

TRATAMENTOS PÓS-COLHEITA NÃO QUÍMICOS: BIOCONTROLO E CALOR NA CONSERVAÇÃO DE PERA ROCHA INTEIRA E NA APTIDÃO PARA PROCESSAMENTO

Joana da Silva Rufino

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Doutora Marta Maria Moniz Nogueira de Abreu

Co-orientador: Professora Doutora Margarida Gomes Moldão-Martins

Co-orientador: Dr.^a Cristina Maria Marques Aleixo

Júri:

Presidente: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: - Doutora Marta Maria Moniz Nogueira Abreu, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária;
-Doutor Miguel António Leão de Sousa, Técnico de qualidade da CAMPOTEC

Agradecimentos

Agradeço ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, na pessoa do Doutor Carlos Santos, pela oportunidade que me concedeu na realização deste trabalho.

Agradeço à Doutora Marta Abreu, minha orientadora. Pela amizade, por todo o conhecimento que me transmitiu, pela orientação, dedicação e apoio incondicional em todas as etapas deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

À engenheira Mestre Carla Alegria, pela muita paciência e apoio, pela grande disponibilidade para esclarecer dúvidas e apresentar sugestões. Pela amizade e partilha de conhecimento, Obrigado.

À Mestre Márcia Reto, pelo carinho com que me acolheu desde o primeiro dia, pela boa disposição, paciência e dedicação durante todas as etapas laboratoriais.

À Dr.^a. Cristina Aleixo pelo precioso auxílio e pronta disponibilidade na revisão e correção dos textos.

À professora Doutora Margarida Moldão pela sugestão do tema e oportunidade de desenvolver este trabalho numa esfera tão dinâmica, desafiante e enriquecedor como o INIAV.

Ao Duarte pela amizade e apoio durante todas as etapas deste trabalho. Com ele, os dias passados no laboratório foram sem dúvida mais fáceis.

Aos meus pais, irmãos e ao Ricardo, agradeço, de forma muito especial, o apoio e carinho que demonstraram em todos os momentos, não só durante este percurso académico mas ao longo de toda a minha vida.

Resumo

Foi avaliada a integração do biocontrolo com tratamento térmico moderado, alternativo à utilização de químicos, na conservação pós-colheita de pera Rocha e na aptidão para o processamento em polpas. A caracterização da microbiota do fruto após colheita apresentou contagens de ca de 5×10^4 ufc.g⁻¹ para os grupos de Bolores e Leveduras (B&L) e de microrganismos a 30 °C, identificando-se *Cladosporium* sp. como contaminante prevalente. A ausência de efeitos do antagonista comercial *Blossom Protect*TM (*Aureobasidium pullulans*, 10^8 ufc.g⁻¹) frente a *Cladosporium* sp. nas condições testadas (7 °C, 60 dias), contrasta com os resultados observados *in vitro* (ca de 80% inibição para 10^8 ufc.g⁻¹ de produto) não acrescentando efeitos à combinação de tratamentos. A aplicação de calor (40 °C / 40 min) revelou-se eficaz no controlo da incidência de podridão pós-colheita (100%) causada por *Penicillium expansum*, fungo que dominou a microbiota nas condições de armazenagem simuladas. Acresce que este tratamento cumpriu objetivos de descontaminação parcial da matéria-prima (redução significativa da contaminação inicial de B&L) enquanto operação de fabrico de polpas de pera Rocha, constituindo uma alternativa mais eficaz e ecológica à vulgar utilização de hipoclorito de sódio, não se observando, efeitos adicionais de inibição dos níveis de escurecimento manifestados pelos tecidos após esmagamento.

Palavras-chave: pera Rocha; pós-colheita; biocontrolo, tratamento térmico moderado; *Cladosporium* sp.; qualidade.

Abstract

Integration of biocontrol and heat treatment (40 °C / 40 min) as non-chemical alternatives to Rocha pear postharvest storage and respective effects to pulp production were evaluated. From native microflora characterization, counts up to $5 \times 10^4 \text{cfu.g}^{-1}$ in yeasts and moulds (Y&M) and aerobic microorganisms at 30 °C were found and *Cladosporium* sp. was identified as the dominant pathogen in Rocha pear at harvest. The lack of effects from the commercial antagonist *Blossom Protect*^{™™} (*Aureobasidium pullulans*, 10^8cfu.g^{-1}) against *Cladosporium* sp. during tested storage conditions (7 °C, 60 days) were countered by *in vitro* results where inhibitions up to 80% were found with 10^8cfu.g^{-1} viable cells. Heat treatment application proved to effectively control (100%) postharvest rot caused by *Penicillium expansum*, found to be the dominant fungi under simulated postharvest conditions. Treatment combination did not introduced additional effects to the found efficiency. To Rocha pear pulp production, the introduction of the heat treatment as a raw material decontamination operation demonstrated to significantly reduce initial Y&M contamination. These results suggest that the heat treatment is an efficient eco-friendly alternative to the widespread use of sodium hypochlorite. However, the heat treatment had no inhibitory effect over excessive colour changes occurring after cut and smash operations.

Keywords: Rocha pear; postharvest; biocontrol, heat treatment; *Cladosporium* sp.; quality.

Extended Abstract

Postharvest diseases, namely those caused by fungi, limit the storage period and distribution of Rocha pear. Disease control is achieved mainly through the use of synthetic fungicides, however, there are significant risks associated with respective use. The development of resistance by the major postharvest pathogens of fruit and vegetables to a large number of fungicides, the public concerns over pesticide residues either in food or environment and the current European legal restriction of its use (eg. diphenylamine, DPA) directed research efforts to find alternative methods.

The overall objective of the present study was to evaluate the non-chemical alternative of the integrated treatment of biocontrol (Blossom Protect commercial antagonist) and heat (40 °C/40 min) to control rot development, and quality of Rocha pear during postharvest and to evaluate the heat treatment (40 °C/40 min) effect as a raw material alternative decontamination treatment to pulp production.

Two different orchards were evaluated in order to assess the influence of different geographical production sites on fruits native microflora and contamination levels just after harvest (non-treated) and after fungicide treatment (Imazalil).

From the characterization of the Rocha pear native microflora, counts up to 5×10^4 cfu.g⁻¹ in yeasts and moulds (Y&M) and aerobic microorganisms at 30 °C were found, irrespective of geographical production site and fungicide application. Within the counted moulds, *Cladosporium* sp. was morphologically identified as the predominant pathogen in both orchards.

The commercially available Blossom Protect antagonist yeast *Aureobasidium pullulans* as a broad spectrum biocontrol treatment was tested to control rot development and quality of Rocha pear during postharvest. Confirmation of the antagonist was carried out by DNA sequencing and morphological identification.

The *in vitro* efficiency of the antagonist yeast *Aureobasidium pullulans*, at different concentrations (10^4 , 10^5 , 10^6 and 10^8 cfu.L⁻¹) to control the growth of *Cladosporium* sp. was tested. The results suggest that the optimum antagonist concentration to significantly inhibit the pathogen (80% plus) is of 10^8 cfu.L⁻¹.

The *in vivo* efficiency of the antagonist, applied as single (10^8 cfu.L⁻¹) or combined with heat treatment (40 °C / 40 min) applied before the antagonist, to control *Cladosporium* sp. development in infected wounds during storage (60 days, 7 °C) was tested. Fruits treated with the antagonist yeast alone or in combination did not control the development of *Cladosporium* sp. pathogen infected wounds during storage. However, during the simulated

postharvest storage conditions, *Penicillium expansum* was found to be the dominant fungi. To this rot causing pathogen, fruits treated with combination of heat treatment and antagonist yeast showed a lower percentage of infected wounds during the entire storage period, in opposition to the single application of antagonist. These results suggest that the effective infection control caused by the pathogen might be related to the heat treatment alone.

Another *in vivo* assay was carried out, considering as independent variables the antagonist application, as single or combined with heat treatment, and heat treatment single application (40 °C/40 min), to evaluate the treatments effects to reduce postharvest decay of Rocha pear (60 days, 7 °C). The evaluated quality parameters included the determination of pH, soluble solids content (SSC), sensory evaluation (colour and firmness), weight loss, incidence of rots and initial microbial counts.

During the tested period, it was found a lack of effect from the commercial antagonist against native microflora, which was unexpected considering the *in vitro* assays. Heat treatment (single application) had a significant decontamination effect ($\sim 2 \text{ Log}_{10}$) and proved to effectively control (100%) postharvest rot, and no additional effects were observed from treatment combination with the antagonist yeast.

On the other hand, the observed fast quality changes during storage (colour, firmness, pH, SSC, weight loss) promoted by the accelerated storage conditions (7 °C) did not allowed to know the real physiological effects induced by heat under normal storage conditions (0 °C). Nonetheless, from the informal sensory evaluation, heat treated fruits showed to have a higher acceptability due to the absence of rots.

Concerning *Rocha* pear pulp production, the effects of the heat treatment as a raw material eco-friendly decontamination operation were significant to inhibit yeasts & moulds (counts $< 10 \text{ cfu.g}^{-1}$) in contrast to the achieved reduction by sodium hypochlorite ($\sim 2 \text{ Log}_{10}$). However, no additional effect was observed on the pulp quality since this treatment did not influenced the burst of browning reactions upon cellular disruption.

Keywords: Rocha pear; postharvest; biocontrol, heat treatment; *Cladosporium* sp.; quality.

Índice Geral

Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
Abstract.....	iii
Extended Abstract	iv
Índice Geral	vi
Índice de Tabelas	viii
Índice de Figuras	ix
Lista de Abreviaturas	xi
1. Enquadramento Teórico	1
2 Revisão da Literatura	4
2.1 A Pera Rocha	5
2.1.1 Aspetos Nutricionais	5
2.1.2 Produção e Comercialização	5
2.1.3 Alterações Fisiológicas	6
2.2 Doenças de pós-colheita	8
2.3 Estratégias alternativas à utilização de fungicidas de síntese	9
2.3.1 Biocontrolo	9
2.3.2 Tratamentos térmicos moderados	12
2.4 Combinação de tratamentos	13
2.5 Processamento em polpa.....	15
3 Materiais e Métodos	17
3.1 Matéria Vegetal Pera Rocha	18
3.2 Fungo patogénico	18
3.2.1 Preparação do inóculo	18
3.3 Antagonista.....	18
3.3.1 Preparação do antagonista comercial	18
3.3.2 Confirmação das especificações da rotulagem	19
3.3.3 Confirmação da estirpe do antagonista	19
3.4 Métodos analíticos.....	21
3.4.1 Ensaio <i>in vitro</i>	21
3.4.2 Ensaio <i>in vivo</i>	22
4 Desenvolvimento Experimental.....	29
4.1 Efeitos do local de produção e do tratamento fungicida pós-colheita (prática industrial) na microbiota da pera Rocha	30
4.1.1 Objetivos e Delineamento experimental	30
4.1.2 Resultados e discussão	31

4.1.3	Conclusão	32
4.2	Estudo da eficiência do antagonista comercial no controlo da podridão de pera Rocha provocada por <i>Cladosporium</i> sp. (<i>in vitro</i>)	33
4.2.1	Objetivos e Delineamento experimental	33
4.2.2	Resultados e discussão	33
4.2.3	Conclusão	35
4.3	Efeitos da integração de tratamentos - biocontrolo e tratamento térmico moderado - na incidência da podridão de pera Rocha em condições simuladas de armazenamento	36
4.3.1	Objetivos e Delineamento experimental	36
4.3.2	Resultados e discussão	38
4.3.3	Conclusão	42
4.4	Efeitos da integração de tratamentos – biocontrolo e térmico moderado na qualidade de pera Rocha em condições simuladas de armazenagem	43
4.4.1	Objetivos e Delineamento experimental	43
4.4.2	Resultados e discussão	44
4.4.3	Conclusão	54
4.5	Efeitos dos tratamentos selecionados no processamento alimentar – polpas de frutos de pera Rocha	55
4.5.1	Objetivo e Delineamento experimental	55
4.5.2	Resultados e discussão	57
4.5.3	Conclusão	62
5	Conclusões Gerais	63
6	Referências bibliográficas	66
7	Anexos.....	I
	Anexo A	II
	Anexo B	XIII

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classificação do grau de diferença pelo valor de TCD (Drlange, 1994).	23
Tabela 2 - Escalas e respectivos descritores adotados na avaliação dos atributos sensoriais de pera Rocha.	25
Tabela 3 - Identificação do tipo de amostras (fatorial completa a duas variáveis).....	30
Tabela 4 - Percentagem de inibição de <i>Cladosporium</i> sp. após 7 e 14 dias de incubação em MEA e Mpera, para diferentes concentrações de A (10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^8 ufc.g ⁻¹).	34
Tabela 5 - Identificação das amostras e efeitos em avaliação (fatorial incompleta). ...	36
Tabela 6 – Identificação das amostras.	43
Tabela 7 - Registos médios relativos a TSS e pH durante 60 dias de armazenagem (7 °C).	45
Tabela 8 - Registos dos valores percentuais médios de incidência de podridão visível em frutos, avaliados durante 60 dias de armazenagem (7 °C).....	51
Tabela 9- Identificação dos tipos de amostras constituídos e respectivos efeitos.....	55
Tabela 10 - Resultados médios (\pm DP) de pH e TSS dos diferentes tipos de amostras.	58
Tabela 11 - Resultados do índice de escurecimento WI (médias \pm DP), da avaliação visual e registos fotográficos para os diferentes tipos de amostras.	59

Índice de Figuras

Figura 1 - Pera Rocha.	5
Figura 2 - Taxa de respiração de frutos climatéricos e não climatéricos.....	7
Figura 3 - Podridão em frutos de pera Rocha causada por <i>Penicillium expansum</i> e <i>Botrytis cinera</i> , respetivamente.	9
Figura 4 - Principais estratégias com efeito nos frutos para controlo das podridões de pós-colheita.	10
Figura 5 - Principais estratégias com efeito direto e indireto nos patogénicos de pós-colheita.	11
Figura 6 - Perfil de eletroforese de DNA extraído de colónias formadas a partir de diluições de <i>Blossom</i> (C1, C2, C3, C4, C5 e C6), da inoculação de <i>Blossom Protect</i> TM em pó (Bpó) para confirmação da estirpe de <i>Aureobasidium pullulans</i>	20
Figura 7 - Representação dos parâmetros Chroma, Hue e L.*	24
Figura 8 - Efeito do local de produção (Alc e L) e aplicação de Imazalil (I e ST) no teor de a) microrganismos a 30 °C e b) bolores e leveduras nos frutos de pera Rocha.....	31
Figura 9 - Predominância de <i>Cladosporium</i> sp. face a outros microrganismos na contaminação natural dos frutos de pera Rocha.	32
Figura 10 - Relação entre a concentração de antagonista e a percentagem de inibição de <i>Cladosporium</i> sp. após 7 dias de incubação, em MEA e Mpera.....	35
Figura 11 - Relação entre a concentração de antagonista e a percentagem de inibição de <i>Cladosporium</i> sp. após 14 dias de incubação, em MEA e Mpera.....	35
Figura 12 – Diagrama do delineamento experimental para a avaliação dos efeitos da integração de tratamentos – biocontrolo e térmico moderado na incidência da podridão de pera Rocha em condições de armazenamento simuladas.	38
Figura 13 – Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (controlo – C vs A _I , A _L e Top x A) na incidência da podridão visível de frutos de pera Rocha causada por <i>Cladosporium</i> sp., durante 60 dias de armazenagem (7 °C).....	39
Figura 14 – Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (controlo – C vs A _I , A _L e Top x A) na incidência da podridão visível de frutos de pera Rocha causada por outros fungos, durante 60 dias de armazenagem (7 °C).....	39
Figura 15 – Podridão causada por a) <i>Cladosporium</i> spp. e b) <i>Penicillium expansum</i> , respetivamente, em frutos de pera Rocha.....	41
Figura 16 - Diagrama do delineamento experimental para a avaliação dos efeitos da integração de tratamentos - biocontrolo e térmico moderado na qualidade de pera Rocha em condições de armazenamento simuladas.....	44

Figura 17 - Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (controle – C vs TA, Top, e Top x A) nos valores de tonalidade da carepa dos frutos, durante 60 dias de armazenagem (7 °C).	46
Figura 18 - Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (controle – C vs TA, Top, e Top x A) nos valores de WI da polpa dos frutos, durante 60 dias de armazenagem (7 °C).46	
Figura 19 - Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (controle – C vs TA, Top, e Top x A) nos valores de firmeza, durante 60 dias de armazenagem (7 °C).....	47
Figura 20 - Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (controle – C vs TA, Top, e Top x A) nos valores de perda de massa, durante 60 dias de armazenagem (7 °C).....	48
Figura 21 - Análise sensorial dos atributos cor, firmeza e apreciação global (C, TA, Top e TopxA) durante 60 dias de armazenagem (7 °C).	49
Figura 22 - Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (controle – C vs TA, Top, e Top x A) nas contagens de bolores e leveduras	50
Figura 23 - Dendrograma resultante da análise de <i>cluster</i> aos parâmetros em estudo durante a armazenagem.	52
Figura 24 - Diagrama do círculo de correlação (<i>loading plot</i>) entre os componentes principais 1 e 2 obtidos a partir dos dados selecionados.....	53
Figura 25 - Diagrama de correlação (<i>loading plot</i>) entre os componentes principais 1 e 2 obtidos a partir dos dados selecionados.	53
Figura 26 - Diagrama do delineamento experimental para a avaliação o efeito dos tratamentos selecionados no processamento alimentar – polpas de frutos.....	57
Figura 27 - Efeito dos tratamentos de descontaminação parcial HIPO e Top no teor de a) microrganismos a 30 °C e b) bolores e leveduras nos frutos de pera Rocha.....	61
Figura 28 - Efeito da pasteurização de polpas processadas a partir de frutos com descontaminação parcial HIPO e Top no teor de a) microrganismos a 30 °C e b) bolores e leveduras	61

Lista de Abreviaturas

- A – Antagonista comercial *Blossom Protect*TM
- B&L – Bolores e Leveduras
- ca – cerca (*circa*)
- cf.- conforme
- DNA – Ácido desoxirribonucleico (*Desoxyribonucleic acid*)
- dNTPs – desoxirribonucleótidos trifosfato
- DP – Desvio padrão
- DPA – Difenilamina (*diphenylamine*)
- DRBC – *Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar*
- EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
- eg. – Em geral
- g – força gravítica
- GYPA – *Glucose Yeast Extract Peptone Agar*
- MEA – *Malt Extract Agar*
- MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
- Mpera – Meio de agar modificado com incorporação de pera Rocha
- MRD – *Maximum Recovery Diluent*
- PCA – Análise de componentes principais (*Principal Components Analysis*)
- PCR - Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
- Primers* – oligonucleótidos iniciadores
- rpm – rotações por minuto
- SAU – Superfície Agrícola Utilizada
- TA – Tratamento com Antagonista comercial *Blossom Protect*TM
- TBE – Tampão *Tris/Borate/EDTA*
- TCD – Diferença total de cor (*Total Color Difference*)
- Top – Tratamento térmico moderado (40 °C / 40 minutos)

TSS – Teor de Sólidos Solúveis

ufc – Unidades Formadoras de Colônias

VDR – Valor Diário de Referência

WI – Índice de escurecimento (*Whiteness Index*)

1 Enquadramento Teórico

A adoção de novos modelos de produção em pomares de pera Rocha, nomeadamente, o aumento da densidade de plantação e o recurso a sistemas de condução alternativos, têm contribuído para elevar o potencial produtivo, e simultaneamente, obter frutos de elevada qualidade. Contudo, as alterações fisiológicas dos frutos durante o período pós-colheita, especialmente em condições de longa conservação, são com frequência, responsáveis por elevadas perdas económicas. Na pera Rocha, a manifestação de sintomas como o escaldão superficial da epiderme e o acastanhamento interno dos frutos, destacam-se como acidentes fisiológicos cuja prevenção continua a ser alvo de intensa investigação. As alterações fisiológicas dos frutos durante o período pós-colheita acarretam, igualmente, perdas de massa, alterações da composição fitoquímica (e.g. vitaminas e compostos fenólicos) e a depreciação da qualidade sensorial, com especial relevo na componente aromática. As condições de armazenagem, incluindo o controlo dos vários fatores como a temperatura de refrigeração e a concentração gasosa no interior das câmaras são determinantes para garantir a qualidade dos frutos e a respetiva aptidão para a transformação tecnológica. O desenvolvimento de doenças de pós-colheita nos frutos pode igualmente ser responsável pela redução drástica do respetivo período de armazenagem, envolvendo prejuízos elevados e reduzindo as mais-valias na cadeia de conservação, armazenamento e distribuição. *Penicillium expansum* e *Phlyctema vagabunda* (Mari *et al.*, 2010) são referenciados como os principais agentes patogénicos responsáveis por elevadas perdas pós-colheita, em pomóideas. O desenvolvimento de fungos de várias espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochlamys* pode contribuir, para além disso, para elevar o risco de contaminação química do fruto enquanto agentes produtores da micotoxina patulina, cuja presença não é eliminada durante o processamento alimentar. Tradicionalmente, o controlo dos problemas fisiológicos e microbiológicos dos frutos durante o período pós colheita centra-se na aplicação de fungicidas e antioxidantes de síntese química em conjugação com os efeitos da refrigeração e da utilização convencional de atmosferas controladas. No entanto, a crescente proibição no uso de produtos antioxidantes para o controlo do escaldão, nomeadamente a utilização de difenilamina (DPA) (Diretiva 2009/859/CE), tem direcionado a investigação de tratamentos alternativos. As metodologias de atmosfera controlada dinâmica com utilização de níveis oxigénio muito baixos têm demonstrando eficácia para algumas variedades muito suscetíveis ao escaldão (Prange *et al.*, 2010). No entanto a eficiência da aplicação desta técnica exige um conhecimento detalhado da fisiologia dos frutos e um controlo técnico rigoroso das condições de armazenagem, difíceis de implementar. Por outro lado, nos últimos anos têm-se verificado importantes progressos no controlo biológico como método alternativo aos fungicidas de síntese na prevenção de

doenças de pós-colheita de frutos (Oliveira, 2007; Coelho *et al.*, 2003). A utilização do biocontrolo enquanto barreira singular é frequentemente questionada quer pela inconsistência dos resultados quer pela eficácia quando da passagem à escala industrial. No entanto, a combinação do biocontrolo com outros tratamentos constitui uma estratégia importante com resultados promissores (El-Ghaouth *et al.*, 2000; Spotts *et al.*, 2002). A integração do biocontrolo com a aplicação de tratamentos térmicos moderados é disso um exemplo, porquanto a ação do calor promove efeitos de prevenção da deterioração por fungos e de retardamento das alterações fisiológicas durante o período pós-colheita (Lurie, 1998). De salientar que a multiplicidade de regimes tempo-temperatura possíveis depende das espécies vegetais em causa, por forma a proporcionar os efeitos referidos sem induzir danos pelo calor (Lurie, 1998).

Para avaliar os efeitos da integração de tratamentos pós-colheita - biocontrolo e aplicação de calor moderado na conservação de pera Rocha e na respetiva aptidão do fruto para processamento alimentar, foram articulados os seguintes estudos:

IDENTIFICAR a microbiota da pera Rocha responsável pela podridão dos frutos durante o período pós-colheita.

Estudo dos efeitos do local de produção e do tratamento fungicida pós-colheita (prática industrial) na microbiota do fruto.

AVALIAR a integração dos tratamentos – biocontrolo (antagonista comercial *Blossom Protect*TM) e térmico moderado (40 °C / 40 min) na conservação pós-colheita de pera Rocha.

Estudo da eficiência *in vitro* do *Blossom Protect*TM no controlo da podridão provocada por *Cladosporium* sp..

Estudo da integração de tratamentos na incidência da podridão do fruto em condições simuladas de armazenamento.

Estudo da integração de tratamentos na qualidade do fruto em condições simuladas de armazenamento.

AVALIAR o tratamento térmico moderado (40 °C / 40 min) enquanto alternativa à descontaminação com hipoclorito de sódio, prática corrente na indústria, na aptidão dos frutos para processamento em polpas.

Estudo dos efeitos do tratamento térmico na qualidade das polpas de pera Rocha refrigeradas após processamento.

2 Revisão da Literatura

2.1 A Pera Rocha

A pera Rocha (*Pyrus communis* L.) é uma cultivar autóctone com Denominação de Origem Protegida, cuja produção está restrita à “Região Oeste”, numa estreita faixa litoral da qual se destacam os concelhos de Torres Vedras, Alcobaça, Mafra, Caldas da Rainha, Lourinhã, Cadaval e Bombarral (Sousa, 2012). Descoberto pela primeira vez em 1836, o fruto da pereira Rocha destacou-se pelas suas características sensoriais peculiares, representando atualmente 97% da produção nacional de pera (ANP, 2012).

A pera (figura 1) apresenta calibre médio, forma predominantemente redonda ovada e carepa unida na base sobre uma superfície lisa, lustrosa e de cor amarelo claro manchado de rosa ténue do lado do sol. A polpa é caracterizada pela cor branca, textura granulosa e crocante, macia, de sabor doce e de perfume ligeiramente acentuado (Jordão e Armando, 2011).



Fonte: Anuário Vegetal (2006).

Figura 1 - Pera Rocha.

2.1.1 Aspetos Nutricionais

A composição nutricional da pera depende das práticas agrícolas, das condições meteorológicas, e do grau de maturação do fruto. Quando em estado de maturação comercial, e de acordo com os dados disponíveis pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA, 2014), a pera Rocha é uma boa fonte de fibra, importante na dieta alimentar, representando em média 10% do VDR. O elevado teor de água, cerca de 85%, torna-a um excelente diurético indicado para regular a hipertensão arterial e evitar patologias renais. É rica em fósforo, cálcio, 10 e 9 mg.100 g⁻¹, respetivamente, e contém vitaminas do complexo B e C.

2.1.2 Produção e Comercialização

Segundo a legislação da União Europeia, as características e qualidade da pera Rocha são atribuídas à região geograficamente delimitada de produção (Regulamento n.º (CE)

510/2006). O microclima da Zona Oeste, a composição dos solos e a proximidade do mar resultam em condições edafo-climáticas específicas favoráveis às necessidades da árvore da pera Rocha, permitindo que se desenvolva de forma adequada (Regulamento n.º 102/2002/CE).

A decisão da data de colheita é fundamental para a conservação e qualidade do fruto e é definida pela determinação de índices de maturação. Frutos com índice refratométrico entre 11 e 13 °Brix, dureza da polpa entre 5,5 e 6,5 kg.0,5 cm⁻² e acidez de 2 a 3 g.L⁻¹ de ácido málico apresentam as condições ideais para início de colheita (ANP, 2012). Tradicionalmente, a colheita das peras tem início a partir da segunda semana de Agosto, prolongando-se até final de Setembro (Anuário Agrícola, 2013). Para que a pera Rocha chegue ao consumidor no expoente da sua qualidade organolética é necessário que a colheita seja realizada em condições ótimas (Sousa, 2012). Desta forma, para prolongar o tempo de prateleira da pera Rocha, o fruto entra no sistema de frio num prazo máximo de 24 horas após colheita e todo o período de armazenagem decorre em câmaras de refrigeração (ANP, 2012). A sua capacidade de conservação no frio e resistência ao manuseamento permite que a pera esteja disponível no mercado até 8 meses após colheita e aceda ao mercado internacional (Anuário Agrícola, 2013).

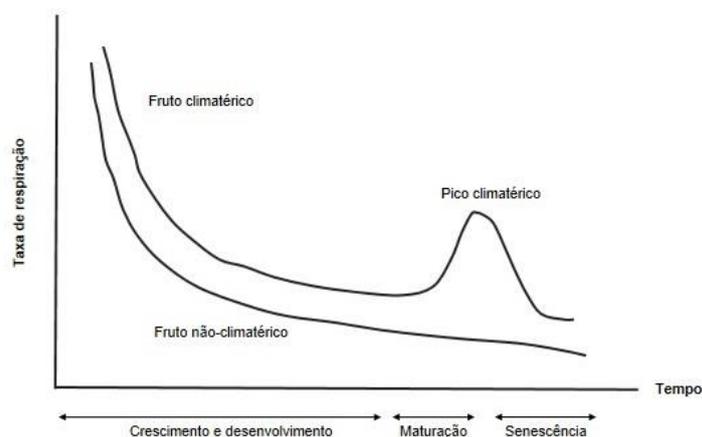
Atualmente, na Região Oeste, a produção de pera Rocha ocupa 10 000 hectares, o correspondente a mais de 95% da SAU da região (ANP, 2012). A capacidade produtiva dos pomares é cerca de 120 a 220 mil toneladas anuais, das quais 30% são destinadas a exportação para o Brasil, França, Reino Unido, Espanha, Polónia, Irlanda, entre outros países (Anuário Agrícola, 2013).

2.1.3 Alterações Fisiológicas

No período pós-colheita, os frutos continuam a respirar e mantêm a sua atividade metabólica. Destacados da árvore, a energia passa a ser obtida pela oxidação de açúcares e ácidos orgânicos, componentes do próprio fruto, com produção de CO₂ e água.

Nos frutos, o comportamento respiratório caracteriza-se por dois padrões distintos (figura 2): diminuição consistente da atividade respiratória com o avanço do processo de maturação na árvore e período pós-colheita – frutos não climatéricos e, após ter-se alcançado um valor mínimo, verifica-se um novo aumento da intensidade respiratória, mais ou menos acentuado, com obtenção de um valor máximo (pico climatérico) seguido de acentuada descida da taxa respiratória – frutos climatéricos.

A intensidade respiratória variável consoante as espécies de fruto é inversamente proporcional à respetiva capacidade de conservação. Assim, taxas respiratórias elevadas são um indicativo de períodos de vida pós-colheita curtos.



Fonte: <http://www.spi.pt>.

Figura 2 - Taxa de respiração de frutos climatéricos e não climatéricos.

A pera é um fruto climatérico, o que lhe permite continuar os processos de maturação após a colheita. Este comportamento permite que a pera seja colhida em fases de maturação prévias à maturação organolética momento em que os frutos manifestam as características de qualidade (sabor e aroma) adequada para consumo em fresco. Durante o pico climatérico desencadeiam-se várias alterações bioquímicas, culminando com os processos de senescência do fruto.

O metabolismo do etileno é determinante no comportamento respiratório e nos processos de maturação com influência no desenvolvimento e comportamento pós-colheita dos frutos. A síntese de etileno é promovida em determinadas etapas de desenvolvimento do fruto, bem como perante condições de *stress* biótico e abiótico (Saltveit, 1999). Elevadas concentrações de etileno induzem alterações fisiológicas incluindo o aumento da atividade respiratória e da transpiração, a degradação da clorofila, o aumento da atividade enzimática, o aumento da permeabilidade celular e a perda da compartimentação celular (Watada *et al.*, 1990).

Durante a transpiração, água contida nos tecidos celulares é evaporada, conduzindo à deterioração do fruto, não apenas pelas alterações de textura mas também pela perda de massa (Pinto *et al.*, 2002). A taxa de transpiração é diretamente afetada pelas condições de armazenagem (temperatura e humidade relativa), embora fatores como a variedade e o estado de maturação também sejam importantes. A perda de água dos frutos pode ser controlada por condições adequadas de armazenagem temperatura baixa e humidade relativa elevada. Para a pera são aconselhados valores de temperatura na gama 0 a 0,5 °C e uma humidade relativa na ordem dos 93 – 95% (CAB, 2014).

A firmeza da polpa é uma característica bastante importante na avaliação da qualidade sensorial da pera Rocha, condicionando a aceitação do produto por parte dos consumidores. A pectina, a celulose e a hemicelulose, são polímeros da parede celular, com influência na firmeza do fruto. As alterações na textura, nomeadamente o amolecimento dos tecidos, resultam da degradação enzimática (celulases, pectinases) destes componentes da parede celular durante o período pós-colheita.

A alteração da cor da epiderme decorrente do processo de maturação dos frutos é resultado da degradação da clorofila e síntese de carotenoides. Este metabolismo é acelerado na presença de etileno, e influenciado por parâmetros como a luz, temperatura e humidade, promovendo o amarelecimento da pera nas fases avançadas de maturação pós-colheita.

2.2 Doenças de pós-colheita

Atualmente, as perturbações pós-colheita provocadas por agentes bióticos e abióticos implicam perdas elevadas na fileira frutícola, representando um dos principais obstáculos à respetiva comercialização e consumo (Sánchez, 2014). A maioria das perdas é atribuída a podridões causadas por fungos patogénicos, podendo alcançar valores de 25% nas diferentes fases da cadeia de conservação, armazenamento e distribuição (Silva *et al.*, 2000). De uma forma geral as podridões manifestam-se durante o período de armazenagem, podendo ser resultado de infeções desenvolvidas no pomar ou estar associadas a ações pós-colheita (Xiao, 2005). Contrariamente aos patogénicos com origem no pomar, a maioria dos patogénicos associados a práticas pós-colheita inadequadas são incapazes de penetrar diretamente através da casca do fruto, necessitando de lesões para penetrarem e instalarem-se. Geralmente as lesões são causadas durante a colheita, transporte, operações de embalamento e processos de armazenagem (Nunes, 2011).

Com base na natureza da infeção, as doenças pós-colheita podem ser agrupadas em duas categorias: doenças provocadas por infeção fúngica do fruto ainda no pomar, causadas por *Sphaeropsis pyriputescens*, *Potrebhiamyces pyri* e *Neofabraea*, e doenças resultantes da infeção de lesões, na colheita, no manuseamento pós-colheita ou no processo de embalamento, da responsabilidade de *Penicillium spp.*, *Mucor piriformis* e *Botrytis cinerea* (Mounir, 2007). Contudo, segundo Sánchez (2014), em Portugal, os agentes patogénicos reconhecidos como causa das doenças com maior incidência em pomóideas são *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea*, responsáveis pela podridão azul e cinzenta, respetivamente (figura 3).



Fonte: XV Encontro Anual da Pera Rocha do Oeste, Ignacio Calavia.

Figura 3 - Podridão em frutos de pera Rocha causada por *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea*, respetivamente.

A redução da incidência de doenças pós-colheita pode ser alcançada atuando ao nível cultural, químico ou biológico. A implementação de medidas profiláticas poderá reduzir de forma significativa a sua incidência, apesar de não conduzir à eliminação total da doença. A manutenção do pomar em bom estado sanitário, realização de podas sanitárias para a remoção de necroses e aplicação regrada de azoto são exemplos de práticas preventivas na pré-colheita. Desta forma, os tratamentos fitossanitários efetuados no pomar, em pré-colheita, destinam-se a proteger os frutos das potenciais infeções (DRADR, 2012).

A aplicação de tratamentos químicos é a abordagem corrente para o controlo de doenças de pós-colheita e distúrbios fisiológicos, na qual se faz uso de agentes antioxidantes e fungicidas de síntese (Hernández-Montiel *et al.*, 2010). Apesar de eficazes, os pesticidas químicos revelam efeitos nefastos sobre o solo, flora, lençóis freáticos, animais e o Homem, desequilibrando as relações simbióticas no ecossistema (Loureiro, 2014) e conduzindo inclusivamente ao desenvolvimento de estirpes fitopatogénicas resistentes.

Aos problemas ambientais e de risco químico para os consumidores acresce ainda a dificuldade na homologação de novos fitofármacos e a proibição de produtos já existentes no mercado, tal como é disso exemplo a difenilamina (DPA) (Diretiva 91/414/CE), tornando urgente desenvolver soluções alternativas. Neste domínio o estudo de diversas estratégias tais como o biocontrolo (Robiglio *et al.*, 2011) e a aplicação de tratamentos térmicos moderados constituem alternativas viáveis ao uso excessivo dos pesticidas de sínteses.

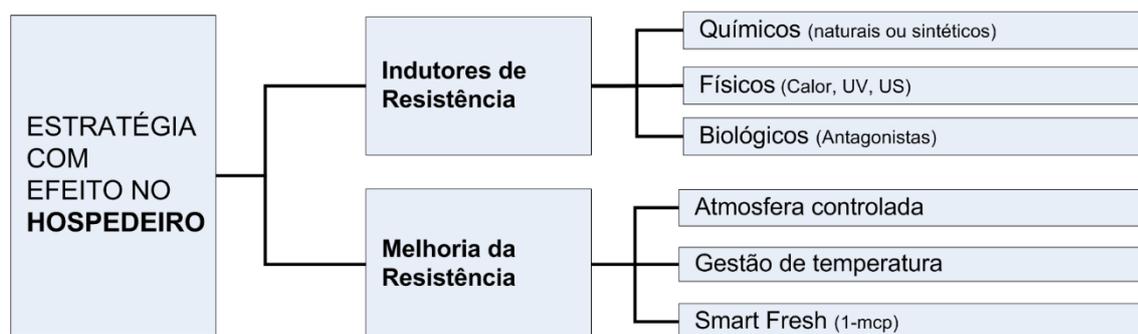
2.3 Estratégias alternativas à utilização de fungicidas de síntese

2.3.1 Biocontrolo

Durante os últimos 20 anos, tem sido desenvolvida intensa investigação de vários agentes de biocontrolo face a diferentes patogénicos responsáveis pelas principais doenças pós-colheita. A maioria destes estudos tiveram como principal objetivo o conhecimento do

mecanismo de ação e eficácia dos agentes de biocontrole. Porém, os produtos biológicos representam ainda uma fração mínima dos fungicidas comercializados mundialmente. Ojiambo e Scherm (2006) estimaram, no final da década de 90, que o valor global das vendas de formulações comerciais de biocontrole era inferior a 0,2% face ao mercado mundial de fungicidas. Contudo, perspectiva-se que as estratégias de controle biológico ganhem expressão devido às exigências do consumidor face às preocupações de segurança alimentar e de preservação do meio ambiente (Mello *et al.*, 2012).

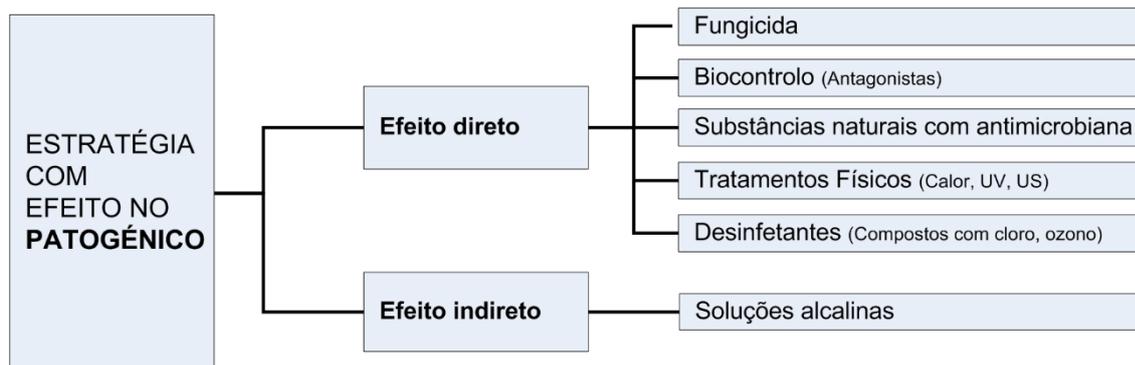
As características inerentes ao hospedeiro influenciam a ação do controle biológico. Nomeadamente nos frutos de pera Rocha, a resistência da epiderme e a textura da polpa constituem importantes fatores que condicionam a propagação do agente patogénico. Face às características intrínsecas podem ser implementadas várias estratégias, bióticas ou abióticas, para induzir e promover a resistência do hospedeiro (figura 4).



Fonte: Conservação de frutas, Marques, 2012.

Figura 4 - Principais estratégias com efeito nos frutos para controlo das podridões de pós-colheita.

Visando o efeito sobre o patogénico, das várias estratégias possíveis, destacam-se três tipos: recurso a produtos sanitários (ozono, compostos clorados, ácido peroxiacético, etc.), aplicação de microrganismos antagonistas e de substâncias naturais com ação antimicrobiana (figura 5).



Fonte: Conservação de frutas, Marques, 2012.

Figura 5 - Principais estratégias com efeito direto e indireto nos patógenos de pós-colheita.

A implementação de controlo biológico, singular ou combinado com outros tratamentos, constitui uma estratégia promissora no combate de pragas, com enquadramento no conceito de agricultura sustentável e integrada (Spadaro *et al.*, 2004).

O conceito de controlo biológico, também designado por biocontrolo, refere-se ao aproveitamento das atividades de um microrganismo para controlar o desenvolvimento de um segundo microrganismo (Yu *et al.*, 2007). Desta forma, o controlo biológico tem por base as relações funcionais entre hospedeiro, antagonista e patógeno, utilizando microrganismos antagonistas para inviabilizar ou reduzir o desenvolvimento dos agentes patogénicos dos frutos, contribuindo assim para a prevenção de doenças pós-colheita (Barreiro, 2008).

Wilson e Wisniewski (1989) descreveram o antagonista ideal como um microrganismo geneticamente estável, eficaz em concentrações baixas, de largo espectro face a vários patógenos e viável em diversos hospedeiros. Deverá possuir necessidades nutricionais simples, facilidade de desenvolvimento em biorreatores, resistência a condições ambientais adversas, não atuar como patógeno para a planta hospedeira e não ser produtor de metabolitos tóxicos para o Homem ser resistente aos pesticidas normalmente utilizados e ser compatível com outros potenciais tratamentos químicos e físicos. As leveduras cumprem melhor as características mencionadas, e, por este motivo, durante os últimos anos, a investigação neste campo tem-se focalizado na seleção e estudo destes microrganismos (Lidon *et al.*, 2012). Segundo Oliveira e Mota (2011), os principais mecanismos de ação das leveduras baseiam-se na competição por espaço ou nutrientes, inibindo o desenvolvimento dos agentes fitopatogénicos sem os eliminar, dominando e colonizando as lesões dos frutos. A este efeito acresce não serem produtores de micotoxinas ou esporos alergénicos. Em virtude da boa taxa de utilização de nutrientes, as leveduras permitem uma rápida

proliferação na qual a produção de polissacáridos extracelulares, restringe o espaço para o desenvolvimento do agente patogénico.

Zhang *et al.* (2007) demonstraram que a utilização da levedura *Cryptococcus laurentii* reduz de 92,5 para 62,5% a infeção de *Penicillium expansum* em pêssegos. No mesmo estudo, resultados similares foram obtidos no controlo da infeção por *Rhizopus stolonifer*. Estudos desenvolvidos por Zhang *et al.* (2008) verificaram inibição total de *B. cinerea* e redução de 20% da incidência de podridão causada por *P. expansum*, utilizando *Rhodotorula glutinis* como agente de biocontrolo no pós-colheita de pera. A aplicação pós-colheita de *Aureobasidium pullulans* em peras permitiu a redução de 88% de infeção por *P. expansum* durante 60 dias de armazenagem (Robiglio *et al.*, 2011). Por outro lado, o antagonista não revelou capacidade de inibição face a *B. cinerea*, reduzindo apenas 22% da incidência. No mesmo estudo, *A. pullulans*, após 120 dias de armazenagem, revelou 40% de incidência de podridão por *P. expansum*, face a valores de 100% para amostras tratadas com fungicidas comerciais. Neste contexto, o fungo leveduriforme *Aureobasidium pullulans* é amplamente utilizado como agente de biocontrolo para prevenção de doenças pós-colheita (Spotts *et al.*, 2002; Vero *et al.*, 2009; Castoria *et al.*, 2001).

Contudo, os resultados destes estudos continuam a ser insatisfatórios em comparação com a eficácia dos fungicidas de síntese (Ferreira-Pinto, *et al.*, 2008). Francesco e Mari (2014) referem que a utilização de agentes de biocontrolo é limitada de acordo com a inconsistência de resultados. Spadaro e Gullino (2005) assinalam ainda os problemas de ineficiência do biocontrolo quando da respetiva utilização em larga escala. Fischer *et al.* (2010) refere que os produtos de biocontrolo apesar de apresentarem uma atividade específica são muito sensíveis a fatores bióticos locais (presença de outros organismos vivos) e abióticos (humidade, pH e temperatura) com influência na respetiva sobrevivência, colonização e multiplicação. Para a maioria dos agentes de biocontrolo o esclarecimento dos mecanismos de atuação e a concentração do número de células necessário para prevenir a doença são segundo Nunes (2011) as principais razões que justificam a respetiva ineficácia. Porém, as limitações encontradas poderão ser ultrapassadas com a integração do biocontrolo com outros tratamentos, complementando ou criando sinergia de efeitos (Leverentz *et al.*, 2000).

2.3.2 Tratamentos térmicos moderados

A aplicação de tratamentos térmicos moderados é também um método utilizado no controlo de doenças pós colheita, tal como a prevenção da deterioração por fungos. Em maçãs, a aplicação do tratamentos térmico de intensidade 38 °C / 4 dias, contribuiu favoravelmente para a redução da deterioração dos frutos provocada por *Penicillium expansum* Link ao longo de 6 meses de armazenagem (0 °C) (Sam *et al.*, 1993). A deterioração provocada

pelo *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. ou pelo *P. expansum* foi parcialmente controlada durante o armazenamento de maçãs Golden *delicious* submetidas a um tratamento térmico equivalente (Fallik, 2004). A estes tratamentos associam-se igualmente efeitos ao nível da fisiologia dos frutos, nomeadamente na diminuição da atividade respiratória, favorável na manutenção da respetiva qualidade pós-colheita (Lurie, 1998). Estes tratamentos envolvem a aplicação de calor por imersão dos produtos em água, vapor ou contacto com correntes de ar quente (Janisiewicz *et al.*, 2010). A gama de intensidade térmica aplicada com benefícios na retenção de fatores da qualidade é muito variável, incluindo a utilização de temperaturas inferiores a 50 °C para uma gama alargada de tempos de tratamento (segundos a horas) e temperaturas da ordem de 90-95 °C durante segundos. A multiplicidade de regimes tempo-temperatura possíveis é limitada pela promoção dos efeitos pretendidos na qualidade dos produtos, sem induzir danos pelo calor (Lurie, 1998). As respostas fisiológicas induzidas pelos tratamentos são igualmente dependentes das cultivares, local de produção, práticas agrícolas e estado de maturação (Fallik, 2004).

No que se refere à atividade respiratória, a resposta de cada fruto é individual e, depende das condições de pré-colheita, da idade fisiológica e da intensidade do tratamento (binómio temperatura / tempo). Durante a aplicação de calor a taxa de respiração pode aumentar no início do tratamento e diminuir, ou mesmo cessar, com o período de exposição. O efeito de inibição é reversível, verificando-se a recuperação da atividade respiratória após os produtos serem restituídos à temperatura ambiente (Lurie, 1998). Contudo, na generalidade, após tratamento verifica-se diminuição na taxa respiratória face aos frutos não tratados. A diminuição da atividade respiratória alcançada ou o atraso no restabelecimento dos níveis iniciais desta foram respostas igualmente induzidas por estes tratamentos (Lurie, 1998).

Em frutos suscetíveis ao amolecimento um dos efeitos benéficos observados refere-se à manutenção ou incremento da firmeza induzida pelo calor, justificada pela alteração da atividade das enzimas envolvidas na degradação da parede celular (da pectinametilsterase e das poligalacturases) (Rico *et al.*, 2007).

Outro exemplo favorável prende-se com a diminuição da suscetibilidade ao escurecimento enzimático, induzida pelos tratamentos térmicos, justificada pelo redirecionamento das vias metabólicas para a síntese de proteínas de choque térmico (Salveit, 2000).

2.4 Combinação de tratamentos

Tal como se referiu anteriormente a prevenção de doenças pós-colheita através da utilização de agentes de biocontrolo não proporciona por si só efeitos consistentes sendo o espectro de ação limitado em comparação com os fungicidas sintéticos. De facto os

microrganismos antagonistas apresentam grande variabilidade na sua eficácia, cujo ação, apenas de proteção, diminui com frequência durante a maturação, não permitindo erradicar infecções preexistentes ou incipientes e/ou prevenir a esporulação de patogênicos fúngicos (El Ghaouth *et al.*, 2002).

Uma das estratégias para potencializar o biocontrole de doenças de pós-colheita reside na integração com outros tratamentos: biológicos, químicos ou físicos (Usall *et al.*, 2008).

De entre as diferentes possibilidades destacam-se os tratamentos térmicos tendo em conta a respetiva eficácia no controlo de doenças pós-colheita, a facilidade de implementação e os custos reduzidos (Palou *et al.*, 2008).

As principais razões que justificam os benefícios desta combinação de tratamentos são: (1) o efeito de descontaminação parcial induzida pelo calor pode promover a maior adesão do agente de biocontrole à superfície do fruto; (2) o calor aumenta a resistência do fruto contra fungos (Garcia *et al.*, 1995); (3) cria-se a possibilidade de minimizar a intensidade térmica por forma a prevenir os danos fisiológicos no fruto (Wszelaki e Mitcham, 2003).

Neste domínio são diversos os estudos nos quais a combinação com tratamentos térmicos resulta na complementaridade e/ou na sinergia de efeitos com vista ao controlo de podridões e à manutenção da qualidade dos frutos na pós-colheita.

Morangos submetidos à combinação de tratamento térmico com imersão em água (55 °C / 30 s) e de biocontrole (suspensão de *Cryptococcus laurentii*; 10⁸ ufc.mL⁻¹) demonstraram uma diminuição significativa da incidência à podridão causada por *Rhizopus* comparativamente a frutos submetidos à aplicação singular dos tratamentos (Zhang *et al.*, 2007). Os autores justificaram a complementaridade observada pelos efeitos de descontaminação parcial induzidos pelo calor permitirem uma ação mais rápida e eficaz do agente de biocontrole.

Resultados similares foram obtidos por Zhong *et al.* (2010) ao testar a utilização de dois antagonistas, *Candida membranaefaciens guillermondii* ou *Pichia*, em combinação com tratamentos térmicos face à podridão causada por *Botrytis cinerea* em frutos de tomateiro. Neste estudo os frutos foram previamente submetidos ao tratamento por imersão em água a 42 °C durante 40 minutos, seguido dos tratamentos de biocontrole. Nos tecidos do fruto os efeitos do tratamento térmico não influenciaram o desenvolvimento dos agentes de biocontrole nas lesões de tomate mas conduziram a um aumento significativo das enzimas fenilalanina amónia-liase, quitinases e β-1,3 glucanase. Nos tecidos este mecanismo de defesa bioquímica em resposta ao stress calor foi assinalado como sendo responsável pelo aumento da eficácia no controle da podridão do fruto.

Quando usado sozinho, um isolado de *Aureobasidium pullulans* (PL5) proporcionou uma redução na incidência à podridão causada por *Monilinia laxa* em pêssegos para valores de 25,8%, em comparação com 74,2% obtidos com as amostras testemunha. A aplicação combinada com tratamentos térmicos (55 °C por 50 s) alcançou uma eficiência superior reduzindo a incidência da podridão para valores de 17,5%. Por outro lado a o efeito singular do tratamento térmico conduziu a uma incidência da doença em cerca de 30%. Estes resultados sugerem o aumento da eficácia do antagonista na combinação com o tratamento térmico (Zhang *et al.*, 2010).

Em limão, a aplicação do biocontrolo (*Pantoea agglomerans*) seguido de um tratamento com ar quente a 33 °C durante 6 horas demonstrou efeitos aditivos e benéficos no controlo da podridão causada por *Penicillium digitatum* (Torres *et al.*, 2007).

Em pêssegos, o tratamento térmico (50 °C durante 2 h) revelou-se eficaz na redução de podridões causadas *Monilinia fructicola* com origem no campo, mas não demonstrou eficácia nas podridões que se instalam após tratamento e antes da armazenagem. A ação preventiva na integração deste tratamento aplicado previamente ao biocontrolo (*Bacillus subtilis*) proporcionou um controlo mais efetivo da podridão de frutos inoculados com *M. fructicola* (Casals *et al.*, 2012).

2.5 Processamento em polpa

As regras do mercado e, em particular, as preocupações do consumidor (saúde e ambientais) são decisivas na orientação dos sistemas de produção alimentar as quais apontam para as seguintes áreas de intervenção genérica: alimentos seguros e saudáveis, amigos do ambiente e com prazos de vida útil adequados à comercialização. Neste sentido, as principais áreas da investigação direcionam-se para a avaliação da qualidade das matérias-primas alimentares, e para a inovação das tecnologias de processamento, visando minimizar os perigos e riscos envolvidos, otimizando, em paralelo, a qualidade comercial e sensorial finais.

O consumo regular de hortofrutícolas afigura-se de grande adequação estratégica e oportunidade na promoção da saúde e na prevenção da doença, reforçando a aposta na investigação e desenvolvimento tecnológico no sector de produtos hortofrutícolas.

O grande incremento na oferta de produtos hortofrutícolas (HF) foi proporcionado pelo aparecimento da cadeia de frio, permitindo a distribuição de produtos de natureza perecível e de carácter sazonal. O desenvolvimento de instalações e transportes frigoríficos, o aparecimento de culturas de estufa, as evoluções tecnológicas das explorações agrícolas e

a globalização de mercados são outros exemplos que contribuíram para o aumento significativo da oferta destes produtos aos vários sectores da população.

Os consumidores são cada vez mais exigentes, dando ainda preferência a produtos alimentares que contenham teores reduzidos de aditivos. Estas motivações têm orientado a indústria alimentar no sentido do fabrico de produtos saudáveis, nutricionalmente equilibrados e de conveniência - de fácil transporte, preparação e consumo.

As polpas de frutos são produtos constituídos pela parte comestível dos mesmos, com ou sem casca, sem sementes, que podem apresentar pedaços (cortados ou em rodela) ou serem esmagados e cuja estabilidade é assegurada pela cadeia de frio (refrigeração ou congelação). A tecnologia de fabrico de polpas de frutos apresenta um grande desenvolvimento no Brasil, sendo este o maior produtor mundial. Portugal regista um interesse crescente neste tipo de produtos, disponíveis principalmente no mercado de importação. Esta realidade justifica o interesse na produção nacional e a aposta na investigação e implementação de tecnologias de fabrico adequadas.

No processamento de frutas em polpas, a manutenção da qualidade em fresco das matérias-primas é crítica a partir do momento em que se compromete a integridade dos tecidos vegetais e se misturam os conteúdos celulares, nomeadamente após as operações de descasque, corte e trituração. A conseqüente mistura dos conteúdos celulares põe em contacto enzimas e substratos estimulando uma diversidade de reações de oxidação enzimática responsáveis pela deterioração da qualidade, tais como o escurecimento das polpas. Este tipo de reações promove igualmente o consumo de compostos fitoquímicos (eg. fenólicos e vitaminas) diminuindo o valor funcional do produto. Acresce que nestes produtos pasteurizados não é prevista uma completa inativação microbiana, sendo a deterioração microbiológica igualmente estimulada a partir do momento em que se disponibilizam os substratos celulares.

A aplicação tratamentos térmicos moderados às matérias-primas tal como se referiu anteriormente (ponto 2.3.2) cumpre objetivos de descontaminação da microbiota promovendo ainda alterações fisiológicas nos frutos com efeitos benéficos na retenção dos atributos da qualidade em fresco. Nesta ótica a implementação destes tratamentos na tecnologia de fabrico de polpas pode representar um contributo importante enquanto metodologia de descontaminação alternativa minimizando o recurso à utilização de agentes químicos normalmente empregues nas operações de lavagem dos frutos (eg. hipoclorito de sódio).

3 Materiais e Métodos

3.1 Matéria Vegetal Pera Rocha

A pera rocha (*Pyrus communis* L. variedade Rocha) utilizada neste estudo foi fornecida pela empresa Campotec-Comercialização e Consultoria Hortofrutícolas, S.A, no âmbito do projeto Bio4Fruit.

Durante a recepção, a pera, foi sujeita a inspeção visual eliminando frutos com lesões causadas por fatores de natureza fisiológica e mecânica, de forma a constituir lotes de calibre homogêneo. A matéria-prima, colhida em estado de maturação, foi armazenada em condições de refrigeração 5 ± 1 °C (câmara Cryocell – RS600SE) até realização dos ensaios.

3.2 Fungo patogénico

3.2.1 Preparação do inóculo

O inóculo do fungo patogénico foi preparado segundo a Norma EN 1275 (2005).

Isolou-se o fungo de uma pera infetada e promoveu-se o seu crescimento em rampa em meio de cultura *Malt Extract Agar* (MEA), à temperatura de incubação de 25 °C durante 9 a 11 dias até à sua aplicação no ensaio. A biomassa desenvolvida na rampa foi recolhida com uma ansa, diluída na solução diluente *Maximum Recovery Diluent* (MRD), homogeneizada e filtrada num pequeno funil esterilizado preenchido com algodão hidrófilo estéril.

Para determinar a concentração da suspensão obtida, efetuaram-se diluições decimais e plaqueou-se por incorporação em MEA. As placas inoculadas foram incubadas a 30 °C, não invertidas, devido à formação de esporos, durante 72 horas. Devido ao risco do micélio do fungo filamentosos invadir as placas e impossibilitar a contagem, efetuou-se a primeira contagem às 42-48 h.

Decorrido este tempo, realizou-se nova contagem, reportando os resultados em ufc.mL⁻¹.

3.3 Antagonista

3.3.1 Preparação do antagonista comercial

O antagonista foi obtido através da hidratação de *Blossom Protect*TM, um agente biotecnológico alternativo ao uso de fitofarmacêuticos. *Blossom Protect*TM tem como principal agente ativo *Aureobasidium pullulans*, levedura ubíqua isolada de folhas de macieira.

A solução de *Blossom Protect*TM foi preparada de acordo com as informações presentes no manual de utilização do fabricante, respeitando as concentrações de aplicação. Pesou-se 1,5 g de *Blossom* e adicionou-se água esterilizada até perfazer 1 L, mantendo-se em agitação magnética até total dissolução.

3.3.2 Confirmação das especificações da rotulagem

Foi preparada uma solução de *Blossom Protect*TM de acordo com o ponto 3.3.1.

Para determinar a concentração da solução obtida, efetuaram-se diluições decimais, em triptona sal. As diluições foram plaqueadas por espalhamento em *Glucose Yeast Peptone Agar* (GYPA) e *Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol* (DRBC), em triplicado. As placas inoculadas foram incubadas a 25 °C, durante 5 dias.

Decorrido este tempo realizou-se a contagem, reportando os resultados em ufc.L⁻¹.

3.3.3 Confirmação da estirpe do antagonista

Foram preparadas sucessivas diluições da solução de *Blossom* e inoculou-se 0,1 mL em placa de Petri com meio DRBC para contagem das células e identificação do antagonista. Após incubação, durante 7 dias a 25 °C, a morfologia celular das colónias formadas foi observada ao microscópio.

O *Aureobasidium pullulans* é uma levedura dimórfica, podendo apresentar morfologia leveduriforme ou pseudo-hifas, semelhantes às hifas características dos fungos filamentosos, mediante diferentes condições ambientais (Zullo *et al.*, 2010). As colónias observadas apresentavam cor variável entre branco, bege, aspeto liso e brilhante com extremidades irregulares e presença de hifas, sugerindo a sua caracterização como *Aureobasidium pullulans*. Para confirmação da estirpe o exame morfológico foi complementado com sequenciação do DNA.

O DNA foi extraído segundo uma adaptação do método descrito por Baleiras *et al.* (2005). Foi recolhida uma ansa de biomassa e homogeneizada em 500 µL de água estéril com auxílio do vortex. As amostras foram congeladas a -80 °C durante 2 horas e meia, e posteriormente colocadas em banho seco a 100 °C durante 5 minutos, para promover a lise celular.

A amplificação do DNA realizou-se por PCR (Bio Rad, icycler), com os *primers* ITS (5' – TCC GTA GGT GAA CCT GC GG – 3') e ITS4 (5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3') como descrito por Esteve-Zarzoso *et al.* (1999). Para um volume final de reação de 25 µL utilizaram-se 10 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, tampão PCR 1x, 0,5 µM de cada *primer* e 1U de Taq polimerase. As condições de PCR foram as seguintes: desnaturação térmica a 95 °C durante 5 minutos; 35 ciclos de: 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 52 °C e 120

segundos a 72 °C, e finalizou-se o processo com tratamento a 72 °C durante 10 minutos para terminar o alongamento das moléculas de DNA por ação da enzima Taq polimerase.

A separação dos fragmentos de DNA efetuou-se segundo a técnica de eletroforese em gel de agarose. O gel foi preparado a uma concentração de 1% de agarose e com tampão TBE 0,5x. Em cada poço foram introduzidas alíquotas de 10 µL (8 µL de DNA amplificado e 2 µL de tampão de carga TBE 6x). Aplicou-se, durante 60 minutos, uma corrente elétrica de 75 V através do gel, obtendo-se o perfil representado na figura 6.

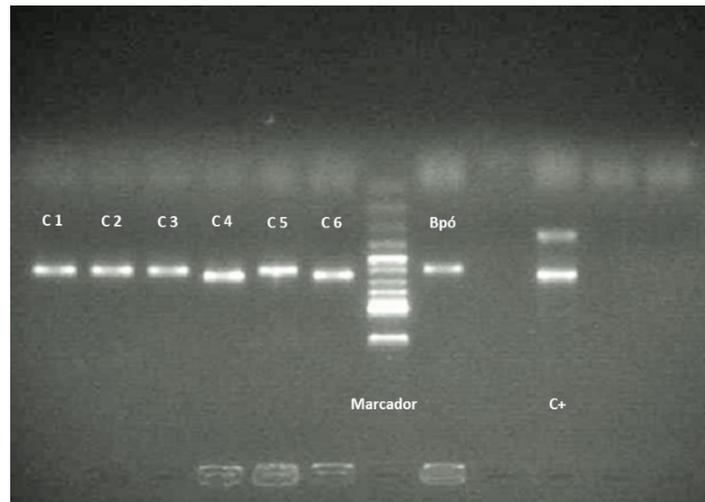


Figura 6 - Perfil de eletroforese de DNA extraído de colônias formadas a partir de diluições de *Blossom* (C1, C2, C3, C4, C5 e C6), da inoculação de *Blossom Protect™* em pó (Bpó) e controle positivo (C+: *Saccharomyces uvarum* ATCC 9080) para confirmação da estirpe de *Aureobasidium pullulans*.

A purificação do DNA realizou-se de acordo com protocolo do fabricante do Jetquick Spin Column. Adicionou-se 400 µL de solução de hidrocloreto de guanidina e isopropanol (H1) a 100 µL da solução de DNA extraído, centrifugando a 12000 g durante 1 minuto e descartou-se o sobrenadante. Ao *pellet* obtido adicionou-se 500 µL de solução contendo etanol, NaCl, EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e Tris-HCl. Centrifugou-se a 12000 g durante 1 minuto, descartando o sobrenadante, e repetiu-se a centrifugação a velocidade máxima. A purificação concluiu-se adicionando 50 µL de água estéril ao novo *pellet* e centrifugando a 12000 g durante 2 minutos.

Para confirmação da estirpe do antagonista sequenciou-se o DNA da amostra correspondente à inoculação direta do *Blossom Protect™* em pó (Bpó). As sequências obtidas foram alinhadas no GenBank utilizando o programa BLAST para a identificação (www.ncbi.nlm.nih.gov). O resultado da sequenciação confirmou que a estirpe presente no antagonista comercial é *Aureobasidium pullulans* estirpe LCC13.

3.4 Métodos analíticos

3.4.1 Ensaios *in vitro*

Otimização da concentração de A – capacidade de inibição

A avaliação da capacidade de inibição *in vitro* foi realizada adotando o método descrito por Hernández-Montiel *et al.* (2010) e Etebarian *et al.* (2005) e o meio de cultura de agar modificado com incorporação de pera Rocha (Mpera) que foi preparado segundo Janisiewicz *et al.* (2010).

Preparou-se a suspensão de antagonista, diluindo 1,5 g de *Blossom Protect*TM em 1000 mL de água, correspondendo a uma concentração inicial a 1×10^8 células. L⁻¹. Efetuaram-se diluições decimais para obtenção das concentrações de 10^8 , 10^6 , 10^5 e 10^4 ufc.L⁻¹. Alíquotas de 30 µL de cada suspensão de levedura foram distribuídas uniformemente, com semeador, em placas contendo MEA ou Mpera, e incubadas durante 24 horas a 25 °C. Como controle utilizou-se água destilada estéril.

A partir da borda de uma colônia de *Cladosporium* sp. com 7 dias de crescimento em MEA, com uma sonda estéril retirou-se uma porção de colônia com ca de 5 mm de diâmetro, e colocou-se no centro das placas inoculadas com antagonista. As placas foram incubadas a 25 °C e o diâmetro da colônia foi medido periodicamente por 14 dias.

O diâmetro da cada colônia foi definido como a média de 3 medidas independentes determinadas com paquímetro digital (Powerfix profit, Z 22855). A percentagem de inibição do desenvolvimento foi calculada segundo a equação 1.

$$N = \frac{a - b}{a} \times 100 \quad \text{(Eq. 1)}$$

N: % de inibição do desenvolvimento

a: diâmetro da colônia de *Cladosporium* sp. não inibido

b: diâmetro da colônia de *Cladosporium* sp. em meio com antagonista

Cada ensaio foi repetido três vezes.

Tratamento estatístico de resultados

O tratamento estatístico dos resultados foi efetuado com recurso ao *software* Statistica v8.0 (StarSoft, Inc., 2007), por análise de variâncias (ANOVA), utilizando o teste Tukey ($p < 0,05$) para separação das médias.

3.4.2 Ensaios *in vivo*

Determinação da cor CIELab

Os valores colorimétricos da carepa e polpa foram determinados no sistema CIELab (iluminante C) com o auxílio do colorímetro CR300 Minolta colorimeter. A calibração do colorímetro efetuou-se segundo o padrão de referência ($L^*=97,10$; $a^*=0,08$; $b^*=1,80$). Os resultados expressam a média de 5 medições por amostra.

Os parâmetros L^* , a^* , b^* obtiveram-se por leitura direta do equipamento, onde o valor L^* representa a luminosidade da amostra, traduzindo a variação da tonalidade escuro/claro, numa escala de 0 a 100 (correspondendo ao branco absoluto e preto absoluto, respetivamente). A cromaticidade é indicada pelo parâmetro a^* , que varia entre o vermelho (+60) e verde (-60), e pelo parâmetro b^* que varia entre amarelo (+60) a azul (-60). As coordenadas de a^* e b^* assumem valores próximos de 0 para cores neutras ou semelhantes, tal como branco, preto ou cinza.

Para além dos parâmetros L^* , a^* , b^* é possível determinar a saturação ou cromaticidade da cor (C^* , *Chroma*), a tonalidade ($^\circ h$, Hue), o índice de escurecimento (WI, *Whiteness Index*) e a diferença total da cor (TCD, *Total Colour Difference*). O índice de escurecimento é apenas calculado para determinação da cor da polpa.

O parâmetro C^* (Eq. 2) é uma medida do croma ou da saturação da cor e representa a distância ao eixo neutro (figura 7). O atributo de cor $^\circ h$ (Eq. 3 a 5) pode ser definido como o ângulo ($0^\circ - 360^\circ$) que transmite a tonalidade de cor. Os ângulos formados variam pelos eixos dos parâmetros a^* e b^* , definindo assim a tonalidade da cor, sendo que os ângulos entre $0^\circ - 90^\circ$ correspondem aos vermelhos, laranjas e amarelos; de 90° a 180° os amarelos, amarelo-verdes e verdes; de 180° a 270° os verdes, cianos e azuis; de 270° a 360° os azuis, púrpuras, magentas e novamente os vermelhos (Dafne, 2014).

$$C^* = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})} \quad \text{(Eq. 2)}$$

$$^\circ h = \frac{\left(\arctg \frac{b^*}{a^*}\right)}{6,2832} \times 360, \text{ se } a^* > 0 \text{ e } b^* > 0 \quad \text{(Eq. 3)}$$

$$^\circ h = 180 + \frac{\left(\arctg \frac{b^*}{a^*}\right)}{6,2832} \times 360, \text{ se } a^* < 0 \quad \text{(Eq. 4)}$$

$$^\circ h = 360 + \frac{\left(\arctg \frac{b^*}{a^*}\right)}{6,2832} \times 360, \text{ se } a^* > 0 \text{ e } b^* < 0 \quad \text{(Eq. 5)}$$

O parâmetro WI (Eq. 6) permite avaliar a evolução visual do escurecimento, traduzindo a maior ou menor presença de material branco na superfície dos hortofrutícolas (Boline *et al.*, 1991).

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad \text{(Eq. 6)}$$

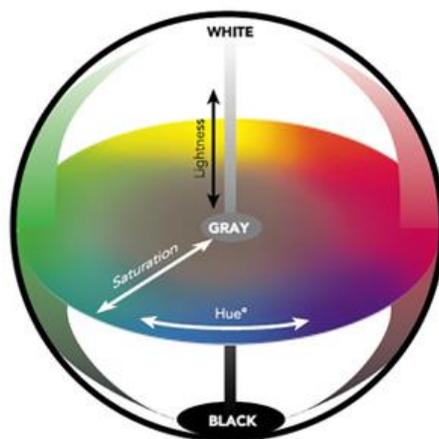
A diferença total da cor (TCD) (Eq. 7) é um parâmetro que traduz as variações da cor entre uma dada amostra e uma amostra referência. Neste estudo a amostra referência é a amostra controle (C) no tempo de armazenamento 0 (considerando esta com um valor nulo; L_0^* , a_0^* , b_0^*).

$$TCD = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad \text{(Eq. 7)}$$

O valor numérico deste parâmetro poder ser correlacionado com a percepção sensorial das diferenças de cor através da classificação de Drlange (1994), expresso na tabela 1.

Tabela 1 - Classificação do grau de diferença pelo valor de TCD (Drlange, 1994).

TCD	Grau de diferenças
0 - 0,2	Impercetível
0,2 – 0,5	Muito pequena
0,5 – 1,5	Pequena
1,5 – 3	Distinta
3 – 6	Muito distinta
6 – 12	Grande
> 12	Muito grande



Fonte: <http://www.digitalmedia.tech.uh.edu>.

Figura 7 - Representação dos parâmetros Chroma, Hue e L.*

Determinação da Firmeza

A firmeza foi determinada efetuando um teste de penetração num texturómetro TA.HDi Texture Analyzer (Stable Microsystem Ltd), equipado com uma célula de carga de 50 kg. O teste de penetração foi realizado a uma velocidade de $1\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ com uma distância de penetração de 10 mm, com recurso a uma sonda de inox de 2 mm de diâmetro. As curvas de força distância foram registadas e a firmeza tomada como o pico de força máxima (N) das curvas. A determinação foi realizada à temperatura ambiente, havendo primeiro estabilização da temperatura dos frutos a analisar. Para cada fruto realizaram-se medições em três pontos da região equatorial. Os resultados foram expressos como a média de 9 determinações por tipo de amostra.

Determinação da perda de massa

A perda de massa foi determinada a partir da pesagem de 5 frutos em cada momento de análise (Mettler PJ3000). Após pesagem os frutos foram restituídos nas mesmas condições de armazenagem. A perda de massa foi determinada relativamente ao peso inicial da amostra recolhida no dia 0, correspondendo ao início do armazenamento (Eq. 8).

$$(\%) \text{ Perda de massa} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (\text{Eq. 8})$$

P_i: Peso inicial

P_f: Peso final

Determinação do pH

O valor de pH foi medido no homogeneizado de pera em água destilada (1:1, p:p), utilizando um potenciômetro (Crison Micro pH 2001). Os valores médios resultaram da média de 3 determinações por amostra.

Determinação do teor em sólidos solúveis (TSS)

O teor em sólidos solúveis foi determinado no sumo obtido por filtração do fruto, utilizando um refratômetro digital (DR-A1). Os resultados são expressos em °Brix (percentagem de sólidos solúveis por 100 g de produto), resultantes da média de 3 determinações por amostra.

Análise sensorial

As amostras foram sujeitas a avaliação sensorial informal (prova de preferência) por um painel não treinado de 6 provadores. Utilizaram-se escalas de 1 a 5, para a avaliação dos atributos cor, firmeza e apreciação global das amostras. Os descritores utilizados para a definição da escala são apresentados na tabela 2. As amostras foram servidas à temperatura ambiente.

Tabela 2 - Escalas e respectivos descritores adotados na avaliação dos atributos sensoriais de pera Rocha.

Escala	Atributo Sensorial		
	Cor	Firmeza	Apreciação Global
1	Verde	Muito firme	Muito bom
2	Moderadamente verde	Firme	Bom
3	Ligeiramente amarelo	Moderadamente firme	Suficiente (limite da aceitabilidade)
4	Amarelo	Mole	Mau
5	Amarelo escuro	Muito mole	Muito mau

Contagem de microrganismos a 30 °C

A determinação de microrganismos a 30 °C foi realizada de acordo com a norma ISO 4833:2003. A amostra foi preparada segundo a norma ISO 6887-4:2003, efetuando, em condições de assepsia, a recolha de casca de 3 peras por amostra. Após homogeneização da casca obtida, pesaram-se 10 g por amostra. Os resultados foram expressos em ufc.g⁻¹ de casca de pera.

Contagem de bolores e leveduras

A determinação de bolores e leveduras foi realizada de acordo com a norma ISO 21527-1:2008. A amostra foi preparada segundo a norma ISO 6887-4:2003, conforme descrito no ponto “Contagem de microrganismos a 30 °C”.

Identificação morfológica de fungos filamentosos

Os fungos responsáveis pela podridão dos frutos foram observados e classificados segundo as suas características morfológicas e culturais, utilizando meio de cultura adequado de forma a favorecer a sua reprodução e desenvolvimento, permitindo ainda a expressão correta das características a estudar.

Partindo de uma colónia, com o auxílio de uma agulha esterilizada à chama, e mediante as técnicas de manipulação asséptica usuais em Microbiologia, procedeu-se à colheita de uma porção de colónia a isolar e inoculou-se num ponto central das placas contendo os diferentes meios de cultura seletivos, DRBC e GYPA. Efetuaram-se observações diárias das placas, avaliando a pureza da colónia através da uniformidade do aspeto apresentado após incubação e ausência de desenvolvimento de outros microrganismos.

Durante a incubação observaram-se características culturais e terminado o período de incubação efetuaram-se análises microscópicas das características morfológicas.

Nas características culturais avaliou-se a velocidade de crescimento, a textura do talo, a cor do talo (pigmentação do talo e coloração dos conídios), cor do reverso da cultura, presença de pigmento difusível, odor, presença de exsudado (gotas de transpiração do micélio aéreo).

Nas características morfológicas, observadas ao microscópio ótico (Leitz laborlux 12), procedeu-se ao estudo do micélio (presença/ausência de septos nas hifas, cor, ornamentação das paredes, dimensões, modo de ramificação), da natureza dos órgãos diferenciados e do seu conteúdo (forma, cor, dimensões, textura das paredes, ornamentação, arranjo espacial) e ao estudo biométrico das células/estruturas esporogénicas e dos esporos.

A identificação foi realizada de acordo com as características observadas com recurso a manuais com chaves de identificação: *Toxiques dans l'Alimentation* (Moreau, 1969) e *Compendium of Soil Fungi* (Domsch, *et al.*, 1980).

Aplicação do tratamento térmico moderado (Top)

Os frutos foram mantidos a 40 °C durante 40 minutos, em banho termostaticado (W600, Memmert) controlado com termopar (52 D, Fluke). Os frutos retirados do banho foram

arrefecidos em gelo fundente. Removeu-se o excesso de água com papel absorvente e os frutos foram restituídos às condições de armazenagem (5 °C).

Lesão dos frutos

O ferimento dos frutos realizou-se de acordo com o método descrito por Robiglio *et al.* (2011). Na zona equatorial de cada pera, fez-se uma lesão, utilizando uma sonda estéril de 3 mm de profundidade e diâmetro.

Antagonista comercial A – aplicação por imersão

Os frutos foram totalmente imersos em suspensão de antagonista (10^8 ufc.mL⁻¹) (preparada de acordo com o ponto 3.3.1). Decorrido um minuto, foram retirados e colocados em placas de vidro de forma a permitir a secagem natural do fruto à temperatura ambiente durante cerca de 30 minutos (Hernández-Montiel *et al.*, 2010). Após total absorção da suspensão, as peras foram dispostas em sacos microperfurados de polipropileno biorientado (38 x 36 cm) e armazenadas a 7 °C, durante dois meses (câmara Cryocell – RS600SE).

Cada condição foi repetida 24 vezes (6 frutos para 4 tempos de análise), realizando tomas para análise nos dias 0, 15, 45 e 60.

Antagonista comercial A - aplicação direta na lesão

A aplicação localizada de A realizou-se segundo o método descrito por Janisiewicz *et al.* (2010). Em cada lesão, com o auxílio de uma micropipeta foram aplicados 25 µL da suspensão de antagonista preparada de acordo com o descrito no ponto 3.3.1.

Inoculação com *Cladosporium* spp.

A partir da suspensão preparada no ponto 3.2.1 procedeu-se à inoculação dos frutos com o agente patogénico. Cada ferida foi inoculada por adição de 25 µL da suspensão de conídios de *Cladosporium* sp.. Nas amostras com A aplicado diretamente na lesão decorreu um período de espera de 90 minutos antes da aplicação de *Cladosporium* sp.. Para controlo do teste, utilizaram-se frutos cujas feridas foram apenas inoculadas com o fungo de deterioração.

Após a inoculação, as peras foram dispostas em tabuleiros identificados e armazenadas a 7 °C, durante dois meses (câmara Cryocell – RS600SE).

Cada pera constituiu um replicado e cada condição de ensaio foi replicada 36 vezes. As peras foram examinadas, efetuando-se registos fotográficos da propagação da infeção aos dias 0, 15, 45 e 60.

A incidência do fungo foi calculada como o número de lesões infetadas sobre o número total de lesões.

Tratamento estatístico de resultados

O tratamento estatístico dos resultados foi efetuado com recurso ao *software* Statistica v8.0 (StarSoft, Inc., 2007), por análise de variâncias (ANOVA), utilizando o teste LSD, e Tukey ($p < 0,05$) para separação das médias nos ensaio 3 e 4, respetivamente.

4 Desenvolvimento Experimental

4.1 Efeitos do local de produção e do tratamento fungicida pós-colheita (prática industrial) na microbiota da pera Rocha

4.1.1 Objetivos e Delineamento experimental

No crescente quadro de limitação da utilização de pesticidas de síntese, tradicionalmente utilizados no controlo de doenças de pós-colheita (ex. Imazalil) e visando a conservação prolongada da pera Rocha em condições de refrigeração, é imprescindível apostar no estudo da integração de tratamentos (biocontrolo, calor, UV, US) como estratégia alternativa, cujos efeitos singulares não configuram por si só uma opção ecológica.

A podridão com origem microbiológica, nomeadamente por fungos filamentosos, é responsável pela perda da qualidade da pera Rocha durante a armazenagem pós-colheita. Para adequar tratamentos pós-colheita é necessário identificar qual/quais o(s) grupo(s) responsável(eis) pela podridão dos frutos. Assim, são objetivos primários deste trabalho:

Caracterizar a microbiota (grupos de microrganismos contaminantes e respetivos teores) em função do local de produção (Alcobaça e Lourinhã).

Avaliar a eficácia da aplicação do tratamento fungicida – Imazalil, sobre a carga microbiana (independentemente do local Alcobaça e Lourinhã), após tratamento e durante 15 dias de armazenagem em refrigeração, em condições simuladas.

Para cumprir estes objetivos foram utilizados frutos de pera Rocha das campanhas 2013 e 2014, e de calibre 65/75 mm, tendo sido o lote constituído segundo os critérios referidos (*cf* procedimento 3.1).

Foram constituídos 4 tipos de amostras de 5 frutos cada, a partir de frutos provenientes dos 2 locais de produção considerados – Alcobaça (Alc) e Lourinhã (L), com e sem tratamento de Imazalil (tabela 3). Para cada amostra realizaram-se as seguintes determinações: contagem de microrganismos a 30 °C, contagem de bolores e leveduras e, identificação morfológica, ao género, dos fungos predominantes. Cada amostra foi analisada em triplicado, após a receção das mesmas no laboratório e ao fim de 15 dias de armazenagem (5 °C). Para os frutos da campanha de 2014 (local de produção não definido e sem tratamento) foram apenas determinadas as contagens de microrganismos a 30 °C, contagem de bolores e leveduras e realizada a identificação morfológica, ao género, dos fungos predominantes.

Tabela 3 - Identificação do tipo de amostras (fatorial completa a duas variáveis).

Id amostra	Local	Tratamento
Alc_I	Alcobaça	Imazalil
Alc_SI		Sem Imazalil
L_I	Lourinhã	Imazalil
L_SI		Sem Imazalil

4.1.2 Resultados e discussão

Eficácia da aplicação do tratamento fungicida

Na figura 8 são apresentados os resultados da caracterização da microbiota dos frutos, relativos às contagens de microrganismos a 30 °C e de Bolores e Leveduras, das amostras A_ST, A_I, L_ST e L_I, nos dias 0 e 15 de armazenagem a 5 °C.

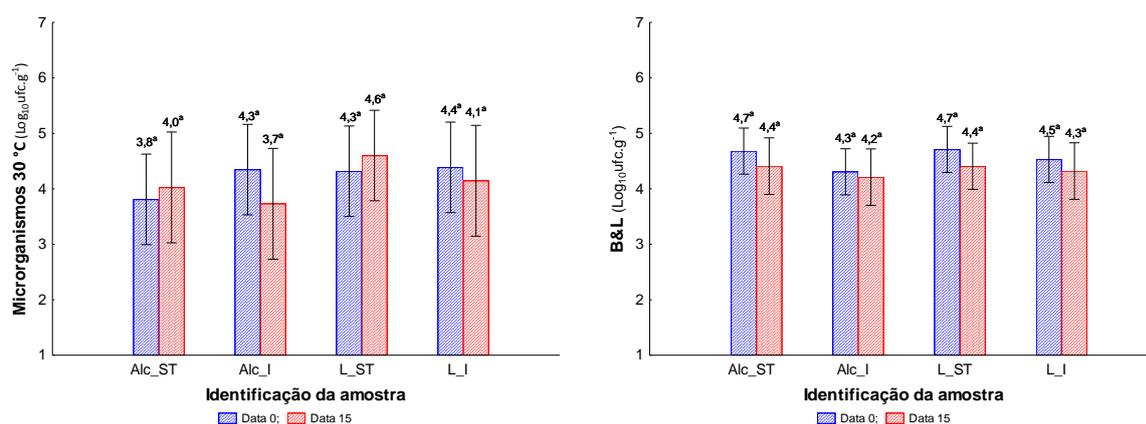


Figura 8 - Efeito do local de produção (Alc e L) e aplicação de Imazalil (I e ST) no teor de a) microrganismos a 30 °C e b) bolores e leveduras nos frutos de pera Rocha. Bandas de variação correspondem aos intervalos de confiança a 95%. Letras diferentes revelam diferenças significativas a 95% (Teste Tukey).

A contaminação inicial dos frutos de pera Rocha foi de ca de $5,3 \times 10^4$ ufc.g⁻¹ para microrganismos a 30 °C, e de $4,7 \times 10^4$ ufc.g⁻¹ para bolores e leveduras, não diferindo com o local de produção nem aplicação do tratamento Imazalil. Na campanha de 2014 verificaram-se contagens semelhantes de ca de $4,8 \times 10^3$ e $3,4 \times 10^3$ ufc.g⁻¹ para microrganismos a 30 °C e bolores e leveduras, respetivamente. O nível de contaminação microbiológica encontra-se dentro da gama apresentada em estudos similares efetuados em pera Rocha (Abreu, 2010).

Da figura 8 verifica-se que as contagens relativas ao grupo de microrganismos a 30 °C foram, em todas as situações, semelhantes às do grupo de bolores e leveduras.

Os grupos microbiológicos analisados não apresentam variações significativas após 15 dias de armazenagem dos frutos (5 °C). Acresce que o tratamento com Imazalil não influenciou, contrariamente ao esperado, as referidas contagens no período considerado (dias 0 e 15).

Caraterização da microbiota

Na identificação dos fungos filamentosos (campanha 2013 e 2014) verificou-se a predominância do género *Cladosporium* sp. (figura 9) e a presença pontual dos géneros *Penicillium* sp., *Alternaria* sp., e *Aspergillus flavus*. Este fungo, *Cladosporium* sp., foi isolado para utilização subsequente no ensaio de biocontrolo.

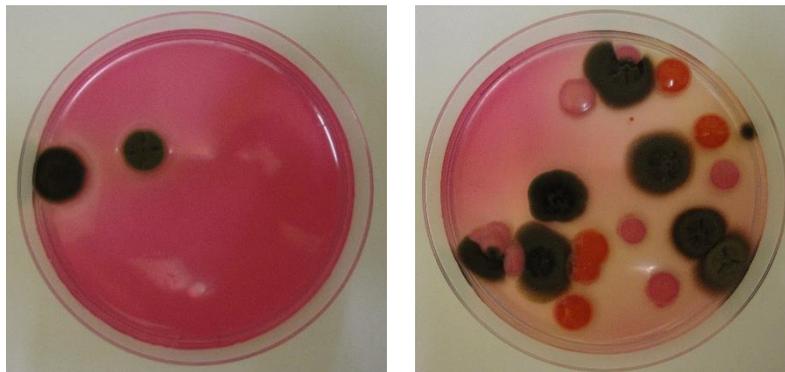


Figura 9 - Predominância de *Cladosporium* sp. face a outros microrganismos na contaminação natural dos frutos de pera Rocha.

4.1.3 Conclusão

O fungicida Imazalil revelou ser um tratamento pós-colheita não eficaz na redução da contaminação microbiológica inicial dos frutos, e sem efeito durante armazenagem (5 °C, 15 dias).

O local de produção mostrou não influenciar os grupos de microrganismos, e respetivos níveis de contaminação, tendo-se identificado o género *Cladosporium* sp. como fungo patogénico prevalecente nos frutos de pera Rocha.

4.2 Estudo da eficiência do antagonista comercial no controlo da podridão de pera Rocha provocada por *Cladosporium* sp. (*in vitro*)

4.2.1 Objetivos e Delineamento experimental

O biocontrolo através da utilização de agentes antagonistas face ao desenvolvimento de podridões causada por fungos patogénicos constitui uma das alternativas em consideração à utilização de pesticidas síntese.

Para avaliar a eficácia do *Blossom Protect*TM (A) (antagonista comercial) no controlo da podridão de pera Rocha efetuaram-se testes *in vitro* com os seguintes objetivos:

Identificar a concentração de A responsável por uma inibição efetiva de *Cladosporium* sp.;

Verificar se a disponibilidade de nutrientes proporcionado pela pera Rocha introduz alteração na ação de A.

Numa primeira fase efetuou-se a confirmação das especificações da rotulagem do antagonista *Blossom Protect*TM, através da contagem do número de células viáveis por grama de produto (10^8 ufc.g⁻¹), conforme procedimento descrito em 3.3.2. Posteriormente foram testadas, em triplicado, quatro concentrações de A a partir da concentração aconselhada no rótulo (10^8 ufc.L⁻¹) e respetivas diluições (10^4 , 10^5 , 10^6 ufc.L⁻¹), utilizando dois meios de cultura: MEA e meio de agar modificado (Mpera) por forma a mimetizar a disponibilidade de nutrientes proporcionada pelo fruto (*cf* procedimento 3.4.1). A percentagem de inibição de *Cladosporium* sp. (*cf* procedimento 3.4.1) foi calculada ao fim de 7 e 14 dias de incubação.

4.2.2 Resultados e discussão

Na contagem do número de células viáveis do produto comercial obteve-se uma concentração de *ca* de 7×10^8 células viáveis de *Aureobasidium pullulans* por grama de produto, observando-se, assim, uma concentração ligeiramente inferior da que consta no rótulo do produto (de 5×10^9 .g⁻¹).

Na tabela 4 apresentam-se os resultados da inibição (%) do antagonista *Aureobasidium pullulans* face ao desenvolvimento de *Cladosporium* sp. para as diferentes concentrações testadas.

Tabela 4 - Percentagem de inibição de *Cladosporium* sp. após 7 e 14 dias de incubação em MEA e Mpera, para diferentes concentrações de A (10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^8 ufc.g⁻¹).

Id amostra	Inibição de <i>Cladosporium</i> sp. (%)	
	7 dias	14 dias
MEA [10^4]	-0,5 ± 1,1	-9,5 ± 2,8
MEA [10^5]	19,2 ± 6,5	44,5 ± 4,6
MEA [10^6]	47,4 ± 9,1	59,7 ± 8,9
MEA [10^8]	80,2 ± 2,3	84,1 ± 1,6
Mpera [10^4]	7,6 ± 4,4	20,0 ± 11,5
Mpera [10^5]	14,6 ± 7,9	59,5 ± 11,0
Mpera [10^6]	51,7 ± 4,2	73,6 ± 0,4
Mpera [10^8]	78,5 ± 1,3	88,0 ± 0,6

No meio Mpera verificou-se um efeito de inibição de *Cladosporium* sp. crescente com o aumento da concentração de A. Em meio de cultura MEA esta situação foi observada a partir da concentração de 10^5 ufc.g⁻¹. Para a concentração de 10^4 ufc.g⁻¹, verificou-se, ao contrário, desenvolvimento do agente patogénico. Este comportamento pode ser explicado por uma menor capacidade competitiva de *A. Pullulans*, em baixas concentrações, face ao contaminante *Cladosporium* sp.. O facto de esta situação não se ter verificado em Mpera pode estar relacionada com a disponibilidade de nutrientes e com a adaptabilidade de *A. Pullulans* relativamente a Mpera, já que a estirpe utilizada foi isolada de folhas de Pomóideas.

A correlação entre a inibição de *Cladosporium* sp. e a concentração de antagonista apresenta um comportamento linear para o tempo 7 e 14 de incubação tal como se apresenta nas figuras 10 e 11.

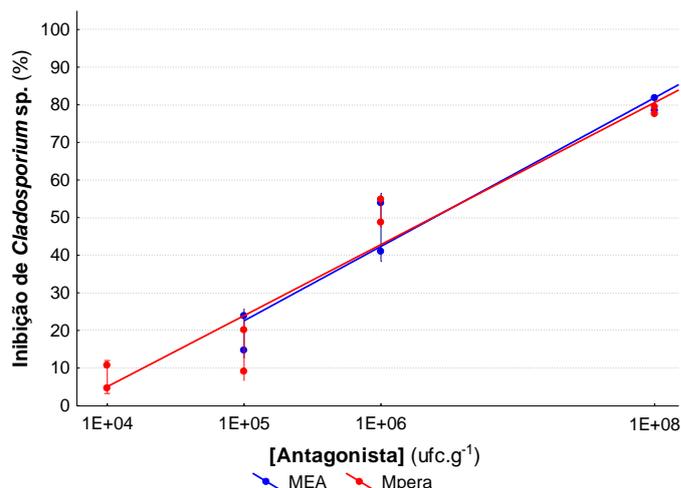


Figura 10 - Relação entre a concentração de antagonista e a porcentagem de inibição de *Cladosporium sp.* após 7 dias de incubação, em MEA e Mpera.

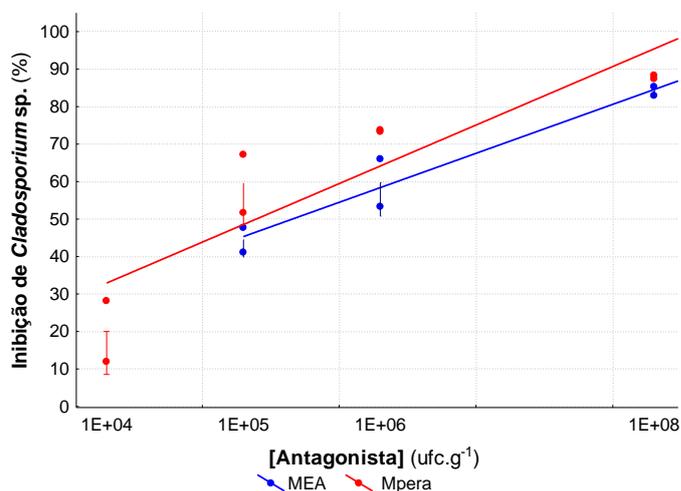


Figura 11 - Relação entre a concentração de antagonista e a porcentagem de inibição de *Cladosporium sp.* após 14 dias de incubação, em MEA e Mpera.

Os coeficientes de correlação linear, muito similares em todas as condições testadas (meios de cultura e tempo de incubação), demonstram que o efeito do A não depende da natureza química dos nutrientes disponibilizados nos meios de cultura testados e que a respectiva ação é efetiva (ca de 80%) na matriz pera Rocha.

4.2.3 Conclusão

O antagonista *Blossom Protect*TM tem potencialidade para controlar o desenvolvimento de *Cladosporium sp.* em pera Rocha, pelos efeitos demonstrados *in vitro*.

4.3 Efeitos da integração de tratamentos - biocontrolo e tratamento térmico moderado - na incidência da podridão de pera Rocha em condições simuladas de armazenamento

4.3.1 Objetivos e Delineamento experimental

Avaliar os efeitos integrados dos tratamentos: biocontrolo (A) (concentração selecionada) e tratamento térmico moderado (Top) (condição referenciada na literatura) no controlo da podridão pós-colheita causada por *Cladosporium* sp. durante a armazenagem (7 °C).

Para cumprir o objetivo proposto foram constituídos quatro tipos de amostras (tabela 5), cuja preparação envolveu diferentes fases (agrupamento de frutos em blocos casualizados; aplicação de biocontrolo e de tratamento térmico moderado e, inoculação com *Cladosporium* sp.) tal como se esquematiza na figura 12.

Tabela 5 - Identificação das amostras e efeitos em avaliação (fatorial incompleta).

Tipo de amostra	Id amostra
Peras submetidas à infeção provocada com <i>Cladosporium</i> sp.	C
Peras submetidas a A aplicado por mergulho + infeção provocada com <i>Cladosporium</i> sp.	A_i
Peras submetidas a A aplicado na lesão + infeção provocada com <i>Cladosporium</i> sp.	A_L
Peras submetidas a Top + A aplicado na lesão + infeção provocada com <i>Cladosporium</i> sp.	Top x A

Id amostra	Efeitos em avaliação
C	Capacidade de desenvolvimento de <i>Cladosporium</i> sp. por contaminação artificial
A_i	Desempenho do <i>Blossom Protect</i> TM aplicado por imersão
A_L	Desempenho do <i>Blossom Protect</i> TM aplicado na lesão
Top x A	Desempenho do efeito combinado do tratamento térmico e do <i>Blossom Protect</i> TM em frutos lesionados

A partir do lote inicial constituíram-se, aleatoriamente, 4 sub-lotes, para os quais se procedeu à seleção visual dos frutos segundo os critérios descritos no procedimento 3.1.

A aplicação de A (por imersão ou aplicação direta na lesão) e da integração Top x A, realizou-se em conformidade com os procedimentos descritos no ponto 3.4.2. Os frutos foram lesionados com auxílio de sonda cilíndrica estéril ($\varnothing = 3$ mm) a 3 mm de profundidade, na zona equatorial e, infetados na lesão através da adição de uma suspensão

de conídeos de *Cladosporium* sp., numa concentração de 10^3 ufc.mL⁻¹. Foram constituídos triplicados.

As amostras (dimensão: 36 frutos) foram acondicionadas em tabuleiros de plástico (24 x 24 cm) e armazenadas em condições de refrigeração (*Cryocell*; 7 °C) ao longo de 60 dias. Foi contabilizado o número de peras por amostra, com podridão visível (independentemente do agente patogénico) e efetuados registos fotográficos de todas as amostras, nos dias 0, 15, 45 e 60 de armazenagem, tendo em conta que os frutos com podridão visível são excluídos da armazenagem subsequente.

As incidências da podridão visível e da podridão por *Cladosporium* sp. foram calculadas através das equações 9 e 10, respetivamente. Foi ainda considerado o cálculo da incidência de podridão causada por outros fungos pela diferença dos valores percentuais anteriores.

$$\% \text{ incidência da podridão visível} = \frac{X}{\text{dimensão da amostra}} \times 100 \quad \text{(Eq. 9)}$$

Sendo X o número de frutos com podridão visível.

$$\% \text{ incidência de } Cladosporium = \frac{Y}{\text{dimensão da amostra}} \times 100 \quad \text{(Eq. 10)}$$

Sendo Y o número de frutos com podridão causada por *Cladosporium* sp..

Nota: Os valores de incidência de podridão apresentados nas figuras 13 e 14 são obtidos através das percentagens cumulativas da incidência de podridão.

Efeitos da integração de tratamentos – biocontrole e térmico moderado na incidência da podridão de pera Rocha em condições de armazenamento simuladas

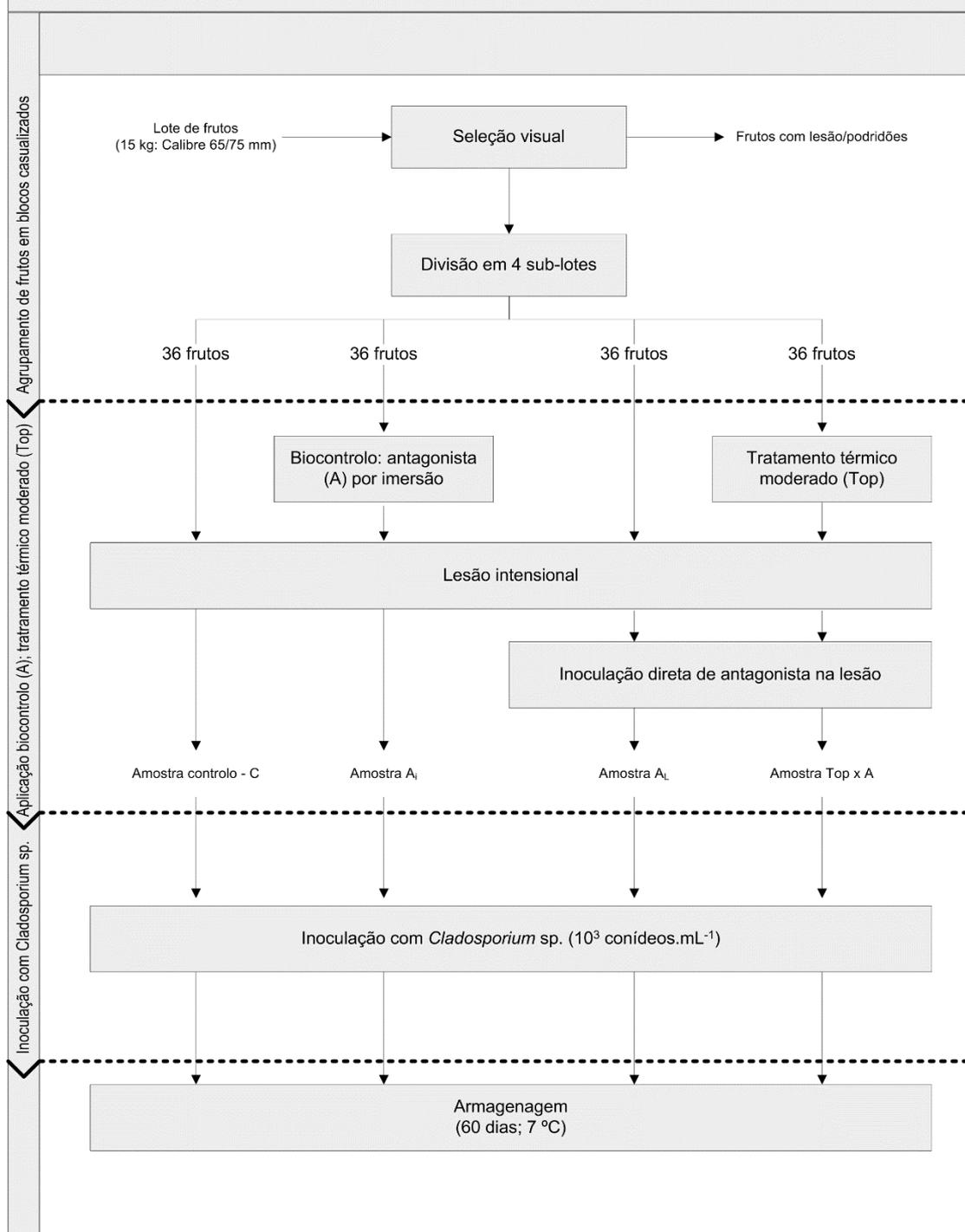


Figura 12 – Diagrama do delineamento experimental para a avaliação dos efeitos da integração de tratamentos – biocontrole e térmico moderado na incidência da podridão de pera Rocha em condições de armazenamento simuladas.

4.3.2 Resultados e discussão

Incidência da podridão visível

Nas figuras 13 e 14 são apresentadas, respectivamente, as incidências de podridão visível (%) causadas por *Cladosporium* sp. e por outros fungos, relativas às amostras submetidas

ao tratamento com antagonista (aplicação por imersão e localizada, A_I e A_L, respetivamente) e à integração da aplicação de calor e antagonista (Top x A) face a amostras de peras não tratadas e submetidas a infeção intencional (controlo – C) durante a armazenagem (60 dias, 7 °C).

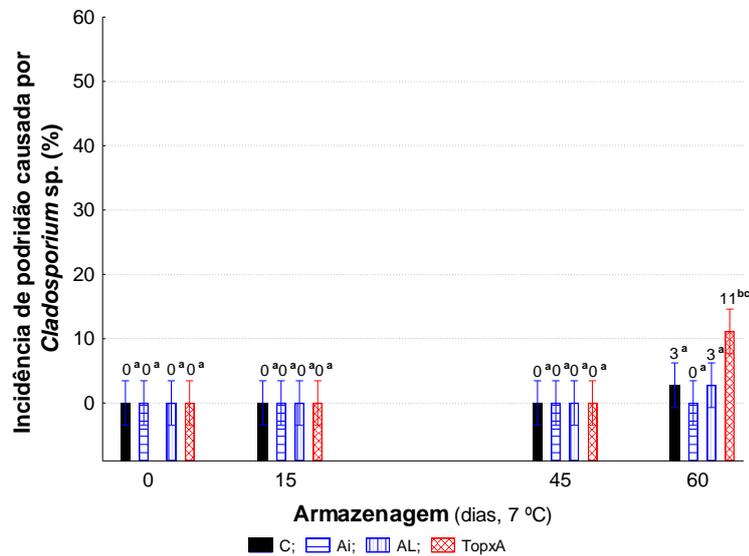


Figura 13 – Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (controlo – C vs A_I, A_L e Top x A) na incidência da podridão visível de frutos de pera Rocha causada por *Cladosporium* sp., durante 60 dias de armazenagem (7 °C). Bandas de variação correspondem aos intervalos de confiança a 95%. Letras diferentes revelam diferenças significativas a 0,95 (Teste LSD).

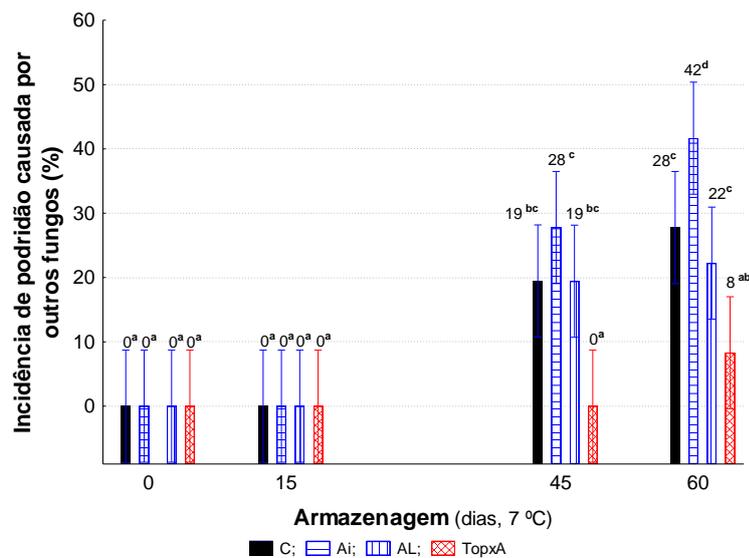


Figura 14 – Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (controlo – C vs A_I, A_L e Top x A) na incidência da podridão visível de frutos de pera Rocha causada por outros fungos, durante 60 dias de armazenagem (7 °C). Bandas de variação correspondem aos intervalos de

confiança a 95%. Letras diferentes revelam diferenças significativas a 0,95 (Teste LSD).

Os frutos submetidos ao antagonista *Blossom Protect*TM, aplicação singular por imersão (A_I) e por inoculação direta na lesão (A_L) apresentaram no 60º dia, valores de incidência de podridão visível inferior a 3%, sem diferenças ($p < 0,05$) face ao controlo (C). A ação de A *in vivo* não demonstrou eficiência, ao contrário do que se verificou nas condições *in vitro* (ponto 4.2).

A ausência de efeito de A quando da passagem às condições *in vivo* foi igualmente verificado noutros estudos (Spadaro *et al.*, 2004; Nunes, 2011) sendo justificada por diversas razões, tais como, a complexidade dos mecanismos de inibição envolvidos, a alteração das condições de temperatura impostas na armazenagem e tempo insuficiente para uma adequada adesão do antagonista aos tecidos do fruto. Acresce ainda que as formulações comerciais podem perder atividade designadamente as misturas liofilizadas.

Da identificação morfológica realizada constatou-se que *Penicillium expansum* foi o agente patogénico responsável pelas podridões dos frutos cuja incidência é apresentada na figura 14.

Nas amostras A_I, A_L e C o aparecimento de podridões causadas por *Penicillium expansum*, verificou-se ao fim de 45 dias, sem diferenças ($p > 0,05$) entre si (28, 19 e 19%, respetivamente). Ao fim de 60 dias as amostras A_L denotaram um aumento ($p < 0,05$) na incidência de *Penicillium expansum* (de 28 para 42%) verificando-se nas restantes amostras (A_I e C) a manutenção ($p > 0,05$) dos mesmos níveis de contaminação (22 e 28%, respetivamente), sem diferenças significativas entre si.

Estes resultados demonstram a ausência de efeito singular do *Blossom Protect*TM no controlo da podridão da pera Rocha, independentemente da forma como foi aplicado (A_I, A_L) e do agente patogénico – *Cladosporium* sp. e / ou *Penicillium expansum*, apesar de ser um antagonista de largo espectro.

Esta situação foi verificada noutros trabalhos (Huang *et al.*, 1995; Robiglio *et al.*, 2011). Os autores referem que em frutos de pera e laranja, utilizando o antagonista *Aureobasidium pullulans* e *Pseudomonas glathei*, a ineficiência da respetiva aplicação singular prende-se com o insucesso da adesão do agente antagonista antes da inoculação do patogénico (no mínimo 10 horas de intervalo entre aplicações) e com a capacidade de desenvolvimento da estirpe a baixa temperatura (condições habituais de armazenagem).

Os frutos de pera Rocha submetidos à integração (Top x A) demonstraram ausência de podridões visíveis até 45º dia (figuras 13 e 14), independentemente do agente patogénico

envolvido (*Cladosporium* sp. e *Penicillium expansum*). No entanto, estas amostras verificaram uma incidência de 11% de podridão causada por *Cladosporium* sp. no 60º dia, superior ($p < 0,05$) à verificada nas amostras A_L e C (de 3%).

Por outro lado, nestas amostras (Top x A) (figura 14) os níveis de contaminação causada por *Penicillium expansum* ao 60º dia (8%) foram significativamente inferiores aos verificados nas restantes amostras (C, A_I e A_L, respetivamente de 28, 42 e 22%). Assim a integração Top x A mostrou ser efetiva no controlo do aparecimento de podridão causada por *Penicillium expansum* e sem efeito no desenvolvimento do *Cladosporium* sp..

A prevalência das podridões causada por *Penicillium expansum* verificada em todo o tipo de amostras perante a contaminação intencional com *Cladosporium* sp. imposta nas condições testadas revela a incapacidade deste patogénico dominar a microbiota epífita na pera Rocha.

A diminuição significativa da microbiota atribuída aos efeitos do Top revelou-se determinante no controlo do aparecimento de podridões. Zhang *et al.* (2007) obtiveram resultados similares na aplicação singular do tratamento térmico no controlo de podridão causado por *Rhizopus* em pêsegos.

Registos fotográficos

Os registos fotográficos das amostras ao longo da armazenagem constam no Anexo A. Destes selecionaram-se dois exemplos para demonstrar as diferenças manifestadas pelo tipo de podridão causadas por *Cladosporium* sp. (a) e *Penicillium expansum* (b) em pera Rocha (figura 14).

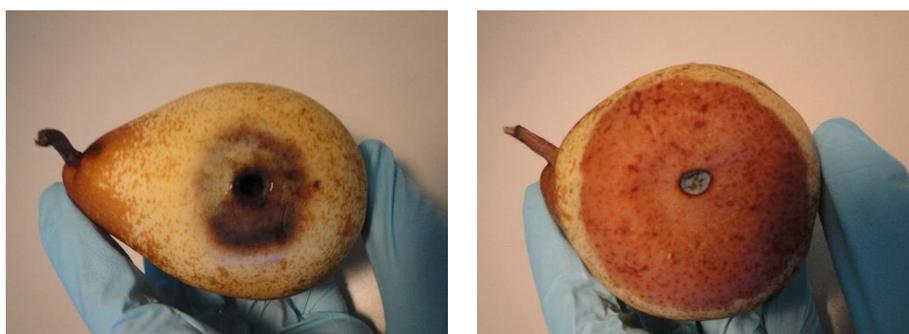


Figura 15 – Podridão causada por a) *Cladosporium* spp. e b) *Penicillium expansum*, respetivamente, em frutos de pera Rocha.

Na caracterização da infeção por *Cladosporium* sp (amostra A_I no 45º dia) verificou-se que os tecidos infetados apresentaram uma zona circular com acentuado escurecimento e com ausência de exsudação. Após o corte do fruto foi ainda possível observar a formação de uma esfera preta com textura compacta. Os tecidos infetados por *Penicillium expansum*

desenvolvem podridões húmidas, de cor ligeiramente acastanhada e de contorno regular (Sousa *et al.*, 2005).

4.3.3 Conclusão

O controlo verificado da podridão causada por *Penicillium* em pera Rocha na integração de tratamentos (amostras Top x A) nas condições testadas, em contraste com a ineficiência dos tratamentos com antagonista (independentemente do tipo de aplicação), sugere que os efeitos sejam apenas da responsabilidade do tratamento térmico. Por outro lado, e ao contrário do previsto, assistiu-se a uma alteração do agente patogénico durante a armazenagem pós-colheita em que o desenvolvimento de *Penicillium* prevaleceu sobre *Cladosporium* sp. identificado como dominante na microbiota do fruto pós colheita (ponto 4.1).

4.4 Efeitos da integração de tratamentos – biocontrole e térmico moderado na qualidade de pera Rocha em condições simuladas de armazenagem

4.4.1 Objetivos e Delineamento experimental

Avaliar a eficácia da integração do antagonista comercial (A) com o tratamento térmico moderado (Top) no controlo da qualidade do fruto, independentemente da microbiota responsável pela podridão.

Para cumprir o objetivo proposto constituíram-se quatro tipos de amostras (do tipo fatorial completa) (tabela 6), preparadas em duas etapas (agrupamento de frutos em blocos casualizados e aplicação dos tratamentos propostos) tal como se apresenta na figura 16.

Tabela 6 – Identificação das amostras.

Tipo de amostra	Id amostra
Peras sem tratamento	C
Peras submetidas a antagonista aplicado por mergulho	TA
Peras submetidas a tratamento térmico moderado	Top
Peras submetidas à integração de tratamentos A e Top	Top x A

Para a constituição aleatória dos sub-lotes procedeu-se à seleção visual a partir de 15 kg de pera Rocha, segundo os critérios descritos no procedimento 3.1. A aplicação de A e Top e da respetiva integração (Top x A), realizou-se em conformidade com os procedimentos descritos (3.4.2), dando origem a 4 tipos de amostras. As mesmas foram armazenadas em condições de refrigeração (7 °C, câmara *Cryocell*) tendo nos dias 0, 15, 45 e 60 de armazenagem sido avaliados os seguintes atributos: cor CIELab (carepa e polpa), pH, TSS (°Brix), firmeza, perda de massa (%), análise sensorial informal, incidência de podridão (%) e, no dia 0 foram ainda efetuadas as contagens microbiológicas dos grupos de bolores e leveduras.

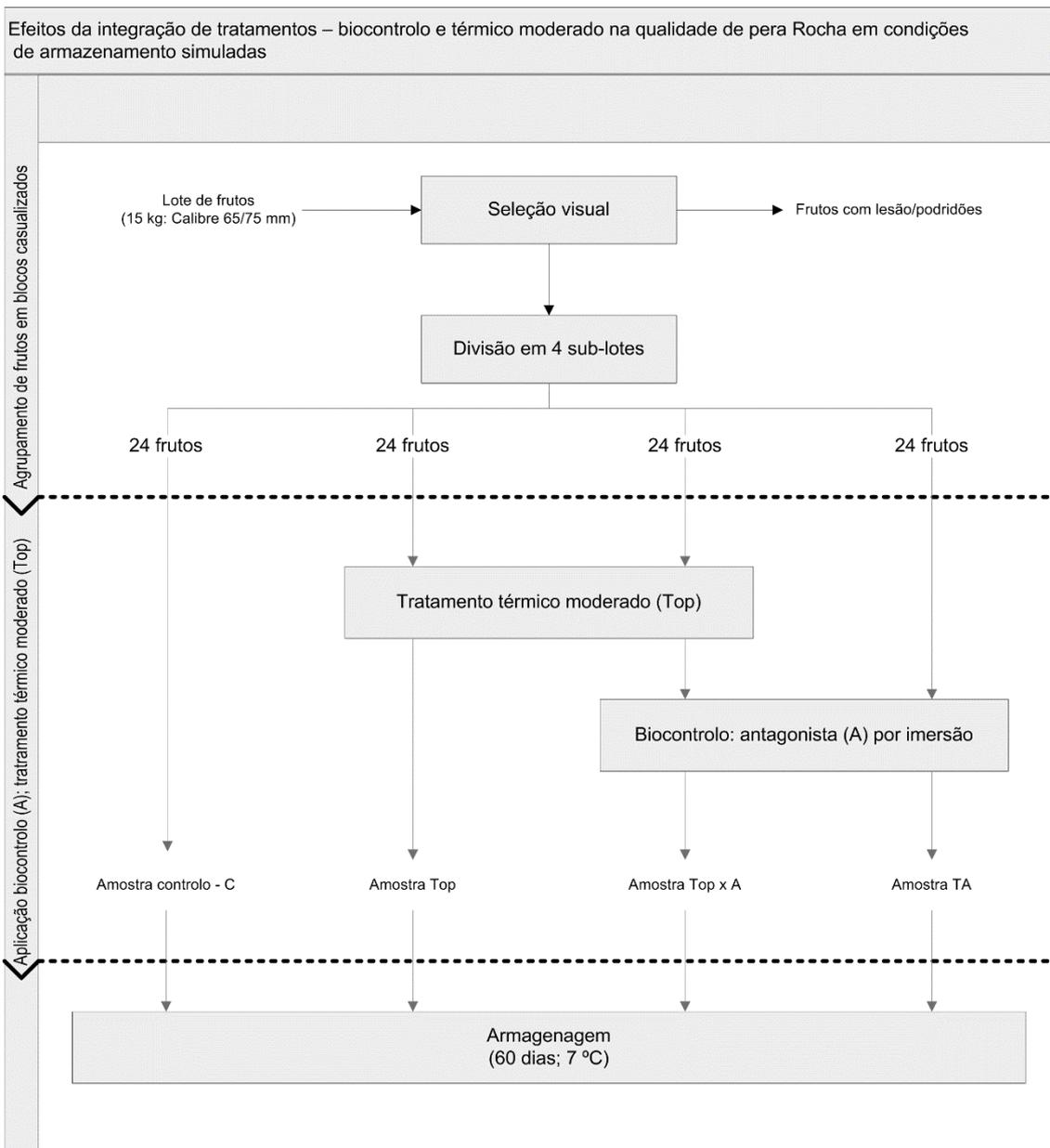


Figura 16 - Diagrama do delineamento experimental para a avaliação dos efeitos da integração de tratamentos - biocontrolo e térmico moderado na qualidade de pera Rocha em condições de armazenagem simuladas.

4.4.2 Resultados e discussão

Os resultados da caracterização físico-química, sensorial e microbiológica são apresentados nas tabelas B1 e B2, constantes do Anexo B.

Indicadores de maturação pós-colheita

TSS e pH

Na tabela 7 são apresentados os valores médios (\pm DP) do teor de sólidos solúveis (TSS) e de pH relativos às amostras em avaliação durante a armazenagem (60 dias, 7 °C).

Os valores de TSS entre amostras e ao longo de 60 dias apresentaram diferenças não significativas ($p > 0,05$), refletindo um comportamento de manutenção face aos valores iniciais situados na gama $11,49 \pm 0,99$ °Brix.

A manutenção dos valores iniciais de pH foi igualmente constatada entre amostras e durante a armazenagem, na gama de variação $4,7 \pm 0,2$ unidades. A única exceção a este comportamento verificou-se na diferença ($p < 0,05$) assinalada entre as amostras TA e Top x A ao fim de 60 e 45 dias, respetivamente com uma variação de 0,5 unidades de pH, cujo significado fisiológico é, no entanto, inexpressivo.

Tabela 7 - Registos médios relativos a TSS e pH durante 60 dias de armazenagem (7 °C).

Id amostra	Armazenagem	TSS (°Brix)	pH
C	0	10,9 ^a ± 0,3	4,6 ^{ab} ± 0,2
	15	11,9 ^a ± 0,5	4,8 ^{ab} ± 0,1
	45	11,5 ^a ± 0,2	4,5 ^{ab} ± 0,1
	60	11,9 ^a ± 0,4	4,7 ^{ab} ± 0,1
TA	0	11,3 ^a ± 1,2	4,5 ^{ab} ± 0,2
	15	11,9 ^a ± 0,4	4,7 ^{ab} ± 0,2
	45	13,0 ^a ± 0,8	4,7 ^{ab} ± 0,4
	60	12,0 ^a ± 1,5	4,9 ^b ± 0,1
Top	0	12,0 ^a ± 0,7	4,8 ^{ab} ± 0,1
	15	11,9 ^a ± 0,5	4,6 ^{ab} ± 0,2
	45	11,6 ^a ± 1,2	4,6 ^{ab} ± 0,1
	60	13,4 ^a ± 1,1	4,5 ^{ab} ± 0,2
Top x A	0	11,8 ^a ± 1,5	4,8 ^{ab} ± 0,1
	15	11,8 ^a ± 1,7	4,9 ^{ab} ± 0,2
	45	12,3 ^a ± 1,2	4,4 ^a ± 0,1
	60	12,4 ^a ± 0,9	4,5 ^{ab} ± 0,1

Os valores correspondem às médias (\pm desvio padrão). Na mesma coluna, valores médios com letras iguais não apresentam diferenças significativas a 0,95% de confiança (Teste de Tukey).

Cor

Na figura 17 e 18 são apresentadas os resultados da tonalidade da carepa (Hue) e do índice de escurecimento da polpa (WI) das amostras em avaliação durante a armazenagem (60 dias, 7 °C).

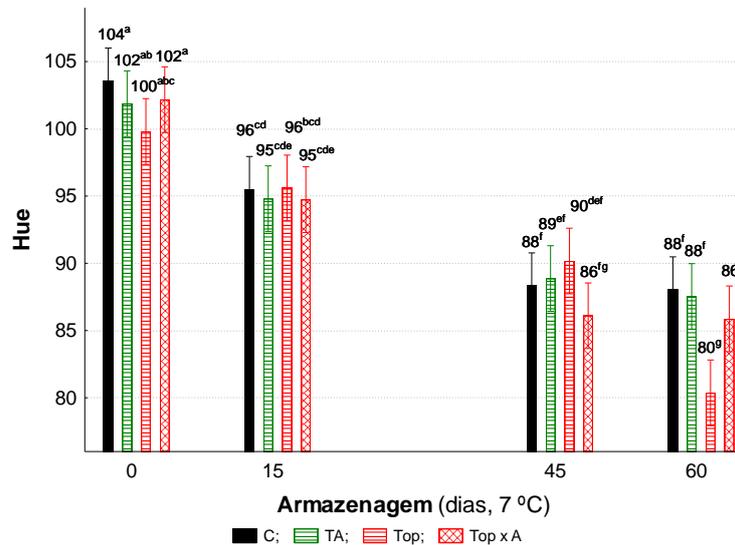


Figura 17 - Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (controlo – C vs TA, Top, e Top x A) nos valores de tonalidade da carepa dos frutos, durante 60 dias de armazenagem (7 °C). Bandas de variação correspondem aos intervalos de confiança a 95%. Letras diferentes revelam diferenças significativas a 95% (Teste Tukey).

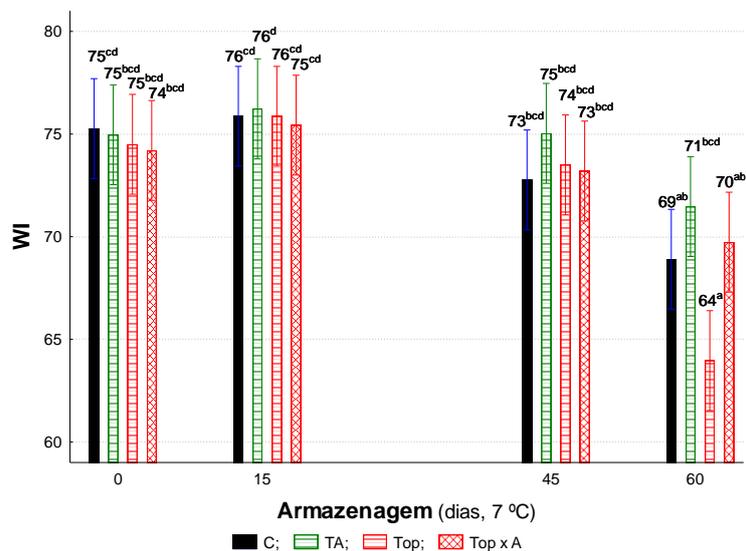


Figura 18 - Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (controlo – C vs TA, Top, e Top x A) nos valores de WI da polpa dos frutos, durante 60 dias de armazenagem (7 °C). Bandas de variação correspondem aos intervalos de confiança a 95%. Letras diferentes revelam diferenças significativas a 95% (Teste Tukey).

A diminuição significativa ($p < 0,05$) dos valores médios de $^{\circ}h$ (decréscimo de ca 15% face ao dia 0) (figura 17), traduz a variação da tonalidade dos frutos de verde para amarelo acastanhado à semelhança do que acontece durante as fases finais do processo de maturação pós-colheita. Por outro lado, em todas as datas avaliadas não se verificaram diferenças significativas da tonalidade, entre amostras, com exceção do 60º dia em que a amostra Top revelou, sem justificação aparente, valores de Hue inferiores ($p < 0,05$) face às restantes.

Conclui-se, em termos gerais, que o comportamento das amostras traduz a independência das variações da tonalidade face aos tratamentos em estudo, mostrando apenas ser influenciadas pelo tempo de armazenagem. No entanto o escurecimento da polpa do fruto traduzido pelas variações de WI mantem os valores iniciais ($74,73 \pm 0,61$), sem diferenças significativas independentemente do tipo de amostras e do período de armazenagem (figura 18). A este comportamento é assinalada uma exceção que se refere às amostras Top no 60º dia, em que os níveis de escurecimentos se revelaram superiores ($p < 0,05$) face às restantes.

Firmeza

Na figura 19 são apresentados os valores de firmeza (pico de força máxima, N) relativos às amostras testadas durante a armazenagem (60 dias, 7 °C).

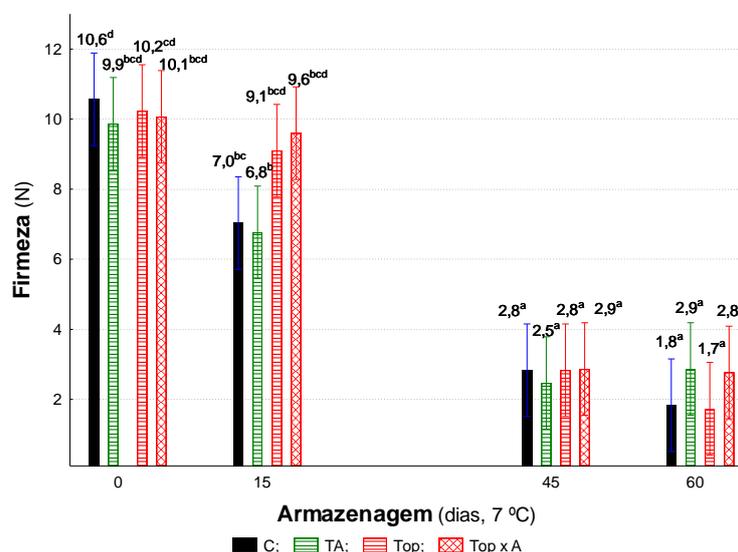


Figura 19 - Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (controlo – C vs TA, Top, e Top x A) nos valores de firmeza, durante 60 dias de armazenagem (7 °C). Bandas de variação correspondem aos intervalos de confiança a 95%. Letras diferentes revelam diferenças significativas a 95% (Teste Tukey).

A diminuição significativa ($p < 0,05$) nos valores médios de firmeza de todas as amostras ocorreu a partir do 15º dia (figura 19), sem variações adicionais significativas na restante

armazenagem. O decréscimo de ca 80% contabilizado durante 45 dias traduz um excessivo amolecimento da polpa do fruto.

Perda de massa

Na figura 20, apresentam-se os valores de perda de massa verificados nas amostras em avaliação durante a armazenagem (60 dias, 7 °C).

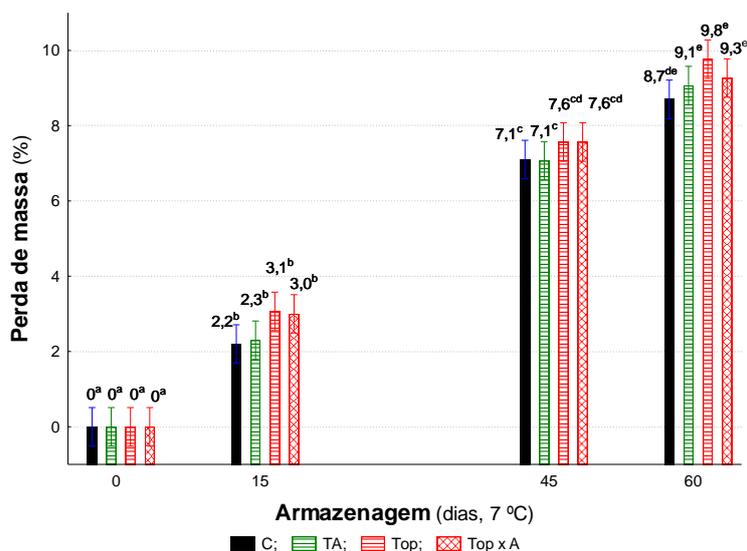


Figura 20 - Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (controle – C vs TA, Top, e Top x A) nos valores de perda de massa, durante 60 dias de armazenagem (7 °C). Bandas de variação correspondem aos intervalos de confiança a 95%. Letras diferentes revelam diferenças significativas a 95% (Teste Tukey).

Da figura 20 constata-se que o aumento das perdas de massa é significativo ($p < 0,05$) em todas as datas testadas, sem diferenças ($p < 0,05$) entre amostras. Neste sentido, a perda de massa foi apenas dependente do período de armazenagem.

A perda de massa ao fim de 60 dias nas condições testadas (7 °C), de ca de 10% é consideravelmente superior em comparação com valores de ca de 3,8% contabilizados para o mesmo fruto ao fim de 4 meses (0 a 1 °C) (Mitcham e Monzon, sd.). Esta discrepância poderá ser justificada pela alteração das condições de armazenagem testadas no que se refere ao valor da temperatura situar-se muito acima do valor normalmente utilizado no armazenamento pós-colheita de pera Rocha (próximo do 0 °C).

Análise sensorial informal

Na figura 21 apresentam-se as classificações sensoriais (cor, firmeza e apreciação global, respetivamente) para as diferentes amostras durante a armazenagem (60 dias, 7 °C), tendo em conta uma classificação de 3 como limiar de aceitação.

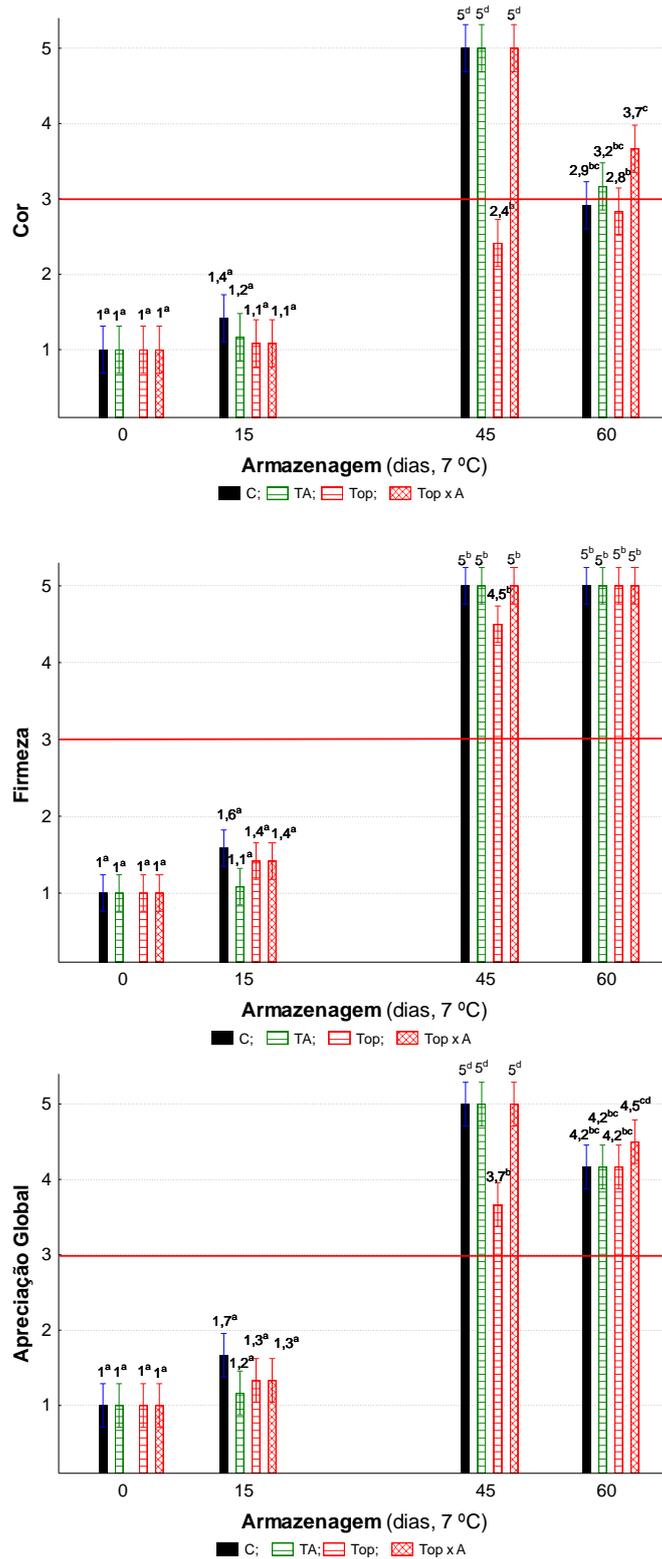


Figura 21 - Análise sensorial dos atributos cor, firmeza e apreciação global (C, TA, Top e TopxA) durante 60 dias de armazenagem (7 °C). Bandas de variação correspondem aos intervalos de confiança a 95%. Escala de cor: 1-Verde, 2- Moderadamente verde, 3- Ligeiramente amarelo, 4- Amarelo, 5- Amarelo escuro. Escala de firmeza: 1- Muito firme, 2- Firme, 3- Moderadamente firme, 4- Mole, 5- Muito mole. Escala hedônica de apreciação global: 1- Muito bom, 2-Bom, 3- Suficiente (limite da aceitabilidade – linha vermelha), 4- Mau, 5- Muito mau.

Da análise das figuras 21 é possível constatar que, para todas as amostras, os atributos sensoriais são mantidos até ao 15º dia, seguindo-se uma contínua depreciação de cor e firmeza no restante período. Estas variações determinam logo a partir do 45º dia a rejeição sensorial das amostras independentemente dos tratamentos testados. A depreciação dos atributos analisados verificada ao fim de 45 dias pode ser explicada pelas condições de armazenagem em estudo favorecer os processos de maturação fisiológica, conduzindo a uma rápida degradação da clorofila e amolecimento da polpa dos frutos e promover a deterioração com origem microbiológica. Assim, conclui-se que a aplicação, singular ou combinada, dos tratamentos em teste não influenciou a evolução do perfil sensorial durante a armazenagem.

Indicadores microbiológicos

Contagens bolores e leveduras

Na figura 22 apresentam-se as contagens iniciais de bolores e leveduras (dia 0) para as amostras em estudo verificando-se que as contagens relativas ao grupo de bolores foi para todas as amostras semelhante ($p>0,05$) ao grupo de leveduras.

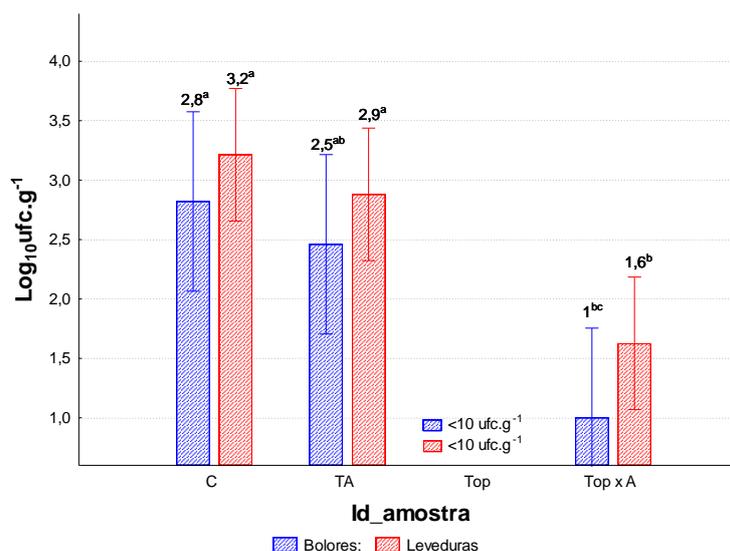


Figura 22 - Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (controlo – C vs TA, Top, e Top x A) nas contagens de bolores e leveduras. Bandas de variação correspondem aos intervalos de confiança a 95%. Letras diferentes revelam diferenças significativas a 95% (Teste Tukey).

Da figura 22 constata-se que o tratamento térmico (Top) conduziu a uma redução significativa da contaminação inicial em ca de 99,9% para o grupo de bolores e leveduras. Nas amostras Top x A verificaram-se reduções significativas de ca de 1,8 ciclos Log para ambos os grupos microbiológicos. Contrariamente ao esperado, a adição de 7×10^8 ufc.g⁻¹ de levedura (*Blossom Protect*TM) não alterou logo ao dia 0 as contagens iniciais para o grupo em causa pelos motivos referidos anteriormente.

Incidência de podridão visível

A incidência de podridão visível (%) contabilizada (tabela 8) apresentou variações significativas em função dos tratamentos e do período de armazenagem (60 dias, 7 °C).

As amostras Top evidenciaram a ausência de podridões visíveis durante o período total ensaiado, o que na comparação com as amostras sem tratamento (C) demonstra efeitos significativos deste na prevenção da incidência de podridão, a partir do dia 15.

O mesmo tipo de comparação revela que a incidência de podridão nos frutos com aplicação de antagonista (efeito singular ou combinado com o tratamento térmico) não revela efeitos de controlo microbiano, tendo-se mesmo verificado uma antecipação deste incidente nas amostras Top x A (15º dia).

Tabela 8 - Registos dos valores percentuais médios de incidência de podridão visível em frutos, avaliados durante 60 dias de armazenagem (7 °C).

Id amostra	Armazenagem	Incidência de podridão (%)
C	0	0
	15	0
	45	67
	60	67
TA	0	0
	15	0
	45	17
	60	67
Top	0	0
	15	0
	45	0
	60	0
Top x A	0	0
	15	17
	45	34
	60	34

Os valores correspondem às médias cumulativas.

Análise de componentes principais (PCA)

Na análise de *cluster* e de componentes principais, optou-se por incluir os seguintes atributos: perda de massa (PM), a incidência de podridão visível (I) e as classificações

sensoriais (cor (Cor_S), firmeza (F_S) e apreciação global (A_S)), excluindo os resultados instrumentais da cor e da textura.

Esta opção baseou-se no facto das classificações sensoriais (cor e firmeza) apresentarem elevadas correlações com resultados instrumentais correspondentes (0,65 e 0,94, respetivamente) permitindo ainda a introdução do juízo da apreciação global importante na definição do limiar de aceitação das amostras.

Na figura 23 apresenta-se o dendrograma resultante da análise de *cluster* onde se verifica (para uma distância euclidiana de 2) a constituição de quatro grupos (A, B, C e D), evidenciando que a separação das amostras foi fortemente influenciada pelo tempo de armazenagem. Assim, no grupo D incluem-se amostras relativas às datas iniciais (0 e 15 dias) e nos restantes (A, B e C) são incluídas amostras relativas às datas subsequentes, independentemente dos tratamentos a que se sujeitaram. Tendo em conta que no grupo D são incluídas as amostras do dia 0 infere-se que o mesmo representa níveis de qualidade em fresco.

Nos grupos B e C são incluídas amostras independentemente do tratamento aplicado evidenciando que a qualidade das mesmas não foi determinada pela natureza do tratamento. Contrariamente no grupo A onde são incluídas amostras sujeitas exclusivamente ao Top singular, independentemente do tempo de armazenagem, indiciando que a aplicação do mesmo introduz efeitos distintivos na respetiva qualidade.

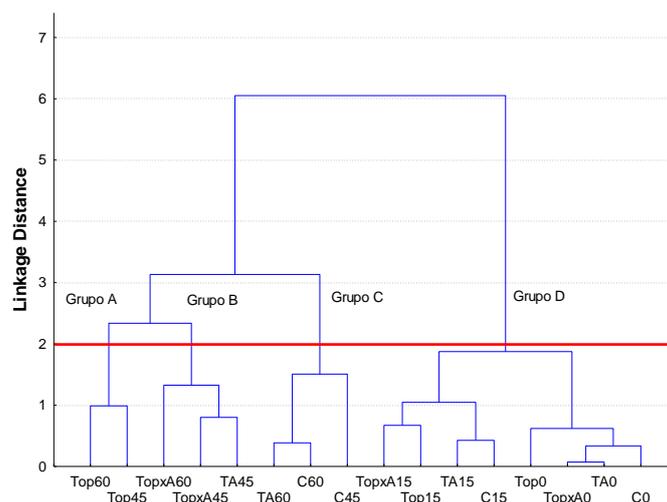


Figura 23 - Dendrograma resultante da análise de *cluster* aos parâmetros em estudo durante a armazenagem.

De forma a obter a visão global da qualidade de pera Rocha no período de armazenagem pós-colheita, foi realizada a análise de componentes principais, apresentando-se nas figuras 24 e 25 o diagrama do círculo de correlação e *score plot*, respetivamente. Na figura 24 está representada a projeção dos atributos no plano dos componentes principais 1 e 2.

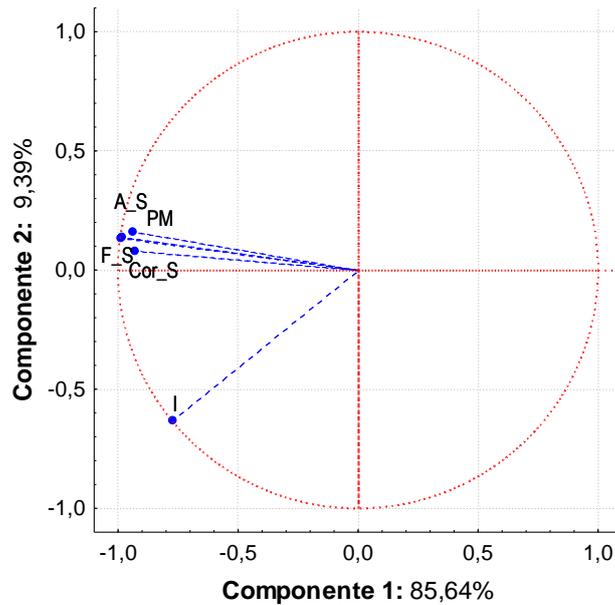


Figura 24 - Diagrama do círculo de correlação (*loading plot*) entre os componentes principais 1 e 2 obtidos a partir dos dados selecionados.

Em cada componente principal foram considerados como importantes e com forte contribuição discriminativa os atributos que apresentaram correlação (r) igual ou superior a 0,73 em valor absoluto. A componente 1 explica quase na totalidade a variância do modelo (85,6%) incluindo os atributos Cor_S, F_S, A_S, I e PM (-0,929, -0,983, -0,988, -0,733, -0,937, respetivamente).

A proximidade entre os vetores A_S, F_S, cor_S e PM e o maior afastamento relativo destes ao vetor I mostra que as variações de cor, textura e perda de massa são mais significativos na apreciação global do que da incidência à podridão.

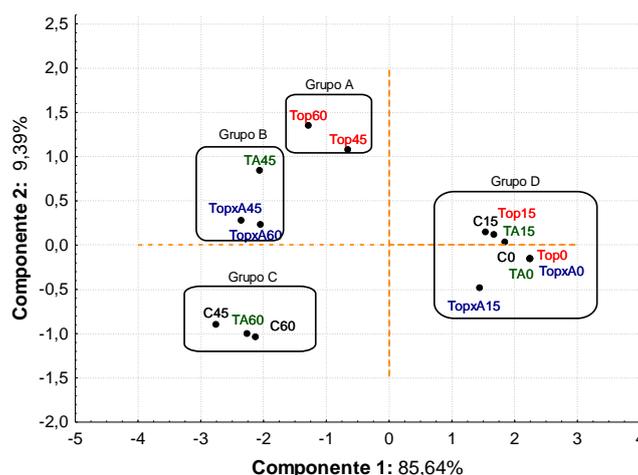


Figura 25 - Diagrama de correlação (*loading plot*) entre os componentes principais 1 e 2 obtidos a partir dos dados selecionados.

A figura 25 mostra o posicionamento das amostras no círculo de correlações. Nesta figura distinguem-se quatro grupos (A, B, C e D), tal como verificado na figura 23.

O grupo D inclui todas as amostras nas fases iniciais de armazenagem (0 e 15 dias) com níveis de aceitação sensorial (qualidade próxima à inicial), independentemente do tratamento aplicado. De facto, o posicionamento das mesmas no diagrama declara variações de cor, firmeza e perda de massa mínimas.

No grupo C infere-se pelo respetivo posicionamento que a aceitação sensorial foi determinada pela incidência à podridão, a incluir amostras submetidas a tratamento com antagonista (A) e sem tratamento (C).

O posicionamento dos grupos A e B demonstra que a apreciação das respetivas amostras é fortemente influenciada pelas variações de cor, firmeza e perda de massa. O afastamento do grupo A (relativo aos vetores A_S, F_S, cor_S e PM) inclui apenas amostras submetidas ao Top sugerindo nestas variações menores nos atributos testados ainda que com níveis de rejeição sensorial.

4.4.3 Conclusão

A alteração da qualidade de pera Rocha nas condições testadas (elevação da temperatura de armazenagem face à condição real (7 vs 0 °C) decorreu na dependência, quase exclusiva, do período de armazenagem. A consequente promoção dos fenómenos de amadurecimento pós-colheita do fruto, de cariz fisiológico - perda de massa acentuada, escurecimento e amolecimentos excessivos, não foi influenciada pela natureza dos tratamentos aplicados durante o período total da armazenagem. No entanto, o Top singular demonstrou efeitos de prevenção na incidência da podridão nas datas mais avançadas, onde, mais uma vez, a integração com A não acresceu qualquer benefício. Este comportamento, aliado ao conhecido padrão climatérico da pera Rocha, sugere que as alterações fisiológicas deste fruto antecedem a ocorrência das podridões com origem microbiana. Para estimar o prolongamento do período pós-colheita de pera Rocha, os efeitos do tratamento térmico (40 °C / 40 min, aplicação singular) carecem de ser reavaliados em condições reais de armazenagem (0 °C), por forma a poder validar a ação deste tratamento no controlo da podridão, bem como avaliar os eventuais efeitos no retardamento dos fenómenos de amadurecimento do fruto.

4.5 Efeitos dos tratamentos selecionados no processamento alimentar – polpas de frutos de pera Rocha

4.5.1 Objetivo e Delineamento experimental

Avaliar a introdução do tratamento térmico moderado (Top; 40 °C / 40 min) numa linha de processamento de polpa de pera Rocha, enquanto alternativa tecnológica não química à operação de descontaminação parcial da matéria-prima que na prática industrial corrente é realizada através da lavagem dos frutos com hipoclorito de sódio (100 ppm cloro livre, pH 6).

Para cumprir os objetivos propostos foram constituídos sete tipos de amostras: amostras de frutos e amostras de polpa (tabela 9 e figura 26). As amostras de frutos compreenderam frutos submetidos a Top (Id. Top), a hipoclorito de sódio (Id. HIPO) e sem qualquer tratamento (Id. Ctr). Para as polpas estabeleceu-se o delineamento do tipo fatorial completo considerando como variáveis independentes o tipo de tratamento dos frutos (Top vs HIPO), e a pasteurização (com e sem) originando quatro tipos de amostras identificadas como: P_Top_p, P_HIPO_p e P_Top, P_HIPO (com e sem pasteurização, respetivamente).

O tratamento dos frutos submetidos ao Top cumpriu o procedimento descrito em 3.4.1. A descontaminação com hipoclorito de sódio foi realizada mediante a imersão dos frutos em soluções aquosas deste agente (100 ppm cloro livre, 1 min, acidificado com ácido cítrico para pH 6) seguindo-se a enxaguagem e secagem (papel absorvente).

A preparação das polpas (1,2 kg) compreendeu a homogeneização dos frutos descascados e cortados em quartos (Robot Termomix durante 1 min) e a respetiva embalagem em sacos de polietileno de baixa densidade e termo-soldados, aptos para o uso alimentar. Foram constituídos 12 sacos por tipo de polpa (descontaminados por Top e por HIPO) metade dos quais foram de imediato armazenados (5 °C, Fitoclima modelo S 600 Pharma) e os restantes foram pasteurizados através da imersão das embalagens em banho de água termostaticado (95 °C / 10 min), e arrefecidos em banhos de gelo fundente e armazenados (5 °C).

A avaliação das amostras face aos seguintes atributos: Cor CIELab (polpa), pH, TSS, prova sensorial informal e, contagem de microrganismos a 30 °C e de bolores e leveduras foi realizada no dia seguinte ao processamento.

Tabela 9- Identificação dos tipos de amostras constituídos e respetivos efeitos.

Id_amostra	Tratamentos	Efeitos
Ctr	Pera Rocha	
Top	Pera Rocha descontaminada termicamente	Efeitos dos tratamentos de descontaminação parcial (Top e HIPO) na qualidade dos frutos para processamento
HIPO	Pera Rocha descontaminada com HIPO	
P_Top	Polpa não pasteurizada de Pera Rocha a partir de frutos descontaminados termicamente	
P_Top_p	Polpa de Pera Rocha pasteurizada a partir de frutos descontaminados termicamente	Efeitos dos tratamentos de descontaminação parcial (Top e HIPO) e da pasteurização na qualidade das polpas
P_HIPO	Polpa de Pera Rocha não pasteurizada a partir de frutos descontaminados com HIPO	
P_HIPO_p	Polpa de Pera Rocha pasteurizada a partir de frutos descontaminados com HIPO	

Top – tratamento térmico moderado (40 °C / 40 min); HIPO – descontaminação com hipoclorito de sódio, P – polpa e p - pasteurização).

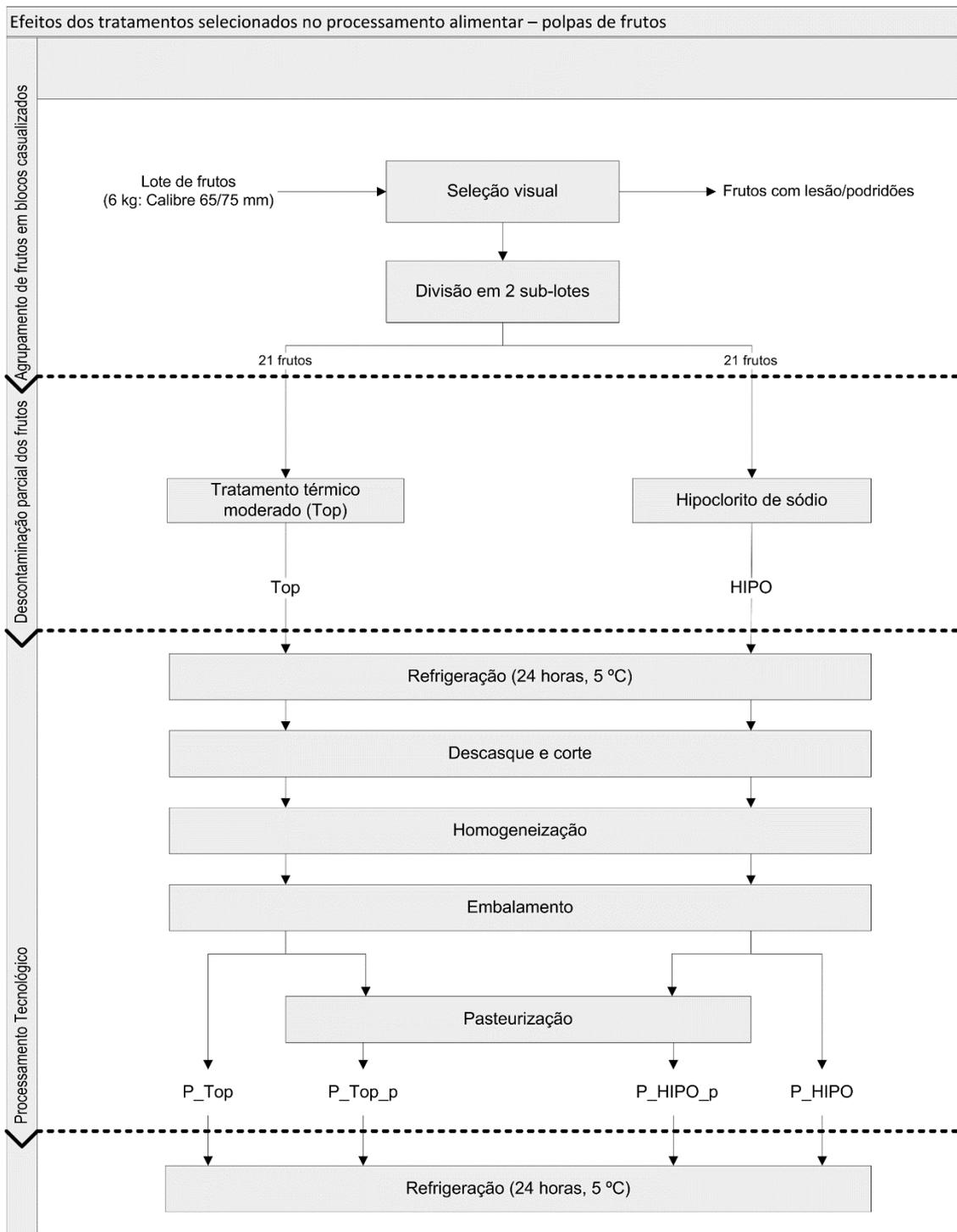


Figura 26 - Diagrama do delineamento experimental para a avaliação o efeito dos tratamentos selecionados no processamento alimentar – polpas de frutos.

4.5.2 Resultados e discussão

pH e TSS

Na tabela 10 constam os valores médios de pH e do teor de sólidos solúveis (TSS) relativos às amostras de frutos (Ctr, HIPO e Top) e amostras de polpas (P_HIPO, P_HIPO_p, P_Top e P_Top_p).

Tabela 10 - Resultados médios (\pm DP) de pH e TSS dos diferentes tipos de amostras.

Tipo de amostras	Identificação de amostras	pH	TSS
Frutos	Ctr	4,7 ^a \pm 0,0	12,3 ^{ab} \pm 0,2
	HIPO	4,8 ^b \pm 0,0	12,1 ^a \pm 0,2
	Top	4,7 ^{ab} \pm 0,1	12,6 ^b \pm 0,2
Polpas	P_HIPO	4,7 ^A \pm 0,1	11,3 ^A \pm 0,2
	P_HIPO_p	4,6 ^A \pm 0,1	11,4 ^A \pm 0,1
	P_Top	4,6 ^A \pm 0,1	11,1 ^A \pm 0,1
	P_Top_p	4,6 ^A \pm 0,0	11,1 ^A \pm 0,2

Na mesma coluna, letras diferentes representam diferenças significativas para $p=0,05$ (teste Tukey).

Nas amostras de frutos submetidos ao tratamento com HIPO verificou-se um ligeiro aumento no valor de pH, de 0,1 unidade, assinalado como significativo face aos frutos sem tratamento (Ctr). No entanto, esta variação não representa qualquer significado prático e pode assumir-se a manutenção do valor inicial de pH, tal como verificado com as amostras Top.

Os valores de TSS das amostras de frutos tratadas com HIPO e Top apresentam diferenças ($p<0,05$) entre si, mas sem alterações significativas face às amostras Ctr ($p>0,05$). As variações máximas registadas para ambas as amostras são, no entanto, muito pequenas (0,5 °Brix), não traduzindo significado fisiológico relevante.

Os valores de pH das polpas são muito semelhantes em comparação com os valores registados nos frutos (variação máxima de 0,1 unidade), independentemente do tratamento aplicado (HIPO e Top). No entanto, verificou-se uma diminuição do valor médio de TSS, de 0,8 °Brix e de 1,5 °Brix nas amostras P_HIPO e P_Top, respetivamente, face aos valores registados nos frutos antes do processamento. Este facto pode ser atribuído ao consumo de açúcares, disponibilizados pelo corte das células, no desenvolvimento microbiano.

O efeito da pasteurização (p) não alterou ($p>0,05$) de forma significativa os valores de pH e de TSS das polpas em comparação (P_HIPO e P_Top).

Na tabela 11 constam os valores médios do índice de escurecimento (WI), os resultados da apreciação visual e os registos fotográficos relativos às amostras de frutos (Ctr, HIPO e Top) e de polpas (P_HIPO, P_HIPO_p, P_Top e P_Top_p).

Tabela 11 - Resultados do índice de escurecimento WI (médias \pm DP), da avaliação visual e registos fotográficos para os diferentes tipos de amostras.

Tipo de amostras	Identificação de amostras	WI	Avaliação visual*	Registos fotográficos
Frutos	Ctr	73,6 ^a \pm 2,1	Sem diferenças perceptíveis	
	HIPO	71,5 ^a \pm 2,7		
	Top	64,0 ^b \pm 2,2		
Polpas	P_HIPO	29,9 ^A \pm 0,8	Sem diferenças perceptíveis e com níveis de apreciação ao nível da rejeição	
	P_HIPO_p	31,1 ^B \pm 0,9		
	P_Top	29,9 ^A \pm 0,6		
	P_Top_p	31,7 ^B \pm 0,7		

Na mesma coluna, letras diferentes representam diferenças significativas para $p=0,05$ (teste Tukey).
*Prova sensorial informal.

Tal como se mostra na tabela 11, as alterações da cor entre amostras de frutos (HIPO, Top e Ctr) não são visualmente distinguidas. No entanto, a avaliação instrumental através do parâmetro WI assinalou diferenças ($p<0,05$) entre as amostras Top face às Ctr

($64,0 \pm 2,2$ vs $73,6 \pm 2,1$, respectivamente), traduzindo nas mesmas valores que refletem um maior escurecimento.

Após processamento, e ao fim de 24h, verificou-se um escurecimento acentuado das polpas com níveis de rejeição sensorial, tal como se pode constatar através dos registos fotográficos (cor dos frutos vs cor de polpas). O fenómeno de escurecimento é atribuído às reações enzimáticas promovidas pela polifenoloxidase (PPO) e que decorrem rapidamente após a disrupção celular pela maior acessibilidade da enzima aos substratos fenólicos e ao oxigénio criada nessa situação. Em termos de WI, esta alteração da cor traduziu-se na redução expressiva dos valores iniciais, em cerca de 42 a 47%, para as amostras P_HIPO e P_Top, respetivamente.

O efeito da pasteurização das polpas, independentemente do tratamento aplicado aos frutos (HIPO e Top), não foi visualmente perceptível na distinção da cor entre amostras. No entanto, a avaliação objetiva refletiu diferenças ($p < 0,05$) visto que o WI das polpas pasteurizadas revelou-se superior face às não pasteurizadas, significando um menor escurecimento das primeiras.

O comportamento anterior revela que o fenómeno de inativação térmica da PPO foi insuficiente, isto é, que as condições de pasteurização testadas não permitiram alcançar os níveis de inibição da atividade da PPO necessários para a estabilidade do produto (ca 90%). A elevada termoresistência da PPO é conhecida e dependente de muitos fatores entre os quais o tipo de fruto. Por outro lado, a inativação enzimática pelo calor é mais dependente da temperatura do que da duração do tratamento (Awuah *et al.*, 2007). Contudo, imediatamente após tratamento térmico foi possível verificar efeito de retenção da cor das polpas, embora este não tenha sido suficiente para prolongar a estabilidade oxidativa até 24 horas. De facto, no estudo efetuado em polpa de anona, Bora *et al.* (2004) verificaram que para se alcançar valores de inativação PPO superior a 90% foram necessários tratamentos térmicos de $95\text{ }^{\circ}\text{C} / 6$ segundos.

Contagens microbiológicas

O efeito de descontaminação parcial dos frutos em função tratamentos em análise (contagens de microrganismos a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e bolores e leveduras) é apresentado na figura 27.

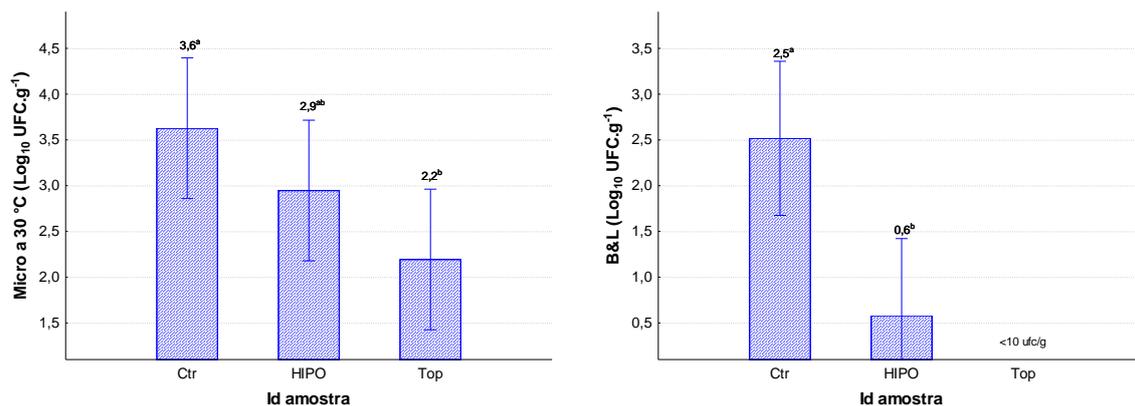


Figura 27 - Efeito dos tratamentos de descontaminação parcial HIPO e Top no teor de a) microrganismos a 30 °C e b) bolores e leveduras nos frutos de pera Rocha. Bandas de variação correspondem aos intervalos de confiança a 95%. Letras diferentes revelam diferenças significativas a 95% (Teste Tukey).

A contaminação inicial dos frutos de pera Rocha foi de $4,6 \times 10^3$ ufc.g⁻¹ de microrganismos a 30 °C e de $3,6 \times 10^2$ ufc.g⁻¹ para B&L, refletindo teores semelhantes ao referido por Figueiredo (2012).

O Top aplicado nos frutos inteiros conduziu a uma redução significativa da contaminação inicial de 38,8 e 99,9%, para os grupos micro a 30 °C e B&L, respetivamente. A lavagem dos frutos com HIPO não alterou o nível de contaminação inicial no que respeita aos microrganismos a 30 °C mas reduziu de forma significativa as contagens de B&L em cerca de 76,0%.

Na figura 28 apresentam-se as contagens microbiológicas (microrganismos a 30 °C e Bolores e Leveduras) relativas às polpas (P_HIPO, P_Top) com e sem pasteurização.

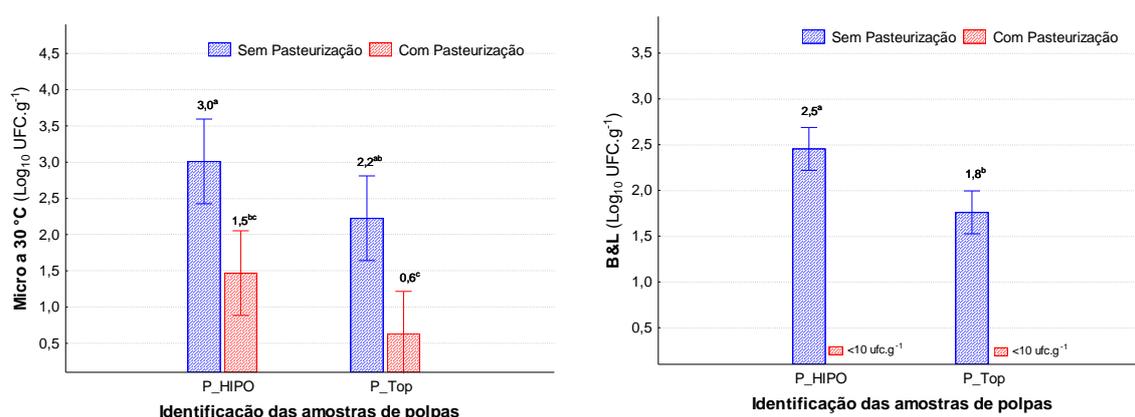


Figura 28 - Efeito da pasteurização de polpas processadas a partir de frutos com descontaminação parcial HIPO e Top no teor de a) microrganismos a 30 °C e b) bolores e leveduras. Bandas de variação correspondem aos intervalos de confiança a 95%. Letras diferentes revelam diferenças significativas a 95% (Teste Tukey).

A pasteurização das polpas revelou-se importante na redução significativa dos grupos microbiológicos analisados independentemente dos tratamentos aplicados nos frutos inteiros

(HIPO e Top). O teor de microrganismos a 30 °C verificou reduções de ca de 60% e para o grupo de bolores e leveduras a redução após pasteurização foi ainda mais efetiva, tendo as amostras verificado valores inferiores a 10 ufc.g⁻¹. A termosensibilidade de bolores e leveduras, cuja eliminação ocorre para valores de temperatura entre 60 e 71 °C (Costilow e Breidt, 2004), justifica a eliminação deste grupo nas polpas de pera.

A eficiência da pasteurização na eliminação da microbiota (com contagens e 1,5 ciclos log ufc.g⁻¹ para microrganismos. a 30 °C) mostrou ser independente da natureza dos tratamentos aplicados aos frutos inteiros (HIPO e Top) e suficiente para garantir durante 24 h (5 °C) os critérios microbiológicos definidos para estes produtos (< 2 x 10³ ufc.g⁻¹, Instrução Normativa nº1, de 7 de Janeiro de 200).

No estudo de desenvolvimento tecnológico de polpas de pera Rocha (min. 50%) em mistura com outros hortofrutícolas e de carácter ácido (pH<4), Figueiredo (2012) verificou que a pasteurização de polpas (90 °C/10 min) foi eficaz na eliminação das formas vegetativas dos microrganismos (com contagens de 0,5 ciclos Log ufc.g⁻¹ para microrganismos. a 30 °C após pasteurização). Estas polpas durante a armazenagem em condições de refrigeração (5 °C) mantiveram durante ca de 30 dias contagens microbiológicas abaixo dos critérios referidos. Em comparação com estes resultados é de esperar que as polpas de pera Rocha em estudo alcancem mais cedo os critérios de rejeição quer pelo carácter não ácido (pH= 4,6) desta polpa quer pelo nível de contaminação mais levado após pasteurização (1,5 vs 0,5 ciclos Log ufc.g⁻¹ para microrganismos. a 30 °C).

4.5.3 Conclusão

O Top revela-se uma alternativa mais saudável e ecológica e mais eficaz do que o HIPO na descontaminação parcial da matéria-prima em particular no que se refere à eliminação de B&L sem prejuízo das características físico-químicas e sensoriais dos frutos. No entanto este tratamento não contribuiu para reduzir a suscetibilidade ao escurecimento das polpas deste fruto. Acresce ainda que a estabilidade oxidativa (PPO) das polpas de pera Rocha constitui o facto mais crítico em termos da conservação do produto. Neste sentido os resultados indicam que a otimização do tratamento de pasteurização (binómio temperatura / tempo) deva ter como primeiro objetivo a inativação enzimática por forma a evitar o escurecimento excessivo observado logo ao final de 24 h (5 °C).

5 Conclusões Gerais

O presente estudo permite retirar algumas conclusões que contribuem para uma melhor perceção e resolução dos problemas envolvidos na aplicação dos tratamentos pós colheita - biocontrolo e calor – na conservação de pera Rocha inteira e na aptidão para processamento.

- Em pera Rocha proveniente do pomar caracterizou-se um nível de contaminação semelhante de ca 5×10^4 ufc.g⁻¹ para os grupos de Bolores e Leveduras e para o grupo de microrganismos a 30 °C, tendo o fungo patogénico *Cladosporium* sp. sido identificado como prevacente da microbiota em dois anos consecutivos.
 - A microbiota assim caracterizada não se alterou nas duas zonas de produção de pera Rocha na região do Oeste - Alcobça e Lourinhã, consideradas importantes enquanto locais abastecedores da central fruteira.
 - A aplicação do fungicida Imazalil em condições reais da indústria, com o objetivo de controlar podridões, não alterou a avaliação qualitativa e quantitativa da microbiota dos frutos.
- Foi verificado o potencial de antagonismo *in vitro* da levedura *Aureobasidium pullulans* - antagonista comercial *Blossom Protect*TM (A) - frente ao patogénico *Cladosporium* sp., com uma inibição de ca de 80% para a concentração de 10^8 ufc.g⁻¹ de células viáveis. Esta situação não foi alterada quando se incorporou pera Rocha no meio de cultura.
- Foi verificada a ineficácia dos efeitos do antagonista comercial *Blossom Protect*TM (10^8 ufc.g⁻¹) frente a *Cladosporium* sp. e *Penicillium expansum* nas condições testados de armazenagem pós-colheita de pera Rocha (7 °C, 60 dias). Para além das inúmeras razões que normalmente justificam a perda de efeito antagonismo *in vivo* (fraca adesão da solução dos agentes de biocontrolo aos tecidos do fruto e /ou condições desfavoráveis de desenvolvimento a baixas temperaturas), verificou-se que o agente patogénico prevacente na microbiota do fruto foi *Penicillium expansum*, para o qual não foram estudados os efeitos de inibição face ao antagonista em teste.
- A integração de tratamentos biocontrolo (*Blossom Protect*TM) e tratamento térmico moderado (40 °C / 40 min) foi inviabilizada pela ineficácia dos efeitos do antagonista comercial *Blossom Protect*TM nas condições testadas *in vivo*.

- A aplicação de calor (40 °C / 40 min) como tratamento pós-colheita de pera Rocha, preveniu de forma significativa (100%) a incidência da podridão no fruto causada por *Penicillium expansum*, em condições de armazenagem simuladas (7 °C, 60 dias), perspetivando-se efeitos similares nas condições reais de armazenagem em que a temperatura é claramente inferior (0 °C).
 - Não ficaram esclarecidos os efeitos do tratamento térmico moderado (40 °C / 40 min) na eventual prevenção de danos fisiológicos (acastanhamento interno e escaldão superficial) de pera Rocha. Assim, o acompanhamento das alterações fisiológicas foi consideravelmente desvirtuado perante a aceleração dos fenómenos de amadurecimento pós-colheita (amolecimento excessivo em ca de 80% face aos valores iniciais), especialmente pela elevação da temperatura face à condição real de armazenagem (de 7 para 0 °C) associado ao comportamento climatérico do fruto.
- A aplicação de calor (40 °C / 40 min) enquanto operação preliminar de descontaminação parcial da matéria-prima numa linha de fabrico de polpas de pera Rocha, constitui uma alternativa mais eficaz e ecológica (reduzindo de forma significativa 99,9% da contaminação inicial de B&L) à vulgar utilização de hipoclorito de sódio, sem prejuízo das características físico-químicas e sensoriais dos frutos. No entanto, este tratamento não altera os níveis de escurecimento acentuados que se verificam após o esmagamento dos tecidos e que são atribuídos às reações de oxidação enzimática.

6 Referências bibliográficas

ABREU, M. - Tratamentos Integrados para a Qualidade de Pera Rocha Minimamente Processada. Universidade Técnica de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia, 2010. Dissertação apresentada para obtenção do grau de Doutor.

ANP. – Associação Nacional de Produtores de Pera Rocha - Caderno de Especificações da Pera Rocha DOP. 2012.

AWUAH, G.; RAMASWAMY, H.; ECONOMIDES, A. Thermal processing and quality: principles and overview. Chemical Engineering and Processing. 2007, 46: 584-602.

BALEIRAS, M.; REIZINHO, R.; DUARTE, F. - Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-*Saccharomyces* yeasts present during red wine fermentations. International Journal of Food Microbiology. 2005, 102: 49-56.

BARREIRO, M. - Biocontrolo das doenças de pós-colheita em pêra "Rocha". Lisboa: In Vida Rural. 2008, 32-34.

BOLIN, H; HUXSOLL, C. - Control of minimally processed carrot (*Dacus carota*) surface discoloration caused by abrasion peeling. Journal of Food Science. 1991, 56: 416-418.

BORA, P.; HOLSCHUH, H; VASCONCELOS, M. - Characterization of polyphenol oxidase of soursop (*Annona muricata* L.) fruit and a comparative study of its inhibition in enzyme extract and in pulp. Ciencia e Tecnologia de Alimentos. 2004, 4: 267-273.

CAB - Cooperativa Agrícola do Bombarral. *Pera Rocha – Armazenamento*. Disponível em <http://www.cab.pt>. Acesso em 9/03/2014. Disponível na <http://www.cab.pt>.

CASALS, C.; ELMER, P.; VIÑAS, I.; TEIXIDO, N; SISQUELLA, M.; USALL, J. - The combination of curing with either chitosan or *Bacillus subtilis* CPA-8 to control brown rot infections caused by *Monilinia fructicola*. Postharvest Biology and Technology. 2012, 64 (1): 126-132.

CASTORIA, R; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; CAPUTO, L.; PACIFICO, S.; DE CICCIO, V. *Aureobasidium pullulans* (LA-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. Postharvest Biology and Technology. 2001, 22: 7-17.

COELHO, R.; HOFFMANN, F.; HIROOKA, E. - Biocontrolo de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. Semina: Ciências Agrárias. 2003, 4 (2): 337-358.

COSTILOW, R.; BREIDT, F. - Processing and safety. In *Acidified Foods: Principles of Handling and Preservation*. Pickle Packers International, Inc. 2004, 5-15.

Dafne. *Produtos de Colorimetria – fundamentos*. Disponível em: <http://www.dafne.pt/produtos/colorimetria/fundamentos.html>. Acesso em 17/03/2014

Diretiva 2009/859/CE do Conselho de 29 de Junho de 2012 relativa à não aprovação da substância ativa difenilamina (JO L 171 de 30.6.2012, p. 2-3).

Diretiva 91/414/CEE do Conselho de 15 de Julho de 1991 relativa à comercialização de produtos fitossanitários (JO L 230 de 19.8.1991, p. 1-31).

DOMSCH, K.; GAMS, W.; ANDERSON, T. Compendium of Soil Fungi. Academic press, 1980.

DRLANGE.-.Color review. Drlange Application Report No.8.0e.U.S.A., 1994, 8.

EL GHAOUTH, A.; SMILANICK, J.; WILSON, C. -Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. Postharvest Biology and Technology. 2000, 19: 103-110.

EL GHAOUTH, A.; WILSON, C.; WISNIEWSKI, M.; DROBY,S.; SMILANICK, J.; KORSTEN, L. Biological control of postharvest diseases of citrus fruits. Biological control of crop diseases. 2002, 289-312.

EN 1275:2005 – Chemical disinfectants and antiseptics, Quantitative Suspension Test for the evaluation of basic fungicidal or basic yeasticidal activity of chemical disinfectants and antiseptics – Test method and requirements. European Committee for Standardization.

ETEBARIAN, H. *et al.* Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. Microbiology. 2005,51 (7): 591-598.

FALLIK, E. - Prestorage hot water treatments (immersion, rinsing and brushing). Postharvest Biology and Technology. 2004, 32 (2): 125:134.

FERREIRA-PINTO, M.; MOURA-GUEDES, M.; SANTOS, M.; SILVA, M.; BARREIRO, M.; SANTOS, M. - The antagonistic activity of *Aureobasidium pullulans* to reduce blue mold in "Rocha" Pear. International Society for Horticultural Science. 2008, 800:921-928.

FIGUEIREDO, T. - Desenvolvimento tecnológico de polpas refrigeradas de pera Rocha e outros hortofrutícolas. Universidade Técnica de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia, 2012. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar.

FISCHER, I.; ALMEIDA, A.; FILETI, M.; BERTANI, R.; ARRUDA, M.; BUENO, C. - Avaliação de Passifloraceas, fungicidas e Trichoderma para o manejo da Podridão-do-colo do maracujazeiro, causada por *Nectria haematococca*. Revista Brasileira de Fruticultura. 2010, 32 (2): 709-717.

FRANCESCO, A.; MARI, M. - Use of biocontrol agents in combination with physical and chemical treatments: efficacy assessment. Stewart Postharvest Review. 2014, 10 (1): 1-4.

Gabinete de Planeamento e Políticas. 2012. Anuário Agrícola. Disponível em: <http://www.gpp.pt>. Acesso em 20/03/2014.

Gabinete de Planeamento e Políticas. 2013. Anuário Agrícola. Disponível em: <http://www.gpp.pt>. Acesso em 20/03/2014.

GARCIA, J.; AGUILERA, C.; ALBI, M. - Postharvest heat-treatment on Spanish strawberry. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1995, 43(6): 1489-1492.

HERNÁNDEZ-MONTIEL, L.; OCHOA, J.; TROYO-DIÉGUEZ, E.; LARRALDE-CORONA, C. - Biocontrol of postharvest blue mold (*Penicillium italicum* Wehmer) on Mexican lime by marine and citrus *Debaryomyces hansenii* isolates. Postharvest Biology and Technology. 2010, 56 (2): 181-187.

HUANG, Y., DEVERALL, B.; MORRIS, S. - Postharvest control of green mould on oranges by a strain of *Pseudomonas glathei* and enhancement of its biocontrol by heat treatment. Postharvest Biology and Technology. 1995, 5 (1-2): 129-137.

INSA. Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge. Alimentação e Nutrição - Tabela de Composição de Alimentos. [Em linha]. [Consult. 10 fevereiro. 2014.]. Disponível na [http:// www.insa.pt/](http://www.insa.pt/)

JANISIEWICZ, W.; CONWAY, W. - Combining biological control with physical and chemical treatments to control fruit decay after harvest. Stewart Postharvest Review. 2010, 1 (3): 1-16.

JANISIEWICZ, W.; KURTZMAN, C.; BUYER, J. - Yeasts associated with nectarines and their potential for biological control of brown rot. Yeast. 2010, 27 (7): 389-398.

JORDÃO, F.; ARMANDO, P. - Pera Rocha do Oeste - Quintas e produção. Torres Vedras. Livro do dia. 2011.

LIDON, F.; RAMALHO, J.; PAIS, I.; RAMOS, A.; SANTOS, M.; ARRABAÇA, J.; BARRAREIRO, M. - Fungistatic action of *Aureobasidium pullulans* on *Penicillium expansum* in “Rocha” pear: implications for oxidative stress during fruit storage. International Journal of Pest Management. 2012, 58 (1): 41-52.

LOUREIRO, S. 2014. Cocktails de pesticidas prejudicam a saúde dos solos. Disponível em: <http://uaonline.ua.pt/pub/detail.asp?c=38014>. Acesso em 14/Maio/2014.

LURIE, S. - Postharvest heat treatments. Postharvest Biology and Technology. 1998, 14: 257-269.

MARI, M.; NERI, F.; BERTOLINI, P. - New approaches for postharvest disease control in Europe. Postharvest pathology. Heidelberg: Springer, 2010, 2: 119-135.

MARQUES, I. – Conservação de frutas: Redução de doenças de pós-colheita em pera “Rocha”. Universidade Nova de Lisboa – Faculdade de Ciências e Tecnologia. Dissertação apresentada para obtenção do mestre em Ciências e Engenharia de Alimentos. Lisboa, 2012.

MELLO, S.; LOUZADA, G.; CARVALHO, D.; JÚNIOR, M.; MARTINS, I.; BRAÚNA, L. – Potencial antagonico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. Biota Neotropica. 2009, 9 (3): 145-149.

MITCHAM, E.; MONZON, M. - Maintaining Quality of Stored Bartlett Pears with Modified Atmosphere Pallet Covers. Department of Plant Sciences, University of California.

MOREAU, C. -. Moississures Toxiques dans l'Alimentation. Lechevalier, 1969.

MOUNIR, R.; DURIEUX, A.; BODO, E.; ALLARD, C.; SIMON, J.; ACHBANI, E. EL-JAAFARI, S.; Dourira, A; JIJAKLI, M. - Production, formulation and antagonistic activity of the biocontrol like-yeasts *Aureobasidium pulullans* against *Penicillium expansum*. Biotechnology Letters. 2007, 29 (4): 553-559.

Norma ISO 21527-1:2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds.

Norma ISO 4833:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 degrees C.

Norma ISO 6887-4:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

Normas Técnicas para a Produção Integrada de Pomóideas. Lisboa: DRADR. 2012, Vol. III.

NUNES, C. - Biological control of postharvest diseases of fruits. European Journal of Plant Pathology. 2011, 133: 181-196.

OJIAMBO; SCHERM. - Biological and Application-Oriented Factors Influencing Plant Disease Suppression by Biological Control: A Meta-Analytical Review. Phytopathology. 2006, 96 (11): 1168-1174.

OLIVEIRA, C. - Tecnologia pós-colheita para melhoria da qualidade e segurança alimentar: pêra, maçã e kiwi. Lisboa: ISAPress 2007, 52.

OLIVEIRA, C.; MOTA, M. - Tecnologias recentes em pós-colheita de pomóideas: 1-MCP, controlo das podridões e espectroscopia de infravermelho próximo. In Engenharia dos biosistemas. Lisboa: Colibri/CEER: 2011: 281-284.

PALOU, L.; SMILANICK, J; DROBY, S. - Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue molds. Stewart Postharvest Review. 2008, 2 (2): 1-16.

PRANGE, R.; WRIGHT, H.; DELONG, J.; HARRISON, P.; GUNAWARDENA, A. - The effect of temperature and other factors on chlorophyll a fluorescence and the lower oxygen limit in apples (*Malus domestica*). Postharvest Biology and Technology. 2010, 55 (1): 21-28.

Regulamento (CE) n.º 102/2002 do Jornal Oficial da União Europeia, de 27 de Abril de 2002.

Regulamento (CE) n.º 510/2006 do Jornal Oficial da União Europeia de 20 de Março de 2006.

RICO, D.; MARTÍN-DIANA, A.; FRIAS, J.; BARAT, J; HENEHAN, G.; BARRY-RYAN, C. - Improvement in texture using calcium lactate and heat-shock treatments for stored ready-to-eat carrots. Journal of Engineering 2007, 79: 1196-1206.

ROBIGLIO, A.; SOSA, M.; LUTZ, M.; LOPES, C.; SANGORRÍN, M. - Yeast biocontrol of fungal spoilage of pear stores at low temperatures. International Journal of Food Microbiology. 2011, 147 (3): 211-216.

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

SILVA, J.; FINGER, F.; CORRÊA, P. - Armazenamento de frutas e hortaliças. In. Secagem e armazenagem de produtos agrícolas. Aprenda Fácil. 2000, 18.

SOUSA, A.; SOUSA, A. - O bolor azul (*Penicillium* spp.) das pêras e maçãs. CRIPOSA. Jornal de Informação Técnica – AVAPI. 2005, 67: 10-12.

SOUSA, R. Manejo de produção de Pera "Rocha". 2012.

SPADARO, D.; GULLINO, M. - State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. International Journal of Food Microbiology. 2004, 91 (2): 185-94.

SPADARO, D; GULLINO, M. - Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. Crop Protection. 2005, 24 (7): 601-613.

SPOTTS, R.; CERVANTES, L.; FACTEAU, T. - Integrated control of brown rot of sweet cherry fruit with a preharvest fungicide, a postharvest yeast, modified atmosphere packing, and cold storage temperature. Postharvest Biology and Technology. 2002, 24 (3): 251- 257.

TORRES, R. *et al.* - Application of *Pantoea agglomerans* CPA-2 in combination with heated sodium bicarbonate solutions to control the major postharvest diseases affecting citrus fruit at several Mediterranean locations. European Journal of Plant Pathology. 2007, 118: 73-83.

USALL, J.; SMILANICK, J.; PALOU, L.; DENIS-ARRUE, N.; TEIXIDÓ, N.; TORRES, R.; VIÑAS, I. Preventive and curative activity of combined treatments of sodium carbonates and *Pantoea agglomerans* CPA-2 to control postharvest green mold of citrus fruit. Postharvest Biology and Technology. 2008, 50 (1): 1-7.

VERO, S.; GARMENDIA, G.; GONZÁLEZ, M. - *Aureobasidium pullulans* as a biocontrol agent of postharvest pathogens of apples in Uruguay. Biocontrol Science and Technology. 2009, 19 (10): 1033-1049.

WATADA, A.; ABE, K.; YAMUCHI, N. - Physiologic activities of partially processed fruits and vegetables. Food Technology. 1990, 44 (5): 116-122.

WILSON, C.; WISNIEWSKI, M. - Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: An Emerging Technology. Annual Review of Phytopathology. 1989, 27: 425-441.

WSZELAKI, A.; MITCHAM, E. - Effect of combinations of hot water dips, biological control and controlled atmospheres for control of gray mold on harvested strawberries. Postharvest Biology and Technology. 2003, 27 (3): 255-264.

XIAO, C. 2005. *Postharvest Diseases of Apples and Pears - A Guide to Diagnosis Control*. In *Tree Research and Extension Center - Tree Fruit Postharvest Pathology* Disponível em: <http://decay.tfrec.wsu.edu/index.php>. Acesso em 11/09/2014.

YU, T.; LI, H.; ZHENG, X. - Synergistic effect of chitosan and *Cryptococcus laurentii* on inhibition of *Penicillium expansum* infections. International Journal of Food Microbiology. 2007, 114 (3): 261-266.

ZARZOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURU, F.; QUEROL, A. - Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. International Journal of Systematic Bacteriology. 1999, 49: 329-337

ZHANG, D.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. - Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. Biological Control. 2010, 54 (3): 172-180.

ZHANG, H.; WANG, L.; ZHENG, X. DONG, Y. - Effect of yeast antagonist in combination with heat treatment on postharvest blue mold decay and *Rhizopus* decay of peaches. International Journal of Food Microbiology. 2007, 115: 53-58.

ZHANG, H.; WANG, L.; DONG, Y.; JIANG, S.; ZHANG, H.; ZHENG, X. - Control of postharvest pear diseases using *Rhodotorula glutinis* and its effects on postharvest quality parameters. International Journal of Food Microbiology. 2008, 126: 167-171.

ZHANG, H.; ZHENG, X.; WANG, L.; LI, S.; LIU, R. - Effect of yeast antagonist in combination with hot water dips on postharvest *Rhizopus* rot of strawberries. Journal of Food Engineering. 2007, 78 (1): 281-287.

ZHONG, Y; LIU, J.; LI, B.; QIN, G.; TIAN, S. - Effects of yeast antagonists in combination with hot water treatment on postharvest diseases of tomato fruit. Biological Control. 2010, 54(3): 316-321.

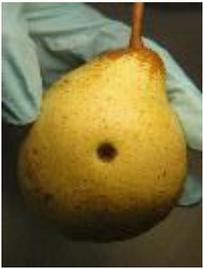
ZULLO, B.; CIOCCIA, G.; CIAFARDINI, G. - Distribution of dimorphic yeast species in commercial extra virgin olive oil. Food Microbiology. 2010, 27(8): 1035-42.

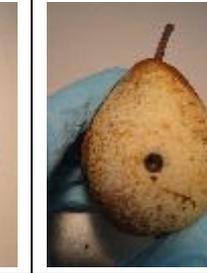
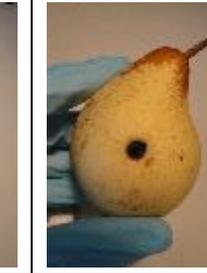
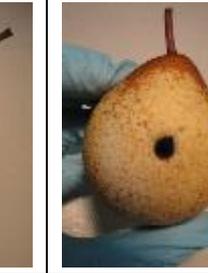
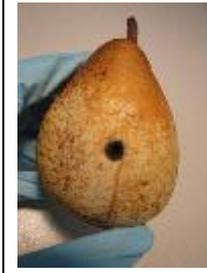
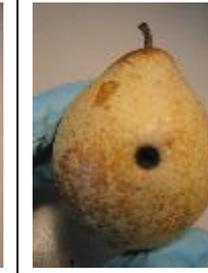
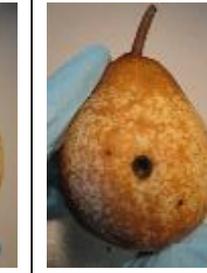
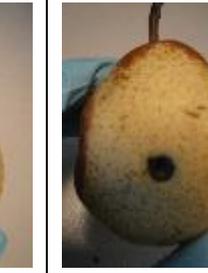
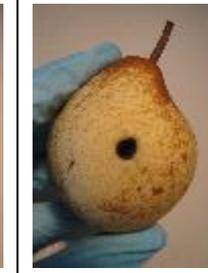
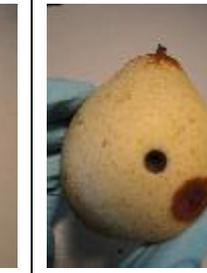
7 Anexos

Anexo A – Registo fotográfico da incidência de podridão (ensaio 4.3)

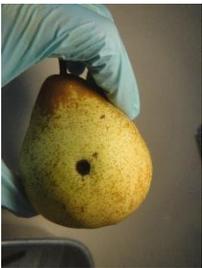
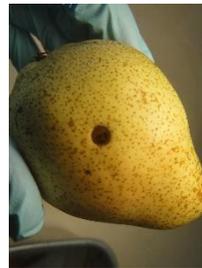
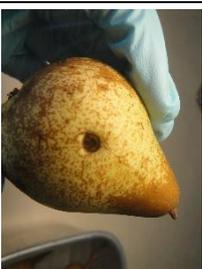
Controlo

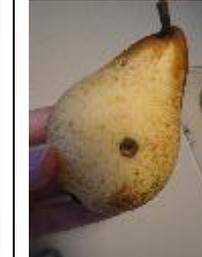
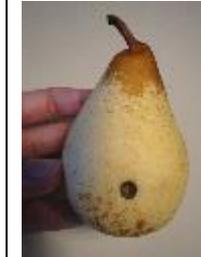
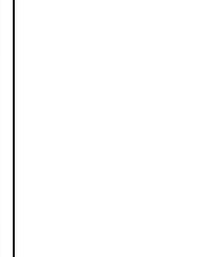
Armazenagem (dia) 0					
Armazenagem (dia) 15					
Armazenagem (dia) 15					

Armazenagem (dia) 15					
Armazenagem (dia) 45					
Armazenagem (dia) 45					
Armazenagem (dia) 45					
Armazenagem (dia) 45					
Armazenagem (dia) 45					

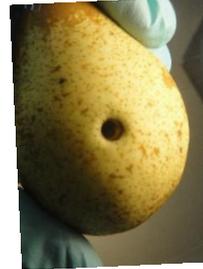
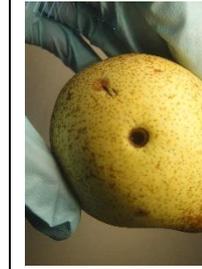
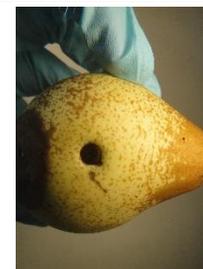
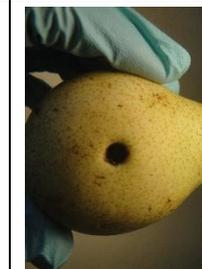
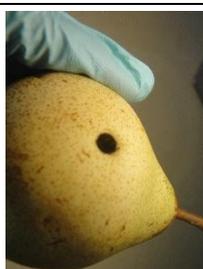
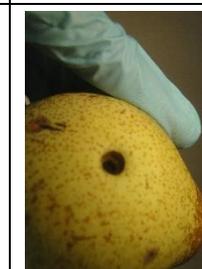
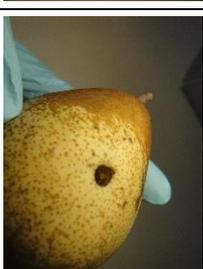
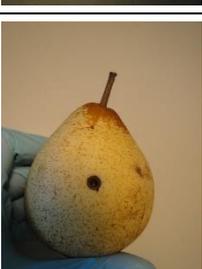
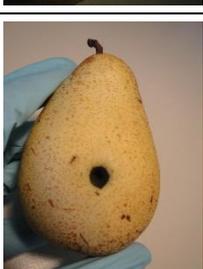
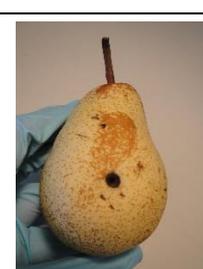
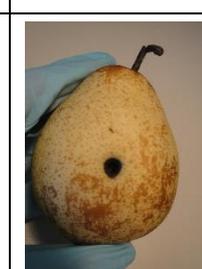
Armazenagem (dia) 45					
Armazenagem (dia) 60					
Armazenagem (dia) 60					
Armazenagem (dia) 60					
Armazenagem (dia) 60					
Armazenagem (dia) 60					

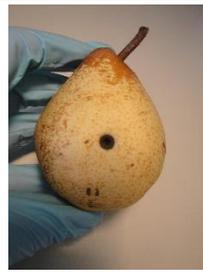
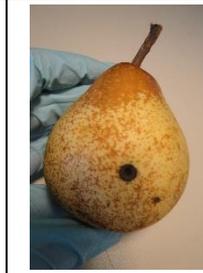
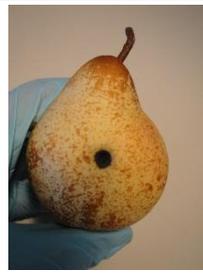
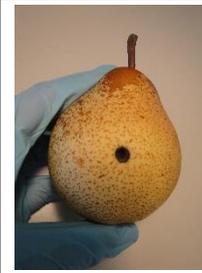
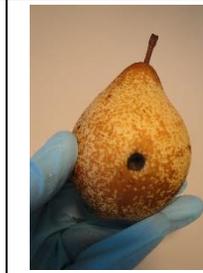
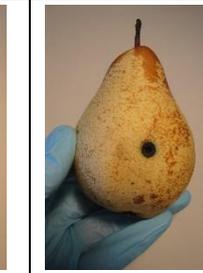
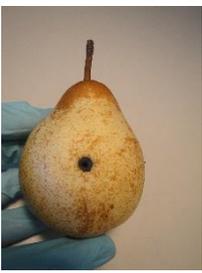
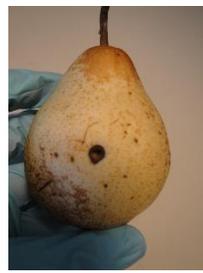
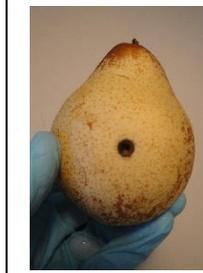
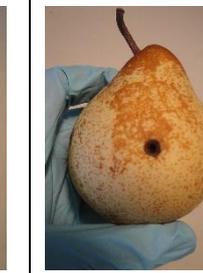
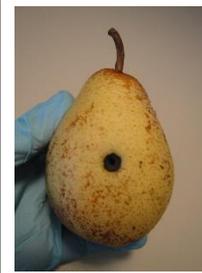
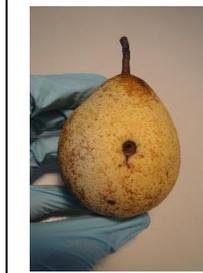
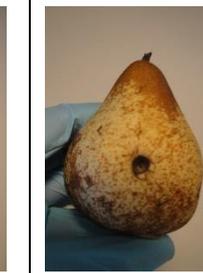
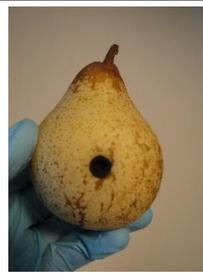
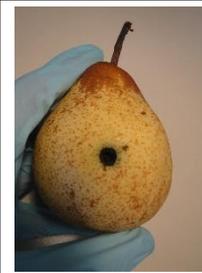
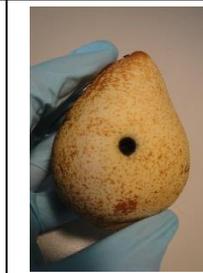
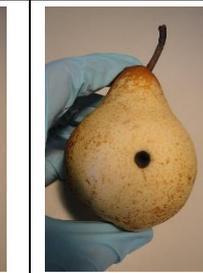
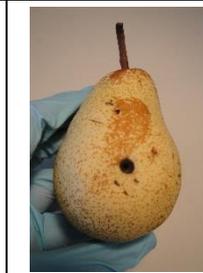
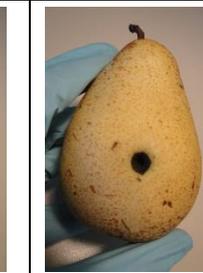
A_i

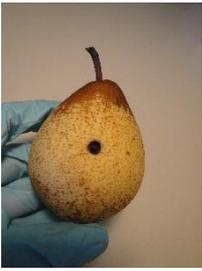
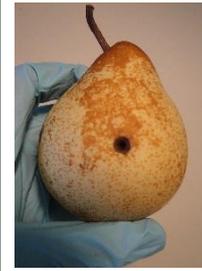
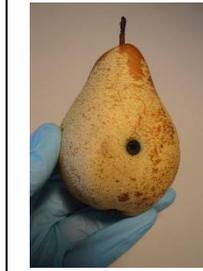
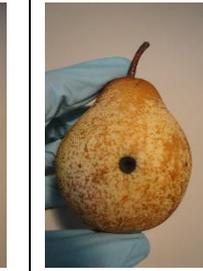
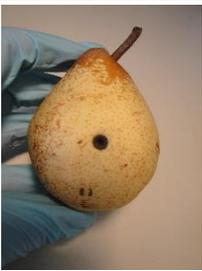
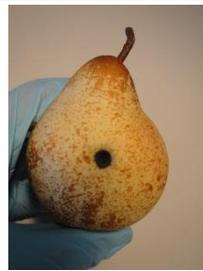
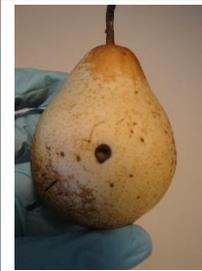
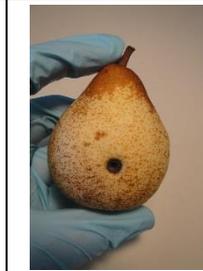
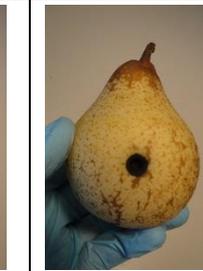
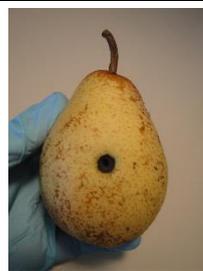
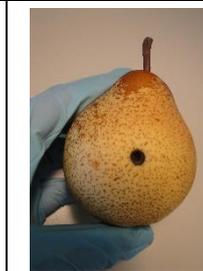
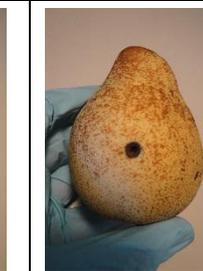
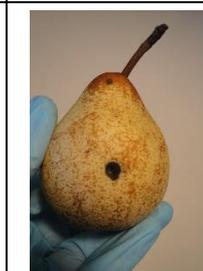
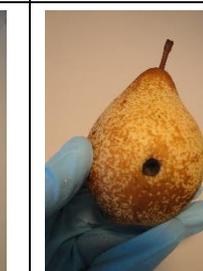
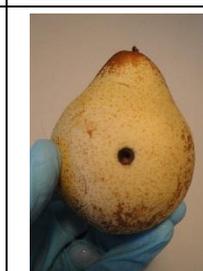
Armazenagem (dia) 0					
Armazenagem (dia) 15					
Armazenagem (dia) 15					
Armazenagem (dia) 15					
Armazenagem (dia) 15					
Armazenagem (dia) 45					

<p>Armazenagem (dia) 45</p>					
<p>Armazenagem (dia) 45</p>					
<p>Armazenagem (dia) 60</p>					

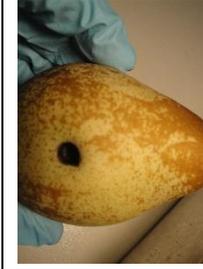
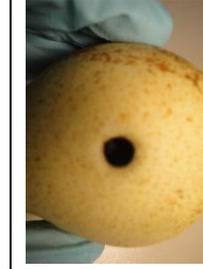
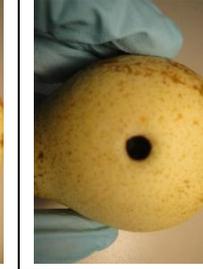
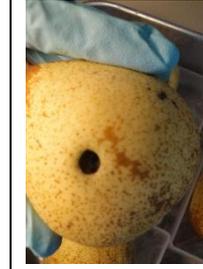
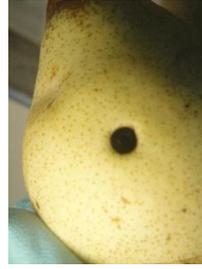
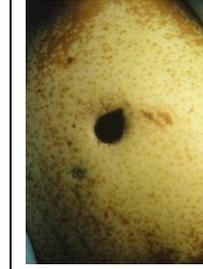
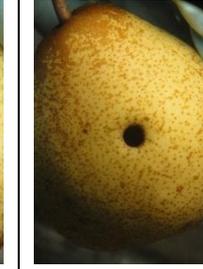
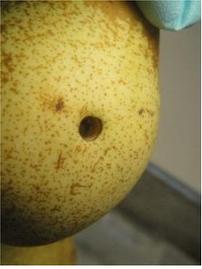
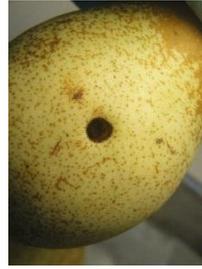
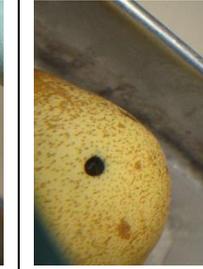
A_L

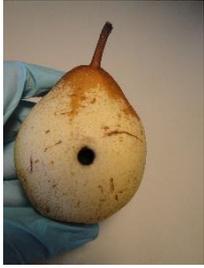
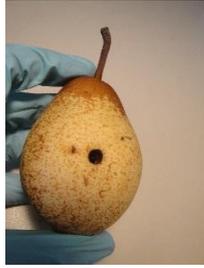
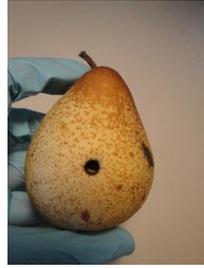
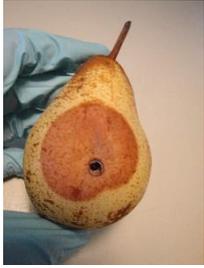
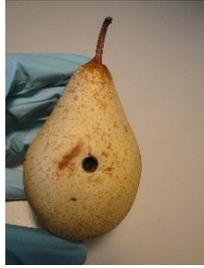
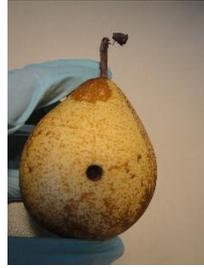
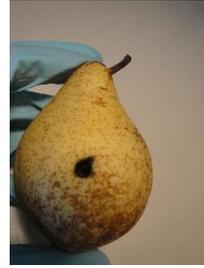
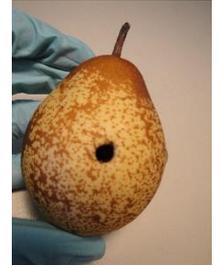
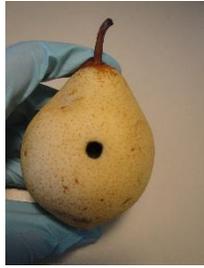
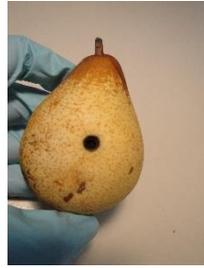
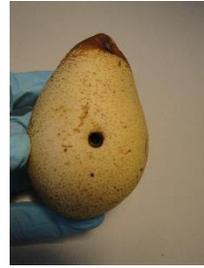
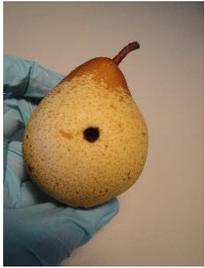
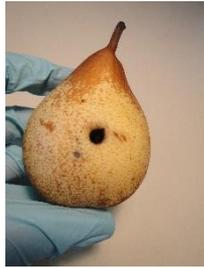
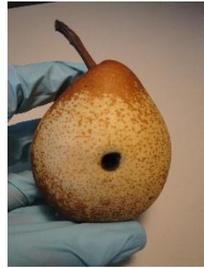
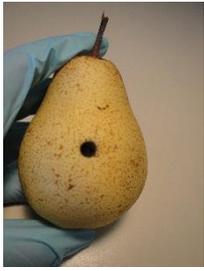
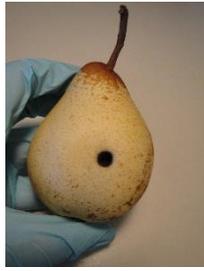
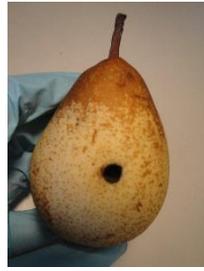
Armazenagem (dia) 0					
Armazenagem (dia) 15					
Armazenagem (dia) 15					
Armazenagem (dia) 15					
Armazenagem (dia) 15					
Armazenagem (dia) 45					

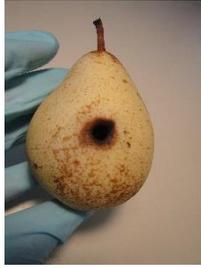
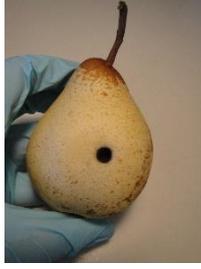
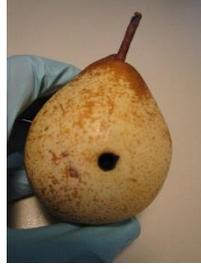
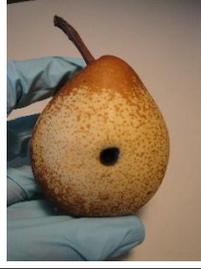
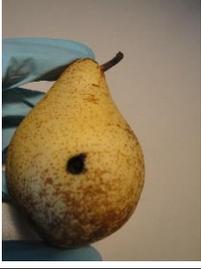
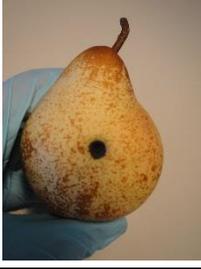
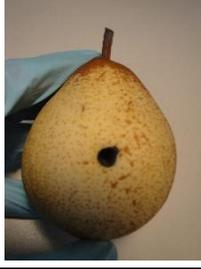
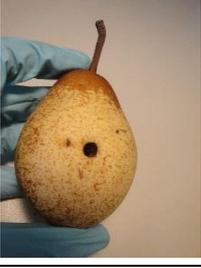
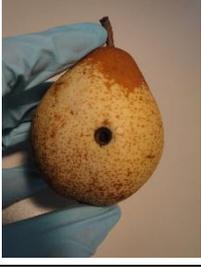
Armazenagem (dia) 45					
Armazenagem (dia) 45					
Armazenagem (dia) 45					
Armazenagem (dia) 45					
Armazenagem (dia) 45					
Armazenagem (dia) 45					

Armazenagem (dia) 60					
Armazenagem (dia) 60					
Armazenagem (dia) 60					
Armazenagem (dia) 60					
Armazenagem (dia) 60					

Top x A

<p>Armazenagem (dia) 0</p>					
<p>Armazenagem (dia) 15</p>					
<p>Armazenagem (dia) 15</p>					
<p>Armazenagem (dia) 15</p>					
<p>Armazenagem (dia) 15</p>					
<p>Armazenagem (dia) 15</p>					

<p>Armazenagem (dia) 45</p>					
<p>Armazenagem (dia) 45</p>					
<p>Armazenagem (dia) 45</p>					
<p>Armazenagem (dia) 45</p>					
<p>Armazenagem (dia) 45</p>					
<p>Armazenagem (dia) 45</p>					

Armazenagem (dia) 45					
Armazenagem (dia) 60					
Armazenagem (dia) 60					
Armazenagem (dia) 60					
Armazenagem (dia) 60					
Armazenagem (dia) 60					

Anexo B – Folha de prova e tabelas de resultados referentes ao ensaio 4.4

Folha de prova de análise sensorial

PROVA DE ANÁLISE SENSORIAL DE FRUTOS DE PERA ROCHA

Data: ___/___/___

Id_Amostra: _____

Nome: _____

Assinale com uma cruz o ponto que melhor traduz a intensidade de percepção de cada atributo.

1. Cor

1	2	3	4	5
Verde	Moderadamente verde	Ligeiramente amarelo	Amarelo	Amarelo escuro

2. Firmeza

1	2	3	4	5
Muito firme	Firme	Moderadamente firme	Mole	Muito mole

1.1.

3. Apreciação Global

1	2	3	4	5
Muito bom	Bom	Suficiente	Mau	Muito mau

Tabela B1 - Resultados médios (\pm DP) dos parâmetros pH, TSS, Cor CIELab, Firmeza e Perda de massa

Id_Am.	Armazenagem	pH	TSS (°Brix)	L*	a*	b*	°h	Firmeza (N)	Perda de massa (%)
C	0	4,6 ^{ab} \pm 0,2	10,9 ^a \pm 0,3	67,8 \pm 1,6	-9,7 \pm 0,9	40,0 \pm 0,9	103,6 ^a \pm 0,9	10,6 ^a \pm 0,9	0,0 ^a \pm 0,0
C	15	4,8 ^{ab} \pm 0,1	11,9 ^a \pm 0,5	69,8 \pm 2,4	-3,8 \pm 0,8	39,4 \pm 1,3	95,5 ^{ab} \pm 1,1	7,0 ^{bc} \pm 1,3	2,2 ^b \pm 0,2
C	45	4,5 ^{ab} \pm 0,1	11,5 ^a \pm 0,2	72,9 \pm 3,1	1,1 \pm 2,1	40,2 \pm 2,7	88,3 ^{bc} \pm 3,2	2,8 ^d \pm 2,7	7,1 ^c \pm 1,0
C	60	4,7 ^{ab} \pm 0,1	11,9 ^a \pm 0,4	70,0 \pm 2,9	1,3 \pm 1,0	38,3 \pm 1,1	88,0 ^{bc} \pm 1,6	1,8 ^d \pm 1,1	8,7 ^{de} \pm 1,0
TA	0	4,5 ^{ab} \pm 0,2	11,3 ^a \pm 1,2	69,5 \pm 1,1	-8,3 \pm 2,7	38,9 \pm 1,3	101,9 ^a \pm 3,7	9,9 ^{abc} \pm 1,3	0,0 ^a \pm 0,0
TA	15	4,7 ^{ab} \pm 0,2	11,9 ^a \pm 0,4	69,4 \pm 2,6	-3,5 \pm 1,8	41,2 \pm 1,0	94,8 ^{abc} \pm 2,4	6,8 ^c \pm 1,0	2,3 ^b \pm 0,1
TA	45	4,7 ^{ab} \pm 0,4	13,0 ^a \pm 0,8	72,8 \pm 0,7	0,8 \pm 1,0	39,0 \pm 1,6	88,9 ^{bc} \pm 1,5	2,5 ^d \pm 1,6	7,1 ^c \pm 0,6
TA	60	4,9 ^b \pm 0,1	12,0 ^a \pm 1,5	70,9 \pm 3,2	1,6 \pm 2,3	39,4 \pm 1,2	87,5 ^{bc} \pm 3,6	2,9 ^d \pm 1,2	9,1 ^e \pm 0,5
Top	0	4,8 ^{ab} \pm 0,1	12,0 ^a \pm 0,7	68,6 \pm 3,7	-6,6 \pm 1,1	37,8 \pm 0,2	99,8 ^{ab} \pm 1,8	10,2 ^{ab} \pm 0,2	0,1 ^a \pm 0,0
Top	15	4,6 ^{ab} \pm 0,2	11,9 ^a \pm 0,5	68,9 \pm 1,8	-4,0 \pm 1,7	39,8 \pm 1,0	95,6 ^{ab} \pm 2,3	9,1 ^{abc} \pm 1,0	3,1 ^b \pm 0,1
Top	45	4,6 ^{ab} \pm 0,1	11,6 ^a \pm 1,2	73,3 \pm 1,2	-0,1 \pm 1,0	39,0 \pm 0,6	90,2 ^{bc} \pm 1,4	2,8 ^d \pm 0,6	7,6 ^{cd} \pm 0,5
Top	60	4,5 ^{ab} \pm 0,2	13,4 ^a \pm 1,1	60,8 \pm 1,1	5,3 \pm 1,1	32,6 \pm 0,9	86,6 ^{bc} \pm 9,2	1,7 ^d \pm 0,9	9,8 ^e \pm 0,2
Top x A	0	4,8 ^{ab} \pm 0,1	11,8 ^a \pm 1,5	66,8 \pm 2,7	-8,6 \pm 0,3	39,4 \pm 1,2	102,2 ^a \pm 0,8	10,1 ^{abc} \pm 1,2	0,0 ^a \pm 0,0
Top x A	15	4,9 ^{ab} \pm 0,1	11,8 ^a \pm 1,7	66,3 \pm 3,1	-3,4 \pm 0,9	39,4 \pm 0,8	94,7 ^{abc} \pm 1,2	9,6 ^{abc} \pm 0,8	3,0 ^b \pm 0,1
Top x A	45	4,4 ^a \pm 0,1	12,3 ^a \pm 1,2	69,8 \pm 1,2	2,7 \pm 0,9	40,9 \pm 1,7	86,1 ^c \pm 1,4	2,9 ^d \pm 1,7	7,6 ^{cd} \pm 0,5
Top x A	60	4,5 ^{ab} \pm 0,1	12,4 ^a \pm 0,9	69,3 \pm 1,2	2,7 \pm 0,8	39,8 \pm 1,3	85,9 ^c \pm 1,2	2,8 ^d \pm 1,3	9,3 ^e \pm 0,2

Nota: Na mesma coluna, letras diferentes representam diferenças significativas para $p=0,05$.

Tabela B2 - Resultados médios (\pm DP) dos parâmetros microbiológicos: contagem de bolores e leveduras e incidência de podridão (%) e atributos sensoriais: cor e firmeza e da apreciação global.

Id_Am.	Armazenagem	Bolores (Log₁₀ufc.g⁻¹)	Leveduras (Log₁₀ufc.g⁻¹)	Inc. Podridão (%)	Cor	Firmeza	Apreciação Global
C	0	2,8 ^a \pm 0,6	3,2 ^a \pm 0,7	0,0 \pm 0,0	1,0 ^a \pm 0,0	1,0 ^a \pm 0,0	1,0 ^a \pm 0,0
C	15			0,0 \pm 0,0	1,4 ^a \pm 0,5	1,6 ^a \pm 0,8	1,7 ^a \pm 0,5
C	45			66,7 \pm 16,5	5,0 ^d \pm 0,0	5,0 ^b \pm 0,0	5,0 ^d \pm 0,0
C	60			66,7 \pm 16,5	2,9 ^{bc} \pm 0,7	5,0 ^b \pm 0,0	4,2 ^{bc} \pm 0,4
TA	0	2,5 ^{ab} \pm 0,3	2,9 ^a \pm 0,2	0,0 \pm 0,0	1,0 ^a \pm 0,0	1,0 ^a \pm 0,0	1,0 ^a \pm 0,0
TA	15			0,0 \pm 0,0	1,2 ^a \pm 0,3	1,1 ^a \pm 0,2	1,2 ^a \pm 0,4
TA	45			17,0 \pm 0,0	5,0 ^d \pm 0,0	5,0 ^b \pm 0,0	5,0 ^d \pm 0,0
TA	60			67,0 \pm 17,0	3,2 ^{bc} \pm 0,5	5,0 ^b \pm 0,0	4,2 ^{bc} \pm 0,4
Top	0	0,0 ^c \pm 0,0	0,0 ^b \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	1,0 ^a \pm 0,0	1,0 ^a \pm 0,0	1,0 ^a \pm 0,0
Top	15			0,0 \pm 0,0	1,1 ^a \pm 0,2	1,4 ^a \pm 0,5	1,3 ^a \pm 0,5
Top	45			0,0 \pm 0,0	2,4 ^b \pm 0,5	4,5 ^b \pm 0,4	3,7 ^b \pm 0,5
Top	60			0,0 \pm 0,0	2,8 ^b \pm 0,8	5,0 ^b \pm 0,0	4,2 ^{bc} \pm 0,4
Top x A	0	1,0 ^{bc} \pm 0,9	1,6 ^c \pm 0,4	0,0 \pm 0,0	1,0 ^a \pm 0,0	1,0 ^a \pm 0,0	1,0 ^a \pm 0,0
Top x A	15			17,0 \pm 0,0	1,1 ^a \pm 0,2	1,4 ^a \pm 0,5	1,3 ^a \pm 0,5
Top x A	45			34,0 \pm 0,0	5,0 ^d \pm 0,0	5,0 ^b \pm 0,0	5,0 ^d \pm 0,0
Top x A	60			34,0 \pm 0,0	3,7 ^c \pm 0,6	5,0 ^b \pm 0,0	4,5 ^{cd} \pm 0,5

Nota: Na mesma coluna, letras diferentes representam diferenças significativas para $p=0,05$.