de Van't Hoff estabelece que a velocidade de uma reação biológica aumenta de duas a três vezes a cada 10°C de aumento na temperatura, sendo Q_{10} o coeficiente adimensional que define o aumento na taxa de respiração quando a temperatura aumenta em 10 graus, e ele não tem unidade. A Tabela 2 apresenta os valores padrões de Q_{10} em vegetais (Kader, 1987).

Tabela 2. Coeficiente do aumento da taxa de respiração de vegetais para intervalos de temperaturas de 10°C (coeficiente de temperatura – Q_{10})

Q_{10}	Temperatura (°C)
2,5-4,0	0 – 10
2,0-2,5	10 – 20
1,5-2,0	20 – 30
0,5-1,1	30 – 40

Fonte: Kader (1987).

Os valores de Q_{10} podem ser calculados para cada tipo de material vegetal, desde que esse material seja avaliado em duas temperaturas com intervalo de 10 °C (Bron et al., 2005) segundo a equação 2.

$$Q_{10} = (R_2 / R_1)^{[10 / (T_2 - T_1)]} \quad (2)$$

Sendo, R_1 - taxa de respiração medida a T_1 (onde $T_1 < T_2$, e a unidade deve ser em graus Celsius); R_2 - taxa de respiração medida a T_2 (onde $T_1 < T_2$, e a unidade deve ser em graus Celsius); e $T_1 < T_2$ (em graus Celsius) com intervalo de 10°C. A resolução da equação 2 pode ser facilmente encontrada em: http://www.physiologyweb.com/calculators/q10_calculator.html

Outra forma de cálculo é plotando $\log(R) \times T$ onde, muitas vezes, T é a temperatura medida na superfície do produto em avaliação, que pode ser uma fruta:

$$\log R = a \cdot T + b$$

e, em seguida Q_{10} é calculado através do coeficiente de inclinação a pela equação $Q_{10} = 10^{(10 \cdot a)}$ (Benkeblia et al., 2000). Com o cálculo de regressão linear, Benkeblia et al. (2000) sugerem que a taxa de respiração aumenta linearmente. Apesar disso, Bron et al. (2005) demonstram que a estimativa de Q_{10} pela regressão linear resulta em valor menor (subestimado) comparado ao valor médio de Q_{10} de cada tempo (período) de avaliação, significando que a média de Q_{10} deve ser calculado a cada tempo (período) de avaliação.

A partir dos valores de Q_{10} pode-se calcular, por exemplo, que a velocidade relativa da respiração pode aumentar de 1,0 a 0°C para 3,0 a 10°C, 7,5 a 20°C, 15,0 a 30°C e 22,5 a 40°C (Kader, 1987). Com base nos valores da tabela 2, Saltveit (2016) compilou dados de efeitos de diferentes temperaturas nas taxas de respiração ou deterioração, e a vida útil de prateleira de um determinado produto (commodity) perecível (Tabela 3). Os dados indicam que um determinado produto que tenha uma vida útil de prateleira de 13 dias a 20°C, pode ser armazenado por 100 dias a 0°C, mas não mais que 4 dias a 40°C. Esses valores ilustram a importância da redução de temperatura dos produtos frescos tão logo possível após a colheita para maximizar sua vida útil.

Tabela 3. Estimativa do efeito de diferentes temperaturas na velocidade de deterioração de um produto vegetal.

Temperatura (°C)	Q_{10} assumido	Velocidade relativa de deterioração	Vida útil relativa (dias)
0	-	1.0	100
10	3.0	3.0	33
20	2.5	7.5	13
30	2.0	15.0	7
40	1.5	22.5	4

Fonte: Saltveit (2016).

Sistemas de coleta de amostras

Os métodos práticos de mensuração da respiração envolvem a estimativa da produção de dióxido de carbono (CO_2), em sua grande maioria, ou consumo de oxigênio (O_2), por tecidos vegetais. São métodos simples e não-destrutivos (Saltveit, 1997). Existem dois sistemas que podem ser usados para estimar a taxa respiratória e a produção de etileno, o sistema estático ou fechado e o sistema dinâmico ou aberto ou com fluxo contínuo de ar.

Sistema fechado (estático)

O sistema estático geralmente é mais utilizado por ser mais simples e econômico. Nesse sistema o material vegetal a ser estudado é colocado num frasco (câmara) e fechado hermeticamente e o acúmulo de CO_2 ou o consumo de O_2 na atmosfera é mensurada em um período de tempo (horas). Esse método é empregado para avaliação durante períodos curtos, de diferentes tipos de produtos vegetais ou pedaços de tecidos (meristema, floretes, ponteiras), podendo ser empregados na tecnologia de cultura de tecidos (Kiferle et al., 2014). Nesse sistema, o cálculo da respiração necessita das seguintes informações: a) volume livre no frasco, b) peso do produto, c) concentração inicial e final de CO_2 , d) tempo (entre o fechamento do frasco e a coleta da amostra) (Kader; Saltveit, 2003). Deve-se atentar para que o frasco não fique fechado por um período excessivo de tempo, pois o acúmulo ou consumo excessivo de CO_2 ou O_2 , respectivamente, pode causar alterações no metabolismo respiratório e produção de etileno e dessa forma prejudicar as avaliações. Pode-se notar na figura 1 a seta indicando o desvio da linearidade no acúmulo de CO_2 quando a concentração atinge cerca de 0,2% de CO_2 após 3 horas com o frasco fechado (Kader; Saltveit, 2003).

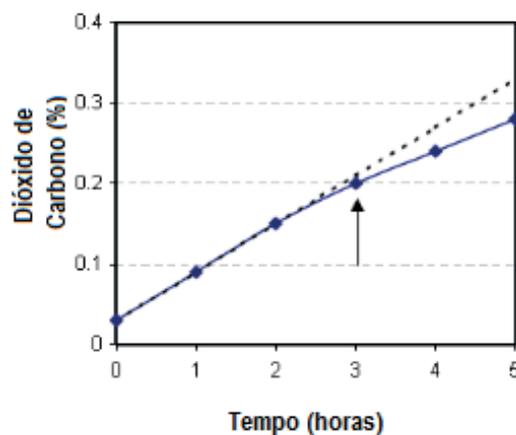


Figura 1. Acúmulo de CO_2 em relação ao tempo num sistema estático (fechado). Adaptada de Kader e Saltveit 2003)

Sistema aberto (dinâmico)

O sistema dinâmico é empregado em experimentos de longa duração, preferencialmente quando o vegetal apresenta alta taxa respiratória e/ou produção de etileno. O produto é acondicionado em uma câmara com entrada e saída de ar em extremidades opostas, e através deste passa-se um fluxo constante de ar. A taxa de respiração é calculada pela diferença entre as concentrações na entrada e na saída da câmara a um fluxo conhecido.

Para a realização dos experimentos em sistema aberto é necessário o uso do instrumento denominado fluxcentro ou flowboard (Cerqueira, 2012; Calbo; Carmelo, 2017). Segundo Calbo (1989), fluxcentro ou flowboard é um sistema para controle de fluxo constante de gases constituído de um compressor de ar, ou uma bombinha tipo aquário, se for para sistemas menores, para o envio do ar atmosférico que borbulha primeiro pela solução de permanganato de potássio (KMnO_4) para a retirada do possível etileno presente no ar atmosférico, depois pela solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) 20% (p/v), e por último pelo painel de distribuição para que o ar atravessasse pelo ambiente das câmaras de experimento onde estarão os vegetais. O fluxo é ajustado de tal forma que esse ar que atravessa as câmaras contenha em torno de 0,5% de CO_2 . Décadas se passaram e o sistema sofreu modificações e atualmente foi aprimorado para seu uso no preparo de atmosfera modificada que permite otimização da mistura de até três diferentes gases de teores conhecidos (Carmelo et al., 2015) para o estudo do prolongamento do frescor de vegetais na pós-colheita. Carmelo et al. (2015) descreveram a montagem de *flowboard* portátil para facilitar os ensaios de atmosfera controlada em condições de laboratório. Segundo esses autores, o sistema funciona integrando distribuidores e misturadores de gases com controle de fluxo, o que agrega a facilidade de confecção, baixo custo e economia no uso de gases.

As vantagens do sistema dinâmico foram descritas em detalhes por Calbo e Henz (2007), sendo relevantes nesse caso conhecer o volume e o fluxo para o cálculo do tempo necessário para atingir o equilíbrio, e uma vez atingido esse equilíbrio, não são mais importantes para os demais cálculos envolvidos. Segundo Saltveit (1999), a desvantagem é o custo em manter o fluxo para obter atmosfera com diferentes composições de gases, porém o sistema portátil descrito por Carmelo et al. (2015) poderá minimizar esse custo com gases.

Propostas de modificação na metodologia

Diante da importância da quantificação da respiração e da produção de etileno pelos vegetais na área de pós-colheita, que envolve o desenvolvimento de novas tecnologias e formas de tratamentos desses vegetais, identificou-se como oportunidade a revisão de procedimentos envolvidos e a modernização do equipamento com foco na quantificação mais rápida e eficiente.

Modificações nas configurações do cromatógrafo gasoso

O avanço da tecnologia em cromatografia gasosa possibilitou analisar a mistura de gases com a combinação em série entre o detector de condutividade térmica (TCD) e o detector de ionização de chama (FID), sendo a escolha da coluna dependente da finalidade e do desempenho do cromatógrafo. Um equipamento com essa configuração é aplicável em áreas da petroquímica que estudam uma mistura de gases, como hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, monóxido de carbono, dióxido de carbono, sulfeto de hidrogênio, dióxido de enxofre, dióxido de nitrogênio, metano, etano, propano, butano, pentano e homólogos de hexano, em níveis tão baixos como 0,1% (v/v) (Application..., 2001).

A partir da experiência adquirida na análise de gases ambientais, e entendendo as particularidades envolvidas no estudo da respiração e produção de etileno de vegetais, foi solicitada à empresa fabricante a modificação na configuração do cromatógrafo a gás que normalmente são utilizados por outros autores. A configuração do cromatógrafo gasoso utilizada na área de petroquímica foi

adaptada para determinação da respiração e da biossíntese de etileno em laboratório na pós-colheita de vegetais. O cromatógrafo, marca Agilent, modelo 7890A, foi equipado com injetor capilar split-splitless, um loop de aço inox de 250 microlitros e uma coluna capilar megabore, acoplados a uma válvula de seis vias. Na figura 2 encontra-se um diagrama esquematizado da válvula de amostragem/injeção de gases através da válvula de seis vias (Agilent..., 2013).

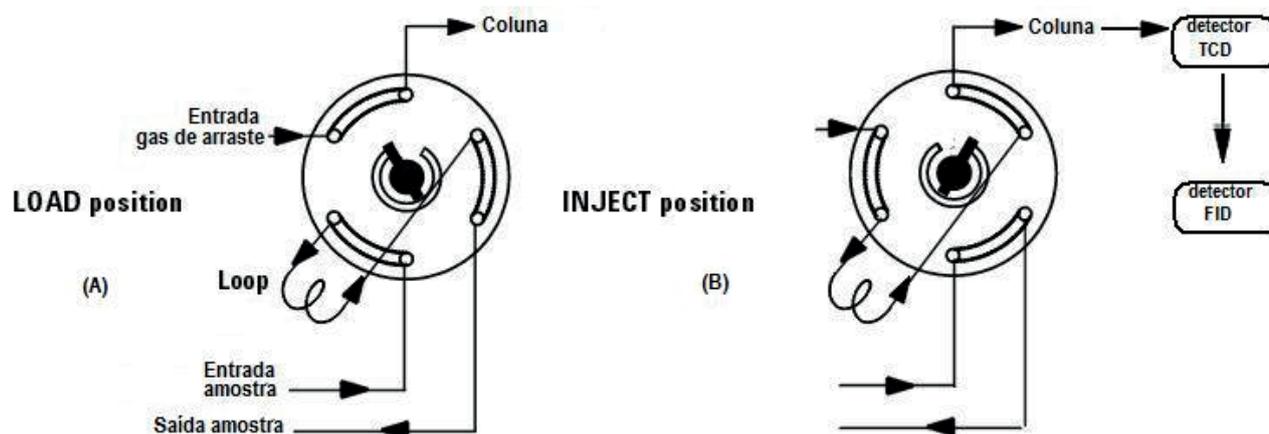


Figura 2. Diagrama esquemático da válvula de seis vias: carregamento da amostra no loop (A), e injeção/detecção (B) quando o gás de arraste passa pelo loop. Ref. adaptado de Manual da Agilent (Agilent..., 2013).

A segunda e importante modificação solicitada na configuração do cromatógrafo foi a instalação de dois detectores em série, sendo o primeiro um detector de condutividade térmica (TCD) com controle eletrônico de pressão (EPC) de todos os gases, e com sistema de segurança que desliga o filamento em caso de falta de gás de referência, e o segundo um detector por ionização de chama (FID). O diferencial oferecido pelo detector TCD com EPC de todos os gases é a sua característica técnica única de comutação do gás de arraste, o que dispensa a necessidade de coluna de referência para operação. A conexão em série dos detectores TCD e FID permite que com uma única injeção de amostra sejam determinadas as concentrações de CO₂ e de etileno, respectivamente, e também de oxigênio, se desejar. Um computador com software OpenLab CDS Instrument Driver, operado em plataforma Win7, para comando e tratamento de dados do cromatógrafo a gás complementa o sistema analítico.

Inicialmente foi testada uma coluna PLOT, CarboPlot P7 (Varian-Agilent), 25m x 0,53mm x 25µm, e as condições analíticas adaptadas de Petrisor et al. (2010) e Cocci et al. (2014), com injetor no modo splitless, fluxo de nitrogênio (N₂) na coluna de 18 mL min⁻¹, temperatura da coluna em isoterma a 90°C, detector TCD a 150°C (com fluxo de referência de 15 mL min⁻¹ e fluxo auxiliar de 2 mL min⁻¹) e o FID a 200°C (fluxo de N₂ de 25 mL min⁻¹, fluxo de ar sintético de 350 mL min⁻¹ e fluxo de hidrogênio de 35 mL min⁻¹). Nessas condições, o cromatograma resultante não satisfaz a repetibilidade devido à baixa resolução dos picos, não sendo analiticamente aceitável (Figura 3). Condições similares a estas foram utilizadas por W. J. Havenga (Iscor Headquarters, Pretoria, South África) (Application..., 2011) com o hélio (He) como gás de arraste, ao invés de N₂ como testado, obtendo-se picos com boa resolução e tempo de retenção do etileno de 7,95 minutos.

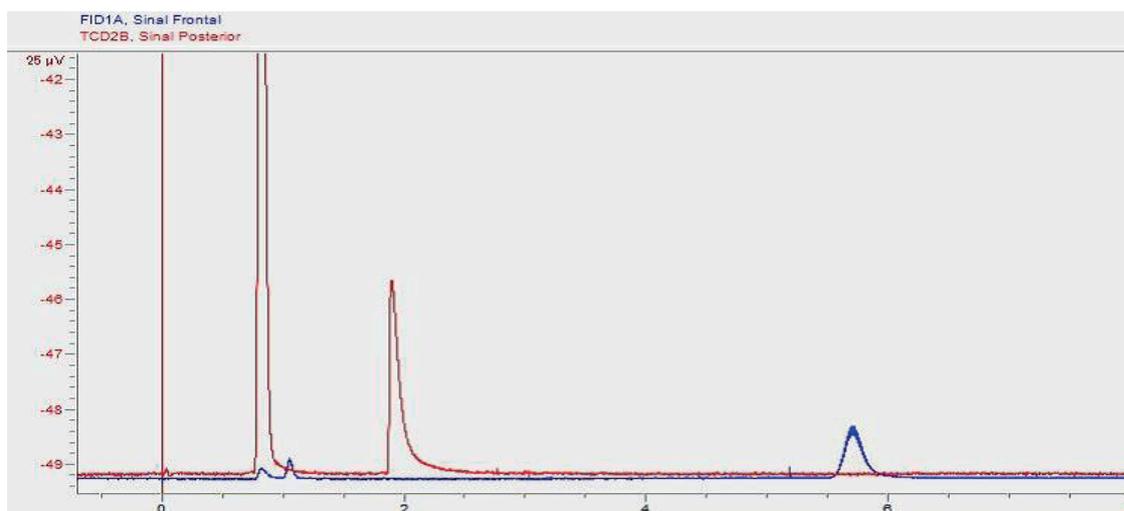


Figura 3. Cromatograma obtido com as condições de injeção splitless, coluna CarboPlot P7, 25m x 0,53mm x 25µm, isoterma a 90°C, com detectores TCD (150°C) e FID (200°C), e N₂ como gás de arraste. CO₂, tempo de retenção 1,86 min, e etileno, tempo de retenção 5,70 min.

Assim, as opções para mudança na condição analítica seriam a troca de gás de arraste, de N₂ para o He ou hidrogênio (H₂), ou a troca de coluna por uma coluna capilar megabore HP-Plot (15 m, 0,53 mm, e 40 µm de espessura do filme) (Tovar et al., 2001) ou HP Plot-Q (30m e 0,53 mm DI) para mensuração de CO₂ (Gusmán et al., 2012). Em razão da facilidade da troca de coluna comparada à troca do N₂ para uso de gás He, e pela existência da coluna no laboratório, optou-se pela troca da coluna para uma coluna capilar megabore Plot-Q (30 m x 0,53 mm x 25 µm) (Agilent). Foram realizadas mudanças nas condições do injetor capilar split-splitless para modo split (3:1) a 120°C, as temperaturas dos detectores TCD (200°C) e FID (300 °C) e temperaturas de 150°C e 80°C para injetor e coluna, respectivamente, segundo Cocci et al. (2014) e Kiferle et al. (2014). O fluxo de gás na coluna foi ajustado para 6 mL min⁻¹. O gás de arraste utilizado foi o N₂ (pureza 99,999%), com fluxo de N₂ de 25 mL min⁻¹, o ar sintético e hidrogênio (ambos com pureza similar ao N₂) nas mesmas condições de fluxo testadas anteriormente para o detector FID, e TCD com fluxo de referência de 15 mL min⁻¹ e fluxo auxiliar de 5 mL min⁻¹.

Nestas condições analíticas, o cromatograma resultante da análise de uma amostra coletada no experimento com mamão papaya em sistema estático encontra-se na figura 4. Os resultados apresentaram a repetibilidade de tempo <0,0008% e repetibilidade de área <0,78% DPR (desvio padrão relativo), consideradas satisfatórias.

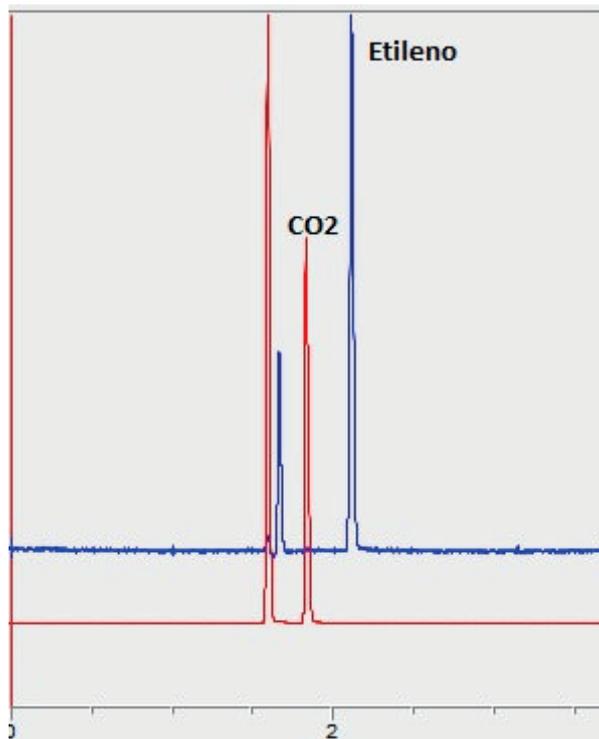


Figura 4. Cromatograma obtido da amostra coletada no experimento com mamão papaya, nas condições de injeção modo split (3:1), coluna Plot Q, 30m x 0,53mm x 25 μ m, isoterma a 80°C, com detectores TCD (200°C) e FID (300°C). Tempo de retenção CO₂ 1,85 min e do etileno de 2,27 min.

As vantagens desta configuração no equipamento são: i) a redução do tempo necessário para análise de uma amostra, com tempo de corrida menor que 2,5 minutos (Fig. 4) ao invés de 6 minutos das condições iniciais (Fig. 3) e de cerca de 8 minutos encontrado por Havenga (Application..., 2011); ii) análise quantitativa de ambos os gases com uma única injeção, obtendo desvio padrão relativo satisfatório para CO₂ (0,78%) e etileno (0,71%) através de 10 injeções de cada padrão; e iii) uso do gás N₂ que é economicamente mais vantajoso que o He, além de o He ser de fonte esgotável. Não foram estabelecidos limites mínimos de detecção dos gases pelo fato de não ser este o foco do trabalho, mas nas análises de amostras reais retiradas em diferentes tempos (15, 30, 60, 90 e 120 minutos) o equipamento atendeu perfeitamente às necessidades experimentais da área de pós-colheita. Por exemplo, foi possível a detecção e quantificação de 0,03 – 0,04 micromol/mol de etileno produzido por mamão papaya.

Modificações no sistema de coleta e processamento de amostras

Nas configurações dos cromatógrafos comumente utilizados até então, a coleta e injeção das amostras são feitas com uma seringa de vidro tipo *gas-tight*, selada, para evitar perda de gás (Bron et al., 2005; Hong et al., 2007), o que envolve necessário cuidado da exatidão do volume tanto para coleta quanto para a injeção da amostra.

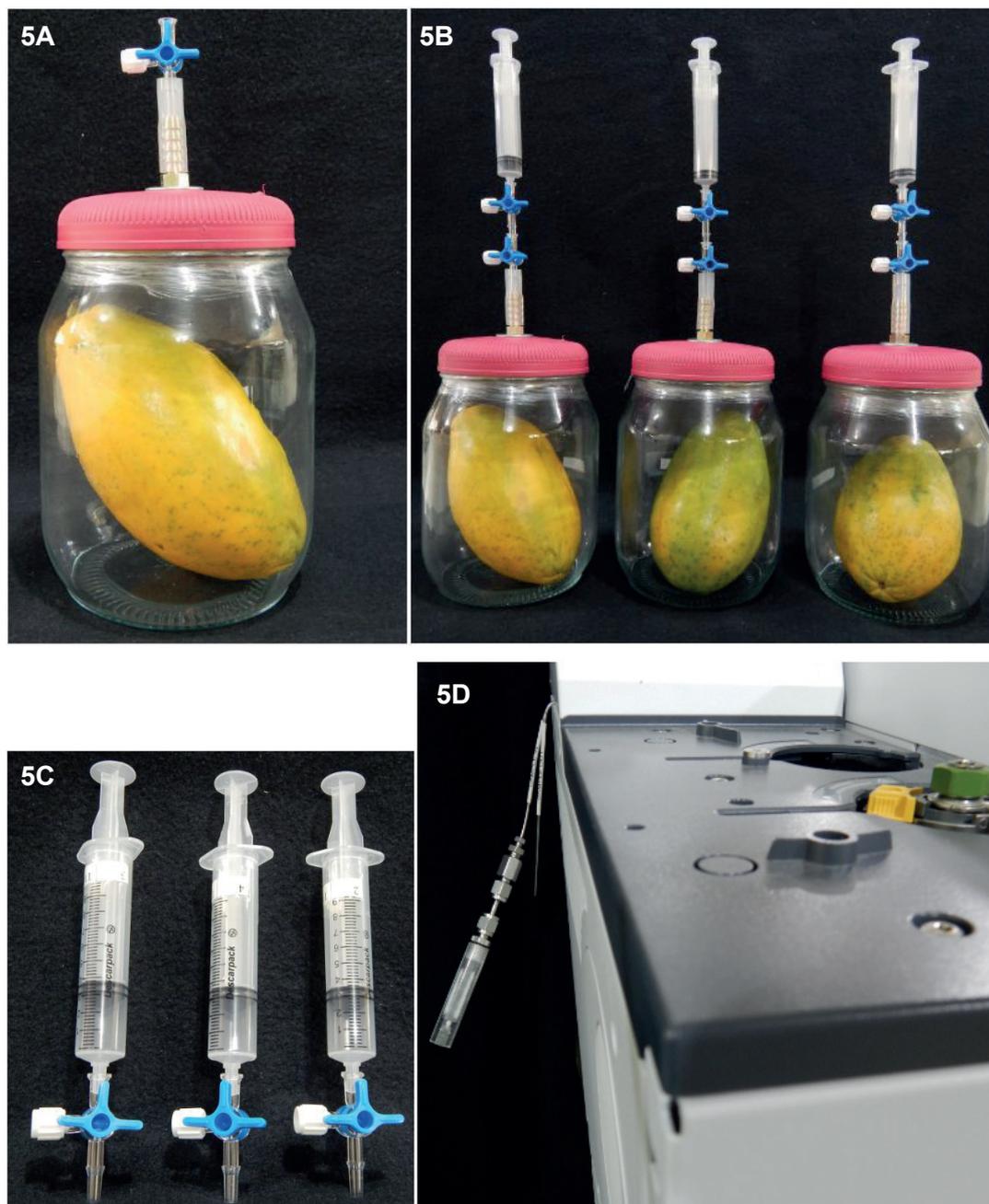


Figura 5. Sistema fechado para coleta de amostra gasosa no ensaio de mamão papaya (5A); seringa acoplada ao sistema na coleta (5B); seringa com amostra e torneira de 3 vias em policarbonato fechada (5C); injetor de amostra gasosa na lateral do cromatógrafo gasoso (5D). (Fotos: Daniel Terao)

Na configuração utilizada no presente trabalho, o loop conectado à válvula de seis vias permite amostragem de volume exato com repetibilidade, sem envolver o erro do analista. Com a instalação do loop de aço inox, de volume conhecido, a coleta e injeção de amostra pode ser feita com uma seringa comum descartável e estéril, com bico tipo *luer lock*, adaptada com torneira de 3 vias *luer slip* confeccionada em policarbonato.

Para ilustrar a metodologia de coleta sugerida, encontra-se na figura 5 um sistema fechado de coleta de amostras de um ensaio com mamão (Figura 5A). Após manter o frasco contendo a fruta lacrado por um período de duas horas, com o fechamento da torneira de 3 vias *luer slip*, instalada na tampa do frasco (Figura 5B) recolhe-se cerca de 1-3 mL de amostra de ar de cada

um dos frascos (Figura 5C) e injeta-se através de tubo capilar de aço inox localizado na lateral do cromatógrafo (Figura 5D). Como vantagens do uso desta metodologia de amostragem podemos citar: i) flexibilidade no volume de coleta de amostras, podendo ser dentro de uma faixa de volume, sem a precisão exigida no procedimento convencional; ii) praticidade e precisão no ajuste das torneiras de três vias da tampa do sistema e; iii) baixo custo de materiais e facilidade de renovação; iv) boa vedação da torneira de três vias, facilitando a logística no transporte do local de ensaio até o laboratório e possibilitando programar o processamento de amostras, sem a necessidade de injeção imediata no cromatógrafo, isto é, as ações não precisam ser concomitantes entre ensaio, coleta e injeção, como ocorre no sistema convencional; v) facilidade na injeção de amostras sem perfuração do septo no cromatógrafo trazendo fluidez no processamento, uma vez que elimina a necessidade periódica de limpeza do “liner” e troca de septo existente no injetor.

Estudo de caso do uso do cromatógrafo com detectores em série na quantificação de CO₂ e de etileno na pós-colheita de mamões

Para ilustração da aplicabilidade das modificações propostas, apresenta-se os resultados de mensurações da atividade respiratória de mamão papaya (*Carica papaya* L. var. Sunrise) durante sete dias de armazenamento refrigerado (10°C) seguido de mais cinco dias em temperatura ambiente (25°C). Os frutos foram acondicionados em câmaras de sistema estático (fechado) (Figura 5A) e mantidos sob refrigeração a 10°C. Nesse período, as amostras de ar (2 mL) foram coletadas a cada dois dias e analisadas no cromatógrafo gasoso nas condições descritas anteriormente. Após a retirada do experimento para temperatura ambiente, as amostras de gás foram coletadas diariamente. Os padrões de referência externa utilizados nas análises foram o CO₂ (9,96 %mol/mol) e o C₂H₄ (10,8 micromol/mol), ambos certificados pela empresa fornecedora (Air Liquide). O tempo de análise de cada amostra foi de 2,5 minutos. Pela aplicação da equação 3-b (Ver Anexo para detalhes dos cálculos) estimou-se a atividade respiratória:

$$R_{CO_2} (\text{mLCO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}) = [A_{am} * C_{pad} / (A_{pad} * 100)] * V(\text{mL}) / (M * t) \quad (3-b)$$

onde, R_{CO_2} é a taxa de respiração, A_{am} = área da amostra, C_{pad} = concentração do padrão (neste estudo, em %), A_{pad} = área do padrão, V = volume livre no frasco (L), M = massa do produto (kg) e t = tempo do ensaio (horas). Como a resposta é em volume, houve a necessidade de corrigir a resposta pela temperatura do experimento (t , °C), ou seja 10°C e a 25°C usando a equação 3-c, onde R_c é a taxa de respiração corrigida pela temperatura do experimento.

$$R_c = R_{CO_2} * (273,15 + T) / 273,15 \quad (3-c)$$

A produção de etileno foi estimada aplicando-se a equação 7 (Ver anexo):

$$C_2H_4 (\mu\text{LC}_2\text{H}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \text{h}^{-1}) = [\text{conc.} C_2H_4 * V(\text{mL})] / (\text{massa}(\text{kg}) * \text{tempo}(\text{h}) * 1000) \quad (7)$$

onde, $\text{conc.} C_2H_4 = [\text{área amostra} * \text{concentração do padrão (ppm)}] / \text{área do padrão}$.

Os resultados da taxa de respiração e da produção de etileno foram plotados em gráfico (Figura 6). A atividade respiratória do mamão ($n=4$) durante o armazenamento refrigerado a 10°C manteve-se abaixo de 10 mLCO₂ kg⁻¹ h⁻¹. Após a retirada do experimento para temperatura ambiente, a taxa de respiração estimada foi de 31 mLCO₂ kg⁻¹ h⁻¹, atingindo o pico pseudo-climatérico no 10º dia (Figura 6). No 1º dia sob refrigeração foi observada a produção de etileno em torno de 2,0 μLC₂H₄ kg⁻¹ h⁻¹

e este valor decaiu para $<1,0 \mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ durante o período em que permaneceu no ambiente refrigerado (Figura 6). A produção de etileno alcançou seu máximo de $2,6 \mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ no 11º dia, já em temperatura ambiente. Manter essas taxas baixas é importante devido a algumas culturas serem muito sensíveis à presença de etileno exógeno (Cantwell, 2001). A refrigeração é uma das técnicas mais difundidas na cadeia de comercialização de frutas e hortaliças, e se ela for eficiente em manter baixa a atividade fisiológica dos vegetais, contribui para retardar o amadurecimento (Manenoi et al., 2007).

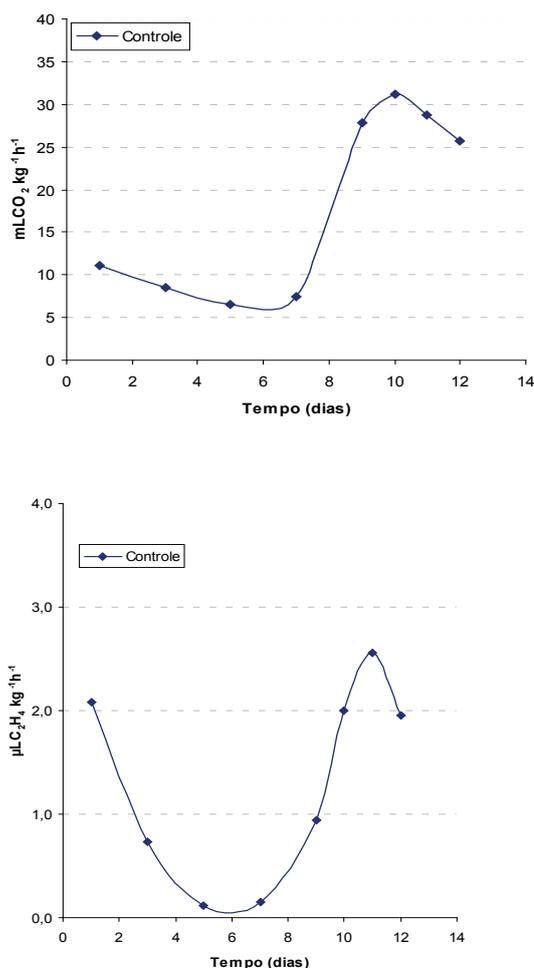


Figura 6. Respiração (superior) e produção de etileno (inferior) em mamão papaya (*Carica papaya* L. var. Sunrise) durante sete dias de armazenamento resfriado a 10°C e mais cinco dias a 25°C.

Considerações finais

As modificações na configuração do cromatógrafo a gás, integrando injetor split-splitless com loop conectado à válvula de seis vias para amostragem e injeção de gases, o uso de uma única coluna capilar, e a configuração de dois detectores em série, permitem a análise simultânea de CO₂ e de C₂H₄, com redução de tempo analítico e aumento da repetibilidade amostral.

A modificação no sistema de coleta e processamento de amostras, usando um sistema fechado conectado a uma torneira de polycarbonato de 3 vias tipo luer slip, e uma seringa descartável, também com torneira de 3 vias para coleta de amostra gasosa, confere maior praticidade,

agilidade e flexibilidade no volume amostrado, possibilitando ao laboratório melhor organização no processamento das amostras.

A aplicação prática no estudo de caso demonstra o alcance do objetivo principal, que é de tornar o procedimento de mensuração da respiração e da biossíntese de etileno na pós-colheita de vegetais mais ágil e prático, e vem para contribuir no incremento da pesquisa sobre a fisiologia vegetal e o desenvolvimento de tecnologias alternativas de pós-colheita para o setor produtivo.

Agradecimento

À Dagmar N. de Oliveira Santos e Melissa Bacchan pelo apoio técnico na cromatografia gasosa. Aos três avaliadores anônimos pelas sugestões e correções incluídas no documento.

Referências

- AGILENT 7890 Series: advanced operation manual. Wilmington: Agilent Technologies, 2013. 247 p.
- APPLICATION note #GC3002. East Norwalk, Buck Scientific, 2001. 2 p.
- APPLICATION note A00763: rapid analysis of detarred coke oven gas. Wilmington: Agilent Technologies, 2011. 2 p.
- ARRUDA, M. C.; JACOMINO, A. P.; PINHEIRO, A. L.; TREVISAN, M. J.; ORTEGA, E. M. M. Atividade respiratória e produção de etileno em laranja “pêra” submetida a níveis de processamento mínimo e temperaturas de armazenamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 4, p. 1155- 1158, 2008.
- ALEXANDER, L.; GRIERSON, D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 377, p.2039-2055, 2002.
- AYUB, R.; GUIB, M.; BEN-AMOR, M.; GILLOT, L.; ROUSTAN, J-P.; LATCHÉ, A.; BOUZAYEN, M.; PECH, J-C. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. **Nature Biotechnology**, v. 14, n. 7, p. 862-866, 1996.
- BENKEBLIA, N.; VAROQUAUX, P.; GOUBLE, B.; SELSELET-ATTOU, G. Respiratory parameters of onion bulbs (*Allium cepa*) during storage: effects of ionising radiation and temperature. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 12, p. 1772-1778, 2000.
- BRON, I. U.; RIBEIRO, R. V.; CAVALINI, F. C.; JACOMINO, A. P.; TREVISAN, M. J. Temperature-related changes in respiration and Q_{10} coefficient of Guava. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 5, p. 458-463, 2005.
- CALBO, A. G. Adaptação de um fluxcentro para estudos de trocas gasosas e um método de aferição de capilares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 24, n. 6, p. 733-739, 1989.
- CALBO, A. G.; CARMELO, L. G. P. Fisiologia pós-colheita: métodos macroscópicos e instrumentos. In: FERREIRA, M. D. (Ed.). **Instrumentação pós-colheita em frutas e hortaliças**. Brasília, DF: Embrapa, 2017. p. 19-64.
- CALBO, A. G.; HENZ, G. P. **Métodos para medir a respiração de frutas e hortaliças**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2007. 12 p. (Embrapa Hortaliças. Comunicado Técnico, 47).
- CANTWELL, M. **Properties and recommended conditions for long-term storage of fresh fruits and vegetables** (11/2001). Disponível em: <http://ucanr.edu/sites/Postharvest_Technology_Center_/files/230191.pdf>. Acesso em: 6 fev. 2017.
- CARMELO, L. G. P.; BECARO, A. A.; FERREIRA, M. D.; CALBO, A. G. Portable flowboard for storage of fruits and vegetables in mini-chambers with controlled atmosphere. **Engenharia Agricola**, v. 35, n. 6, p. 1105-1116, 2015.

- CERQUEIRA, T. S. **Fisiologia, bioquímica e conservação de bananas e goiabas sob altas concentrações de O₂ combinadas com CO₂ e N₂O**. 2012. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manejo**. 2 ed. Lavras: UFLA, 2005. 783 p.
- COCCI, E.; SACCHETTI, G.; ROCCULI, P.; DALLA ROSA, M. Response of Pink Lady® apples to post-harvest application of 1-methylcyclopropene as a function of applied dose, maturity at harvest, storage time and controlled atmosphere storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 13, p. 2691-2698, 2014.
- COLLI, S. Etileno. In: KERBAUY, G. B. (Ed.). **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 308-332.
- CRONJE, P. J. R.; BARRY, G. H.; HUYSAMER, M. Postharvest rind breakdown of “Nules Clementine” mandarin is influenced by ethylene application, storage temperature and storage duration. **Postharvest Biology and Technology**, v. 60, n. 3, p. 192-201, 2011.
- DOMÍNGUEZ, I.; LAFUENTE, M.T.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; GAVARA, R. Influence of modified atmosphere and ethylene levels on quality attributes of fresh tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Food Chemistry**, v. 209, p. 211-219, 2016.
- ESTADOS UNIDOS. Department of Commerce. National Oceanic and Atmospheric Administration. **History of atmospheric carbon dioxide from 800,000 years ago until January 2016**. Boulder, 2016. Disponível em: <<https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/history.html>>. Acesso em: 9. out. 2017.
- FONSECA, S. C.; OLIVEIRA, F. A. R.; BRECHT, J. K. Modelling respiration rate of fresh fruits and vegetables for modified atmosphere packages: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 52, n. 2, p. 99-119, 2002.
- FUENTEALBA, C.; HERNÁNDEZ, I.; OLAETA, J. A.; DEFILIPPI, B.; MENESES, C.; CAMPOS, R.; LURIE, S.; CARPENTIER, S.; PEDRESCHI, R. New insights into the heterogeneous ripening in Hass avocado via LC-MS/MS proteomics. **Postharvest Biology and Technology**, v. 132, p. 51-61, 2017.
- GHASEMNEZHAD, M.; MARSH, K.; SHILTON, R.; BABALAR, M.; WOOLF, A. Effects of hot water treatments on chilling injury and heat damage in “satsuma” mandarins: antioxidant enzymes and vacuolar ATPase, and pyrophosphatase. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, n. 3, p. 364-371, 2008.
- GUNES, G.; WATKINS, C. B.; HOTCHKISS, J. H. Effects of irradiation on respiration and ethylene production of apple slices. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 8, p. 1169-1175, 2000.
- GUSMÁN, N. G.; SARRIA, S. D.; CAMACHO, J. C. Fisiología y atributos de calidad de la guayaba “pera” (*Psidium guajava* cv.) en poscosecha. **Revista de Ingeniería**, n. 37, p. 26-30, 2012.
- HONG, S.-I.; LEE, H.-H.; KIM, D. M. Effects of hot water treatment on the storage stability of satsuma mandarin as a postharvest decay control. **Postharvest Biology and Technology**, v. 43, n. 2, p. 271-279, 2007.
- JAIME, P.; SALVADOR, M. L.; ORIA, R. Respiration rate of sweet cherries: Burlat, Sunburst and Sweetheart cultivars. **Journal of Food Science**, vol. 66, n. 1, p. 43-47, 2001.
- JOBLING, J. **Correct cool chain management is essential for all fruit and vegetables**. Sydney: Sydney Postharvest Laboratory, 2009. Disponível em: <<http://www.postharvest.com.au/Shelflife.PDF>>. Acesso em: 6 fev. 2017.
- KADER, A. A. Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. **Food Technology**, v. 40, n. 5, p. 99-104, 1986.
- KADER, A. A. Respiration and gas exchange of vegetables. In: WEICHMANN, J. (Ed.). **Postharvest physiology of vegetables**. New York: Marcel Dekker, 1987. p. 25-43.
- KADER, A. A.; SALTVEIT, M. E. Respiration and gas exchange. In: BARTZ, J. A.; BRECHT, J. K. (Ed.). **Postharvest physiology and pathology of vegetables**. 2nd ed. Gainesville: CRC Press, 2003. p. 7-29.
- KIFERLE, C.; LUCCHESINI, M.; MAGGINI, R.; PARDOSSI, A.; MENSUALI-SODI, A. *In vitro* culture of sweet basil: gas exchange, growth, and rosmarinic acid production. **Biologia Plantarum**, v. 58, n. 4, p. 601-610, 2014.

- LIMA, M. A. C.; ALVES, R. E.; BISCEGLI, C. I.; FILGUEIRAS, H. A. C.; FILGUEIRAS, H. A. C. Qualidade pós-colheita de melão Galia submetido à modificação da atmosfera e ao 1-metilciclopropeno. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 793-798, 2005.
- LELIÈVRE, J. M.; LATCHE, A.; JONES, B.; BOUZAYEN, M.; PECH, J. C. Ethylene and fruit ripening. **Physiologia Plantarum**, v. 101, n. 4, p. 727-739, 1997.
- MANENOI, A.; BAYOGAN, E. R.; THUMDEE, S.; PAULL, R. E. Utility of 1-methylcyclopropene as a papaya postharvest treatment. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, n. 1, p. 55-62, 2007.
- PETRISOR, C.; RADU, G. L.; CIMPEANU, G. Quantification of physico-chemical changes during apricot ripening through non-destructive methods. **Revista de Chimie**, v. 61, n. 4, p. 345-350, 2010.
- PICTON, S.; BARTON, S. L.; BOUZAYEN, M.; HAMILTON, A. J.; GRIERSON, D. Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene. **Plant Journal**, v. 3, n. 3, p. 469-481, 1993.
- POWRIE, W. D.; SKURA, B. J. Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. In: OORAIKUL, B.; STILES, M. E. (Ed.). **Modified Atmosphere Packaging of Food**. Chichester: Ellis Horwood, 1991. Chapter 7.
- RYALL, A. L.; LIPTON, W. J.; PENTZER, W. T. **Handling, transportation and storage of fruits and vegetables**. Westport: AVI, 1979. p. 4-12.
- RYALL, A. L.; PENTZER, W. T. Fruits and tree nuts. In: RYALL, A. L.; LIPTON, W. J.; PENTZER, W. T. **Handling, transportation and storage of fruits and vegetables**. Westport: AVI, 1979.
- SALTVEIT, M. E. **Measuring respiration**. Davis: University of California, [2013?]. 5 p. Disponível em: <http://ucanr.edu/sites/Postharvest_Technology_Center_/files/231497.pdf>. Acesso em: 6 fev. 2017.
- SALTVEIT, M. E. A summary of CA and MA requirements and recommendations for harvested vegetables. In: SALTVEIT, M. E. (Ed.). **7th International Controlled Atmosphere Research Conference. Vegetables and Ornamentals**. vol. 4, Davis: University of California, 1997. p. 98-117. (Postharvest Horticulture series, 18).
- SALTVEIT, M. E. Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 15, n. 3, p. 279-292, 1999.
- SALTVEIT, M. E. Respiratory metabolism. In: GROSS, K. C.; WANG, C. Y.; SALTVEIT, M. E. (Ed.). **The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks**. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 2016. p. 68-75. (Agriculture Handbook, 66).
- SILVA, J. A.; COSTA, T. S. da; LUCCHETTA, L.; MARINI, L. J.; ZANUZO, M. R.; NORA, L.; NORA, F. R.; TWYMAN, R. M.; ROMBALDI, C. V. Characterization of ripening behavior in transgenic melons expressing an antisense 1-aminocyclopropene-1-carboxylate (ACC) oxidase gene from apple. **Postharvest Biology and Technology**, v. 32, n. 3, p. 263-268, 2004.
- SKLORZ, A.; JANSSEN, S.; LANG, W. Application of a miniaturised packed gas chromatography column and a SnO₂ gas detector for analysis of low molecular weight hydrocarbons with focus on ethylene detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 180, p. 43-49, 2013.
- STEPANOVA, A. N.; ECKER, J. R. Ethylene signaling: from mutants to molecules. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, n. 5, p. 353-360, 2000.
- SUSLOW, T. V.; CANTWELL, M.; MITCHELL, J. **Cantaloupe**: recommendations for maintaining postharvest quality. Disponível em: <http://postharvest.ucdavis.edu/Commodity_Resources/Fact_Sheets/Datastores/Fruit_English/?uid=14&ds=798>. Acesso em: 6 fev. 2017.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. (Ed.) **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: ARTMED, 2017. 858 p.
- TOVAR, B.; GARCÍA, H. S.; MATA, M. Physiology of pre-cut mango. I. ACC and ACC oxidase activity of slices subjected to osmotic dehydration. **Food Research International**, v. 34, n. 2-3, p. 207-215, 2001.
- WATADA, A. E. Effects of ethylene on the quality of fruits and vegetables. **Food Technology**, v. 44, n. 5, p. 82-85, 1986.

YANG, S. F.; HOFFMAN, N. E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, p.155-189, 1984.

ZAIDI, N. A.; TAHIR, M. W.; VELLEKOOP, M.; LANG, W. A gas chromatographic system for the detection of ethylene gas using ambient air as a carrier gas. **Sensors**, v. 17, n. 10, p. 2283-2294, 2017.

ZHU, M.; CHU, C. L.; WANG, S. L.; LENCKI, R. W. Influence of oxygen, carbon dioxide, and degree of cutting on the respiration rate of Rutabaga. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 1, p. 30-37, 2001.

ANEXO

Detalhes dos cálculos envolvidos na estimativa da taxa de respiração e da produção de etileno

Num sistema estático, a estimativa da taxa de respiração é feita através da equação 3-a (Jaime et al., 2001; Fonseca et al., 2002):

$$R_{CO_2} = d[CO_2]/dt \times V(\text{mL})/100 \times M(\text{kg}) \quad (3-a)$$

onde, $d[CO_2]/dt = (CO_{2f} - CO_{2i})/t_f - t_i$ é a variação da concentração de dióxido de carbono no tempo, sendo $t_f - t_i$ o tempo de duração do estudo (hora) e o valor de CO_{2i} é a concentração inicial no ambiente que, normalmente, era considerada em torno de 0,03%, mas a média anual em 2015 atingiu 400,8 ppm (Estados Unidos, 2016), então foi ajustado para 0,04%, M é a massa do vegetal (kg) e V o volume livre no frasco em mililitro (mL). Estima-se o volume livre no frasco pelo volume de água deslocada pelo produto em estudo. Divide-se por 100 se a unidade da diferença da concentração é dada em percentagem. Se o experimento for realizado em diferentes temperaturas, há que se considerar o efeito da temperatura sobre o volume do gás. A pressão de um gás é determinada pela lei de gás ideal $P_A V = n_A R T$, considerando um gás a pressão constante de 1 atm e 0°C (273,15 °K) deriva a equação $V_1 = V_0 \times (T_1/T_0)$ e a temperatura é expressa em graus Kelvin. Assim, a equação 3-a transforma em equação 3-b:

$$R_{CO_2} = (CO_{2f} - 0,0401)/t_f - t_i \times (1/100 \times M) \times V_0 \times ((273,15 + T^\circ\text{C})/273,15) \quad (\text{mL}) \quad (3-b)$$

T é a temperatura em que o estudo foi realizado, em graus Celsius (°C).

Assim, com as conversões nas unidades métricas a taxa de respiração pode ser expressa em $[\text{mLCO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}]$ para a temperatura em que o experimento for realizado. Na prática, a concentração de CO_2 é estimada pela calibração do cromatógrafo com padrão certificado de CO_2 (comercialmente pode ser fornecido em %), mas pode ser em ppm (micromol por mol):

$\%CO_2 = [\text{área obtida com a amostra} \times \text{concentração do padrão certificado (\%)] / \text{área do padrão}$ e desse resultado subtrai-se o valor de CO_{2i} (0,04).

A taxa respiratória e produção de etileno também podem ser calculadas com a equação (4) sugerida por Calbo e Carmelo (2017):

$$CO_2 \text{ ou } E = V_L \Delta C / (M \Delta T) \quad (4)$$

Onde: M é a massa do produto (kg) na câmara de trocas gasosas;

V_L é o volume livre no frasco, obtido do volume total do frasco menos o volume do produto nele acondicionado (L);

ΔC é o aumento da concentração de CO_2 (mL L^{-1}) ocorrido no intervalo de tempo de medição (h).

Para um sistema dinâmico, isto é, experimento realizado com fluxo contínuo de ar passando pelo sistema, é só multiplicar a diferença entre as concentrações de CO_2 na saída e a concentração de CO_2 na entrada (%) pelo fluxo de ar (F , em L h^{-1}), e dividido pela massa do produto (kg) x 100 (equação 5) (Fonseca et al., 2002).

$$R_{CO_2} = \frac{[^{out}CO_2 - ^{in}CO_2] \times F}{100 \times M} \quad (5)$$

Transformando $L h^{-1}$ em $mL h^{-1}$ pela multiplicação por 1000, temos o resultado expresso em $[mLCO_2 kg^{-1} h^{-1}]$. Quando a resposta é expressa em volume, então é necessário corrigir pela temperatura do experimento $V_1 = V_0 (T_1/T_0)$. Se desejar a unidade em $mmol CO_2 kg^{-1} h^{-1}$, será necessário realizar a operação de transformação lembrando que $1 ppm = 1 mg L^{-1}$ e um mol de CO_2 equivale a 44,01 g. Deve-se verificar, sempre, se as unidades se cancelam na fórmula e que a unidade final seja aquela que se deseja obter.

Calbo e Carmelo (2017) sugerem a equação 6 para o cálculo da taxa respiratória em sistema aberto:

$$E = F \Delta C/M \quad (6)$$

Onde: M é a massa do produto (kg) na câmara de trocas gasosas;

F é o fluxo de ar ($L h^{-1}$), isto é, volume de ar que atravessou a câmara de trocas gasosas num intervalo de tempo. Da mesma forma, a produção de etileno é estimada com o padrão certificado de etileno ($micromol mol^{-1}$) e com o ajuste na unidade de mililitro para microlitro, segundo a equação 7:

$$C_2H_4 (\mu L C_2H_4 \cdot kg^{-1} h^{-1}) = [conc.C_2H_4] \cdot V(mL) / (massa(kg) \cdot tempo(h) \cdot 1000) \quad (7)$$

onde, $conc.C_2H_4 = [\text{área amostra} \cdot \text{concentração do padrão (ppm)}] / \text{área do padrão}$. Assim, as conversões de ppm ($10/1000000$) e de mL para μL multiplicando-se por 1000, temos no final $1/1000$. O cálculo é realizado utilizando os valores obtidos no cromatógrafo.

A respiração (produção de CO_2) e produção de etileno pelo material vegetal são mensuradas diariamente durante o período de experimentação a $25^\circ C$, e a cada 2 dias para os produtos mantidos a $10^\circ C$.

Embrapa

Meio Ambiente

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

CGPE 14954