

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FITOTECNIA

TESE

**Antecipação de Safra, Qualidade Pós-Colheita
de Caqui ‘Mikado’ (*Diospyros kaki*) e
Desenvolvimento/Validação de Nova
Metodologia para Detecção e Quantificação de
Cianamida Hidrogenada em Matriz de Água.**

Augusto César Vieira Neves Junior

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**ANTECIPAÇÃO DE SAFRA, QUALIDADE PÓS-COLHEITA DE
CAQUI 'MIKADO' (*Diospyros kaki*) E
DESENVOLVIMENTO/VALIDAÇÃO DE NOVA METODOLOGIA
PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CIANAMIDA
HIDROGENADA EM MATRIZ DE ÁGUA.**

AUGUSTO CÉSAR VIEIRA NEVES JUNIOR

Sob a Orientação da Professora
Regina Celi Cavestré Coneglian
E Co-orientação do Pesquisador
Antonio Gomes Soares

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em**
Ciências, no Curso de Pós-Graduação
em Fitotecnia, Área de Concentração
Produção vegetal.

Seropédica, RJ
Julho de 2013

631.89

N513a

T

Neves Junior, Augusto César Vieira, 1982-
Antecipação de safra, qualidade pós-
colheita de caqui 'mikado' (*Diospyros
Kaki*) e desenvolvimento/validação de nova
metodologia para detecção e quantificação
de cianamida hidrogenada em matriz de água
/ Augusto César Vieira Neves Junior -
2013.

156 f.: il.

Orientador: Regina Celi Cavestré
Coneglian.

Tese (doutorado) - Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-
Graduação em Fitotecnia.

Bibliografia: f. 147-155.

1. Plantas - Reguladores - Teses. 2.
Caquí - Cultivo - Teses. 3. Caquí -
Colheita - Teses. 4. Caquí - Fenologia -
Teses. 5. Fenologia vegetal - Teses. 6.
Fitotecnia - Teses. I. Coneglian, Regina
Celi Cavestré, 1964-. II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de
Pós-Graduação em Fitotecnia. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

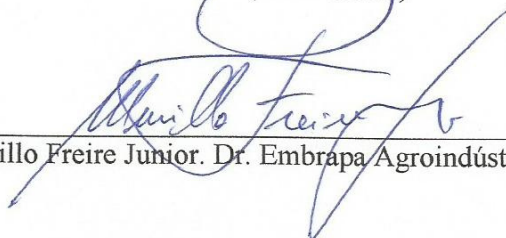
AUGUSTO CÉSAR VIEIRA NEVES JUNIOR

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de concentração em Fisiologia da Produção.

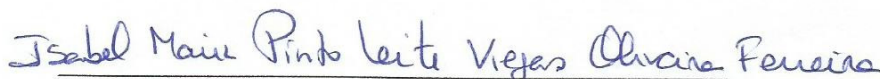
TESE APROVADA EM 29 / 07 / 2013



Regina Celi Cavestré Coneglian. Dr^a. UFRRJ
(Orientadora)



Murillo Freire Junior. Dr. Embrapa Agroindústria de Alimentos



Isabel Maria Pinto Leite Viegas Oliveira Ferreira. Dra. FFUP
(Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto)



Marco Antonio da Silva Vasconcellos. Dr. UFRRJ



Luiz Aurélio Peres Martelleto. Dr. UFRRJ

*“Take my love, take my land
Take me where I cannot stand
I don’t care, I’m still free
You can’t take the sky from me”*

Greg Edmonson – Firefly song

Dedicatória

Dedico

*Aos meus pais e aos meus amigos,
que sempre acreditaram em mim,
mesmo quando eu mesmo duvidei.*

Agradecimentos

Agradeço a **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, onde tive o prazer e privilégio de ser aluno de graduação e pós-graduação (Mestrado e Doutorado). Onde morei durante oito anos de minha vida (alojamento) e aprendi não só uma profissão, mas também como viver.

Agradeço aos meus **pais**, **Alda Maria Cabral Neves** e **Augusto César Vieira Neves**, que fizeram de mim o que sou hoje. Que enquanto puderam sempre estavam lá para me ajudar. E quando não puderam mais, deixaram todos os seus ensinamentos que me ajudam e guiam até hoje.

Agradeço a todos os **produtores de caqui** do distrito de Dona Mariana, município de Sumidouro – RJ. Em especial aos produtores **Leandro Matias**, **Wanderlei Nunes de Oliveira**, **Nivaldo Nunes de Oliveira**, **Mauro Oliveira** e **Albertina Vieira Neves Lameirão**, pela ajuda durante todas as fases do experimento (desde a instalação até a colheita final), sem a ajuda desses nada deste trabalho teria sido possível. Além das ideias (que enriqueceram este trabalho), das amizades e incentivos destes, que estiveram presente a todo o momento durante os trabalhos de campo.

Agradeço meus orientadores **Dr.^a Regina Celi Cavestré Coneglian** e **Dr. Antonio Gomes Soares**, pelas orientações, conselhos, estímulos, apoio, paciência e sobre tudo pela amizade.

Agradeço aos digníssimos membros da banca: **Dr.^a Isabel Maria Pinto Leite Viegas Oliveira Ferreira**, **Dr. Murillo Freire Junior**, **Dr. Marco Antonio da Silva Vasconcellos** e **Dr. Luiz Aurélio Peres Martelleto**. Pelas sugestões e dicas que enriqueceram tanto o presente trabalho e este humilde profissional.

Agradeço aos **Estagiários, Técnicos, Analistas e Pesquisadores** da **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, pela ajuda, dicas e conselhos nos trabalhos de caracterização dos frutos e qualidades pós-colheita.

Em especial ao técnico **Jorge Potxci de Azevedo (Caetano)**, pela ajuda nos experimentos de campo, estando presente em todas as etapas do trabalho ao longo dos três anos. À analista **Henriqueta Talita Guimarães Barboza**, por toda a ajuda nas análises realizadas na Embrapa Agroindústria de Alimentos, onde sem ela teria sido impossível fazer este trabalho com tantos dados e qualidade. Aos dois também quero agradecer sobre tudo a amizade, os conselhos e incentivos.

Não posso deixar de agradecer aqui também às estagiárias **Fernada de Moraes**, pela grande ajuda durante as análises da primeira safra. E à **Thayana Lobão Faskomy**, que tanto me ajudou nos experimentos do mestrado e voltou a me ajudar durante os experimentos da segunda safra deste trabalho. E em especial à amizade das duas.

Agradeço a todos do **Laboratório de Bromatologia e Hidrologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto**, que me receberam de braços abertos e durante seis meses me fizeram sentir em casa. Em especial a **professora Dr.^a Isabel Maria Pinto Leite**

Viegas Oliveira Ferreira, pelas orientações, dicas e amizade, sempre estando presente e disposta a ajudar em tudo.

Ao **Armindo Jorge Alves de Melo**, pela amizade, ajuda, orientação e dicas. Gostaria de deixar registrado aqui também meus parabéns pelo nascimento de seu primeiro filho (*MM – miúdo do miúdo*) e que, mesmo que venha a ser parecido com o pai, o importante é que tenha saúde e que consigamos entender quando ele começar a falar. E que em sua vida e a da sua família nunca falte saúde, felicidade, vinho e chouriço.

Ao **Edgar Augusto da Costa Pinto** (*miner work or gravedigger*), pelas ajudas, dicas e sobre tudo a amizade. Mesmo sem que este, durante o período da minha estada em Portugal, não tenha revelado *o mistério das seis e meia (18:30)*. Soube também que ele está tentando um pós doutorado aqui no Brasil, onde pretende estudar: *A influência de diferentes fusos horários no mistério das seis e meia*.

Quero agradecer também às amizades formadas durante a minha estadia na cidade do Porto – PT: **Gastón Ignacio Pancrazio, Vania Patricia Laranjo Pereira, Sara Cristina da Silva Cunha, Carina Isabel Resente de Pinho, Olga Maria da Silva Viegas, Carla Sofia Pereira Santos, Olívia Maria de Castro Pinho, Jozé de Oliveira Fernandes, Rebeca Cruz, Zita Emanuela de Sá Veloso Martins, Suzana Isabel Pereira Casal e Eulália Mendes**, entre outros.

Agradeço aos meus primos de Portugal: **Maria de Lurdes Vieira e Neves, Manuel Soutelo (Naninho), Felipe Neves Soutelo, Filipe Pereira e Manuel João Neves Soutelo**, por me receberem de braços abertos durante a minha estadia de seis meses na cidade do Porto – PT, assim como a **Dilma** e a **Claudia**. Obrigado por fazerem com que eu me sentisse em casa, pela amizade, ajuda, apoio e conselhos. Significou muito este tempo que passei aí com vocês, espero reencontrar vocês em breve e que vocês venham-me visitar aqui no Brasil para que eu possa retribuir a hospitalidade, carinho e amor cujo qual recebi enquanto estive aí. E para se sentir mais em casa, pode deixar que o meu micro-ondas vai conseguir conversar com você tão bem quanto o seu, **Manuel João**.

Não posso deixar de agradecer a todos os meus **amigos** que sempre me ajudaram, me apoiaram nos momentos difíceis, acreditaram em mim, incentivaram e me deram forças para continuar sempre em frente, acreditando em mim quando até eu mesmo cheguei a duvidar. Em especial aos meus amigos **Ricardo Carioca Lopes, Davison Guimarães Vaz, Ana Elisa Braga Bellas** e ao meu primo **Raphael Gomide**, que tanto me ajudaram ao longo desses anos do doutorado (e da minha vida). Me ajudando, apoiando e incentivando. Não podia também deixar de registrar aqui, assim como deixei registrado na minha dissertação, a ajuda do meu grande amigo **Antonio Augusto Carioca Lopes**, que já na graduação acreditava em meu potencial. Sem vocês nunca teria chegado aonde estou hoje, por isso sou eternamente grato.

Agradeço também a **Marta Araujo Cyrino Escobar**, que tanto me ajudou e incentivou no período de correção desta tese. Muito obrigado pela força que você me deu meu amor.

Agradeço a **Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior – CAPES** e ao **Programa de Doutorado Sanduiche no Exterior – PDSE**, pelas oportunidades e pelo suporte através de bolsas de estudos.

RESUMO

NEVES JUNIOR, Augusto César Vieira. **Antecipação de Safra, Qualidade Pós-Colheita de Caqui ‘Mikado’ (Diospyros kaki) e Desenvolvimento/Validação de Nova Metodologia para Detecção e Quantificação de Cianamida Hidrogenada em Matriz de Água.** Seropédica: UFRRJ, 2013. 156p. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2013.

O caqui ‘Mikado’ enfrenta grandes dificuldades em sua comercialização pela safra ocorrer em curto período do ano. Visando criar alternativas aos produtores, realizou-se experimento na região serrana do estado do Rio de Janeiro para avaliar a antecipação sucessiva de duas safras, com a utilização de cianamida hidrogenada (CH) e a influência da irrigação nestas antecipações. A CH é atualmente o regulador de crescimento que possui a melhor atuação na quebra de dormência. Contudo, objetivando seu monitoramento no meio ambiente, foi desenvolvido metodologia de detecção e quantificação em águas (de diferentes fontes), que fosse de baixo custo, elevada sensibilidade, processo de fácil implementação e validada pelas regras internacionais. O experimento de antecipação de safra teve como delineamento experimental blocos ao acaso com parcelas perdidas. Foram avaliados 6 tratamentos, em 2 blocos, ao longo de toda a safra (colheitas de 15 em 15 dias), em 2 safras sucessivas, quanto a fenologia e produtividade das árvores, e características físicas e químicas dos frutos. Os dados foram analisados individualmente, safra por safra, e as duas safras foram então comparadas entre si. Verificou-se que, na 2^o safra a CH antecipou em 2 semanas a brotação vegetativa e o aparecimento de flor fechada nas plantas, independente da utilização da irrigação. Contudo a colheita de todos os tratamentos teve início na mesma data. Nas duas safras, os sólidos solúveis totais (SST) e o calibre dos frutos aumentaram com o passar das colheitas, enquanto os taninos condensados (TC) diminuíram. Da 1^a para a 2^a safra a produtividade das árvores e os TC dos frutos aumentaram, já a acidez total titulável e os SST dos frutos diminuíram. A segunda parte do presente trabalho visou desenvolver um novo método para quantificação de CH usando derivatização *in situ* com ácido 2,6-dimetil-4-quinolinocarboxílico éster de N-hidroxisuccinimida, seguido de microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) e análise por HPLC/fluorescência. Foram utilizadas técnicas quimiométricas multivariadas com sucesso, obtendo-se as condições ideais de derivatização direta e extração por DLLME. Parâmetros da derivatização como quantidade de agente derivatizante e de tampão, temperatura, tempo, pH e condições de extração por DLLME, como volume de solvente dispersante e de extração (SE), força iônica (NaCl a conc. m/v), pH e tempo de extração foram otimizados por duas etapas de delineamento: delineamento 2^k fatorial para triagem e delineamento central composto (*central composite design* – CCD) para otimização. As melhores condições para derivatização foram 600µL de agente derivatizante, temperatura de 4°C e pH 8,5, enquanto que para a extração foram 800µL de SE, 30% de NaCl conc. m/v, e pH 3,8. A preformance analítica do método para análises rotineiras demonstrou excelente linearidade a partir de 10 a 200µg.L⁻¹ com fator de correlação de 0,9996. A precisão variou para os ensaios intradia e interdia em 3,5 a 5,5% e de 8,5 a 8,6. Recuperações médias realizadas em água de diferentes origens variou de 90,2% a 110,2%.

Palavras chave: fitorregulador, safras sucessivas, qualidade pós-colheita, detecção e quantificação.

ABSTRACT

NEVES JUNIOR, Augusto César Vieira. **Advancement Harvest, Postharvest Quality of Persimmon 'Mikado' (*Diospyros kaki*) and Development/Validation of New Methodology for Detection and Quantification of Hydrogen Cyanamide on Water Matrix.** Seropédica: UFRRJ, 2013. 156p. Thesis (Doctor in Plant Science). Institute of Agronomy, Crop Science Department, Federal Rural University of Rio de Janeiro. Seropédica, 2013.

'Mikado' Persimmon faces marketing problems because the harvest occurs in a short period of the year. It was performed an experiment with the use of hydrogen cyanamide (HC) and the influence of irrigation to evaluate if it is possible to anticipate the harvest in order to create alternatives for producers. The CH is currently the growth regulator that has the best performance to break the dormancy. However, in order to monitor the environment, it was developed one methodology for detection and quantification CH in water (from different sources), with low cost, high sensitivity, easy implement process and validated by international rules. The experiment of break dormancy of persimmon crop had the experimental randomized block design with lost parcels. There were evaluated six treatments in two blocks throughout the crop (harvested at each 15 days) in 2 successive years, the productivity of the trees (PT), and physical and chemical characteristics of the fruits. Data were analyzed individually in two different harvests and then the two harvests were compared. It was found that in the 2nd harvest the CH anticipated in 2 weeks the sprouting and the vegetative development of the flower closed from plants, regardless of the use of irrigation. However, the harvesting was in the same date for all treatments. In two seasons, the total soluble solids (TSS) and the size of the fruit increased over the crops, while condensed tannins (CT) decreased. From the first to the second harvesting, the PT and the CT of fruits increased, while the total titratable acidity and TSS of fruits decreased. The second part of this study aimed to develop a new CH quantification method using *in situ* derivatization with 2,6-dimethyl-4-quinolinecarboxylic acid N-hydroxysuccinimide ester, followed by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and HPLC analysis / fluorescence. Multivariate chemometric techniques were successfully used to obtain the optimum conditions for direct derivatization and DLLME extraction. Derivatization parameters and DLLME extraction conditions were optimized by a two steps design, 2^k factorial design for screening and central composite design (CCD) design for optimization. Best derivatization conditions were addition of 600µL of derivatizing reagent, a temperature of 4°C and pH 8.5, whereas for optimum extraction 800µL of solvent, 30% NaCl conc. w/v and pH 3.8 were chosen. The analytical performance of the method for routine analysis demonstrated excellent linearity from 10 to 200µg.L⁻¹ with a correlation factor of 0.9996. Precision ranged from 3.5 to 5.5% and 8.5 to 8.6% for intraday and interday assays. The mean recoveries performed on water from different origins ranged from 90.2 to 110.2%.

Key words: phyto regulator, successive harvestings, postharvest quality, detection and quantification.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Tratamentos do experimento de antecipação de safra de caquizeiro ‘Mikado’ com uso de fitorregulador (cianamida hidrogenada).....015
- Tabela 2. Médias dos blocos para o calibre dos frutos (em milímetros) das plantas submetidas aos diferentes tratamentos, em diferentes colheitas ao longo da safra 2010-2011 (1ª safra).....026
- Tabela 3. Médias dos blocos e das colheitas para percentuais de frutos injuriados das plantas submetidas aos diferentes tratamentos, na safra 2010-2011 (1ª safra).....028
- Tabela 4. Médias dos blocos para a acidez total titulável dos frutos (g de ácido málico.100g⁻¹ de amostra) das plantas submetidas aos diferentes tratamentos, em diferentes colheitas ao longo da safra 2010-2011 (1ª safra).....031
- Tabela 5. Médias dos blocos para os sólidos solúveis totais dos frutos (°Brix) das plantas submetidas aos diferentes tratamentos nas colheitas ao longo da safra 2010-2011 (1ª safra).....034
- Tabela 6. Médias dos blocos para os taninos condensados (mg.100g⁻¹) dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos nas colheitas ao longo da safra 2010-2011 (1ª safra).....038
- Tabela 7. Tempo (em semanas) entre as médias dos blocos para o início do aparecimento da brotação vegetativa e o surgimento de flor fechada e aberta, nas plantas submetidas aos diferentes tratamentos, na safra 2011-2012 (2ª safra).....045
- Tabela 8. Semanas após a aplicação dos tratamentos em que ocorreram o abortamento de flores fechadas e abertas e o aparecimento de frutos tipo “chumbinho” e em desenvolvimento, na safra 2011-2012 (2ª safra).....051
- Tabela 9. Tempo (em semanas) entre as médias dos blocos para o início do aparecimento da brotação vegetativa, até o surgimento dos frutos tipo “chumbinho” e os em desenvolvimento, o período de tempo entre o aparecimento das flores abertas, até o surgimento dos frutos tipo “chumbinho” e os em desenvolvimento e o intervalo de tempo entre o surgimento dos frutos tipo “chumbinho” e dos frutos em desenvolvimento, na safra 2011-2012 (2ª safra).....055
- Tabela 10. Tempo (em semanas) entre as médias dos blocos para o início do aparecimento da brotação vegetativa, flor fechada, flor aberta, fruto tipo “chumbinho” e fruto em desenvolvimento até o início da colheita (31ª semana após a aplicação dos tratamentos), na safra 2011-2012 (2ª safra).....060
- Tabela 11. Médias dos blocos para o calibre dos frutos (em milímetros) das plantas submetidas aos diferentes tratamentos nas colheitas ao longo da safra 2011-2012 (2ª safra).....067
- Tabela 12. Médias dos blocos e das colheitas para percentuais de frutos injuriados das plantas submetidas aos diferentes tratamentos na safra 2011-2012 (2ª safra)....068
- Tabela 13. Médias dos blocos para os sólidos solúveis (°Brix) dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos nas colheitas ao longo da safra 2011-2012 (2ª safra).....072
- Tabela 14. Médias dos blocos para os taninos condensados (mg.100g⁻¹) dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos nas colheitas ao longo da safra 2011-2012 (2ª safra).....075
- Tabela 15. Classificação de frutos de caqui ‘Mikado’, levando-se em conta o comprimento e a massa que os frutos terão, com cálculos feitos a partir dos dados das correlações

obtidas nas Figuras 40 e 41. Tabela adaptada a partir da classificação obtida no site oficial da Federação da Agricultura do Estado do Paraná (FAEP – 2013). 090

Tabela 16. Médias dos tratamentos, blocos e colheitas para os percentuais de frutos injuriados nas diferentes safras (1 ^a e 2 ^a safras).....	091
Tabela 17. Fatores, códigos, níveis baixo e alto, do delineamento fatorial 2 ⁵ para procedimentos de derivatização e extração.....	122
Tabela 18. Fatores, códigos, níveis baixo e alto, do delineamento de matriz CCD para os procedimentos da derivatização e da extração.....	123
Tabela 19. Parâmetros de calibração, desvios-padrões e incertezas calculados de acordo com Miller & Miller (2005). As normas foram elaboradas nas mesmas condições aplicáveis às amostras. Cada teste foi realizado em pelo menos cinco experimentos independentes.....	140
Tabela 20. Resultados das análises para avaliar a precisão e a repetibilidade do método proposto para a cianamida hidrogenada em matriz de água (n=9 para ensaios intradia e n=9 para ensaios interdia).....	141
Tabela 21. Valores das concentrações experimentais e de suas respectivas recuperações médias para cada tipo de amostra (n≥3).....	142

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema da disposição das plantas do experimento no tratamento e no bloco. 016
- Figura 2. Orvalho sobre os ramos das plantas de caqui.....017
- Figura 3. Aplicação da calda (A), EPI utilizado obrigatoriamente por todos que participaram da aplicação (B) e ponto de escoamento da calda após a aplicação (C).....017
- Figura 4. Esquema dos galhos de uma planta de caqui com as respectivas datas de safras que cada ramo se originou (A) e vista superior do posicionamento dos ramos na copa da árvore da parcela principal segundo o quadrante onde estes se encontravam (B).019
- Figura 5. Estruturas vegetais analisadas durante as avaliações fenológicas: gema vegetativa não brotada (A); gema vegetativa brotada (B); flor fechada (C); flor aberta (D); fruto tipo “chumbinho” (E); fruto em desenvolvimento (F).....020
- Figura 6. Injúrias avaliadas nos frutos: abrasão (A); estria (B); queimadura de sol (C); deformidade (D); perfuração (E); podridão (F); mancha (G); perda de cálice (H); e perda de firmeza (I).....022
- Figura 7. Médias dos tratamentos para o calibre dos frutos das plantas nas colheitas ao longo da safra 2010-2011 (1ª safra) em relação aos diferentes blocos.....025
- Figura 8. Médias das colheitas para o calibre dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação aos blocos (1ª safra).....027
- Figura 9. Médias das colheitas para a acidez total titulável dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação aos blocos (1ª safra).....030
- Figura 10. Médias dos tratamentos para a acidez total titulável dos frutos nas colheitas ao longo da safra 2010-2011 (1ª safra), em relação aos blocos.....032
- Figura 11. Médias das colheitas para os sólidos solúveis totais dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação aos blocos (1ª safra).....033
- Figura 12. Médias dos tratamentos para os sólidos solúveis totais dos frutos nas colheitas ao longo da safra 2010-2011 (1ª safra), em relação aos blocos.....035
- Figura 13. Médias das colheitas para os taninos condensados dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação aos blocos (1ª safra).....037
- Figura 14. Plantas de caqui ‘Mikado’ do bloco B2. À direita, plantas tratadas com cianamida hidrogenada e irrigação (tratamento T2), à esquerda (frente), plantas tratadas apenas com irrigação (tratamento T4).....040
- Figura 15. Médias dos blocos para o início do aparecimento da brotação vegetativa até a brotação vegetativa máxima dos ramos avaliados das plantas submetidas aos diferentes tratamentos, em relação às semanas após a aplicação destes.....040
- Figura 16. Médias dos blocos para a intensidade do aparecimento das brotações vegetativas nos ramos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos até a brotação máxima, em relação ao tempo (semanas) após a aplicação destes.....042
- Figura 17. Médias dos blocos para o período de aparecimento e de abortamento de flores abertas e fechadas, nos ramos avaliados, das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação ao tempo (semanas) após aplicação destes.....044
- Figura 18. Médias dos blocos para a intensidade do aparecimento de flores fechadas nos ramos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos até ao aparecimento máximo destas, em relação ao tempo (semanas) após a aplicação dos tratamentos.....047

Figura 19. Médias dos blocos para a intensidade do abortamento das flores fechadas nos ramos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos, em relação ao tempo (semanas) após a aplicação destes.....	049
Figura 20. Médias dos blocos para a intensidade dos abortamentos das flores abertas nos ramos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos, em relação ao tempo (semanas) após a aplicação destes.....	050
Figura 21. Médias dos blocos para o período de frutificação e abortamentos, nos ramos avaliados, das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação ao tempo (semanas) após a aplicação destes.....	053
Figura 22. Médias dos blocos para a intensidade do aparecimento de frutos tipo “chumbinho” nos ramos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos até ao aparecimento máximo destes, em relação ao tempo (semanas) após a aplicação dos tratamentos.....	058
Figura 23. Médias dos blocos para a intensidade do aparecimento de frutos em desenvolvimento nos ramos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos até o início da colheita, em relação ao tempo (semanas) após a aplicação dos tratamentos.....	059
Figura 24. Correlação entre a percentagem de abortamento total e o número de flores fechadas surgidas no ramo.....	062
Figura 25. Médias dos tratamentos e das colheitas para o calibre dos frutos das plantas com as copas desenvolvidas (bloco B1) e das com as copas em desenvolvimento (bloco B2), na safra 2011-2012 (2ª safra).....	064
Figura 26. Médias das colheitas para o calibre dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação aos blocos (2ª safra).....	065
Figura 27. Médias dos tratamentos para o calibre dos frutos das plantas nas colheitas ao longo da safra 2011-2012 (2ª safra) em relação aos diferentes blocos.....	066
Figura 28. Médias dos tratamentos e das colheitas para a acidez total titulável dos frutos em relação aos blocos na safra 2011-2012 (2ª safra).....	069
Figura 29. Médias das colheitas para os sólidos solúveis totais dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação aos blocos (2ª safra).....	070
Figura 30. Médias dos tratamentos para os sólidos solúveis totais dos frutos das plantas nas colheitas ao longo da safra 2011-2012 (2ª safra) em relação aos diferentes blocos.....	073
Figura 31. Médias das colheitas para os taninos condensados dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação aos blocos (2ª safra).....	074
Figura 32. Médias dos tratamentos para os taninos condensados dos frutos durante as colheitas da safra 2011-2012 (2ª safra) em relação aos diferentes blocos.....	076
Figura 33. Ruptura do galho devido ao enfraquecimento decorrente da morte parcial do interior deste e ao excesso de frutos: necrose parcial do galho (A); local onde o galho rompeu (B); perda de frutos e da arquitetura da planta.....	078
Figura 34. Médias dos tratamentos, blocos e safras para a produtividade do caquizeiro (Kg.ha ⁻¹) em relação às colheitas.....	080
Figura 35. Médias dos tratamentos, blocos e safras para o percentual de perdas de frutos no campo em relação às colheitas.....	081
Figura 36. Médias das safras, colheitas e blocos para o percentual de perdas de frutos no campo em relação aos tratamentos aplicados nas plantas.....	082

Figura 37. Médias dos tratamentos e colheitas para o calibre dos frutos das plantas com a copa totalmente desenvolvida (bloco B1) e das com a copa em desenvolvimento (bloco B2) nas diferentes safras (1ª e 2ª safras).....	083
Figura 38. Médias dos blocos e colheitas para o calibre dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação às safras (1ª e 2ª safras).....	084
Figura 39. Médias das safras e colheitas para o calibre dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação aos blocos.....	085
Figura 40. Médias dos tratamentos e blocos para o calibre dos frutos nas colheitas ao longo das duas safras.....	086
Figura 41. Correlação entre o calibre e o comprimento dos frutos colhidos ao longo das duas safras.....	088
Figura 42. Correlação entre o calibre e a massa dos frutos colhidos ao longo das duas safras.....	089
Figura 43. Injúria do tipo abrasão causada pelo atrito com o galho da árvore.....	092
Figura 44. Médias dos tratamentos, blocos e colheitas para a acidez total titulável dos frutos em relação às safras de 2010-2011 e 2011-2012 (1ª e 2ª safras).....	094
Figura 45. Médias dos tratamentos e colheitas para os sólidos solúveis totais dos frutos nos blocos, em relação às safras de 2010-2011 e 2011-2012 (1ª e 2ª safras).....	096
Figura 46. Médias dos blocos e colheitas para os sólidos solúveis totais dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação às safras de 2010-2011 e 2011-2012 (1ª e 2ª safras).....	097
Figura 47. Médias das colheitas e safras para os sólidos solúveis totais dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação aos blocos.....	098
Figura 48. Médias dos tratamentos e blocos para os sólidos solúveis totais dos frutos, nas diferentes colheitas ao longo das duas safras (2010-2011 e 2011-2012).....	099
Figura 49. Médias dos tratamentos e safras para os sólidos solúveis totais dos frutos, nas colheitas em relação aos blocos.....	100
Figura 50. Médias dos tratamentos, blocos e colheitas para os taninos condensados dos frutos em relação às duas safras (2010-2011 e 2011-2012).....	101
Figura 51. Médias dos blocos e colheitas para os taninos condensados dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação às duas safras (2010-2011 e 2011-2012).....	103
Figura 52. Médias das safras e colheitas para os taninos condensados dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação aos blocos.....	104
Figura 53. Médias dos tratamentos e blocos para os taninos condensados dos frutos, nas diferentes colheitas ao longo das duas safras (2010-2011 e 2011-2012).....	105
Figura 54. Médias dos tratamentos e safras para os taninos condensados dos frutos, nas diferentes colheitas em relação aos blocos.....	106
Figura 55. Esquema da rota do NADPH e glutatona em células contra a alta concentração de peróxido de hidrogénio, devido a inibição da catalase (A); reações oxidativas da rota de pentose fosfatada (B), tendo como produto a ribose 5-fosfato que é precursora de nucleotídeos, coenzimas, DNA e RNA (C); e do papel do NADPH na regulação da divisão da glicose 6-fosfato entre a glicólise e a via das pentoses fosfatadas (D). Adaptado de Lehninger et al., 2004.....	112
Figura 56. Esquema do método de microextração líquido-líquido dispersiva (dispersive liquid-liquid microextraction – DLLME).....	117

Figura 57. Esquema da molécula da cianamida hidrogenada, composta por um grupo ciano (A) e um grupo amina (B).....	120
Figura 58. Esquema da distribuição dos resíduos de y da curva de regressão linear (Miller & Miller, 2005).Onde x_1 é o valor de x em 1, y_1 é o valor de y em 1 e \hat{y}_1 é o valor de y na reta em x_1 , assim por diante.....	125
Figura 59. Intensidade de fluorescência em relação ao comprimento de onda do derivatizado da cianamida hidrogenada.....	127
Figura 60. Efeito de diferentes solventes de extração na área do pico cromatográfico da cianamida hidrogenada.....	128
Figura 61. Gráfico de <i>Pareto</i> com a magnitude dos efeitos principais da derivatização, o eixo vertical mostra o valor t dos efeitos absolutos.....	129
Figura 62. Superfície de resposta estimada pelo delineamento de composto central em relação ao efeito combinado do pH e da temperatura na área do pico do derivatizado de cianamida hidrogenada, sendo o volume do agente derivatizante fixado em 600 μ L.....	131
Figura 63. Superfície de resposta estimada pelo delineamento de composto central em relação ao efeito combinado do volume de derivatizante e da temperatura na área do pico do derivatizado de cianamida hidrogenada, sendo o pH fixado em 8,5.....	132
Figura 64. Gráfico de <i>Pareto</i> com a magnitude dos efeitos principais da extração, o eixo vertical mostra o valor t dos efeitos absolutos.....	134
Figura 65. Superfície de resposta estimada pelo delineamento de composto central em relação ao efeito combinado do volume de solvente de extração e do pH na área do pico do derivatizado de cianamida hidrogenada, sendo a força iônica fixada em 30 % NaCl (conc. m/v).....	136
Figura 66. Superfície de resposta estimada pelo delineamento de composto central em relação ao efeito combinado do pH e da força iônica (conc. m/v) na área do pico do derivatizado de cianamida hidrogenada, sendo o volume de solvente de extração fixado em 800 μ L.....	137
Figura 67. Cromatogramas da otimização da derivatização e extração da cianamida hidrogenada, em matriz de água, para a concentração padrão de 1.000 μ g.L ⁻¹ . Onde: A: após os experimentos preliminares; B: após a otimização da derivatização; C: nas condições ótimas de derivatização e extração; Cyanamide peak: pico do derivatizado da cianamida hidrogenada (DMQC-cianamida).....	138
Figura 68. Cromatogramas de amostras de água do rio Douro após a extração nas melhores condições. Onde: A: amostra não enriquecida; B: amostra enriquecida com 20 μ g.L ⁻¹ de cianamida hidrogenada; C: amostra enriquecida com 200 μ g.L ⁻¹ de cianamida hidrogenada; Cya: pico do derivatizado da cianamida hidrogenada (DMQC-cianamida); IS: padrão interno de metilamina a 10 μ g.L ⁻¹ de concentração (DMQC-metilamina).....	143

LISTA DE SÍMBOLOS

A

ADAPAR	Agência de defesa agropecuária do Paraná
ANOVA	Análise de variância
ATT	Acidez total titulável

C

CAPES	Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior
CCD	Central composite design (delineamento central composto)
CH	Cianamida hidrogenada
CT	Condensed tannin

D

DLLME	Dispersive liquid-liquid microextraction (microextração líquido-líquido dispersiva)
DMQUC-OSu	2,6-Dimethyl-4-quinolinecarboxylic acid N-hydroxysuccinimide ester
DPR	Department of Pesticide Regulation

E

Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPI	Equipamento de proteção individual

F

FAEP	Federação da Agricultura do Estado do Paraná
FDA	Food and Drug Administration

G

GSH	Glutathione (Glutathiona reduzida)
GSSG	Glutathiona oxidada
G6PD	Glucose 6-fosfato desidrogenase

H

HPLC	High-performance liquid chromatography
-------------	--

I

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICH	International Conference on Harmonisation
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial
IR	Irrigação

L

LLE	Liquid-liquid extraction (extração líquido-líquido)
LOD	Limit of detection (limite de detecção)
LOQ	Limit of quantification (limite de quantificação)
LPME	Liquid-phase microextraction (microextração de fase líquida)

LR	Linear rage (faixa linear)
LSD	Least significant difference (teste de Fisher)
M	
MDPF	2-Methoxy-2,4-difhenyl-3(2H)-furanone
N	
NaCl	Cloreto de sódio
NHF	Número de horas de frio
NQS	1,2-Naphtoquinone-4-sulfonic acid
P	
PDSE	Programa institucional de bolsas de doutorado sanduíche no exterior
S	
SDME	Single-drop microextraction (microextração de única gota)
SST	Sólidos solúveis totais
T	
TC	Taninos condensados
TSS	Total soluble solids
U	
UF	Unidades de frio

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	001
O Caquizeiro no Brasil e no Mundo.....	001
O Caquizeiro e suas Características.....	002
O Caquizeiro e sua Fenologia.....	002
O Caquizeiro e a Quebra da Dormência.....	003
O Caquizeiro e a Pós-Colheita dos Frutos.....	005
Experimento.....	006
1. CAPÍTULO I – Antecipação de safra de caquizeiro da cultivar ‘Mikado’ e qualidade pós-colheita dos frutos.....	007
1.1. Introdução.....	008
1.2. Revisão de Literatura.....	009
1.2.1. Características Culturais.....	009
1.2.2. Dormência e sua Quebra Artificial pelo uso da Cianamida Hidrogenada.....	010
1.2.3. Cianamida Hidrogenada, seus Riscos e Cuidados.....	011
1.2.4. Produção e Produtividade.....	012
1.2.5. Irrigação.....	012
1.2.6. Pós-Colheita.....	012
1.3. Material e Métodos.....	014
1.3.1. Aplicação dos Tratamentos.....	016
1.3.1.1. Safra 2010-2011 (1ª Safra).....	017
1.3.1.2. Safra 2011-2012 (2ª Safra).....	018
1.3.2. Avaliação Fenológica.....	018
1.3.3. Colheita e Produtividade.....	020
1.3.3.1. Safra 2010-2011 (1ª Safra).....	021
1.3.3.2. Safra 2011-2012 (2ª Safra).....	021
1.3.4. Avaliação e Caracterização dos Frutos.....	021
1.3.5. Avaliação Química dos Frutos.....	023
1.4. Resultados e Discussão.....	024
1.4.1. Safra 2010-2011 (1ª Safra).....	024
1.4.1.1. Caracterização dos Frutos.....	024
1.4.1.2. Caracterização Química dos Frutos.....	029
1.4.2. Safra 2011-2012 (2ª Safra).....	038
1.4.2.1. Fenologia.....	039
1.4.2.1.1. Brotação Vegetativa.....	039
1.4.2.1.2. Floração.....	043
1.4.2.1.3. Frutificação.....	051
1.4.2.2. Caracterização dos Frutos.....	063
1.4.2.3. Caracterização Química dos Frutos.....	068
1.4.3. Comparação e Avaliação das Safras 2010-2011 e 2011-2012 (1ª e 2ª Safras).....	076
1.4.3.1. Fatores de Produção da Cultura do Caqui ‘Mikado’.....	077
1.4.3.2. Produção e Produtividade.....	079
1.4.3.3. Caracterização dos Frutos.....	083
1.4.3.4. Caracterização Química dos Frutos.....	093
1.5. Conclusões.....	107

2. CAPÍTULO II – Metodologia de detecção e quantificação de cianamida hidrogenada.....	108
2.1. Introdução.....	109
2.2. Revisão de Literatura.....	109
2.2.1. Cianamida Hidrogenada e sua Ação.....	110
2.2.2. Meio Ambiente e o Homem.....	114
2.2.3. Detecção e Quantificação.....	115
2.3. Material e Métodos.....	118
2.3.1. Reagentes.....	118
2.3.2. Equipamentos.....	119
2.3.3. Seleção do Reagente Derivatizante.....	119
2.3.4. Seleção do Comprimento de Onda de Excitação e de Emissão.....	120
2.3.5. Extração por DLLME.....	121
2.3.6. Derivatização e Procedimentos de Extração.....	121
2.3.7. Delineamento Experimental.....	122
2.3.8. Preparação de Amostras.....	123
2.3.9. Validação do Método.....	124
2.4. Resultados e Discussão.....	126
2.4.1. Seleção do Reagente Derivatizante.....	126
2.4.2. Seleção do Comprimento de Onda de Excitação e de Emissão.....	127
2.4.3. Seleção do Solvente de Extração.....	127
2.4.4. Otimização das Condições de Derivatização.....	128
2.4.5. Otimização das Condições de Extração.....	133
2.4.6. Desempenho Analítico e Validação do Método.....	139
2.4.6.1. Desempenho em Amostras de Água de Diferentes Origens.....	141
2.5. Conclusões.....	144
3. CONCLUSÕES GERAIS.....	145
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	147
ANEXO A – Delineamento central composto (<i>central composite design</i> – CCD) para a derivatização e extração, com as variáveis de níveis independentes e os respectivos resultados experimentais das áreas de pico do derivatizado (DMQC-cianamida).....	156

INTRODUÇÃO GERAL

O Caquizeiro no Brasil e no Mundo

O caquizeiro (*Diospyros kaki*) é uma espécie de origem subtropical altamente produtiva e rústica. Seu cultivo iniciou na China, bem como no Japão e na Coreia, no final do século VII, sendo que sua introdução nos países com condições climáticas e edafológicas similares a dos seus países de origem é relativamente recente. Nos Estados Unidos apareceu no ano de 1828 e de lá foi levado para Itália, França e Espanha (Ragazzini, 1985). No Brasil, há evidências de que o caquizeiro entrou pela primeira vez através de São Paulo, por volta de 1890 e atualmente é cultivado principalmente nas Regiões Sudeste e Sul do país (Martins & Pereira, 1989).

O Brasil, apesar de ser o terceiro maior produtor mundial de frutas frescas, tem uma inserção inexpressiva no mercado internacional, em que pese a enorme potencialidade do país, em especial nos mercados de frutas frescas tropicais. As estimativas otimistas de alguns especialistas do setor sugerem ser possível atingir em poucos anos patamares de exportação anuais da ordem de US\$ 2 bilhões com frutas frescas, sem incluir os mercados de sucos e de polpas de frutas. O país participa com menos de 0,5% das exportações mundiais de frutas, destacando-se principalmente nas vendas de produtos tropicais (Lacerda et al., 2004).

De acordo com dados obtidos no site oficial do IBGE (2013), no período de 2007 para 2011, a produção de frutos de caqui no Brasil diminuiu de 159.851 para 154.625 toneladas, assim como a produtividade, que caiu de 19.820,33 para 17.717,88Kg.ha⁻¹. Já o valor da produção e a área plantada aumentou, respectivamente, de 127.588 para 166.664 mil reais e 8.082 para 8.349ha.

Os quatro principais estados produtores de caqui continuaram os mesmos e com o mesmo grau de importância, onde em 2011 São Paulo foi o responsável pela produção de 47,99%, seguido pelo Rio Grande do Sul (21,86%), Paraná (10,43%) e Rio de Janeiro (9,69%). Em 2007 o Rio de Janeiro foi o primeiro em produtividade, 29.537,27Kg.ha⁻¹, entretanto, em 2011, sua produtividade caiu para 21.408,00Kg.ha⁻¹, inferior à produtividade de São Paulo (22.824Kg.ha⁻¹) no mesmo ano (IBGE, 2013).

Conforme informações obtidas no site oficial do município de Sumidouro em 2013, este está localizado na região serrana fluminense, possuindo quatro distritos: Centro; Campinas; Dona Mariana e Soledade. Apresentando relevo montanhoso e clima tropical de altitude, estando a 355 metros de altitude. Segundo o IBGE (2013), de 2004 até 2011, o município de Sumidouro aumentou sua produção de 4.428 toneladas para 5.180 toneladas de frutos de caqui, enquanto que a produtividade aumentou de 27.000,00 Kg.ha⁻¹ para 28.000,00Kg.ha⁻¹.

O caquizeiro se destaca, no município de Sumidouro, como uma das principais atividades das propriedades rurais, em relação à área plantada, tempo dedicado e remuneração de atividade, sendo a maioria dos produtores de base familiar. As principais cultivares produzidas na região são o 'Rama Forte' e o 'Mikado' (Neves Junior et al., 2006). Os produtores possuem pouco controle da produção, além de baixa capacidade tecnológica na pós-colheita. Praticamente todos utilizam caixa K de madeira para embalar os frutos, onde estes em sua maioria são comercializados *in natura* para centrais de abastecimento e transportados em caminhões lonados, sendo apenas 15% dos frutos comercializados transportados em caminhão tipo baú (Neves Junior et al., 2007).

O Caquizeiro e suas Características

A maturação natural do fruto de caqui ocorre de fevereiro a maio, dependendo da cultivar, e neste período ocorre grande oferta no mercado, levando os produtores a venderem o fruto por preços pouco rentáveis (Brackmann et al., 1997). Normalmente, segundo Gonzalez et al. (2005), fora da época da colheita os preços aumentam, atingindo em alguns casos incrementos de até 300%. Contudo, um dos pontos de estrangulamento da cadeia produtiva é a dificuldade de manter a qualidade dos frutos até o período após a safra, quando os valores dos frutos aumentam, ou produzir esses frutos antes da safra normal. Além disso, o caqui enfrenta a concorrência com frutas mais tradicionais tais como laranja, banana e maçã (Muñoz, 2002).

Segundo Corsato (2004), apesar do seu crescimento lento, o caquizeiro atinge portes que variam de três a quinze metros, levando de sete a oito anos para atingir a maturidade. Entra em produção comercial a partir do terceiro ano, daí para frente a frutificação cresce progressivamente até os 15 anos, quando se estabiliza.

Existem inúmeras cultivares no mundo, e hoje em dia há também uma série de híbridos. Para maiores facilidades de estudo, as variedades são reunidas em três grupos, Sibugaki, Amagaki e Variável. Onde: (1) O grupo Sibugaki é constituído de variedades cujas polpas dos frutos sempre se apresentam taninosas e de cor amarela, com o fruto contendo ou não sementes, tendo como principais cultivares: 'Taubaté', 'Pomelo', 'Rubi', 'Mikado', 'Regina', 'Mazelli', 'Hachiya', 'IAC-5', 'Costa' e outras; (2) O grupo Amagaki é constituído de variedades cujas polpas dos frutos não apresentam-se taninosas, contendo ou não sementes, e são de cor amarela, também chamadas de variedades de frutos doces ou duros, tendo como principais cultivares: 'Fuyu', 'Fuyuhana', 'Jiro', 'Fuyugaki' e outras; (3) E o grupo Variável, como o próprio nome indica, reúne as variedades cujos frutos alteram sua composição e cor quando possuem ou não sementes. Quando sem sementes, a polpa do fruto é amarela e rica em tanino, quando apresentam sementes, a polpa do fruto é de cor escura (chocolate) e sem tanino, tendo como principais cultivares: 'Rama Forte', 'Giombo', 'Luiz-de-Queiroz', 'Chocolate' e outras (Biasi et al., 1998; Simão, 1998).

O Caquizeiro e sua Fenologia

O caquizeiro, por ser uma planta de folhas caducas, durante o ciclo vegetativo deve armazenar reservas de carboidratos suficientes para passar o período de hibernação e para dar início ao ciclo seguinte. Com a quebra da dormência e o início do novo ciclo, essas reservas manterão a planta até que as novas folhas deixem de ser drenos e passem a ser fontes de carboidratos.

A partir do conhecimento dos estádios fenológicos e do entendimento das necessidades dos diferentes órgãos em relação à planta toda, as práticas de manejo podem ser modificadas e programadas buscando-se a melhoria da produção (Corsato, 2004).

Devido à competitividade entre os ramos vegetativos e os frutos é comum que haja alternâncias na produção de uma safra para outra. Quando em uma safra ocorre grande produção não há acúmulo de reserva suficiente nos ramos para garantir um desenvolvimento adequado na parte aérea da próxima safra para mais uma grande produção. A alternância de produção pode ser controlada mediante poda severa de ramos no inverno e desbaste precoce dos frutos em excesso. A adoção dessas práticas nas árvores mais produtivas deverá regularizar a frutificação em todo o pomar, de sorte a tornar possível obter altas produções de frutos de boa qualidade (Ojima, et al., 1985).

Para evitar que a parte reprodutiva da planta drene carboidratos em excesso e comprometa o armazenamento destes para o próximo ciclo, a planta realiza o abortamento natural de flores e frutos. A intensidade e a duração do período de abortamento depende de vários fatores internos e externos, como: a reserva de carboidratos da planta no início do ciclo, a sanidade da planta, ataque de pragas, fertilidade do solo, condições climáticas adversas, entre outras.

O caquizeiro pode ser considerado em alguns casos como planta dióica, apresentando flores masculinas e femininas em plantas diferentes e, em outros, monóica, apresentando flores femininas e masculinas na mesma planta. Essa particularidade com relação à distribuição e ao sexo das flores determina uma subdivisão das plantas em três categorias: 1^a- pistiladas constantes, que produzem somente flores femininas, ano após ano; 2^a- estaminadas constantes, produzem sempre flores pistiladas e algumas poucas estaminadas; 3^a- estaminadas esporádicas, produzem só pistiladas, em alguns anos e pistiladas e estaminadas em outros anos (Martins & Pereira, 1989; Simão, 1998).

Entre os fatores fisiológicos envolvidos com o abortamento natural de frutos de caqui sem sementes destacam-se: a) a elevada competitividade por fotoassimilados entre fruto e ramo, sobretudo quando os frutos se desenvolvem em ramos vegetativos muito vigorosos; b) a carência de uma fonte própria de hormônio de crescimento nos frutos partenocápicos, presente nos frutos com sementes; e c) predominância de temperaturas elevadas durante o verão, no início do desenvolvimento dos frutos (Corsato, 2004).

Após a produção dos frutos, o caquizeiro entra em um período de hibernação. Durante este período as árvores perdem as folhas e o metabolismo da planta é reduzido, contudo não para totalmente. Permitindo que a planta sobreviva a condições adversas como baixas temperaturas e períodos mais secos.

De acordo com Lang (1987) (citado por Carvalho & Alves, 2007), a dormência de gemas pode se estender ao longo do ano passando pelas fases de ecodormência, paradormência e endodormência. Na ecodormência, o desenvolvimento da gema não acontece devido a um fator ambiental desfavorável e um novo fluxo de crescimento ocorre somente quando as condições ideais são reestabelecidas. Na paradormência a ausência de desenvolvimento da gema é resultante da inibição tida como a longa distância por outro órgão ou região do vegetal em crescimento, como as gemas terminais. Na endodormência o não desenvolvimento da gema é resultante de uma série de eventos bioquímicos e fisiológicos que acontecem em níveis meristemáticos ou organelas muito próximas.

Carvalho & Alves (2007) verificaram uma particularidade no caso do caquizeiro. A entrada da endodormência e a elevação de sua intensidade ocorreu no período de crescimento e maturação dos frutos, cuja colheita ocorreu na primeira semana de maio no pomar estudado. O período de endodormência mais profunda em gemas de um ano de caquizeiro 'Fuyu' ocorreu de abril a maio, com um pico de intensidade no início de maio. Nos meses de junho e julho ocorreu o período de dormência menos intensa, correspondendo à saída da endodormência e entrada na ecodormência.

O Caquizeiro e a Quebra da Dormência

A dormência em frutíferas de clima temperado tem sido bastante discutida devido à tendência do homem de cultivar espécies em zonas com condições climáticas limitantes para a adaptação. O frio é o principal agente responsável pela saída da dormência das plantas caducifólias, sendo que estas, quando cultivadas em regiões com insuficiência de frio hibernal, apresentam sintomas de falta de adaptação (Perussi, 2009).

Segundo Martins e Pereira (1989) o caquizeiro é resistente a baixas temperaturas e para quebra do repouso fisiológico requer determinado regime de frio e apresenta acentuado repouso vegetativo. A temperatura mais favorável ao desenvolvimento de fruteiras de clima temperado varia de 5°C a 15°C. Pode-se plantar o caquizeiro em regiões de zero a 150 horas de frio (acúmulo de temperaturas menores do que 7,2°C). De acordo com Ragazzini (1985), na gema existe uma substância β -inibidora do desenvolvimento, que possui atividade e quantidade máxima durante o inverno e diminui gradualmente durante a primavera, com o seu desaparecimento cessa o mecanismo de repouso.

Américo Júnior (2007) preconiza que há duas correntes de pesquisadores que procuram explicar os principais fatores envolvidos no controle da dormência. Para escola francesa, a dormência é considerada como um processo muito complexo para ser controlado por um ou dois fatores. Supõe-se que os fitohormônios tenham importância secundária, sendo a dormência apenas uma etapa de crescimento rítmico, envolvendo muitos sub-processos, entre eles, o metabolismo dos ácidos nucleicos e, o metabolismo e transporte de açúcares. Já a escola americana defende uma hipótese mais simples, baseando-se na suposição de que a dormência seria controlada por poucos fatores, em que o frio removeria os inibidores, estimulando os promotores de crescimento, levando à retomada do crescimento. Porém, ambas escolas admitem que a temperatura é o principal fator exógeno envolvido para entrada e superação da dormência, que possibilita, posteriormente, a brotação e florescimento na primavera.

Quando as plantas caducifólias são cultivadas em regiões com insuficiências de frio hibernal, apresentam sintomas de falta de adaptação como atraso e maior duração do período de floração e abertura de menor número de gemas floríferas e vegetativas, resultando em redução na produção, com frutos desuniformes e de baixa qualidade (Marodin et al., 2002). Os produtos utilizados para a quebra de dormência como o óleo mineral, cálcio-cianamida (CaCN_2), nitrato de potássio (KNO_3), cianamida hidrogenada (H_2CN_2) e paclobutrazol, podem uniformizar e antecipar a brotação e a floração em determinadas condições (Razzouk, 2007).

Pesquisas realizadas demonstram que, dentre os produtos disponíveis no mercado, a cianamida hidrogenada é o mais eficiente produto químico para a quebra de dormência (Mizobutsi et al., 2003), sendo também o mais utilizado atualmente na superação artificial da dormência (Coletti, 2009). Tem-se constatado que os efeitos da cianamida na frutificação, na maturação e na qualidade dos frutos são variados. Pode provocar avanço da maturação acompanhado de redução da frutificação, incremento da produção, aumento da massa, do tamanho e do conteúdo de açúcares dos frutos, redução na acidez ou nenhum efeito nem nos açúcares nem na acidez (Silva et al., 2005). De acordo com Mizobutisi et al. (1997), o efeito da cianamida hidrogenada varia em função de vários fatores, como concentração, época, modo de aplicação, cultivar e condições climáticas.

Por se tratar de um produto tóxico, deve-se tomar todas as precauções no manuseio da cianamida hidrogenada. Segundo o Department of Pesticide Regulation (1993) da Califórnia, este produto em ratos, administrada por via oral, causa hepatotoxicidade e toxicidade da tireoide. Não é oncogênica, mas a exposição crônica causa toxicidade na tireoide, onde o nível sem efeitos observado para esta toxicidade, em ratos, é de 1mg/Kg.dia^{-1} . Por conta disso torna-se importante haver um método de detecção e quantificação de cianamida hidrogenada que seja de fácil execução e baixo custo para realizar monitoramentos sempre que necessário dos mananciais hídricos das regiões que utilizem este produto.

De acordo com a Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR, 2013), no Brasil a cianamida hidrogenada está registrada apenas para as culturas de maçã, pêssego e

uva. Esta, por ser muito reativa não deve ser aplicada com nenhum outro produto, exceto óleo mineral emulsionável, ou espalhante, quando especificamente recomendados. O tempo frio continuado ou uma seca prolongada, mesmo com a aplicação da cianamida hidrogenada, pode retardar a brotação. E a chuva nas primeiras horas após o tratamento tende a remover o produto antes da absorção, sendo necessário reaplicá-lo. Apesar deste produto não possuir registro para a cultura do caqui, este já é utilizado em algumas regiões para a quebra artificial da dormência.

É importante a aplicação de uma irrigação racional, na cultura do caqui, com aplicações de volumes pequenos de água de forma que as plantas não sofram estresse, nem por déficit e nem por excesso de água. Um grau adequado de umidade no solo modera a queda de frutos e reduz sobretudo a aparições de rachaduras, sede de posterior instalação de micélios fúngicos (*Penicillium*, *Macrosporium*, *Botrys*, etc.), o que causa depreciação comercial do fruto (Edagi & Kluge, 2009). Isso ocorre devido a um aumento rápido no conteúdo de água a nível celular, é característica de estação de crescimento seca, com um excesso de umidade no período que antecede a maturação (Ragazzini, 1985).

O Caquizeiro e a Pós-Colheita dos Frutos

Em pesquisas realizadas no Brasil, no campo fitotécnico, preocupava-se basicamente as respostas imediatas oferecidas mediante a aplicação de determinadas práticas culturais. Os resultados eram expressos principalmente em termos de produtividade ou rendimento, devido aos fatores económicos. Contudo, sabe-se que as características de produção devem estar intimamente ligadas aos fatores pós-colheita. Desta forma, o sistema de produção deve ser bem caracterizado e algumas práticas culturais são pesquisadas no intuito de verificar o melhor comportamento do produto na pós-colheita (Chitarra & Chitarra, 2005).

Para atender às exigências de qualidade do mercado consumidor, existe maior demanda de conhecimento a respeito da cultura do caqui, incluindo aspectos relacionados à nutrição, manejo da planta, bem como estudo das causas e medidas preventivas para distúrbios fisiológicos na pré e pós-colheita (Souza et al, 2011).

De acordo com Chitarra & Chitarra (2005) as características externas de qualidade, percebidas pelo tato e pela visão, são importantes na diferenciação do produto, particularmente, na decisão de compra. As características internas percebidas pelo sabor, aroma e tato (sensação de textura), combinadas com a aparência do produto, são importantes na determinação da aceitação deste pelo consumidor. A importância dos atributos da qualidade muda para cada segmento da cadeia produtiva (desde o produtor até o consumidor). Os distribuidores enfatizam a aparência e a textura, enquanto que os consumidores o *flavor* (sabor e aroma) e a textura.

Segundo Guerra & Pereira (2008), no município de Antônio Carlos, em Minas Gerais, o principal argumento dos produtores de caqui para a não formalização de contratos com atacadistas, o que proporcionaria melhores preços, é o fato de que esses exigem uma determinada qualidade das frutas em todas as transações, contudo esta qualidade poderia não ser sempre alcançado pelo produtor. Entretanto, os próprios produtores percebem que esse entrave poderia ser superado com o amparo de uma associação bem estruturada, que poderia auxiliar estes em todas as etapas da cadeia produtiva.

O tempo de armazenamento, respiração, transpiração, composição química, aparência externa, estrutura anatômica, senescência, qualidade sensorial, e outras características do produto pós-colheita parcialmente refletem as condições culturais e ambientais às quais este foi exposto. Uma série de fatores devem ser levados em consideração durante e após a

colheita para se obter frutos de boa qualidade. Por exemplo, a determinação do período em que será realizada. Colheitas após chuvas pesadas devem ser evitadas, devendo ser realizadas nos períodos mais frios do dia, usualmente no período da manhã (Chitarra & Chitarra, 2005). Os frutos devem ser colhidos com cuidado, evitando-se batidas ou lesões, e colocados em caixas ou cestas rasas, para serem transportados para os barracões. Sendo então classificados e embalados ou preparados para sofrerem retirada da adstringência (Martins & Pereira, 1989). A firmeza de polpa é um fator de qualidade em frutos para o consumo *in natura*, pois indica a tolerância do fruto ao transporte e manuseio durante a colheita e comercialização (Souza, 2010). Sendo portanto indispensável para a venda dos frutos de caqui ‘Mikado’, cujos quais são vendidos ainda firmes, diferentes dos frutos da variedade ‘Rama Forte’ por exemplo.

O caquizeiro é uma espécie sensível ao etileno e por esse motivo, a diminuição da produção desse hormônio faz com que se consiga prolongar a vida útil do fruto. O armazenamento refrigerado, associado a técnicas de inibição do etileno, se tornam interessantes no aumento da conservabilidade dos frutos. Aumentando assim o período de comercialização da fruta, o que é interessante por conta do período relativamente curto que se tem de colheita (Souza, 2010).

Experimento

Este trabalho foi desenvolvido através de uma parceria entre a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, a Embrapa Agroindústria de Alimentos, o laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto/Portugal, produtores rurais do distrito de D. Mariana, município de Sumidouro – RJ e com o Programa Institucional de Bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A caracterização da antecipação de safra do caqui ‘Mikado’ é apresentada no Capítulo 1. No Capítulo 2 é apresentado o desenvolvimento de uma metodologia de detecção e quantificação de cianamida hidrogenada em água, do qual o artigo foi publicado na revista *Journal of Chemometrics*, com o título: *Response surface methodology for optimization of cyanamide analysis by in situ derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction*.

Os objetivos do presente trabalho foram:

- a) caracterizar a safra do caqui ‘Mikado’ na região serrana do estado do Rio de Janeiro;
- b) verificar o efeito da aplicação do fitorregulador cianamida hidrogenada e de irrigação na antecipação de safra das plantas da cultivar ‘Mikado’;
- c) avaliar se a antecipação de safra sucessiva prejudica a produtividade das plantas da cultivar ‘Mikado’;
- d) avaliar componentes de qualidade pós-colheita dos frutos de caqui;
- e) desenvolver uma nova metodologia de detecção e quantificação de cianamida hidrogenada em água de diferentes fontes que apresente elevada sensibilidade, baixo consumo de reagentes, processo de fácil implemento e baixo custo;
- f) validação da metodologia desenvolvida de acordo com as orientações dos organismos de regulação internacional (SANCO).

1. CAPÍTULO I

Antecipação de safra de caquizeiro da cultivar 'Mikado' e qualidade pós-colheita dos frutos

Resumo

O caqui 'Mikado' enfrenta grandes dificuldades em sua comercialização, pela safra ocorrer em um curto período e pela competição com outras cultivares de caquizeiro e outras frutas. Visando criar alternativas aos produtores, realizou-se experimento na região serrana do estado do Rio de Janeiro para avaliar a antecipação sucessiva de duas safras, com a utilização de cianamida hidrogenada (CH) e a influência da irrigação neste processo. Para isto, avaliou-se a fenologia e produtividade das árvores, e as características físicas e químicas dos frutos de 6 tratamentos, em 2 blocos, ao longo de toda a safra e em 2 safras sucessivas. Os dados foram analisados individualmente, safra por safra, e as duas safras foram então comparadas entre si. Averigou-se que os, nas duas safras, sólidos solúveis totais (SST) e o calibre dos frutos aumentaram, assim como a porcentagem de perdas no campo no decorrer das colheitas, enquanto que os taninos condensados (TC) diminuíram. Na 2ª safra verificou-se uma antecipação de 2 semanas na brotação vegetativa e na floração das plantas tratadas com CH, independente da utilização ou não da irrigação, enquanto que a frutificação foi adiantada de 0,5 a 1 semana. Da 1ª para a 2ª safra a produtividade das árvores e os TC dos frutos aumentaram já a acidez total titulável, os SST e o calibre (com exceção dos tratamentos com cianamida hidrogenada nas duas safras) diminuíram.

Palavras chave: fenologia; *Diospyros kaki.*; antecipação de safra; cianamida hidrogenada, qualidade de fruto.

Abstract

'Mikado' persimmon faces marketing problems because the harvest occurs in a short period of the year and there are competition with other cultivars of persimmon and other fruits. Aiming to create alternatives to the producers, the experiment took place in the mountainous region of the state of Rio de Janeiro to evaluate the anticipation of two successive harvests with hydrogen cyanamide (HC) and the influence of irrigation in this process. For this, it was evaluated the cycle and productivity of trees, and the chemical and physical characteristics of the fruits of 6 treatments in two blocks throughout the harvest in 2 successive years. Data were analyzed individually, harvest by harvest, and the two harvests were then compared. It was verified that the total soluble solids (TSS) and the caliber of the fruit increased, as did the percentage of field losses during the crop, whereas condensed tannins (CT) decreased, in both harvest. In the 2nd season there was an anticipation of two weeks in the budding and flowering of plants treated with HC, regardless of the use or not of irrigation, while the fruiting was advanced 0.5 to 1 week. From 1st to 2nd harvest the productivity of the trees and the CT in the fruits has increased, while the total acidity, TSS and the caliber in the fruits decreased.

Keywords: phenology; *Diospyros kaki.*; harvest anticipation, hydrogen cyanamide, fruit quality

1.1. Introdução

Apesar do caqui 'Mikado' ser uma cultivar de grande potencial, problemas com a retirada da adstringência e a concorrência com outras variedades de caqui mais conhecidos, como o 'Rama-Forte', dificultam sua comercialização. Os frutos são comercializados enquanto ainda estão firmes e geralmente são gerados por partenocarpia, não possuindo assim sementes. Como a maioria das técnicas aplicadas para a retirada da adstringência interfere na firmeza dos frutos, ocorre grandes perdas antes mesmo destes serem comercializados.

A antecipação de safra desta cultivar, através da quebra antecipada da dormência das gemas, pode vir a diminuir os problemas com o curto período de safra. Uma vez que os frutos poderão ser oferecidos em um período diferente da safra normal, obtendo melhores preços de venda, compensando assim possíveis perdas, devido as atuais técnicas de retirada de adstringência, e diminuindo a concorrência com outras cultivares.

A utilização da cianamida hidrogenada para a quebra de dormência pode ser uma alternativa economicamente viável e apesar de representar um gasto a mais na produção, abre a possibilidade da venda dos frutos em novos mercados por estes serem colhidos e comercializados fora do pico de produção da safra.

A pesar desta ser registrada apenas para as culturas da maçã, pêssigo e uva, esta vem sendo utilizada de forma irregular por produtores que precisam realizar a quebra da dormência artificial do caqui em regiões de baixo acumulo de horas de frio. É importante, portanto, saber como este produto se comporta em diferentes variedades de caqui e qual sua influencia na produção, produtividade e qualidade dos frutos produzidos.

Mesmo o caquizeiro sendo uma planta rustica, a utilização da irrigação pode ser algo interessante para a cultura. Esta bem aplicada além de poder vir a auxiliar a diminuir problemas nos frutos como o aparecimento de rachaduras, pode também ser útil na antecipação artificial da brotação. Caso o produto para a quebra de dormência seja aplicado durante um período prolongado de seca é provável que este, sem a irrigação, não seja capaz de quebrar artificialmente a dormência das plantas.

Pelo fato deste ser uma planta subtropical, deve-se verificar se essa quebra sucessiva de dormência irá afetar as reservas que a planta acumula em seus galhos para a safra seguinte. Já que a quebra da dormência estará alterando o ciclo fenológico da planta.

Se o caquizeiro sofrer um estresse durante a safra que comprometa o acúmulo de reservas para o próximo ciclo, haverá uma queda da produtividade na safra seguinte, podendo essa queda interferir em mais de uma safra, até que a planta se recupere do estresse.

A qualidade pós-colheita dos frutos é também de fundamental importância para a obtenção e conquista de mercados com melhores preços na venda. Para isso é fundamental que o fruto mantenha sua qualidade, preservando seus componentes nutricionais e características sensoriais.

O objetivo deste trabalho foi verificar se a quebra da dormência no caquizeiro da variedade 'Mikado' (em anos sucessivos) afeta a produtividade das plantas, além de estudar qual a influência da aplicação da cianamida hidrogenada e irrigação (associadas ou não) na qualidade pós-colheita dos frutos e no ciclo fenológico das plantas.

1.2. Revisão de Literatura

1.2.1. Características Culturais

Existem inúmeras variedades de caqui cultivadas no mundo, e hoje em dia há também uma série de híbridos (Simão, 1998). Apenas na Ásia, centro de origem do caqui, existem mais de 2000 cultivares, das quais, a maioria é adstringente (Edagi & Kluge, 2009).

A cultivar Fuyu, por exemplo, é promissora em termos de mercado. A colheita normalmente ocorre num curto período, durante os meses de abril e maio. Entretanto, dois problemas essenciais ainda limitam a harmonização da cadeia produtiva: o abortamento floral e o curto período de conservação da fruta (Porfírio-da-silva, 2008).

Anualmente o caqui forma a partir de uma gema o ramo produtivo da safra, tendo que para isso recorrer inicialmente a reservas (presentes nos ramos e raízes) do ano anterior. Produzindo no mesmo ano agrícola matéria seca, tanto para o crescimento vegetativo, como para o reprodutivo, além de deixar reservas suficientes para o próximo ciclo. Sendo que os frutos são responsáveis por exportar, com uma colheita de 27,7 t.ha⁻¹ de frutos: 25,5Kg.ha⁻¹ de nitrogênio; 5,7 Kg.ha⁻¹ de fósforo; 51,5 Kg.ha⁻¹ de potássio; 6,8 Kg.ha⁻¹ de cálcio; 2,8 Kg.ha⁻¹ de magnésio; e 5,1 Kg.ha⁻¹ de enxofre (Takahashi et al., 2010).

A época de ocorrência da brotação das gemas é importante, uma vez que influencia o período de desenvolvimento do fruto, sendo que seu atraso reduz esse período dificultando a perda natural de adstringência, ao passo que sua antecipação coloca em risco o desenvolvimento das brotações em regiões sujeitas a geadas (Razzouk, 2007). Uma diferença marcante de temperatura entre o dia e a noite durante o verão favorece a diferenciação de um maior número de gemas em flores. As condições ambientais e nutricionais adequadas a atividade vegetativa são favoráveis também a diferenciação de flores femininas (Ragazzini, 1985).

O caqui pode possuir flores unissexuadas dióicas, onde os sexos se encontram separados em indivíduos diferentes, e/ou algumas vezes bissexuadas. As flores masculinas são axilares, unidas em cimeira, com três flores curto-pecioladas ou subsésseis, pequenas, pendulosas, variáveis em dimensões, com 0,8 a 1,8cm de comprimento, apresentando de 14 a 24 estames inseridos aos pares na base da corola e no ovário rudimentar. Já as flores femininas são normalmente solitárias nas axilas dos ramos do ano anterior ou da estação, em desenvolvimento, com 1,5 a 2,5cm de comprimento e 0,5 a 1cm de largura. Enquanto as flores hermafroditas são raras e acham-se associadas às flores masculinas (Martins & Pereira, 1989; Simão, 1998).

Segundo Ragazzini (1985), as plantas de caqui podem apresentar: a) só flores femininas (pistilíferas); b) só flores masculinas (estaminíferas); c) só flores hermafroditas; d) flores masculinas e femininas; e) flores femininas e hermafroditas; f) flores masculinas e hermafroditas; g) flores masculinas, femininas e hermafroditas. Contudo é mais comum encontrar plantas com apenas flores femininas ou com flores femininas e masculinas. As plantas de algumas variedades podem também produzir flores diferentes em períodos temporais distintos de sua vida, produzindo apenas flores masculinas na fase inicial e apenas flores femininas quando já desenvolvidas.

O caqui é uma fruteira sujeita à alternância de produção (Corsato, 2004). Devido à competitividade entre os ramos vegetativos e os frutos é comum que haja alternâncias na produção de uma safra para outra. Quando em uma safra ocorre grande produção de frutos, não há acúmulo de reserva suficiente nos ramos para garantir um desenvolvimento adequado da parte aérea da próxima safra para mais uma grande produção. De acordo com Ojima et al. (1985) a alternância de produção, característica natural do caqui 'Pomelo', pode ser controlada

mediante poda severa de ramos no inverno e desbaste precoce dos frutos em excesso, em anos em que se espera frutificação abundante.

De acordo com Corsato et al. (2005) frutos de caqui sem sementes são fracos competidores por carboidratos em relação aos pontos de crescimento vegetativo. Segundo esses autores, estudos anteriores têm evidenciado que, entre as razões para esse fato destacam-se: o tempo de desenvolvimento para que as folhas se torne efetivamente fonte de carboidratos; a extrema sensibilidade de frutos sem sementes a baixas irradiâncias; e o baixo conteúdo em carboidratos de reserva nos respectivos ramos onde esses frutos estariam se desenvolvendo.

Segundo Ragazzini (1985), já foram detectados diversos fatores que podem induzir um aumento da queda dos frutos, como por exemplo: um excesso de umidade, desequilíbrio hídrico, desequilíbrio nutricional (especialmente carência de fósforo e potássio), poda não equilibrada em relação ao vigor da planta, adversidades atmosféricas, desfolhação precoce da planta produzida por granizo.

Quanto mais tempo os frutos permanecerem nas árvores, mais chances estes possuem de serem abortados. Contudo, depois da maturação fisiológica até a colheita, o fruto de caqui ainda continua crescendo enquanto estiver na árvore (Ragazzini, 1985). Os frutos com sementes parecem apresentar tendência a amadurecimento precoce quando comparados com os da mesma variedade e sem sementes. A presença da semente pode alterar, principalmente, a cor da polpa, o tamanho e o sabor dos frutos de certas variedades, enquanto que em outras, os frutos apresentam as mesmas características, quer tenham ou não sementes. Sendo estas desejáveis em certas variedades e indesejáveis em outras (Martins & Pereira, 1989; Simão, 1998).

1.2.2. Dormência e sua Quebra Artificial pelo uso da Cianamida Hidrogenada

As fruteiras de clima temperado caracterizam-se pela queda das folhas no final do ciclo e a conseqüente entrada em dormência. Durante este período, a planta não demonstra crescimento, porém as atividades metabólicas continuam, embora reduzidas (Perussi, 2009).

A quebra de dormência das plantas caducifólias envolve fatores internos, como balanço dos promotores e inibidores de crescimento, ou externos, como temperatura, fotoperíodo e a radiação solar, entre outros. Dos fatores externos, o que mais se destaca é a temperatura, sendo que, quando as plantas são cultivadas em regiões com insuficiência de frio hibernal, apresentam sintomas de falta de adaptação, como atraso e maior duração do período de floração e abertura de menor número de gemas floríferas e vegetativas, resultando em redução na produção, com frutos desuniformes e de baixa qualidade (Razzouk, 2007).

As pulverizações químicas com substâncias (reguladores de crescimento) são de uso comercial corrente para acelerar ou retardar a maturação, promover a abscisão de folhas e frutos, ou para iniciar e uniformizar o período de floração. Essas técnicas (quando devidamente aplicadas) uniformizam a aparência, o grau de maturação e asseguram colheita uniforme (com maior rendimento), facilitam o manuseio e melhoram o valor de comercialização (Chitarra & Chitarra, 2005)

De acordo com o Department of Pesticide Regulation (1993), a cianamida hidrogenada causa vernalização química e brotação uniforme nas plantas. Este produto de acordo com Ayub et al. (2009) pode ter o efeito de fixar mais os frutos à planta, provavelmente devido ao aumento da atividade metabólica do ovário, aumentando o fluxo de metabólitos para o fruto. Isso reduz a queda destes. A quebra de dormência pela cianamida hidrogenada é interessante

para uniformizar e compatibilizar o florescimento de cultivares de polinização cruzada, bem como antecipar e melhorar a produção.

Os efeitos da aplicação da cianamida hidrogenada em caquizeiro variam em função de vários fatores, como concentração, época, modo de aplicação, cultivar e condições climáticas (Mizobutsi et al., 1997). Esta tem o efeito de quebra de dormência e de uniformizar a brotação e a floração (Mizobutsi et al., 2003). De acordo com Mizobutsi et al. (2004), quanto mais tarde é a aplicação da cianamida hidrogenada, menor é a antecipação da colheita. Uma vez que será menor a antecipação da brotação e do florescimento.

Segundo estudos realizados por Palladini & Patri (1999), a eficiência de diferentes volumes de caldas (com a mesma dosagem de cianamida hidrogenada e óleo mineral) não apresenta diferença na quebra da dormência em macieiras, desde que ocorram 800 unidades de frio. Segundo os autores, deve-se basear a dosagem, para macieiras, de acordo com unidades de frio que ocorrer no inverno, aumentando a dosagem à medida que diminui o número de unidades de frio.

Para mensurar a quantidade de frio o modelo mais utilizado é a soma diária das horas com temperaturas iguais ou inferiores a 7,2°C, resultando nos números de horas de frio (NHF). Entre os modelos utilizados para calcular as unidades de frio (UF) destacam-se os de Utah, Carolina do Norte e suas modificações (Biasi et al., 2010).

A cianamida hidrogenada é aplicada em plantas ainda dormentes, recém podadas, não diretamente em seus frutos. Com base nas propriedades físicas e químicas da cianamida hidrogenada, estudos ambientais e estudos de resíduos em uva, não se espera que seus resíduos sejam encontrados em frutas. Consequentemente, não se espera a exposição a cianamida hidrogenada através da dieta, sendo considerado apenas a exposição ocupacional da utilização desta (Department of Pesticide Regulation, 1993).

Como a cianamida hidrogenada não é sistêmica, possuindo assim uma ação localizada é necessário que a pulverização atinja todos os ramos da planta, molhando-os até o ponto de gotejamento, para que se tenha o máximo efeito. Contudo, como a aplicação é realizada no período em que a planta tem a menor superfície disponível para a deposição e retenção dos produtos aplicados, o volume de solução gasta não é tão elevado (Palladini & Patri, 1999).

1.2.3. Cianamida Hidrogenada, seus Riscos e Cuidados

A utilização de produtos químicos, que promovam e uniformizem a brotação e a floração é prática comum na viabilização dos cultivos de frutíferas de clima temperado, porém, nem sempre os resultados são satisfatórios, sobretudo em locais onde ocorre baixo acúmulo de frio. Com a proibição do uso dos sais de dinitro, a melhor opção para a superação artificial da dormência passou a ser a utilização da cianamida hidrogenada (Perussi, 2009).

Com base nas informações atuais disponíveis de toxicidade, o DPR (Department of Pesticide Regulation) chegou a conclusão que a cianamida hidrogenada provoca efeitos adversos no fígado, tireoide, rins, ovário e testículos de animais utilizados como cobaias em laboratório, apesar de não existir relato de doenças ou lesões, para o *Pesticide Illness Surveillance Program* do DPR, na Califórnia, até 1991. O DPR concluiu ainda que, na ausência de dados adicionais para o contrário, esta tem o potencial para provocar efeitos semelhantes em seres humanos. Portanto, a utilização de equipamento de proteção individual por todos que participem em sua aplicação é indispensável. Para material de grau técnico, o LD50 oral em ratos foi de 125mg/Kg, enquanto que o LD dérmico em coelhos variou de 742mg/Kg a 901 mg/Kg. Já a inalação, CL50, foi superior a 1000mg/m³ (Department of Pesticide Regulation, 1993).

No Brasil a cianamida hidrogenada está registrada apenas para as culturas de maçã, pêssego e uva (ADAPAR, 2013). Diante desta situação e da real utilização da cianamida hidrogenada pelos produtores de caqui, que precisam realizar a quebra de dormência artificial nas plantas, torna-se cada vez mais necessário estudos sobre o comportamento deste produto, sobretudo em relação à sua capacidade de contaminação ambiental. A utilização pelos produtores sem autorização, por necessidade, mostra a importância da regularização de sua utilização na cultura do caqui.

1.2.4. Produção e Produtividade

Vários fatores influem na produção e na produtividade do caquizeiro. A fertilidade do solo e a adubação são fatores de grande influência. Segundo Souza (2010), em experimentos com plantas de caqui 'Fuyu', a adição de adubação nitrogenada melhorou a produtividade do caquizeiro. Contudo, esta adubação parece ter interferido negativamente na firmeza da polpa dos frutos quando usada em doses mais elevadas.

Outro fator que pode influenciar a produtividade das plantas é o uso da irrigação. Apesar do caquizeiro ser uma planta rústica, vigorosa e altamente produtiva (Martins & Pereira, 1989), e não requer grande utilização da irrigação para seu cultivo. Sendo, inclusive, comum trabalhos de pesquisa, como o de antecipação de safra (Mizobutsi et al.; 1997; Mizobutsi et al., 2004; Carvalho & Alves, 2007) e de variação de nitrogênio em ramos produtivos (Aguiar, 2010), não utilizarem irrigação alguma na cultura. A utilização da irrigação de forma correta é importante para melhorar a qualidade dos frutos colhidos e da produtividade.

1.2.5. Irrigação

Um grau adequado de umidade no solo modera a queda de frutos e reduz sobretudo as aparições de rachaduras, local de posterior instalação de micélios fúngicos (*Penicillium*, *Macrosporium*, *Botrys*, etc.), causando depreciação comercial. As rachaduras ocorrem devido a um aumento rápido no conteúdo de água no fruto, a nível celular. Isso é característico de estação seca na época de crescimento do fruto, com um excesso de umidade no período que antecede a maturação deste (Ragazzini, 1985).

Existem vários sistemas de irrigação, tais como o de aspersão, sulco e microaspersão. A escolha do melhor sistema a ser utilizado depende de informações tais como solo, relevo, cultura, incidência de pragas e doenças, viabilidade econômica, entre outras. No sistema de microaspersão, a aplicação da água, e se necessário, de produtos químicos, é numa fração de volume de solo explorado pelas raízes das plantas, de forma circular ou em faixa contínua. A seleção, por parte do produtor, de um sistema de irrigação inadequado pode acarretar elevação dos custos de produção, diminuição da produtividade agrícola e elevação posterior da escassez de água (Sobel & Costa, 2005).

A irrigação por aspersão é adaptável a diversas condições de relevo e taxa de infiltração do solo. Contudo, pode propiciar o desenvolvimento de doenças foliares. O efeito do vento pode afetar a uniformidade de distribuição e a eficiência (Trentin, 2005).

1.2.6. Pós-Colheita

Um dos pontos de estrangulamento da cadeia produtiva do caquizeiro é a dificuldade de manter a qualidade dos frutos colhidos (Muñoz, 2002). A qualidade pós-colheita dos frutos começa no campo, bem antes da colheita. Visando evitar injúrias nos frutos de caqui e

garantir a qualidade, os produtores de São Paulo utilizam a prática de ensacamento dos frutos no campo (Rocha & Benato, 2006). Silva (2005) também relata o ensacamento de frutos de caqui Fuyu. Ao serem colhidos, os sacos de papel podem ser retirados no campo ou no galpão de embalagem durante a classificação.

Os frutos apresentam-se sob várias formas, ora achatado, ora globoso, quadrático, com forma de cone, etc. A cor da casca (de acordo com a variedade), varia de amarelo-alaranjado a vermelho, e a cor da polpa também sofre alteração com a presença ou ausência de sementes. Estes são ricos em amido, pectina e açúcares, principalmente glicose, e não apresentam acidez. O fruto verde é rico em tanino e à medida que amadurece, parte deste se transforma em açúcares e parte é consumida na respiração. A adstringência dos frutos maduros de algumas variedades se deve ao tanino simples solúvel em água, não apresentado adstringência se o tanino estiver coagulado ou polimerizado. O fruto apresenta ainda bom teor de vitaminas A e C (Martins & Pereira, 1989; Simão, 1998).

Este está provido de um pedúnculo lenhoso de 1-1,25cm, de longitude, que termina em um cálice persistente. A presença do cálice é essencial. Na fase anterior à maturação, se as folhas forem retiradas dos galhos, deixando apenas os frutos, esses continuam crescendo. Contudo, se retirar as folhas dos cálices do fruto, este e as sementes irão parar o seu desenvolvimento. Parece que as folhas dos cálices são locais de processos enzimáticos e hormonais (auxínicos) que regulam o desenvolvimento do fruto, a respiração, a transpiração e a translocação de compostos nutricionais (Ragazzini, 1985).

Não existe índice objetivo que pode determinar o começo das operações de colheita dos frutos. O ponto de colheita pode ser determinado pelas diferentes tonalidades por que passa o fruto até atingir a maturação morfológica. No início, a casca apresenta-se com coloração verde clara, passando a amarelo-avermelhada nas variedades do grupo Sibugaki (polpas sempre taninosas) e a verde-amarelada nas do grupo Amagaki (polpas não apresentam taninos, também chamados de frutos doces ou duros). A colheita é feita por uma leve torção do pedúnculo ou com tesoura apropriada, sendo o corte bem rente ao cálice. Contudo o tempo de colheita aumenta com a utilização de tesouras (Ragazzini, 1985; Martins & Pereira, 1989; Simão, 1998).

A adstringência é um fator importante na qualidade pós-colheita dos frutos de caqui. Sendo desejado que estes não contenham adstringência para a comercialização *in natura*. Segundo Chitarra & Chitarra (2005) a sensação de adstringência percebida em alguns frutos é conectada com a reação tanante (ligação com proteínas) e depende, sobretudo, do número de grupos de hidroxila (OH) fenólicos por molécula do composto. Surge daí a designação de “taninos” para os compostos que apresentam adstringência. A adstringência acentuada produz uma sensação desagradável na boca, em pequenas porções ou em combinações com outros fatores do sabor, podendo contribuir para um “*flavor*” desejável, como em vinhos produzidos com cultivares de uvas pigmentadas.

A retirada de adstringência adequada dos frutos de variedades taninosas, como o ‘Mikado’ e o ‘Taubaté’, ou variáveis, como o ‘Rama-forte’ e o ‘Giombo’, é uma grande dificuldade para a manutenção da pós-colheita do caqui. O fruto de caqui imaturo é adstringente devido ao tanino solúvel presente em células especializadas. A redução da adstringência durante o desenvolvimento e amadurecimento de cultivares adstringentes e o desaparecimento da adstringência de cultivares não adstringentes está relacionado com a capacidade natural de remover o conteúdo de tanino existentes na polpa do fruto (Campo-Dall’ et al., 1996).

Na retirada da adstringência, o acetaldeído é o composto responsável pela polimerização das moléculas de tanino. A penetração do etanol, na retirada artificial da

adstringência no fruto ocorre principalmente através da superfície da casca, aumentando proporcionalmente em função de sua concentração na atmosfera. Sendo preferível aplicar o álcool ao invés de aplicar diretamente o acetaldeído porque os frutos possuem uma maior eficiência em absorver o etanol em comparação com o acetaldeído. Ao ser absorvido, o etanol é transformado em acetaldeído pela ação da enzima álcool desidrogenase (Edagi & Kluge, 2009).

1.3. Material e Métodos

O experimento, com a variedade de caqui 'Mikado', foi conduzido em duas propriedades rurais de base familiar do distrito de D. Mariana no município de Sumidouro – RJ, onde cada propriedade constituiu um bloco experimental.

Na 1ª propriedade, onde se localizou o Bloco B1, o pomar era constituído por árvores com mais de 20 anos de idade, plantadas em declive, com espaçamento de 5 X 5m. Enquanto que na 2ª propriedade, onde se localizou o Bloco B2, o pomar era constituído por árvores de 6 anos de idade (início dos experimentos), localizado em terreno de baixada, tendo também o espaçamento de 5 X 5m. As avaliações fenológicas das plantas foram realizadas no campo, já as físicas e químicas dos frutos foram realizadas no laboratório de Fisiologia da Pós Colheita da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

O experimento foi conduzido ao longo de duas safras agrícolas (2010-2011 e 2011-2012). Com exceção da avaliação de fenologia, todas as avaliações foram realizadas nas duas safras.

Uma vez que as colheitas foram efetuadas no decorrer de toda a safra agrícola, foi possível, não só avaliar e comparar as duas safras, como também avaliar e comparar o decorrer de cada uma das safras individualmente (ao longo das colheitas realizadas de 15 em 15 dias), em relação à produção, produtividade e características dos frutos. Permitindo inclusive a comparação de colheita a colheita da primeira safra com a segunda safra agrícola.

Foram avaliados os seguintes tratamentos (Tabela 1) para quebra de dormência das gemas vegetativas das plantas de caquizeiro 'Mikado' ao longo dos três anos de avaliação, em duas safras diferentes, sendo a cianamida hidrogenada aplicada a partir da segunda quinzena do mês de Junho dos anos de 2010 e 2011, de acordo com o cronograma estipulado:

- T1** – Controle, onde não foi aplicada irrigação e nem a cianamida hidrogenada;
- T2** – Aplicação de irrigação e de cianamida hidrogenada na dose de 7 mL.L⁻¹ com óleo mineral na dose de 8,0 mL.L⁻¹ nas duas safras agrícolas (2010-2011 e 2011-2012);
- T3** – Aplicação de irrigação e cianamida hidrogenada na dose de 7 mL.L⁻¹ com óleo mineral na dose de 8,0 mL.L⁻¹ apenas na primeira safra agrícola (2010-2011);
- T4** – Aplicação de irrigação nas duas safras agrícolas (2010-2011 e 2011-2012);
- T5** – Não houve aplicação de irrigação, apenas aplicação de cianamida hidrogenada na dose de 7 mL.L⁻¹ com óleo mineral na dose de 8,0 mL.L⁻¹ nas duas safras agrícolas (2010-2011 e 2011-2012);
- T6** – Não houve aplicação de irrigação, apenas aplicação de cianamida hidrogenada na dose de 7 mL.L⁻¹ com óleo mineral na dose de 8,0 mL.L⁻¹ apenas na primeira safra agrícola (2010-2011);

Tabela 1. Tratamentos do experimento de antecipação de safra de caquizeiro 'Mikado' com uso de fitorregulador (cianamida hidrogenada).

Tratamento	1ª Safra (2010-2011)		2ª Safra (2011-2012)	
	CH	IR	CH	IR
T1				
T2	X	X	X	X
T3	X	X		
T4		X		X
T5	X		X	
T6	X			

Obs: CH – Com cianamida hidrogenada; IR – Irrigação.

O produto comercial utilizado, que continha cianamida hidrogenada, possuía uma concentração de 52,0% m/v (520 g.L⁻¹) de princípio ativo. Sendo adquirido no ano da aplicação, uma vez que possuía validade de apenas 12 meses.

O sistema de irrigação utilizado foi o de microaspersão, o qual era acionado pelo produtor, em cada propriedade. Estes por sua vez utilizavam os mesmos critérios que usavam nas culturas anuais que também cultivam em suas propriedades, não havendo quantificação da água aplicada. O sistema era sempre ligado no início da manhã ou no final da tarde.

A microaspersão foi escolhida como sistema de irrigação por apresentar alta eficiência na aplicação da água e por ser indicada à fruticultura de modo geral. Principalmente para locais de relevo acidentado (caso da propriedade do Bloco B1) para evitar problemas como a erosão.

O experimento foi conduzido em dois blocos ao acaso, constituídos por seis parcelas experimentais formadas por três linhas de plantio, contendo quatro plantas por linha, com uma parcela útil constituída por duas plantas centrais (Figura 1). Utilizando-se um total de 216 plantas, sendo destas avaliadas 36 plantas.

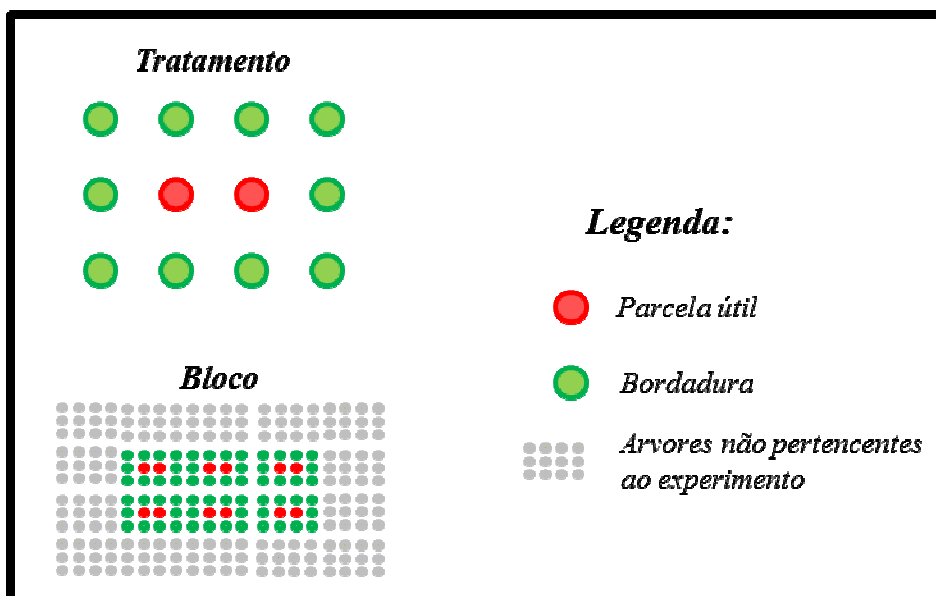


Figura 1. Esquema da disposição das plantas do experimento no tratamento e no bloco.

O Bloco B1 era constituído por árvores de mais de 20 anos de idade, plantadas em declive. Enquanto que o Bloco B2 era formado por árvores de 6 anos de idade (início do experimento), localizadas em área de baixada. Os dois blocos possuíam um espaçamento entre árvores de 5 X 5m.

Segundo Corsato (2004), apesar do seu crescimento lento, o caquizeiro atinge portes que variam de três a quinze metros, levando de sete a oito anos para atingir a maturidade. Entrando em produção comercial a partir do terceiro ano, sendo que a frutificação cresce progressivamente até os 15 anos, quando se estabiliza.

1.3.1. Aplicação dos Tratamentos

Para evitar a diluição da calda de cianamida hidrogenada pelo orvalho presente sobre os ramos das árvores (Figura 2), os tratamentos foram aplicados após a evaporação deste (o que ocorreu por volta das 10 horas). A aplicação foi realizada até no mais tardar às 16 horas, tentando-se evitar as temperaturas mais baixas no período do final da tarde, uma vez que o fabricante alerta que o desempenho do produto pode ser afetado pelo frio. A aplicação seria repetida caso chovesse até 48 horas após a aplicação dos tratamentos entretanto não foi este o caso.

Os tratamentos foram administrados por bloco, ou seja, quando iniciada a aplicação de um determinado bloco, todas as árvores experimentais do bloco recebiam seus respectivos tratamentos no mesmo dia. A calda era aplicada em toda a parcela experimental de um tratamento, para então ser aplicada na parcela seguinte.



Figura 2. Orvalho sobre os ramos das plantas de caqui.

A sequência de aplicação dos tratamentos foi aleatória, sendo esta realizada no mesmo sentido do vento predominante na área, no momento da aplicação. Foi utilizado pulverizador elétrico para aplicar a calda nas árvores até o ponto de escorrimento, sendo obrigatório o uso de EPI (Equipamento de Proteção Individual) por todos os que participaram da aplicação (Figura 3). A frequência do pomar foi proibida até que todo o produto aplicado estivesse totalmente seco sobre plantas.

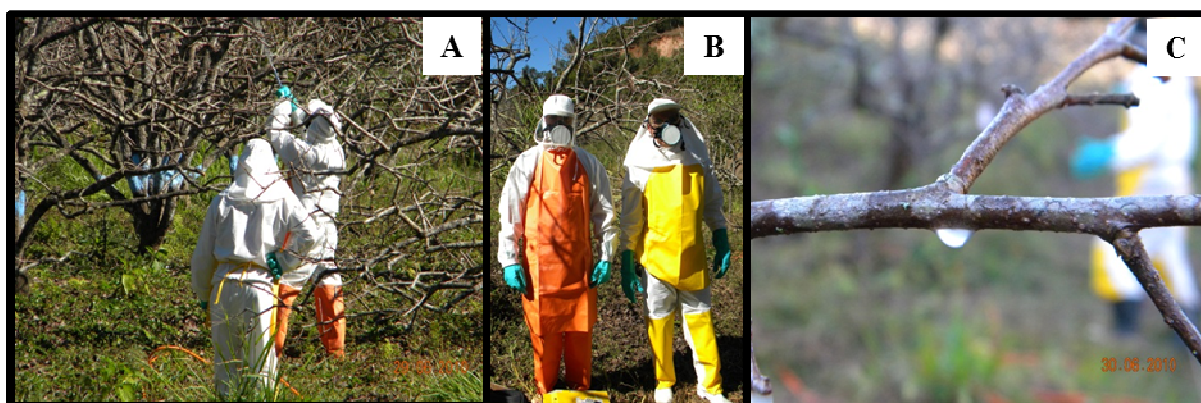


Figura 3. Aplicação da calda (A), EPI utilizado obrigatoriamente por todos que participaram da aplicação (B) e ponto de escorrimento da calda após a aplicação (C).

Caso o vento predominante no momento da aplicação fosse muito forte, o que não ocorreu durante as duas safras, uma barreira feita de lona seria utilizada para evitar que a derivação do produto afetasse os outros tratamentos.

É aconselhado que antes da aplicação da calda as plantas sejam podadas para ajudar no estímulo da brotação e para evitar a poda com a planta já brotada. Contudo como os produtores não realizam poda de produção nesta variedade, esta não foi feita. Na variedade de caqui ‘Mikado’ os produtores efetuam somente a poda de formação em mudas e a poda de limpeza, ou seja, eles podam apenas os ramos mortos que não brotaram.

1.3.1.1. Safra 2010-2011 (1ª Safra)

As árvores, que estavam em estado de dormência, dos tratamentos T2, T3, T5 e T6 dos blocos B1 e B2 foram submetidas a aplicação de solução contendo cianamida hidrogenada e óleo mineral (7mL.L^{-1} e 8mL.L^{-1} , respectivamente) em primeiro de Julho de 2010 (01/07/2010).

Aplicou-se em média de 6,5L de calda por planta nos tratamentos do bloco B1 e 3,7L de calda por planta nos tratamentos do bloco B2. O baixo volume de calda usado no bloco B2 se deve ao porte das plantas, sendo estas menores por se tratar de um pomar jovem (6 anos). Considerando-se apenas a cianamida hidrogenada (produto comercial) e o óleo mineral, gastou-se em média 0,046L e 0,052L, respectivamente, por planta no bloco B1. Sendo que no bloco B2 gastou-se em média 0,026L e 0,029L, respectivamente, por planta. O que em termos de hectare (para o espaçamento utilizado) representaria, respectivamente, em média 92L e 52L de cianamida hidrogenada (produto comercial) e 104L e 58L de óleo mineral.

1.3.1.2. Safra 2011-2012 (2ª Safra)

As árvores, que estavam em estado de dormência, dos tratamentos T2 e T5 dos blocos B1 e B2 foram submetidas a aplicação de solução contendo cianamida hidrogenada e óleo mineral (7mL.L^{-1} e 8mL.L^{-1} , respectivamente) nos dias doze de Julho de 2011 (12/07/2011), no bloco B1, e no dia treze de Julho de 2011 (13/07/2011), no bloco B2. Este atraso na aplicação dos tratamentos ocorreu devido as más condições climáticas, que impossibilitaram a aplicação do produto, que estava prevista para a segunda quinzena de Junho.

Aplicou-se em média 5,983L de calda por planta nos tratamentos do bloco B1 e 4,811L de calda por planta nos tratamentos do bloco B2. Considerando-se apenas a cianamida hidrogenada e o óleo mineral, gastou-se em média 0,042L de cianamida hidrogenada (produto comercial) e 0,048L de óleo mineral por planta no bloco B1. Sendo que no bloco B2 gastou-se em média 0,034L de cianamida hidrogenada (produto comercial) e 0,038L de óleo mineral por planta. O que em termos de hectare (para o espaçamento utilizado) representaria, respectivamente, em média 84L e 68L de cianamida hidrogenada (produto comercial) e 96L e 76L de óleo mineral.

1.3.2. Avaliação Fenológica

A avaliação fenológica foi realizada apenas durante a safra 2011-2012 (2ª safra). Selecionou-se quatro ramos por árvore da parcela principal (oito ramos por tratamento), onde cada ramo se encontrava em um quadrante (Norte, Leste, Sul e Oeste, sendo respectivamente: R1, R2, R3 e R4), totalizando 96 ramos que foram avaliados individualmente. Estes foram selecionados com base na safra em que se desenvolveram, sendo considerado para avaliação os ramos a partir da safra 2009/2010 (Figura 4).

Após a marcação, com a utilização de etiquetas, os ramos foram avaliados semanalmente para verificar a data e proporção da brotação vegetativa, do surgimento das flores (fechadas e abertas) e do surgimento dos frutos (frutos tipo “chumbinho” e frutos em desenvolvimento). As avaliações tiveram início uma semana após a aplicação dos tratamentos até uma semana anterior ao início da colheita, sendo realizado 30 avaliações durante o período de dezenove de Julho de 2011 (19/07/2011) a primeiro de Março de 2012 (01/03/2012).

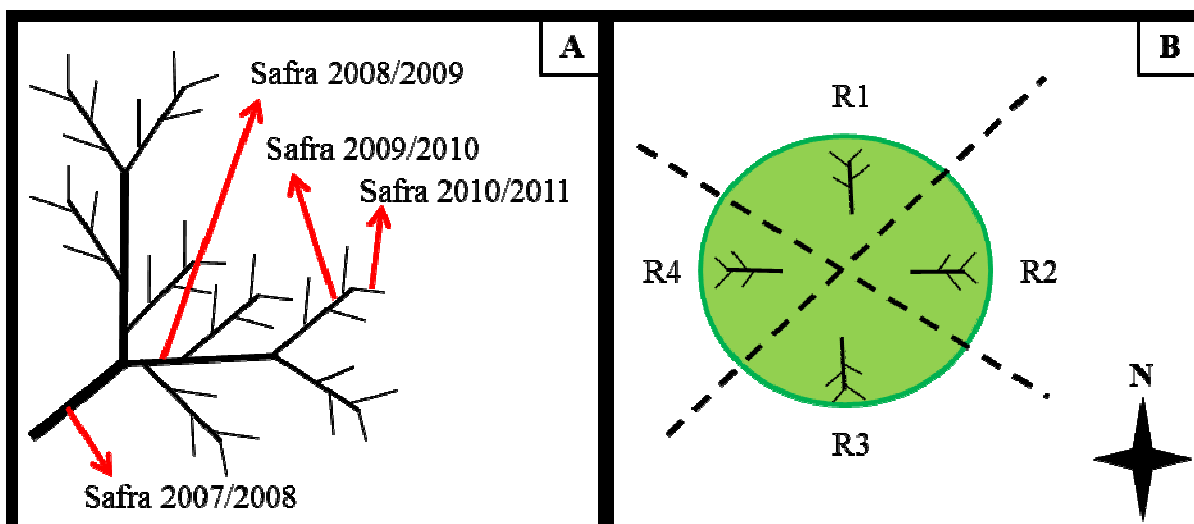


Figura 4. Esquema dos galhos de uma planta de caqui com as respectivas datas de safras que cada ramo se originou (A) e vista superior do posicionamento dos ramos na copa da árvore da parcela principal segundo o quadrante onde estes se encontravam (B).

Ao se avaliar a data do aparecimento de cada estrutura (folhas, flores e frutos), verificou-se não haver diferença entre os blocos. Devido a isto, a data de aparecimento dessas estruturas em cada tratamento foi avaliada considerando-se a média (em relação aos blocos) do período (semanas após aplicação dos tratamentos) em que a primeira estrutura, em questão, surgiu, até o máximo de seu aparecimento. Para o período de abortamento (flores e frutos) considerou-se a data em que ocorreu, independente do bloco. A brotação vegetativa, florescimento (flor fechada e flor aberta) e frutificação (fruto tipo “chumbinho” e fruto em desenvolvimento) foram classificadas conforme a Figura 5.

Para análise estatística considerou-se a porcentagem dos dados coletados, onde na brotação, esta foi obtida a partir do número de gemas vegetativas brotadas pelo número de gemas vegetativas que o ramo selecionado apresentava. Para as flores fechadas, flores abertas, frutos tipo “chumbinho” e frutos em desenvolvimento, foram obtidas a partir do número total de cada uma destas estruturas pelo número total de flores fechadas. Considerou-se como abortamento de cada estrutura a diferença no total entre a avaliação em questão e a avaliação anterior (desde que a estrutura em questão não tivesse se transformado na seguinte) e a porcentagem de abortamento foi obtida com o número de flor e/ou fruto abortado pelo número total de flores fechadas.

O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso com parcelas perdidas. Os resultados foram interpretados por análise de variância (ANOVA), considerando-se os diferentes tratamentos, blocos e a interação entre estes. Foi aplicado o teste de Fisher (LSD) a fim de verificar as diferenças entre as médias das avaliações fenológicas (intensidade de aparecimento de flores fechadas, flores abertas, frutos tipo “chumbinho”, frutos em desenvolvimento e seus referentes abortamentos) ao nível de 5% de probabilidade, quando estas eram definidas pela ANOVA como significativamente diferentes. Foi utilizado o *software STATISTICA* versão 8.0 da *StatSoft Inc.*

Realizou-se análise de correlação entre o número de flores fechadas por ramo analisado e a porcentagem de perdas totais (abortamento de flor fechada, flor aberta, fruto tipo “chumbinho” e fruto em desenvolvimento), sendo estas análises de correlação testadas pela ANOVA para determinar sua significância.

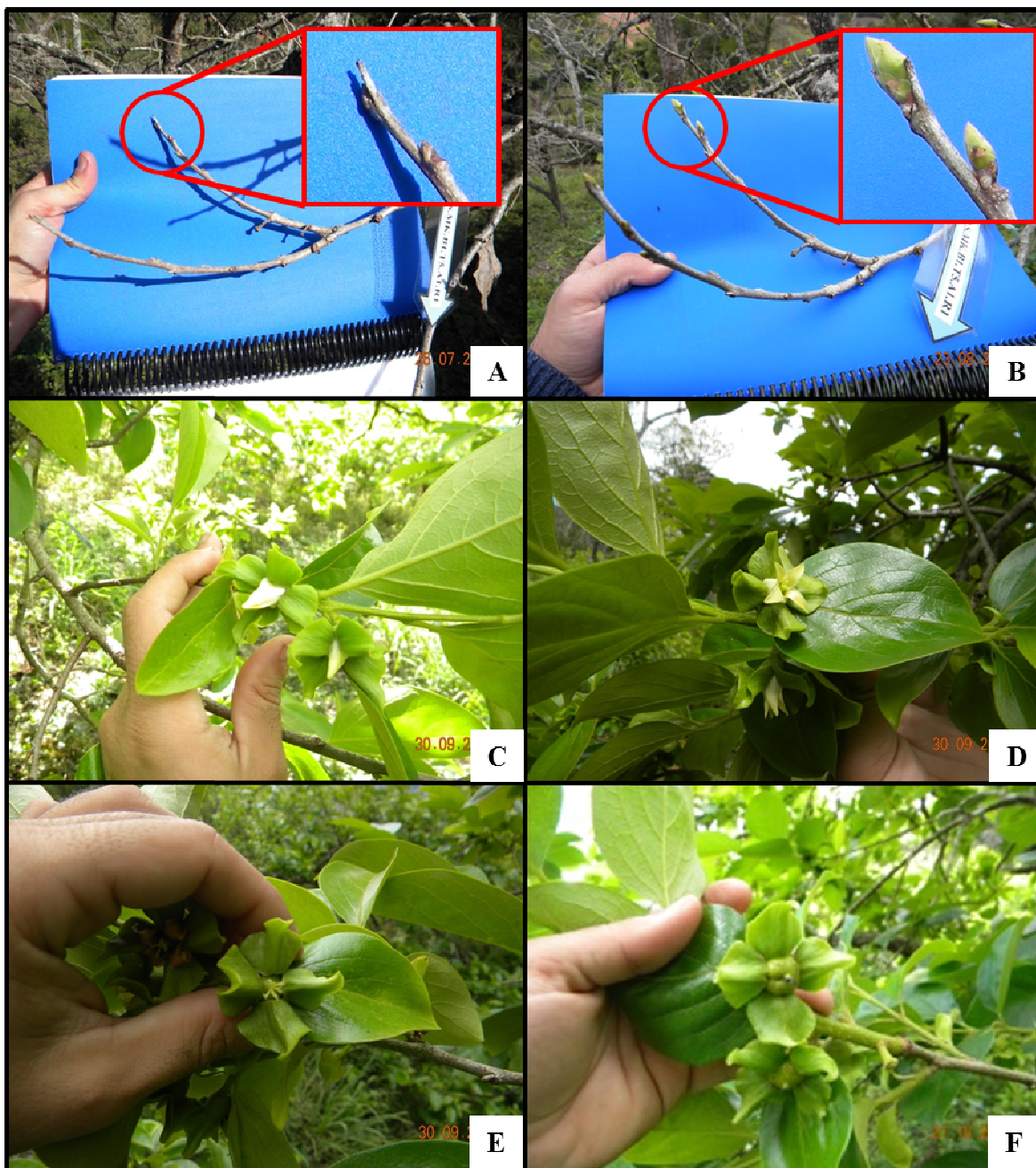


Figura 5. Estruturas vegetais analisadas durante as avaliações fenológicas: gema vegetativa não brotada (A); gema vegetativa brotada (B); flor fechada (C); flor aberta (D); fruto tipo “chumbinho” (E); fruto em desenvolvimento (F).

1.3.3. Colheita e Produtividade

As colheitas para o experimento foram realizadas com auxílio de tesoura de poda, não efetuando-se qualquer tipo de seleção dos frutos, antes ou depois desta. Apenas as duas árvores pertencentes a parcela útil de cada tratamento tiveram seus frutos colhidos. Para a retirada do campo e transporte utilizou-se uma caixa de plástico (medidas internas: 51,5cm X 32,9cm X 13,0cm) com o interior revestido de plástico bolha, onde os frutos foram acondicionados em duas camadas.

Colheu-se os frutos fisiologicamente maduros, de forma aleatória, independente de apresentarem ou não injúrias. As colheitas foram efetuadas em todas as faces e alturas de uma das árvores da parcela útil até que a primeira camada de frutos da caixa fosse completada. Repetiu-se então o procedimento na segunda árvore até a segunda camada de frutos da caixa estar completa. Os frutos desta caixa foram embalados individualmente com papel toalha e encaminhados para a Embrapa Agroindústria de Alimentos. Estes foram transportados em veículo fechado no período da madrugada, evitando-se assim altas temperaturas. Em média a duração de cada transporte foi de cinco a seis horas.

Após a colheita para as análises de caracterizações físicas e químicas, os frutos restantes das árvores da parcela útil que apresentavam-se fisiologicamente maduros foram colhidos. Esses foram então pesados, para a contabilização da produtividade, e comercializados pelos produtores. Os que já se apresentavam maduros de mais (moles) para a comercialização foram colhidos separadamente e pesados para avaliar a perda que ocorre no campo. Esses procedimentos se repetiram ao longo das duas safras, sendo a colheita efetuada de 15 em 15 dias, até que não houvesse mais frutos para serem colhidos.

O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso com parcelas perdidas. Os resultados foram interpretados por análise de variância (ANOVA), considerando-se os diferentes tratamentos, colheitas e safras. Foi aplicado o teste de Fisher (LSD) para se verificar as diferenças entre as médias das análises de produção e produtividade das árvores de caquizeiro ao nível de 5% de probabilidade, quando estas eram definidas pela ANOVA como significativamente diferentes. Foi utilizado o *software STATISTICA* versão 8.0 da *StatSoft Inc.*

1.3.3.1. Safra 2010-2011 (1ª Safra)

A colheita foi realizada de 15 em 15 dias de vinte e oito de Fevereiro de 2011 (28/02/2011) até doze de Maio de 2011 (12/05/2011).

1.3.3.2. Safra 2011-2012 (2ª Safra)

A colheita foi realizada de 15 em 15 dias de oito de Março de 2012 (08/03/2012) até dezoito de Maio de 2012 (18/05/2012).

1.3.4. Avaliação e Caracterização dos Frutos

Após a chegada dos frutos no laboratório de fisiologia da pós-colheita, na Embrapa Agroindústria de Alimentos, mediu-se individualmente o comprimento e o calibre (com um paquímetro) e pesou-se cada fruto. Estes também foram avaliados se possuíam condições de serem comercializados e quais eram as duas principais injúrias presentes, caso existisse.

Analisou-se ao todo três mil cento e cinquenta e sete (3.157) frutos na primeira safra (2010-2011) e um mil novecentos e trinta e um (1.931) frutos na segunda safra (2011-2012), contabilizando um total de cinco mil e oitenta e oito (5.088) frutos avaliados ao longo de todo experimento. As principais injúrias avaliadas foram: abrasão, estria, queimadura de sol, deformidade, perfuração, podridão, mancha, perda de cálice e perda de firmeza (Figura 6).

Os frutos da variedade 'Mikado' são comercializados ainda "duros" (com a polpa ainda bem firme). Todos os frutos que apresentaram perda de firmeza foram considerados não comercializáveis, assim como os que apresentaram a perda do cálice e podridão. Os que apresentavam as demais injúrias só foram considerados não comercializáveis quando estas

eram muito marcantes, seja pela porcentagem da área que a injúria afetava na superfície do fruto ou pela aparência que atribuía ao fruto.

As presenças de injúrias foram estimadas em porcentagem para avaliação estatística, considerando-se a quantidade de vezes que cada injúria aparecia pela quantidade total de frutos. Apenas as duas injúrias mais importantes (as mais marcantes) em cada fruto foram consideradas.



Figura 6. Injúrias avaliadas nos frutos: abrasão (A); estria (B); queimadura de sol (C); deformidade (D); perfuração (E); podridão (F); mancha (G); perda de cálice (H); e perda de firmeza (I).

O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso com parcelas perdidas. Os resultados foram interpretados por análise de variância (ANOVA), considerando-se os diferentes tratamentos, blocos, colheitas, safras e a interação entre estes. Foi aplicado o teste de Fisher (LSD) para se verificar as diferenças entre as médias das avaliações de caracterização dos frutos (calibre, comprimento e massa) e das injúrias presentes nos frutos ao nível de 5% de probabilidade, quando estas eram definidas pela ANOVA como significativamente diferentes. Foi utilizado o *software STATISTICA* versão 8.0 da *StatSoft Inc.*

Realizou-se análise de correlação entre o calibre dos frutos e seus comprimentos e entre o calibre dos frutos e suas massas, sendo estas análises de correlação testadas pela ANOVA para determinar sua significância.

1.3.5. Avaliação Química dos Frutos

Após a realização da caracterização dos frutos (comprimento, calibre, massa e injúria), aqueles considerados comerciais foram selecionados aleatoriamente e submetidos ao processo de retirada de adstringência. Os frutos selecionados foram acondicionados em uma caixa de plástico (medidas internas: 51,5cm X 32,9cm X 13,0cm) com os cálices para baixo e sem que os mesmos se tocassem, até que o fundo da caixa fosse preenchido.

Estes foram então submetidos ao vapor de álcool com a proporção de 7mL de álcool a 70% para cada quilograma de fruto, durante 70 horas para a retirada da adstringência (Neves Jr, 2009). Depois disso, os frutos que se apresentaram moles foram descartados, selecionando-se seis (6) frutos para constituírem as amostras. Os frutos tiveram seus cálices retirado e foram batidos, homogeneizados e separados em três (3) alíquotas para análises químicas. As amostras foram processadas juntando-se todos os frutos. Determinou-se:

- **Acidez titulável total:** pesou-se 10g de amostra até a 4ª casa decimal em bécher de 100mL, adicionando-se 50mL de água destilada, deixando sob agitação magnética. Onde titulou-se com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N em titulador automático programado para ponto de virada em pH 8,1, sendo os resultados expressos em porcentagem massa/massa de ácido cítrico (ISO 750, 1998);
- **Sólidos solúveis totais:** colocou-se uma ou mais gotas de amostras no refratômetro eletrônico até cobrir totalmente a superfície do prisma, efetuando-se assim a leitura do aparelho. Realizou-se no mínimo duas leituras por amostra com diferença máxima entre as leituras de 0,2 °BRIX, caso esta diferença fosse maior repetia-se a análise até que duas leituras em sequência apresentassem no máximo esta diferença (ISO 2173, 1978);
- **Taninos Condensados:** pesou-se entre 0,75 g a 1 g de amostra em tubo falcon e adicionou-se 15 mL de uma solução 10% v/v de ácido clorídrico em metanol (10% v/v HCl/MeOH). Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas em vortex e armazenadas em geladeira durante 8 horas. Após a extração, as amostras foram filtradas para balão volumétrico de 25 mL, avolumando estes com a solução 10% v/v HCl/MeOH. Pipetou-se 40µl da amostra para uma placa de 96 poços. Cada amostra foi pipetada em quatro replicatas sendo que três (das quatro replicatas), foram adicionadas 200µl de solução de vanilina 4% m/v em 10% v/v HCl/MeOH e uma replicata, que constitui o branco da amostra, teve a adição de 200µl da solução de 10% v/v HCl/MeOH. Homogeinizou-se as amostras e após 20 minutos realizou-se a leitura da absorvância, no comprimento de onda (λ) de 550nm no Espectrofluorímetro com leitor de microplacas. Foram preparadas curvas de calibração contendo 10 padrões de uma solução de catequina cuja concentração variou de 0,25 a 0,35% m/v em solução metanólica de 80% v/v (MeOH 80% v/v). As diferentes concentrações dos padrões geraram leituras de absorvância equivalentes ao ácido tânico. Para a curva, a proporção de catequina e MeOH 80% v/v resultavam no volume de 40µl e a adição de vanilina completou o volume final de 240µl. As leituras dos padrões foram feitas no Espectrofluorímetro com leitor de microplacas 20 minutos após a sua preparação (Deschamps and Cheryan, 1987);

O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso com parcelas perdidas. Os resultados foram interpretados por análise de variância (ANOVA), considerando-se os diferentes tratamentos, blocos, colheitas, safras e a interação entre estes. Foi aplicado o teste de Fisher (LSD) para verificar as diferenças entre as médias das análises físicas e químicas ao nível de 5% de probabilidade, quando estas eram definidas pela ANOVA como

significativamente diferentes. Também foi utilizado o *software* STATISTICA versão 8.0 da StatSoft Inc.

1.4. Resultados e Discussão

Devido ao grande volume e para melhor compreensão dos dados gerados ao longo de todo o experimento, os resultados foram apresentados como: primeira safra; segunda safra; e a comparação entre as mesmas.

1.4.1. Safra 2010-2011 (1ª Safra)

As colheitas da safra 2010-2011 (1ª safra) ocorreram entre vinte e oito de Fevereiro de 2011 (28/02/2011) e doze de Maio de 2011 (12/05/2011), sendo efetuadas de 15 em 15 dias e compreendendo um total de seis colheitas. As árvores submetidas a cianamida hidrogenada, com (tratamentos T2 e T3) e sem irrigação (tratamentos T5 e T6), não apresentaram antecipação no início da colheita.

Contudo, com exceção das árvores submetidas ao tratamento T3, as árvores submetidas a cianamida hidrogenada apresentaram frutos somente até a quinta colheita, indicando uma tendência em concentrar as colheitas no início da safra. As árvores com as copas ainda em desenvolvimento (bloco B2) também apresentaram concentração da safra, não apresentando frutos na sexta colheita. O fato da copa ainda estar em desenvolvimento pode propiciar condições favoráveis para maturação mais rápida dos frutos, como por exemplo uma maior entrada de raios solares devido a uma copa menos densa e/ou uma maior temperatura no interior da copa.

Segundo Chitarra & Chitarra (2005), a elevação da temperatura tem efeito marcante na redução do período de desenvolvimento dos frutos. Por intensificar a atividade respiratória, promove aumento da transpiração, modificações na coloração, nos teores de sólidos solúveis totais e de outros constituintes químicos.

1.4.1.1. Caracterização dos Frutos

A qualidade dos frutos colhidos é tão importante quanto sua quantidade. Dentre as qualidades desejadas em um fruto estão: um tamanho adequado; ser livres de pragas e doenças; e apresentar o menor nível possível de injúrias, preferencialmente estar livre de injúrias. Visando a melhora da qualidade destes, é importante saber quais as principais injúrias que ocorre no pomar e se os tratamentos culturais que estão sendo executados estão interferindo na incidência das injúrias nos frutos, assim como se estão influenciando características como o tamanho dos frutos.

Na safra 2010-2011 (1ª safra), as árvores jovens, com a copa ainda em formação (bloco B2), não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) para os calibres dos frutos produzidos, em comparação com os produzidos pelas árvores que apresentavam a copa já totalmente formada (bloco B1). As árvores do bloco B2 apresentaram diferença significativa (interação blocos/colheitas) apenas na quarta colheita, como pode ser visto na Figura 7.

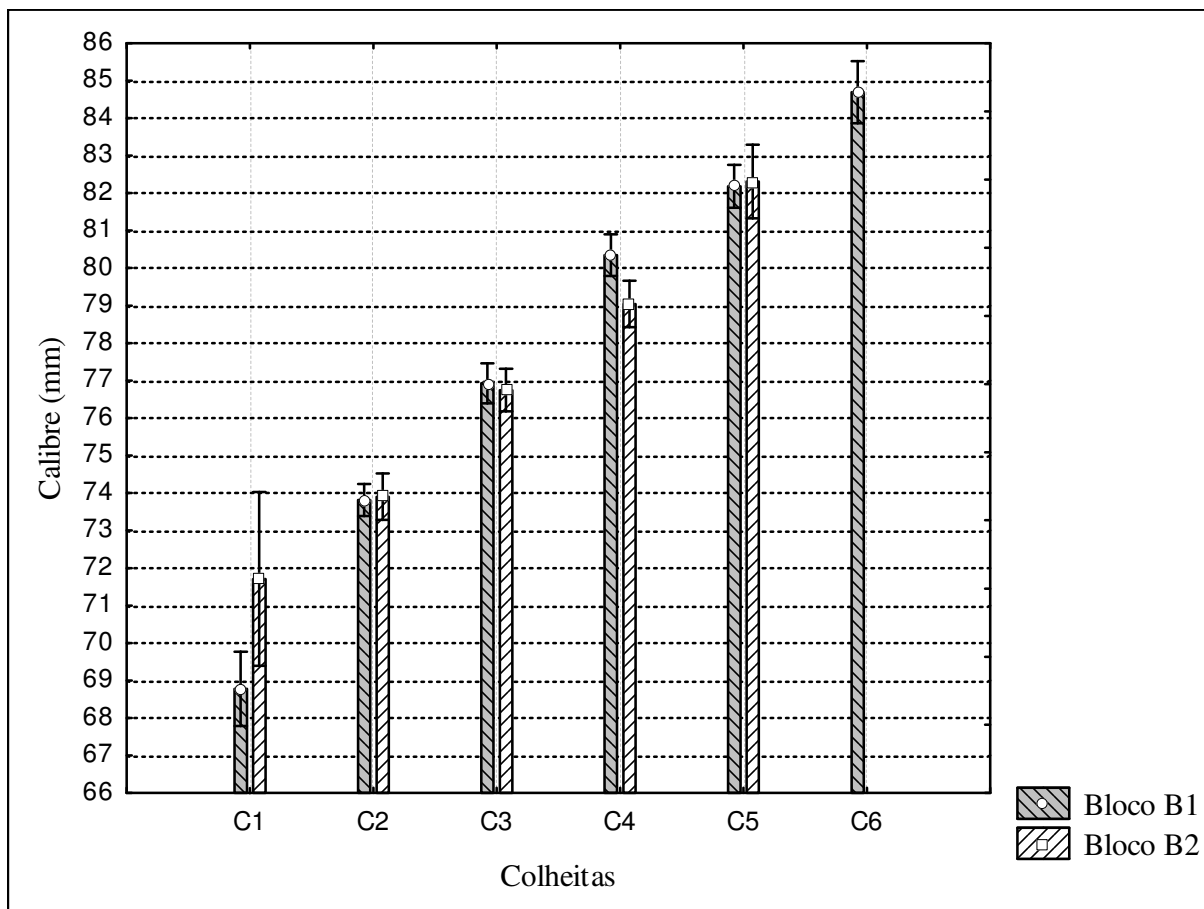


Figura 7. Médias dos tratamentos para o calibre dos frutos das plantas nas colheitas ao longo da safra 2010-2011 (1ª safra) em relação aos diferentes blocos.

Provavelmente ocorreu algum fator externo, que não pode ser controlado, que proporcionou menores calibres nos frutos das árvores do bloco B2 na quarta colheita desta safra. É possível constatar também que nos dois blocos o calibre dos frutos aumenta ao longo das colheitas.

Quanto mais tempo os frutos permaneceram nas árvores, maior foi o calibre destes, independente do tratamento aplicado. Conforme as colheitas foram sendo realizadas, houve uma diminuição da competição entre os frutos, uma vez que a colheita atuou como se fosse um “raleio” nos frutos, permitindo que os frutos remanescentes crescessem mais. Quanto mais frutos retirados, menor a competição entre os frutos remanescente.

Depois da maturação fisiológica até a colheita, o fruto de caqui ainda continua crescendo, enquanto estiver ligado à árvore (Ragazzi, 1985). Segundo Pimentel (1998), a retirada de frutos permite que os frutos colhidos depois sejam de maior tamanho.

É possível observar, Tabela 2, que as árvores que receberam apenas irrigação (tratamento T4) apresentaram, em todas as colheitas ao longo da safra, os frutos com os maiores calibres. Apesar do caquizeiro ser uma planta resistente e produtiva, estes resultados demonstram que a irrigação pode acarretar benefícios à cultura. Contudo, a associação da cianamida hidrogenada com a irrigação (tratamentos T2 e T3) não demonstrou resultados igualmente bons aos das árvores submetidas somente a irrigação (tratamento T4). Os frutos das árvores desses dois tratamentos apresentaram as mesmas tendências. Sendo que, com

exceção da 1ª colheita (onde estas apresentaram os frutos de maior calibre), em todas as demais, estas apresentaram frutos de menor calibre.

Tabela 2. Médias dos blocos para o calibre dos frutos (em milímetros) das plantas submetidas aos diferentes tratamentos, em diferentes colheitas ao longo da safra 2010-2011 (1ª safra).

Colheitas	Tratamentos					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
1ª	69,53 Eab	69,85 Ea	69,24 Ea	72,19 Ea	67,26 Db	68,88 Dab
2ª	72,19 Eb	73,20 Db	73,29 Db	75,99 Ea	72,81 Cb	75,83 Ca
3ª	77,18 Db	76,97 Cb	75,34 Cc	80,30 Da	73,91 Cd	77,64 Bb
4ª	79,85 Cb	78,94 Bbc	78,50 Bc	82,32 Ca	78,03 Bc	82,18 Aa
5ª	82,17 Bbc	81,21 Abc	80,39 Ac	84,51 Ba	82,00 Abc	82,49 Ab
6ª	84,73 Ab	–	81,23 Ac	88,12 Aa	–	–

Letras maiúsculas e iguais nas colunas e letras minúsculas e iguais nas linhas não apresentam diferença significativa.

Já as árvores tratadas apenas com a cianamida hidrogenada (tratamento T5 e T6) apresentaram resultados discordantes entre si. Enquanto que as árvores do tratamento T5 apresentaram os frutos de menor calibre em todas as colheitas (da 1ª à 5ª colheita), as árvores do tratamento T6 apresentaram frutos com os maiores calibres na 1ª, 2ª e 4ª colheitas. Provavelmente esta divergência ocorreu devido a fatores exógenos e que não puderam ser controlados nas condições em que o experimento foi conduzido.

A divergência entre os resultados dos frutos das árvores submetidas aos tratamentos T5 e T6 pode ter sido intensificada devido a diferença de idade entre as árvores presentes no bloco B1 (árvores já totalmente formadas) e no bloco B2 (árvores com a copa em formação). Na Figura 8 (interação entre tratamentos e blocos, $p < 0,001$) pode-se observar que no bloco B2 as árvores submetidas aos tratamentos T1 e T6 apresentaram frutos com calibres significativamente menores, enquanto que os das árvores submetidos ao tratamento T3 apresentam calibres significativamente maiores, quando comparados com os frutos das árvores que receberam respectivamente os mesmos tratamentos no bloco B1.

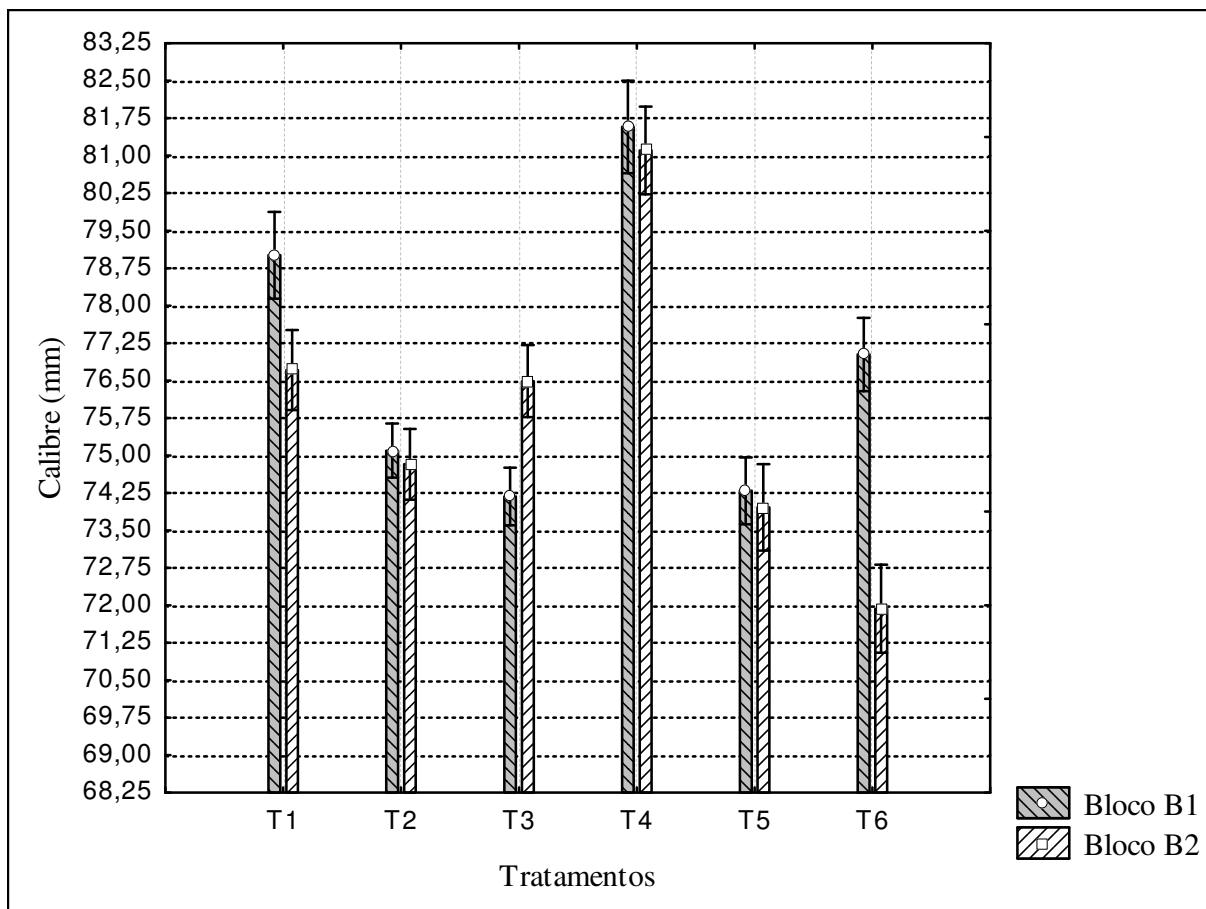


Figura 8. Médias das colheitas para o calibre dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação aos blocos (1ª safra).

Provavelmente ocorreram condições edafoclimáticas e/ou outros fatores que interferiram nos calibres dos frutos das árvores submetidas aos tratamentos T3 (no bloco B2) e T6 (no bloco B1) que favoreceram o aumento do calibre dos frutos. Já para as árvores do bloco B2 submetidas ao tratamento T6, essas condições foram desfavoráveis para os frutos.

Pode-se verificar que das oito combinações (blocos e tratamentos) que receberam a cianamida hidrogenada, cinco delas foram consonantes entre si (árvores submetidas ao tratamento T2, blocos B1 e B2; tratamento T3, bloco B1; tratamento T5, blocos B1 e B2). É possível que condições climáticas restritas a determinado local (microclima) estejam afetando os resultados das demais combinações.

Uma mesma cultivar de uma determinada fruta não tem, necessariamente, a mesma qualidade em termos de sabor, aroma, textura, espessura de casca ou tamanho e aparência. Além dos aspectos nutricionais da planta, os fatores climáticos exercem papel fundamental nesse contexto e nenhum, isoladamente, é responsável pelas diferentes características pós-colheitas. Estes fatores englobam temperatura, luz, umidade relativa, vento, altitude, pluviosidade e textura do solo (Chitarra & Chitarra, 2005).

É importante lembrar que o caquizeiro recebe influência em sua produção e na qualidade dos frutos de uma safra para outra. Já que se tratar de planta de folhas caducas, tendo que armazenar carboidratos para um novo fluxo de brotação na safra seguinte. Devido a isso, é possível que os fatores que originaram esta discrepância tenha ocorrido na safra 2009-2010 (safra anterior à 1ª safra do experimento) e/ou na safra 2010-2011 (1ª safra).

Outro fator de qualidade dos frutos é a presença ou não de injúrias, assim como o tipo destas. Ao longo da safra avaliada (2010-2011, 1ª safra) verificou-se que, nas condições experimentais, as injúrias presentes nos frutos não foram influenciadas pela época em que foram colhidas (colheitas), pelo uso da irrigação ou pela idade das árvores (blocos). Como é demonstrado na Tabela 3, não houve diferença significativa entre os frutos (independente do tratamento que as árvores tenham recebido) para a ausência de injúrias, variando de 18,77% à 34,45%.

Tabela 3. Médias dos blocos e das colheitas para percentuais de frutos injuriados das plantas submetidas aos diferentes tratamentos, na safra 2010-2011 (1ª safra).

Injúria*	Tratamentos					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Frutos s/ injúrias	18,77 AB	23,91 AB	22,13 B	29,96 A	32,74 A	34,45 A
Mancha	17,05 B	16,55 BC	20,32 B	19,35 AB	16,41 BC	11,28 CD
Estria	31,05 A	32,39 A	35,93 A	22,00 AB	31,64 A	28,33 AB
Abrasão	22,48 AB	19,76 B	28,07 AB	18,19 B	26,59AB	21,49 BC
Queimadura de sol	4,33 CDa	4,25 CDa	4,89 Ca	0,37 Db	4,93 Da	3,49 Da
Perfuração	2,61 CDc	8,26 CDa	6,21 Cab	4,43 CDbc	3,54Dbc	5,81 Dabc
Perda de firmeza	22,38 AB	11,96 BC	13,88 BC	14,57 BC	6,85 CD	7,81 D
Podridão	1,60 CD	0,90 D	0,68 C	0,18 D	0,33 D	1,26 D
Cálice	14,23 BCab	5,74 CDbc	3,85 Cc	22,69 ABa	3,80 Dc	11,64CDbc
Deformidade	0,18 Db	0,00 Db	0,00 Cb	0,19 Db	0,00 Db	0,87 Da
Frutos descartados	23,85 ABa	14,84 BCab	15,91 Bab	15,30 BCab	6,92CDb	9,85 Db

Letras maiúsculas e iguais nas colunas e letras minúsculas e iguais nas linhas não apresentam diferença significativa.

* Injúrias ilustradas na Figura 6.

Já em relação aos frutos descartados (devido à severidade de suas injúrias), as árvores tratadas apenas com a cianamida hidrogenada (tratamentos T5 e T6) apresentaram os menores índices, enquanto que as árvores do controle (tratamento T1) apresentaram os maiores índices. Entretanto, os frutos das árvores tratadas com a cianamida hidrogenada associada com a irrigação (tratamentos T2 e T3) e as que receberam apenas a irrigação (tratamento T4) não apresentaram diferenças significativas das que receberam os tratamentos T1, T5 e T6.

As árvores do controle (tratamento T1) e as que receberam apenas irrigação (tratamento T4) foram os que apresentaram os maiores índices de frutos com injúrias no

cálice. Sendo que as submetidas aos tratamentos T2 (cianamida hidrogenada e irrigação) e T6 (apenas cianamida hidrogenada) apresentaram índices que não diferem estatisticamente das árvores do controle (tratamento T1).

Os menores índices de injúria no cálice dos frutos das árvores que receberam cianamida hidrogenada pode estar relacionado a um aumento na atividade metabólica do ovário. Segundo Ayub et al. (2009), a cianamida hidrogenada provavelmente aumenta a atividade metabólica do ovário, aumentando o fluxo de metabólitos para o fruto. E de acordo com Ragazzini (1985), parece que as folhas dos cálices são locais de processos enzimáticos e hormonais que regulam o desenvolvimento do fruto, a respiração, a transpiração e a translocação de compostos nutricionais.

As injúrias que apresentaram as menores incidências nos frutos (independente do tratamento recebido pela árvore) foram a queimadura de sol, perfuração, podridão e deformidade. Sendo seus maiores índices, respectivamente, 4,93%, 8,26%, 1,60% e 0,87%. Já a principal injúria que se apresentou nos frutos (independente do tratamento recebido pela árvore) foi a estria, seguidas pelas injúrias do tipo a abrasão e mancha. Onde seus maiores índices apresentados foram, respectivamente, 35,93%, 28,07% e 20,32%.

As árvores que receberam a cianamida hidrogenada, com (tratamentos T2 e T3) e sem irrigação (tratamentos T5 e T6) apresentaram como principais injúrias, nos frutos, as do tipo abrasão e estria. Já as árvores do controle (tratamento T1) apresentaram em seus frutos, com maior incidência, as injúrias do tipo estria, abrasão e perda de firmeza. Enquanto que as árvores tratadas apenas com irrigação (tratamento T4) apresentaram em seus frutos, principalmente, as injúrias do tipo mancha, estria e injúria no cálice.

Condições de estresse por danos mecânicos, como raladuras, cortes, perfurações, vibrações e quedas, estimulam a atividade respiratória de frutas e hortaliças. A extensão do aumento na taxa de respiração é usualmente proporcional à severidade do dano e pode ser agrupada em causada por dano mecânico (colheita, manuseio, chuva, vento, insetos, etc.) e por infecção devido a microrganismos como fungos e vírus (Chitarra & Chitarra, 2005).

Segundo Souza (2010), caquis produzidos em regiões de maior amplitude térmica apresentam maior ciclo de maturação, maior acúmulo de sólidos solúveis totais e, em consequência, a formação de microfissuras na epiderme, facilitando a ocorrência de escurecimento em pós-colheita.

1.4.1.2. Caracterização Química dos Frutos

As árvores jovens, com a copa em formação (bloco B2) apresentaram, na safra 2010-2011 (1ª safra), frutos significativamente mais ácidos ($p < 0,001$) do que as árvores com a copa já formada (bloco B1), apresentando em média, 0,084 (frutos das árvores do bloco B1) e 0,906 $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de ácido málico (frutos das árvores do bloco B2).

Provavelmente essa maior acidez se deve pela maior competição por carboidratos nas árvores do bloco B2 entre a parte vegetativa (formação da copa e armazenamento de carboidratos para a safra seguinte) e a parte reprodutiva. Este comportamento também é corroborado pelas menores concentração dos sólidos solúveis totais e maiores concentrações dos taninos condensados nesses mesmos frutos (resultados discutidos à frente).

Esta maior competição por carboidratos gera um maior estresse para as árvores. Estando sob maior estresse, estas têm a tendência de produzir metabólitos secundários (muitos deles ácidos orgânicos), o que intensifica o metabolismo dos frutos. A intensa atividade metabólica do fruto, além de aumentar a produção de metabólitos intermediários do ciclo de Krebs (ácidos orgânicos), pode aumentar a acidez dos frutos (Antoniolli et al., 2002).

A acidez é um componente importante na composição do “*flavor*” dos frutos, junto com doçura e a adstringência. Esta é atribuída, principalmente, aos ácidos orgânicos que se encontram dissolvidos nos vacúolos das células, tanto na forma livre, como combinada com sais, ésteres, glicosídeos, etc. Em alguns produtos, os ácidos orgânicos não só contribuem para a acidez, como também, para o aroma característico, porque alguns componentes são voláteis. Os compostos fenólicos também apresentam caráter ácido, podendo, de certa forma, contribuir para a acidez, além da adstringência (Chitarra & Chitarra, 2005).

Pode-se observar na Figura 9 que as árvores (de ambos os blocos) tratadas com cianamida hidrogenada (na 1ª safra), com (tratamentos T2 e T3) e sem irrigação (tratamentos T5 e T6), apresentaram a tendência (nos respectivos blocos) de produzirem os frutos menos ácidos. Sendo que no bloco B2, os frutos das árvores submetidas ao tratamento T4 (apenas irrigação) não diferenciaram-se estatisticamente dos das árvores submetidas aos tratamentos T2 e T3, permanecendo superior aos dos tratamentos T5 e T6. Enquanto que as árvores com a copa totalmente desenvolvida (bloco B1), independente dos tratamentos aplicados, apresentaram sempre frutos menos ácidos.

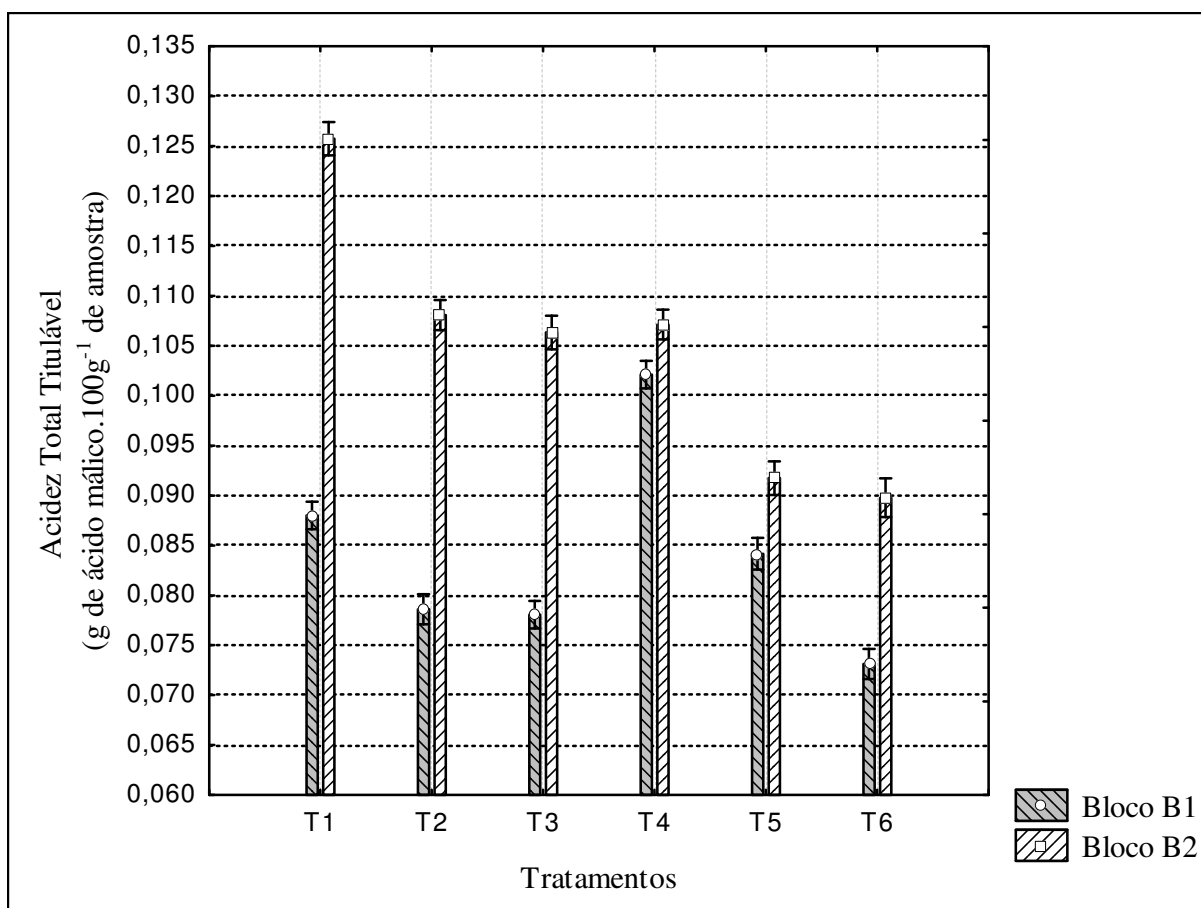


Figura 9. Médias das colheitas para a acidez total titulável dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação aos blocos (1ª safra).

É possível que a cianamida hidrogenada esteja auxiliando a diminuição do estresse nas plantas. Já a utilização da irrigação, isolada (tratamento T4) ou com a cianamida hidrogenada (tratamentos T2 e T3), apresentaram respostas diferentes para as árvores com a copa formada (bloco B1) e a copa em formação (bloco B2).

No bloco B1, a aplicação apenas da irrigação nas árvores proporcionou os frutos com as maiores concentrações de acidez total titulável (ATT), sendo maiores inclusive do que os das árvores do controle (tratamento T1). Enquanto que a irrigação, associada com a cianamida hidrogenada apresentou os frutos com as menores concentrações.

Já no bloco B2, a aplicação nas árvores da irrigação, isoladamente ou associada com a cianamida hidrogenada, não apresentaram diferenças significativas na concentração da ATT nos frutos. Sendo estas concentrações menores apenas dos frutos das árvores do controle.

Ao longo da safra 2010-2011 (1ª safra), ao se avaliar a interação entre colheitas e tratamentos (desconsiderando-se a idade das árvores, blocos), com exceção dos frutos das árvores submetidas aos tratamentos T6 (apenas cianamida hidrogenada) e T4 (apenas irrigação), a concentração de ATT nos frutos aumentou até a quarta colheita, diminuindo então até o final da safra. Já nas árvores submetidas ao tratamento T4, a concentração de ATT diminuiu até a terceira colheita, aumentou na quarta e voltou a diminuir até o final da safra. Enquanto que as submetidas ao tratamento T6 apresentaram frutos com concentrações de ATT estatisticamente iguais até a terceira colheita, diminuindo então até o final da safra (Tabela 4).

Tabela 4. Médias dos blocos para a acidez total titulável dos frutos (gramas de ácido málico. 100g^{-1} de amostra) das plantas submetidas aos diferentes tratamentos, em diferentes colheitas ao longo da safra 2010-2011 (1ª safra).

Colheitas	Tratamentos					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
1 ^a	0,095 Db	0,083 Ce	0,090 Bc	0,119 Aa	0,087 Bcd	0,085 Ade
2 ^a	0,090 CDb	0,085 Cd	0,091 Bc	0,112 Ba	0,087 Bd	0,082 Ae
3 ^a	0,109 Ba	0,085 Ccd	0,090 Bb	0,087 Dbc	0,088 Bbc	0,082 Ad
4 ^a	0,124 Aa	0,118 Ab	0,100 Ac	0,121 Aa	0,095 Ad	0,075 Be
5 ^a	0,101 Ca	0,096 Bb	0,079 Cc	0,100 Ca	0,076 Cc	0,062 Cd
6 ^a	0,072 E	–	0,072 D	0,069 E	–	–

Letras maiúsculas e iguais nas colunas e letras minúsculas e iguais nas linhas não apresentam diferença significativa.

É possível verificar também que a quarta colheita foi a que apresentou os frutos com as maiores concentrações de ATT, com exceção do tratamento T6. Sendo que nas árvores submetidas ao tratamento T4 as concentrações nos frutos da quarta safra não diferiram estatisticamente dos da primeira. Já os frutos das árvores submetidas a cada um dos tratamentos, apresentaram no final da safra as menores concentrações de ATT, com exceção dos das árvores submetidas ao tratamento T2 (cianamida hidrogenada e irrigação), que apresentaram as menores concentrações na segunda e terceira colheitas.

Ao se avaliar a interação entre colheitas e blocos ao longo da safra 2010-2011 (1ª safra), é possível observar que a concentração da ATT nos frutos se comportou de forma diferente entre as árvores com a copa já desenvolvida (bloco B1) e as com a copa em desenvolvimento (bloco B2). Enquanto que a concentração de ATT nos frutos das árvores do bloco B1 oscilou, aumentando e diminuindo até a quarta colheita, para então diminuir até o

final da safra. Os frutos das árvores do bloco B2 apresentaram uma oscilação um pouco menor, onde, diferente das árvores do bloco B1, a concentração de ATT nos frutos no início da safra é alta, diminuindo na segunda colheita, voltando a aumentar na quarta colheita e a diminuir no final da safra (5ª colheita), como descrito na Figura 10.

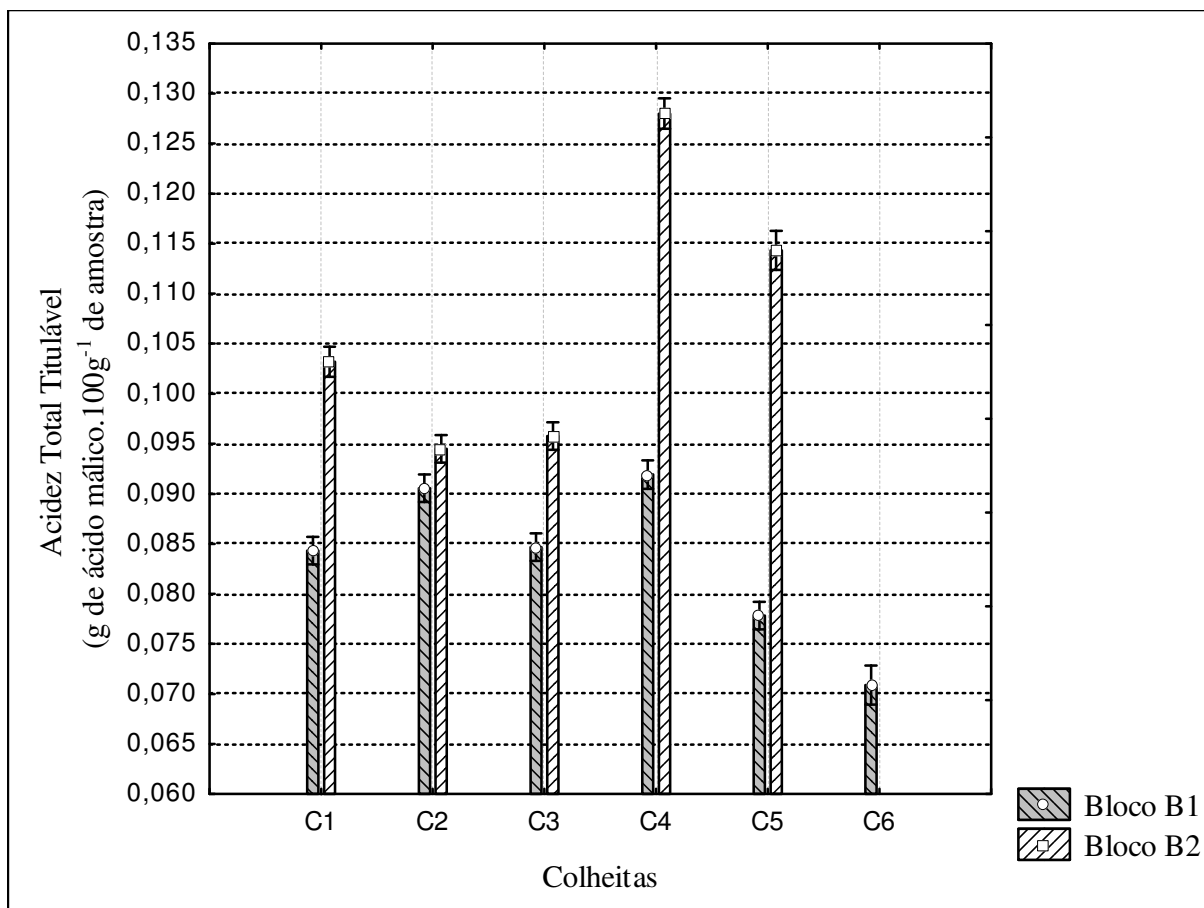


Figura 10. Médias dos tratamentos para a acidez total titulável dos frutos nas colheitas ao longo da safra 2010-2011 (1ª safra), em relação aos blocos.

Possivelmente essas diferenças ocorreram devido a diferença entre a competição por carboidratos apresentado entre as árvores já desenvolvidas (bloco B1) e as em desenvolvimentos (bloco B2). Contudo é provável que outros fatores apresentados ao longo desta safra (clima, solo, etc.) tenham feito com que essas plantas respondessem de forma diferente entre si, podendo o estresse devido a competição por carboidratos não ser o fator de maior influencia.

Em relação a concentração dos sólidos solúveis totais (SST) nos frutos, constatou-se que houve uma diferença significativa ($p < 0,001$) entre os frutos das árvores com as copas já formadas (bloco B1) e os frutos das árvores com as copas em desenvolvimento (bloco B2). Os frutos das árvores do bloco B1 apresentaram maiores concentrações de SST do que os das árvores do bloco B2, apresentando em média, respectivamente, 14,6 e 13,7°Brix.

Provavelmente as menores concentrações de SST nos frutos das árvores com a copa em formação (bloco B2) ocorreram devido a uma maior competição entre a parte vegetativa (formação da copa e armazenamento de carboidratos para a safra seguinte) e a parte reprodutiva das árvores. Isso é corroborado pelas maiores concentração da ATT (como visto

anteriormente) e pelas maiores concentrações dos taninos condensados destes frutos (que serão discutidos à frente).

A competição entre os drenos (órgãos das plantas que consomem ou armazenam os fotoassimilados) é importante para a produtividade e qualidade do produto colhido. Uma maior competição por carboidratos acarreta em um menor acúmulo de sólidos solúveis totais (Pimentel, 1998).

Devido a esta maior competição por carboidratos, as árvores sofrem um estresse maior. Com isto os frutos acabam por terem seu metabolismo intensificado, o que favorece a quebra dos açúcares e dificulta o armazenamento dos SST. A competição em si por carboidratos também prejudica o armazenamento dos SST, uma vez que com o aumento da competição, diminui a chegada de fotoassimilados nos frutos.

É possível observar na Figura 11 que, com exceção das plantas controle (tratamento T1), os frutos das árvores com a copa em formação (bloco B2) apresentaram menores concentrações de SST do que os das árvores com a copa já formada (bloco B1). É possível notar também que os frutos das árvores com a copa já formada (bloco B1) respondem aos diferentes tratamentos de forma diferenciada dos das árvores com a copa em formação (bloco B2).

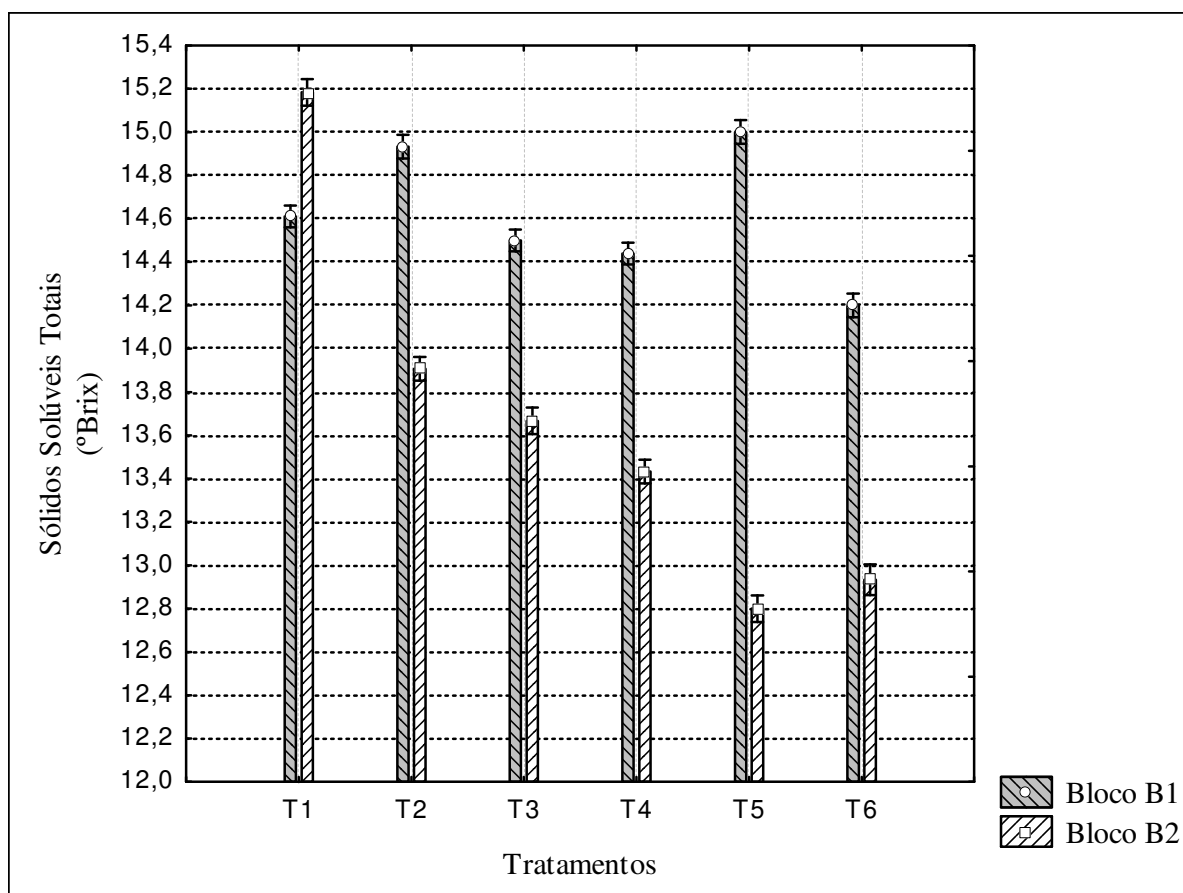


Figura 11. Médias das colheitas para os sólidos solúveis totais dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação aos blocos (1ª safra).

As árvores do bloco B1 apresentam frutos com concentrações de SST próximas às das árvores do controle (tratamento T1). Os frutos das árvores submetidas aos tratamentos T2 (cianamida hidrogenada e irrigação) e T5 (apenas cianamida hidrogenada) apresentaram

maiores concentrações do que as submetidas ao tratamento T1, enquanto que os das árvores submetidas aos tratamentos T3 (cianamida hidrogenada e irrigação), T4 (apenas irrigação) e T6 (apenas cianamida) apresentaram concentrações menores. Já as árvores do bloco B1 apresentaram frutos com concentrações de SST sempre menores do que os frutos das árvores do controle deste bloco.

As menores concentrações de SST nos frutos das árvores do bloco B2 provavelmente ocorreram devido a maior competição por carboidratos entre a parte vegetativa (formação da copa e armazenamento de carboidratos para a safra seguinte) e a parte reprodutiva. É possível também que os tratamentos aplicados nas árvores do bloco B2 tenham estimulado um crescimento vegetativo maior do que as árvores do controle (tratamento T1) deste mesmo bloco. Com este maior crescimento vegetativo a competição por carboidratos aumentaria ainda mais, explicando assim as diferentes respostas aos tratamentos que os blocos apresentaram.

Já na Tabela 5 (interação entre colheitas e tratamentos), verifica-se não haver um tratamento que possa ser indicado como o que apresentou frutos com maiores concentrações de SST ao longo da safra 2010-2011 (1ª safra). Uma vez que em cada uma das colheitas, árvores submetidas a um diferente tratamento apresentaram frutos com maiores concentrações. Apesar disso, quando se considera o comportamento da concentração dos SST dos frutos ao longo das colheitas, nas árvores submetidas a cada um dos tratamentos, verifica-se que quanto mais tempo levou-se para colher os frutos, maiores foram as concentrações.

Tabela 5. Médias dos blocos para os sólidos solúveis totais dos frutos (°Brix) das plantas submetidas aos diferentes tratamentos nas colheitas ao longo da safra 2010-2011 (1ª safra).

Colheitas	Tratamentos					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
1 ^a	13,7 Ea	12,0 Ed	12,1 Fd	13,3 Cb	11,5 Ee	12,5 Dc
2 ^a	13,5 Fa	13,3 Db	13,5Ea	12,0 Dc	13,4 Dab	13,4 Cab
3 ^a	14,7 Db	14,2 Cd	14,0De	13,3 Cf	14,9 Ca	14,4 Bc
4 ^a	15,1 Cb	16,0 Ba	14,9 Cc	14,5 Bd	15,2 Bb	14,4 Bd
5 ^a	16,4 Ab	16,7 Aa	16,2 Bb	15,9 Ac	16,2 Ab	14,7 Ad
6 ^a	15,3 Bc	–	16,4 Aa	15,9 Ab	–	–

Letras maiúsculas e iguais nas colunas e letras minúsculas e iguais nas linhas não apresentam diferença significativa.

O aumento dos teores de SST ao longo da safra 2010-2011 (1ª safra) pode ser devido a diminuição da competição por carboidratos entre os frutos. Conforme estes vão sendo colhidos há a diminuição dos drenos de carboidratos. Com uma menor competição, o estresse sofrido por estas árvores também é menor. Esses dados são corroborados pela diminuição dos teores de taninos condensados (dados apresentados e discutidos posteriormente) e pelo aumento do calibre dos frutos ao longo das colheitas nesta mesma safra (como visto na Tabela 2).

O aumento da concentração dos SST nos frutos, ao longo da safra 2010-2011 (1ª colheita), ocorreu tanto para as árvores com a copa já formada (bloco B1), quanto para as árvores com a copa em formação (bloco B2). Constatou-se também que até a terceira colheita, as árvores do bloco B1 apresentaram sempre frutos com concentrações maiores de SST, sendo que na quarta colheita não houve diferença significativa e na quinta colheita os frutos das árvores do bloco B2 apresentaram maiores concentrações (Figura 12).

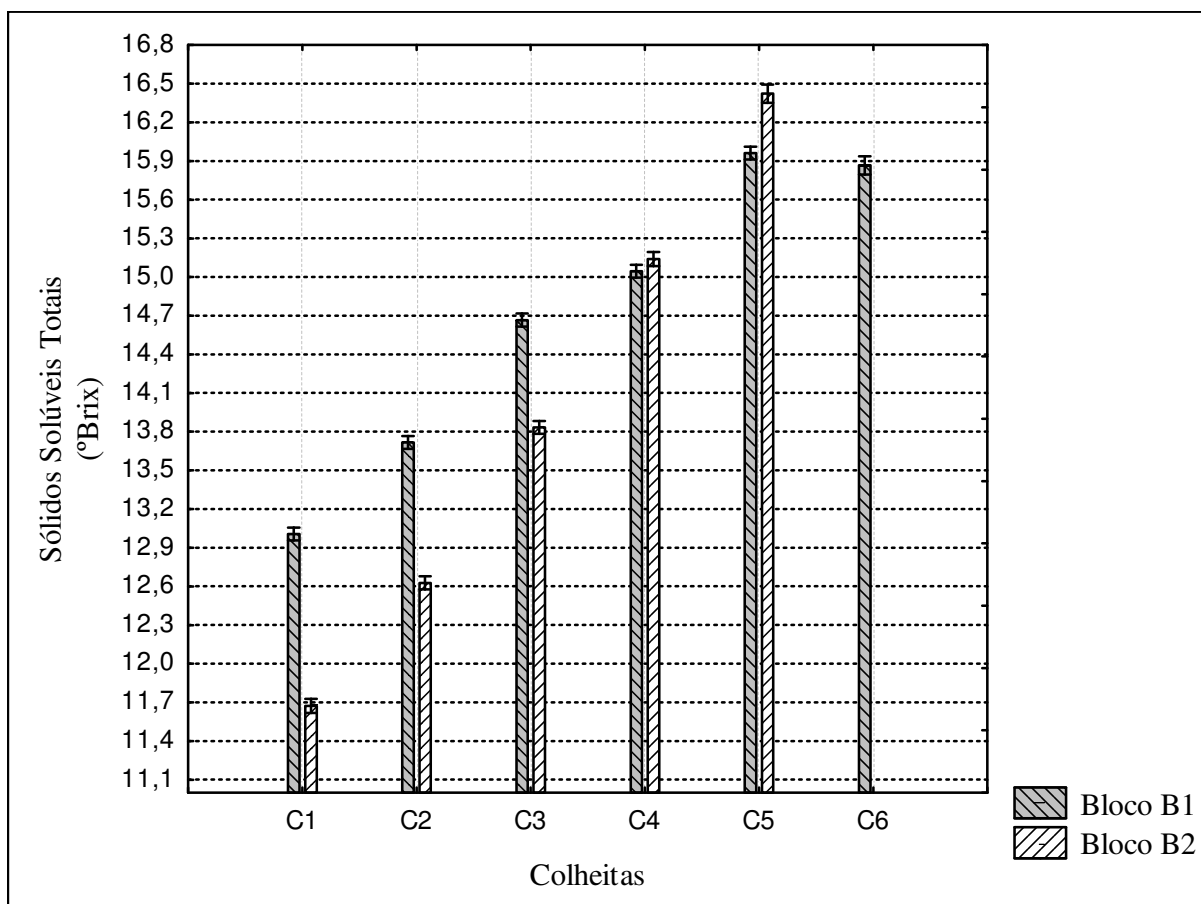


Figura 12. Médias dos tratamentos para os sólidos solúveis totais dos frutos nas colheitas ao longo da safra 2010-2011 (1ª safra), em relação aos blocos.

Foi possível verificar que as árvores do bloco B2 apresentaram frutos com menores concentrações na fase inicial da safra devido a maior competição por carboidratos por conta do maior crescimento vegetativo para a formação da copa. A diminuição da competição com a retirada de drenos de carboidratos (frutos colhidos) pode ter feito com que o estresse enfrentado pelas plantas no Bloco B2 diminuísse de tal forma que a concentração dos SST nos frutos dessas árvores se igualasse à dos frutos das árvores do bloco B1 na fase final da safra e ultrapassasse no fim desta.

Segundo Pimentel (1998), quanto menor o número de drenos, menor será a competição entre estes. Conforme os frutos vão sendo colhidos, ocorre uma menor competição entre estes e a parte vegetativa, proporcionando assim a possibilidade de um maior acúmulo de SST nos frutos remanescentes.

Em relação as concentrações dos taninos condensados (TC) presentes nos frutos, verificou-se que houve diferença significativa ($p < 0,001$) entre os frutos das árvores com a

copa já formada (bloco B1) e os frutos das árvores com a copa em formação (bloco B2). Os frutos das árvores do bloco B1 apresentaram em média uma concentração inferiores de TC ($2,76\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$) do que os frutos das árvores do bloco B2 ($3,17\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$).

É provável que isto tenha ocorrido devido a maior competição por carboidratos, das árvores do bloco B2, entre a parte vegetativa (formação da copa e armazenamento de carboidratos para a safra seguinte) e a parte reprodutiva da planta. Isso é corroborado pelas menores concentrações de SST e maiores concentrações de ATT nesses mesmos frutos (como visto anteriormente)

Evolutivamente as plantas tendem a sintetizar compostos, subprodutos do seu metabolismo primário, para diversas aplicações, como atrativos de polinizadores ou inibidores de fitófagos (Monteiro et al., 2005). Um desses compostos do metabolismo secundário das plantas são os taninos, polímeros de compostos fenólicos (Guimarães-Beelen et al., 2006). Os compostos fenólicos que são originados do metabolismo secundário das plantas se formam em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiação UV, dentre outros (Angelo & Jorge, 2007).

Os tratamentos de cianamida hidrogenada aplicados nas árvores apresentaram uma tendência de resposta diferenciada entre as árvores com a copa formada (bloco B1) e as com a copa em formação (bloco B2): Enquanto que as árvores submetidas aos tratamentos T3 (cianamida hidrogenada e irrigação), T5 e T6 (apenas cianamida hidrogenada em ambos tratamentos) apresentaram frutos com concentrações maiores de TC no bloco B2, as árvores submetidas ao tratamento T2 (cianamida hidrogenada e irrigação) não apresentaram diferenças significativas entre os blocos. Já as árvores do controle (tratamento T1) apresentaram concentrações maiores no bloco B1 e as submetidas apenas à irrigação (tratamento T4) não apresentaram diferenças significativas (Figura 13).

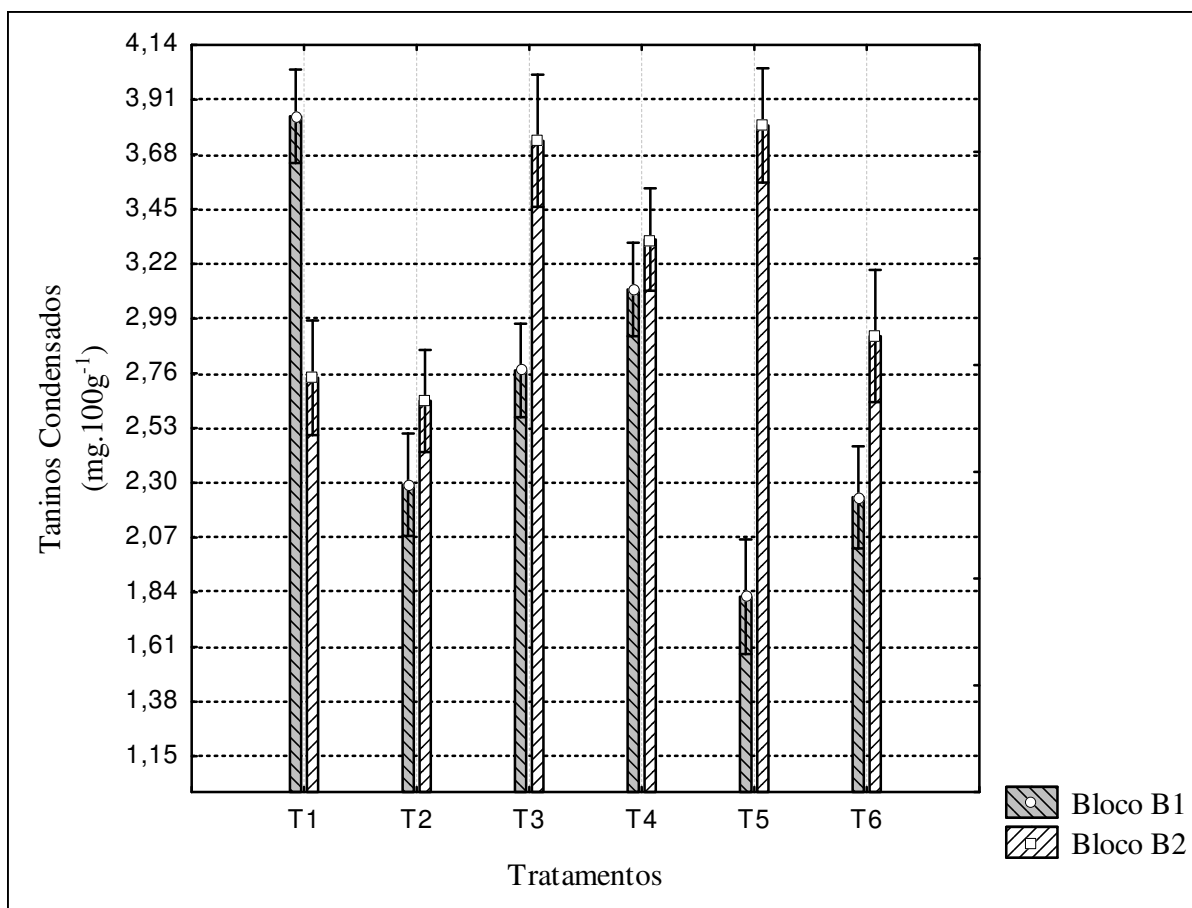


Figura 13. Médias das colheitas para os taninos condensados dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação aos blocos (1ª safra).

É possível que a cianamida hidrogenada, independente da utilização da irrigação, esteja estimulando o crescimento vegetativo das árvores do bloco B2, o que aumentaria a competição por carboidratos e conseqüentemente o estresse sofrido. Apesar disto, o estímulo do crescimento vegetativo das árvores com a copa em formação (bloco B2) pode ser interessante a longo prazo.

As concentrações dos TC foram menores nos frutos que permaneceram mais tempo nas árvores. Sendo que ao longo de toda a safra 2010-2011 (1ª safra) as árvores do controle (tratamento T1) foram as que apresentaram os frutos com as maiores concentrações, com exceção apenas da última colheita (6ª colheita). Verificou-se também que a diferença entre a concentração de TC nos frutos das árvores do controle diminuiu nas últimas colheitas, onde estes não apresentaram diferenças significativas dos frutos das árvores submetidas aos tratamentos: T 3 (cianamida hidrogenada e irrigação) na quinta colheita; do T4 (apenas irrigação) na quarta e quinta colheita; e T6 (apenas cianamida hidrogenada) na quinta colheita (Tabela 6).

Tabela 6. Médias dos blocos para os taninos condensados ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$) dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos nas colheitas ao longo da safra 2010-2011 (1ª safra).

Colheitas	Tratamentos					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
1 ^a	6,51 Aa	4,07 Ae	5,87 Ab	5,38 Ac	4,66 Ad	3,93 Ae
2 ^a	4,08 Ba	2,82 Bb	2,98 Bcd	3,53 Bbc	3,96 Bab	1,67 Ce
3 ^a	4,45 Ba	2,58 Bcd	2,78 Bc	3,46 Bb	1,79 Ce	2,29 Bd
4 ^a	2,60 Ca	1,48 Cc	1,97 Cb	2,16 CDab	2,03 Cb	2,24 BCab
5 ^a	1,98 Da	1,39 Cb	1,53 Cab	1,81 Dab	1,36 Db	1,93 BCab
6 ^a	1,28 Eb	–	2,10 Ca	2,59 Ca	–	–

Letras maiúsculas e iguais nas colunas e letras minúsculas e iguais nas linhas não apresentam diferença significativa.

A diminuição da concentração dos TC nos frutos que permaneceram por mais tempo nas árvores provavelmente ocorreu devido a diminuição do estresse que estas sofriam pela competição por carboidratos. Conforme os drenos de carboidratos foram retirados ao longo da safra (frutos colhidos), a competição por este diminuiu e com ela o estresse sofrido pelas plantas.

A provável diminuição da competição entre os frutos ao longo da safra, e por consequência do estresse, é corroborada pelo aumento nos SST (como visto anteriormente – Tabela 5) e pelo aumento dos calibres desses mesmos frutos (como na Tabela 2). Segundo Pimentel (1998), quanto menor o número de drenos, menor será a competição entre estes, sendo que quase todo o carbono que vai para o dreno é proveniente da atividade fotossintética durante o período de enchimento deste dreno.

É possível que a diminuição da diferença entre os frutos das árvores do controle (tratamento T1) e as demais árvores no final da colheita seja exatamente por isso. Com a diminuição do estresse ao longo da safra, os frutos dessas árvores apresentaram uma diminuição da concentração de TC nos frutos que caíram a níveis semelhantes de outros tratamentos.

As maiores concentrações de TC nos frutos das árvores do controle (tratamento T1) por toda a safra 2010-2011 (1ª safra) indicam que, provavelmente em algum momento ao longo da safra, os tratamentos aplicados podem ter contribuído para a diminuição dos estresses sofridos pelas árvores. Já em relação as concentrações dos TC nos frutos dos diferentes blocos ao longo das colheitas (interação bloco-colheita), não houve diferença significativa entre estes ($p>0,119$).

1.4.2. Safra 2011-2012 (2ª Safra)

As colheitas da safra 2011-2012 (2ª safra) ocorreram entre oito de Março de 2012 (08/02/2012) e dezoito de Maio de 2011 (18/05/2011), sendo efetuadas de 15 em 15 dias e compreendendo um total de seis colheitas.

A cianamida hidrogenada aplicada nas árvores durante esta safra, com (tratamentos T2) e sem irrigação (tratamentos T5), não proporcionou antecipação no início da colheita.

Contudo estas apresentaram frutos somente até a quinta colheita, indicando que a cianamida hidrogenada teve um efeito de concentração das colheitas. As árvores com as copas ainda em desenvolvimento (bloco B2) também apresentaram concentração da safra, não apresentando frutos na sexta colheita. O fato da copa ainda estar em desenvolvimento pode propiciar condições favoráveis para maturação mais rápida dos frutos, como por exemplo uma maior entrada de raios solares devido a uma copa menos densa e/ou uma maior temperatura no interior da copa.

1.4.2.1. Fenologia

Os dados de fenologia foram coletados apenas durante a safra 2011-2012 (2ª safra), onde se poderia obter informações sobre a aplicação sucessiva da cianamida hidrogenada e a influência dos tratamentos da safra anterior.

Constatou-se que a fenologia das árvores de caqui 'Mikado' não apresentaram diferenças significativas entre os blocos. Indicando que, nas condições em que o estudo se desenvolveu, árvores com a copa ainda em formação (bloco B2) apresenta o mesmo padrão fenológico do que árvores com a copa já totalmente formada (bloco B1).

Como será demonstrado à frente, verificou-se diferenças entre o período de brotação vegetativa, floração e frutificação dos tratamentos que não levaram a aplicação da cianamida hidrogenada na 2ª safra (2011-2012) para os que levaram aplicação da cianamida hidrogenada, sendo com (T2) ou sem irrigação (T5). Entretanto, não verificou-se diferenças na brotação das árvores que receberam os tratamentos com cianamida hidrogenada apenas na primeira safra (2010-2011), com aplicação de irrigação (T3) ou sem aplicação da irrigação (T6), em relação aos tratamentos que não receberam cianamida hidrogenada em nenhuma das safras, com aplicação de irrigação (T4) ou não (T1).

O modo de ação da cianamida hidrogenada como produto químico, para a quebra de dormência, não é conhecido. Sabe-se, entretanto, que este produto é rapidamente absorvido e causa diminuição da atividade da catalase, sem modificar a da peroxidase. Como resultado, verifica-se aumento da concentração de água oxigenada (H_2O_2) nos tecidos das gemas. Este aumento poderia ser responsável pela ativação do ciclo das pentoses e consequente indução da quebra de dormência das gemas. A cianamida hidrogenada induz a rápida mudança no conteúdo de glutathione reduzida (GSH), em gemas de pessegueiro. A diminuição do nível de GSH dentro de 12 horas após a aplicação de cianamida hidrogenada pode sugerir que a GSH presente nos tecidos foi provavelmente utilizada na desintoxicação da água oxigenada gerada, quando a atividade da catalase foi inibida (Mizobutsi et al., 2003).

1.4.2.1.1. Brotação Vegetativa

Considerando-se o período do início até o aparecimento máximo das brotações vegetativas, nos ramos avaliados, não houve diferença entre as árvores que possuíam a copa já desenvolvida (bloco B1) e as árvores com a copa ainda em desenvolvimento (bloco B2). Os tratamentos que foram submetidos a aplicação de cianamida hidrogenada na segunda safra (2011-2012), com irrigação (tratamento T2) ou sem irrigação (tratamento T5), apresentaram um adiantamento do surgimento de suas brotações em pelo menos duas semanas. Já o tratamento T4 (apenas irrigação nas duas safras) foi o que demonstrou o maior atraso na brotação vegetativa, tendo iniciada uma semana depois das árvores do controle, tratamento T1 (Figura 14).



Figura 14. Plantas de caqui ‘Mikado’ do bloco B2. À direita, plantas tratadas com cianamida hidrogenada e irrigação (tratamento T2), à esquerda (frente), plantas tratadas apenas com irrigação (tratamento T4).

Constatou-se também que os tratamentos T2 (irrigação e cianamida hidrogenada nas duas safras) e T5 (apenas cianamida hidrogenada nas duas safras) foram os que apresentaram um maior período de brotação, cinco semanas, enquanto que o menor foi o tratamento T4 (apenas irrigação nas duas safras), 2,5 semanas (Figura 15).

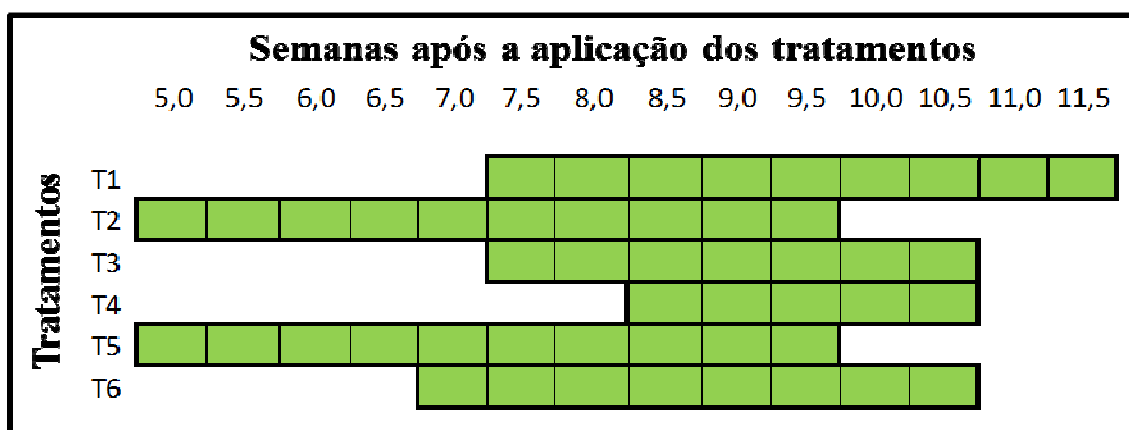


Figura 15. Médias dos blocos para o início do aparecimento da brotação vegetativa até a brotação vegetativa máxima dos ramos avaliados das plantas submetidas aos diferentes tratamentos, em relação às semanas após a aplicação destes.

O adiantamento da brotação vegetativa pode vir a ser bom para as plantas a médio e longo prazo. Quanto mais cedo ocorrer a brotação, mais cedo as plantas irão possuir folhas fontes de carboidratos. Com isso, estas plantas poderão, antes das outras, começar a armazenar carboidratos para a safra seguinte e/ou utiliza-lo para a formação de novos ramos e dos órgãos reprodutivos.

Segundo Mizobutsi et al. (2004), avaliando a quebra de dormência do caqui Costata, verificaram que quanto mais tarde ocorreu a aplicação da cianamida hidrogenada, menor foi a antecipação da brotação, do florescimento e da colheita.

A cianamida hidrogenada é capaz de promover a antecipação da brotação em caquizeiro da variedade 'Fuyu' (Ayub et al., 2009). De acordo com trabalhos realizados por Mizobutsi et al. (1997), variedades diferentes de caquizeiro tratadas com cianamida hidrogenada demonstraram antecipações de brotação diferentes entre si. As variedades Jirô, Giombo, Regina, Costata, Rama Forte e Cereja apresentam um adiantamento de brotação de 10 semanas em média, enquanto que a variedade Rubi apenas 5 semanas. Apesar da diferença da brotação vegetativa, todas as variedades, por eles estudadas, adiantam suas colheitas entre 5 e 9 semanas, sem diferirem entre si. Isto pode indicar que a antecipação da colheita com o uso da cianamida hidrogenada não está ligada somente à antecipação da brotação com a quebra da dormência, uma vez que neste mesmo trabalho, eles não verificaram diferença na antecipação do florescimento.

A intensidade da brotação só começou a se igualar entre os tratamentos na 9ª semana (Figura 16), ou seja, a cianamida hidrogenada não só adiantou o aparecimento da brotação em duas semanas, como fez com que o vigor da brotação inicial fosse maior, demorando um total de quatro semanas para que a porcentagem de gemas vegetativas brotadas fossem estatisticamente iguais entre os tratamentos. Isso pode acarretar uma vantagem para as plantas tratadas com a cianamida hidrogenada, pois essas apresentaram folhas fontes de carboidratos antes e em um número inicial maior do que as demais plantas.

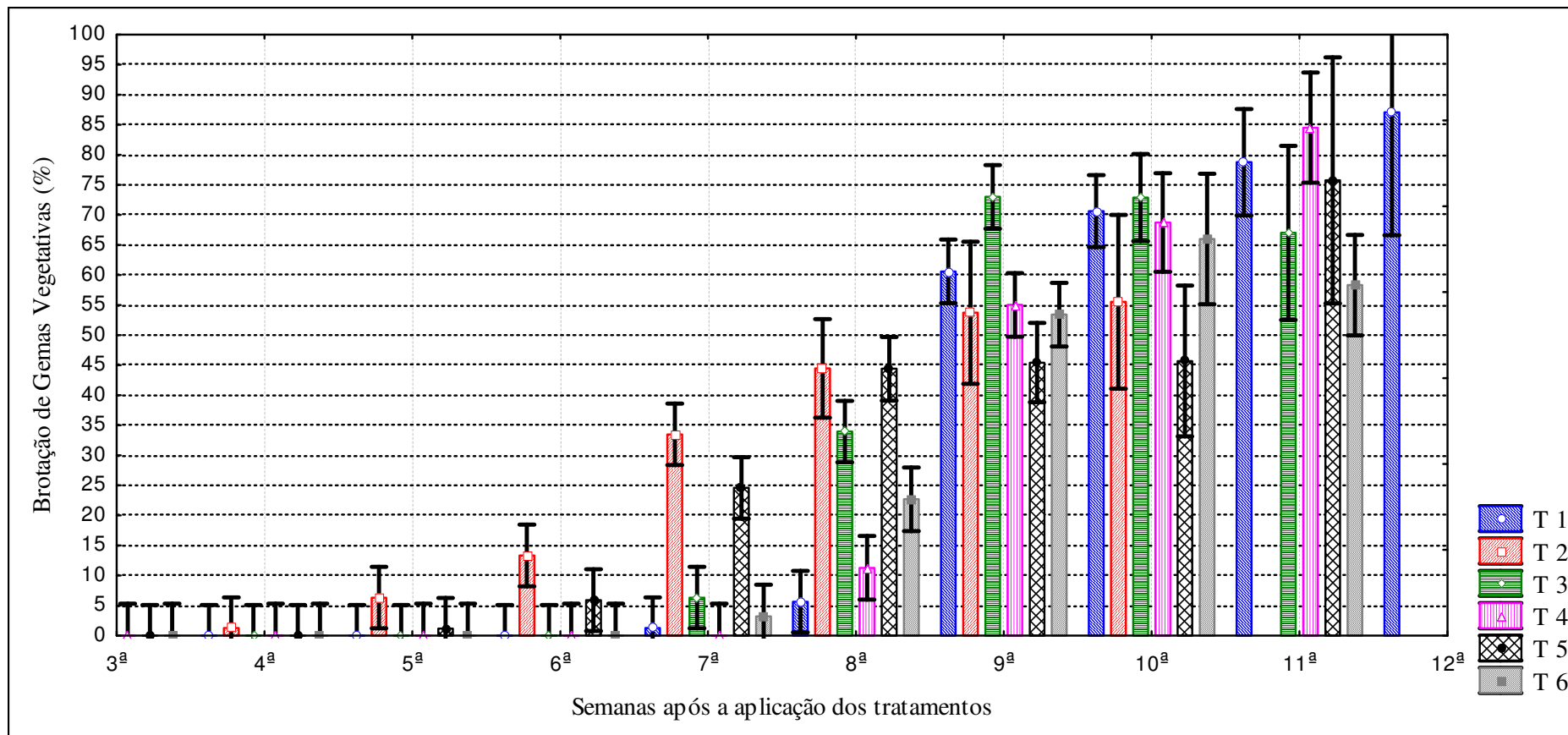


Figura 16. Médias dos blocos para a intensidade do aparecimento das brotações vegetativas nos ramos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos até a brotação máxima, em relação ao tempo (semanas) após a aplicação destes.

Os tratamentos demonstraram também diferenças na época em que as plantas apresentaram suas brotações máximas. As árvores que receberam aplicação da cianamida hidrogenada nas duas safras, com (tratamento T2) ou sem irrigação (tratamento T5), alcançaram a brotação máxima oito semanas após a aplicação dos tratamentos. Enquanto que as árvores que receberam aplicação de cianamida hidrogenada apenas na primeira safra, com (tratamento T3) ou sem irrigação (tratamento T6) levaram nove semanas para a brotação máxima. Já as árvores tratadas apenas com irrigação (tratamento T4) demoraram dez semanas e as árvores do controle (tratamento T1) foram as que mais demoraram, levando onze semanas.

As árvores que receberam a cianamida hidrogenada apenas na primeira safra, com (tratamento T3) ou sem irrigação (tratamento T6), podem ter acumulado mais reservas em seus caules e raízes para a safra seguinte. O que explica um maior vigor em suas brotações quando comparadas às árvores que não foram submetidas a aplicação da cianamida hidrogenada. A irrigação, por sua vez, não influenciou nos resultados quando associada com a cianamida hidrogenada. Contudo, quando sozinha (tratamento T4), proporcionou um maior vigor na brotação vegetativa do que as árvores do controle (tratamento T1).

1.4.2.1.2. Floração

Considerando-se o período do início até o aparecimento máximo da floração (aparecimento tanto de flores fechadas quanto de flores abertas), nos ramos avaliados, não houve diferença entre as árvores que possuíam a copa já desenvolvida (bloco B1) e as árvores com a copa ainda em desenvolvimento (bloco B2).

Os tratamentos que receberam a cianamida hidrogenada apresentaram uma antecipação de 2 semanas do início da floração (aparecimento de flores fechadas). Contudo, a diferença foi reduzida para apenas 0,5 semana quando comparado com as flores abertas. A cianamida hidrogenada provocou um aumento no período do aparecimento das flores fechadas até o início do aparecimento das flores abertas.

As árvores que não receberam a cianamida hidrogenada na segunda safra (tratamentos T1, T3, T4 e T6) demoraram de 0,5 a 1 semana do aparecimento das primeiras flores fechadas até o das primeiras flores abertas, enquanto que as que receberam os tratamentos T2 (cianamida hidrogenada e irrigação nas duas safras) e T5 (apenas cianamida hidrogenada nas duas safras) levaram de 2,5 a 2 semanas, respectivamente (Figura 17).

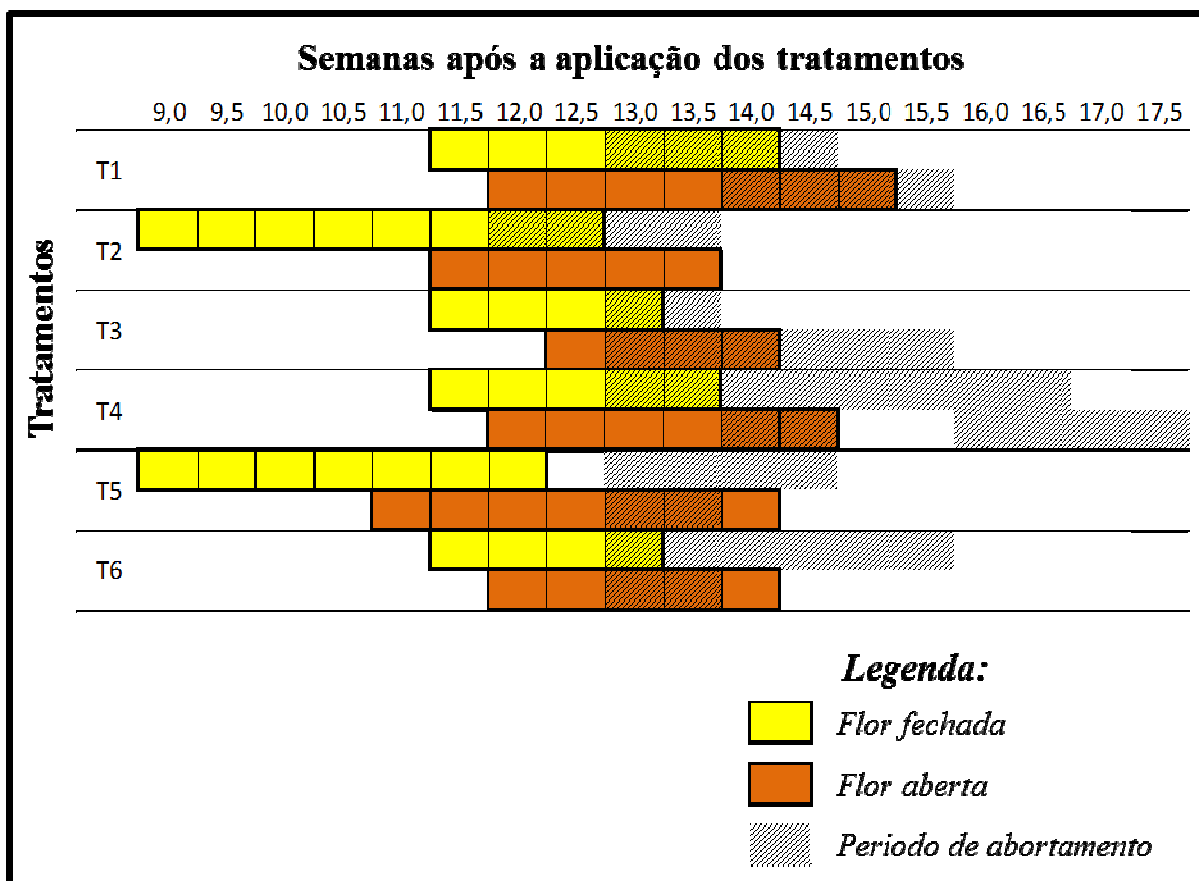


Figura 17. Médias dos blocos para o período de aparecimento e de abortamento de flores abertas e fechadas, nos ramos avaliados, das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação ao tempo (semanas) após aplicação destes.

Esses resultados indicam que possivelmente para a variedade de caqui ‘Mikado’ o início do aparecimento de flores fechadas está associado com o início da brotação, onde em geral, levou de 3 a 4,5 semanas a partir do início da brotação até o início da floração, como pode ser visualizado na Tabela 7. A maioria das árvores levou 4,0 semanas, somente as submetidas aos tratamentos T4 (apenas irrigação nas duas safras) e T6 (cianamida hidrogenada apenas na primeira safra) que levaram 3,0 e 4,5 semanas, respectivamente.

Tabela 7. Tempo (em semanas) entre as médias dos blocos para o início do aparecimento da brotação vegetativa e o surgimento de flor fechada e aberta, nas plantas submetidas aos diferentes tratamentos, na safra 2011-2012 (2ª safra).

Tratamentos	Período de Tempo em Semanas		
	Brotação Vegetativa – Flor Fechada	Brotação Vegetativa – Flor Aberta	Flor Fechada – Flor Aberta
T1	4,0	4,5	0,5
T2	4,0	6,5	2,5
T3	4,0	5,0	1,0
T4	3,0	3,5	0,5
T5	4,0	6,0	2,0
T6	4,5	5,0	0,5

Contudo, a abertura da flor fechada provavelmente está associada mais a fatores exógenos (temperatura, fotoperíodo, etc.) do que a brotação vegetativa das plantas. Uma vez que a abertura das flores ocorreu na 12ª semana (± 1 semana) da aplicação dos tratamentos, independente do tratamento aplicado nas árvores. Com isso, o período em que só se tinha flores fechadas foi maior nos tratamentos que receberam cianamida hidrogenada na safra da avaliada, tratamentos T2 (cianamida hidrogenada e irrigação nas duas safras) e T5 (apenas cianamida hidrogenada nas duas safras).

Mizobutsi et al. (1997) verificaram que a cianamida hidrogenada, utilizada para antecipar a safra de sete variedades de caquizeiro, antecipou a floração em até 10 semanas. Apesar de algumas variedades terem antecipado mais a brotação inicial do que outras, não foi diferente para a antecipação do florescimento.

Segundo Corsato et al. (2005), avaliando a fenologia do caquizeiro Rama Forte em clima tropical, verificaram que após 31 dias do início da brotação das gemas vegetativas ocorreu um florescimento vigoroso, com flores de coloração amarelo-creme, exclusivamente do sexo feminino. O florescimento se prolongou por 16 dias, sob uma temperatura média de 20 °C.

Apesar dos ramos das árvores tratadas com cianamida hidrogenada terem permanecido um período maior na fase de floração, esse fato não deve ter influenciado as reservas de carboidratos para a safra seguinte, uma vez que as flores não demandam uma quantidade muito grande de carboidratos.

De acordo com Pimentel (1998), quando se inicia o desenvolvimento do fruto e de sementes, há uma dominância do crescimento destes órgãos sobre os órgãos vegetativos (parte aérea e raiz), enquanto as flores ainda são pobres competidoras. No período da floração há um aumento de atividade fotossintética das folhas, porém, nesse estágio não há grande acúmulo de matéria seca como no estágio de enchimento do fruto.

Os ramos das árvores que não receberam cianamida hidrogenada na segunda safra (tratamentos T1, T3, T4 e T6) apresentaram sua brotação vegetativa máxima entre a 9ª e a 11ª semana após a aplicação dos tratamentos. Enquanto que os que receberam cianamida hidrogenada na segunda safra, com (T2) ou sem irrigação (T4), já apresentavam pelo menos 50% do máximo de suas flores fechadas na 11ª semana (Figura 18).

Apesar da diferença no início do aparecimento de flor fechada nos ramos das árvores submetidas aos diferentes tratamentos, verificou-se que o aparecimento máximo de flores fechadas foi na mesma época, independente do tratamento que a árvore tenha recebido (12ª semana após a aplicação dos tratamentos). Foi possível constatar também que, provavelmente, a cianamida hidrogenada associada com a irrigação tenha influenciado a intensidade da brotação das flores.

Até a 10ª semana após a aplicação dos tratamentos, apenas as árvores tratadas com cianamida hidrogenada na segunda safra (T2 e T5) apresentavam flores fechadas. Entretanto, as árvores submetidas ao tratamento T2 (cianamida hidrogenada e irrigação nas duas safras) apresentaram uma quantidade estatisticamente superior de flores fechadas do que as que receberam o tratamento T5 (apenas cianamida hidrogenada nas duas safras) da 8ª semana até a 12ª semana.

De acordo com Mizobutisi et al. (2004) a antecipação da colheita está associada à antecipação da brotação e do florescimento. Contudo, segundo Alves et al. (2012), quanto mais tardio for o início da floração, menor será a possibilidade de danos por geada em regiões suscetíveis.

A aplicação da cianamida hidrogenada associada com a irrigação apenas na primeira safra (tratamento T3) pode estar influenciando o aparecimento das flores fechadas na segunda safra. Se as plantas tratadas com a cianamida hidrogenada e irrigação na primeira safra estiverem armazenando uma maior reserva de carboidratos de uma safra para a próxima, isso pode proporcionar um maior vigor na brotação das flores fechadas. Talvez seja isso que tenha ocorrido na segunda safra deste experimento, onde, na 11ª semana após a aplicação dos tratamentos, as árvores tratadas com cianamida hidrogenada e irrigação apenas na primeira safra (tratamento T3) foram as que apresentaram a segunda maior quantidade de flores fechadas, não diferindo estatisticamente das do tratamento T5.

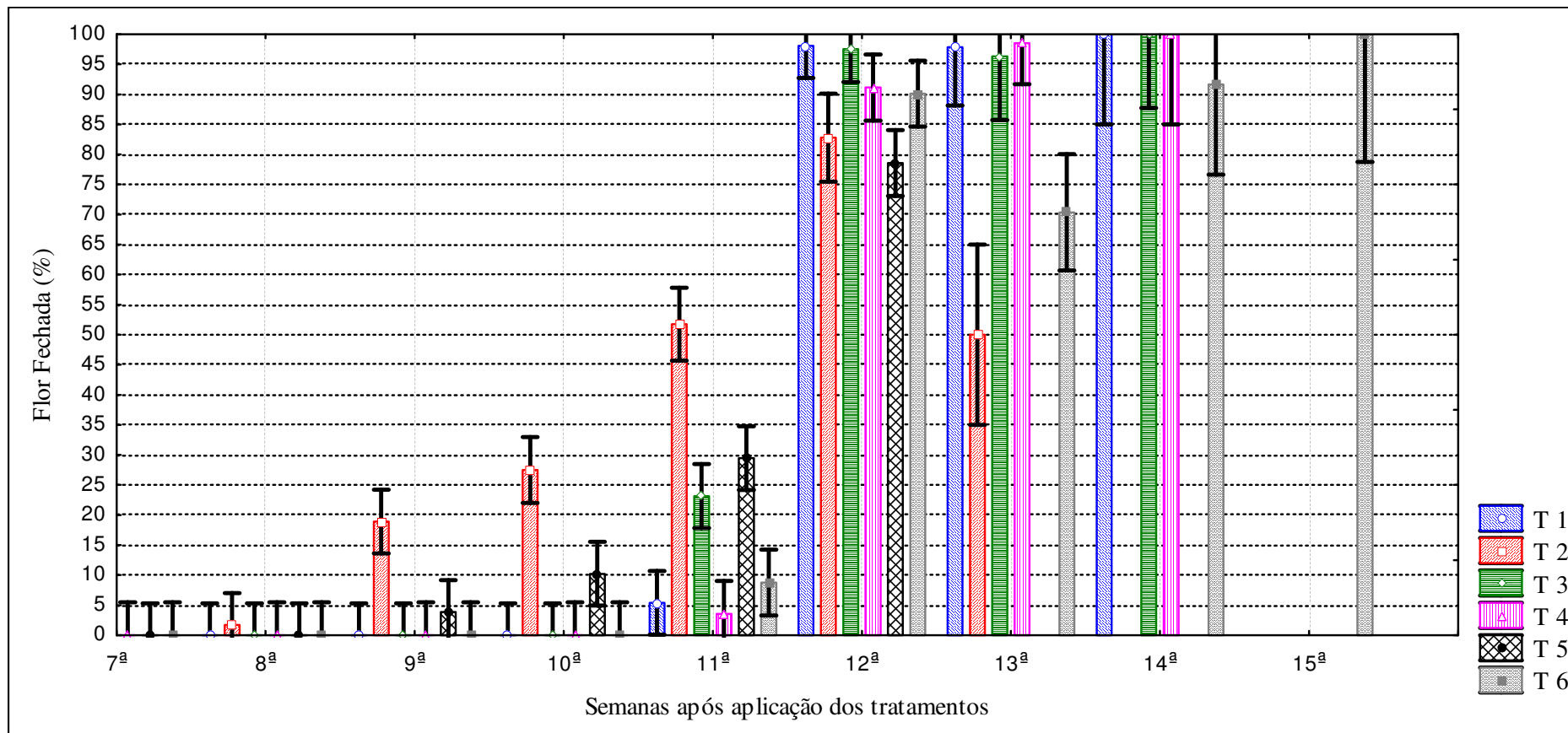


Figura 18. Médias dos blocos para a intensidade do aparecimento de flores fechadas nos ramos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos até ao aparecimento máximo destas, em relação ao tempo (semanas) após a aplicação dos tratamentos.

A temperatura é um dos fatores que influencia no florescimento do caquizeiro. Na Austrália, cuja temperatura média na primavera é de 21°C, o florescimento ocorre 30 dias (por volta de 4 semanas) após a brotação das gemas e dura de 7 a 10 dias; na Nova Zelândia, devido o seu clima temperado ameno e temperatura média na primavera de 14°C, o florescimento tem início após brotação das gemas, finalizando entre 14 e 28 dias (Corsato, 2004).

O período onde todos os tratamentos apresentaram abortamento de flor fechada foi durante a 13ª semana após a aplicação dos tratamentos. As árvores experimentais apresentaram a duração do abortamento de flores fechadas entre uma (tratamento T3) e quatro semanas (tratamento T4), sendo duas semanas para os tratamentos T1, T2 e T5 e três semanas para o tratamento T6 (Figura 19). Já para o abortamento de flores abertas, considerando-se as árvores de todos os tratamentos, variou entre a 13ª e a 17ª semana. Apenas as árvores do tratamento T2 (cianamida hidrogenada e irrigação nas duas safras) não apresentaram abortamento desta estrutura. Já os tratamentos T5 (apenas cianamida hidrogenada nas duas safras) e o T6 (apenas cianamida hidrogenada na primeira safra) apresentaram somente uma semana de abortamento, enquanto que as árvores dos demais tratamentos apresentaram abortamento em três semanas. Sendo o máximo de abortamento na 13ª semana para as árvores do tratamento T3 (cianamida hidrogenada e irrigação apenas na primeira safra) e na 14ª semana para os tratamentos T1 (árvores do controle) e T4 (irrigação nas duas safras), como pode ser visualizado na Figura 20.

O abortamento de flores e frutos ocorre naturalmente em árvores de caquizeiro. A competição entre os drenos (órgãos das plantas que consomem ou armazenam os fotoassimilados) é importante para a produtividade e qualidade do produto colhido. Em tomateiro, o primórdio da inflorescência pode abortar se o fornecimento de assimilados for suficiente somente para os meristemas vegetativos da parte aérea e raiz. Posteriormente, quando a taxa de crescimento do fruto for máxima, a dos meristemas vegetativos será mínima (Pimentel, 1998).

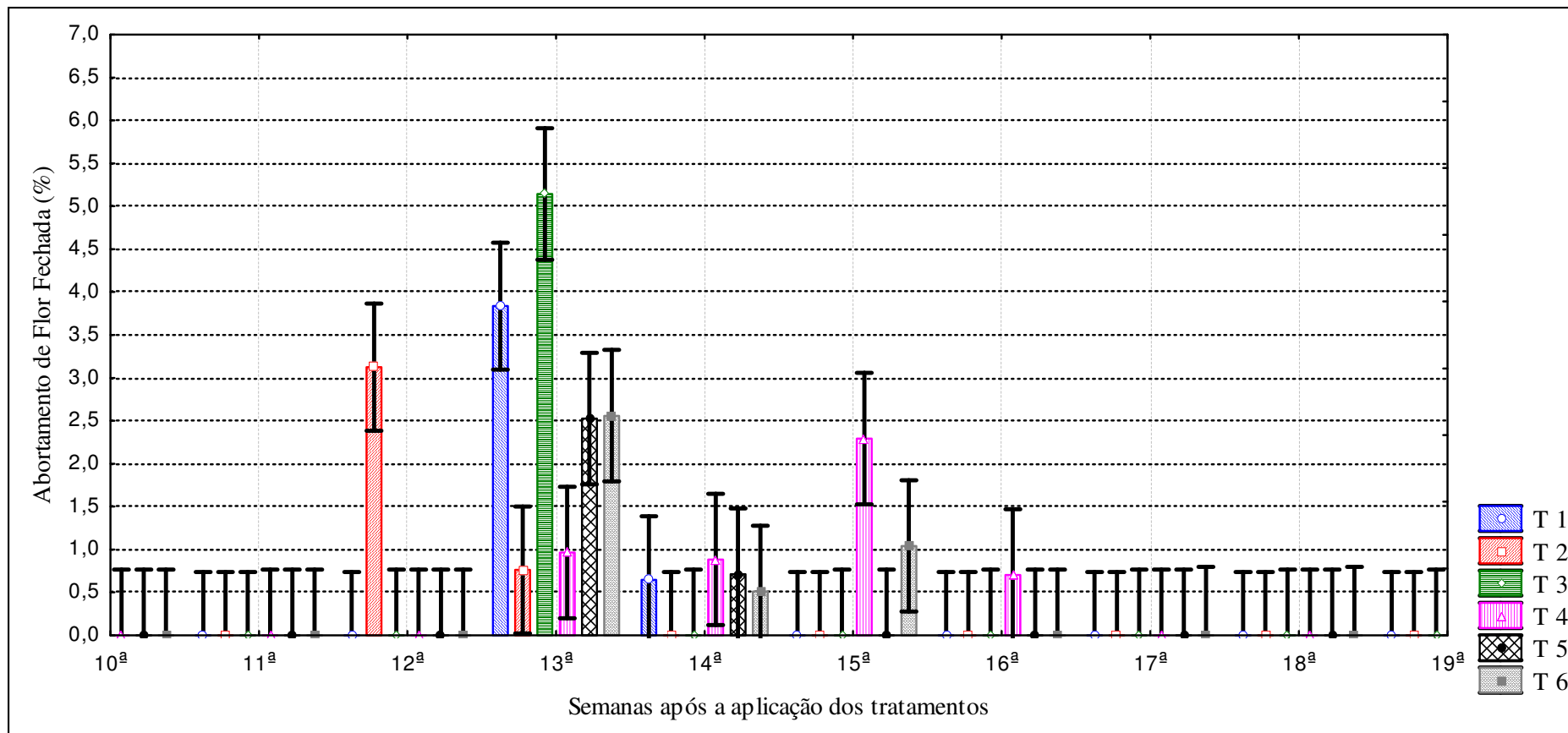


Figura 19. Médias dos blocos para a intensidade do abortamento das flores fechadas nos ramos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos, em relação ao tempo (semanas) após a aplicação destes.

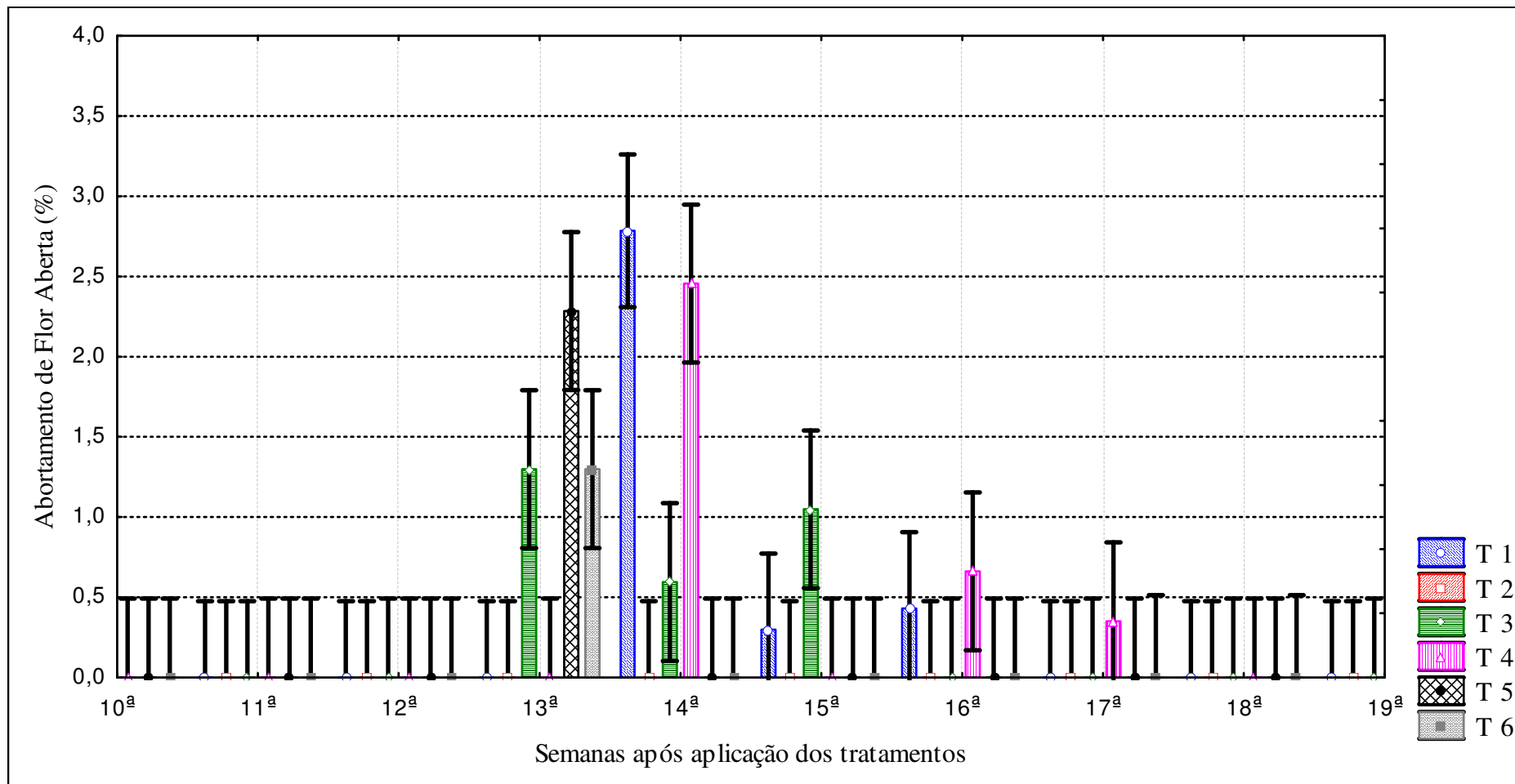


Figura 20. Médias dos blocos para a intensidade dos abortamentos das flores abertas nos ramos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos, em relação ao tempo (semanas) após a aplicação destes.

É possível que o abortamento floral tenha ocorrido devido ao aparecimento dos frutos tipo “chumbinho” e dos frutos em desenvolvimento (dados discutidos no item 1.4.2.1.3.). Ao se comparar as semanas (após a aplicação dos tratamentos) em que houve os abortamentos de flores fechadas e flores abertas, com as que apareceram os frutos tipo “chumbinho” e frutos em desenvolvimento, verifica-se que ocorreram praticamente no mesmo período. Os abortamentos começaram depois, ou na semana do aparecimento dos frutos. A diferença entre as semanas para as árvores submetidas aos tratamentos T2 e T3 foi de $\pm 0,5$ semanas, ± 1 semana para as submetidas aos tratamentos T5 e T6, $\pm 1,5$ semanas para as submetidas ao tratamento T1 e $\pm 3,5$ semanas para as submetidas ao tratamento T4 (Tabela 8).

Tabela 8. Semanas após a aplicação dos tratamentos em que ocorreram o abortamento de flores fechadas e abertas e o aparecimento de frutos tipo “chumbinho” e em desenvolvimento, na safra 2011-2012 (2ª safra).

Tratamentos	Abortamentos		Aparecimentos	
	Flor Fechada	Flor Aberta	Fruto tipo “Chumbinho”	Fruto em Desenvolvimento
T1	<i>13 e 14</i>	<i>14 ; 15 e 16</i>	<i>12,5</i>	<i>14,5</i>
T2	<i>12 e 13</i>	—	<i>11,5</i>	<i>13</i>
T3	<i>13</i>	<i>13 ; 14 e 15</i>	<i>12,5</i>	<i>14,5</i>
T4	<i>13 ; 14 ; 15 e 16</i>	<i>14 ; 16 e 17</i>	<i>13</i>	<i>14,5</i>
T5	<i>13 e 14</i>	<i>13</i>	<i>12</i>	<i>13</i>
T6	<i>13 ; 14 e 15</i>	<i>13</i>	<i>12</i>	<i>14,5</i>

A cianamida hidrogenada pode estar interferindo no processo de abortamento floral dos caquizeiros da variedade ‘Mikado’ concentrando o período de abortamento, podendo inclusive estar influenciando em parte o abortamento da safra seguinte. As árvores que receberam tratamentos com cianamida hidrogenada nas duas safras, com (tratamento T2) e sem irrigação (tratamento T5), apresentaram duas semanas com abortamento floral (flores fechadas e abertas). Já as que receberam a cianamida hidrogenada apenas na primeira safra, com (tratamento T3) e sem irrigação (tratamento T6), apresentaram (na 2ª safra) três semanas com abortamento floral. Enquanto que as árvores tratadas apenas com irrigação (tratamento T4) e as árvores do controle (tratamento T1) apresentaram, respectivamente, cinco e quatro semanas com abortamento floral.

1.4.2.1.3. Frutificação

Considerando-se o período do início até o aparecimento máximo da frutificação (aparecimento tanto de frutos tipo “chumbinho” quanto de frutos em desenvolvimento), nos

ramos avaliados, não houve diferença entre as árvores que possuíam a copa já desenvolvida (bloco B1) e as árvores com a copa ainda em desenvolvimento (bloco B2).

As árvores de caqui submetidas aos diferentes tratamentos não apresentaram diferença no aparecimento dos frutos tipo “chumbinhos”. Estes apareceram entre a 12^a e a 12,5^a semana (± 1 semana) após a aplicação dos tratamentos.

Entretanto, as árvores que receberam a cianamida hidrogenada nas duas safras, com (tratamento T2) e sem irrigação (tratamento T5), apresentaram na segunda safra frutos em desenvolvimento 1,5 semanas antes que as árvores que receberam os demais tratamentos (Figura 21).

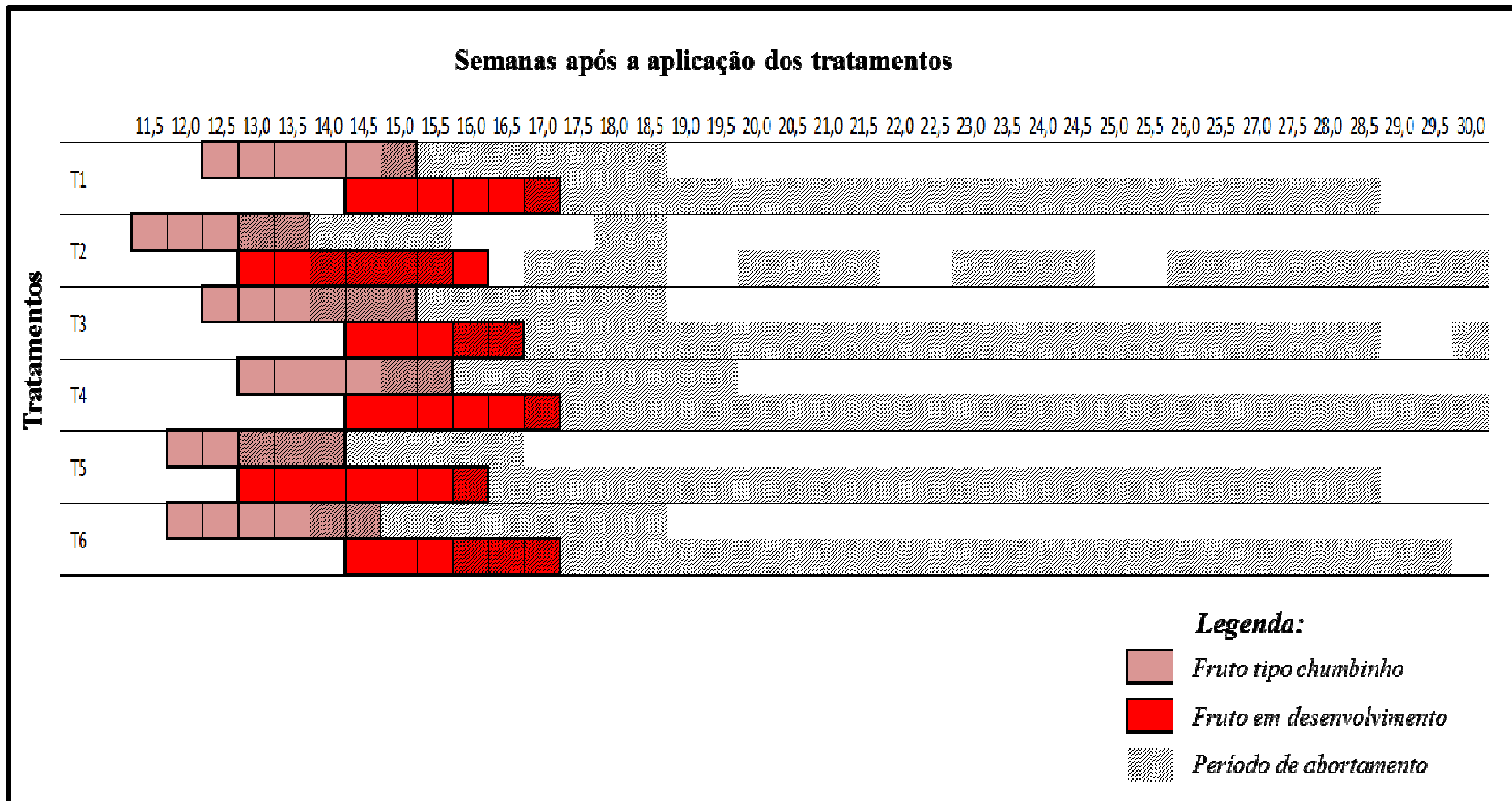


Figura 21. Médias dos blocos para o período de frutificação e abortamentos, nos ramos avaliados, das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação ao tempo (semanas) após a aplicação destes.

Esse fato pode proporcionar a chance dos frutos das árvores tratadas com cianamida hidrogenada na segunda safra (tratamentos T2 e T5) se desenvolverem mais do que os frutos das demais árvores, ou ajudar a explicar a concentração dos frutos nas colheitas iniciais das árvores tratadas com cianamida hidrogenada, como será discutido no item 1.4.3.2. (Produção e Produtividade). De acordo com Ragazze (1984), depois da maturação fisiológica do fruto até a colheita, o fruto de caqui ainda continua crescendo enquanto estiver na árvore.

Corsato et al. (2005), avaliando a fenologia do caquizeiro Rama Forte em clima tropical, verificaram que o período requerido para o desenvolvimento dos frutos, avaliado pelo aumento em diâmetro até a sua maturação, foi de 161 dias, sob uma temperatura média diária de 26 °C. No primeiro decêndio de fevereiro, foi iniciada a mudança na coloração dos frutos, que passaram a adquirir tonalidade verde-alaranjada, sendo os primeiros frutos colhidos na primeira quinzena de março e a colheita no pomar encerrada após 30 dias. Corsato (2004), na mesma variedade, verificou que da brotação das gemas até o completo desfolhamento somaram-se 287 dias no decorrer de toda a primavera, verão e outono.

Os resultados obtidos durante o experimento indicam que provavelmente o início da frutificação (aparecimento dos frutos tipo “chumbinho”), para a variedade ‘Mikado’, está associado ao aparecimento das flores abertas nos ramos. O tempo entre o aparecimento das flores abertas e o dos frutos tipo “chumbinho” foi de aproximadamente 0,5 semanas ($\pm 0,5$ semanas). Sendo que os tratamentos T2, T3 e T6 apresentaram um período menor do que 0,5 semanas. É provável que o aparecimento dos frutos em desenvolvimento também estejam relacionados com o aparecimento das flores abertas, levando aproximadamente 2 semanas (± 1 semana), como pode ser visto na Tabela 9.

Tabela 9. Tempo (em semanas) entre as médias dos blocos para o início do aparecimento da brotação vegetativa, até o surgimento dos frutos tipo “chumbinho” e os em desenvolvimento, o período de tempo entre o aparecimento das flores abertas, até o surgimento dos frutos tipo “chumbinho” e os em desenvolvimento e o intervalo de tempo entre o surgimento dos frutos tipo “chumbinho” e dos frutos em desenvolvimento, na safra 2011-2012 (2ª safra).

Tratamentos	Período de Tempo em Semanas				
	Brotação Vegetativa – Fruto tipo “Chumbinho”	Brotação Vegetativa – Fruto em Desenvolvimento	Flor Aberta – Fruto tipo “Chumbinho”	Flor Aberta – Fruto em Desenvolvimento	Fruto tipo “Chumbinho” – Fruto em Desenvolvimento
T1	5,0	7,0	0,5	2,5	2,0
T2	6,5	8,0	<0,5	1,5	1,5
T3	5,0	7,0	<0,5	2,0	1,5
T4	4,5	6,0	1,0	2,5	1,5
T5	7,0	8,0	1,0	2,0	1,0
T6	5,0	7,5	<0,5	2,5	2,5

Quando comparado com o início da brotação, os frutos tipo “chumbinho” das árvores tratadas com cianamida hidrogenada nas duas safras, com (tratamento T2) e sem irrigação (tratamento T1), foram os que levaram mais tempo para aparecerem, levando respectivamente 6,5 e 7,0 semanas. O mesmo ocorreu com o surgimento dos frutos em desenvolvimento, levando de 0,5 a 2,0 semanas a mais do que as árvores submetidas aos demais tratamentos.

A importância relativa dos drenos muda ao longo do ciclo da planta de acordo com a distribuição espacial dos tecidos em crescimento, durante a fase vegetativa os meristemas apical e radicular são mais importantes, mas durante a fase reprodutiva os frutos se tornam os drenos preferenciais (Silva, 2011). Como no caquizeiro estas duas fases ocorrem praticamente ao mesmo tempo, a competição por carboidratos acaba sendo muito grande.

A reposição no estoque do amido de reserva nos ramos e nas raízes do caquizeiro ocorre, principalmente, entre o florescimento e a abscisão foliar (Corsato et al., 2008). Contudo o fato dos ramos das árvores tratadas com cianamida hidrogenada, na segunda safra, apresentarem um maior período de tempo entre a brotação e o aparecimento dos frutos tipo “chumbinho” e os em desenvolvimento (fortes drenos de carboidratos), pode contribuir para um maior acúmulo de reservas nas plantas para a safra seguinte. Uma vez que estas árvores também apresentaram uma colheita a menos (como visto no item 1.4.2.) é provável que isto tenha contribuído para um maior acúmulo de reservas.

Já em relação ao período entre o aparecimento dos frutos tipo “chumbinho” e os em desenvolvimento, verificou-se que levou em média entre 1,5 e 2,0 semanas ($\pm 0,5$ semanas), pois nas árvores tratadas apenas com cianamida hidrogenada nas duas safras (tratamento T5) levaram 1 semana, sendo que nas que receberam os tratamentos T2 (cianamida hidrogenada e irrigação nas duas safras), T3 (cianamida hidrogenada e irrigação apenas na primeira safra) e T4 (apenas irrigação) levaram 1,5 semanas. As árvores do controle (tratamento T1) e as que receberam o tratamento T6 (apenas cianamida hidrogenada na primeira safra) foram as que apresentaram um maior período, levando respectivamente 2,0 e 2,5 semanas.

Apesar das árvores, independente dos tratamentos que estas receberam, não apresentarem grandes diferenças no aparecimento dos frutos tipo “chumbinho”, pode-se notar diferenças estatisticamente significativa na intensidade em que estes aparecem (Figura 22). As árvores que receberam cianamida hidrogenada nas duas safras, com (tratamento T2) e sem irrigação (tratamento T5), apresentaram na segunda safra uma maior intensidade de aparecimento dos frutos tipo “chumbinho” até a 13ª semana, após a aplicação dos tratamentos.

É possível que a cianamida hidrogenada aplicada nas árvores apenas na primeira safra, com (tratamento T3) e sem irrigação (tratamento T6), esteja influenciando a intensidade do aparecimento dos frutos tipo “chumbinho” na segunda safra. Uma vez que os tratamentos T3 e T6 na 13ª semana posterior a aplicação dos tratamentos apresentaram maior vigor do que os tratamentos T1 (árvores do controle) e T4 (apenas irrigação), apresentando menor vigor apenas às árvores que receberam cianamida hidrogenada na safra que ocorreu a avaliação (tratamentos T2 e T5). Provavelmente a cianamida hidrogenada proporcionou um maior acúmulo de reservas de carboidratos nas árvores submetidas aos tratamentos T3 e T6 da primeira para a segunda safra do experimento e esta maior reserva de carboidratos pode estar aumentando o vigor da frutificação, quando comparados com os tratamentos T1 e T4.

O fruto, no caso das plantas frutíferas, é o dreno de importância econômica, de forma que a relativa participação de matéria seca direcionada para este irá determinar, em parte, a sua qualidade final (Silva, 2011). Entretanto, sendo o caquizeiro uma planta de folhas caducas, o acúmulo de reservas para a safra seguinte (dreno) é de extrema importância para a produção dos frutos da próxima safra. Os tratamentos culturais aplicados e toda a produção da safra corrente devem ser feitos levando-se em conta este fato.

Já na Figura 23, verifica-se que, na segunda safra, apenas as árvores submetidas ao tratamento T2 (cianamida hidrogenada e irrigação nas duas safras) apresentaram, estatisticamente, mais frutos em desenvolvimento (na 14ª semana após aplicação dos tratamentos) do que as árvores submetidas aos demais tratamentos, não diferindo estatisticamente apenas do tratamento T5 (apenas cianamida hidrogenada nas duas safras). A porcentagem do aparecimento dos frutos em desenvolvimento (em todas as árvores experimentais) apresentou uma tendência de aumento até a 17ª semana e depois de redução até a 30ª semana (semana anterior ao início da colheita).

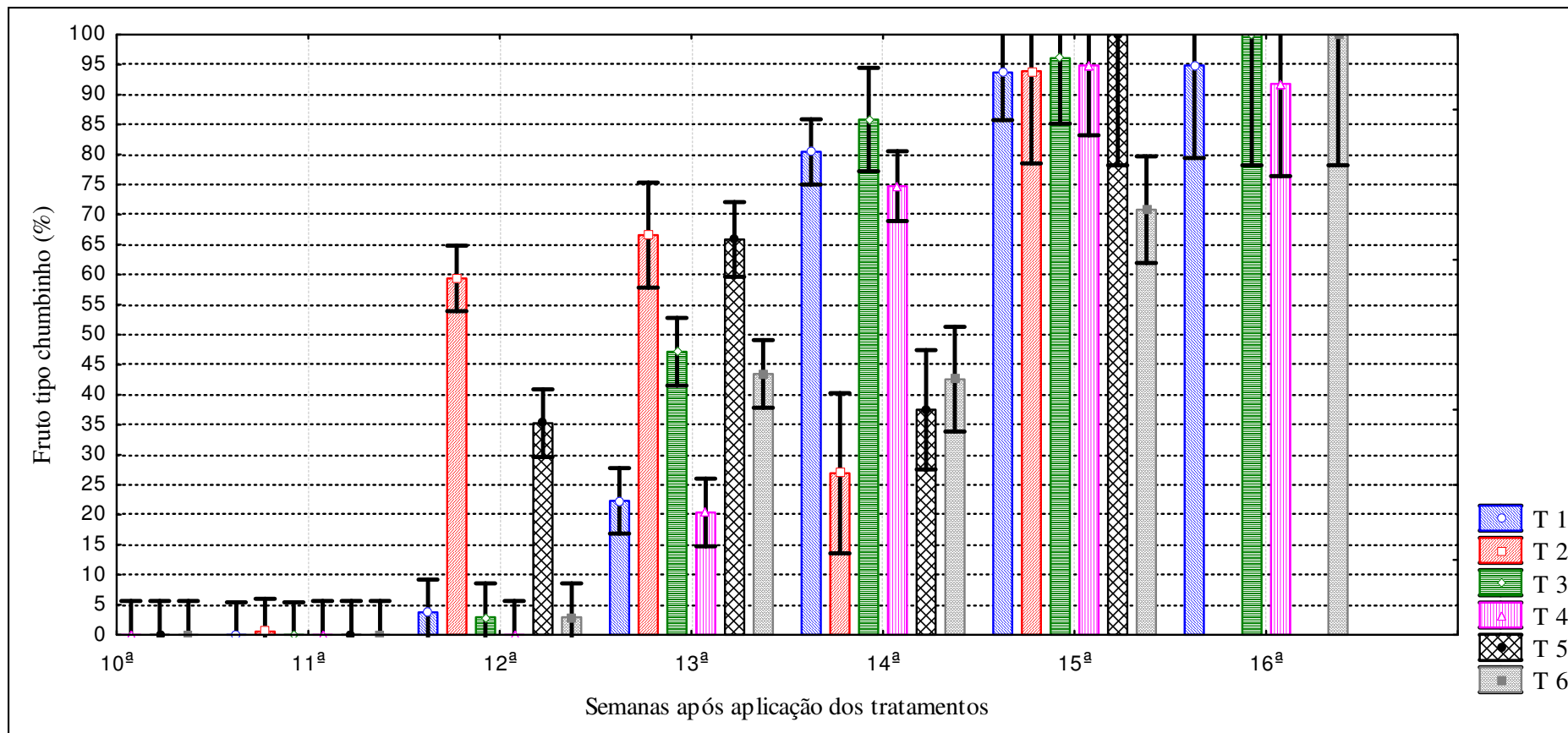


Figura 22. Médias dos blocos para a intensidade do aparecimento de frutos tipo “chumbinho” nos ramos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos até ao aparecimento máximo destes, em relação ao tempo (semanas) após a aplicação dos tratamentos.

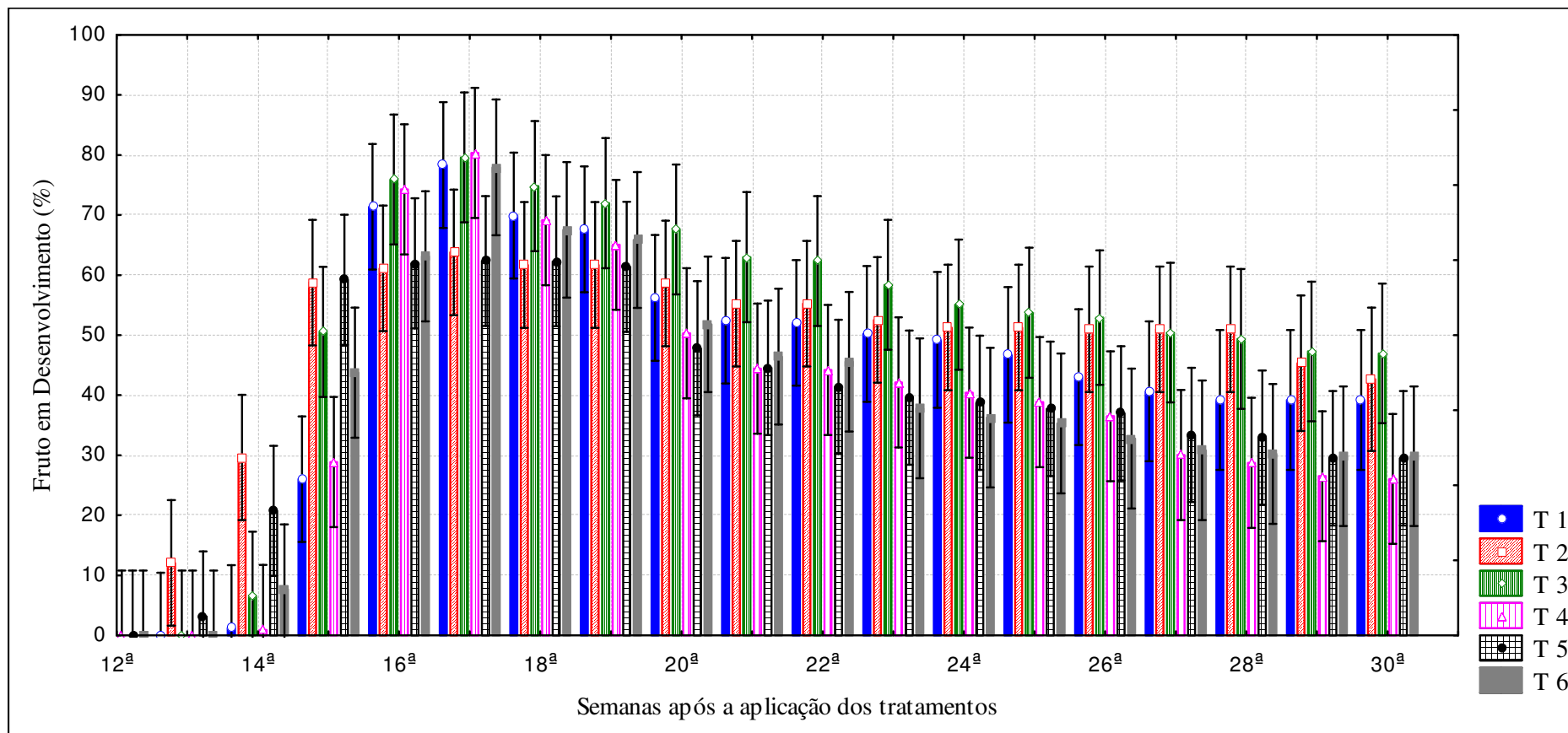


Figura 23. Médias dos blocos para a intensidade do aparecimento de frutos em desenvolvimento nos ramos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos até o início da colheita, em relação ao tempo (semanas) após a aplicação dos tratamentos.

Apesar da cianamida hidrogenada não ter antecipado o início da colheita (31ª semana após a aplicação dos tratamentos), provavelmente proporcionou alterações na fenologia dos caquizeiros da variedade ‘Mikado’. Pode-se verificar, pela Tabela 10, que as árvores tratadas com a cianamida hidrogenada nas duas safras, com (tratamento T2) e sem irrigação (tratamento T5), apresentaram um aumento em praticamente todas as fases fenológicas ao se comparar o período entre início de cada fase até o início da colheita. A única exceção é o período entre o aparecimento dos frutos tipo “chumbinho” e o início da colheita para os tratamentos T5 e T6 (cianamida hidrogenada apenas na primeira safra).

Tabela 10. Tempo (em semanas) entre as médias dos blocos para o início do aparecimento da brotação vegetativa, flor fechada, flor aberta, fruto tipo “chumbinho” e fruto em desenvolvimento até o início da colheita (31ª semana após a aplicação dos tratamentos), na safra 2011-2012 (2ª safra).

Tratamentos	Período de Tempo em Semanas				
	Brotação Vegetativa — Início da Colheita	Flor Fechada — Início da Colheita	Flor Aberta — Início da Colheita	Fruto tipo “Chumbinho” — Início da Colheita	Fruto em Desenvolvimento — Início da Colheita
T1	23,5	19,5	19,0	18,5	16,5
T2	26,0	22,0	19,5	19,5	18,0
T3	23,5	19,5	18,5	18,5	16,5
T4	22,5	19,5	19,0	18,0	16,5
T5	26,0	22,0	20,0	19,0	18,0
T6	24,0	19,5	19,0	19,0	16,5

Essas modificações na fenologia das plantas podem influenciar desde o armazenamento das reservas de carboidratos para a safra seguinte, as estratégias para o controle de pragas e doenças no pomar, até a época em que ocorre os abortamentos de flores e frutos.

As árvores tratadas com cianamida hidrogenada na segunda safra, na qual foi realizada a avaliação fenológica, com (tratamento T2) e sem irrigação (tratamento T5), apresentam um período maior entre a brotação vegetativa e a colheita. Deste modo, possuem folhas fontes de carboidratos por mais tempo, em comparação com as demais, proporcionando uma oportunidade para armazenar mais reservas para a safra seguinte ou utilizar estes carboidratos na formação de novos ramos, no caso de árvores que apresentam a copa ainda em desenvolvimento (bloco B2). O mesmo acontece com os frutos em desenvolvimento, onde os tratamentos T2 e T5 apresentam um maior período de tempo, proporcionando a oportunidade destes se desenvolverem mais, podendo assim apresentarem maior massa e volume.

No caso das estratégias para o controle de pragas, a mudança da fenologia pode acarretar na mudança da época de aplicação de agroquímicos. O Tripes (*Heliothrips haemorrhoidalis*), por exemplo, tem como o controle a pulverização na época da florada, quando começa a queda das pétalas (Nakano et al., 2002). Sendo assim, o controle desta praga seria em época diferente em árvores tratadas com a cianamida hidrogenada.

Em relação ao abortamento, não verificou-se diferença significativa, entre as árvores experimentais, para o abortamento dos frutos até a 30ª semana após a aplicação dos tratamentos (semana que antecedeu a colheita). Contudo, de acordo com Mizobutsi (2003), em caqui Rubi, a cianamida hidrogenada pode ter aumentado a aderência dos frutos ao pedúnculo, por estabelecer alta taxa de atividade metabólica no ovário, reduzindo assim a queda dos frutos. Mizobutsi et al. (2004) verificaram também que a fixação dos frutos é maior com o aumento da concentração da cianamida hidrogenada e óleo mineral aplicados, realizadas em vinte e um de Julho (21/07) e onze de Agosto (14/08) em caqui Costata.

No Japão, a queda prematura dos frutos não adstringente logo após a queda das pétalas num período de duas a três semanas é mais acentuado quando não ocorre a polinização, e os frutos polinizados que apresentam seis ou mais sementes obtêm uma massa média 65% superior aos frutos sem sementes, o que mostra a importância da polinização nas variedades doces (Razzouk, 2007).

Os frutos da variedade 'Mikado' são predominantemente paternocarpicos, não possuindo portanto sementes (fontes de fitormônios). Estes podem, portanto, ser fracos competidores de carboidratos, sendo abortados em prol do crescimento vegetativo e acúmulo de reservas para a safra seguinte.

Corsato et al. (2005), avaliando a fenologia do caquizeiro Rama Forte em clima tropical, verificaram que o abortamento iniciou-se quatro dias após o início do florescimento, perdurando por toda a primavera. A partir dessa data ocorreram dois picos distintos no aumento da quantidade de flores/frutos abortados. O primeiro pico ocorreu 21 dias e o segundo 48 dias após o início do florescimento.

Ao se avaliar os abortamentos (flores e frutos) de forma global, constatou-se uma correlação significativa ($p < 0,001$) entre a quantidade de flores brotadas nos ramos (flores fechadas) e a quantidade total de abortamentos (flores e frutos). Quanto maior foi a quantidade de flores fechadas que brotaram nos ramos, maior foi a intensidade dos abortamentos (Figura 24).

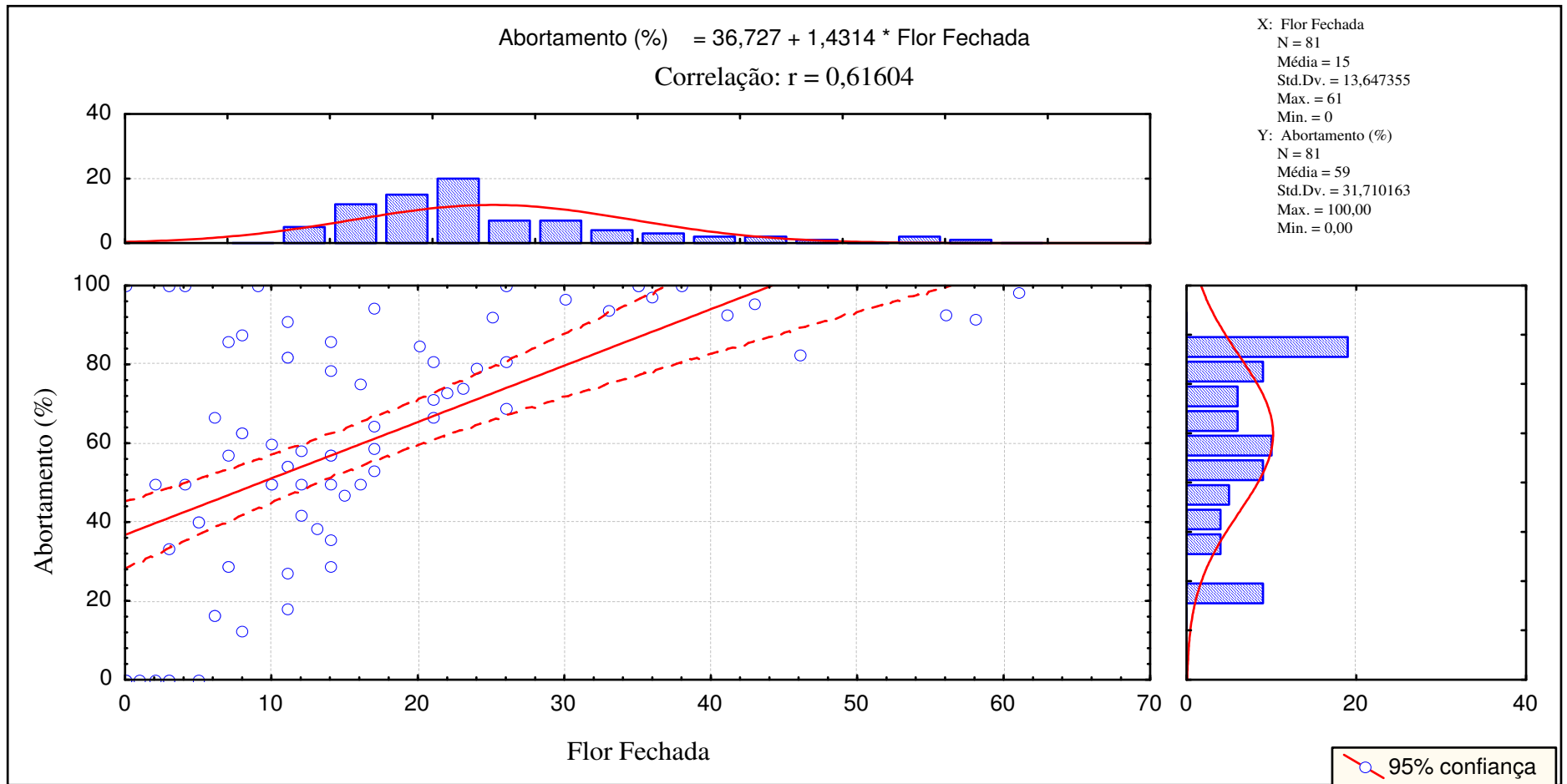


Figura 24. Correlação entre a porcentagem de abortamento total e o número de flores fechadas surgidas no ramo.

Os dados apresentados na Figura 24 podem auxiliar na prática agrícola de “raleio”. Segundo Pimentel (1998), o “raleio” dos primeiros frutos irá permitir além de um desenvolvimento vegetativo, que os frutos produzidos depois (em menor número) sejam de maior tamanho, característica desejável para a comercialização.

De acordo com estudos realizados por Ayub et al. (2009), com a variedade ‘Fuyu’, há uma grande competição entre o crescimento vegetativo e o crescimento reprodutivo. Estes verificaram que quanto maior o número de brotos por ramo e maior o número de gemas brotadas, menor é a produção por planta.

A queda de frutos durante o desenvolvimento é comum não só em caquizeiro como em outras plantas. No caqui, é comum registrar duas épocas de queda, uma em setembro-outubro e a outra em dezembro-janeiro. Quando a queda dos frutos é intensa num dos períodos, no outro ela é leve. Anelamento e aplicação de nitrogênio reduzem a queda dos frutos (Simão, 1998). De acordo com Aguiar et al. (2010), estudando variação do teor de nitrogênio em ramos produtivos de caquizeiro, constataram que o nitrogênio no fruto não tende a diminuir quando se aproxima a maturação desses. O que indica que provavelmente o nitrogênio que é armazenado no caule é proveniente da realocação a partir das folhas.

Takahashi et al. (2010), verificaram na cultivar de Giombo, um acúmulo constante de massa seca pelo caule durante as três semanas após a brotação, e pela folha durante as nove primeiras semanas. Do início da brotação até a 12ª semana, é muito pequeno o crescimento de frutos em massa seca, mostrando um acentuado acúmulo da 12ª até a 36ª semana. Na 39ª semana após a brotação ocorre um decréscimo da massa seca dos frutos em relação a 36ª semana.

A maior queda de frutos de caqui depende também da variedade. Diferentes variedades possuem diferentes épocas de queda de fruto, uma vez que estas possuem fenologia diferente uma das outras. Razzouk (2007), avaliando a fenologia de dez variedades de caquizeiro verificou que o pico de queda natural dos frutos, nas variedades Rubi, Taubaté, Toote e Fuyu, ocorre aos 42 dias após o florescimento, ou seja, na primeira quinzena de dezembro. Já para as variedades Pomelo, Rama Forte, Giombo e Suruga, este pico é mais tardio, dos 63 aos 98 dias, do início de dezembro até o início de Janeiro. A Jiro apresenta o pico de queda mais precoce, apenas uma semana após o florescimento.

1.4.2.2. Caracterização dos Frutos

Para melhorar a qualidade dos frutos é importante saber quais as principais injúrias que ocorre no pomar e se os tratamentos culturais que estão sendo executados estão interferindo na incidência das injúrias nos frutos, assim como se estão influenciando características como o tamanho e massa destes.

Na safra 2011-2012 (2ª safra), as árvores jovens, com a copa ainda em formação (bloco B2), apresentaram os calibres dos frutos produzidos significativamente menores, em comparação com os produzidos pelas árvores que apresentavam a copa já totalmente formada (bloco B1), como demonstrado na Figura 25.

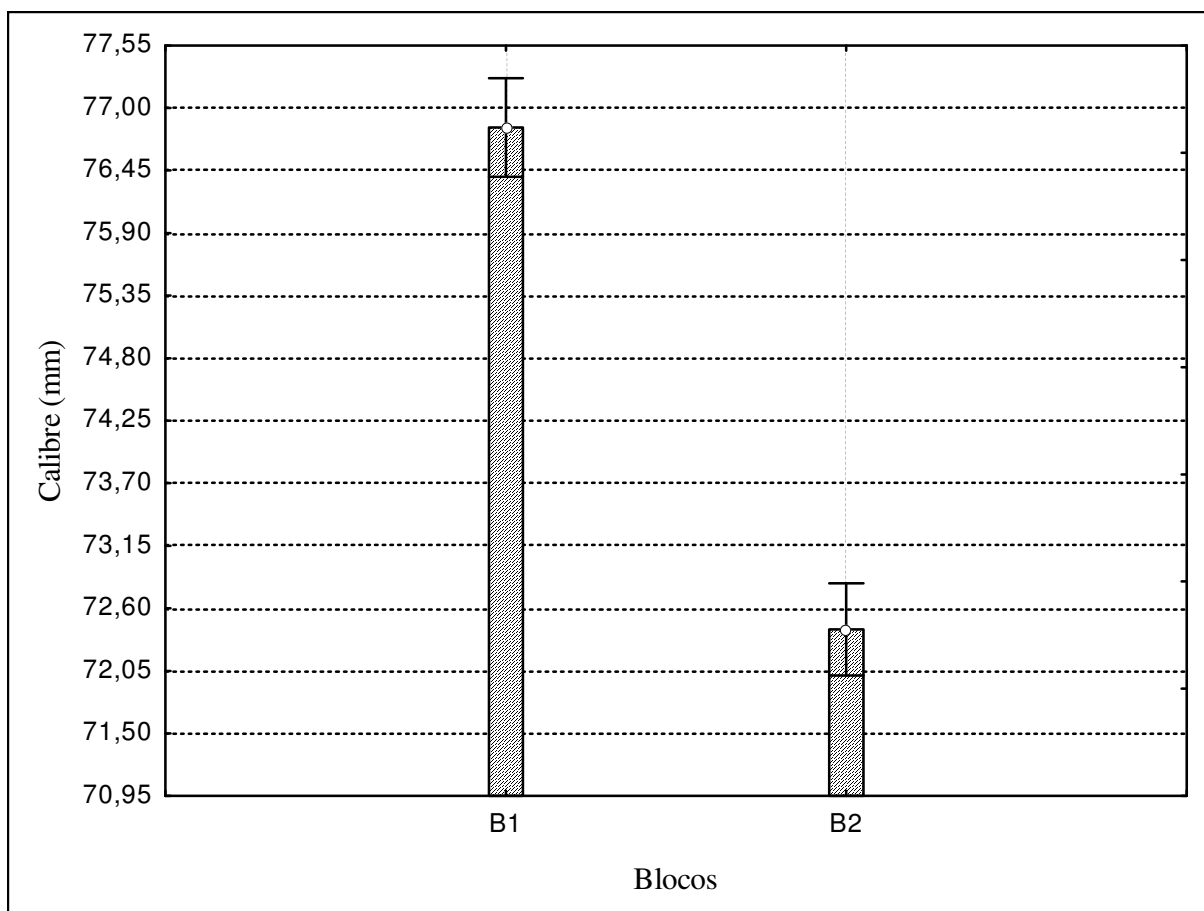


Figura 25. Médias dos tratamentos e das colheitas para o calibre dos frutos das plantas com as copas desenvolvidas (bloco B1) e das com as copas em desenvolvimento (bloco B2), na safra 2011-2012 (2ª safra).

Provavelmente os menores calibres dos frutos das árvores mais novas, na segunda safra, ocorreu devido a competição por carboidratos entre a parte vegetativa (crescimento e formação da copa; e armazenamento de carboidratos para a safra seguinte) e a parte reprodutiva. Como será visto no item 1.4.3.2., a segunda safra apresentou uma maior produtividade, o que pode ter aumentado esta competição por carboidratos e gerado estes resultados.

Ao se verificar a interação entre tratamentos e blocos ($p < 0,001$) constatou-se que as árvores mais nova (Bloco B2), independente do tratamento aplicado, apresentou os frutos com os menores calibres (Figura 26), reforçando que provavelmente os menores calibres ocorreram devido a maior competição por carboidratos.

É possível verificar também uma diferença entre os resultados obtidos com os diferentes tratamentos e o desenvolvimento das árvores. Nas árvores com a copa totalmente desenvolvida (bloco B1) o tratamento T2 (cianamida hidrogenada e irrigação nas duas safras) foi o que proporcionou os maiores frutos. Enquanto que nas árvores com a copa ainda em formação (bloco B2) os tratamentos que proporcionaram os maiores frutos foram os T1 (árvores do controle), T2, T5 (apenas cianamida nas duas safras) e T6 (apenas cianamida na 1ª safra).

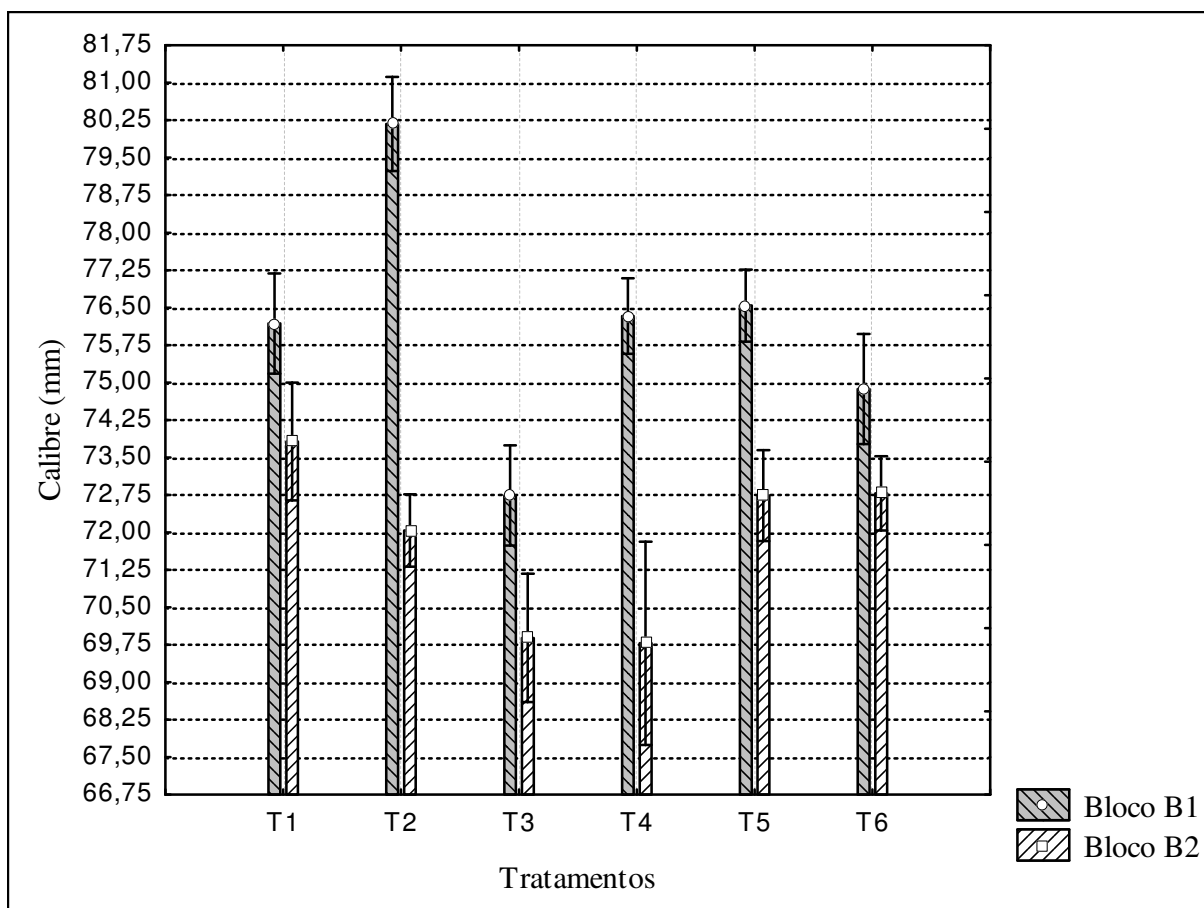


Figura 26. Médias das colheitas para o calibre dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação aos blocos (2ª safra).

Em relação às diferentes colheitas, ao se verificar a interação destas com os blocos ($p < 0,004$), constatou-se que o calibre dos frutos das árvores mais novas (bloco B2), com exceção da primeira colheita, foram sempre os menores ao longo de toda a safra 2011-2012 (2ª safra), e que, independente da idade das árvores (blocos), quanto mais tempo os frutos permaneceram ligados a estas, maior foi seu calibre (Figura 27).

Este resultado reforça a ideia de que há uma maior competição por carboidratos nas árvores mais novas (bloco B2) e que conforme as colheitas são efetuadas esta competição, entre os frutos remanescentes e entre a parte vegetativa diminui. Uma vez que conforme se realiza as colheitas o número de drenos de carboidratos (frutos colhidos) diminui.

A reposição no estoque do amido de reserva nos ramos e nas raízes ocorre, principalmente, entre o florescimento e a abscisão foliar, compreendendo assim todo o período de enchimento dos frutos (Corsato et al., 2008). Segundo Pimentel (1998), conforme os frutos vão sendo colhidos, ocorre uma menor competição entre estes e a parte vegetativa, sendo assim, quanto menor o número de drenos, menor será a competição entre eles.

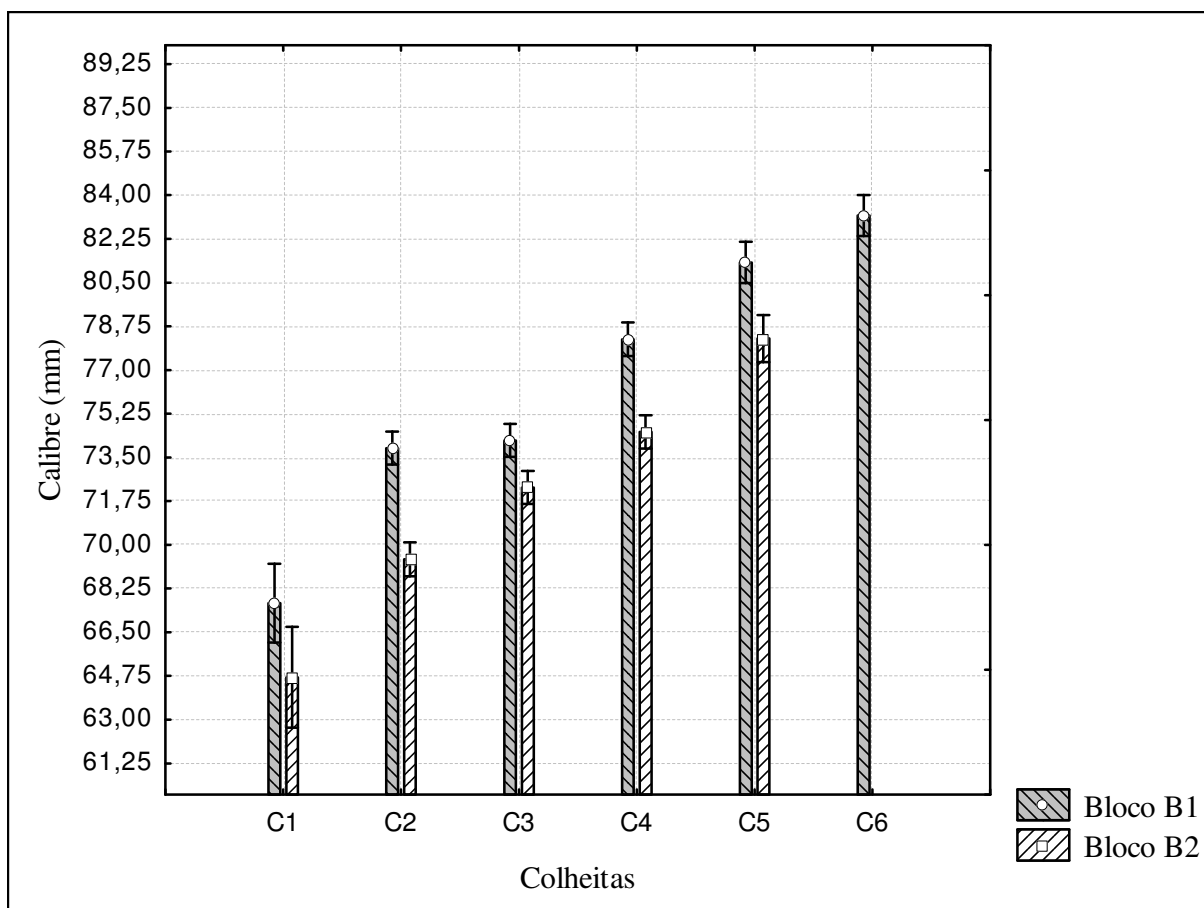


Figura 27. Médias dos tratamentos para o calibre dos frutos das plantas nas colheitas ao longo da safra 2011-2012 (2ª safra) em relação aos diferentes blocos.

Os frutos das árvores tratados sucessivamente (1ª e 2ª safra) com cianamida hidrogenada e irrigação (tratamento T2) apresentaram frutos com os maiores calibres em todas as colheitas no decorrer da segunda safra (Tabela 11). Provavelmente a associação da cianamida hidrogenada com a irrigação, nas condições que ocorreram durante a safra 2011-2012 (2ª safra), influenciou positivamente no aumento dos frutos.

Com exceção da primeira colheita, as árvores submetidas ao tratamento T3 (cianamida hidrogenada e irrigação apenas na primeira safra) apresentaram sempre os menores frutos. Não diferenciando estatisticamente apenas dos frutos das árvores submetidas ao tratamento T4 (apenas irrigação nas duas safras) na sexta colheita.

Verificou-se também que, independente do tratamento aplicado nas árvores, quanto mais tempo o fruto permaneceu na árvore, maior foi o seu calibre. Provavelmente, conforme os frutos foram sendo colhidos, a competição por carboidratos entre os frutos remanescentes foi diminuindo, proporcionando a oportunidade destes crescerem mais, além destes terem permanecido em maior período de tempo ligados às árvores.

Tabela 11. Médias dos blocos para o calibre dos frutos (em milímetros) das plantas submetidas aos diferentes tratamentos nas colheitas ao longo da safra 2011-2012 (2ª safra).

Colheitas	Tratamentos					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
1ª	68,65 Ea	67,62 Da	66,30 Eab	66,94 Ea	69,26 Da	63,37 Db
2ª	71,16 Eb	73,86 Ca	66,59 Ec	72,69 Dab	72,15 Cb	73,80 Ca
3ª	73,38 Db	76,34 Ba	70,64 Dc	73,25 CDb	73,39 Cb	72,43 Cb
4ª	75,77 Ccb	79,69 Aa	72,57 Ce	74,68 CDb	77,31 Bbc	78,05 Bb
5ª	81,40 Ba	80,37 Aabc	76,73 Bd	78,75 Bbc	80,28 Aab	78,60 Bc
6ª	84,35 Aab	–	80,89 Ac	82,53 Abc	–	85,01 Aa

Letras maiúsculas e iguais nas colunas e letras minúsculas e iguais nas linhas não apresentam diferença significativa.

Em relação às injúrias presentes nos frutos, nas condições experimentais, verificou-se que estas não foram influenciadas pela época em que os frutos foram colhidos (colheitas), e nem pela idade das árvores (blocos). Sendo que, individualmente (cada uma das injúrias), não foram influenciadas pelo uso da irrigação ou aplicação da cianamida hidrogenada (tratamentos). Os índices dos frutos sem injúrias foram sempre maiores do que os índices dos frutos descartados, com exceção das árvores submetidas aos tratamentos T4 (apenas irrigação nas duas safras) e T6 (apenas cianamida hidrogenada na 1ª safra) que não diferiram estatisticamente (Tabela 12).

A qualidade de um produto é determinada, sensorialmente, pela sua aparência, textura e “*flavor*” (sabor e aroma), tendo estes atributos importância variada para cada segmento da cadeia produtiva (desde o produtor até o consumidor). Os distribuidores enfatizam a aparência e a textura, enquanto que os consumidores o “*flavor*” e a textura (Chitarra & Chitarra, 2005). Ou seja, quanto maior for o índice de injúrias que os frutos apresentarem, mais desvalorizados estes serão no mercado.

Os frutos provenientes das árvores tratadas com cianamida hidrogenada (nas duas safras), com (tratamento T2) e sem irrigação (tratamento T5), apresentaram apenas a estria como principal injúria. Enquanto que os frutos das árvores do controle (tratamento T1) e das submetidas a cianamida hidrogenada e irrigação apenas na primeira safra (tratamento T3), apresentaram como principais injúrias as dos tipos: mancha, estria, abrasão, perfuração, perda de firmeza e injúria no cálice.

Enquanto que os frutos das árvores submetidas aos tratamentos T4 (irrigação nas duas safras) e T6 (cianamida hidrogenada apenas na 1ª safra) apresentaram como principais injúrias a mancha, a estria e a abrasão. Sendo que as árvores tratadas com o T4 apresentaram também como principais injúrias, nos frutos, a perda de firmeza e injúria no cálice.

De acordo com Chitarra & Chitarra (2005), os estresses mecânicos ocorrem ao longo do período de crescimento dos vegetais em decorrência de fatores diversos, como ventos, chuvas, granizo, etc. Podendo ser uma perturbação fisiológica ou um dano físico, como o rompimento das células num ferimento, havendo regeneração dos tecidos com cicatrização da área. Este inclui a fricção, impacto e compressão, causando um ou mais tipos de colapso nos

tecidos. A identificação dos fatores pré-colheita que predisõem o desenvolvimento de distúrbios fisiológicos na fase pós-colheita, torna possível a redução da incidência desses fatores.

Tabela 12. Médias dos blocos e das colheitas para percentuais de frutos injuriados das plantas submetidas aos diferentes tratamentos na safra 2011-2012 (2ª safra).

Injúria*	Tratamentos					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Frutos s/ injúrias	31,07 a	37,32 a	37,49 a	28,56 a	32,26 a	21,90 ab
Mancha	17,44 b	10,17 cd	16,12 b	15,31 abcd	16,50 b	19,29 ab
Estria	13,30 bc	24,75 b	15,32 b	23,63 ab	28,46 a	25,44 a
Abrasão	16,22 bc	13,82 c	14,56 b	16,82 abcd	15,68 b	19,99 ab
Queimadura de sol	2,08 de	1,41 de	2,60 c	0,78 cd	2,28 cd	1,07 d
Perfuração	7,54 bcde	7,88 cde	8,66 bc	8,75 bcd	9,61 bc	6,37 cd
Perda de firmeza	12,42 bcd	9,02 cde	7,21 bc	13,73 abcd	8,17 bcd	14,32 bc
Podridão	6,31 cde	1,41 de	1,04 c	0,51 cd	1,96 cd	2,46 d
Cálice	16,89 bc	10,81 cd	7,65 bc	20,50 ab	8,74 bcd	13,59 bc
Deformidade	0,26 e	0,00 e	2,27 c	0,00 d	0,00 d	2,10 d
Frutos descartados	14,52 bc	10,85 cd	8,51 bc	15,13 abcd	9,31 bc	16,40 abc

Letras minúsculas e iguais nas colunas não apresentam diferença significativa.

Não houve diferenças significativas entre os tratamentos para as diferentes injúrias.

* Injúrias ilustradas na Figura 6.

Já as injúrias que menos tiveram incidência nos frutos (independente do tratamento que as árvores receberam), na segunda safra, foram a queimadura de sol, podridão, deformidade e perfuração, apresentando, respectivamente, um índice máximo de 2,60%, 6,31%, 2,27% e 9,61%. As que tiveram maior importância foi a do tipo estria, seguida pela mancha, abrasão, perda de firmeza e injúria no cálice.

1.4.2.3. Caracterização Química dos Frutos

Na safra 2011-2012 (2ª safra) a concentração da acidez total titulável (AAT) dos frutos não apresentaram diferença significativa para os diferentes tratamentos aplicados nas árvores ($p > 0,134$), para as colheitas ($p > 0,335$) e para as interações ($p > 208$).

Esperava-se que houvesse diferenças e interações entre os tratamentos, colheitas e blocos. Provavelmente as condições ambientais apresentadas ao longo desta safra e a grande produtividade (como será apresentado e discutido no item 1.4.3.2.) contribuiu para estes resultados inesperados.

A concentração da ATT nos frutos só foi significativamente diferente ($p < 0,003$) entre as árvores com a copa já formada (bloco B1) e as com a copa em formação (bloco B2), sendo que as árvores mais novas apresentaram os frutos mais ácidos (Figura 28).

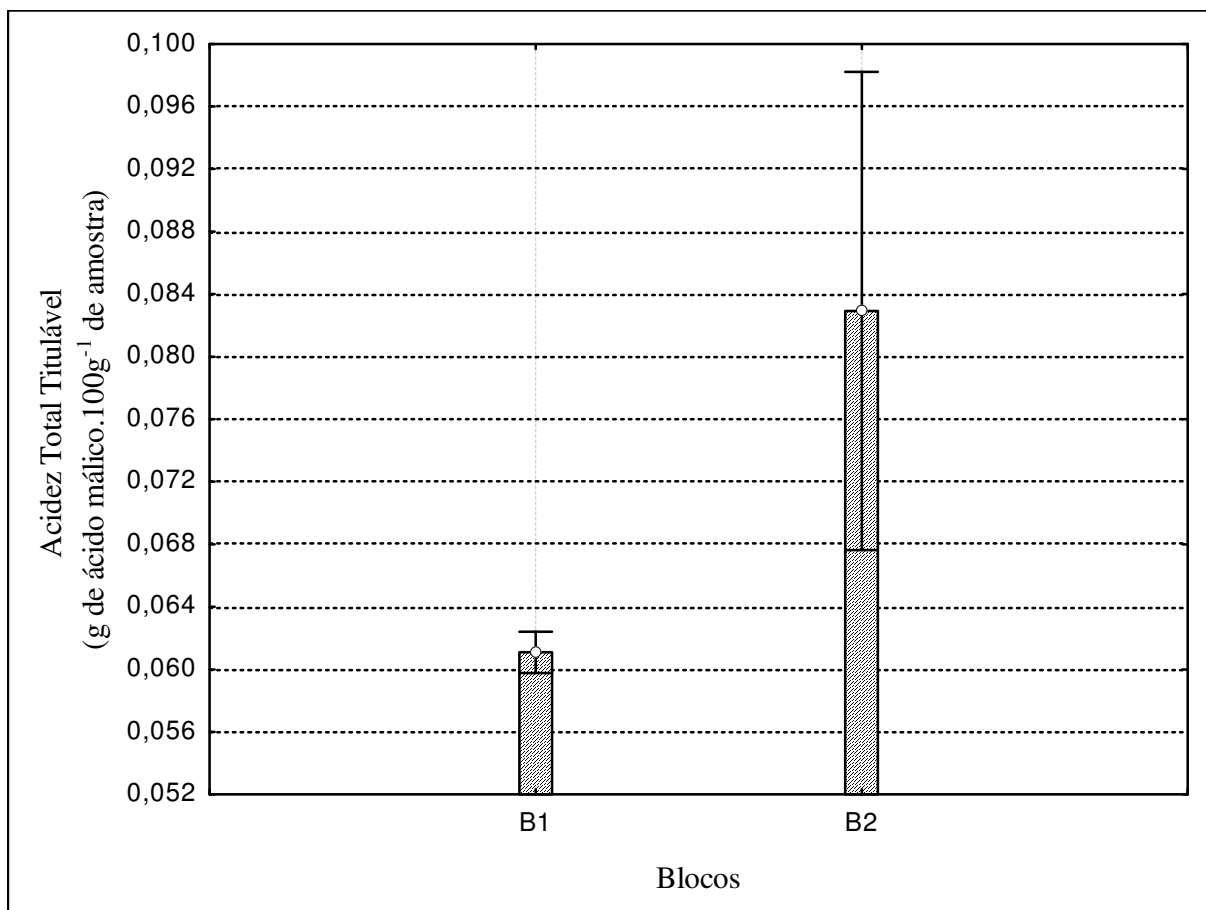


Figura 28. Médias dos tratamentos e das colheitas para a acidez total titulável dos frutos em relação aos blocos na safra 2011-2012 (2ª safra).

O maior índice de ATT nos frutos nas árvores do bloco B2 pode ter ocorrido devido ao maior estresse que estas plantas sofreram devido a competição da parte reprodutiva e da parte vegetativa por carboidratos, uma vez que a copa destas ainda está em formação. A planta estando sob estresse, tem a tendência de produzir metabólitos secundários, intensificando assim o metabolismo dos frutos, o que é corroborado pelas menores concentrações de taninos condensados, maiores concentrações de sólidos solúveis totais (dados apresentados e discutidos posteriormente) e pelos menores calibre apresentados por estes mesmos frutos (como visto na Figura 25). Segundo Antonioli et al. (2002) o aumento da acidez nos frutos pode ser devido a intensa atividade metabólica do fruto, além da produção de intermediários do ciclo de Krebs.

Muitos dos metabólitos secundários são ácidos orgânicos, como os ácidos fenólicos por exemplo. Portanto, o aumento desses compostos pode contribuir para o aumento da acidez

nos frutos. De acordo com Angelo & Jorge (2007), os compostos fenólicos, como os taninos condensados, que são originados do metabolismo secundário das plantas, se formam em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiação UV, dentre outros.

Já em relação a concentração dos sólidos solúveis totais (SST) na safra 2011-2012 (2ª safra), os das árvores com a copa já formada (bloco B1) apresentaram concentrações (13,4°Brix) significativamente superiores ($p < 0,036$) do que a concentração (13,2°Brix) dos das árvores com a copa em formação (bloco B2).

É possível que as menores concentrações de SST nos frutos das árvores do bloco B2 tenha ocorrido devido a maior competição por carboidratos entre a parte reprodutiva e a parte vegetativa que essas plantas sofreram devido a formação da copa, estando estes consonantes com os resultados de ATT (como visto anteriormente), de taninos condensados (como demonstrados posteriormente) e dos calibres apresentados pelos mesmos frutos (como visto na Figura 25).

É possível observar na Figura 29 que, durante a segunda safra, as árvores submetidas ao tratamento T6 (somente cianamida hidrogenada apenas na primeira safra), com a copa em formação (bloco B2), foram as únicas que apresentaram frutos com maiores concentrações de SST, em comparação com as árvores com a copa já formada (bloco B1). As árvores do controle (tratamento T1) e as submetidas apenas a cianamida hidrogenada nas duas safras (tratamento T5), foram as únicas que não apresentaram diferenças significativas entre as árvores do bloco B1 e do bloco B2.

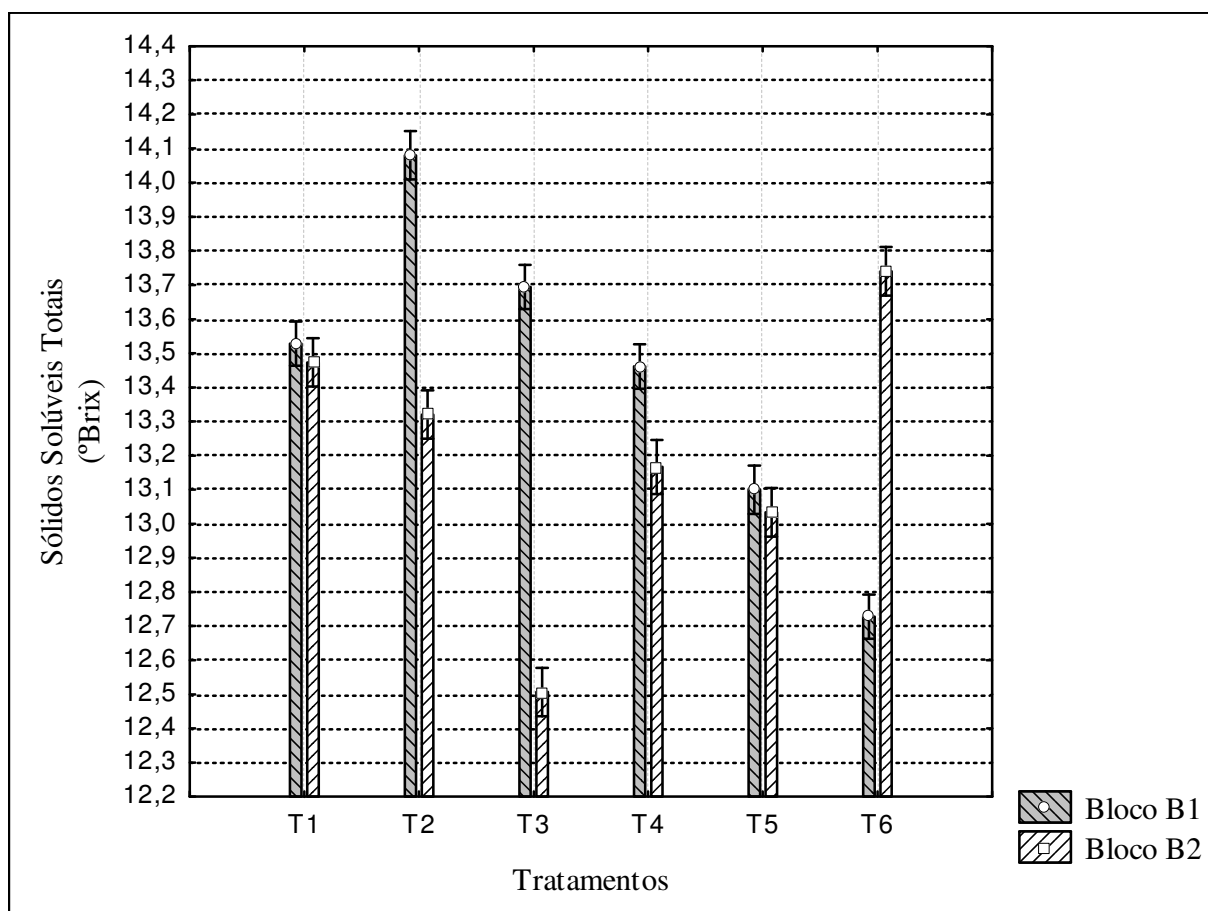


Figura 29. Médias das colheitas para os sólidos solúveis totais dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação aos blocos (2ª safra).

É possível que, nas condições apresentadas durante a segunda safra, a aplicação da cianamida hidrogenada em conjunto da irrigação (tratamento T2), realizada nas duas safras, em árvores com a copa já desenvolvidas (bloco B1), esteja contribuindo para uma maior concentração de SST nos frutos. Este efeito pode também estar sendo transmitido de uma safra para a safra seguinte, uma vez que as árvores do bloco B1 que receberam o tratamento T3 (cianamida hidrogenada e irrigação apenas na primeira safra) apresentaram a segunda maior concentração de SST nos frutos. Já a aplicação apenas da cianamida hidrogenada nas duas safras (tratamento T5) e somente na primeira safra (tratamento T6), podem ter contribuído para as menores concentrações de SST nos frutos.

No caso das árvores submetidas ao tratamento T3, este na primeira safra pode estar contribuindo para um maior acúmulo de carboidratos para a safra seguinte (2ª safra). Isto pode contribuir para um maior vigor na brotação vegetativa e com isso diminuir a competição por carboidratos, diminuindo assim o estresse sofrido pela planta e favorecendo uma maior concentração de SST nos frutos destas.

Isto é corroborado pelo maior vigor da brotação vegetativa que as plantas submetidas ao tratamento T3 apresentaram na segunda safra (como visto na Figura 16), sendo este maior do que o das árvores do controle (tratamento T1) e o das submetidas apenas a irrigação (tratamento T4). Apesar das árvores submetidas ao tratamento T6 (somente cianamida hidrogenada apenas na 1ª safra) terem também apresentado vigor equivalente ao das submetidas ao tratamento T3, estas não apresentaram frutos com os mesmos resultados, o que pode indicar que a irrigação utilizada junto com a cianamida hidrogenada no tratamento T3 está fazendo diferença.

É possível verificar também que o comportamento da concentração dos SST, nos frutos das árvores que receberam os diferentes tratamentos não foi o mesmo para as árvores com a copa já formada (bloco B1) e com a copa em formação (bloco B2). É possível que a idade das árvores esteja afetando a forma como os diferentes tratamentos contribuem na concentração dos SST dos frutos da safra 2011-2012 (2ª safra). Esta diferença só não foi encontrada nos frutos das árvores do controle (tratamento T1) e das submetidas ao tratamento T5 (apenas cianamida hidrogenada nas duas safras). E as maiores diferenças foram encontradas nas árvores submetidas aos tratamentos T2, T3 e T6.

Pela Tabela 13, interação entre colheitas e tratamentos, é possível constatar que houve uma maior concentração de SST nos frutos das últimas colheitas. Sendo que as árvores submetidas ao tratamento T2 (cianamida hidrogenada e irrigação) foram as que apresentaram as maiores concentrações de SST nos frutos em um maior número de colheitas (3ª, 4ª e 5ª colheitas), na safra 2011-2012 (2ª safra).

Tabela 13. Médias dos blocos para os sólidos solúveis totais (°Brix) dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos nas colheitas ao longo da safra 2011-2012 (2ª safra).

Colheitas	Tratamentos					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
1 ^a	13,0 Ed	13,8 Cb	13,4 Cc	14,3 Ba	12,8 De	12,2 Ef
2 ^a	13,3 Da	12,5 Ec	12,2 Fd	12,9 Db	13,2 Ca	12,9 Cb
3 ^a	12,8 Fb	13,3 Da	12,9 Eb	12,5 Ec	12,2 Ed	12,5 Dc
4 ^a	13,5 Cd	14,4 Ba	13,7 Bc	13,8 Cc	13,5 Bd	14,1 Ab
5 ^a	14,6 Aa	14,5 Aa	13,2 Dc	12,6 Ed	13,8 Ab	13,9 Bb
6 ^a	14,2 Bb	–	14,1 Abc	15,5 Aa	–	14,0 ABC

Letras maiúsculas e iguais nas colunas e letras minúsculas e iguais nas linhas não apresentam diferença significativa.

O aumento dos SST nas últimas colheitas da segunda safra provavelmente foi devido a diminuição da competição por carboidratos entre os frutos por conta da eliminação de drenos de carboidratos (frutos colhidos). Isso é corroborado pelos resultados dos taninos condensados (resultados apresentados e discutidos posteriormente), onde suas concentrações diminuem ao longo da safra e pelos resultados do calibre desses mesmos frutos, que aumentaram ao longo da safra (como apresentado na Tabela 11).

Ao se comparar a concentração dos SST dos frutos das árvores com a copa já totalmente formada (bloco B1) com os das árvores com a copa em formação (bloco B2) ao longo da segunda safra (interação entre colheitas e blocos), é possível verificar que os frutos das árvores do bloco B2 apresentaram menores concentrações até a terceira colheita, havendo uma inversão na quarta e quinta colheita. Verificou-se também, nos dois blocos, uma tendência de diminuição das concentrações da primeira até a terceira colheita e uma tendência de aumento destas, da terceira até a última colheita (Figura 30).

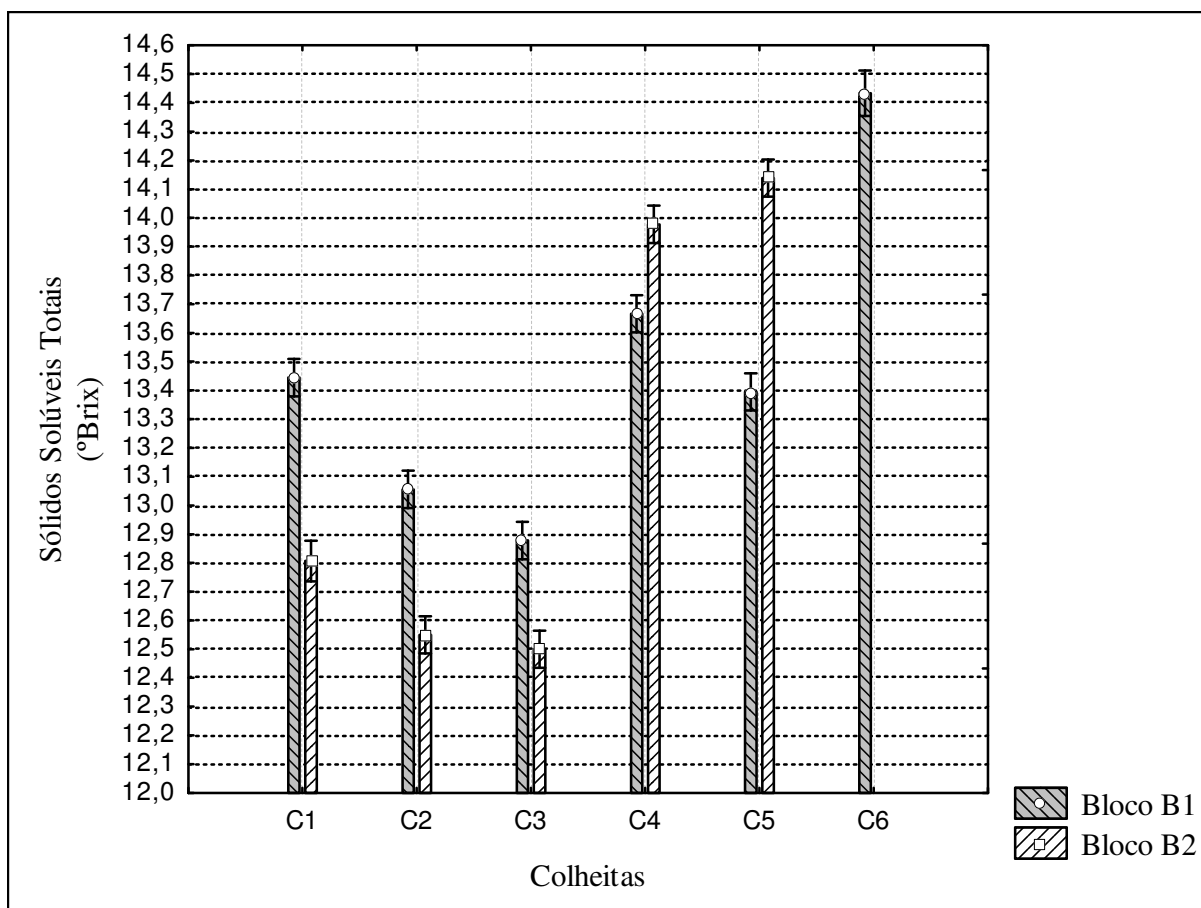


Figura 30. Médias dos tratamentos para os sólidos solúveis totais dos frutos das plantas nas colheitas ao longo da safra 2011-2012 (2ª safra) em relação aos diferentes blocos.

As condições que se apresentaram ao longo da segunda safra provavelmente contribuíram para um aumento do estresse sofrido pelas árvores até a terceira colheita. Em especial nas árvores com a copa em formação (bloco B2), uma vez que estas apresentaram menores concentrações só até esta colheita. A partir da terceira colheita, com a retirada de vários drenos de carboidratos (frutos colhidos), a competição por carboidratos deve ter diminuído a um nível que permitiu que os frutos das árvores do bloco B2 apresentassem as maiores concentrações de SST (4ª e 5ª colheita).

Na segunda safra 2011-2012 (2ª safra), em relação à concentração de taninos condensados (TC), as árvores com a copa já formada (bloco B1) apresentaram concentrações ($3,21 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) significativamente inferiores ($p < 0,001$) do que as concentrações ($3,60 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) dos frutos das árvores com a copa em formação (bloco B2). Provavelmente as maiores concentrações nas árvores do bloco B2 ocorreram devido a uma maior estresse gerado pela maior competição por carboidratos entre a parte reprodutiva e a parte vegetativa (formação da copa e acúmulo de carboidratos para a safra seguinte) destas. Isto é corroborado pelos menores calibres (como visto no item 1.4.2.2.), pelas maiores concentrações de ATT e menores concentrações de SST (como visto anteriormente) que estes mesmos frutos apresentaram.

Um dos problemas pós-colheita da cultura de caqui é a retirada de adstringência dos frutos de variedades taninosas ou variáveis à época de colheita (Shimizu et al., 2002). A falta de conhecimento e tecnologia disponível aos produtores faz com que sejam aplicadas técnicas

rudimentares que, eliminam a adstringência, mas promovem amolecimento do fruto, impedindo sua conservação por período prolongado (Muñoz, 2002). A concentração inicial dos TC provavelmente irá influenciar nas técnicas de retirada da adstringência. Com isso pode-se determinar tempos de exposição e/ou concentrações dos diferentes princípios ativos que provocam a retirada da adstringência ao longo das colheitas.

Em relação a concentração de TC nos frutos, as árvores de diferentes idades (blocos) responderam de forma diferente aos tratamentos aplicados. As com a copa em formada (bloco B1), os frutos das árvores do controle (tratamento T1) foram os que apresentaram as maiores concentrações, sendo que as submetidas a cianamida hidrogenada e irrigação nas duas safras (tratamento T2) e apenas cianamida hidrogenada nas duas safras (tratamento T5) apresentaram, respectivamente, frutos com a terceira maior concentração e menor concentração.

Enquanto que nas árvores com a copa em formação (bloco B2), as tratadas com cianamida hidrogenada, com (tratamento T2) e sem irrigação (tratamento T5), apresentaram os frutos com a segunda maior concentração de TC, ficando atrás apenas dos frutos das submetidas ao tratamento T3 (cianamida hidrogenada e irrigação apenas na primeira safra). As árvores do controle (tratamento T1) foram as que apresentaram os frutos com a terceira menor concentração e as submetidas ao tratamento T4 (apenas irrigação) foram os que apresentaram as menores concentrações (Figura 31).

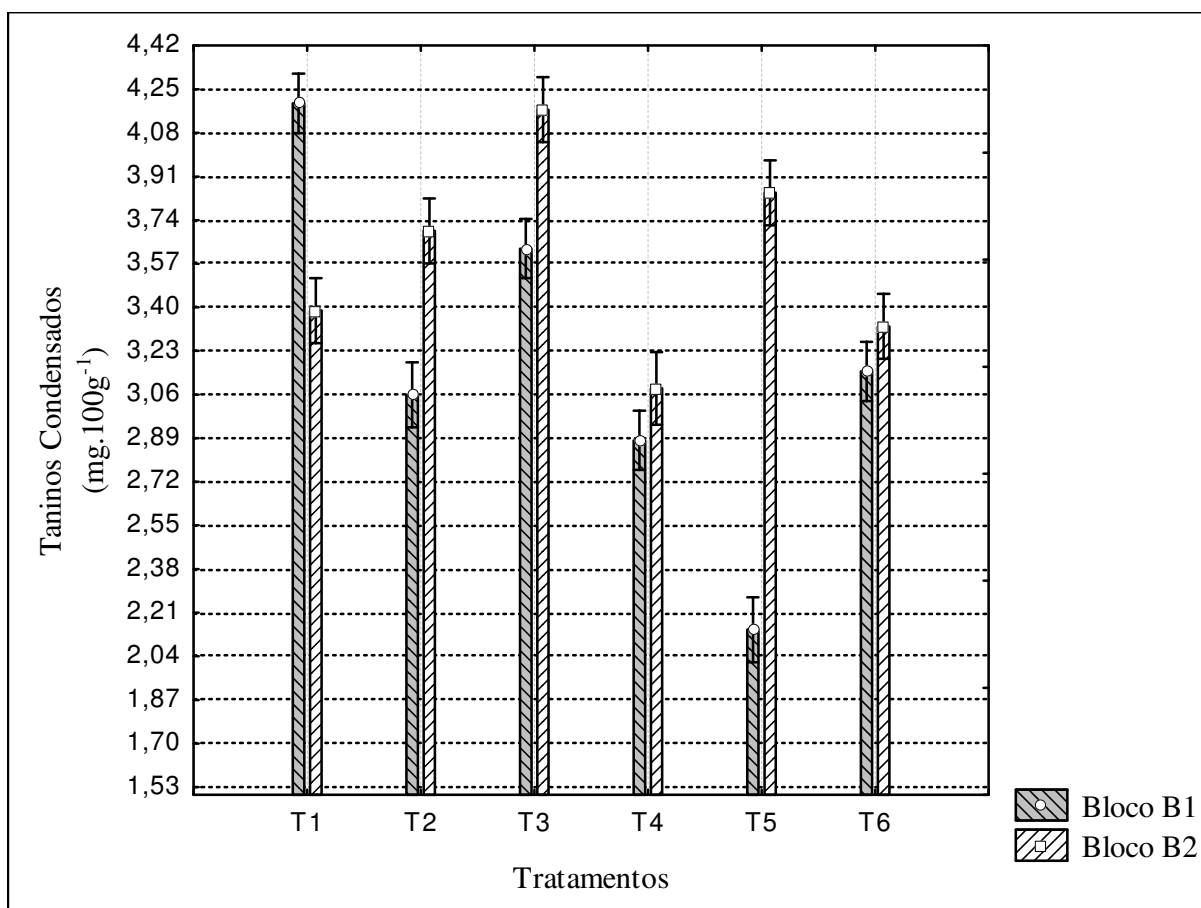


Figura 31. Médias das colheitas para os taninos condensados dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação aos blocos (2ª safra).

É provável que a idade das árvores interfira a forma como os diferentes tratamentos aplicados nas árvores afetaram a concentração de TC nos frutos. Talvez, nas árvores do bloco B2, os tratamentos estejam contribuindo, em algum momento, para o maior crescimento vegetativo das plantas. O que estaria aumentando o estresse destas, devido a maior competição por carboidratos, e contribuiriam para a maior concentração dos TC nos frutos. Isto é corroborado pelos resultados de SST, onde estes mesmos frutos apresentaram uma tendência de conterem as menores concentrações de SST (como visto anteriormente).

Pela Tabela 14 observa-se que a aplicação da cianamida hidrogenada (nas duas safras), com (tratamento T2) ou sem irrigação (tratamento T5), pode ter contribuído para que as concentrações dos TC não se elevassem nos frutos ao longo da safra 2011-2012 (2ª safra), uma vez que em nenhuma das colheitas as árvores submetidas a esses tratamentos apresentaram frutos com as maiores concentrações. A aplicação apenas da irrigação (tratamento T4), provavelmente contribuiu para manter as concentrações de TC mais baixas, já que somente na segunda colheita essas apresentaram as maiores concentrações de TC em seus frutos.

Tabela 14. Médias dos blocos para os taninos condensados ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos nas colheitas ao longo da safra 2011-2012 (2ª safra).

Colheitas	Tratamentos					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
1 ^a	5,31 Aa	4,49 Ac	4,97 Bb	3,08 Bb	4,25 Ac	5,76 Aa
2 ^a	4,34 Bbc	4,56 Ab	5,40 Aa	5,28 Aa	3,52 Bb	4,08 Bc
3 ^a	3,54 Cb	3,63 Bb	4,21 Ca	3,17 Bc	2,69 Dd	1,84 De
4 ^a	4,39 Ba	2,48 Cc	2,94 Db	1,94 Cd	3,16 Cb	2,53 Cc
5 ^a	1,69 Dc	1,73 Dc	2,45 Eab	2,19 Cb	1,36 Ed	2,68 Ca
6 ^a	3,55 Ca	–	2,68 DEb	1,39 Dc	–	1,74 Dc

Letras maiúsculas e iguais nas colunas e letras minúsculas e iguais nas linhas não apresentam diferença significativa.

Já as árvores do controle (tratamento T1) e as que foram submetidas ao tratamento T3 (cianamida e irrigação apenas na primeira safra) apresentaram as maiores concentrações em três colheitas. Sendo estas, respectivamente, a primeira, quarta e sexta, e a segunda, terceira e quinta colheita.

É possível verificar também que ao longo da safra (2ª safra) a concentração dos TC nos frutos apresentaram tendência de diminuir, independente do tratamento aplicado nas árvores. Provavelmente o estresse gerado pela competição por carboidratos entre a parte reprodutiva e vegetativa das plantas foi menor nas últimas colheitas, devido a eliminação de drenos de carboidratos (frutos colhidos). Isto é corroborado pela tendência do aumento dos SST (como visto anteriormente) e pelo aumento do calibre nestes mesmos frutos (como visto no item 1.4.2.2.).

A tendência da redução da concentração dos TC nos frutos ao longo da safra 2011-2012 (2ª safra) ocorreu tanto nas árvores com a copa já formada (bloco B1) como nas com a

copa em formação (bloco B2). As árvores do bloco B2 mostraram também a tendência de apresentarem os frutos com as maiores concentrações de TC, o que não ocorreu na terceira e quinta colheita (Figura 32).

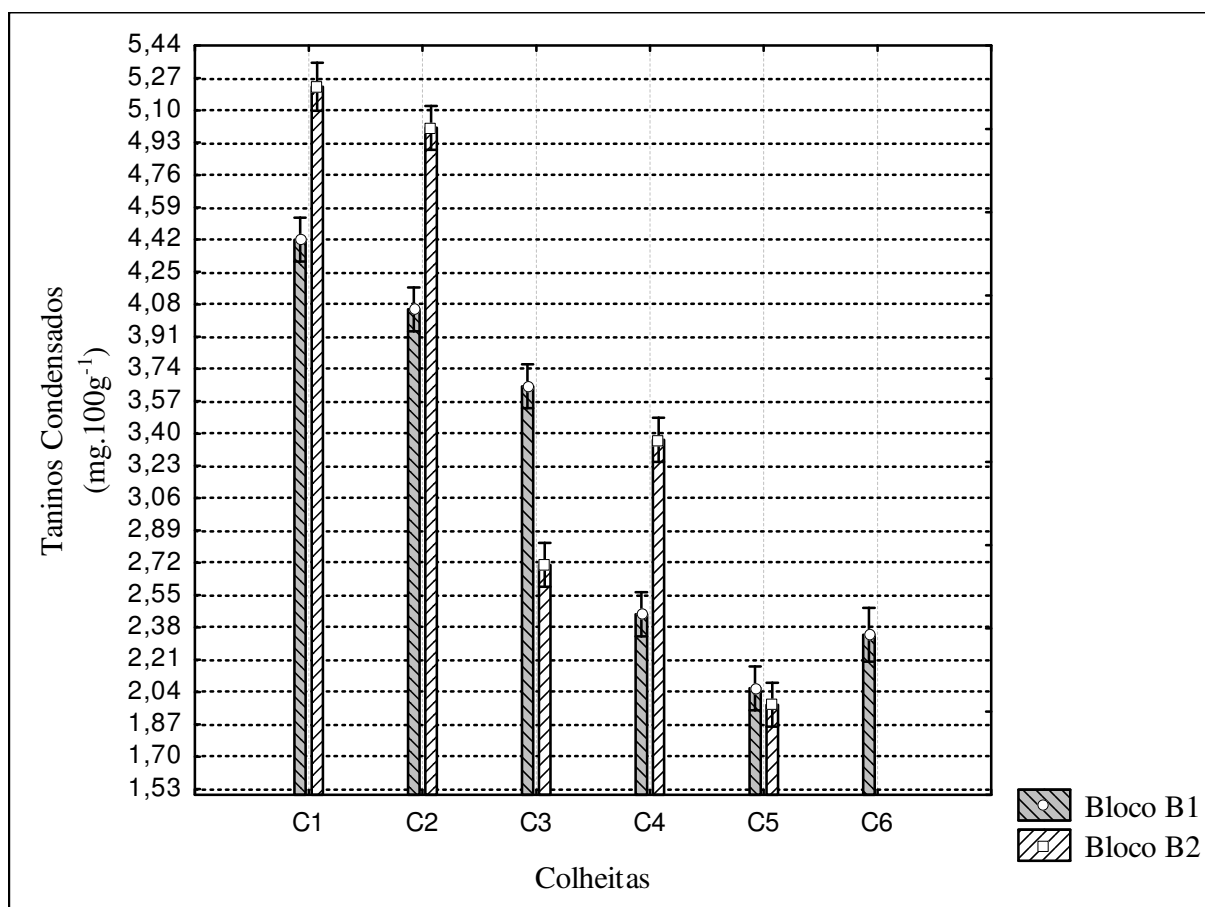


Figura 32. Médias dos tratamentos para os taninos condensados dos frutos durante as colheitas da safra 2011-2012 (2ª safra) em relação aos diferentes blocos.

Os resultados indicam que, possivelmente, as árvores do bloco B2 passaram por maiores estresses ao longo da segunda safra, gerando maiores concentrações de taninos condensados nos frutos. Este maior estresse pode ser devido a maior competição por carboidratos por conta do crescimento e formação da copa destas árvores, sendo que ao longo da safra, com a colheita dos frutos (eliminação de drenos de carboidratos), o estresse diminui, diminuindo assim a competição por carboidratos. Isto pode ser confirmado pela tendência no aumento das concentrações de SST (como visto anteriormente) e pelo aumento dos calibres (como visto no item 1.4.2.2.) desses mesmos frutos nas últimas colheitas.

1.4.3. Comparação e Avaliação das Safras 2010-2011 e 2011-2012 (1ª e 2ª Safras)

Durante as duas safras, nenhum dos tratamentos aplicados nas árvores foi capaz de antecipar o início das colheitas. Contudo, as árvores que receberam a cianamida hidrogenada, com ou sem irrigação, apresentaram a tendência de concentrar as colheitas, apresentando uma colheita a menos do que as submetidas aos demais tratamentos.

As duas safras apresentara um total de seis colheitas (realizadas quinzenalmente), sendo que a diferença do início das colheitas (em cada um dos anos) foi praticamente o

mesmo nas duas safras. A safra 2010-2011 (1ª safra) apresentou o início aproximadamente uma semana antes do da safra 2011-2012 (2ª safra), sendo estes, respectivamente, nos dias vinte e oito de Fevereiro de 2011 (28/02/2011) e oito de Março de 2012 (08/03/2012).

Constatou-se também que, nas duas safras, as árvores com a copa em desenvolvimento (bloco B2) apresentaram uma concentração na safra (possuindo apenas cinco colheitas) em comparação com as árvores já totalmente desenvolvidas (bloco B1). O fato da copa ainda estar em desenvolvimento pode propiciar condições favoráveis para maturação mais rápida dos frutos, como por exemplo uma maior entrada de raios solares devido a uma copa menos densa e/ou uma maior temperatura no interior da copa.

Segundo Chitarra & Chitarra (2005), a elevação da temperatura tem efeito marcante na redução do período de desenvolvimento, por intensificar a atividade respiratória, promovendo aumento da transpiração, modificações na coloração, nos teores de sólidos solúveis totais e de outros constituintes químicos.

1.4.3.1. Fatores de Produção da Cultura do Caqui ‘Mikado’

Verificou-se que o sistema de irrigação adotado no experimento (microaspersão) não foi o mais adequado para. Este sistema de irrigação, apesar de ser uma interessante escolha pela sua eficiência no uso da água, apresentou-se inadequado para o caquizeiro, conforme este é cultivado na região. Como os frutos destes estão nas extremidades dos galhos, ao começarem a ganhar massa, fazem com que os galhos da copa sejam rebaixados e cheguem próximo ao solo, podendo até tocar a terra caso este não seja escorado. Isso fez com que o microaspersor ficasse sob a copa, em um ambiente pouco ventilado.

Durante o experimento, para evitar possíveis problemas fitossanitários, devido a formação de um microclima no interior das copas com um alto teor de umidade, quando as plantas começavam a apresentar estas características a irrigação era suspensa. Provavelmente o melhor sistema de irrigação para a produção do caquizeiro seja a aspersão sobre copa. Este tipo de irrigação, além de evitar os problemas que se teve com a microaspersão, poderia ser utilizado como defesa contra geada em regiões suscetíveis. O sistema de gotejamento também seria uma alternativa viável ao sistema de microaspersão e teria um uso mais eficiente da água, sendo este sistema mais indicado para locais com um declive muito acentuado ou pouca disponibilidade de água (para um uso mais eficiente da água).

Contudo, caso aja um escoramento eficiente dos galhos, onde não dificulte a colheita e os tratos culturais (sem gerar custos elevados para a produção), o sistema de microaspersor poderá ser utilizado, uma vez que não haverá a formação de um microclima no interior da copa. A irrigação localizada é adaptável às mais diversas condições de relevo e todo tipo de taxa de infiltração. Pode ser usada em casos extremos, como solos muito arenosos ou muito pesados. Este tipo de irrigação provoca menor efeito de doenças que a aspersão e permite umedecimento de apenas parte da área. O efeito do vento não é problema no caso do gotejamento e afeta a uniformidade de distribuição e eficiência de forma muito mais amena na microaspersão, do que na aspersão (Trentin, 2005). O método de irrigação mais citado na literatura para o caquizeiro é o da irrigação localizada. Nos trabalhos de quebra de dormência realizado por Ayub et al. (2009) e no de avaliação da fenologia realizado por Razzouk (2007), ambos utilizaram a irrigação por microaspersão.

Constatou-se também que os produtores não realizam a poda no período em que a planta está em dormência, devido ao fato de não haver como diferenciar visualmente os ramos mortos dos sadios. Isto foi corroborado pela avaliação fenológica, onde alguns dos ramos mortos foram identificados para serem utilizados durante a coleta de dados. A poda excessiva

de ramos viáveis, deixando-se os ramos inviáveis, poderia acarretar uma queda significativa da produtividade. Por conta deste risco os produtores realizam apenas a poda de formação em mudas e a poda de limpeza em árvores (feita após a brotação vegetativa), tendo assim a garantia que estão retirando apenas os ramos inviáveis e/ou indesejados.

Outros problemas também foram detectado durante as safras e a coleta dos dados fenológicos. Constatou-se que alguns galhos apresentaram morte parcial de seus tecidos, sem que a árvore ou os ramos afetados apresentassem sintomas (Figura 33). Segundo observações realizadas no decorrer do experimento, além do que foi visualizado em outras árvores, no pomar, esta morte parcial pode ocorrer em qualquer parte do ramo, até mesmo no caule principal. Sem diminuir a produtividade da planta ou apresentar algum sintoma nas folhas, podendo levar, em último caso, à quebra do tronco principal e por consequência a perda da árvore.

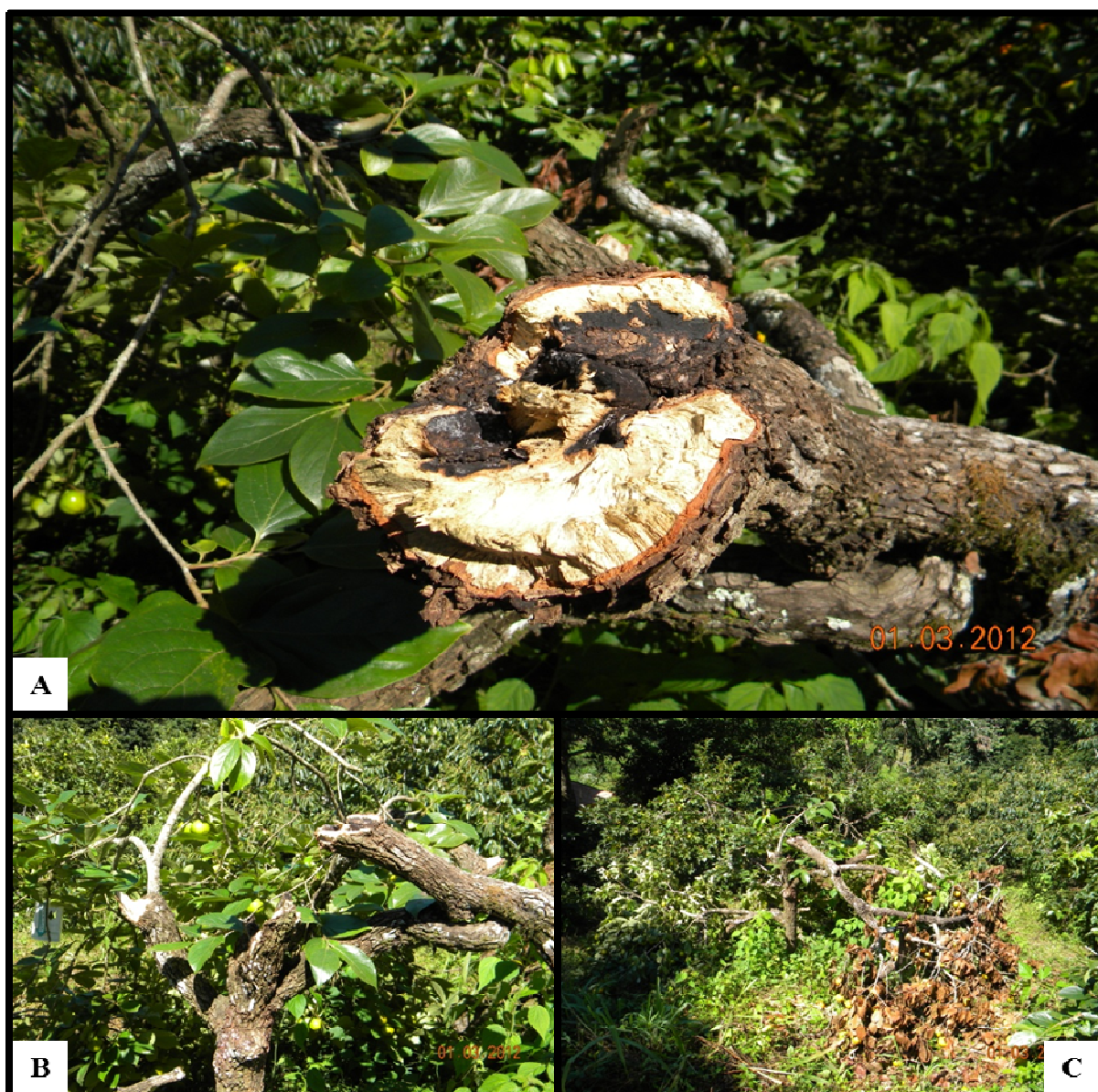


Figura 33. Ruptura do galho devido ao enfraquecimento decorrente da morte parcial do interior deste e o excesso de frutos: necrose parcial do galho (A); local onde o galho rompeu (B); perda de frutos e da arquitetura da planta.

Isto poderia ter sido minimizado com a utilização de escoramento, contudo, apenas a determinação do que está causando esta morte parcial poderia indicar uma estratégia de controle. A princípio, este problema pode estar afetando apenas a resistência dos galhos das árvores, mas pode também estar reduzindo a produtividade destas devido a redução do fluxo da seiva. Se esta redução está ocorrendo é de forma gradativa, e com isso os produtores não conseguem perceber-la.

Segundo Kimati et al. (1997), o declínio do caquizeiro pode provocar vários pontos de necrose no floema. Contudo, diferente do declínio, não houve murcha de folhas maduras no ápice dos ramos, seca descendente destes e/ou brotações anormais nas árvores que apresentaram este problema.

Esta quebra e necrose só foram identificadas no pomar mais antigo, podendo ter ocorrido devido a idade elevada das plantas. Isso ocorre em apenas algumas plantas e a estratégia dos produtores é conduzir estas até o ponto em que apresentem produtividade satisfatória e/ou morra, sendo então substituída por uma nova muda. Se este problema for devido a idade avançada das plantas, a estratégia adotada seria adequada para a renovação dos pomares, uma vez que as propriedades são pequenas e a substituição de muitas plantas acarretaria em queda de produtividade que poderia levar à inviabilidade econômica da produção.

1.4.3.2. Produção e Produtividade

As colheitas dos frutos nas árvores do experimento foram realizadas de 15 em 15 dias, sendo a 1ª safra iniciada em vinte e oito de Fevereiro de 2011 (28/02/2011) e a 2ª safra em oito de Março de 2012 (08/03/2012). Não houve antecipação do início da colheita para as árvores tratadas com cianamida hidrogenada. Contudo, nas duas safras, verificou-se um menor número de colheitas nas árvores tratadas com cianamida hidrogenada (na safra em que estas receberam este tratamento), independente da aplicação da irrigação, o que indica uma concentração da safra. De acordo com Mizobutsi (2003), em caqui Rubi, diferente dos resultados encontrados no caqui 'Mikado', a cianamida hidrogenada antecipou a colheita em dois meses e meio.

Considerando-se as duas safras, não houve diferença significativa ($p > 0,849$) entre a produtividade média dos tratamentos e nem dos blocos ou safras. A produtividade variou de $4.098,09\text{Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ a $6.068,19\text{Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ por colheita e $19.465,97\text{Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ a $31.857,97\text{Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ por safra, sendo o espaçamento entre plantas de 5 X 5m (400 árvores por ha) e a produtividade média por safra de $25.311,19\text{Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$. Esses resultados indicam que a utilização sucessiva da cianamida hidrogenada não afeta a produtividade das árvores de caquizeiro. Já em relação às colheitas, verificou-se que a produtividade aumentou conforme as colheitas foram sendo realizadas (Figura 34). Observou-se também um aumento significativo na produtividade das colheitas na segunda safra, onde a média por colheita na primeira safra foi de $3.733,89\text{Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ e na segunda foi de $6.049,52\text{Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$.

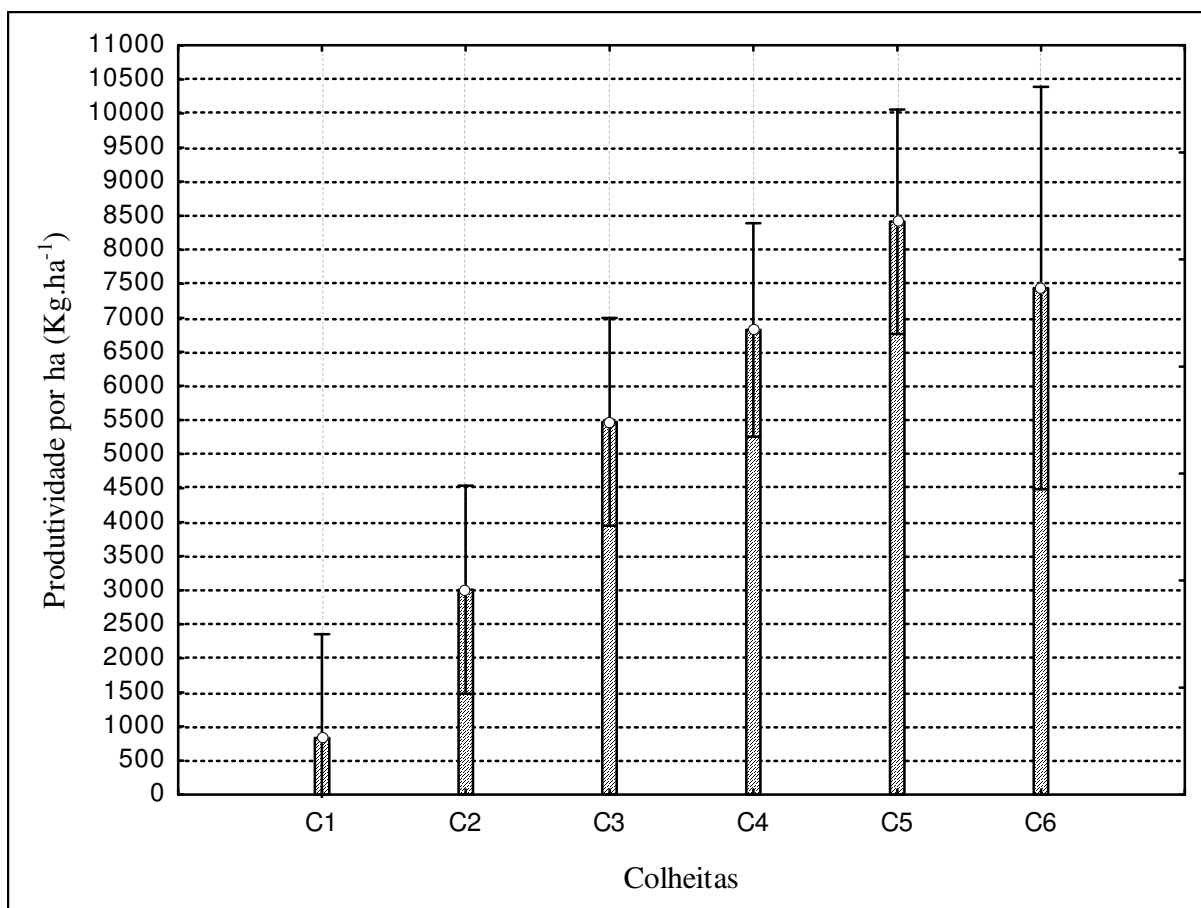


Figura 34. Médias dos tratamentos, blocos e safras para a produtividade do caquizeiro (Kg.ha⁻¹) em relação às colheitas.

Segundo Martins & Pereira (1989), uma planta adulta de caquizeiro, de modo geral, produz (em culturas bem conduzidas) de 100 a 150 quilos de frutos anualmente, o que com o espaçamento adotado nas árvores do experimento seria de 40.000 a 60.000 quilos de frutos por hectare. Contudo esses mesmos autores, afirmam que o espaçamento ideal para o caquizeiro é de 7 X 7m (204 árvores por hectare), que segundo as estimativas produziriam 20.400 quilos por hectare. Em comparação com estes dados, nas condições em que o experimento foi conduzido, o espaçamento adotado (5 X 5m) foi favorável, já que este apresentou uma produtividade média maior (25.311,19 Kg.ha⁻¹).

De acordo com informações obtidas no site oficial do Comitê de Fruticultura da Metade Sul do RGS (Frutas – RS, 2013), o espaçamento de plantio varia em função da variedade a ser cultivada. Para as variedades do tipo taninoso e variável, cujas plantas são mais vigorosas, os espaçamentos mais utilizados são 8 X 7m (178 plantas por ha), 7 X 7m (204 plantas/ha) e 7 X 6m (238 plantas por ha). Já para as variedades do tipo não taninosos, cujas copas são menos vigorosas, os espaçamentos mais utilizados são os de 7 X 6m (238 plantas/ha), 6 X 6m (277 plantas por ha) e 6 X 5m (333 plantas por ha).

Segundo informações obtidas no site oficial do IBGE (2013), a produtividade do caquizeiro no Brasil variou, em 2011, de 13.155,00Kg.ha⁻¹ (Paraná) a 22.824,00Kg.ha⁻¹ (São Paulo). Já o estado do Rio de Janeiro apresentou uma produtividade de 21.408,00Kg.ha⁻¹ e no município de Sumidouro foi de 28.000,00Kg.ha⁻¹.

A cianamida hidrogenada é capaz de promover aumento do número de frutos por planta e, conseqüentemente, aumento da produtividade, em caquizeiro da variedade ‘Fuyu’ (Ayub et al., 2009). Contudo, nem a cianamida hidrogenada, a irrigação ou a associação de ambos, aumentaram a produtividade das árvores de caqui ‘Mikado’ do experimento, nas safras de 2010-2011 (1ªsafra) e 2011-2012 (2ª safra).

Considerando-se as duas safras, não houve diferença significativa de perdas durante o transporte dos frutos ($p>0,237$), nem em relação aos tratamentos ou em relação às colheitas, variando em média de 9,87 a 20,57% durante as colheitas e de 8,18 a 19,18% entre os tratamentos. Em relação às perdas no campo, não houve diferença entre as safras ou entre as árvores com a copa já totalmente desenvolvida (bloco B1) e as que apresentavam a copa ainda em desenvolvimento (bloco B2), havendo apenas diferenças significativas ao longo das colheitas (Figura 35).

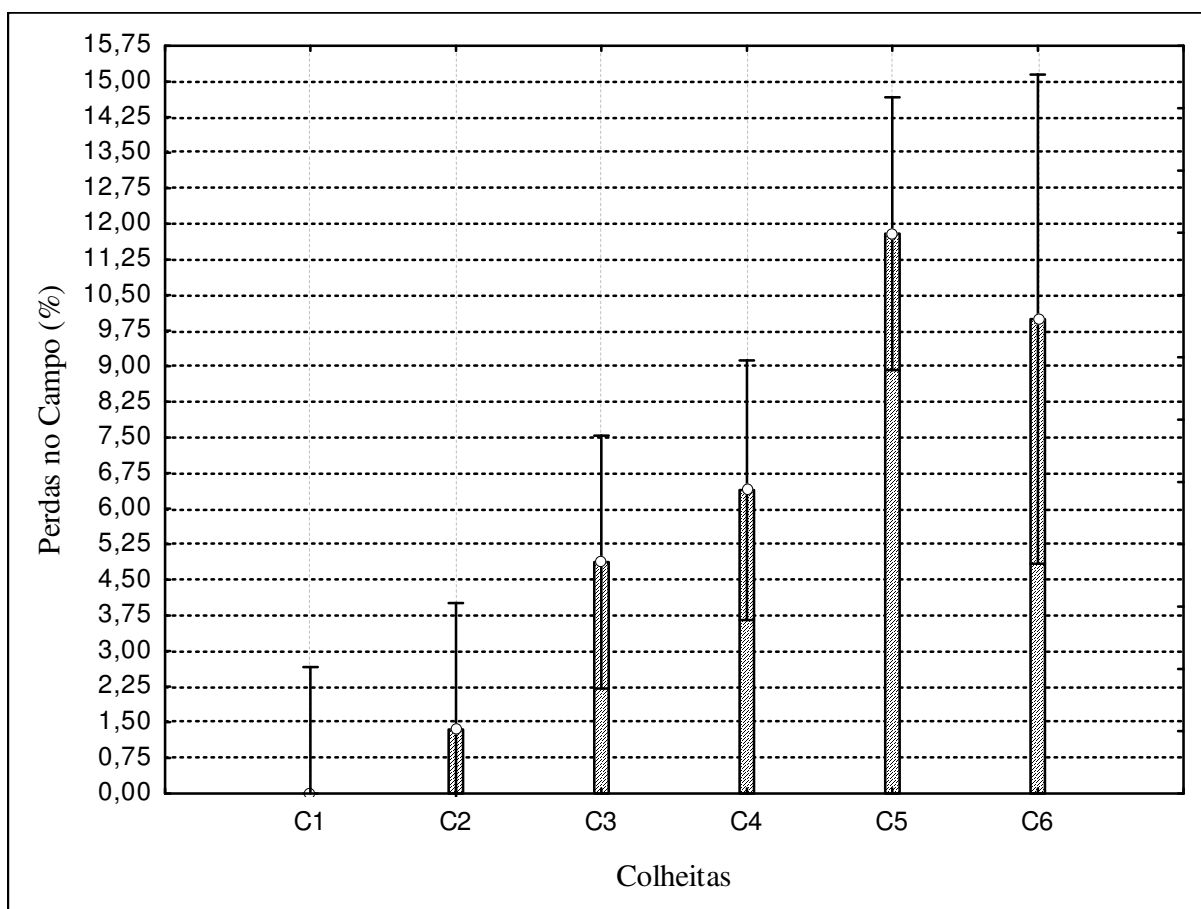


Figura 35. Médias dos tratamentos, blocos e safras para o percentual de de perdas de frutos no campo em relação às colheitas.

Considerando esses resultados, os tratamentos que receberam cianamida hidrogenada não tiveram a sexta colheita. A adoção de colheitas semanais, ao invés de quinzenais pode proporcionar menores perdas no campo, conseqüentemente um aumento na receita bruta.

Uma vez que a cianamida hidrogenada foi capaz de concentrar as safras nas primeiras colheitas, a redução entre o intervalo das colheitas poderia proporcionar não só uma diminuição nas perdas de campo, como também um aumento na qualidade dos frutos. Já que

estes permaneceriam por um período de tempo menor no campo (em comparação com os frutos das árvores não tratadas), tendo uma menor exposição a condições adversas.

No Brasil estima-se que entre a colheita e a mesa do consumidor ocorrem perdas de até 30% das frutas, sendo este desperdício causado principalmente por falhas no armazenamento e transporte (Assmann et al., 2006). Esses dados concordam com os pelos resultados obtido ao longo do experimento, sendo que as maiores perdas registradas foram durante o transporte (por volta de 20%). Estas não são necessariamente devido a deficiência no transporte e sim pela qualidade do fruto que chega para o transportado, onde este pode apresentar aparência adequada para comercialização, contudo já estar em um estado fisiológico avançado de tal forma que não resiste ao transporte. Já no campo, as perdas registradas foram por volta de 12%.

Os tratamentos também apresentaram diferença significativa em relação as perdas médias por colheita no campo. O tratamento T1 foi o que demonstrou as maiores perdas e o tratamento T6 as menores, contudo não houve diferença significativa entre o restante dos tratamentos e entre esses dois tratamentos (Figura 36).

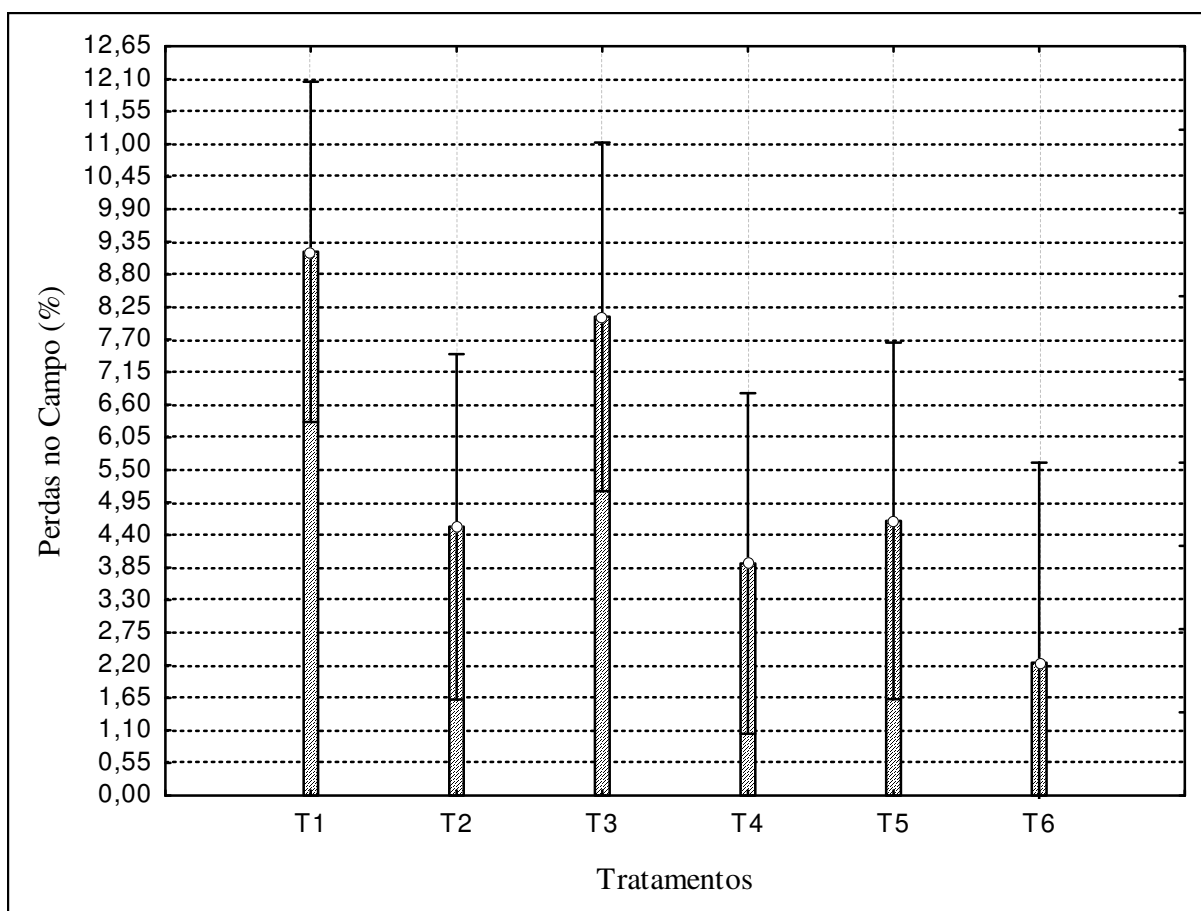


Figura 36. Médias das safras, colheitas e blocos para o percentual de perdas de frutos no campo em relação aos tratamentos aplicados nas plantas.

Apesar da cianamida hidrogenada, da irrigação, ou da associação das duas não terem reduzido significativamente as perdas no campo, nas condições em que o experimento foi conduzido, a diminuição do intervalo entre as colheitas poderia proporcionar um resultado totalmente diferente.

1.4.3.3. Caracterização dos Frutos

Os frutos apresentaram calibres com diferenças significativas entre as safras, blocos, colheitas e tratamentos. Na Figura 37 observa-se que em relação aos blocos, o bloco B2 (árvores mais novas, com a copa em desenvolvimento) mostrou em média um menor calibre nas duas safras, contudo a diferença foi bem maior na segunda safra. É possível verificar também que houve uma diminuição dos calibres na segunda safra nos dois blocos.

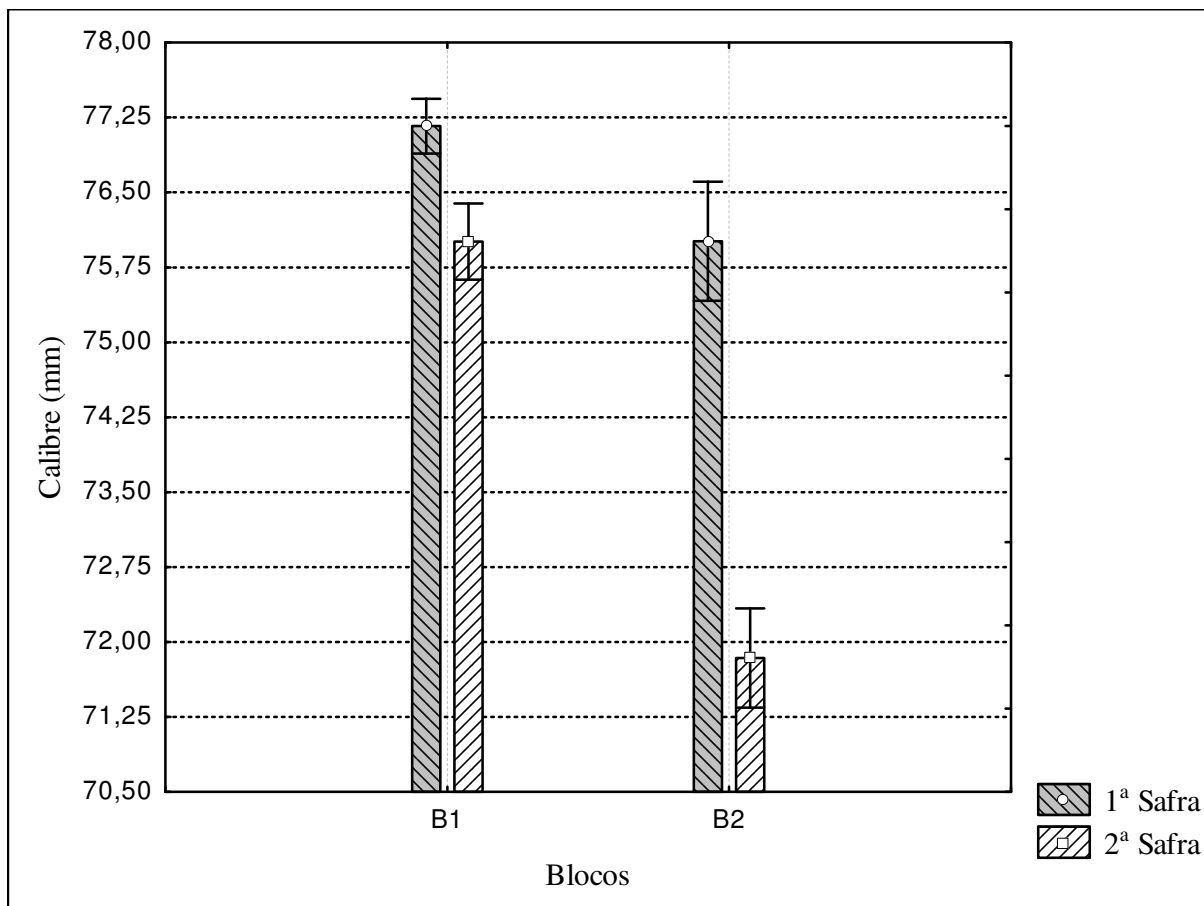


Figura 37. Médias dos tratamentos e colheitas para o calibre dos frutos das plantas com a copa totalmente desenvolvida (bloco B1) e das com a copa em desenvolvimento (bloco B2) nas diferentes safras (1ª e 2ª safras).

Provavelmente as árvores do bloco B2 apresentaram um menor calibre por haver uma maior competição entre a parte vegetativa da planta (desenvolvimento da copa e armazenamento de carboidratos para a safra seguinte) e a reprodutiva. Isso é corroborado pelos dados da produtividade (como visto no item 1.4.3.2.), uma vez que quando a produtividade aumentou na 2ª safra, a diferença entre o calibre dos frutos do bloco B2 aumentou em relação ao do bloco B1, provavelmente devido a maior competição por carboidratos na segunda safra. Sendo que as árvores dos dois blocos apresentaram frutos com menores calibres na safra 2011-2012 (2ª safra).

Corsato (2004), avaliando caquizeiros da variedade Rama Forte, sugere a independência das reservas contidas na raiz para o desenvolvimento dos frutos, o que demonstra a importância dos ramos possuírem reservas adequadas para o próximo ciclo. Corsato et al. (2008) preconizam que a mobilização do amido de reserva nos ramos de

caquizeiro, da cultivar Rama Forte, possui grande importância na sustentação de um novo fluxo de brotação no início do desenvolvimento vegetativo. Sendo que a reposição no estoque desse amido de reserva nos ramos e nas raízes ocorre, principalmente, entre o florescimento e a abscisão foliar.

Ao se comparar os calibres dos frutos das árvores submetidas a diferentes tratamentos, sem considerar a idade e o desenvolvimento da copa das árvores (blocos), verificou-se uma diferença significativa entre as duas safras. Com exceção das árvores tratadas com a cianamida hidrogenada nas duas safras, com (tratamento T2) e sem irrigação (tratamento T5), e as submetidas ao tratamento T6 (apenas cianamida hidrogenada na 1ª safra), as árvores submetidas aos demais tratamentos apresentaram, na segunda safra, frutos com menor calibre (Figura 38).

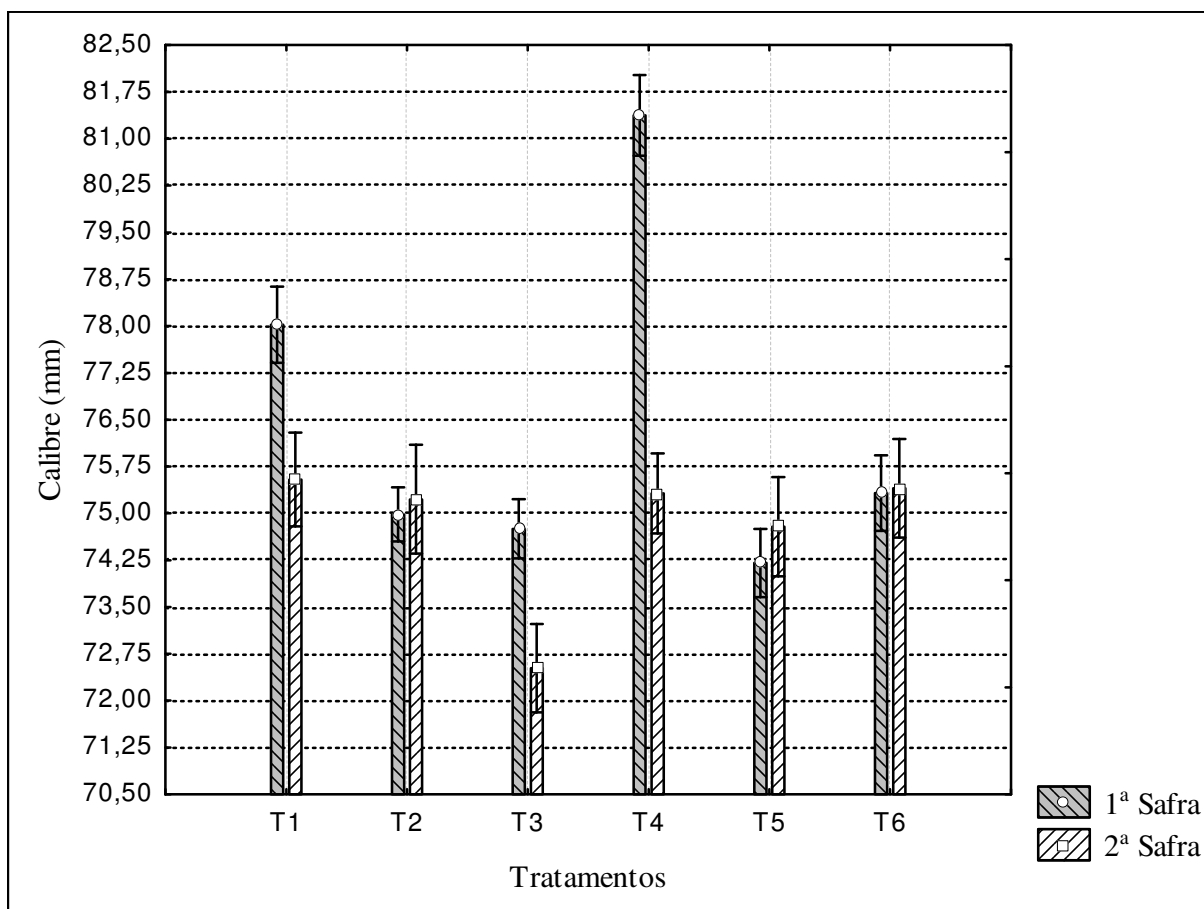


Figura 38. Médias dos blocos e colheitas para o calibre dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação às safras (1ª e 2ª safras).

Provavelmente, os frutos apresentaram um menor calibre na segunda safra devido a uma maior competição por carboidratos, decorrente da maior produtividade apresentada pelas árvores na segunda safra (como visto no item 1.4.3.2.).

É possível também que a aplicação da cianamida hidrogenada na segunda safra nas árvores submetidas aos tratamentos T2 e T5 tenha auxiliado e evitado a redução dos calibres dos frutos. Isto pode ser devido ao maior período de tempo que os frutos em desenvolvimento permaneceram nos ramos (1,5 semanas), como visto no item 1.4.2.1.3. anteriormente. Este maior período pode ter proporcionado a oportunidade dos frutos armazenarem mais reservas,

permitindo maiores calibres. O fato dessas mesmas árvores terem apresentado uma brotação vegetativa em pelo menos duas semanas antes das demais (como visto no item 1.4.2.1.1.) pode ter colaborado para que os órgãos de reservas apresentassem um maior acúmulo inicial de carboidratos, diminuindo assim um pouco a competição entre a parte reprodutiva e a vegetativa da planta.

Com exceção das árvores submetidas ao tratamento T3 (cianamida hidrogenada e irrigação apenas na 1ª safra), as árvores com a copa totalmente desenvolvida (bloco B1) apresentaram frutos com calibres maiores do que as árvores com a copa ainda em desenvolvimento (bloco B2), considerando-se as duas safras (Figura 39).

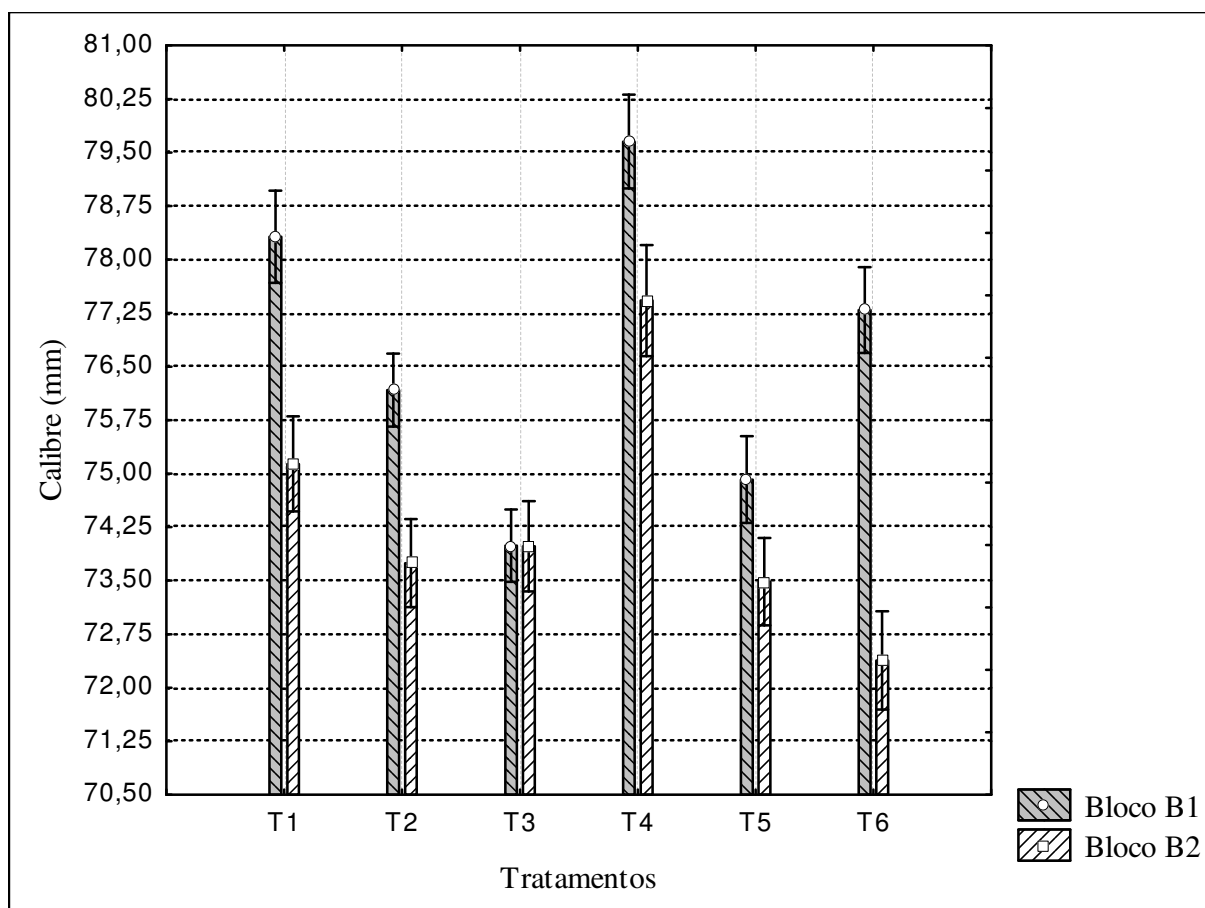


Figura 39. Médias das safras e colheitas para o calibre dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação aos blocos.

Provavelmente o menor calibre dos frutos das árvores do bloco B2 se deve pela maior competição por carboidratos entre a parte vegetativa e a parte reprodutiva. Isto é corroborado pelos resultados das concentrações nos frutos de sólidos solúveis totais (menores concentrações nos frutos das árvores do bloco B2, com exceção dos tratamentos T1 e T6) e taninos condensados (maiores concentrações nos frutos das árvores do bloco B2, com exceção do tratamento T1), sendo estes resultados discutidos no item 1.4.3.4. O que é condizente com a suposição de que os frutos das árvores do bloco B2 sofreram um maior estresse devido a maior competição por carboidratos entre a parte vegetativa (acúmulo de reservas e formação da copa) e a parte reprodutiva.

Ao se comparar os calibres dos frutos, considerando-se apenas as colheitas ao longo das duas safras, constata-se que os calibres dos frutos da primeira safra (com exceção da última colheita) foram sempre maiores do que os da segunda. É possível observar também que ao longo das duas safras, o calibre dos frutos aumentam a cada colheita (Figura 40).

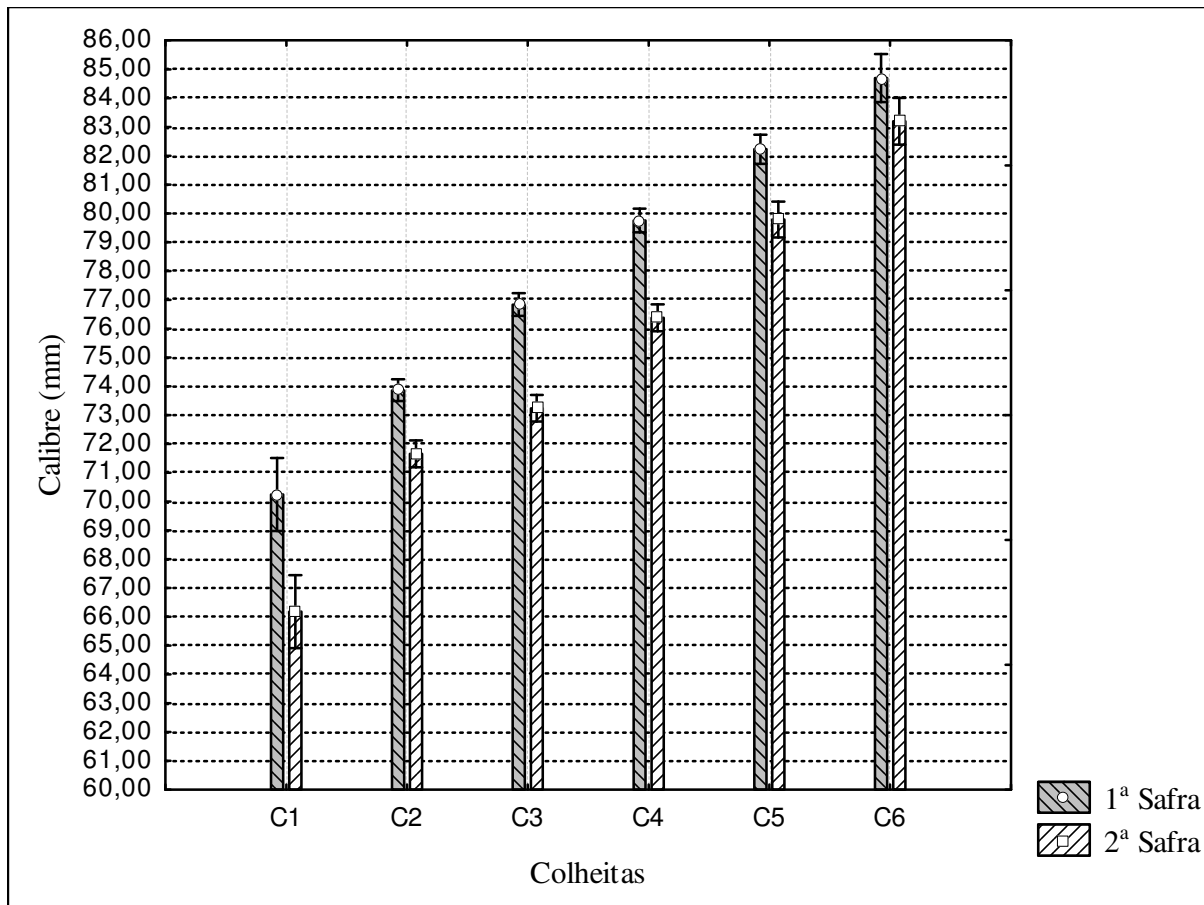


Figura 40. Médias dos tratamentos e blocos para o calibre dos frutos nas colheitas ao longo das duas safras.

Estes resultados corroboram com a suposição de que devido a maior produtividade na segunda safra (como visto no item 1.4.3.2.), houve uma maior competição entre os frutos em si e entre a parte vegetativa. As concentrações dos sólidos solúveis totais (menores em todas as colheitas na segunda safra, com exceção da colheita C1) e dos taninos condensados (maiores em todas as colheitas na segunda safra, com exceção das colheitas C1 e C6) nos mesmos frutos (sendo estes discutidos posteriormente no item 1.4.3.4.) também fortalecem esta conjectura. Sendo também reforçada pelo fato de que nas duas safras os frutos aumentaram de calibre ao longo das colheitas.

O aumento do calibre dos frutos ao longo das colheitas está associado tanto com o maior período de tempo de permanência destes na planta, quanto devido a diminuição do estresse sofrido ao longo das colheitas. Os frutos colhidos tardiamente possuem um maior tempo, nos ramos, para armazenar uma maior quantidade de reservas e se desenvolver mais, enquanto que, conforme ocorre a colheita, o número de drenos de carboidratos diminui (frutos colhidos), diminuindo a intensidade da competição e conseqüentemente o estresse sofrido pelos frutos remanescentes.

A diminuição do estresse ao longo das colheitas é condizente com os resultados das concentrações dos sólidos solúveis totais nos frutos (tendência de aumento das concentrações ao longo das colheitas) e taninos concentrados (tendência de diminuição das concentrações ao longo das colheitas), sendo estes discutidos item 1.4.3.4. posteriormente.

Segundo Corsato (2004), o caquizeiro é uma fruteira sujeita à alternância de produção. Devido à competitividade entre os ramos vegetativos e os frutos é comum que haja alternâncias na produção de uma safra para outra. Quando em uma safra ocorre grande produção não há acúmulo de reserva suficiente nos ramos para garantir um desenvolvimento adequado na parte aérea da próxima safra para mais uma grande produção.

A alternância de produção, característica natural do caqui 'Pomelo', pode ser controlada mediante poda severa de ramos no inverno e desbaste precoce dos frutos em excesso, em anos em que se espera frutificação abundante (Ojima, 1985).

Ao se verificar o formato e a massa dos frutos de caqui da variedade 'Mikado' ao longo do experimento, constatou-se que há uma correlação significativa entre o calibre e o comprimento (Figura 41) e entre o calibre e a massa dos frutos (Figura 42), onde quanto maior for o calibre, maior será o comprimento e a massa do fruto.

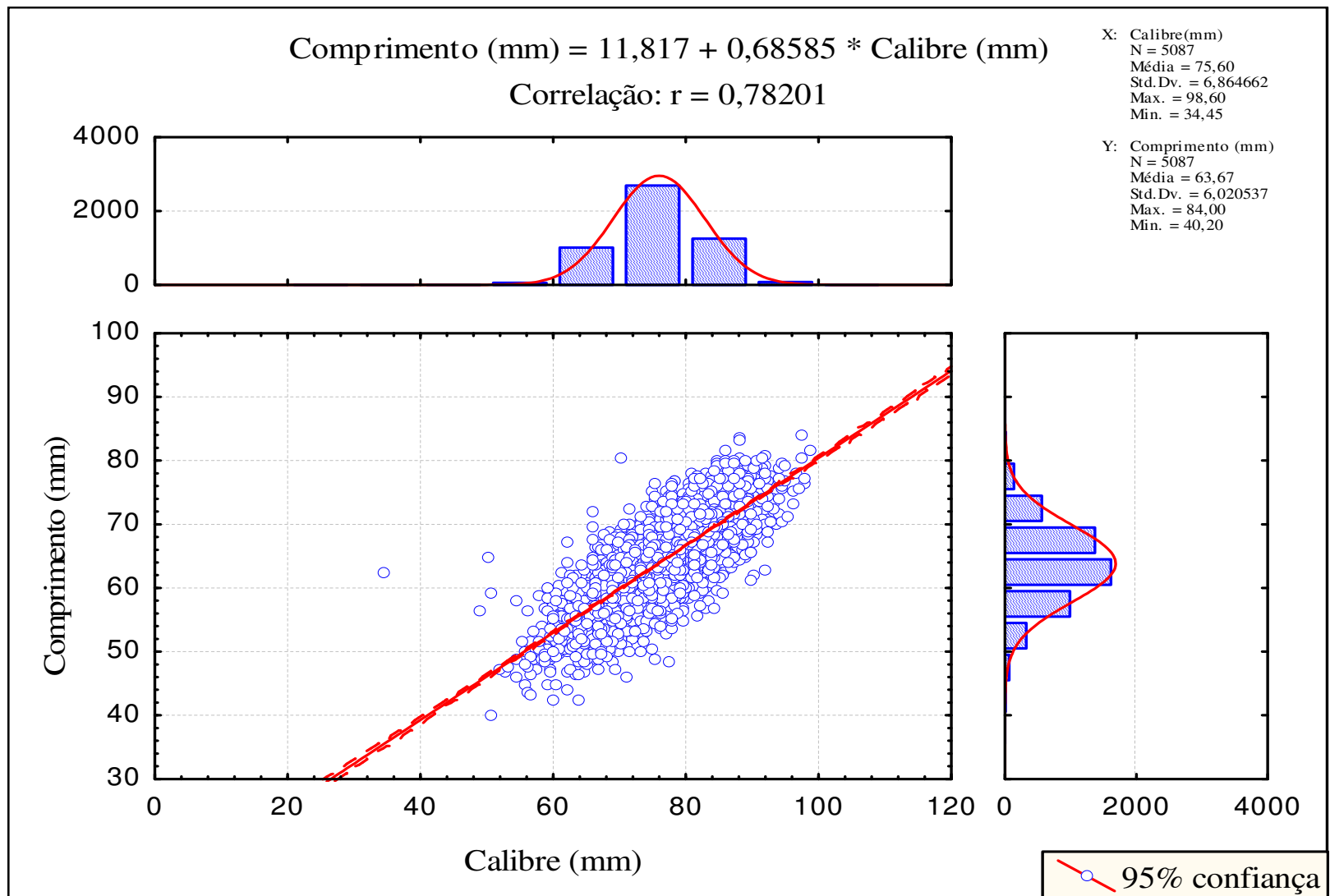


Figura 41. Correlação entre o calibre e o comprimento dos frutos colhidos ao longo das duas safras.

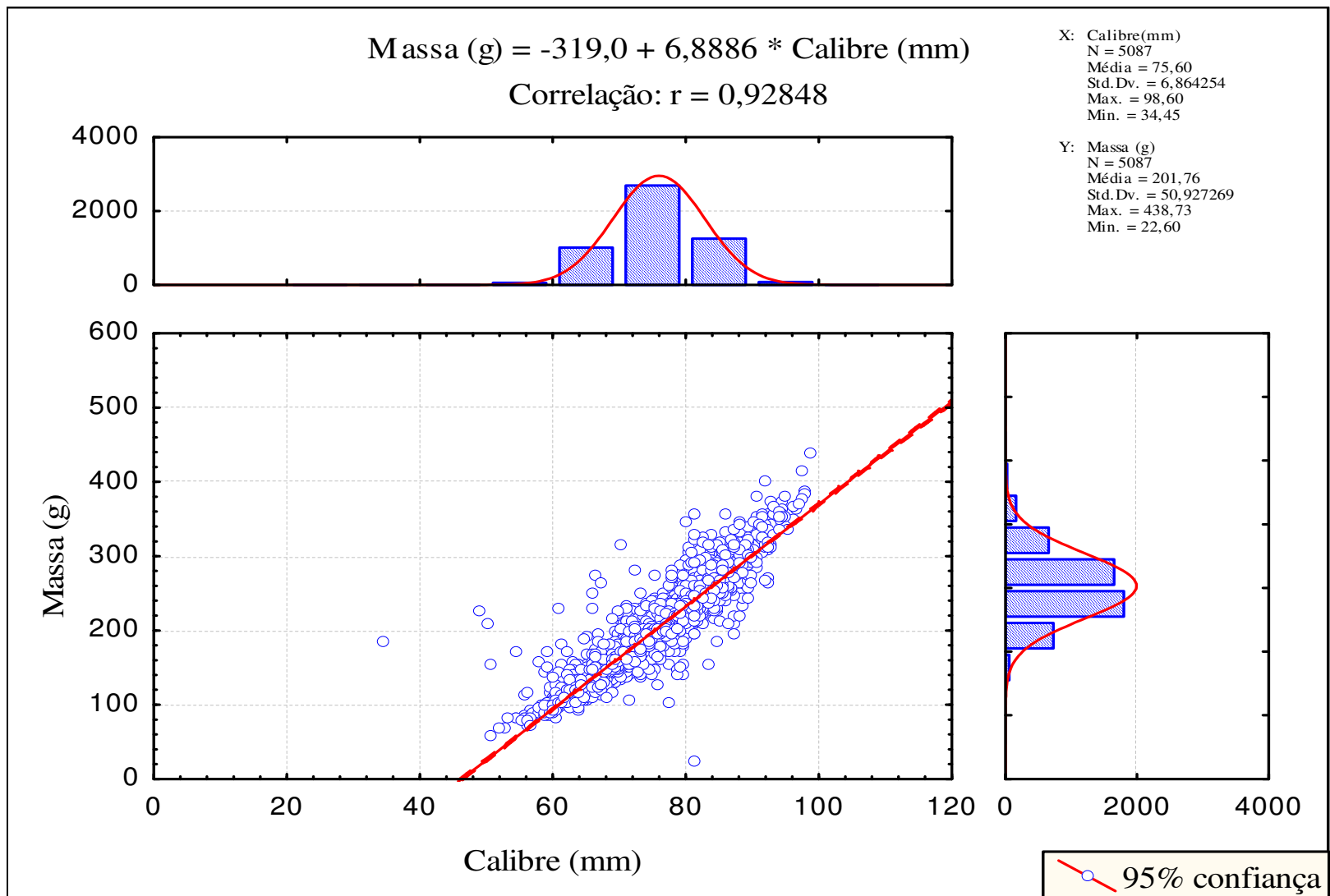


Figura 42. Correlação entre o calibre e a massa dos frutos colhidos ao longo das duas safras.

O tamanho dos frutos varia muito de variedade para variedade. Nas condições experimentais, os frutos da variedade ‘Mikado’ apresentaram em média massa de 201,76g, sendo a menor massa de 22,60g e a maior de 438,73g. Razzouk (2007), avaliando a fenologia de dez variedades de caquizeiro em regiões tropicais, verificou que a variedade Jiro produziu os maiores frutos (290,75g), seguido pelas variedades Fuyuhana (148,21g), Fuyu (116,26g) Pomelo (116,22g), Rubi (93,31g), Rama Forte (70,03g) e Giombo (68,97g).

Os frutos ao serem embalados são separados e classificados, sendo que um dos parametros de classificações adotado é o calibre destes. A classificação do fruto de caqui pelo calibre é feita em 8 categorias, variando de 4 a 11 (FAEP, 2013). Considerando-se os dados obtidos com as análises de correlações e o sistema atual de classificação é possível estimar as dimensões ideais para embalagens de caqui da variedade ‘Mikado’ levando-se em conta os dados presentes na Tabela 15.

Tabela 15. Classificação de frutos de caqui ‘Mikado’, levando-se em conta o comprimento e a massa que os frutos terão, com cálculos feitos a partir dos dados das correlações obtidas nas Figuras 41 e 42. Tabela adaptada a partir da classificação obtida no site oficial da Federação da Agricultura do Estado do Paraná (FAEP – 2013).

Classes	Diâmetro Equatorial (mm)		Altura maior que (mm)	Massa por Fruto (g)	
	Mínimo	Máximo		Mínimo	Máximo
4	–	50	46,11	–	25,43
5	50	60	52,97	25,43	94,32
6	60	70	59,83	94,32	163,20
7	70	80	66,69	163,20	232,09
8	80	90	73,54	232,09	300,97
9	90	100	80,40	300,97	369,86
10	100	110	87,26	369,86	438,75
11	110	–	87,26	438,75	–

A qualidade e aparência dos frutos são fundamentais para a comercialização. Tão importante quanto o tamanho e a forma é a presença ou ausência de injúrias. Ao longo das duas safras avaliadas (2010-2011 e 2011-2012) verificou-se que, nas condições experimentais, as injúrias presentes nos frutos não foram influenciadas pela época em que

foram colhidas (colheitas), pelo uso da irrigação, da cianamida hidrogenada ou pela idade das árvores (blocos). As injúrias que mais apareceram nos frutos foram estria, abrasão e mancha. Sendo que as que apresentaram menor incidência foram deformidade, podridão, perfuração e queimadura de sol (como visto nos itens 1.4.1.1. e 1.4.2.2.).

A Tabela 16 mostra que de uma safra para a outra, apenas as injúrias do tipo estria, abrasão, queimadura de sol e perfuração apresentaram diferenças significativas, sendo que apenas a injúria tipo perfuração aumentou da primeira safra para a segunda.

Tabela 16. Médias dos tratamentos, blocos e colheitas para os percentuais de frutos injuriados nas diferentes safras (1ª e 2ª safras).

Injúria	1ª Safra	2ª Safra
Estria	30,14 a	21,67 b
Abrasão	22,66 a	16,23 b
Queimadura de Sol	3,65 a	1,70 b
Perfuração	5,09 b	8,12 a

Letras minúsculas e iguais nas linhas não apresentam diferença significativa.

Das injúrias de maior incidência nos frutos, a do tipo estria é a que demonstrou maior importância nas propriedades onde o experimento foi conduzido. Apesar desta ter diminuído da primeira para a segunda safra, ainda continuou com uma porcentagem muito elevada, permanecendo como uma das injúrias de maior incidência na segunda safra (como visto no item 1.4.2.2.).

A maior produtividade registrada na segunda safra (como visto no item 1.4.3.2.) pode ter influenciado o aparecimento nos frutos das injúrias do tipo estria e queimadura do sol. Com uma maior produtividade, é possível que os frutos tenham aumentado de tamanho de forma mais lenta devido a uma maior competição por carboidratos. Isto pode ter permitido que o crescimento da epiderme do fruto acompanhasse melhor a taxa de crescimento dos frutos, diminuindo com isto o aparecimento de rachaduras, o que gerariam as estrias.

A maior competição por carboidratos e o desenvolvimento mais lento dos frutos podem ser corroborados pelo fato de que as árvores que apresentaram uma menor fase fenológica de desenvolvimento dos frutos (árvores submetidas aos tratamentos T1, T3, T4 e T6), como visto no item 1.4.2.1.3., também apresentaram calibres de frutos menores na segunda safra (como visto na Figura 38). Ou seja, com um menor tempo para se desenvolver e uma maior competição por carboidratos (aumento da produtividade na segunda safra), pode ter acarretado em um menor calibre nos frutos.

Se considera-mos que, teoricamente, a diminuição de calibre dos frutos ocorreu pela maior competição e pelo crescimento mais lento destes. As árvores tratadas com a cianamida hidrogenada na segunda safra (tratamentos T2 e T5), apesar de também terem apresentado um desenvolvimento mais lento dos frutos por conta da maior competição por carboidratos, podem ter tido uma manutenção do tamanho por terem apresentado um maior período de tempo para estes se desenvolverem.

Segundo Edagi e Kluge (2009), o aparecimento dessas rachaduras pode estar relacionado à aceleração do crescimento dos frutos, causando por excesso de irrigação ou adubação nitrogenada. É importante a aplicação de uma irrigação racional, na cultura do caqui, com aplicações de volumes pequenos de água de forma que as plantas não sofram estresse, nem por déficit e nem por excesso de água. Um grau adequado de umidade no solo modera a queda de frutos e reduz sobretudo a aparições de rachaduras, sede de posterior instalação de micélios fúngicos (*Penicillium*, *Macrosporium*, *Botrys*, etc.), o que causa depreciação comercial do fruto. Isso ocorre devido a um aumento rápido no conteúdo de água a nível celular, é característica de estação de crescimento seca, com um excesso de umidade no período que antecede a maturação (Ragazzini, 1985).

O problema com a injúria tipo estria, na localidade do experimento, pode ser semelhante ao da rachadura, porem de forma mais branda. O crescimento do fruto pode ser rápido demais, em um determinado momento, para o crescimento epidérmico acompanhar, o que acaba provocando o surgimento das estrias.

Em relação a injúria do tipo queimadura de sol, a maior produtividade registrada na segunda safra pode estar associada a uma brotação vegetativa mais vigorosa, devido talvez a condições climáticas favoráveis. Caso isto tenha ocorrido, as copas das árvores poderiam se apresentar mais densas, proporcionando assim maior proteção aos frutos contra o sol. Em associação a isto, ou de forma isolada, as condições climáticas apresentadas ao longo da segunda safra (safra 2011-2012) podem ter sido mais favorável para a diminuição desta injúria (maior quantidade de dias com menores insolação).

O excesso de luminosidade pode resultar em escaldadura dos tecidos, pelo excesso de energia solar, tendo como consequência a degradação da pigmentação das áreas superficiais. Os danos variam com a duração da exposição e intensidade da luz, que, em casos mais graves, causa o colapso e morte dos tecidos (Chitarra & Chitarra, 2005).

Há a possibilidade das condições climáticas na segunda safra terem auxiliado na diminuição da incidência da injúria do tipo abrasão nos frutos. Uma das causas deste tipo de injúria no campo é o atrito dos frutos nos galhos da árvore (Figura 43). Caso a velocidade do vento tenha sido menor na segunda safra, auxiliaria na diminuição deste tipo de injúria.



Figura 43. Injúria do tipo abrasão causada pelo atrito com o galho da árvore.

De acordo com Chitarra & Chitarra (2005), ventos excessivos danificam a estrutura física dos tecidos mais delicados, causando abrasões que prejudicam a aparência pela formação de cicatrizes e predispõem os produtos a doenças, uma vez que essas áreas danificadas têm menor resistência à penetração por microrganismos.

Já a injúria nos frutos do tipo perfuração podem ser causadas por galhos que colidem com muita força na epiderme desses, como por animais. Os pássaros, atraídos pela cor dos frutos, podem tentar se alimentar destes. Entretanto, os altos níveis de adstringência presente na casca e na polpa desencoraja os pássaros de se alimentarem. Apesar dos altos níveis de adstringência impedirem a alimentação, a tentativa em si já seria o bastante para causar a injúria do tipo perfuração.

A adstringência do fruto de caqui é causada pelos taninos condensados presentes na polpa. Os taninos agem como repelentes alimentares a uma grande variedade de animais. Frutos imaturos, por exemplo, em geral apresentam altos níveis de taninos que podem estar concentrados nas camadas celulares mais externas (Taiz & Zeiguer, 2004).

A identificação dos fatores pré-colheita que predispõem o desenvolvimento de desordens fisiológicas na fase pós-colheita, torna possível a redução da incidência dessas desordens (Chitarra & Chitarra, 2005). O manejo agrícola de ensacar os frutos ainda na árvore pode ser uma solução para diminuir drasticamente os índices de injúrias dos tipos abrasão, perfuração e queimadura de sol. Apesar deste manejo aumentar o custo de produção, uma maior qualidade dos frutos poderia proporcionar também melhor remuneração e/ou a conquista de novos mercados.

1.4.3.4. Caracterização Química dos Frutos

Os frutos, após sofrerem a retirada da adstringência, foram avaliados quimicamente. Observou-se que, no caso da acidez total titulável (ATT) (Figura 44), houve diferença significativa entre as duas safras avaliadas ($p < 0,001$), havendo uma diminuição da ATT da primeira para a segunda safra, enquanto que não houve interação entre as safras e os blocos ($p > 0,373$), as safras e os tratamentos ($p > 0,240$) e as safras e as colheitas ($p > 0,862$).

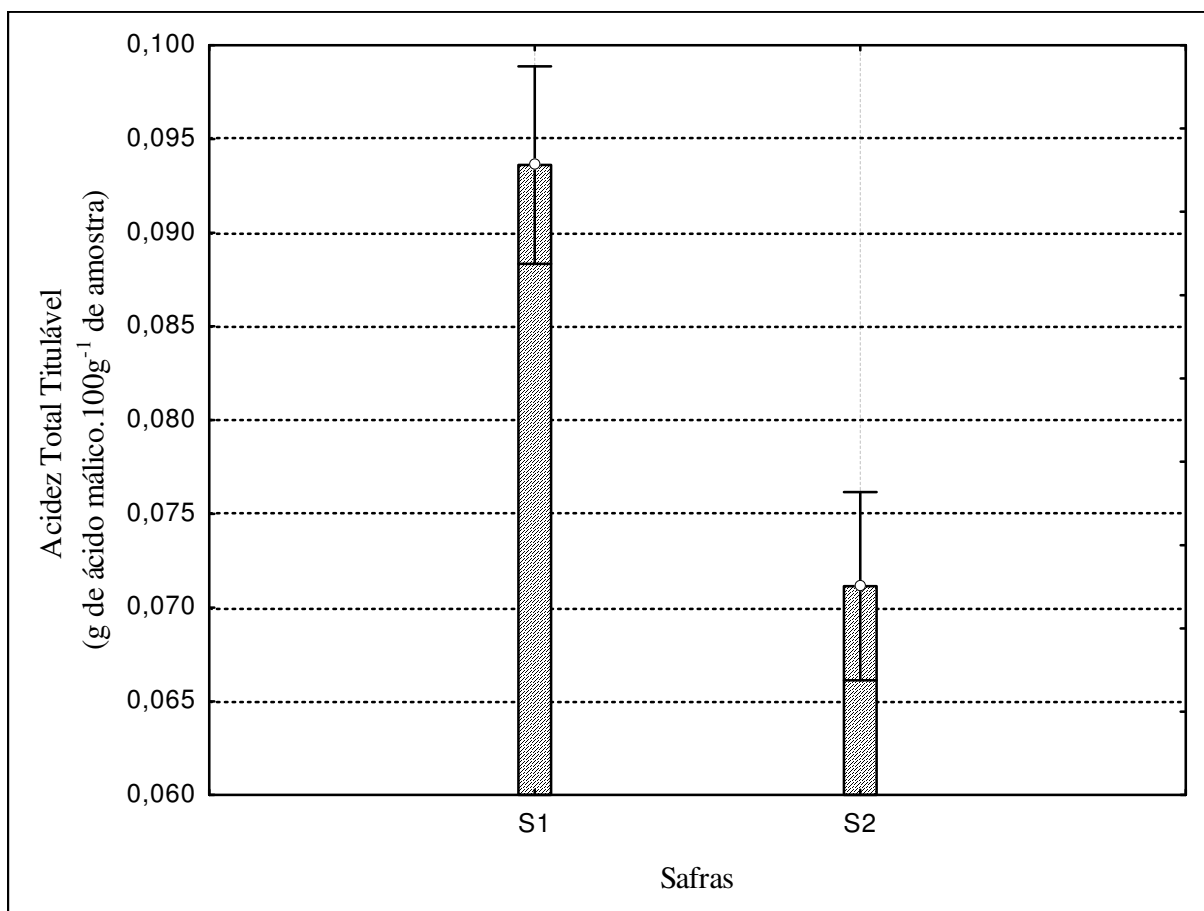


Figura 44. Médias dos tratamentos, blocos e colheitas para a acidez total titulável dos frutos em relação às safras de 2010-2011 e 2011-2012 (1^a e 2^a safras).

Esperava-se um aumento da concentração da acidez total titulável, na polpa dos frutos, da primeira para a segunda safra devido ao aumento que ocorreu na segunda safra de taninos condensados (dados apresentados posteriormente), uma que os taninos condensados são ácidos orgânicos. Provavelmente isto não ocorreu porque a concentração de outros ácidos orgânicos, mais representativos para a acidez dos frutos do caqui 'Mikado', diminuíram na segunda safra.

Outro fator que também corroboraria para o aumento da acidez total titulável na segunda safra (o que não ocorreu) foi o aumento da produtividade na segunda safra (como visto no item 1.4.3.2.). Com o aumento da produtividade, ocorre um aumento do estresse sofrido pela planta, o que é atestado pelos resultados de taninos condensados (como será visto mais a frente). Com o aumento do estresse ocorre um aumento nos metabolitos secundários, intensificando assim o metabolismo dos frutos. O aumento da acidez nos frutos, segundo Antonioli et al. (2002), pode ser devido a intensa atividade metabólica deste, além da produção de intermediários do ciclo de Krebs.

Diferente de boa parte dos resultados vistos nos itens anteriores (1.4.1.2. e 1.4.2.3), os resultados de acidez total titulável (entre as safras) não estão de acordo com os resultados esperados, já que quanto maior o estresse as plantas sofreram, maior seria a acidez dos frutos. É possível que outros fatores, além do estresse sofrido pelas plantas, interfiram na concentração da acidez total titulável, visto que os resultados da concentração desta nas colheitas se comportaram diferentes em cada uma das safras e em ambas não condizentes com

a suspeita de que quanto mais estresse as plantas sofre, maior seria a concentração da acidez total titulável nas polpa dos frutos.

Contudo, diferente dos resultados entre as safras, as plantas com a copa em formação (bloco B2), portanto sob um estresse maior devido a maior competição por carboidratos, apresentaram frutos com concentração de ATT mais elevada, como esperado. Apresentando a concentração de 0,073 g de ácido málico. 100g^{-1} de amostra para os frutos das árvores do bloco B1 e 0,093 g de ácido málico. 100g^{-1} de amostra para os das árvores do bloco B2. A provavel maior competição por carboidratos nas árvores do bloco B2 é corroborada pelos resultados de menores concentrações de sólidos solúveis totais e maiores concentrações de taninos condensados nestes frutos (como discutido à frente) e pelos menores calibres destes frutos (como visto no item 1.4.3.3.).

As características físicas e químicas de um fruto são tão importantes quanto a aparência. Os consumidores costumam comprar os frutos primeiramente por sua aparência, mas só voltam a comprar os mesmos se esses possuírem textura e *flavor* (sabor e aroma) que seja agradáveis e característicos da fruta. Portanto, qualquer tratamento, aplicado nas árvores e/ou nos frutos, que alterem essas características negativamente pode vir a depreciar o produto.

De acordo com Chitarra & Chitarra (2005), as características externas de qualidade, percebidas pelo tato e pela visão, são importantes na diferenciação do produto, particularmente, na decisão de compra. As características internas percebidas pelo sabor, aroma e tato (sensação de textura), combinadas com a aparência do produto, são importantes na determinação da aceitação deste pelo consumidor.

Segundo Mizobutsi (2004) a época da aplicação da cianamida hidrogenada pode influenciar a ATT. Este constatou que quanto mais tarde se aplicou a cianamida hidrogenada, menor foi a acidez dos frutos. Os resultados dos tratamentos que receberam a cianamida hidrogenada poderiam até ser explicados por isso, já que que a na 1ª safra foi aplicada em primeiro de Julho de 2010 (01/07/2010) e na 2ª safra em doze de Julho de 2011 (12/07/2011), contudo não houve interação entre as safras.

Os frutos apresentaram diminuição na concentração dos sólidos solúveis totais (SST) da primeira para a segunda safra. Assim como as árvores mais novas (bloco B2) apresentaram concentrações significativamente menores do que as totalmente desenvolvidas (bloco B1), em ambas as safras (Figura 45).

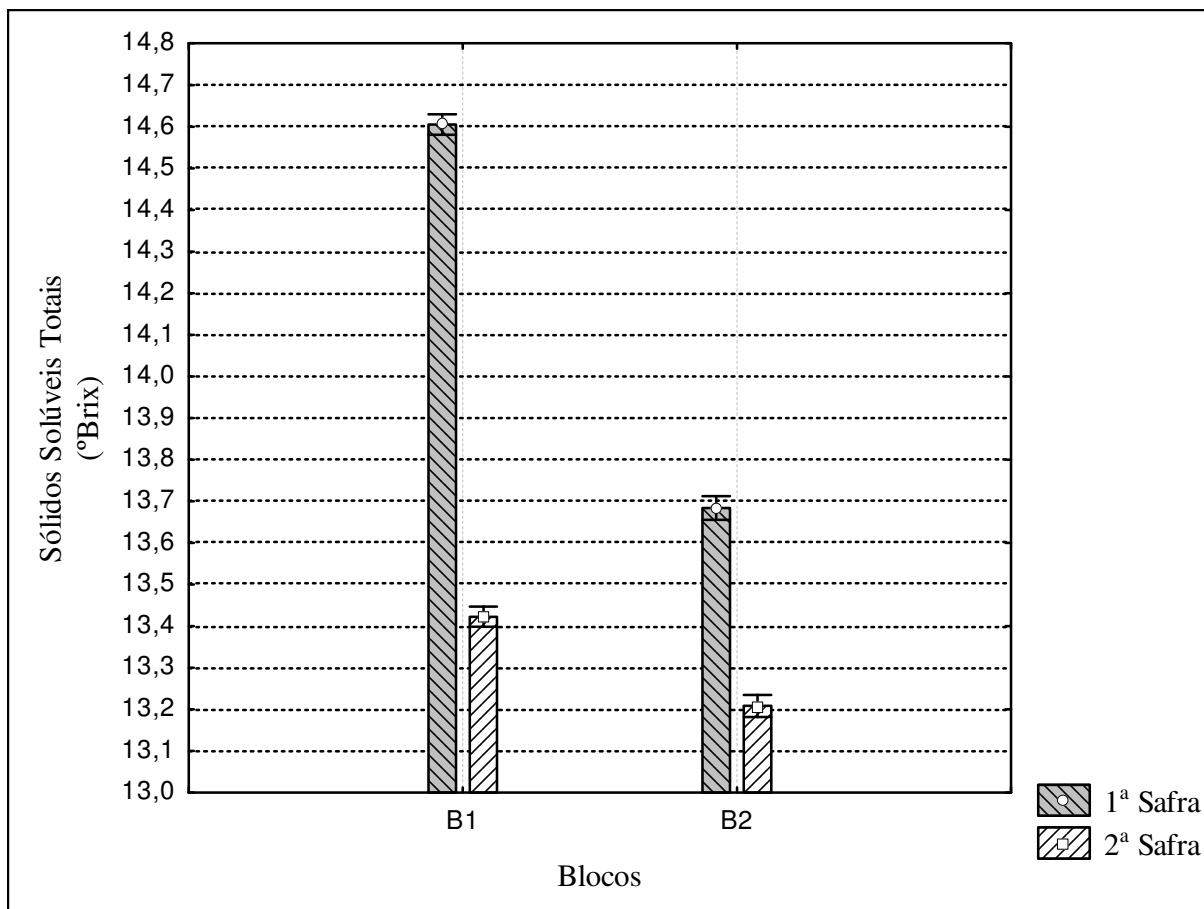


Figura 45. Médias dos tratamentos e colheitas para os sólidos solúveis totais dos frutos, nos blocos, em relação às safras de 2010-2011 e 2011-2012 (1ª e 2ª safras).

Provavelmente a diminuição na segunda safra ocorreu devido ao aumento da produtividade das árvores nesta (como visto no item 1.4.3.2.), o que pode ter acarretado uma maior competição por carboidratos, entre os frutos e entre estes e a parte vegetativa. Sendo ratificado pela diminuição do calibre dos frutos da primeira para a segunda safra (como visto no item 1.4.3.3).

O mesmo se aplica para os resultados de menor concentração de SST nos frutos das árvores com as copas em formação (bloco B2), onde a competição por carboidratos tende a ser maior. Uma vez que as copas das árvores ainda em formação demandam mais carboidratos do que as copas já totalmente formadas. Estes resultados são reforçados pelos menores calibres (como visto no item 1.4.3.3), maiores concentrações de ATT (como visto anteriormente) e pelas maiores concentrações de taninos concentrados (como discutido posteriormente) apresentados pelos frutos das árvores do bloco B2.

De acordo com Souza et al. (2011), desenvolvendo estudos sobre a produtividade e qualidade de caqui, verificaram que as concentrações de SST foram menores em frutos de plantas sem aplicação de nitrogênio, o que pode demonstrar que essa deficiência de nutriente acarretou uma menor concentração de SST.

Nota-se na Figura 46 que houve diferença significativa também entre os tratamentos, em relação às safras ($p < 0,001$). Todas as árvores na segunda safra, independente do tratamento aplicado, apresentaram frutos com concentrações menores de SST do que na primeira safra. Estes resultados confirmam que na safra 2011-2012 (2ª safra) a competição

por carboidratos foi maior, devido a maior produtividade apresentada pelas árvores nesta safra (como visto no item 1.4.3.2.).

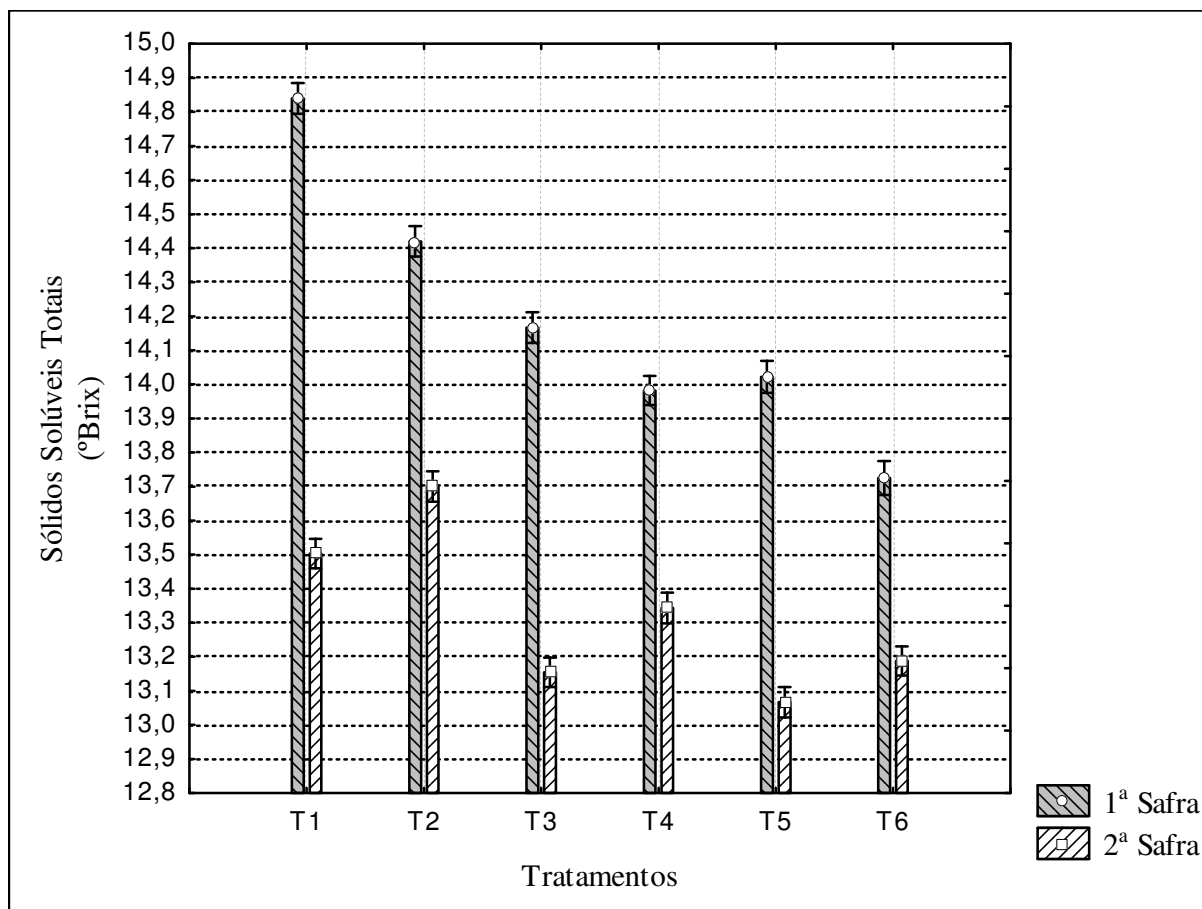


Figura 46. Médias dos blocos e colheitas para os sólidos solúveis totais dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação às safras de 2010-2011 e 2011-2012 (1ª e 2ª safras).

Enquanto que na primeira safra as árvores do controle (tratamento T1) foram as que apresentaram frutos com a maior quantidade de SST, seguido pelas árvores submetidas aos tratamentos com cianamida hidrogenada associado com irrigação (tratamentos T2 e T3), na segunda safra os frutos das árvores do controle e das árvores tratadas com a cianamida hidrogenada e irrigação (tratamento T2) inverteram de posição.

Provavelmente, na segunda safra, a aplicação da cianamida hidrogenada associada a aplicação de irrigação (tratamento T2), nas árvores, contribuiu para que o estresse sofrido pelas plantas devido a maior produtividade não fosse tão grande, já que na segunda safra os frutos destas árvores foram os que apresentaram maiores concentrações de SST. Isto é corroborado pelo fato dos calibres dos frutos das árvores submetidos a este tratamento não terem diminuído da primeira para a segunda safra (como visto no item 1.4.3.3.).

Neves Jr. (2009), caracterizando frutos de caqui 'Mikado' para processamento mínimo, verificou que os teores de SST foram em média de 13,7 °Brix, antes do processamento. Tomando como base este valor, podemos verificar que os frutos das árvores, independente dos tratamentos aplicados, da primeira safra foram iguais (tratamento T6) ou

superiores a este valor, enquanto que os da segunda safra foram todos iguais (tratamento T2) ou inferiores.

Durante as duas safras verificou-se uma tendência dos frutos das árvores com a copa ainda em formação (bloco B2) apresentarem concentrações menores de SST, com exceção das árvores do controle (tratamento T1) e das árvores tratadas com a cianamida hidrogenada apenas na primeira safra (tratamento T6), todos os frutos das árvores do bloco B2 apresentaram menores concentrações de SST em comparação com as do bloco B1 submetidas aos respectivos tratamentos (Figura 47).

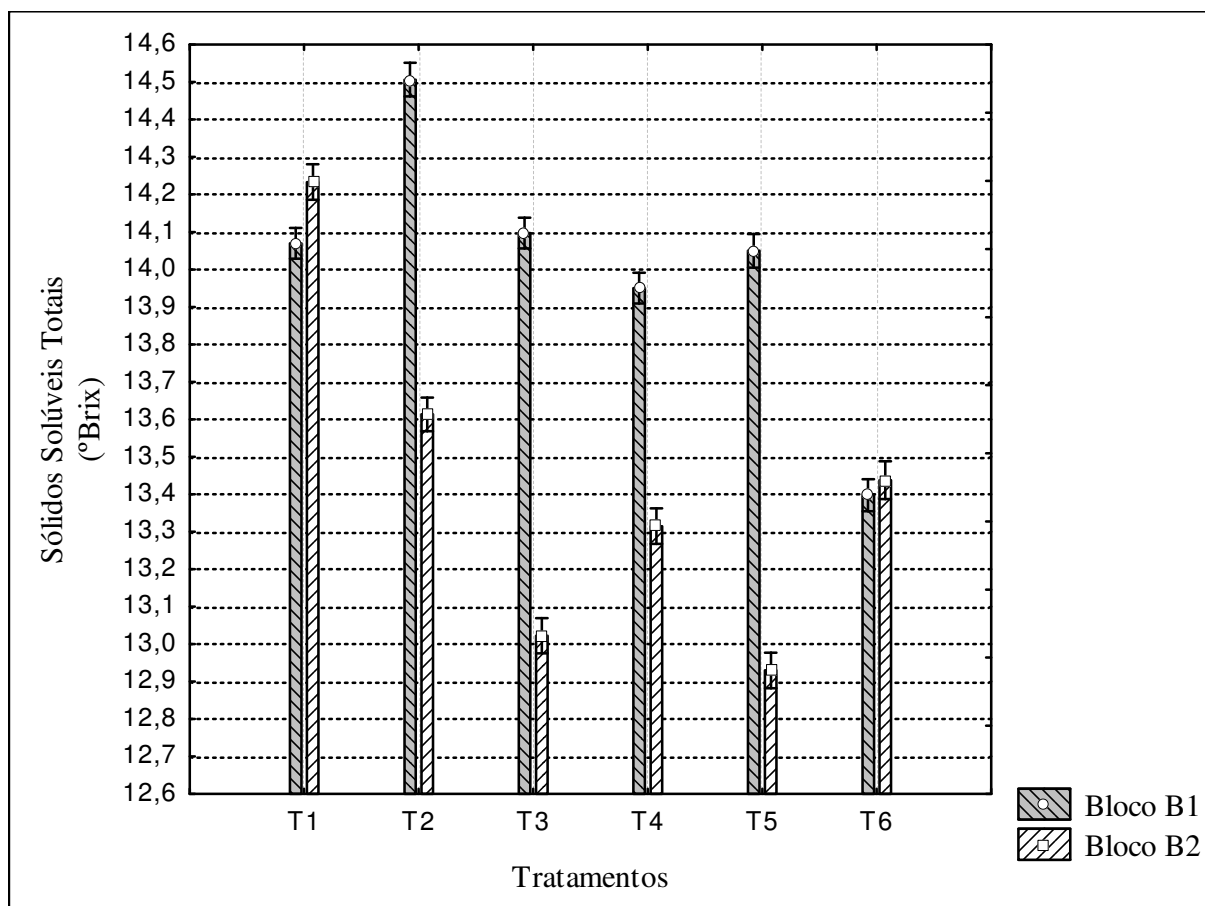


Figura 47. Médias das colheitas e safras para os sólidos solúveis totais dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação aos blocos.

Os tratamentos aplicados nas árvores do bloco B2 que proporcionaram menores concentrações de SST nos frutos provavelmente, em algum momento na formação destes, estão estimulando mais o crescimento vegetativo das plantas para a formação da copa. Se este estímulo ocorreu, a competição por carboidratos deve ter aumentado, acarretando assim um menor acúmulo dos SST nos frutos. Apesar deste menor acúmulo dos SST nos frutos, um crescimento vigoroso da parte vegetativa das árvores com a copa ainda em formação (bloco B2) pode ser benéfico para estas a longo prazo.

Em relação às colheitas, os frutos, independente dos tratamentos aplicados nas árvores, mostraram concentrações cada vez maiores ao longo destas (nas duas safras). Sendo que, com exceção da primeira colheita, a concentração dos SST foram sempre mais baixas na segunda

safar (safra 2011-2012) do que na primeira safra (safra 2010-2011), como demonstrado na Figura 48.

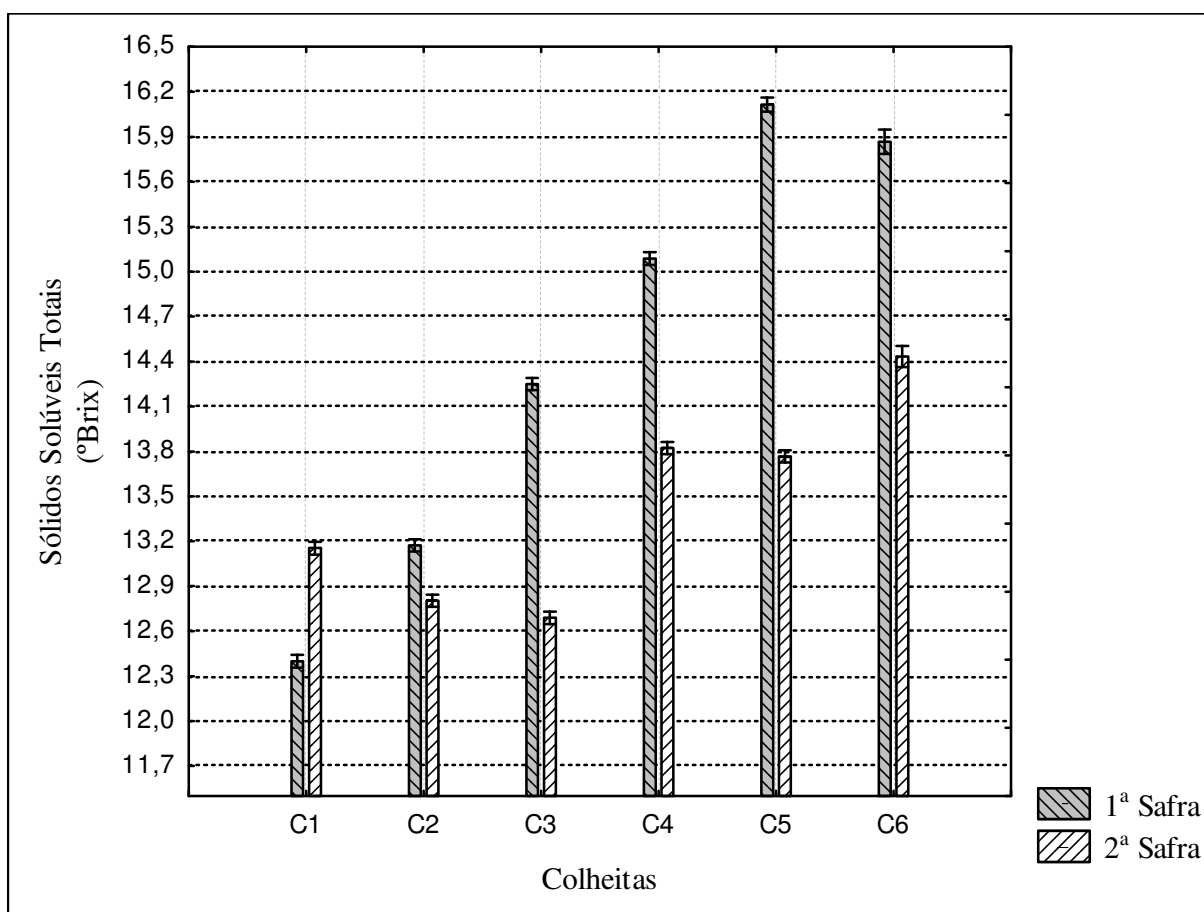


Figura 48. Médias dos tratamentos e blocos para as concentrações dos sólidos solúveis totais dos frutos, nas diferentes colheitas ao longo das duas safras (2010-2011 e 2011-2012).

Esses resultados reforçam a ideia de que a maior produtividade na segunda safra (como visto no item 1.4.3.2.) acarretou uma maior competição por carboidratos. Além de corroborar também com a suposição de que conforme os frutos vão sendo colhidos, a competição entre os frutos remanescentes diminui, proporcionando a oportunidade desses acumularem mais carboidratos, aumentando o tamanho (como visto no item 1.4.3.3.) e a concentração dos SST destes.

Segundo Pimentel (1998), conforme os frutos vão sendo colhidos, ocorre uma menor competição entre estes e a parte vegetativa, proporcionando assim a possibilidade de um maior acúmulo de SST nos frutos remanescentes. Sendo assim, quanto menor o número de drenos, menor será a competição entre eles. Uma vez que quase todo o carbono que vai para o dreno é proveniente da atividade fotossintética durante o período de enchimento deste. De acordo com Corsato et al. (2008), a reposição no estoque do amido de reserva nos ramos e nas raízes ocorre, principalmente, entre o florescimento e a abscisão foliar, compreendendo assim todo o período de enchimento dos frutos.

O teor de SST é utilizado como uma medição indireta do teor de açúcares, uma vez que aumenta de valor à medida que esses componentes vão se acumulando na fruta. As

medições, no entanto, não representam o teor exato dos açúcares, pois outras substâncias também se encontram dissolvidas na seiva vacuolar, como as vitaminas, fenólicos (dentre estes os taninos condensados), pectinas, ácidos orgânicos etc., que contribuem para a leitura dos SST. (Chitarra & Chitarra, 2005).

Ao se verificar como os frutos das árvores de diferentes idades (blocos) se comportaram quanto a concentração de SST ao longo das safras (interação entre colheitas e blocos), constatou-se que até a terceira colheita as árvores mais novas (bloco B2) apresentaram menores concentrações de SST nas polpas dos frutos. Sendo que nas colheitas seguintes, os frutos destas passaram a apresentar as maiores concentrações. Averiguou-se também que tanto as árvores do bloco B1 (árvores com as copas totalmente formadas), quanto as árvores do bloco B2 (árvores com as copas ainda em formação) apresentaram maiores concentrações nos frutos de SST nas colheitas mais tardias (Figura 49).

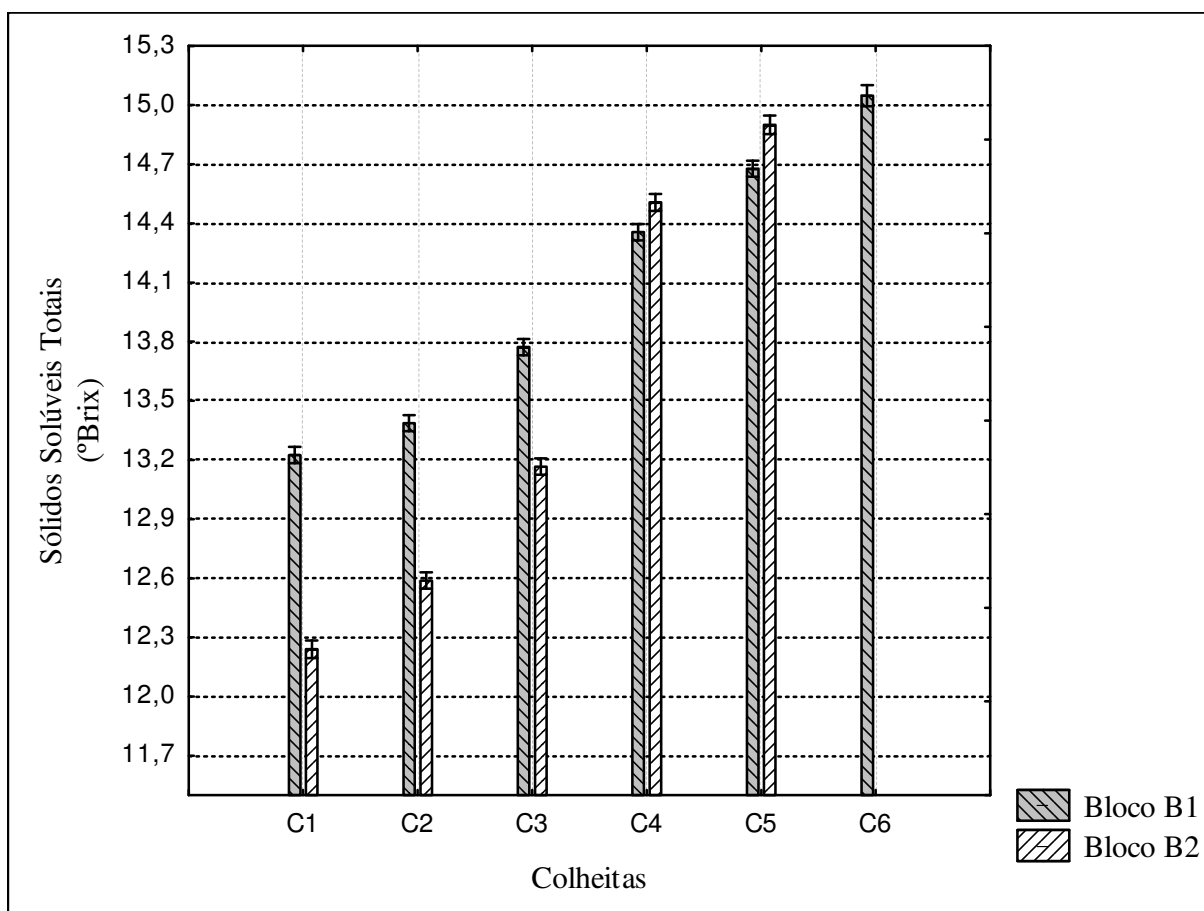


Figura 49. Médias dos tratamentos e safras para os sólidos solúveis totais dos frutos, nas colheitas em relação aos blocos.

Assim, como na Figura 48, esses resultados corroboram com a suposição de que a competição por carboidratos diminui com o passar das colheitas, provavelmente devido a diminuição da quantidade de drenos de carboidratos (frutos colhidos). Estes estão de acordo com os resultados de que as árvores com a copa em formação (bloco B2) estão sob um maior estresse devido a maior demanda por carboidratos da parte vegetativa.

Conforme as colheitas são realizadas e a competição por carboidratos diminui (frutos colhidos) é possível verificar que a diferença entre a concentração de SST nas polpas dos

frutos das árvores dos dois blocos diminui, até o ponto em que a concentração nos frutos das árvores do bloco B2 ultrapassa os do bloco B1 (4ª colheita). Provavelmente, a competição por carboidratos (nas árvores do bloco B2), neste ponto, tenha diminuído devido a retirada de drenos por carboidratos (colheita dos frutos), permitindo um maior acúmulo de SST nas polpas dos frutos, o que reforçaria as duas suposições.

De acordo com Muñoz (2002), enquanto existir tanino na polpa do fruto de caqui, a leitura do refratômetro (SST) não indica o teor de açúcares no fruto, e sim um somatório do tanino solúvel e açúcares.

Em relação aos taninos condensados (TC), verifica-se na Figura 50 que houve diferença significativa entre as safras ($p < 0,001$), onde os frutos da segunda safra (safra 2011-2012) apresentaram uma concentração maior de TC. Provavelmente a maior concentração na segunda safra se deve a uma maior competição entre a parte vegetativa e a parte reprodutiva da planta, uma vez que esta apresentou uma maior produção (como visto no item 1.4.3.2.).

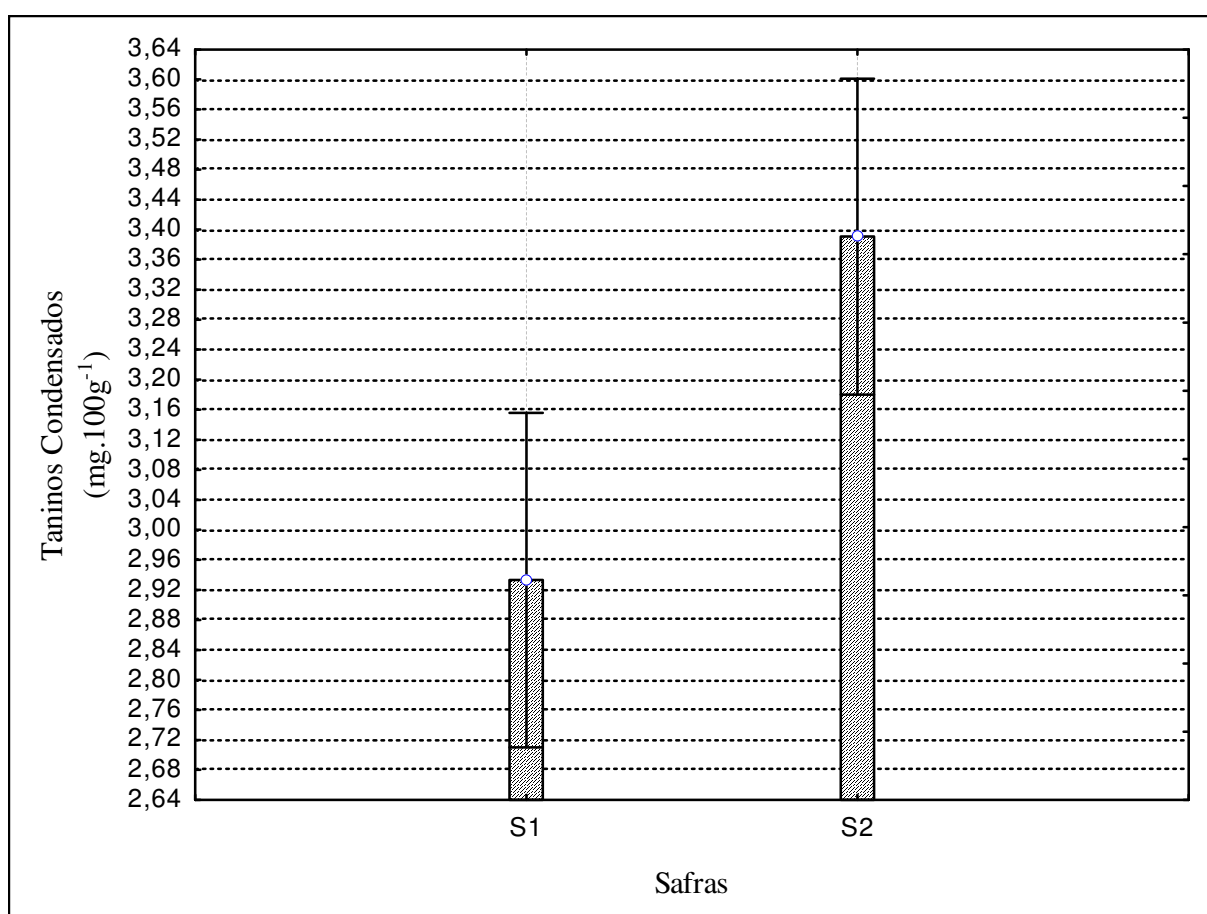


Figura 50. Médias dos tratamentos, blocos e colheitas para os taninos condensados dos frutos em relação às duas safras (2010-2011 e 2011-2012).

Apesar de não haver interação entre as safras e os blocos ($p > 0,932$), houve diferença significativa para os blocos ($p < 0,001$). O bloco B2 (árvores jovens, com a copa ainda em formação) mostrou uma concentração de taninos condensados sempre maior, apresentando os valores de $3,404 \text{ mg.100g}^{-1}$, enquanto que os frutos das árvores do bloco B1 (árvores com as copas totalmente desenvolvidas) apresentaram concentrações dos TC de $2,991 \text{ mg.100g}^{-1}$.

É possível que devido a uma maior competição por carboidratos nas plantas com as copas ainda em desenvolvimento (bloco B2) os frutos tenham acumulado uma quantidade maior de metabólitos secundários, dentre eles os TC. Esta maior competição por carboidratos das árvores com as copas em desenvolvimentos é corroborada pelos resultados de maiores concentrações de ATT e SST, como visto anteriormente, e pelos menores calibres dos frutos destas árvores (como visto no item 1.4.3.3.).

Os taninos são polímeros fenólicos, sendo os taninos condensados compostos formados pela polimerização de unidades de falvonóides. Onde os fenóis, juntamente com os terpenos e os compostos nitrogenados, formam os três grupos principais de metabólitos secundários (Taiz & Zeiger, 2004). Uma vez que plantas sob estresse têm a tendência de produzir mais metabólitos secundários, isso explica o aumento dos taninos condensados nos frutos das árvores que passaram por maior estresse devido a maior competição por carboidratos.

A adstringência nos frutos de caquis taninosos é causada por taninos solúveis em água, liberados por células especializadas, dispersas na polpa dos frutos. Podem coexistir em diferentes proporções, tanto o tanino condensado, quanto o hidrolisável na polpa do caqui, variando essas proporções de variedade para variedade (Campo-Dall'Orto et al., 1996). Esses frutos, quando consumidos, ainda que levemente adstringentes, proporcionam uma sensação de secura no palato, devido aos taninos precipitarem as proteínas presentes na saliva, principalmente a amilase (Edagi et al., 2009).

Os taninos condensados ou proantocianidinas são constituídos por unidades flavanol: flava-3-ols (catequina) ou flavan 3,4-diols (leucoantocianinas). Podem conter de duas a cinquenta unidades flavonoides; possuem estruturação complexa; são resistentes à hidrólise, mas podem ser solúveis em solventes orgânicos aquosos, dependendo de sua estrutura. Os pigmentos antocianidinas são os responsáveis por um vasto conjunto de nuances rosa, vermelha, violeta e azul em flores, folhas, frutos, sucos e vinhos. Também são responsáveis pela adstringência de frutas, sucos e vinhos, e em muitos casos são compostos bioativos em plantas medicinais (Battestin et al., 2004).

Na segunda safra (em comparação com a primeira), com exceção dos frutos das árvores submetidas aos tratamentos T4 (irrigação nas duas safras) e T5 (aplicação de apenas cianamida hidrogenada nas duas safras), os frutos das outras árvores apresentaram a tendência de conterem maiores concentrações de TC. As árvores do controle (tratamento T1) foram as que apresentaram os frutos com as maiores concentrações de TC em ambas as safras, indicando possivelmente que estas foram as que sofreram maior estresse em cada uma das safras. Contudo os frutos das árvores do controle não diferiram estatisticamente dos frutos das árvores submetidas ao tratamento T4 na primeira safra e das submetidas ao tratamento T3 (cianamida hidrogenada e irrigação apenas na primeira safra) na segunda safra (Figura 51).

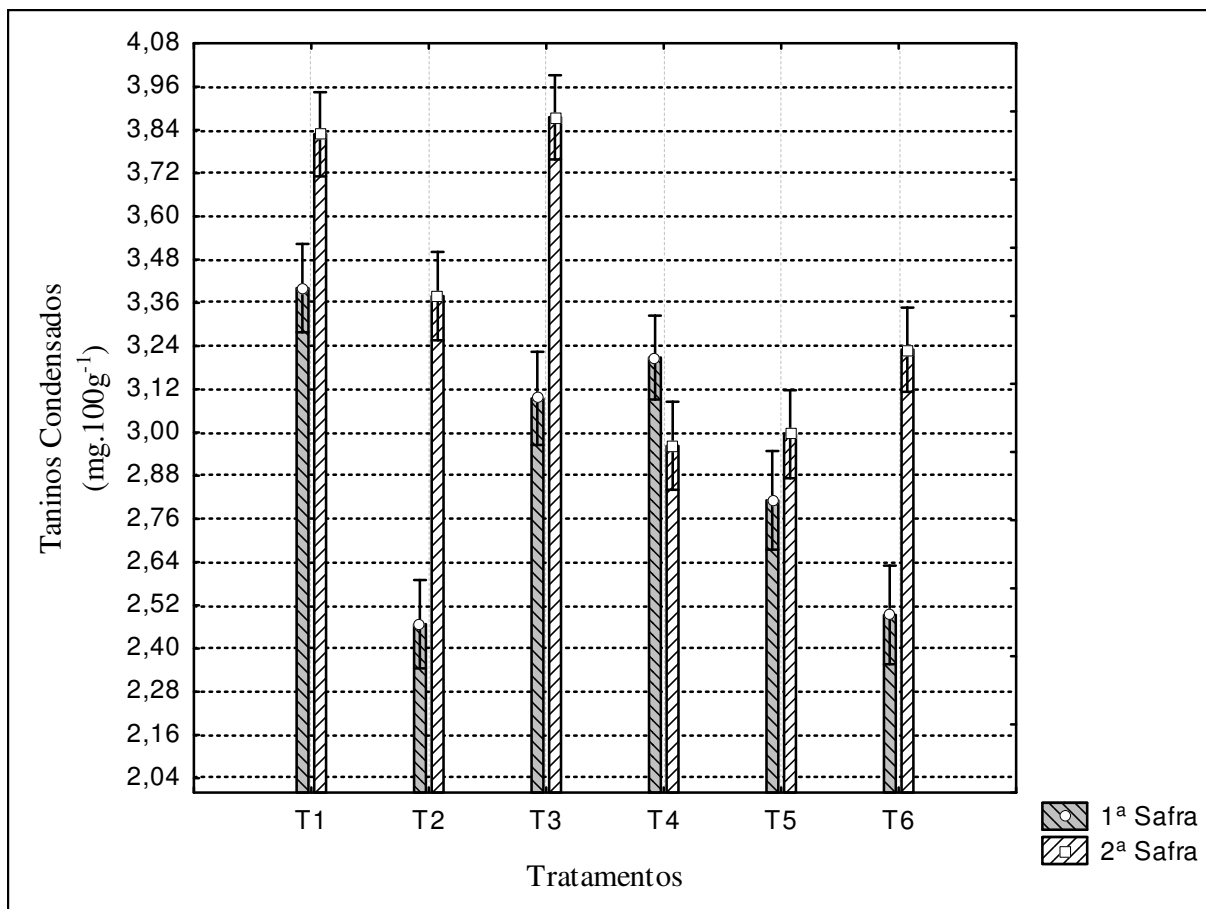


Figura 51. Médias dos blocos e colheitas para os taninos condensados dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação às duas safras (2010-2011 e 2011-2012).

A tendência de maiores concentrações de TC na polpa dos frutos da segunda safra corrobora com a suposição de que devido a maior produtividade das árvores na segunda safra (como visto no item 1.4.3.2.) essas estão sob um maior estresse. Isto é reforçado pela tendência dos frutos apresentarem menores calibres na segunda safra (como visto no item 1.4.3.3.), assim como estes apresentarem menores concentrações de SST (como visto anteriormente).

Durante as duas safras, as árvores com a copa ainda em formação (bloco B2) produziram frutos com a tendência de conterem maiores concentrações de TC, sendo que apenas as árvores do controle (tratamento T1) do bloco B2 apresentaram frutos com concentrações de TC menores do que as respectivas árvores do bloco B1 (árvores com as copas totalmente desenvolvidas), assim como demonstrado na Figura 52.

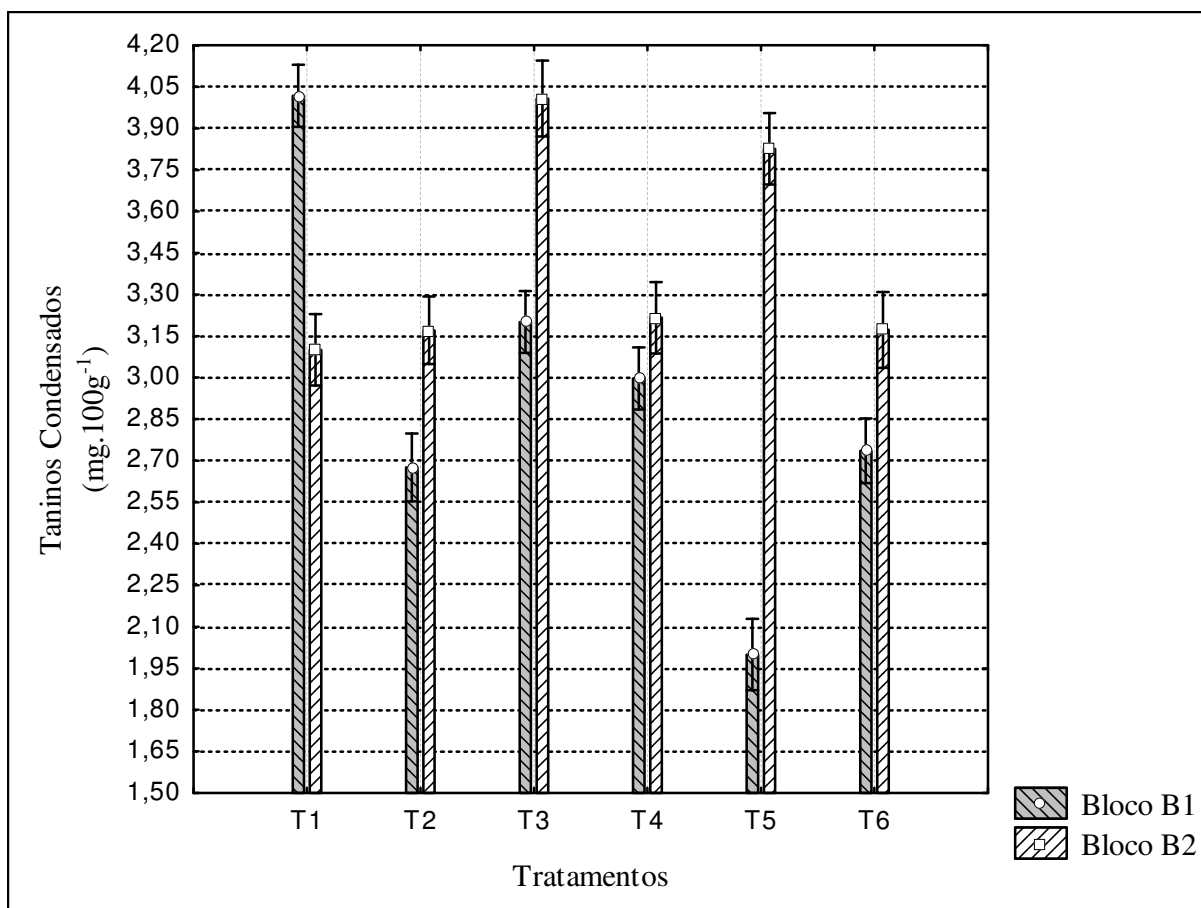


Figura 52. Médias das safras e colheitas para as concentrações dos taninos condensados dos frutos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos em relação aos blocos.

Como visto anteriormente, estes resultados também ratificam a ideia de que as árvores com a copa em desenvolvimento (bloco B2) concentram maior concentração de TC nos frutos devido a maior estresse. Este estresse provavelmente seria originado por uma maior competição por carboidratos entre a parte vegetativa (maior consumo de carboidratos para a formação da copa e armazenamento para a safra seguinte) e os frutos em formação.

As árvores submetidas ao tratamento T5 (apenas cianamida hidrogenada nas duas safras) foram as que apresentaram a maior diferença na concentração dos TC nos frutos entre os blocos. Possivelmente a cianamida hidrogenada estimulou o crescimento da parte vegetativa das plantas, contudo, sem a utilização da irrigação, o estresse provocado pela maior competição por carboidratos nas árvores com a copa em formação (bloco B2) aumentou ainda mais com este estímulo. Esta grande diferença (entre os blocos) nos frutos das árvores do tratamento T5 também foi detectada na concentração dos SST (como visto anteriormente), o que corrobora com esta suposição.

Nas duas safras, quanto mais tempo os frutos ficaram nas árvores (independente do tratamento aplicado) menores foram as concentrações de TC, com exceção da sexta colheita. Os frutos da segunda safra, com exceção da primeira e sexta colheita, apresentaram sempre maiores concentrações de TC (Figura 53).

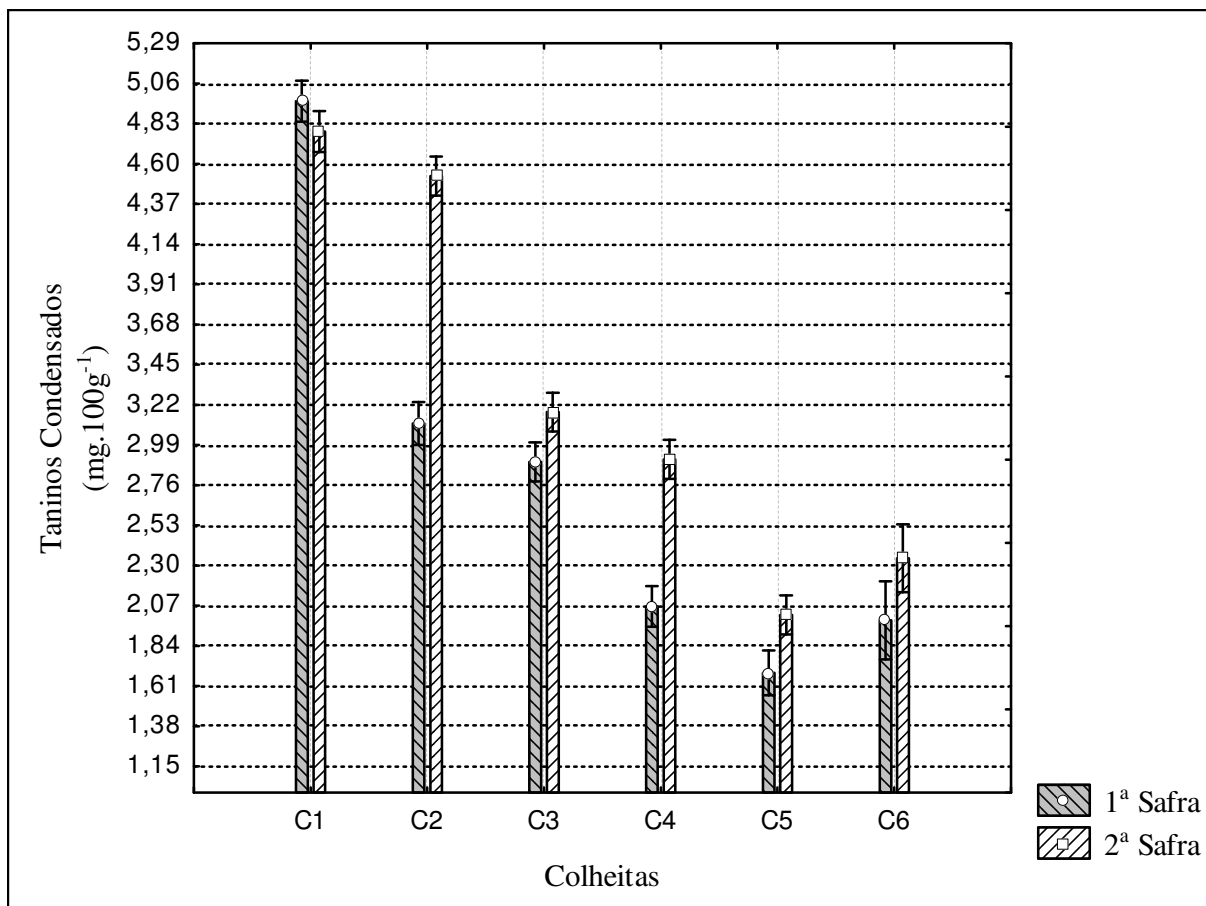


Figura 53. Médias dos tratamentos e blocos para os taninos condensados dos frutos, nas diferentes colheitas ao longo das duas safras (2010-2011 e 2011-2012).

A maior concentração de TC na segunda safra pode ser devido a um maior estresse das árvores decorrente do aumento da produtividade (como visto no item 1.4.3.2.), sendo isto condizente com os menores calibres e menores concentrações de SST dos frutos da segunda safra.

Assim como os resultados obtidos das concentrações dos SST (como visto na Figura 48) e dos calibres dos frutos (como visto na Figura 40) ao longo das duas safras, os resultados das concentrações de TC corroboram com o que já foi especulado até então. De que conforme as colheitas são realizadas, o estresse sofrido pelas plantas diminui.

A tendência da diminuição da concentração dos TC nos frutos ao longo das safras ocorreu tanto nos frutos das árvores que possuíam a copa já totalmente formada (bloco B1), quanto nas árvores com a copa ainda em formação (bloco B2). Os frutos das árvores do bloco B2 apresentaram, na maioria das colheitas, maiores concentrações de TC. Apenas na terceira (frutos com menores concentrações de TC) e quinta (não foram estatisticamente diferentes dos das árvores do bloco B1) colheita é que isto não ocorreu (Figura 54).

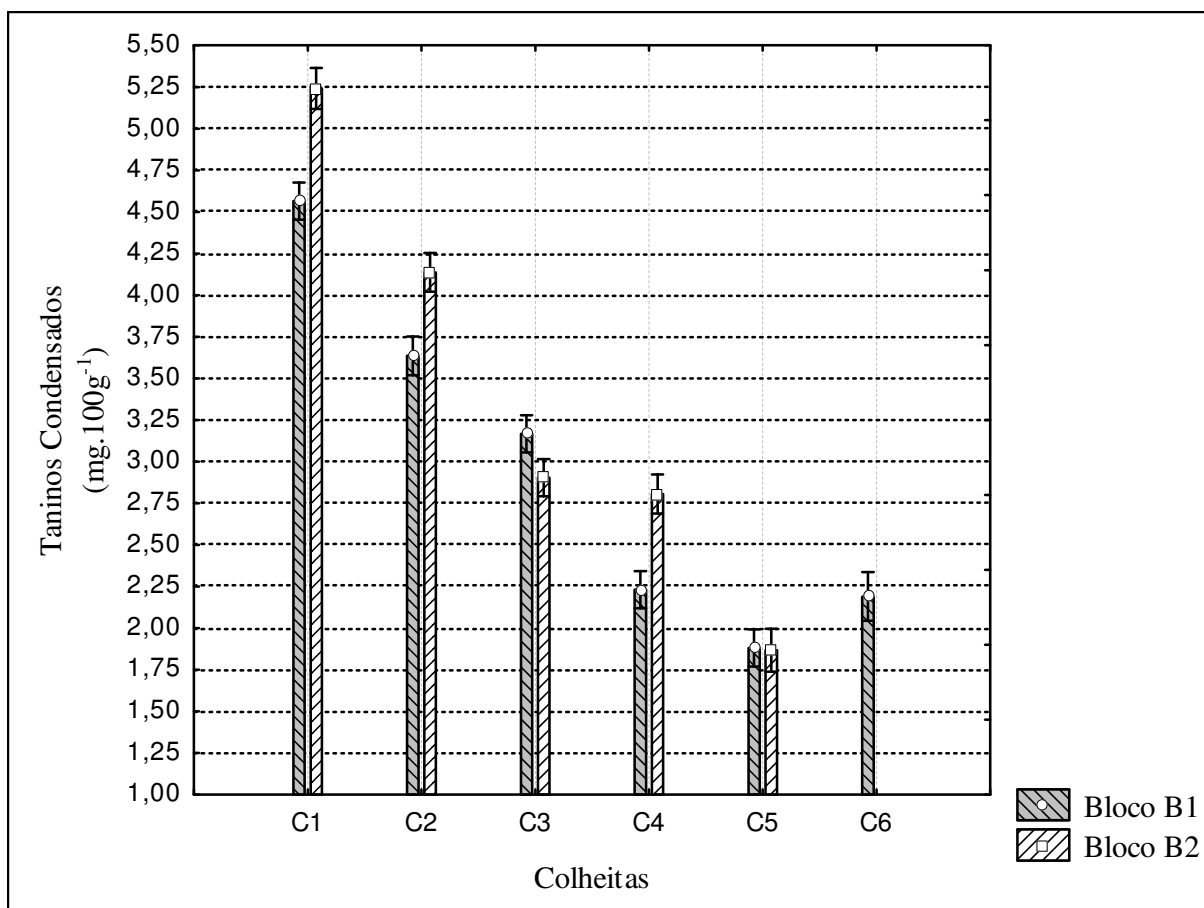


Figura 54. Médias dos tratamentos e safras para os taninos condensados dos frutos, nas diferentes colheitas em relação aos blocos.

Estes resultados corroboram, juntamente com os resultados de SST (como visto anteriormente) e os calibres dos frutos (como visto no item 1.4.3.3.), com a suposição de que o estresse das plantas diminui a cada colheita. Isto devido a diminuição da competição por carboidratos acarretada pela eliminação de drenos (frutos colhidos).

O fruto de caqui imaturo é adstringente devido ao tanino solúvel presente em células especializadas. Sua redução durante o desenvolvimento e amadurecimento de cultivares adstringentes e o desaparecimento desta de cultivares não adstringentes está relacionado com a capacidade natural de remover o conteúdo de tanino existentes na polpa do fruto. Sugere-se que esta capacidade natural depende da quantidade de compostos voláteis, tais como etanol e acetaldeído produzidos pela semente durante o desenvolvimento do fruto. A produção de etanol pela semente é provavelmente iniciada pela condição de anaerobiose e altas concentrações de CO₂ no período de desenvolvimento do fruto (Muñoz, 2002).

Os dados obtidos da concentração de TC nos frutos ao longo das colheitas podem ser utilizados na elaboração de metodologias mais eficientes de retirada de adstringência dos frutos. Uma vez que a concentração inicial de TC nos frutos irá influenciar no processo da retirada da adstringência, assim como a temperatura, a concentração do princípio ativo do agente que promove a retirada da adstringência e o tempo de exposição dos frutos a este.

1.5. Conclusões

- As árvores com a copa em desenvolvimento (bloco B2) apresentaram, nas duas safras, concentração no período da colheita, possuindo frutos apenas até a quinta colheita. Os frutos dessas árvores apresentaram os menores calibres, as menores concentrações de SST e as maiores concentrações de ATT e TC. Não foram verificadas diferenças significativas entre as árvores dos diferentes blocos para a fenologia (na segunda safra), a produtividade, as perdas e as injúrias apresentadas nos frutos.
- Na segunda safra a cianamida hidrogenada, com ou sem irrigação, apresentaram adiantamento na brotação vegetativa, no aparecimento de flores fechadas e no aparecimento de frutos em desenvolvimento.
- Houve um aumento na produtividade na segunda safra (safra 2011-2012), acompanhado de diminuição do calibre, concentração de sólidos solúveis totais e acidez total titulável dos frutos, assim como o aumento na concentração de taninos condensados destes. Verificou-se também que na segunda safra a diferença entre os calibres dos frutos das árvores dos blocos B1 e B2 aumentaram.
- A cianamida hidrogenada (com a utilização ou não da irrigação), aplicada consecutivamente, atuou positivamente na manutenção dos calibres dos frutos. Já que o calibre possui correlação com a massa e o comprimento dos frutos, esta atuou portanto positivamente nestes, prevenindo a diminuição desses devido a fatores que se apresentaram na segunda safra.
- Quanto mais tarde os frutos foram colhidos, maiores foram os calibres, as concentrações de sólidos solúveis totais e menores foram as concentrações de taninos condensados. Houve também um aumento da produtividade ao longo das colheitas, assim como um aumento das perdas em campo. A presença de injúrias e se os frutos estavam aptos a comercialização ou não, não foram afetados.
- A aplicação da irrigação e da cianamida hidrogenada, associado ou isoladamente, não antecipou o início da colheita e nem influenciou na produtividade ou no aparecimento de injúrias nos frutos.
- Enquanto que a aplicação de apenas irrigação nas árvores contribuiu, na primeira safra, para que estas apresentassem os maiores calibres, menores concentrações de sólidos solúveis totais (em 4 de 6 colheitas) e maiores concentrações de acidez total titulável (em 4 das 6 colheitas) nos frutos.
- Já as árvores tratadas com a associação da cianamida hidrogenada com a irrigação (tratamento T2), na segunda safra, foram as que apresentaram os frutos com os maiores calibres e as maiores concentrações de sólidos solúveis totais em 3 das 5 colheitas.

2. CAPÍTULO II

Metodologia de detecção e quantificação de cianamida hidrogenada

RESUMO

A cianamida hidrogenada é amplamente utilizada na agricultura, conseqüentemente os seus resíduos podem ser encontrados na água. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um novo método para sua quantificação usando derivatização *in situ* com ácido 2,6-dimetil-4-quinolinocarboxílico éster de N-hidroxisuccinimida, seguido de microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) e análise por HPLC/fluorescência. Foram utilizadas técnicas quimiométricas multivariadas, obtendo-se as condições ideais de derivatização direta e extração por DLLME. Os parâmetros da derivatização como quantidade de agente derivatizante, quantidade de tampão, temperatura, tempo, pH e condições de extração por DLLME, como volume de solvente dispersante, volume de solvente de extração, força iônica (NaCl a conc. m/v), pH e tempo de extração, Estes foram otimizados em 2 etapas diferentes: primeiro um desenho 2^k fatorial completo para avaliação das variáveis mais importantes e um segundo desenho recorrendo ao CCD (*central composite design*) para a otimização das variáveis mais importantes. As melhores condições para derivatização foram 600 μ L de agente derivatizante, temperatura de 4°C e pH 8,5, enquanto para a extração foram 800 μ L de solvente de extração, 30% de NaCl conc. m/v, e pH 3,8. A performance analítica do método para análises de rotina demonstrou excelente linearidade para uma gama de concentrações de 10 a 200 μ g.L⁻¹ com fator de correlação de 0,9996. A precisão variou entre 3,5 a 5,5% para os ensaios intradia e entre 8,5 a 8,6% para os interdia. Efetuaram ensaios de recuperações em água de diferentes origens, onde os valores médios variaram de 90,2% a 110,2%.

Palavras chave: ácido 2,6-dimetil-4-quinolinocarboxílico éster de N-hidroxisuccinimida, DLLME, derivatização *in situ*, HPLC/fluorescência.

ABSTRACT

Cyanamide is widely used for agricultural purposes, therefore its residues can be found in water. A new method was developed for its quantification using *in situ* derivatization with 2,6-dimethyl-4-quinolinecarboxylic acid N-hydroxysuccinimide ester followed by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and HPLC/fluorescence analysis. Multivariate chemometric techniques were successfully used to obtain the optimum conditions for direct derivatization and DLLME extraction. Derivatization parameters such as, derivatizing agent amount, buffer amount, temperature, time, and pH and DLLME extraction conditions, namely, disperser solvent volume, extraction solvent volume, ionic strength (NaCl conc. w/v), pH and extraction time were optimized by a two steps design, 2^k factorial design for screening and CCD design for optimization. Best derivatization conditions were addition of 600 μ L of derivatizing reagent, a temperature of 4°C and pH 8.5, whereas for optimum extraction 800 μ L of solvent, 30% NaCl conc. w/v and pH 3.8 were chosen. The analytical performance of the method for routine analysis was evaluated. Excellent linearity was achieved from 10 to 200 μ g.L⁻¹ with a correlation factor of 0.9996. Precision ranged from 3.5 to 5.5% for intraday assays and 8.5 to 8.6% for interday assays. The mean recoveries performed on water from different origins ranged from 90.2% to 110.2%.

Keywords: 2,6-dimethyl-4-quinolinecarboxylic acid N-hydroxysuccinimide (DMQC-OSu), chemometrics analyses, DLLME; *in situ* derivatization, HPLC/fluorescence.

2.1. Introdução

A cianamida hidrogenada é um produto largamente utilizado na agricultura como regulador de crescimento para plantas caducifólias. Por ser tratar de um produto altamente miscível com a água e tóxico para os mamíferos, um método adequado de detecção e quantificação é extremamente importante para o monitoramento da qualidade das águas nas localidades onde este produto é utilizado.

A cianamida, como regulador de crescimento, é aplicada nas plantas caducifólias quando estas estão sem as folhas para a quebra da dormência das gemas. Devido a este fato, parte do produto pode ser lixiviado para os rios e águas subterrâneas. Contudo, devido a ausência das folhas, não é aplicado um grande volume de caldo do produto.

A elaboração de um método eficiente para o monitoramento da utilização da cianamida pode vir a ser um incentivo para a regularização desta para a cultura do caqui, uma vez que este produto mostra grande potencial para o uso na cultura.

Os métodos atuais de detecção de cianamida hidrogenada utilizam equipamentos como os cromatógrafos líquidos massa/massa ou processos complexos de extração da cianamida da matriz de água para depois realizar a derivatização e detecção. Até mesmo a detecção direta da cianamida na água é bem complexa, o que proporciona uma detecção só quando esta se apresenta em níveis elevados.

Tendo em vista a importância de se ter uma metodologia de detecção e quantificação para o monitoramento em áreas que utilizem a cianamida hidrogenada, este trabalho teve como objetivo desenvolver, otimizar e validar um método de detecção e quantificação da cianamida hidrogenada em matriz de água, em diferentes fontes, com a utilização de cromatografia líquida de alta eficiência (high-performance liquid chromatography – HPLC) utilizando detector de fluorescência que permite a detecção e quantificação de baixos níveis de cianamida hidrogenada. Outra importante contribuição é a disponibilidade de material sobre o assunto que é extremamente escasso.

2.2. Revisão de Literatura

A fruticultura brasileira vem ganhando importância e começa a chamar a atenção de órgãos, empresas e entidades relacionadas aos seus sistemas de produção. Pois o avanço tecnológico e o crescimento na área plantada com frutas são importantes sinalizadores para estudos e análises das especificidades de cada fruta, do potencial do volume de produção e das estratégias de mercado das indústrias de insumos. No consumo de defensivos, a agricultura brasileira destaca-se em 3º lugar, precedida por Estados Unidos e Japão. E a demanda de princípio ativo por hectare é maior nas frutas do que em outras culturas como soja, milho e cana-de-açúcar (Neves et al., 2002)

Um gargalo para a produção de caqui e para adotar estratégias, como a de antecipação e retardo de safra por exemplo, é a falta de agrotóxicos registrados para a cultura o que compromete a produção e comercialização, prejudicando a competitividade do agronegócio brasileiro no exterior (Razzouk, 2007).

A cianamida é um composto denominado agroquímico multifuncional que pode ser usado como pesticida, herbicida e fertilizante (Hiradate et al., 2005). Pesquisas recentes revelaram que a cianamida é também um produto biosintetizado naturalmente pela leguminosa ervilhaca (*Vicia villosa*), em que grande proporção da atividade inibitória no extrato bruto pode ser explicada pela presença da cianamida, sugerindo que esta possa ser um aloquímico nesta espécie. (Kamo et al., 2003).

A cianamida hidrogenada (CAS # 420-04-2) tem peso molecular de 42,02g/mol, sendo que a fórmula empírica é CH_2N_2 . O ponto de fusão situa-se entre 45-46°C, sendo um composto higroscópico, com coeficiente de partição octanol/água de -0,82 a 20°C. A cianamida é solúvel em água (100g/100mL a 43°C) e álcoois. Possui a pressão de vapor de 5×10^{-3} Pa a 20°C (Department of Pesticide Regulation, 1993).

2.2.1. Cianamida Hidrogenada e sua Ação

A solução de cianamida e a suspensão de cálcio cianamida causam rápida brotação quando aplicadas sobre gemas dormentes de videira (*Vitis vinifera* L.). A solução apresenta efeito mais potente do que a suspensão da cálcio cianamida. Sugere-se que a suspensão de cálcio cianamida sofre uma hidrólise parcial. Neste processo de hidrólise do cálcio cianamida, os íons de cianamida podem ser a forma ativa e reagir como a solução de cianamida. É possível que a dormência das gemas é, pelo menos, parcialmente regulado pela inibição da respiração. Esta inibição pode ser removida por baixa temperatura (acumulo de horas de frio), pela cianamida e alguns outros tratamentos, apesar do modo de ação de cada agente pode apresentar certas diferenças, assim como sua eficácia (Shulman et al., 1983).

Conforme estudo de Yooyongwech et al. (2012), em gemas de flores de pessegueiro em árvores tratadas com cianamida hidrogenada houve correlação positiva entre a concentração da água com as gemas em transição da paradormência para a endodormência. Tal estudo sugere que os níveis do influxo de água nos rebentos tratados estão relacionados com a duração do desenvolvimento das gemas e um determinado nível de interação dos processos de dormência. Não está claro como a concentração da água é diretamente induzida pelo agente que promove a quebra da dormência.

O modo de ação da cianamida hidrogenada como produto químico, para a quebra de dormência, não é conhecido. Sabe-se, entretanto, que este produto é rapidamente absorvido e causa diminuição da atividade da catalase, sem modificar a da peroxidase. Como resultado, verifica-se aumento da concentração de água oxigenada (H_2O_2) nos tecidos das gemas. Este aumento poderia ser responsável pela ativação do ciclo das pentoses e consequente indução da quebra de dormência das gemas. A cianamida hidrogenada induz a rápida mudança no conteúdo de glutathiona reduzida (GSH), em gemas de pessegueiro. A diminuição do nível de GSH dentro de 12 horas após a aplicação de cianamida hidrogenada pode sugerir que a GSH presente nos tecidos foi provavelmente utilizada na desintoxicação da água oxigenada gerada, quando a atividade da catalase foi inibida (Mizobutsi et al., 2003).

Há um possível envolvimento de espécies reativas de oxigênio e antioxidantes no controle da dormência. As espécies reativas de oxigênio (incluindo o superóxido, O_2^- , peróxido de hidrogênio, H_2O_2 , e radicais hidroxila (OH)) possuem geração ubíqua em sistemas biológicos, e ocorre, quer como inevitável subproduto de reações metabólicas ou por meio de sinais de regulação de processos, tanto em condições normais, quanto sob estresse. Os principais mecanismos, em plantas, de eliminação destes oxigênios reativos incluem a superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e a catalase (Bajji et al., 2007).

A superóxido dismutase é considerada como regulador chave dentro do sistema de defesa antioxidante, sendo regulador do O_2^- e do H_2O_2 . O H_2O_2 é eliminado pela catalase e pela peroxidase, sendo suas afinidades diferentes para o H_2O_2 (a catalase possui afinidade na faixa de mM e a peroxidase em μM). Possivelmente estes antioxidantes pertençam a duas classes distintas de remoção de H_2O_2 . A catalase pode ser responsável pela remoção das espécies reativas de oxigênio durante o estresse, enquanto que a peroxidase pode ser responsável pela modulação fina destes, para sinalização. A relação entre o metabolismo de

espécies reativas de oxigênio e a quebra de dormência em sementes e gemas vegetativas tem sido repetidamente relatados. De fato, a aplicação de H_2O_2 ou de inibidores de catalase quebra a dormência nestes tecidos vegetais (Bajji et al., 2007).

Quando ocorre a desintoxicação para a diminuição do alto nível de H_2O_2 através da GSH, esta é convertida a glutatona oxidada (GSSG) pela glutatona peroxidase, que converte também H_2O_2 em H_2O . Para a GSSG voltar a GSH é necessário o $NADPH + H^+$, a onde a glutatona redutase converte a GSSG em GSH transformando o $NADPH + H^+$ em $NADP^+$. Para voltar a $NADPH + H^+$, a enzima glucose 6-fosfato desidrogenase (G6PD) converte a glucose 6-fosfato em 6-fosfo-glucono- δ -lactona. Essa 6-fosfo-glucono- δ -lactona pode estar sendo utilizada na via de redução da pentoses fosfatos. Onde os produtos são ribulose 5-fosfato, CO_2 e $NADPH$. A ribulose 5-fosfato é um precursor de nucleotídeos, coenzimas, DNA e RNA, como demonstrado na Figura 55 A, B e C (Lehninger et al., 2004).

Através dessas reações pode estar sendo gerado um sinal para a produção de enzimas e proteínas que fará com que a planta saia do estado de dormência. Os trabalhos científicos indicam que as enzimas envolvidas são peças chaves para fazer com que a planta saia do estado de dormência. Quando $NADPH$ é formado mais rapidamente do que pode ser utilizado para a biossíntese da glutatona e de redução, a concentração de $[NADPH]$ aumenta e inibe a primeira enzima na via da pentose fosfato. Como resultado, verifica-se que mais moléculas de glucose-6-fosfato estarão disponíveis para a glicólise (Figura 55 D) (Lehninger et al., 2004). Ao chegar neste ponto provavelmente haverá um aumento na taxa respiratória da gema que promoverá, junto com os sinais gerados, a quebra da dormência.

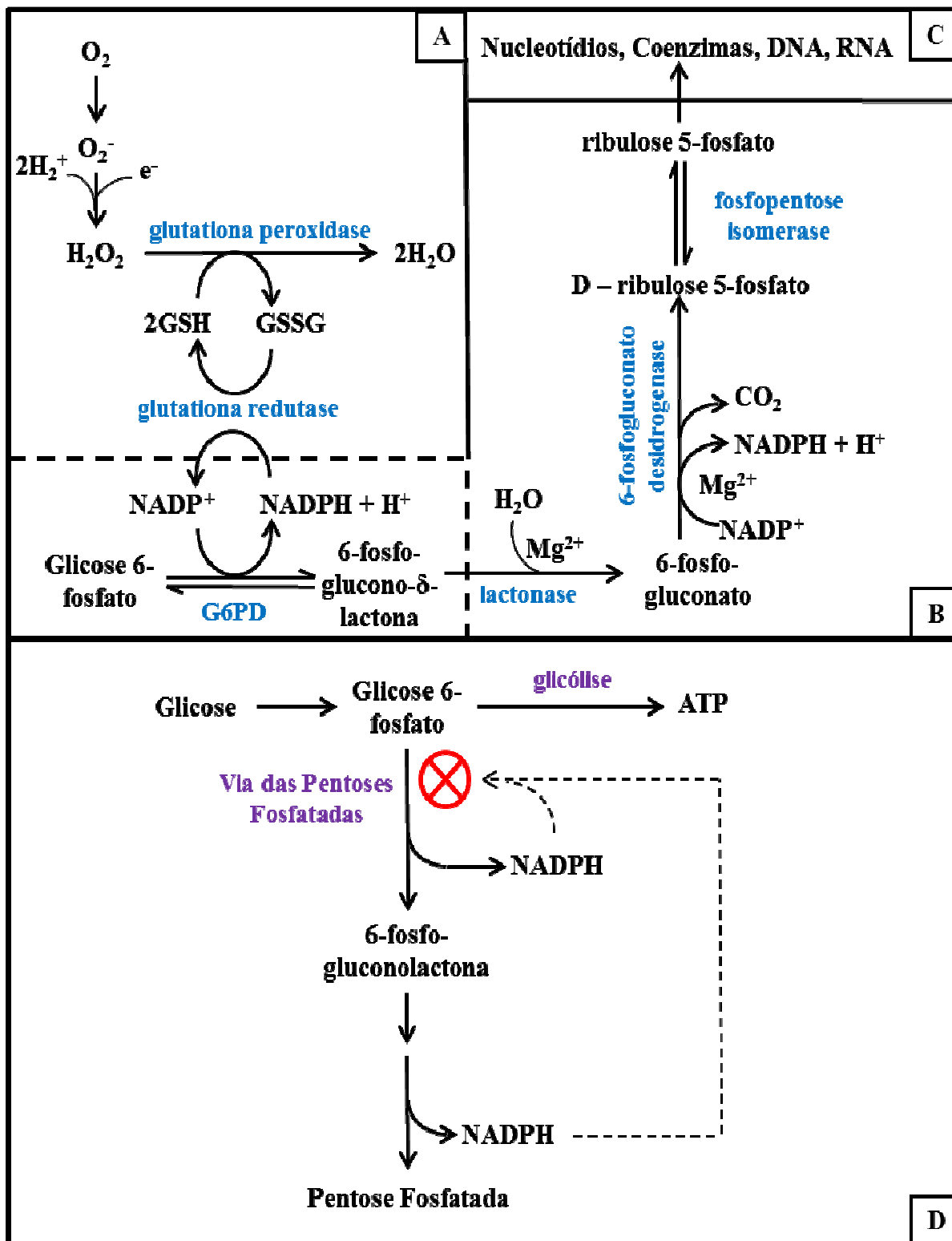


Figura 55. Esquema da rota do NADPH e glutationa em células contra a alta concentração de peróxido de hidrogénio, devido a inibição da catalase (A); reações oxidativas da rota de pentose fosfatada (B), tendo como produto a ribose 5-fosfato que é precursora de nucleotídeos, coenzimas, DNA e RNA (C); e do papel do NADPH na regulação da divisão da glicose 6-fosfato entre a glicólise e a via das pentoses fosfatadas (D). Adaptado de Lehninger et al., 2004.

O tratamento de tubérculos de batata colhidos em estufas de crescimento, tratados com inibidor da catalase ou com H_2O_2 , resultou numa brotação rápida e uniforme, bem como numa maior produção de broto, quando comparados com tubérculos não tratados. Esse efeito de quebra de dormência não parece ser característica peculiar de brotos de tubérculos de batata, uma vez que vários estudos têm apontado respostas semelhantes em sementes e brotos de árvores frutíferas. Isto fornece evidências adicionais de que os mecanismos de regulação comuns de dormência podem ocorrer nestes diferentes tecidos vegetais (Bajji et al., 2007).

Em sementes dormentes tem sido proposto que o caminho das pentoses fosfatadas desempenha papel central na quebra de dormência destas. Conforme estudos realizados em sementes de nectarina por Hu & Couvillon (1990), medindo atividades enzimáticas diretamente, foi verificado aumento da atividade da via das pentoses fosfatadas durante a quebra da dormência. Presume-se que os produtos químicos, que atuam na quebra de dormência, aumentam a atividade desta via inibindo a catalase, que é necessária para a reoxidação do NADPH (coenzima essencial para a via das pentoses fosfatadas). Como resultado, observa-se aumento dos níveis do H_2O_2 . Estes dados sugerem que a via das pentoses fosfatadas desempenhe papel positivo, enquanto que a catalase exibe papel de inibição da liberação da dormência.

Segundo este mesmo estudo em sementes de nectarina, os dados demonstram que os aumentos significativos da G6PDH e da 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH), as duas enzimas chaves nesta via, ocorreram ao mesmo tempo, mas não antes, com os aumentos de germinação das sementes frescas. E a germinação atingiu um máximo antes que os níveis de atividade das duas enzimas fossem atingidos. Portanto o aumento da atividade da via das pentoses provavelmente resulta na quebra da dormência, fenômeno da germinação (Hu & Couvillon, 1990).

De acordo com Guevara et al. (1992), estudando o efeito da cianamida hidrogenada na germinação de sementes de café, altas doses de cianamida hidrogenada provocaram a inibição da germinação. Uma vez que a cianamida hidrogenada ativou as vias das pentoses fosfatadas é possível que uma estimulação muito grande possa fazer com que esta prejudique a respiração. Segundo Mayer (1977), citado por Guevara et al. (1992), a via das pentoses fosfatadas competem pelo substrato respiratório disponível, existindo portanto uma relação entre os dois.

Para se ter uma perspectiva mais ampla na complexidade da rede bioquímica responsável pela regulação e execução do processo de dormência, é necessário muito mais detalhes da indução coordenada (ou repressão) dos metabólicos que atuam em conjunto durante a liberação de dormência de gemas (Pang et al., 2007).

Conforme Yooyongwech et al. (2012), a enzima de codificação de transcrição, a proteína quinase de sacarose não fermentada [*Sucrose non-fermenting (SNF)-like protein kinase*] oriunda da via respiratória fermentativa, está envolvida na percepção de sinal de brotação induzido por cianamida hidrogenada em gomos de uva.

De acordo com estudos realizados por Pang et al. (2007), com base na elevada redundância de codificação para vários genes de sinalização relacionados com Ca_2^+ , em gemas tratadas com cianamida hidrogenada, a coleção da sequência de marcadores originados faz com que se acredite que a sinalização do Ca_2^+ está envolvida na dormência de gemas de uva. Os resultados desses estudos suportam a hipótese de que o estresse oxidativo está envolvido no gatilho, seja por indutores naturais ou artificiais, da cascata de sinais no interior das bagas. E sugere que esta sinalização de Ca_2^+ pode ocorrer mediante a dependência de cálcio pela fosforilação de proteínas.

2.2.2. Meio Ambiente e o Homem

O conhecimento da cianamida hidrogenada no meio ambiente e no homem, assim como os possíveis danos que esta pode causar é importante para a elaboração de planos e ações na prevenção de problemas que esta molécula pode vir a causar. Sendo o monitoramento desta no meio ambiente igualmente importante para estas estratégias.

A meia vida fotolítica da cianamida hidrogenada em solução aquosa é de 29 dias a pH 5 e 39 dias a pH 7. Em condições aeróbias, a meia vida em solos arenosos, é de aproximadamente doze horas, e em condições anaeróbicas a meia vida no solo é de 35 dias. A cianamida hidrogenada é apenas um pouco móvel no solo, movendo-se mais lentamente em solos com teor de matéria orgânica. Sob condições do campo, a meia vida varia entre 10 e 15 dias. Segundo pesquisas, não há resíduos detectáveis em uvas provenientes de vinhas que foram tratadas com cianamida hidrogenada. Os dados sugerem fortemente que a cianamida hidrogenada é rapidamente quebrada no meio ambiente e é pouco provável que persistem como contaminante ambiental (Department of Pesticide Regulation, 1993).

Apesar de possuir meia vida curta, a cianamida hidrogenada pode vir a ser fonte de contaminação dos recursos hídricos da região onde está sendo aplicada. Podendo ser um risco às populações próximas caso cuidados não sejam tomados durante a sua aplicação.

Nos tratamentos fitossanitários, os equipamentos de pulverização têm como função gerar as gotas e transportá-las até o alvo, na quantidade necessária, com o mínimo de desperdício e de contaminação de outras áreas (Palladini & Patri, 1999). Entretanto, Herrington et al. (1981), citado por Palladini & Patri (1999), estudando a retenção e distribuição da pulverização sobre plantas de macieira no estádio dormente, verificou que somente percentual de 9 a 22% ficou retido nos ramos.

Conforme o Micromedex (1995), citado por Granado (1998), a cianamida hidrogenada é bem absorvida por via oral, inalatória e dérmica. Hidrolisada em torno de 60% para carbina, a maior parte é excretada pela urina. Sendo que o íon cianeto não é metabólito da cianamida.

Em estudos realizados pelo *Department of Pesticide Regulation* (1993), a absorção oral de cianamida hidrogenada em animais de laboratório foi de 100%. As doses médias absorvidas dermicamente em 24 horas por humanos e ratos foram de 5,5% e 11,1%, respectivamente. Aproximadamente 40%, da dose oral por humano, foi recuperada na urina nas primeiras 24 horas. Para os ratos, de 43% da dose oral foi recuperada na urina. Aproximadamente 95% das doses absorvidas oralmente em ratos ou seres humanos foram excretadas em 24 horas. O restante das doses dérmicas ou oral, em ratos ou seres humanos, foram excretadas nas fezes ou como CO₂ exalado. Em ratos a cianamida hidrogenada não se concentra em todos os tecidos. Não houve qualquer indicação da cianamida hidrogenada ser convertida em cianeto *in vivo* em ratos ou em humanos. O principal metabólico na urina dos animais de laboratório e humanos foi *N-acetylcyanamide*.

Segundo Hiragate et al. (2005), a molécula da cianamida é tóxica para mamíferos, causando irritação aos olhos, pele e sistema respiratório, induz dermatite de contato alérgica, miose, salivação, lacrimejamento, e convulsão. Além disso, a cianamida é muito irritante para a pele, olhos e membranas mucosas.

Exposições repetidas produzem sensibilização e ulcerações dérmicas, irritação do trato respiratório com pneumonite e/ou edema pulmonar. A inalação intensa e/ou ingestão concomitante ao álcool produz reações do tipo antabuse, similares ao dissulfiram, que incluem vasodilatação com eritema e queimadura em faces, náuseas, vômitos, vertigens, visão turva, confusão, dificuldade respiratória, severa hipotensão e colapso circulatório (Micromedex, 1995, citado por Granado, 1998).

A estimativa da dose diária absorvida de uma pessoa que trabalha em um local próximo a da aplicação durante 1 hora é de 7,5µg/Kg-dia a 100 pés (30,48m), 41,0µg/Kg-dia a 200 pés (60,96m) e 2,9µg/Kg-dia a 300 pés (91,44m). A média anual de dose diária absorvida varia de 0,2µg/Kg-dia para os supervisores e 0,7 µg/Kg-dia para os misturadores/carregadores e o aplicador. A estimativa para a vida média absorvida de dose diária varia de 0,1 µg/Kg-dia para os supervisores a 0,4 µg/Kg-dia para os misturadores/carregadores e para o aplicador (Department of Pesticide Regulation, 1993).

2.2.3. Detecção e Quantificação

Apesar de já existirem métodos de detecção e quantificação da cianamida hidrogenada, como o da patente US Patent (1987) nº: 4692415 (SKW Trosberg Aktiengesellschaft, 1987), ainda existem problemas como a sensibilidade do método, os limites de quantificação e de detecção que não são satisfatórios, e/ou os métodos são muito complexos (Hiragata et al., 2005).

A cianamida pode ser diretamente analisada por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção de UV (Pramanik et al., 2009), ou a cromatografia em fase gasosa-espectrometria de massa (Hiradate et al., 2005). Contudo, devido a problemas de separação cromatográfica e detecção, a cianamida tem de ser derivatizada antes da separação e quantificação por sistema analítico. Os reagentes utilizados para análises de derivatização dos aminoácidos são por vezes aplicados na derivatização da cianamida (Nagumo et al., 2009).

A derivatização de moléculas de difícil detecção para posterior separação por HPLC tem sido o objeto de muitos estudos. Diversos reagentes têm sido empregados com sucesso na derivatização de substâncias, tais como as amins biogênicas, toxinas, antibióticos e outros produtos farmacêuticos. A dificuldade de desenvolver um método de derivatização reside na escolha do reagente adequado. Essa escolha depende dos seguintes critérios: o detector que se pretende usar; a seletividade pretendida (alguns reagentes são muito específicos e só reagem com amins primárias ou com grupos guanidina); na possibilidade de trabalhar no modo de derivatização pós-coluna ou pré-coluna; a compatibilidade com as condições de reação (temperatura, solvente, etc.) (Coppex, 2000). Um reagente de derivatização ideal deve ser estável, fácil de ser obtido ou sintetizado, e permitir a rápida conversão quantitativa de um analito para um único derivado detectável com mínimas reações secundárias (Huang et al., 2009).

A utilização de reagentes de derivatização fluorogênicos, tais como o ácido 2,6-dimetil-4-quinolinocarboxílico éster de N-hidroxissuccinimida pode aumentar a sensibilidade do método. No entanto, até agora, a utilização deste reagente não foi descrita para a análise de cianamida hidrogenada. Percebe-se que, o processo de derivatização requer muito tempo e esforço. A fim de resolver esses problemas, a derivatização *in situ* foi desenvolvida, neste método simplesmente adiciona-se o reagente de derivatização à solução da amostra (Xu et al., 2009). Esta etapa de derivatização converte a cianamida em um composto menos polar o que provoca aumento na eficiência da extração (Fattahi et al., 2007).

A preparação das amostras constitui um passo fundamental e essencial para o sucesso de qualquer método analítico. Geralmente é dependente do analito e da matriz, necessitando de uma otimização adequada dos diferentes parâmetros que a influencia. Embora no passado não tenha sido dada atenção suficiente na preparação das amostras, principalmente devido aos avanços na instrumentação analítica, hoje em dia os esforços estão sendo focados em sua melhoria. Neste sentido, as tendências atuais estão caminhando para a sua simplificação, miniaturização e automação, envolvendo também o uso de procedimentos isentos de solventes

ou solventes “amigos” do ambiente, mantendo-se ao mesmo tempo a eficiência de extração em níveis aceitáveis. Tal aprimoramento representa um grande desafio (Ramos et al., 2011).

Os métodos tradicionais de preparação de amostras para a pré-concentração e “limpeza” para as análises de cianamida incluem a extração com água e purificação, utilizando uma coluna que contém terra de diatomáceas (Cai et al., 2012), a extração com ácido acético a 2% (Nagumo, 2009), a evaporação com nitrogênio (Pramanik, 2009), e a purificação utilizando uma coluna de fase normal (Hiradate et al., 2005).

Ao longo dos últimos anos, alguns novos procedimentos de extração miniaturizados têm sido introduzidos com sucesso, onde podem ser agrupados nas chamadas técnicas de microextração de fase líquida (*liquid-phase microextraction* – LPME). A LPME emergiu a partir da extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction* – LLE), que é provavelmente o procedimento de extração mais amplamente utilizado, apesar das suas claras desvantagens, tais como o consumo elevado de tempo e solvente. Em geral, a técnica de LPME combina a extração e a concentração em um só passo. Normalmente ocorre entre vários microlitros de solvente imiscível em água (conhecido como extratante ou aceitador) e uma fase aquosa (também conhecida em alguns casos como fase doadora) que contém analitos de interesse (Ramos et al., 2011).

A LPME tem sido realizada sob diferentes modos de extração, que podem ser classificadas em três categorias principais: microextração de única gota (*single-drop microextraction* – SDME), microextração líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid-liquid microextraction* – DLLME) e microextração LPME de fibra oca (*hollow-fiber LPME* – HF-LPME). Diversas variações também foram introduzidas em cada uma dessas técnicas, o que claramente demonstra a sua versatilidade. Na maioria dos casos, um alto fator de enriquecimento relativo é obtido, uma vez que o baixo volume de agente de extração pode ser facilmente introduzido em um sistema de cromatografia ou de eletroforese (Ramos et al., 2011).

O método de microextração líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid-liquid microextraction* – DLLME), têm adquirido grande atenção da comunidade científica nos últimos anos como alternativas para os procedimentos clássicos (Melo et al., 2013; Rezaee et al., 2006). Este método baseia-se na dispersão de um solvente de extração (miscível em água), em combinação com um solvente dispersor (miscível em ambos, água e no solvente de extração) dentro de uma solução aquosa. Assim, uma área muito maior de contato entre a fase aquosa e o solvente de extração é obtido, devido à “nuvem” de suspensão formada (Figura 56). A popularidade desta metodologia vem da sua utilidade, alto fator de enriquecimento, velocidade, simplicidade, baixo custo e respeito pelo ambiente. Esta técnica está disponível, praticamente, em todos os laboratórios de análises (Abadie et al., 2012) e pode ser facilmente modificada para uma finalidade particular, ou associada a outras técnicas de preparação de amostra (Zgola-Greskowalk & Grzeskowiak, 2011).

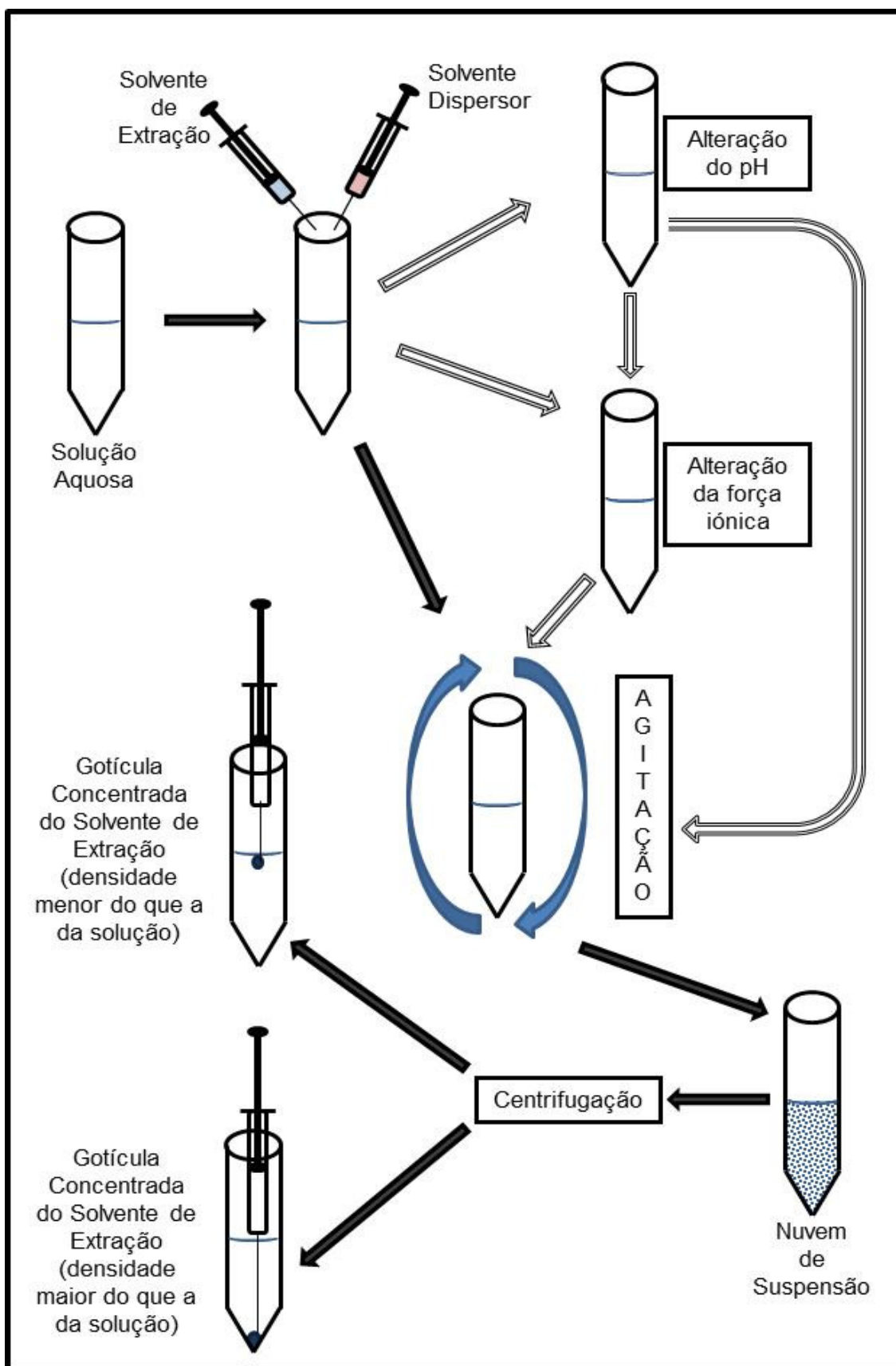


Figura 56. Esquema do método de microextração líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid-liquid microextraction* – DLLME).

Após a centrifugação, o solvente de extração é normalmente recolhido no fundo do tubo e injetado no sistema de cromatografia ou de eletroforese. Este pode também ser evaporado com gás inerte (nitrogênio) e reconstituído, podendo assim obter-se uma maior concentração das moléculas e/ou mudar a polaridade desta, dependendo do volume e da solução de reconstituição utilizada, para então ser injetado. Solventes de baixa densidade, também têm sido explorados como extratores, mas, neste caso, uma gota flutuante é recolhida após centrifugação. Caso a solução seja arrefecida e o solvente tenha um ponto de fusão baixo, a gota flutuante solidifica, facilitando assim a separação das fases e diminuindo as perdas. Esta técnica é chamada de DLLME – gota orgânica flutuante (*DLLME-floating organic drop* – STO) (Ramos et al., 2011).

Diversas variáveis influenciam as reações de derivatização e a eficiência do solvente de extração. No caso da derivatização, a temperatura, tempo de reação, pH da solução, afinidade do derivatizante e sua concentração, são fatores que podem afetar a reação. Já na extração pode-se citar o volume de solvente dispersante, volume de agente extrator, força iônica, pH e tempo de extração. Após a obtenção de uma reação de derivatização e um solvente extrator adequado para a extração é necessário otimizar os parâmetros para se obter o máximo de molécula desejada para a injeção. Possibilitando assim uma maior sensibilidade de detecção e quantificação.

Normalmente, a otimização dos parâmetros da derivatização e da extração para a análise cromatográfica é feita pelo método “um fator por vez” (*one-factor-at-a-time method*), o qual consiste em variar um fator de controle ou parâmetro de cada vez, mantendo os outros constantes durante cada ensaio (Andre et al., 2013). Isto pode consumir muito tempo, e é provável que não se encontre o verdadeiro ponto ótimo quando existem interações entre as variáveis.

O desing fatorial completo de dois níveis (*two-level full factorial desing*) é uma ferramenta útil para a procura preliminar de fatores experimentais que precisam ser otimizados (Ferreira et al., 2007). Além disso, a metodologia de superfície de resposta (*response surface methodology*) desempenha um papel crucial para fornecer modelos estatísticos que ajudam a compreender as interações entre os fatores que estão sendo otimizados e estabelecer as condições ideais, com um número mínimo de ensaios (Pinho et al., 2011; Phoa et al., 2009).

É, portanto, claro que estes dois métodos quimiométricos, quando aplicados a derivatização e a microextração, maximizam a qualidade dos dados analíticos (Stalikas et al., 2009). No entanto, embora esses desenhos experimentais de otimização apresentem uma vantagem quando comparado ao método “um fator por vez” de otimização, apenas uma minoria dos estudos aplicam esses procedimentos (Leardi, 2009).

2.3. Material e Métodos

2.3.1. Reagentes

Foi utilizado padrão de cianamida (pureza > 99%) adquirido a partir da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

O cloridrato de metilamina (pureza > 98%) foi adquirido pela Fluka (Buchs, Suíça). Todos os solventes utilizados na fase móvel foram de grau HPLC da Merck (Darmstadt, Alemanha). Água ultra-pura (0,05µS/cm) foi obtida por meio de sistema Mili-Q da Millipore (Miliford, MA, EUA).

Foram adquiridos da sigma o 1,2-naftoquinona-4-sulfônico (*1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid*), com pureza de 97%; o 2-metoxi-2,4-difenil-3(2H)-furanona (*2-methoxy-2,4-*

diphenyl-3(2H)-furanone) adequado para a fluorescência (pureza $\geq 98,0\%$ – HPLC); o cloridrato de piridoxal (*pyridoxal hydrochloride*), com pureza maior ou igual a 99% (HPLC); o 2,6-dimetil-4-quinolinocarboxílico éster de n-hidroxissuccinimida (*2,6-dimethyl-4-quinolinecarboxylic acid n-hydroxysuccinimide ester* – DMQC-OSu) para derivatização para HPLC (pureza $\geq 98,0\%$); e o ácido 4-aminobutírico foi adquirido da Merk.

As soluções de padrão de cianamida foram preparadas em água semanalmente e mantidas no escuro a 4°C. Já as soluções de cloridrato de metila foram preparadas em ácido clorídrico a 0,1%. As misturas padrão, de concentrações apropriadas, foram preparadas por diluição com água ultra-pura e mantidas a 4°C, protegidas da luz (de acordo com as orientações SANCO – 2011).

Já os solventes de extração, triclorometano, clorobenzeno, diclorometano, tetraclorometano, tetracloroetileno, foram de elevada pureza adquiridos da Fluka. E o cloreto de sódio (NaCl) foi de grau analítico proveniente da Riedel-de-Haën (Bushs, Suíça).

2.3.2. Equipamentos

Utilizou-se um banho de água com termostato, marca Huber MPC-V12 (offen burg, Alemanha) para controlar a temperatura durante o processo de derivatização.

A separação e quantificação da cianamida hidrogenada foram realizadas por HPLC com detecção por fluorescência. A análise cromatográfica foi realizada em equipamento HPLC analítico (Jasco, Tóquio, Japão), equipado com bombas HPLC Jasco PU-2080, um detector FP-920 de fluorescência, um injetor de amostras AS-950, e um forno de coluna (modelo 7981; Jones Chromatography, Hengoed, Reino Unido). A coluna utilizada foi Waters Spherisorb ODS2 (3 μ m; 150mm de comprimento; 4,6mm de diâmetro interno). O controlador de Software Borwin PDA (JMBS Developments, Le Fontanil, França) também foi utilizado.

A separação cromatográfica foi realizada utilizando-se mistura de dois eluentes; Eluente A, que consiste em uma solução tampão de ácido fórmico/formato de sódio 10mM, a pH 3; e Eluente B, que consiste em acetonitrila. O gradiente utilizado foi de 0-5 minutos, 35% de B em A; 5-10 minutos, 35-90% de B em A; 10-12,5 minutos, 90% de B em A, e 12,5-20 minutos de enxague e reequilíbrio da coluna. As separações foram efetuadas a 40°C, com taxa de fluxo de 1,0mL.min⁻¹. E os comprimentos de onda de detecção de fluorescência foram fixados em 332nm para excitação e 432nm para emissão.

Utilizou-se um espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 50B, com as células de quartzo de 1cm de percurso óptico para avaliar o comprimento de onda de excitação e emissão dos derivados de cianamida.

2.3.3. Seleção do Reagente Derivatizante

Realizaram-se testes com diversos derivatizantes, com o objetivo de escolher qual seria o mais adequado para se a derivatização da molécula de cianamida hidrogenada, originando um derivatizado fluorescente. Como o grupo de reação da cianamida hidrogenada é uma amina primária (Figura 57), os derivatizantes testados eram adequados para a derivatização de aminas primárias.

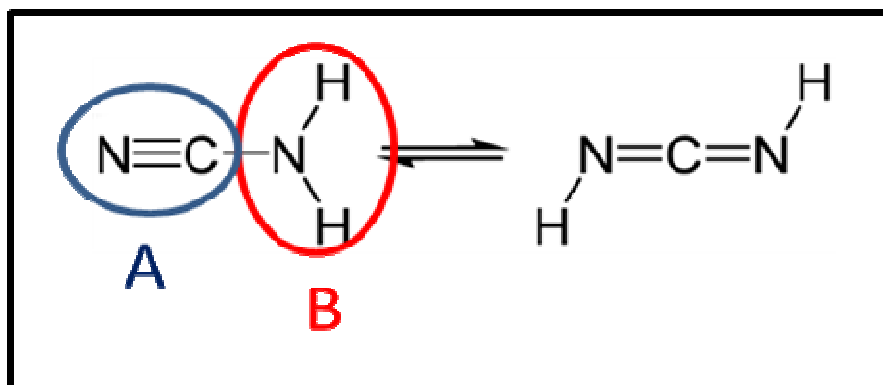


Figura 57. Esquema da molécula da cianamida hidrogenada, composta por um grupo ciano (A) e um grupo amina (B).

Os derivatizantes testados foram:

- D1** → 1,2-Naphtoquinone-4-sulfonic acid (NQS);
- D2** → 2-Methoxy-2,4-difhenyl-3(2H)-furanone (MDPF);
- D3** → Pyridoxal;
- D4** → 2,6-Dimethyl-4-quinolinecarboxylic acid N-hydroxysuccinimide ester (DMQC-OSu)

Sendo que cada reação de derivatização foi realizada nas seguintes condições:

- D1** → tampão de carbonato de sódio (0,2M/pH: 11,3), temperatura de 100°C durante 4 minutos e com a interrupção da reação com banho de gelo. Como padrão interno utilizou-se o ácido 4-aminobutirico;
- D2** → tampão de carbonato de sódio (0,2M/pH: 11,3); Ácido Borico – Hidróxido de sódio (pH9,5); Borato de sódio (pH:9,6). Temperatura de 20°C durante 30 minutos. Como padrão interno utilizou-se o ácido 4-aminobutirico;
- D3** → adicionou-se 100µL tampão de borato de sódio (0,5M/pH 9,6), 50 µL de ácido 4-aminobutirico (Padrão Interno), 50 µL de solução de cianamida hidrogenada a 100mg/L. A reação ocorreu a 80°C durante 30 minutos, sendo interrompida com banho de gelo. Adicionou-se então o tampão de boroidreto de sódio (NaBH₄ – 100mg dissolvido em solução de hidróxido de sódio 0,1M), após um minuto adicionou-se 40 µL de ácido clorídrico 2M para o pH reduzir a 1 e 2 (Blau & Halket, 1993).
- D4** → adicionou-se 25µL de solução de cianamida hidrogenada a 100 mg/L, 25µL de solução de metilamina a 10 mg/L, 100µL de tampão de ácido bórico (0,2M) e borato de sódio (0,05M) de pH 8,0, 200µL de DMQC-OSu e 150µL de água ultra pura.

Após a determinação do derivatizante, este foi utilizado no experimento que determinou o método para a detecção e quantificação de cianamida hidrogenada em diferentes matrizes de água.

2.3.4. Seleção do Comprimento de Onda de Excitação e de Emissão

Os testes preliminares para estabelecer o comprimento de onda mais adequado para análise de fluorescência foram efetuados em espectrofluorímetro. Visando assim determinar os parâmetros espectrais, tais como, comprimento de onda de excitação e emissão da cianamida hidrogenada derivatizada pelo DMQC-OSu.

Após a determinação do comprimento de onda mais adequado para o derivatizado (DMQC-cianamida), este foi utilizado no experimento que determinou o método para a detecção e quantificação de cianamida hidrogenada em diferentes matrizes de água.

2.3.5. Extração por DLLME

Os ensaios para a seleção do melhor solvente de extração foram realizados utilizando-se 10mL água ultrapura enriquecida com padrão de cianamida hidrogenada, com concentração final de 10mg/L. A derivatização foi realizada com a adição de 1mL de solução tampão (H_3BO_3/NaB_4O_7 ; pH=8,5) e 400 μ L de DMQC-OSu (2mM), à temperatura ambiente durante 15 minutos. Em seguida 3,5 gramas de NaCl e 400 μ L de diferentes solventes de extração, separadamente, foram adicionados para formar uma “nuvem” de suspensão.

Esta solução foi submetida a agitação manual vigorosa, até a dissolução total do NaCl. Os tubos cônicos foram então centrifugados a 5.000 rpm durante 4 minutos e a fase aquosa superior foi removida com pipeta (as partículas dispersivas foram sedimentadas no fundo do tubo de centrifugação). A fase orgânica resultante foi removida do tubo de ensaio e evaporada com corrente suave de nitrogênio. Finalmente, a amostra foi reconstituída em 80 μ L de fase cromatográfica móvel inicial (35% de eluente B em A) e 20 μ L foram injetados para análise.

Os solventes orgânicos testados foram: triclorometano, clorobenzeno, diclorometano, tetraclorometano e tetracloroetileno. O efeito de diferentes solventes de extração foi avaliado pela área do pico obtido pelo derivatizado da cianamida através da leitura de HPLC/fluorescência.

2.3.6. Derivatização e Procedimentos de Extração

A derivatização foi efetuada utilizando volume de 10mL de amostra de água, colocados num tubo de ensaio cônico de 15mL e com adição de metilamina como padrão interno (10 μ g.L⁻¹ de concentração final para 10mL de amostra). Adicionou-se 300 μ L de tampão de H_3BO_3/NaB_4O_7 (pH=8,5) e 600 μ L de solução de DMQC-OSu (2mM). A solução foi então incubada a 4°C na geladeira por 15 minutos. As amostras eram enriquecida com padrão de cianamida hidrogenada quando na preparação da curva de calibração e/ou para testar a validação do método.

O derivatizado DMQC-cianamida foi extraído pelo método DLLME, onde 65 μ L de ácido acético 2M e 3g de NaCl foram adicionados à solução. Sendo então 800 μ L de triclorometano (solvente de extração) rapidamente aplicados, formando-se assim uma dispersão designada de “nuvem”. Esta solução foi submetida a uma agitação manual vigorosa, até a dissolução total do NaCl. Os tubos cônicos foram então centrifugados a 5.000rpm durante 4 minutos e a fase aquosa superior foi removida com uma pipeta (as partículas dispersivas foram sedimentadas no fundo do tubo de centrifugação). A fase orgânica resultante foi removida do tubo e evaporada com uma corrente suave de nitrogênio. Finalmente, a amostra foi reconstituída em 80 μ L de fase cromatográfica móvel inicial (35% de eluente B em A) e 20 μ L foram injetados para análise.

A concentração de cianamida hidrogenada na matriz de água foi calculada com a utilização de curvas padrão de calibração (10-200 μ g.L⁻¹). Foi utilizada uma calibração em matriz isenta de analito, em que a metilamina é utilizada como padrão.

2.3.7. Delineamento Experimental

Delineamento fatorial de dois níveis (2^k) foi montado para a triagem das principais variáveis que afetam o processo de derivatização da cianamida e da extração. Esta metodologia é uma ferramenta útil para examinar as principais variáveis em sistema multivariável. Como indicado na Tabela 17, dois modelos fatoriais diferentes foram construídos. Cada um possuía trinta e duas combinações em diferentes níveis de concentração. Ambos desenhos experimentais consistiam em 4 pontos centrais e foram realizados para avaliar a significância das cinco variáveis em estudo.

Tabela 17. Fatores, códigos, níveis baixo e alto, do delineamento fatorial 2^5 para procedimentos de derivatização e extração.

Derivatização			Extração		
Fatores	Níveis		Fatores	Níveis	
	Baixo (-1)	Alto (+1)		Baixo (-1)	Alto (+1)
(x ₁) Temperatura (°C)	4	50	(x ₁) Solvente Dispersante (µL)	600	1500
(x ₂) Tempo (min.)	5	40	(x ₂) Solvente de Extração (µL)	100	400
(x ₃) Agente Derivatizante (µL)	100	300	(x ₃) Força Iônica (NaCl conc. m/v) (%)	0	35
(x ₄) Tampão (mL)	300	1500	(x ₄) pH	3,5	8,5
(x ₅) pH	7	9,5	(x ₅) Tempo de Extração (min.)	5	15

Posteriormente as variáveis significativas foram otimizadas usando delineamento central composto (*central composite design* – CCD), onde os parâmetros otimizados são apresentados na Tabela 18. Foi utilizado um CCD com um delineamento 2^3 fatorial completo, como pontos cúbicos, com seis pontos a uma distância axial de $\alpha = 1,682$ a partir do ponto central e 6 replicatas do ponto central. No Anexo A encontra-se todos os parâmetros avaliados e os resultados das áreas de pico do derivatizado DMQC-cianamida utilizado nos CCDs da derivatização e da extração.

Tabela 18. Fatores, códigos, níveis baixo e alto, do delineamento de matriz CCD para os procedimentos da derivatização e da extração.

Derivatização					
Fatores	Níveis				
	-α (-1,682)	Baixo (-1)	Central (0)	Alto (+1)	+α (+1,682)
(x₁) Temperatura (°C)	- 0,1	4	10	16	20,1
(x₂) Agente Derivatizante (µL)	63,6	200	400	600	736,4
(x₃) pH	6,5	7,0	7,75	8,5	9,0
Extração					
Fatores	Níveis				
	-α (-1,682)	Baixo (-1)	Central (0)	Alto (+1)	+ α (+1,682)
(x'₁) pH	2,8	3,5	4,5	5,5	6,2
(x'₂) Solvente de Extração (µL)	129,6	300	550	800	970,4
(x'₃) Força Iônica (NaCl conc. m/v) (%)	28,3	30	32,5	35	36,7

Por conta disso, o experimento completo teve 20 combinações, incluindo 6 repetições do ponto central. Dois CCD diferentes foram construídos, um para a otimização das condições de derivatização e outro para a otimização do processo de extração.

A temperatura da derivatização variou de 4 a 16°C ($-\alpha = -0,1$ e $\alpha = 20,1$), a quantidade de agente de derivatização de 200 a 600µL ($-\alpha = 63,6$ e $\alpha = 736,4$) e o pH de derivatização variou entre 7,0 e 8,5 ($-\alpha = 6,5$ e $\alpha = 9,0$), respectivamente.

Para as variáveis do processo de extração, o pH variou de 3,5 a 5,5 ($-\alpha = 2,8$ e $\alpha = 6,2$), o volume do solvente de extração variou de 300-800µL ($-\alpha = 129,6$ e $\alpha = 970,4$) e a força iônica (NaCl a conc. m/v%), variou de 30 a 35% ($-\alpha = 28,3$ e $\alpha = 36,7$). A resposta usada em todos os experimentos foi a área do pico do derivatizado da cianamida (DMQC-cianamida).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Design Expert Trial.Version 7 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN). Foi realizada análise de regressão para se ajustar a função de resposta, obtendo-se o modelo final. E a partir da análise de variância (ANOVA) por meio do teste F (Teste de Fisher), foi avaliado a adequação e significância do modelo.

2.3.8. Preparação de Amostras

Para avaliar a precisão e a aplicabilidade do método proposto, a extração e a determinação da cianamida hidrogenada foi realizada em diferentes matrizes de amostras de

água, incluindo as águas subterrâneas, de torneira, mineral, de rio e água do mar. Todas as amostras foram coletadas na cidade do Porto, Portugal, em Janeiro de 2013. As amostras de água subterrâneas foram coletadas em poços perfurados; as de torneira foram retiradas do abastecimento público; as de água mineral foram compradas em supermercado local; as de água do rio foram retiradas do rio Douro; enquanto que as de água do mar foram coletadas do Oceano Atlântico Norte.

Antes da determinação da cianamida hidrogenada, 500mL de cada amostra de água foi filtrada através de filtros de fibra de vidro (Whatman, GF/F 47mm, Maidstone, England) e mantida em recipientes de vidro âmbar a 4°C de temperatura até que fossem analisadas.

2.3.9. Validação do Método

Para garantir que a metodologia de otimização analítica fosse adequada para a realização de análises de rotina, o método foi validado no que respeita aos parâmetros de calibração e respectivas incertezas, precisão, recuperação, limite de quantificação (LOQ) e limite de detecção (*limit of detection* – LOD).

A validação do método foi realizada de acordo com as orientações das autoridades reguladoras e dos principais organismos internacionais. Sendo estes: Conferência Internacional sobre as Decisões de Harmonização (ICH, 2005); SANCO (SANCO, 2011); Grupo EURACHEM (EURACHEM, 1998); Administração de Alimentos e Drogas (FDA, 2001); e Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2007).

A verificação de desempenho do método analítico foi realizada pela calibração em matriz utilizando a metilamina como padrão interno. As curvas de calibração foram estabelecidas utilizando o modelo de regressão linear, traçando as razões do derivatizado da cianamida hidrogenada (DMQC-cianamida) e do derivatizado da metilamina (DMQC-metilamina) versus a concentração da área do pico do derivatizado da cianamida hidrogenada.

A faixa linear das curvas de calibração foi de 10 a 200µg.L⁻¹ de cianamida hidrogenada, utilizando sete padrões de calibração (10, 20, 50, 75, 100, 150 e 200µg.L⁻¹), preparado sob as mesmas condições otimizadas anteriormente. Cada teste foi efetuado pelo menos em cinco experimentos independentes.

Os erros aleatórios associados à curva de calibração, isto é, o erro para o declive (S_b) e o erro para a interseção na origem (S_a) (para uma curva $y=a+bx$) foram calculados utilizando o S_y/x , que estima os erros aleatórios na direção y , tal como esquematizado na Figura 58.

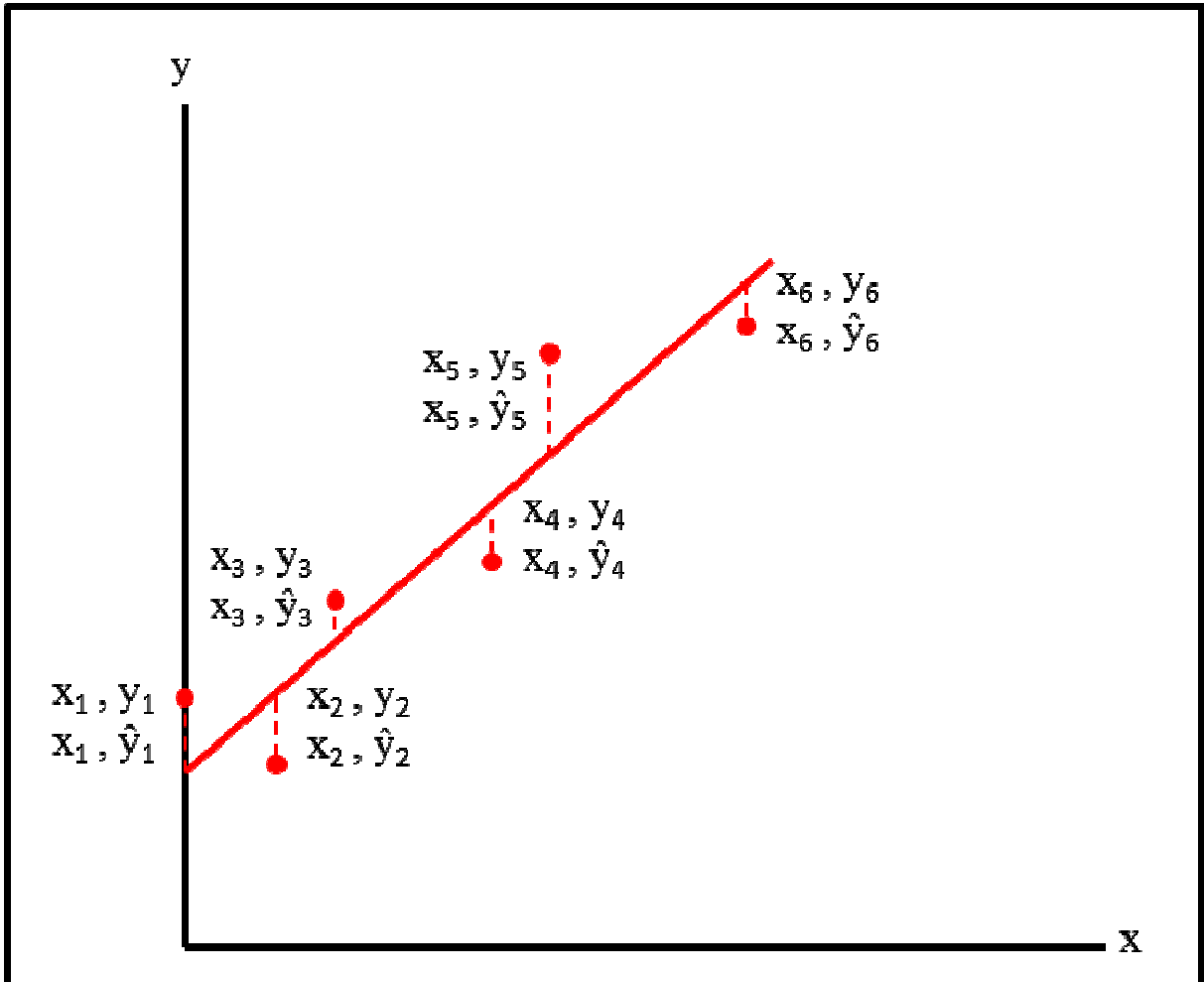


Figura 58. Esquema da distribuição dos resíduos de y da curva de regressão linear (Miller & Miller, 2005). Onde x_1 é o valor de x em 1, y_1 é o valor de y em 1 e \hat{y}_1 é o valor de y na reta em x_1 , assim por diante.

Os erros aleatórios na direção y foram calculados pela seguinte fórmula:

$$S_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

Onde:

- ✓ $S_{y/x}$ → erros aleatórios na direção y;
- ✓ n → número de pontos para a construção da curva.

Após o cálculo de $S_{y/x}$ foi possível calcular o desvio padrão para a inclinação (S_b) e o de intercepção (S_a). Utilizando-se as fórmulas abaixo:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Onde:

- ✓ S_b → erro para o declive;
- ✓ $S_{y/x}$ → erros aleatórios na direção y.

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Onde:

- ✓ S_a → erro para a interseção na origem;
- ✓ $S_{y/x}$ → erros aleatórios na direção y.

O LOD e o LOQ foram calculados com base nos parâmetros da curva de calibração (Miller et al., 2005). Em que o LOD é igual ao desvio padrão na interseção da curva (S_a) e mais de três vezes o desvio dos resíduos da mesma ($S_{y/x}$), sendo para o LOQ dez vezes esse valor.

A repetibilidade foi avaliada no mesmo dia em três concentrações (20, 75 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e em triplicata (nove determinações). Para a análise de precisão intermediária foram realizados, também em três níveis de concentração, uma determinação por dia, em três dias diferentes (nove determinações).

2.4. Resultados e Discussão

A otimização das condições do HPLC/fluorescência foi o primeiro foco na separação cromatográfica do derivatizado da cianamida hidrogenada dos subprodutos da derivatização na matriz. Esta foi realizada ao mesmo tempo em que se fez a seleção dos reagentes derivatizantes.

A fase móvel continha tampão de ácido fórmico/formato de sódio ($10 \times 10^{-3} \text{mol.L}^{-1}$, pH=3) como fase aquosa e acetonitrilo como fase orgânica. O aumento da concentração da fase orgânica de 35% até 90%, com taxa de fluxo de $1,0 \text{mL.min}^{-1}$, foi capaz de separar o derivatizado de cianamida dos componentes interferentes.

2.4.1. Seleção do Reagente Derivatizante

Dos quatro reagentes derivatizantes testados, verificou-se que, nas condições usadas, o único capaz de reagir com a cianamida hidrogenada com possibilidade de formar um derivado com detecção por fluorescência foi o 2,6-Dimethyl-4-quinolinecarboxylic acid N-hydroxysuccinimide ester (DMQC-OSu). Desta forma, este foi escolhido para o desenvolvimento do método de detecção e quantificação de cianamida hidrogenada.

2.4.2. Seleção do Comprimento de Onda de Excitação e de Emissão

Para obter o máximo de sensibilidade na detecção por fluorescência, foi necessário avaliar o espectro de excitação e de emissão do derivado da cianamida com DMQC.OSu e escolher os comprimentos de onda de excitação e de emissão mais adequados.

Verificou-se que o comprimento de onda de emissão de 432nm e o comprimento de onda de excitação de 332nm foram os que deram a maior sensibilidade, ou seja, foram os que apresentaram a maior intensidade de fluorescência no equipamento (Figura 59).

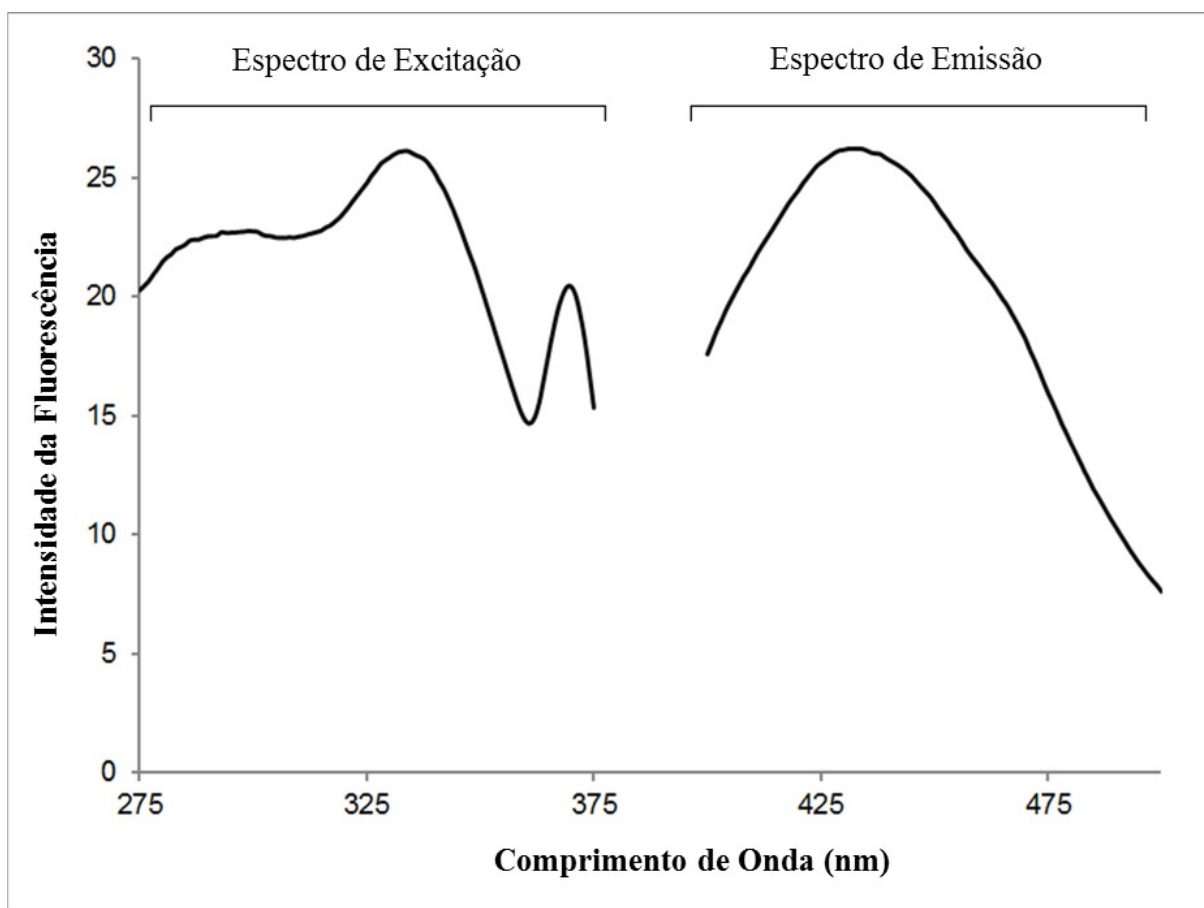


Figura 59. Intensidade de fluorescência em relação ao comprimento de onda do derivatizado da cianamida hidrogenada.

2.4.3. Seleção do Solvente de Extração

Durante os testes para a extração por DLLME, a partir da derivatização com DMQC-OSu, verificou-se que o solvente de extração mais promissor foi o triclorometano, apresentando a maior área de pico (Figura 60). A maior área do pico do derivado da cianamida com DMQC.OSu indica que houve melhor recuperação de resposta à extração com este solvente.

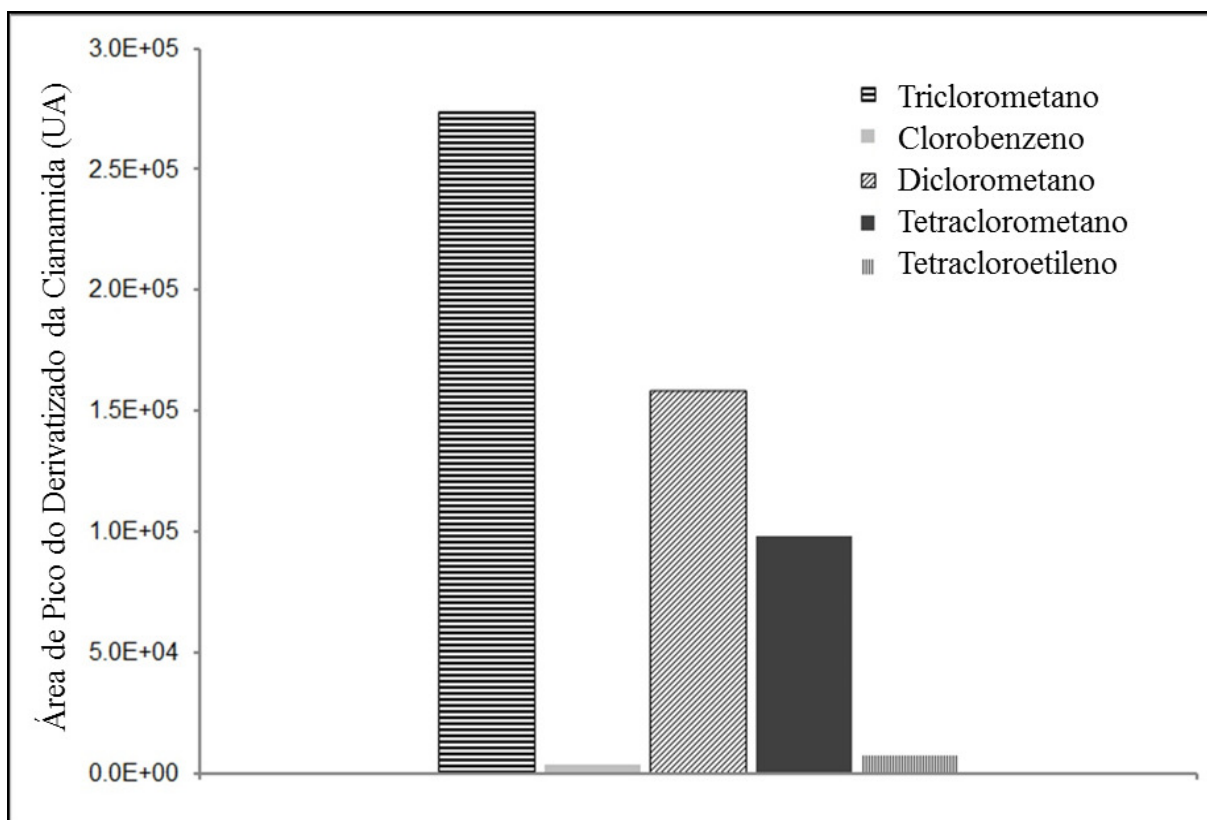


Figura 60. Efeito de diferentes solventes de extração na área do pico cromatográfico da cianamida hidrogenada.

Estes solventes foram pré-selecionados devido a densidade que apresentavam. Era intuito de que a gotícula formada após a centrifugação permanecesse no fundo do frasco para então ser feito a separação da fase aquosa.

2.4.4. Otimização das Condições de Derivatização

Os principais efeitos das cinco variáveis estudadas (temperatura, tempo, volume de derivatizante, volume de tampão e pH) nos ensaios de triagem apresentam-se na Figura 61, na forma de gráfico de *Pareto*. Este indica que os efeitos estatisticamente significativos sobre a área do pico do derivatizado de cianamida (DMQC-cianamida) foram a temperatura, a quantidade do agente derivatizante e o pH. O tempo de derivatização e a quantidade de tampão não apresentaram efeito significativo sobre a área do pico do derivatizado da cianamida.

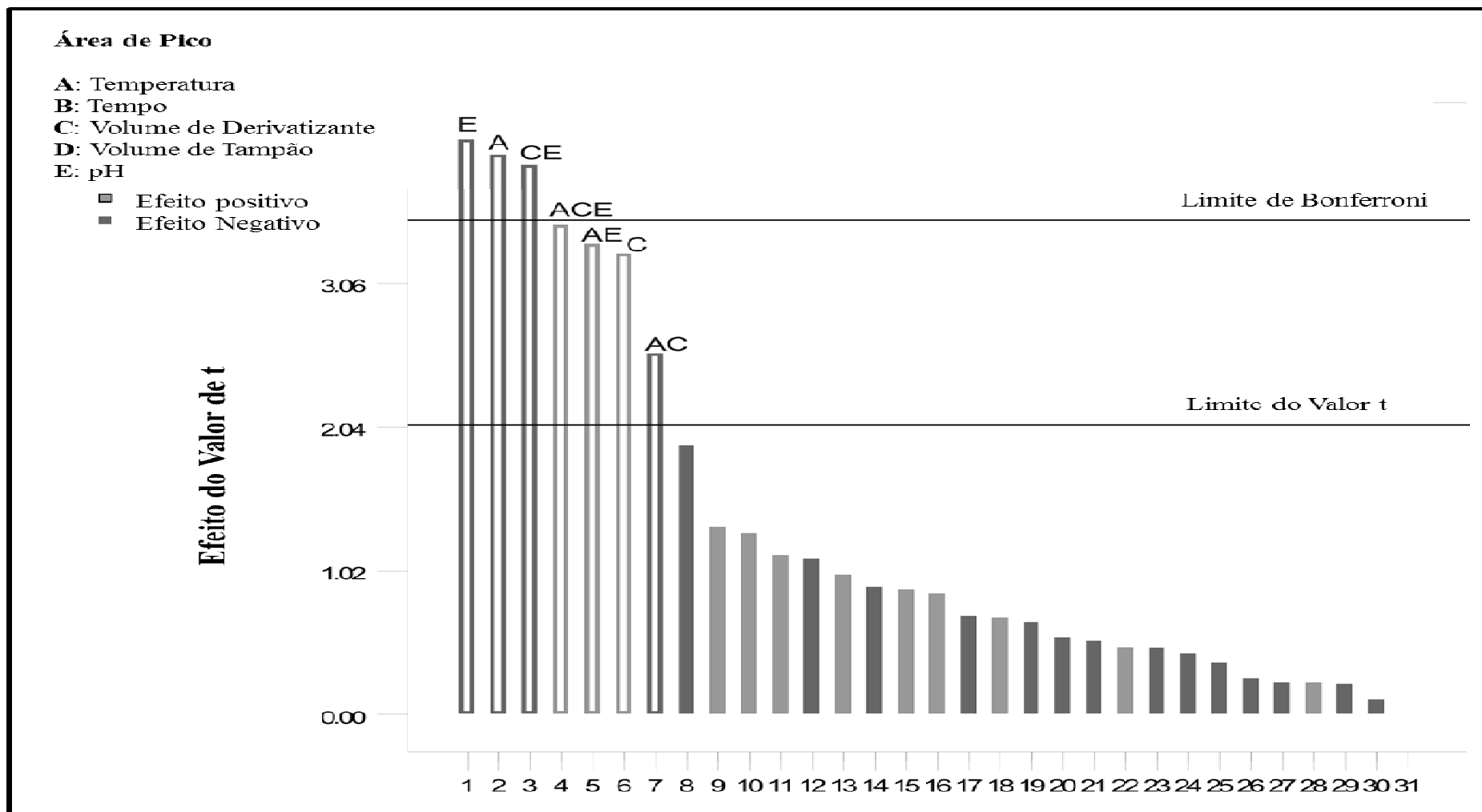


Figura 61. Gráfico de *Pareto* com a magnitude dos efeitos principais da derivatização, o eixo vertical mostra o valor t dos efeitos absolutos.

Por não apresentarem efeitos significativos, o tempo de derivatização e a quantidade de tampão foram fixados, respectivamente, em 15 minutos e 300 μ L. O tempo de derivatização foi definido com a intenção de não estender demasiadamente o tempo de análise, permitindo também que ocorresse a reação de derivatização. Enquanto que a quantidade de tampão foi selecionada para reduzir seu efeito de diluição na amostra.

Em seguida foi conduzido o delineamento central composto (*central composite design* – CCD) para a otimização da derivatização. O intervalo de variação para os parâmetros de temperatura (x_1), volume do agente derivatizante (x_2) e pH (x_3) são mostrados na Tabela 18.

A análise de regressão permitiu estabelecer uma função de resposta e obter um modelo final, que se apresenta com boa aptidão para a interação de dois fatores (2FI), uma vez que os valores de R^2_{pred} (R^2 *predicted* – predito) e R^2_{adj} (R^2 *adjusted* – ajustado) obtidos foram 0,8995 e 0,9494, respectivamente. Uma proporção de 28,285 foi alcançada, o que indica um sinal adequado, sendo o modelo de superfície de resposta 2FI adequado e significativo. A adequação da significância, avaliada a partir de ANOVA por meio do teste F, mostrou a adequação e significância do modelo 2FI. O valor do teste F foi de 60,36, indicando elevada significância do modelo e somente 0,01% de possibilidade de que um valor tão grande do teste F poderia ocorrer devido a ruído. O *Lack of fit value* de Prob > F foi 0,5705, e não foi significativo ($p > 0,05$), o que significa que o modelo é válido para o presente estudo.

A análise da curva de superfície de resposta para o delineamento experimental permitiu a previsão da função de resposta (área de pico do derivatizado da cianamida hidrogenada) para os efeitos das três variáveis em estudo. As curvas de superfície e de contorno demonstram os efeitos da variação da temperatura e pH, onde quanto menor a temperatura e maior o pH, maior será a área de pico (Figura 62). Enquanto a terceira variável (quantidade de agente de derivatização) foi mantida constante no nível mais elevado para a função de resposta.

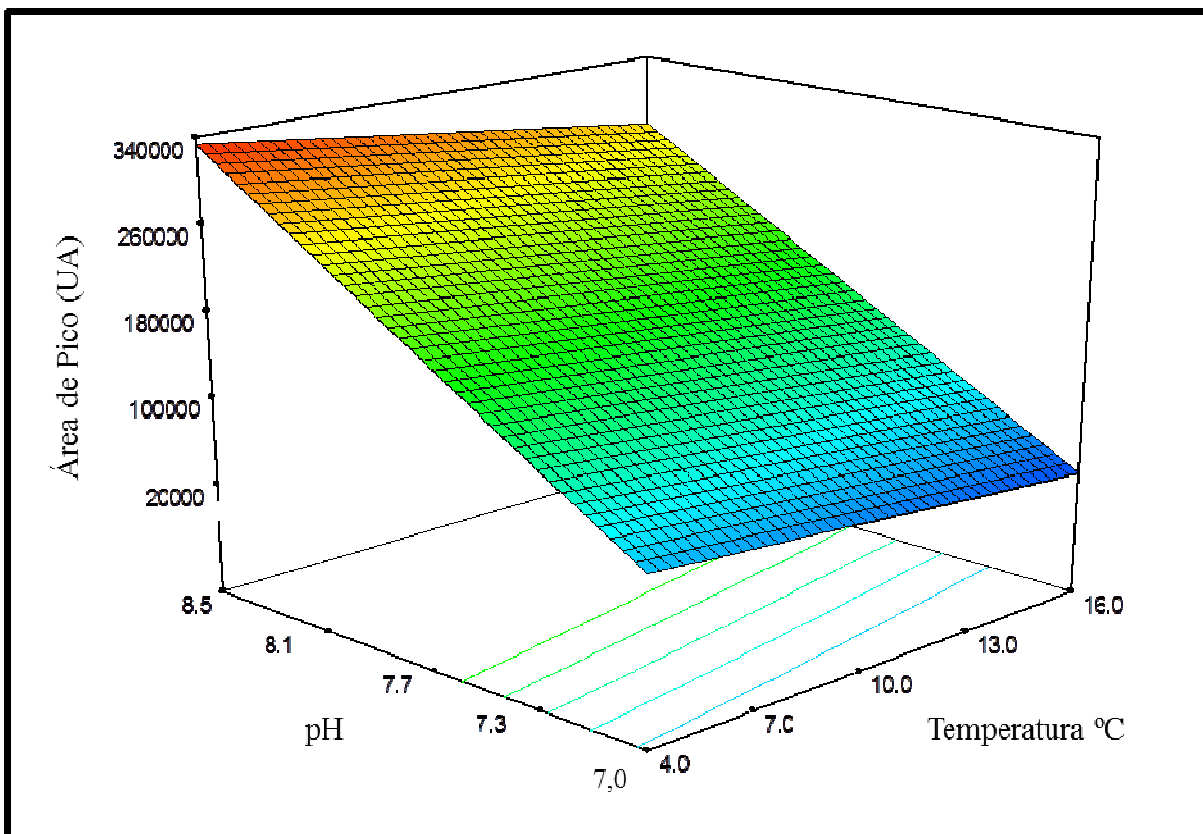


Figura 62. Superfície de resposta estimada pelo delineamento de composto central em relação ao efeito combinado do pH e da temperatura na área do pico do derivatizado de cianamida hidrogenada, sendo o volume do agente derivatizante fixado em 600 μ L.

Verificou-se que quanto maior a quantidade de agente derivatizante e menor a temperatura, maiores foram as áreas de pico do derivatizado da cianamida (Figura 63). Enquanto a terceira variável (pH) foi mantida constante no nível mais elevado sobre a função de resposta.

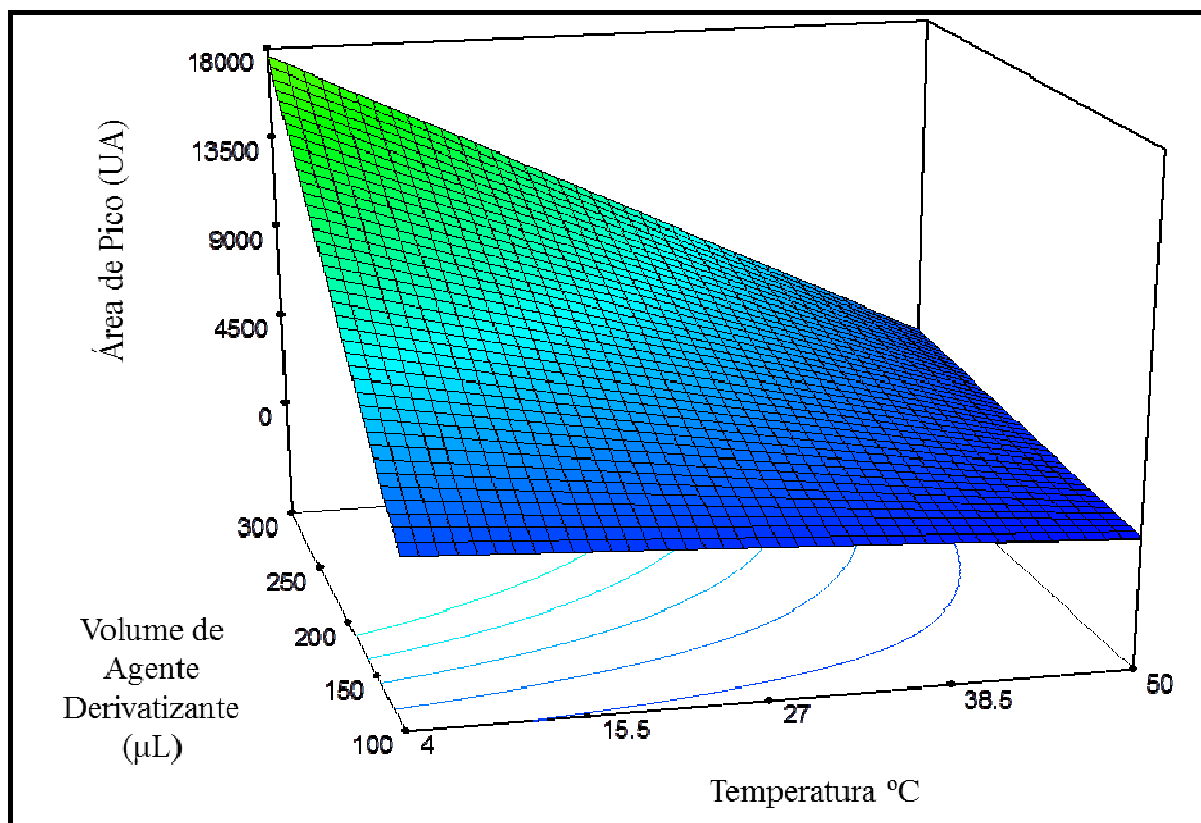


Figura 63. Superfície de resposta estimada pelo delineamento de composto central em relação ao efeito combinado do volume de derivatizante e da temperatura na área do pico do derivatizado de cianamida hidrogenada, sendo o pH fixado em 8,5.

De acordo com este estudo de otimização, a maior resposta foi obtida com baixa temperatura, pH elevado, e maior quantidade de agente derivatizante, que resulta em melhor resposta.

Após a avaliação das curvas de superfícies de resposta, foram atribuídos os parâmetros de otimização para as variáveis em estudo, calculando o índice desejável, que permite obter as melhores condições experimentais (Pinho et al., 2011). O programa combina as condições ótimas para cada variável num único número e, em seguida, procura pelos maiores valores globais. Neste índice um (1) representa o valor máximo e zero (0) uma situação não desejável (mínimo). As principais vantagens da utilização de funções de índice desejável são a obtenção de respostas qualitativas e quantitativas de uma transformação simples e rápida de diferentes respostas para uma medição (Khodadoust & Hadjmohammadi, 2011).

Os índices desejáveis estavam determinados a maximizar a função de resposta (a área do pico do derivatizado da cianamida) e mantendo os outros parâmetros no intervalo (ou seja, podendo assumir qualquer valor dentro dos definidos inicialmente). As condições ótimas obtidas foram temperatura de 4°C, quantidade de agente derivatizante de 600µL e pH 8,5.

Os testes de confirmação foram então conduzidos com os parâmetros sugeridos pelo modelo experimental, em seis ensaios diferentes. As áreas observadas foram $3,11 \times 10^5 \pm 4,21 \times 10^4$ (UA) e foi previsto áreas para o derivatizado da cianamida em $3,3310^5 \pm 3,5910^4$ (UA). Os resultados para os valores observados estavam rigorosamente correlacionados com os dados obtidos por análise de otimização utilizando o CCD, o que indica a consistência entre os valores experimentais e os previstos.

2.4.5. Otimização das Condições de Extração

Após a otimização da derivatização *in situ* da cianamida hidrogenada em matriz de água, foi necessário uma fase de “limpeza” e concentração, a fim de atingir baixo nível de detecção e de quantificação. Assim, para a otimização do processo de extração, a estratégia experimental foi semelhante à aplicada no processo de otimização da derivatização.

Os resultados indicam que os efeitos estatisticamente significativos sobre a área do pico do derivatizado de cianamida hidrogenada, na extração, foram o pH, a força iônica e o volume de solvente de extração, como demonstrado na Figura 64, sob a forma de gráfico de *Pareto*.

O volume do agente dispersante e do tempo de extração não tiveram efeito significativo sobre a área do pico do derivatizado da cianamida. Sendo assim foram fixados para os testes seguintes em 600 μ L de acetonitrilo (agente dispersante) e cinco minutos (tempo de extração), tempo necessário para dissolução completa do NaCl adicionado. Estes valores utilizados foram os mais baixos do desenho experimental, sendo escolhidos com o intuito de reduzir o efeito de diluição e consumo de tempo.

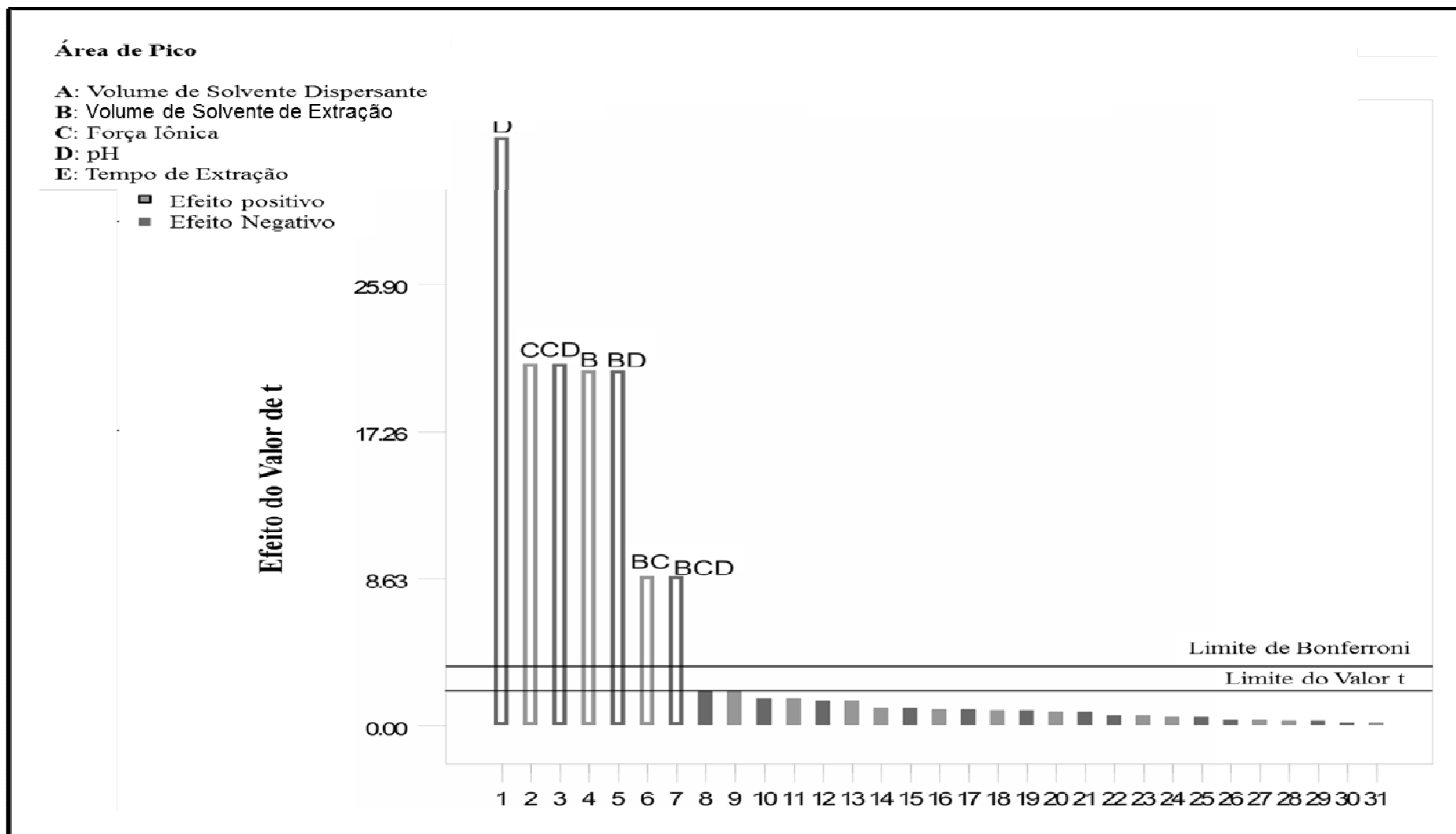


Figura 64. Gráfico de *Pareto* com a magnitude dos efeitos principais da extração, o eixo vertical mostra o valor t dos efeitos absolutos.

A análise de regressão permite estabelecer uma função de resposta e obter o modelo final. O melhor ajuste foi alcançado através de modelo quadrático com superfície de resposta adequada e significativa. Os valores de R^2_{pred} e R^2_{adj} obtidos foram 0,8357 e 0,9014, respectivamente. A razão de 15,720 foi alcançada, o que indica um sinal adequado. A partir da ANOVA foi confirmado a adequação e a significância do modelo quadrático. Onde o valor de F do modelo foi de 20,29, indicando a elevada significância do modelo, tendo apenas uma possibilidade de 0,01% de que este valor seja tão grande que possa ocorrer devido ao ruído. O **Lack of fit value** de Prob > F foi 0,8470, e não foi significativo ($p > 0,05$), o que significa que o modelo é válido para o presente estudo.

Após a determinação dos efeitos principais da extração, foi realizado o delineamento CCD para a otimização do processo de extração. Os parâmetros utilizados foram o pH (x'_1), o volume de solvente de extração (x'_2) e a força iônica (x'_3), em que são apresentados as suas variações na Tabela 18.

A análise da superfície de resposta para o delineamento experimental permitiu a previsão da função de resposta (área de pico do derivatizado da cianamida hidrogenada) dos efeitos do pH, força iônica, e da quantidade de solvente de extração. O gráfico de superfície e de contorno demonstram os efeitos da variação do pH e da quantidade de solvente de extração. Onde, as maiores áreas de pico foram encontradas por volta do pH 4,0 e com os maiores volumes de solvente de extração (Figura 65). A terceira variável (força iônica) foi mantida constante no nível mais elevado sobre a função de resposta.

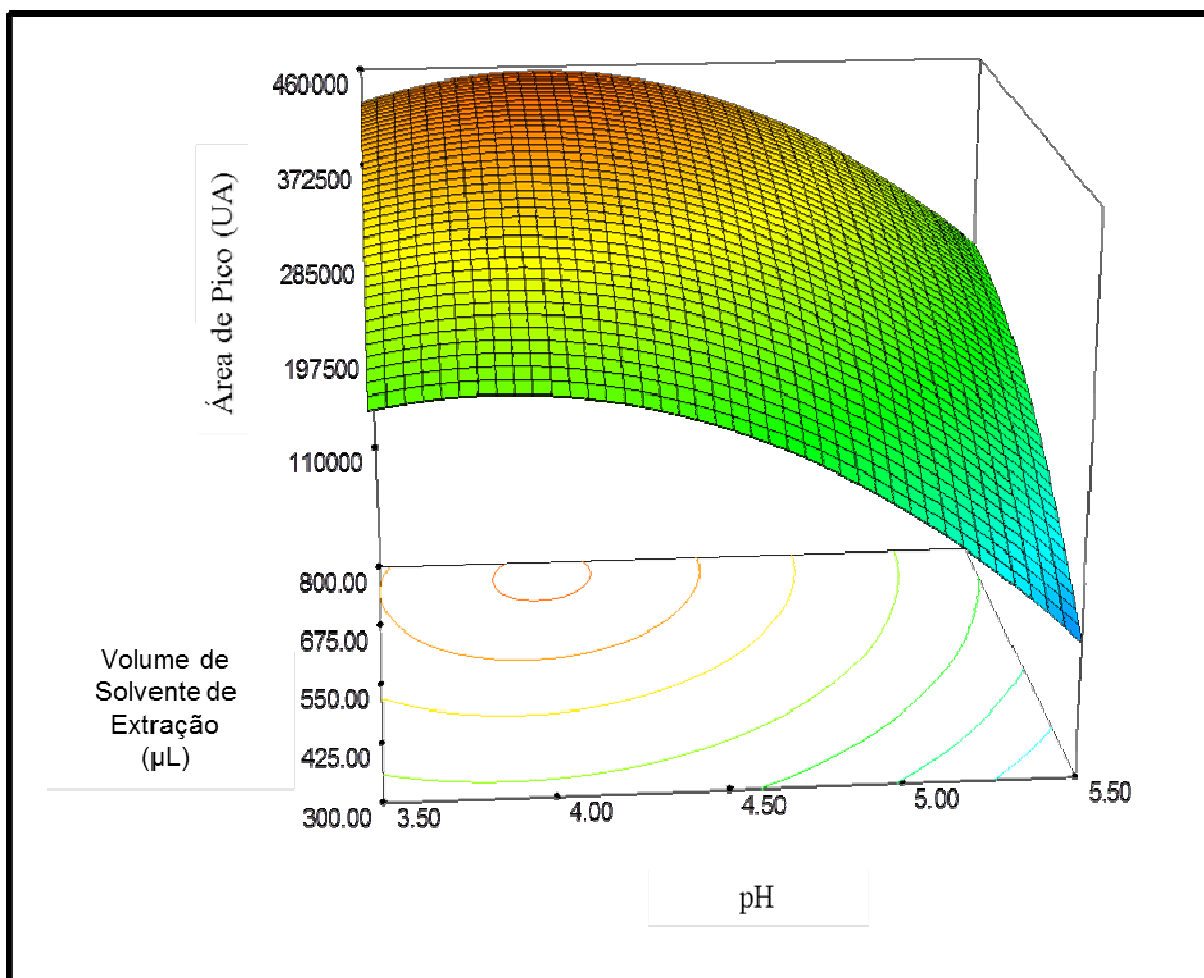


Figura 65. Superfície de resposta estimada pelo delineamento de composto central em relação ao efeito combinado do volume de solvente de extração e do pH na área do pico do derivatizado de cianamida hidrogenada, sendo a força iônica fixada em 30 % NaCl (conc. m/v).

Em relação à força iônica, verificou-se que quanto menor o pH e maior a força iônica, maior foi a extração (Figura 66). Enquanto que a terceira variável (volume de solvente de extração) foi mantida constante no nível mais elevado sobre a função de resposta.

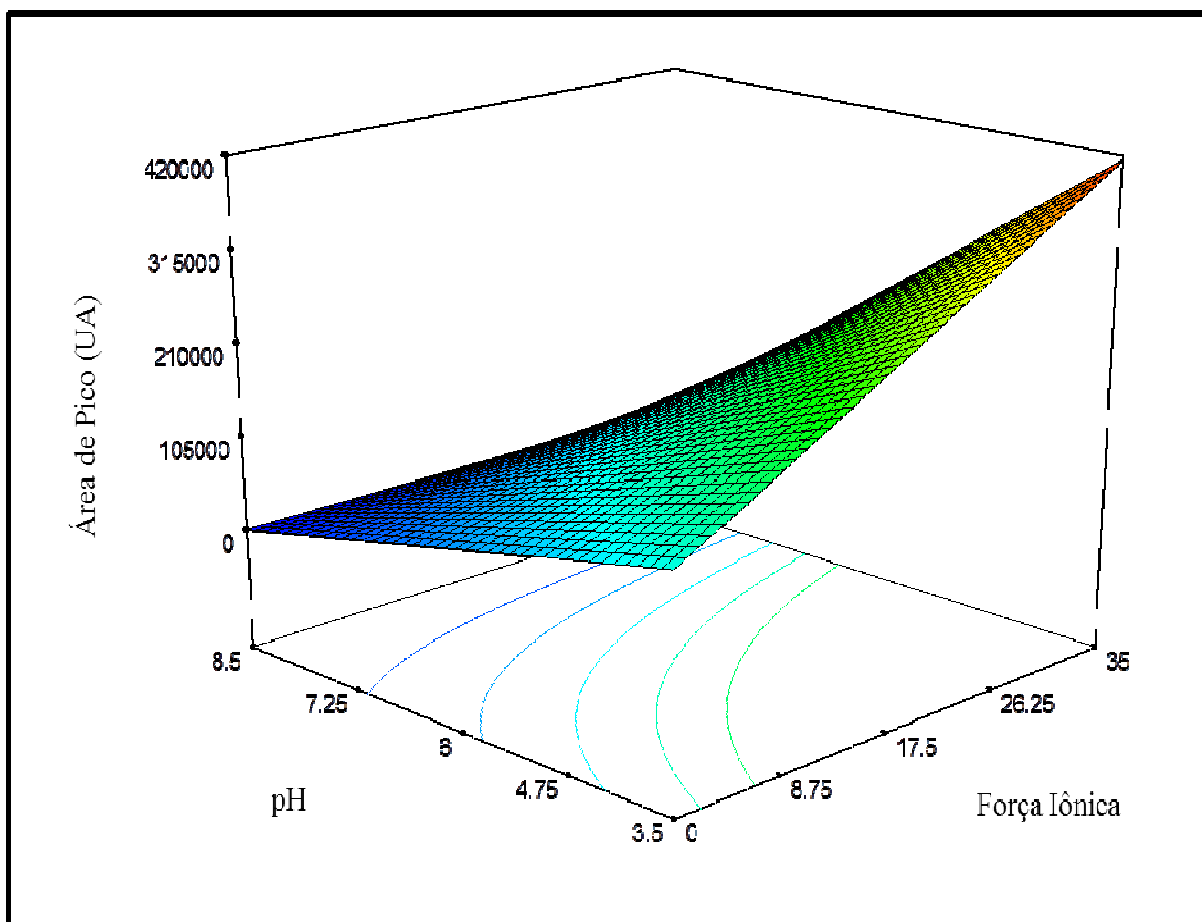


Figura 66. Superfície de resposta estimada pelo delineamento de composto central em relação ao efeito combinado do pH e da força iônica (conc. m/v) na área do pico do derivatizado de cianamida hidrogenada, sendo o volume de solvente de extração fixado em 800 μ L.

Após a avaliação das superfícies de resposta foram estabelecidos os critérios para as variáveis em estudo para obter as condições experimentais ideais. Este foi realizado para maximizar a resposta e manter os outros parâmetros no intervalo. Os índices desejáveis foram construídos e obtidos como condições ótimas a pH 3,8, o volume do solvente de extração em 800 μ L e a força iônica (NaCl a conc. m/v) em 30%.

Os testes de confirmação foram então conduzidos com os parâmetros, tal como sugerido pelo modelo experimental, em seis ensaios diferentes. As áreas observadas foram $5,12 \times 10^5 \pm 5,64 \times 10^4$ (UA) e a área prevista para o derivatizado da cianamida foram $4,94 \times 10^5 \pm 6,40 \times 10^4$ (UA). Os resultados para os valores observados estavam intimamente correlacionados com os dados obtidos por análise de otimização utilizando o CCD, que indica a consistência entre os valores experimentais e os previstos.

Na Figura 67 são mostrados na forma de Cromatogramas a evolução do sinal de resposta da área do pico do derivatizado da cianamida hidrogenada (DMQC-cianamida) durante o processo de otimização da derivatização e da extração.

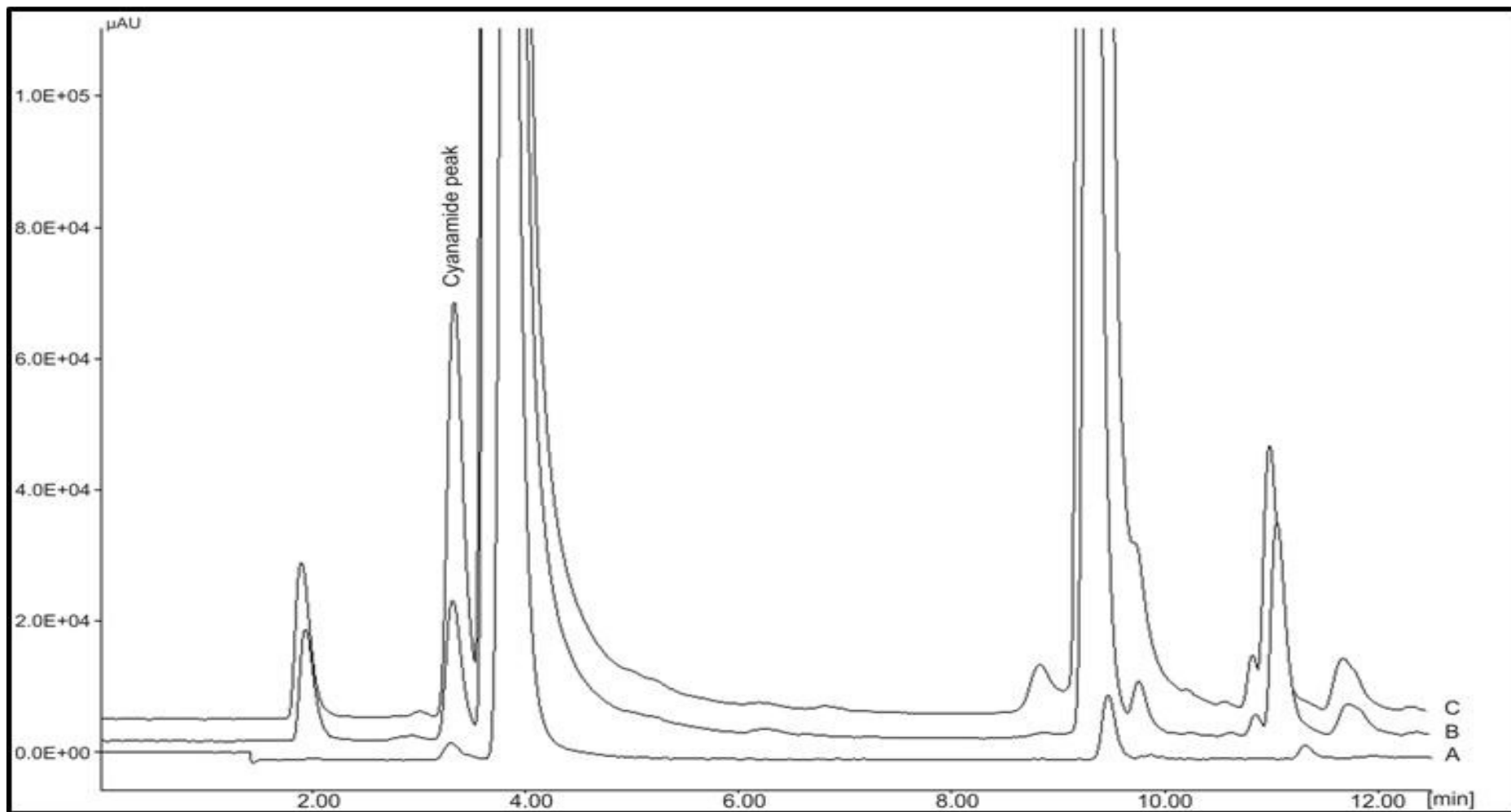


Figura 67. Cromatogramas da otimização da derivatização e extração da cianamida hidrogenada, em matriz de água, para a concentração padrão de $1.000\mu\text{g.L}^{-1}$. Onde: **A**: após os experimentos preliminares; **B**: após a otimização da derivatização; **C**: nas condições ótimas de derivatização e extração; **Cyanamide peak**: pico do derivatizado da cianamida hidrogenada (DMQC-cianamida).

Os três cromatogramas foram obtidos a partir de uma solução padrão contendo $1.000\mu\text{g.L}^{-1}$ de cianamida hidrogenada. O cromatograma A foi obtido após os experimentos preliminares realizados pelos métodos univariado (*univariate method*); o cromatograma B foi obtido após a otimização da derivatização, o aumento da área do pico foi de dezesseis vezes quando comparado com os dos experimentos preliminares; o cromatograma C foi obtido nas condições ótimas de derivatização e extração, apresentando um aumento de quarenta e seis vezes quando comparado com os dos experimentos preliminares.

2.4.6. Desempenho Analítico e Validação do Método

Os parâmetros de calibração são apresentados na Tabela 19. Foi obtida uma excelente resposta linear, com um fator de correlação igual a 0,9996. Onde o LOD e o LOQ foram de 4,82 e $16,02\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 19. Parâmetros de calibração, desvios-padrões e incertezas calculados de acordo com Miller & Miller (2005). As normas foram elaboradas nas mesmas condições aplicáveis às amostras. Cada teste foi realizado em pelo menos cinco experimentos independentes.

	LR($\mu\text{g.L}^{-1}$)	$b \pm t_{(n-2)}S(b)$	$a \pm t_{(n-2)}S(a)$	r^2	LOD($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LOQ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	S(y/x)
Cianamida	10-200	0,0051 \pm 0,0001	-0,0083 \pm 0,0134	0,9996	4,82	16,08	0,0082

Onde, **LR** é a faixa linear (**linear range**); **b** é a inclinação (**slope**); **a** é o intercepto (**intercept**); **r²** é o coeficiente de correlação (**correlation coefficient**); **S(b)** e **S(a)** são os desvios padrões da inclinação e do intercepto (**standard deviations of the slope and intercept**); **S(y/x)** é o desvio padrão dos resíduos da regressão linear **y**; **LOD** é o limite de detecção (**limit of detection**); e o **LOQ** é o limite de quantificação (**limit of quantification**).

Estes valores foram inferiores aos encontrados na literatura, tais como em Turowski & Deshmukh (2004), que apresentam uma maior linearidade, variando de $500\mu\text{g.L}^{-1}$ – 5000mg.L^{-1} , e Rust (1987), que apresenta um LOQ entre 10 e $50\mu\text{g.L}^{-1}$ para solução padrão.

Os testes de precisão apresentaram variações de 3,5 a 5,5% para intradia e variações de 8,5 a 8,6% de precisão para interdia (Tabela 20). Estes valores estavam abaixo de 20%, o que é recomendado pelo SANCO (2011), em todos os três níveis de concentração.

Tabela 20. Resultados das análises para avaliar a precisão e a repetibilidade do método proposto para a cianamida hidrogenada em matriz de água (n=9 para ensaios intradia e n=9 para ensaios interdia).

Nível de Enriquecimento ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Precisão RSD %					
	Intradia			Interdia		
	20	75	200	20	75	200
Cianamida	3,5	4,4	5,5	8,3	8,6	8,4
Nível de Enriquecimento ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Recuperação					
	Concentração Esperada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			Média de Recuperação %		
	20	75	200	20	75	200
Água Ultra Pura	$20,0\pm 0,7$	$71,2\pm 3,0$	$195,4\pm 10,6$	100,2	95,0	97,7

2.4.6.1. Desempenho em Amostras de Água de Diferentes Origens

Para avaliar a aplicação do método proposto em amostras reais, cinco tipos diferentes de amostras de água (água subterrâneas, água de rio, água do mar, água de torneira e água mineral) foram coletadas e analisadas de acordo com o método proposto.

As amostras de água foram submetidas aos procedimentos descritos anteriormente, com a derivatização *in situ* e a extração por DLLME. As amostras não apresentaram níveis detectáveis de cianamida hidrogenada. Sendo então estas enriquecidas com cianamida hidrogenada em três níveis de concentração (20, 75 e $200\mu\text{g.L}^{-1}$) e as recuperações médias variaram entre 90,2% em água subterrânea para 110,2% para todas as amostras de água (Tabela 21).

Tabela 21. Valores das concentrações experimentais e de suas respectivas recuperações médias para cada tipo de amostra (n≥3).

<i>Nível de Enriquecimento (µg.L⁻¹)</i>	Recuperação					
	Concentração Esperada (µg.L⁻¹)			Média de Recuperação %		
	20	75	200	20	75	200
Água Ultra Pura	20,0±0,7	71,2±3,0	195,4±10,6	100,2	95,0	97,7
Água Subterrânea	19,7±1,4	72,6±0,7	180,5±11,1	98,4	96,7	90,2
Água de Rio	19,1±2,6	73,5±1,7	195,2±8,9	95,4	98,0	97,6
Água do Mar	20,2±0,1	76,2±2,9	197,2±11,7	101,0	101,6	98,6
Água da Torneira	21,9±2,6	82,6±6,2	197,2±11,2	109,7	110,2	98,6
Água Mineral	19.5±0.1	70.0±5.5	193.0±3.6	97.3	93.4	96.5

Para cada concentração, um teste *t de Student* foi realizado para cada tipo de água, e a comparação entre as concentrações esperada e experimental não mostrou diferença estatística (p>0,05). O teste aplicado confirma a precisão do método nestes diferentes tipos de matrizes (Mansilha et al., 2010), sendo que, sem o enriquecimento da cianamida, nenhuma das amostras apresentaram níveis detectáveis de cianamida. Na Figura 68 apresenta-se cromatogramas típicos de amostras de rio com três níveis de enriquecimento (0µg.L⁻¹; 20µg.L⁻¹; e 200µg.L⁻¹).

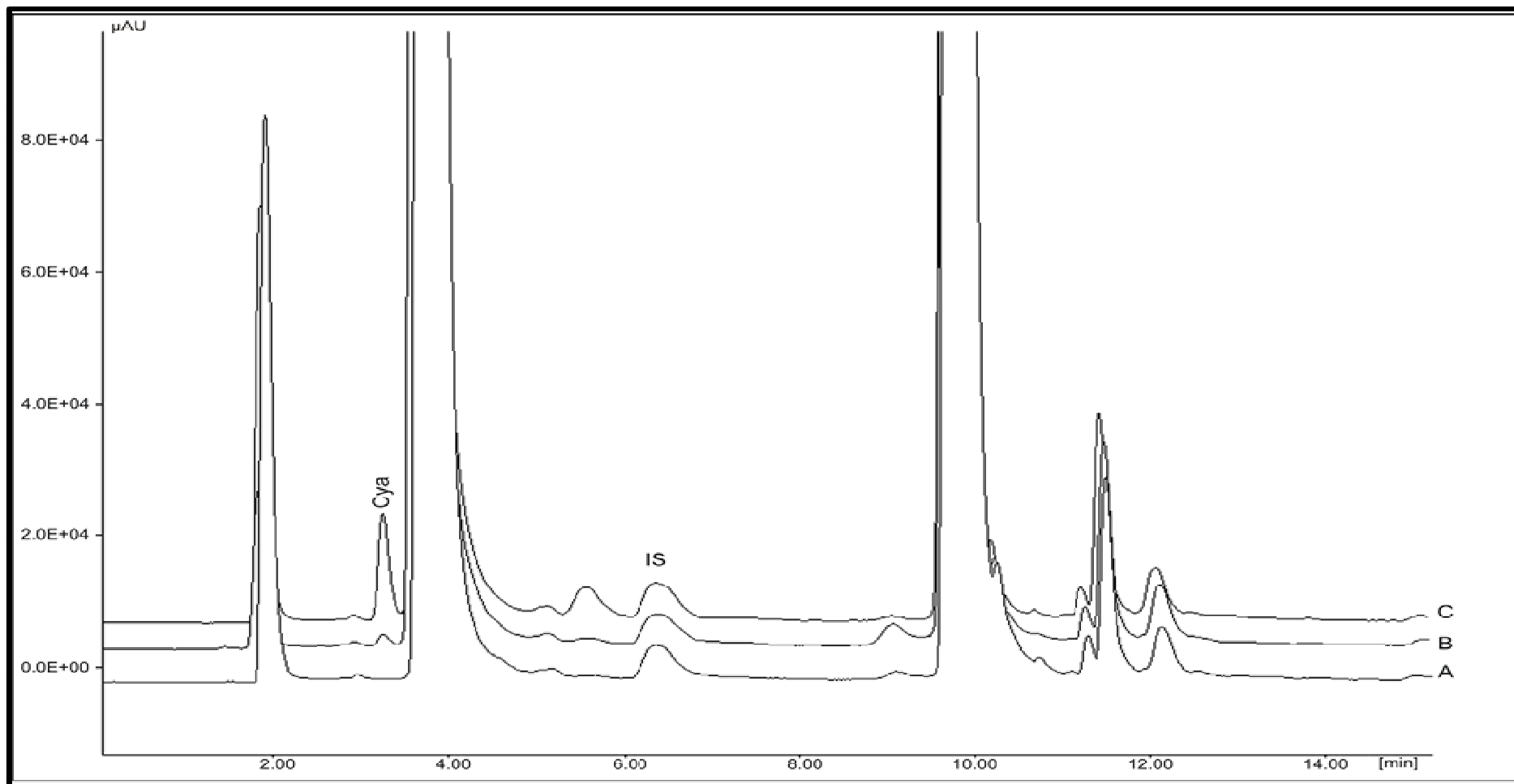


Figura 68. Cromatogramas de amostras de água do rio Douro após a extração nas melhores condições. Onde: **A**: amostra não enriquecida; **B**: amostra enriquecida com $20\mu\text{g.L}^{-1}$ de cianamida hidrogenada; **C**: amostra enriquecida com $200\mu\text{g.L}^{-1}$ de cianamida hidrogenada; **Cya**: pico do derivatizado da cianamida hidrogenada (DMQC-cianamida); **IS**: padrão interno de metilamina a $10\mu\text{g.L}^{-1}$ de concentração (DMQC-metilamina).

2.5. Conclusões

- Foi elaborado novo método para a análise de cianamida hidrogenada em amostras de água através de aplicação de derivatização direta (derivatização *in situ*) com o ácido 2,6-dimetil-4-quinolinocarboxílico éster de N-hidroxisuccinimida (DMQC-OSu), seguido de extração por DLLME e análises de HPLC/fluorescência.
- Técnicas quimiométricas multivariadas foram utilizadas com sucesso para a seleção das variáveis relevantes para a derivatização *in situ* e para a extração por DLLME. E para estabelecer as melhores condições das variáveis mais significativas, ou seja, temperatura, quantidade de agente derivatizante e pH para a derivatização *in situ* e o volume do solvente extrator, força iônica e pH para a extração por DLLME. O estabelecimento de condições ótimas foi obtido com número mínimo de ensaios para a obtenção da resposta máxima da área de pico do derivatizado da cianamida hidrogenada (DMQC-cianamida).
- O método proposto foi validado com sucesso em termos do limite de detecção e quantificação, precisão e recuperação. Este foi aplicado para a análise de águas subterrâneas, de rio, de mar, de torneira e água mineral, não sendo encontrado níveis detectáveis de cianamida hidrogenada nestas amostras. Através da fortificação dos cinco tipos de amostras de água, com quantidades conhecidas de cianamida hidrogenada, demonstrou-se a exatidão do método proposto.

3. CONCLUSÕES GERAIS

- A cianamida hidrogenada (com e sem a utilização da irrigação) aplicada nas plantas de caqui na segunda safra foi capaz de antecipar a brotação vegetativa e o aparecimento de flores fechadas e o aparecimento de frutos em desenvolvimento.
- A aplicação consecutiva desses tratamentos também atuou positivamente na manutenção dos calibres dos frutos, conseqüentemente também atuou positivamente na massa e no comprimento dos frutos. Prevenindo a diminuição desses devido a fatores que se apresentaram na segunda safra.
- Na segunda safra, verificou-se um aumento na produtividade das árvores, acompanhado da diminuição do calibre, concentração de sólidos solúveis totais e acidez total titulável dos frutos, assim como o aumento na concentração de taninos condensados.
- A aplicação da irrigação e da cianamida hidrogenada, associado ou isoladamente, não antecipou o início da colheita e nem influenciou na produtividade ou no aparecimento de injúrias nos frutos.
- Quanto mais tarde os frutos foram colhidos, maiores foram os calibres, as concentrações de sólidos solúveis totais e menores foram as concentrações de taninos condensados. Houve também um aumento da produtividade ao longo das colheitas, assim como um aumento das perdas em campo. A presença de injúrias e se os frutos estavam aptos a comercialização ou não, não foram afetados.
- Foi possível verificar diferenças no comportamento das árvores com a copa totalmente desenvolvida (bloco B1) e as árvores com a copa em desenvolvimento (bloco B2). As árvores com a copa em desenvolvimento apresentaram, nas duas safras, concentração no período da colheita, possuindo frutos apenas até a quinta colheita. E os frutos dessas árvores apresentaram os menores calibres, as menores concentrações de sólidos solúveis totais e as maiores concentrações de acidez total titulável e taninos condensados.
- Uma vez que a cianamida hidrogenada é um agroquímico que possui potencial para contaminação ambiental foi elaborado um novo método para a análise em amostras de água para possíveis monitoramentos. Este método baseia-se na derivatização direta (derivatização *in situ*) com o ácido 2,6-dimetil-4-quinolinocarboxílico éster de N-hidroxisuccinimida (DMQC-OSu), seguido de extração por DLLME e análises de HPLC/fluorescência.
- As variáveis para a derivatização *in situ* e para a extração por DLLME foram selecionadas através de técnicas quimiométricas multivariadas. Estas foram também utilizadas para estabelecer as melhores condições das variáveis mais significativas, ou seja, temperatura, quantidade de agente derivatizante e pH para a derivatização *in situ* e o volume do solvente extrator, força iônica e pH para a extração por DLLME. O estabelecimento de condições ótimas foi obtido com número mínimo de ensaios para a obtenção da resposta máxima da área de pico do derivatizado da cianamida hidrogenada (DMQC-cianamida).

- O método proposto foi validado com sucesso em termos do limite de detecção e quantificação, precisão e recuperação. Este foi aplicado para a análise de águas subterrâneas, de rio, de mar, de torneira e água mineral, não sendo encontrados níveis detectáveis de cianamida hidrogenada nestas amostras. Através da fortificação dos cinco tipos de amostras de água, com quantidades conhecidas de cianamida hidrogenada, demonstrou-se a exatidão do método proposto.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadi, M. D. M.; Ashraf, N.; Chamsaz, M.; Shemirani, F. **An overview of liquid phase microextraction approaches combined with UV-Vis spectrophotometry.** Talanta, v.99, p. 1-12, 2012.
- ADAPAR – Agência de Defesa Agropecuária Paraná. <http://www.adapar.pr.gov.br/>. (Acesso em Julho de 2013).
- Aguiar, S.X.; Melém Junior, N.J.; Fonseca, I.C.B.; Bagatin, A.K.; Takahashi, H.W. **Varição do teor de nitrogênio em ramos produtivos de caqui.** Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal – SP, v.32, n.1, p.276-285, Março, 2010.
- Alves, G.; Silva, J.; Mio, L.L.M.; Biasi, L.A. **Comportamento fenológico e produtivo de cultivares de pessegueiro no município da Lapa, Paraná.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.47, n.11, p.1596-1604, 2012.
- Américo Júnior, W. **Seleção de pessegueiro adaptado ao clima subtropical** Tese (doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2007.
- Andre, C.; Jorge, F.; Castanheira, I.; Matos, A. **Optimizing UPLC isocyanate determination through a Taguchi experimental design approach.** Journal of Chemometrics, v.27, p. 91-98, 2013.
- Angelo, P.M. & Jorge, N. **Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão.** Revista Instituto Adolfo Lutz, v.66, n.1, p.232-240, 2007.
- Antoniolli, L.R.; Castro, P.R.C.; Kluge, R.A.; Scarpate Filho, J.A. **Remoção da adstringência de frutos de caqui ‘Giombo’ sob diferentes temperaturas.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.37, n.5, p.687-691, 2002.
- Assmann, A.P.; Citadin, I.; Kalicz, C.A.; Locatelli, M.C.; Moeses, A.D. **Armazenamento de caqui cv. ‘Fuyu’ e laranja cv. ‘Pera’ em atmosfera modificada sob diferentes temperaturas.** Synergismus científica UTFPR (Universidade Tecnológica Federal do Paraná), Pato Branco, 01 (1,2,3,4): 1-1778, 2006.
- Ayub, R.A.; Blum, J.; Malgarim, M.B.; **Época e princípios ativos para a quebra de dormência de caqui cv. Fuyu.** Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal – SP, v.31, n.3, p.644-649, Setembro, 2009.
- Bajji, M.; Hamdi, M.M.; Gastiny, F.; Rojas-Beltran, J.A.; Jardin, P. **Catalase inhibition accelerates dormancy release and sprouting in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers.** Biotechnology Agronomic Society Environment, v.11, n.2, p. 121-131, 2007.
- Battestin, V.; Matsuda, L.K.; Macedo, G.A. **Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos.** Revista Alimentos e Nutrição, Araraquara, v.15, n.1, p.63-72, 2004.

Biasi, L.A.; Carvalho, R.I.N.; Zanette, F. **Dinamica da dormência de gemas de videira e quiveiro em região de baixa ocorrência de frio.** Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal – SP, n.4, p.1244-1249, Setembro, 2010.

Biasi, L.A.; Morimoto, F.; Carvalho, R.I.N.; Zanette, F. **Trabalhador na fruticultura – Cultivo do caqui.** Serviço Nacional de Aprendizagem Rural (SENAR) – Administração regional do estado do Paraná, Curitiba, p.35, 1998.

Blau, K. & Halket, J. **Handbook of Derivatives for Chromatography.** British Library Cataloguing in Publication Data, pg.192-193, 1993.

Brackmann, A.; Mazaro, S.M.; Saquet, A.A. **Frigoconservação de caquis (*Diospyros kaki*) das cultivares Fuyu e Rama Forte.** Ciência Rural, Santa Maria, v. 27, n.4, p. 561-566, 1997.

Cai, X., M.; Zhao, H.; Hu, M.W.X.Q.; He, H.M.; Zhang, C.P.; Zhang, C.R.; Li, Z. **Determining Hydrogen Cyanamide in Fruit by Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate and HPLC with Fluorescence Detection.** Chromatographia, v.75, n.17-18, p. 1069-1074, 2012.

Campo-Dall’Orto, F.A.; Ojima, M.; Barbosa, W.; Azullo; M.A.T. **Novo processo de avaliação da adstringência dos frutos no melhoramento do caqui** Bragantia, Campinas, v.55, n.2, p.237-243, 1996.

Carvalho, R.I. & Alves, M.C.A. **Intensidade de dormência das gemas de caqui “Fuyu” no período do outono e inverno na região de fazenda Rio Grande – PR.** Revista Brasileira Agrociência, Pelotas, v.13, n.1, p. 35-38, jan-mar, 2007.

Chitarra, M.I.F. & Chitarra, A.D. **Pós-colheita de frutas e hortaliças – Fisiologia e manejo.** 2ª edição revisada e ampliada, Ed. UFLA (Universidade Federal de Lavras), Lavras – MG, 2005.

Coletti, R. **Fenologia, produção e superação da dormência do mirtilo em ambiente protegido.** Dissertação (Mestrado) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, p.76, Agosto de 2009.

Coppex, L. **Derivatives for HPLC Analysis.** Thesis – Faculty of Chemistry and Pharmacy – University of Genf, 2000.

Corsato, C.E. **Fenologia e carboidratos de reserva do caqui (*Diospyros kaki* L.) ‘Rama Forte’ em clima tropical.** Tese (doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba - SP, Julho de 2004.

Corsato, C.E.; Scarpate Filho, J.A.; Sales; E.C.J. **Teores de carboidratos em órgãos lenhosos do caqui em clima tropical.** Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal – SP, v.30, n.2, p.414-418, 2008.

Corsato, C.E.; Scarpate Filho, J.A.; Verdial, M.F. **Fenologia do caquizeiro “Rama Forte” em clima tropical.** *Bragantia*, Campinas, v.64, n.3, p.323-329, 2005.

Department of Pesticide Regulation **Hydrpgen Cyanamid – Risk Characterization Document.** Medical Toxicology and Worker Health and Safety Braches, California Environmental Protection Agency, December, 1993.

Edagi, F.K.; Chiou, D.G.; Terra, F.A.M.; Sestari, I.; Kluge, R.A. **Remoção da adstringência de caquis ‘Giombo’ com subdosagens de etanol.** *Revista Ciência Rural*, Santa Maria, v.39, n.7, p.2022-2028, out, 2009.

Edagi, F.K. & Kluge, A.K. **Remoção de adstringência de caqui: um enfoque bioquímico, fisiológico e tecnológico – Revisão Bibliográfica** *Revista Ciência Rural*, Santa Maria, v.39, n.2, p.585-594, mar-abr, 2009.

Eurachem guide. **The fitness for purpose of analytical methods.** Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 1998.

FAEP – Federação da Agricultura do Estado do Paraná. <http://www.faep.com.br/comissoes/frutas/cartilhas/frutas/caqui.htm>. (Acesso em Julho de 2013).

Fattahi, N.; Assadi, Y.; Hosseini, M.R.; Jahromi, E.A. **Determination of chlorophenols in water samples using simultaneous dispersive liquid-liquid microextraction and derivatization followed by gas chromatography-electron-capture detection.** *Journal of Chromatography A*, v.1157, n.1-2, p. 23-29, 2007.

FDA – Food and Drug Administration. **Guide for industry bioanalytical method validation.** 2001.

Ferreira, S.L.C.; Bruns, R.E.; Silva, E.G.P.; Santos, W.N.L.; Quintella, C.M.; David, J.M.; de Andrade, J.B.; Breikreitz, M.C.; Jardim, I.C.S.F.; Neto, B.B. **Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems.** *Journal of Chromatography A*, v.1158, p. 2-14, 2007.

Frutas – RS, Comitê de Fruticultura da Metade Sul do RGS <http://www.frutas.radar-rs.com.br/frutas/caqui/plantio-caqui.htm> (Acesso em Julho de 2013).

Gonzalez, A.,F.; Ayub, R.,A.; Werlang, C. **Controle da maturação de caqui (*Diospyros kaki* L.) cv. Fuyu tratados com aminoethoxivinilglicina e armazenados a temperatura ambiente.** *Revista brasileira Agrociência*, Pelotas, v.11, n.2, p. 231-233, abr-jun, 2005.

Granado, M. **Intoxicações humanas por agrotóxicos em Santa Catarina. Um perfil dos casos registrados pelo centro de informações toxicológicas.** Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 1998.

Guerra, C.,A. & Pereira, C.M.M. **A cadeia produtiva de caqui no município de Antônio Carlos sob a ótica da economia dos custos de transação.** Organizações Rurais & Agroindustriais, Lavras, v.10, n.3, p. 328-342, 2008.

Guevara, E.; Herrera, J.; Alizaga, R.; **Efecto de la cianamida hidrogenada en la semilla de cafe (*Coffe arábica*) cv. Caturra. II. Influencia sobre el metabolismo germinativo.** Agronomía Costarricense, v.16, n.2, p. 177-185, 1992.

Guimarães-Beelen, P.M.; Berchielli, T.T.; Buddington, R.; Beelen, R. **Efeito dos taninos condensados de forrageiras nativas do semi-árido nordestino sobre o crescimento e atividade celulolítica de *Ruminococcus flavefaciens* FD** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.58, n.5, p.910-917, mar-abr, 2009.

Hiradate, S.; Kamo, T.; Nakajima,E.; Fujii, J. **Direct quantitative determination of cyanamide by stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry.** Journal of Chromatography A., v. 1098, pg.138-143, 2005.

Hu, H. & Couvillon, G.A. **Activities of catálase and pentose phosphate pathway dehydrogenases durin dormancy relase in Nectarine seed.** Jornal of American Societ Horticulture Scienci, v.115, n.6, p. 987-990, 1990.

Huang, K.J.; Wei, C.Y.; Xie, W.Z.; Liu, Y.M.; Chen, Y.H.; Zhang, J.F. **LC Analysis of aliphatic primary amines and diamines after derivatization whit 2,6-dimethyl-4-quinolinecarboxylic acid n-hydroxysuccinimide ester.** Jornal of Chromatographia, v.70, p. 747-752, 2009.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística <http://www.sidra.ibge.gov.br> (Acesso Junho de 2013).

ICH – International Conference on Harmonisation **Harmonised tripartite guideline, validation of procedures: text and methodology Q2 (R1).** 2005.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos.** DOQ-CGCRE-008, 2007.

International Standar ISO 750:1998 (E) segunda edição **Fruit and vegetable products Determenation of titrable acidity,** 1998.

International Standar ISO 1842:1991 (E) segunda edição **Fruit and vegetable products Determenation of pH,** 1991.

International Standard ISO 2173:1978 (E) primeira edição **Fruit and vegetable products Determenation of soluble solids content – Refractometric method,** 1978.

Kamo, T.; Hidradate, S.; Fujii, Y. **First isolation of natural cyanamide as a possible allelochemical from hairy vetch.** Jornal of Chemical Ecology, v.29, n.2, p. 275-283, 2003.

Khodadoust, S. & Hadjmohammadi, M. **Determination of N-methylcarbamate insecticides in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC with the aid of experimental design and desirability function.** *Analytica Chimica Acta*, v.699, n.1, p. 113-119, 2011.

Kimati, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A.; Rezende, J.A.M. **Manual de Fitopatologia – Volume 2 – Doenças das Plantas Cultivadas.** Agrônômica Ceres, São Paulo, 1997.

Lacerda, M.A.D.; Lacerda, R.D.; Assis, P.C.O. **A participação da fruticultura no agronegócio brasileiro.** *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 4, n. 1, 1º Semestre, 2004.

Leardi, R. **Experimental desing in chemistry: a tutorial.** *Analytica Chimica Acta*, v.659, p. 161-172, 2009.

Lehninger, A. L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry.** W H Freeman & Co, 4º edition, 2004.

Mansilha, C.; Melo, A.; Rebelo,H.; Ferreira, I. M. P. L. V. O.; Pinho, O.; Domingues, V.; Pinho, C.; Gameiro, P. **Quantification of endocrine disruptors and pesticides in water by gas chromatography-tandem mass spectrometry. Method validation using weighted linear regression schemes.** *Journal of Chromatography A.*, v. 1217, pg.6681-6691, 2010.

Marodin, G.A.B.; Sartori, I.A.; Guerra, D.S. **Efeito da aplicação de cianamida hidrogenada e óleo mineral na quebra de dormência e produção do pessegueiro – ‘Flamecrest’.** *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal – SP*, v.24, n.2, p.426-430, Agosto, 2002.

Martins, F.P. & Pereira, F.M. **Cultura do Caquizeiro.** Jaboticabal, FUNEP, 130p, 1989.

Melo, A.; Mansilha, C.; Pinho, O.; Ferreira, I. M. P. L. V. O. **Analysis of Pesticides in Tomato Combining QuEChERS and Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Followed by High-Performance Liquid.** *Food Analytical Methods*, v.6, n.2, p. 559-568, 2013.

Miller, J.N. & Miller, J.C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry.** Ancienne édition, 5th edition, p. 320, 2005.

Mizobutsi, G.P.; Bruckner, C.H.; Salomão, L.C.C.; Bagatin, A.K.; Neves, J.C.L. **Efeito da aplicação de cianamida hidrogenada e óleo mineral em sete variedades de caquizeiro (*Diospyros kaki* L.).** *Revista Ceres, Viçosa*, v.44, n.225, p. 547-556, 1997.

Mizobutsi, G.P.; Bruckner, C.H.; Salomão, L.C.C.; Bagatin, A.K.; Neves, J.C.L. **Antecipação da colheita de caqui ‘Costata’ através da quebra de dormência com cianamida hidrogenada e óleo mineral.** *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal – SP*, v.26, n.2, p. 209-211, Agosto, 2004.

Mizobutsi, G.P.; Bruckner, C.H.; Salomão, L.C.C.; Ribeiro, R.A.; Motta, W.F. **Efeito da aplicação de cianamida hidrogenada e de óleo minera em caquizeiro.** Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal – SP, v.25, n.1, p. 89-92, Abril, 2003.

Monteiro, J.M.; Albuquerque, U.P.; Araújo, E.L. **Taninos: Uma abordagem da química à ecologia.** Revista Química Nova, v.28, n.5, p.892-896, 2005.

Muñoz, V.R.S. **Destanização do caqui (*Diospyros kaki* L.) ‘Rama Forte’.** Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola, Campinas, SP, p.164, Dezembro, 2002.

Nagumo, Y.; Tanaka, K.; Tewari, K.; Thiraporn, K.; Tsuchida, T.; Honama, T.; Ohtake, N.; Sueyoshi, K.; Takahashi, Y.; Ohya, T. **Rapid quantification of cyanamide by ultra-high-pressure liquid chromatography in fertilizer, soil ou plant samples.** Journal of Chromatography A, v.1216, n.17, p. 5614-5618, 2009.

Nagumo, Y.; Tanaka, K.; T.; Crane, O.; Keilin, T.; Keren-Keiserman, A. **Involvement of calcium signalling in dormancy release of grape buds.** Journal of Experimental Botany, v.58, n.12, p. 3249-3262, 2007.

Nakano, O.; Silveira Neto, S.; Carvalho, R.P.L.; Baptista, G.C. de V.; Parra, J.R.P.; Zucchi, R.A.; Alves, S.B.; Vendramim, J.D.; Marchini, L.C.; Lopes, J.R.S.; Omoto, C. **Entomologia Agrícola.** Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz – FEALQ, Piracicaba – SP, 2002.

Neves, E.M.; Dayoub, M.; Dragone, D.S. **Análise da demanda por defensivos pela fruticultura brasileira 1997-2000.** Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal – SP, v.24, n.3, p. 694-696, Dezembro, 2002.

Neves Jr., A.C.V. **Aplicação de Revestimentos Comestíveis em Caqui ‘Mikado’ (*Diospyros kaki*) Minimamente Processado.** Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, RJ, 2009.

Neves Junior, A.C.V.; Soares, A.G.; Fonseca, M.J.O.; Goldenstein, J.L.; Costa, M.G.S.; Jannuzi, G. **Características de produção de caquizeiro no município de Sumidouro – RJ.** XIX Congresso brasileiro de fruticultura, Cabo Frio – RJ, p.249-249, 2006.

Neves Junior, A.C.V.; Soares, A.G.; Machado, E.G.; Fonseca, M.J.O.; Costa, M.G.S. **Avaliação Físico-química de Caqui (*Diospyros kaki*) Minimamente Processado.** II Simpósio Brasileiro de Pós-Colheita – Frutas, Hortaliças e Flores, Viçosa – MG, p.263, 2007.

Ojima, M.; Dall’Orto, F.A.C.; Barbosa, W.; Tombolato, A.F.C.; Rigitano, O. **Frutificação alternada em caqui cultivar Pomelo (IAC 6-22).** Bragantia, Campinas, v.44, n.1, p.481-486, Março, 1985.

Palladini, L.A. & Patri, J.L. **Eficiência de diferentes volumes e concentrações de calda para quebra de dormência na macieira cultivar ‘Gala’.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.34, n.8, p. 1491-1495, ago, 1999.

Pang, X.; Halaly, T.; Crane, O.; Keilin, T.; Keren-Keiserman, A. **Involvement of calcium signalling in dormancy release of grape buds.** Journal of Experimental Botany, v.58, n.12, p. 3249-3262, 2007.

Perussi, G.P.G. **Quebra de dormência de macieiras com uso de alho em Guarapuava – PR.** Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Centro-Oeste, Guarapuava, PR, p.47, 2009.

Phoa, F.K.H.; Wong, W.K.; Xu, H.Q. **The need of considering the interactions in the analysis of screening designs.** Journal of Chemometrics, v.23, p. 545-553, 2009.

Pimentel, C. **Metabolismo de Carbono na Agricultura Tropical** Seropédica – RJ, EDUR – Editora Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, p.159, 1998.

Pinho, C.; Melo, A.; Mansilha, C.; Ferreira, I.M.P.L.V.O. **Optimization of conditions for anthocyanin hydrolysis from Red Wine Using Response Surface Methodology (RSM).** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.59, n.1, p. 50-55, 2011.

Porfó-da-Silva, L.C. **Qualidade pós-colheita do fruto caqui (*Diospyros kaki* L.) cv. ‘Fuyu’, produzido em porto Amazonas – PR.** Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

Pramanik, S.K.; Dutta, S.; Bhattacharyya, A. **Studies on the residue of hydrogen cyanamide in grape berries.** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v.82, n.5, p. 644-646, 2009.

Ragazzini, D. **El Kaki** Madri, Ediciones Mundi-Prensa, p.176, 1985.

Ramos, M.A.; Pérez, L.M.R.; Curbelo, M.A.G.; Borges, J.H.; **Review – Liquid phase microextraction applications in food analysis.** Journal of Chromatography A, v.1218, p. 7415-7437, 2011.

Razzouk, P.L.G. **Avaliação fenológica de dez variedades de caquizeiro *Diospyros kaki* L. e propagação por estaquia em regiões tropicais.** Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Engenharia Ilha Solteira, Ilha Solteira, SP, Fevereiro, 2007.

Rezaee, M.; Assadi, Y.; Hosseine, M. R. M.; Agahae, E.; Ahamadi, F.; Berijani, S. **Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction.** Journal of Chromatography A, v.1116, n.1-2, p. 1-9, 2006.

Rocha, P & Benato, E.A. **Sistema produtivo e pós-colheita do caqui Rama Forte e Fuyu.** Revista Informações Econômicas, São Paulo – SP, v.36, n.4, p58-64, 2006.

Rust, U. **Process for the determination of cyanamide in plants parts.** Patente n. US4692415 A, 1987.

SANCO/12495/2011 **Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed.** Directorate General for Health & Consumers – European Commission, 2011.

Shulman, Y.; Nir, G., Fanberstein, L; Lavee, S. **The effect of cyanamide on the release from dormancy of grapevine buds.** Scientia Horticulturae, v.19, p.97-104, 1983.

Silva, A.C. **Crescimento, produtividade e alocação de reservas da figueira, em diferentes condições de cultivo.** Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu - SP, 2011.

Silva, M.J.; Pais, I.R.; Ramalho, J.C. **Quebra de dormência na macieira ‘Fuji’ com cianamida hidrogenada (Dormex). Efeito na produção e na qualidade dos frutos.** “X Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. XII Congresso Latino Americano de Fisiologia Vegetal”, Recife, Brasil, 11-16 de Setembro (Painel 777 e artigo 5pp em CD), 2005.

Silva, P.R. **Diagnostico da logística de caqui ‘Rama Forte’ e ‘Fuyu’, boas práticas agrícolas e análise dos perigos e pontos críticos de controle.** Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, SP, Fevereiro, 2005.

Simão. S. **Tratado de Fruticultura** Piracicaba, FEALQ, p.760, 1998.

SKW Trosberg Aktiengesellschaft (Trostberg – Alemanha). Rust, U. **Process for the determination of cyanamide in plants and plant parts.** United States Patent, Patent Number: 4,692,415 Set. 8, 1987.

Sobel, T.F. & Costa, E.F. **Estimando taxas de adoção de tecnologias poupadoras de água na fruticultura irrigada do Vale do São Francisco: o caso dos pequenos agricultores.** Revista Econômica do Nordeste, Fortaleza, v.36, n.1, p. 121-146, jan-mar, 2005.

Souza, E. L. **Causas da redução da firmeza de polpa e de alterações na epiderme em caqui ‘Fuyu’** Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

Souza, E. L.; Argenta, L.C.; Souza, A. L. K.; Pereira Gardin, J. P.; Nunes, E. O.; Rombaldi, C. V. **Produtividade e qualidade de caqui na colheita e após armazenamento refrigerado com aplicação de diferentes doses de nitrogênio no solo.** Evidência, Joaçaba, v.11, n.1, p.19-32, Janeiro/Junho, 2011.

Stalikas, C.; Fiamegos, Y.; Sakkas, V.; Albanis, T. **Developments on chemometric approaches to optimize and evaluate microextraction.** Journal of Chromatography A, v.1216, p. 175-189, 2009.

Sumidouro – RJ <http://www.sumidouro.rj.gov.br> (Acesso em Julho de 2013).

Taiz, L. & Zeiguer, E. **Fisiologia Vegetal.** 3ª edição, Editora Artmed, Porto Alegre – RS, 2004.

Takahashi, H.W.; Fonseca, I.C.; Takahashi, A. **Extração de nutrientes pelos ramos frutíferos de caqui cultivar giombo durante um ciclo de produção.** Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal – SP, v.32, n.1, p.326-334, Março, 2010.

Trentin, C.V. **Diagnóstico voltado ao planejamento do uso de águas residuárias para irrigação nos cinturões verdes da região metropolitana de Curitiba-PR** Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Estado do Paraná, 2005.

Turowski, M. & Deshmukh, A.L. **Direct chromatographic method for dermination of hydrogen cyanamide and dicyandiamide in aqueous solutions.** Anal Lett, n.37, pg.1981-1989, 2004.

Xu, L.; Basheer, C.; Lee, H.K. **Chemical reactions in liquid-phase microextraction.** Plant Omics Jornal, v.5, n.4, p.400-404, 2012.

Yooyongwech, S.; Horigane, A., K.; Yoshida, M; Sekozawa, Y.; Sugaya, S.; Cha-um, S.; Gemma, H. **Hydrogen cyanamide enhances MRI-measured water status in flower buds of peach (*Prinus persica L.*) during winter.** Plant Omics Jornal, v.5, n.4, p.400-404, 2012.

Zgola-Grzeskowalk, A. & Grzeskowiak, T. **Dispersive liquid-liquid microextraction.** TrAC Trends in Analytical Chemistry, v.30, n.9, p. 1382-1399, 2011.

ANEXO A – Delineamento central composto (*central composite design* – CCD) para a derivatização e extração, com as variáveis de níveis independentes e os respectivos resultados experimentais das áreas de pico do derivatizado (DMQC-cianamida).

Ordem de Aviação	Derivatização			Área do Pico	Ordem de Aviação	Extração			Área do Pico
	Variáveis Independentes					Variáveis Independentes			
	x ₁ (°C)	x ₂ (µL)	x ₃ (pH)			x' ₁ (pH)	x' ₂ (µL)	x' ₃ (com. m/v)	
1	4,0	200,0	7,0	18.250,1	1	3,5	300,0	30,0	349.434,7
2	16,0	200,0	7,0	22.029,4	2	5,5	300,0	30,0	63.485,6
3	4,0	600,0	7,0	52.790,1	3	3,5	800,0	30,0	500.407,0
4	16,0	600,0	7,0	33.984,5	4	5,5	800,0	30,0	247.710,0
5	4,0	200,0	8,5	92.467,6	5	3,5	300,0	35,0	307.109,0
6	16,0	200,0	8,5	87.047,0	6	5,5	300,0	35,0	153.182,0
7	4,0	600,0	8,5	344.057,8	7	3,5	800,0	35,0	357.972,9
8	16,0	600,0	8,5	291.451,0	8	5,5	800,0	35,0	300.075,0
9	-0,1	400,0	7,75	152.168,9	9	2,8	550,0	32,5	315.976,0
10	20,1	400,0	7,75	67.917,4	10	6,2	550,0	32,5	56.223,0
11	10,0	63,6	7,75	10.287,2	11	4,5	129,6	32,5	159.496,8
12	10,0	736,4	7,75	205.443,0	12	4,5	970,4	32,5	442.283,0
13	10,0	400,0	6,5	3.016,2	13	4,5	550,0	28,3	385.591,9
14	10,0	400,0	9,0	212.124,1	14	4,5	550,0	36,7	446.263,5
15	10,0	400,0	7,75	104.330,6	15	4,5	550,0	32,5	392.599,2
16	10,0	400,0	7,75	143.538,8	16	4,5	550,0	32,5	448.713,4
17	10,0	400,0	7,75	93.030,5	17	4,5	550,0	32,5	381.354,4
18	10,0	400,0	7,75	144.461,8	18	4,5	550,0	32,5	366.643,8
19	10,0	400,0	7,75	120.065,9	19	4,5	550,0	32,5	358.872,4
20	10,0	400,0	7,75	107.846,6	20	4,5	550,0	32,5	481.411,9

Os nomes dos fatores das variáveis independentes encontram-se na Tabela 18.