

AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS ASSOCIADOS À MATURAÇÃO DA PERA ROCHA

RITA AMADO BARBOSA

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DE GRAU DE MESTRE EM

ENGENHARIA QUÍMICA

ORIENTADOR: Professora Doutora Maria Filipa Gomes Ribeiro
Professora Doutora Ana Cristina Ferreira de Oliveira Rodrigues

JÚRI

PRESIDENTE: Professora Doutora Maria Joana Castelo-Branco de Assis Teixeira Neiva Correia
ORIENTADOR: Professora Doutora Maria Filipa Gomes Ribeiro
VOGAL: Professor Doutor João Miguel Alves da Silva

DEZEMBRO 2020

EM COLABORAÇÃO COM



AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à professora doutora Ana Cristina Ferreira de Oliveira Rodrigues pela motivação, pela confiança, pelo optimismo que sempre mostrou e por todo o acompanhamento e apoio ao longo destes meses.

À professora doutora Maria Filipa Gomes Ribeiro por todos os conhecimentos que me transmitiu e por se ter demonstrado sempre disponível para me ajudar.

Um agradecimento muito especial à Carmen Dionisio e à Catarina Brito por me terem acolhido no RochaCenter de forma excepcional, por ouvirem os meus desesperos e celebrarem comigo as pequenas conquistas, pela ajuda, motivação, disponibilidade, pela paciência e amizade, que certamente se irá manter. O seu apoio foi fundamental para mim e para a execução deste trabalho.

Ao doutor Auguste Fernandes por toda a ajuda prestada sempre que foi necessário.

À Cindy Dias pela disponibilidade, simpatia e ensinamentos relativamente às análises em GC-MS.

À Cátia Costa por me ter recebido no laboratório de química estrutural no Instituto Superior Técnico com toda a simpatia.

A todos os meus amigos e às minhas colegas de faculdade e amigas Patrícia Correia, Ana Lourenço, Carolina Belga e Patrícia Abreu por me terem acompanhado nesta fase e em todo o meu percurso, pelo apoio e pelos momentos de diversão e alegria que me proporcionaram e partilharam comigo.

Em especial à Patty, amiguinha desde o primeiro dia, por estar sempre presente nos bons e nos maus momentos, tornando sempre tudo um pouco mais fácil.

A todos os que acompanharam o meu percurso, pois de uma forma ou outra todos contribuíram para que eu chegasse até aqui, em especial ao João Duarte e ao Bernardo Pessanha, por apesar de por vezes um pouco mais distantes, estarem sempre lá para me ouvir.

À minha madrinha, Beatriz Forte, por ser como uma mentora para mim e uma inspiração, pelo apoio e pela motivação.

Ao Miguel por ter sido o meu escape da realidade.

À minha família, pelo apoio consante e incondicional. Sem ela nada disto teria sido possível. Em especial à minha mãe, Maria Helena Barbosa, e ao meu avô, Guilherme Amado, que sempre fizeram tudo por mim e pelos meus irmãos.

AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS ASSOCIADOS À MATURAÇÃO DA PERA

ROCHA

RESUMO

A pera Rocha é uma das frutas mais importantes para a economia portuguesa e o seu armazenamento e conservação ao longo do ano são fatores cruciais. No entanto, e apesar de diferentes tecnologias disponíveis, continuam a existir problemas na preservação da qualidade dos frutos ocorrendo acidentes fisiológicos como o escaldão superficial e os acastanhamentos internos.

O objetivo deste trabalho consistiu na caracterização físico-química da pera Rocha e no desenvolvimento de um método de análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, para identificar os compostos orgânicos voláteis (VOCs) libertados pelos frutos durante a fase de maturação e conservação.

Utilizaram-se dois métodos diferentes, um para a deteção do etileno (*Select ion monitoring* - SIM) e outro para os restantes compostos (*full scan*). Na atmosfera gasosa das câmaras de conservação, foram detectados mais de 40 VOCs, entre eles o 1-hexanol, o acetato de hexilo, o etanol, o 1-butanol, o acetato de butilo e o acetaldeído com maiores abundâncias relativas. O composto produzido pelas peras em maior quantidade foi o etanol. Em todas as condições de conservação testadas (Atmosfera Normal (AN), Atmosfera Controlada (AC), AC + 1-MCP (1-metilciclopropeno), e *Ultra Low Oxygen* (ULO)), houve uma maior produção de álcoois do que de ésteres. O mesmo verificou-se nas amostras testadas sob condições de AN e temperatura ambiente com *shelf-life* de 5 e 14 dias. O 1-hexanol revelou ser o composto mais significativo encontrando-se sempre presente além do etanol. Este estudo permitirá uma melhor compreensão do metabolismo da pera Rocha e possivelmente a otimização da sua conservação no futuro.

Palavras-chave: Pera Rocha, etileno, voláteis (VOCs), GC-MS, atmosferas de conservação, 1-MCP

EVALUATION OF THE VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS ASSOCIATED TO ROCHA PEAR'S MATURATION

ABSTRACT

Rocha pear is one of the most important fruits for portuguese economy and its storage and conservation throughout the year are crucial factors. However, and despite the different technologies available, there are still problems in preserving fruit's quality, with physiological disorders such as superficial scald and internal browning occurring.

The objective of this work was the physico-chemical characterization of Rocha pear and the development of a gas chromatography coupled with mass spectrometry analysis method, to identify the volatile organic compounds (VOCs) released by the fruits during the ripening stage and throughout storage.

Two different methods were used, one for the detection of ethylene (*Select ion monitoring* - SIM) and the other for the remaining compounds (full scan). In the gaseous atmosphere of the storage chambers, more than 40 VOCs were detected, including 1-hexanol, hexyl acetate, ethanol, 1-butanol, butyl acetate and acetaldehyde with greater relative abundances. The compound produced by pears in greater quantity was ethanol. In all the tested storage conditions (Normal Atmosphere (NA), Controlled Atmosphere (CA), CA + 1-MCP (1-methylcyclopropene), and Ultra Low Oxygen (ULO)), there was a higher production of alcohols than esters. The same was verified in the samples tested under the condition of NA with shelf life of 1, 5 and 14 days. 1-hexanol proved to be the most significant compound and is always present in addition to ethanol. This study will allow a better understanding of the Rocha pear metabolism and possibly the optimization of its storage in the future.

Key-words: Rocha pear, ethylene, volatiles (VOCs), GC-MS, storage atmospheres, 1-MCP

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1	A PERA ROCHA	3
2.2	FRUTO	5
2.3	IMPORTÂNCIA ECONÓMICA	6
2.4	DESENVOLVIMENTO FISIOLÓGICO DO FRUTO	7
2.5	ESTADO DE MATURAÇÃO	9
2.6	ARMAZENAMENTO E CONSERVAÇÃO DA PERA ROCHA	11
2.6.1	<i>Armazenamento em Atmosfera controlada</i>	12
2.6.2	<i>Armazenamento em atmosfera com reduzido Teor de oxigénio (Ultra Low Oxygen)</i>	13
2.6.3	<i>Acidentes Fisiológicos</i>	14
	• Escaldão superficial	14
	• Acastanhamento interno	15
2.6.4	<i>Utilização de Difenilamina (DPA)</i>	17
2.6.5	<i>Utilização de 1-MCP</i>	18
2.7	COMPOSTOS VOLÁTEIS	19
2.8	DETEÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA COM ESPECTROMETRIA DE MASSA (GC-MS)	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	AMOSTRAS	25
3.2	REAGENTES	25
3.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FRUTOS PÓS-COLHEITA	26
3.3.1	<i>Determinação da cor</i>	26
3.3.2	<i>Peso</i>	27
3.3.3	<i>Calibre</i>	27
3.3.4	<i>Firmeza da polpa</i>	27
3.3.5	<i>Teor em sólidos solúveis (TSS)</i>	28
3.3.6	<i>Teste de regressão do amido</i>	28
3.3.7	<i>Acidez total titulável</i>	29
3.3.8	<i>Quantificação de compostos fenólicos</i>	29
3.3.8.1	Recta de calibração	29
3.3.8.2	Extracção	30

3.3.8.3	Método Colorimétrico.....	30
3.3.9	<i>Determinação da capacidade antioxidante</i>	31
3.3.9.1	Solução de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)	31
3.3.9.2	Recta de calibração	31
3.3.9.3	Extracção de antioxidantes	31
3.3.9.4	Método DPPH.....	32
3.3.10	<i>Trienos conjugados e α-farneseno</i>	32
3.4	ANÁLISE DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS: OPTIMIZAÇÃO DO MÉTODO	32
3.4.1	<i>Equipamento</i>	32
3.4.2	<i>Identificação do etileno</i>	33
3.4.3	<i>Análise de Amostras reais</i>	38
3.4.4	<i>Deteção de Compostos Orgânicos Voláteis</i>	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FRUTOS PÓS-COLHEITA	51
4.2	ANÁLISE DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS	60
4.2.1	<i>Deteção do etileno</i>	61
4.2.2	<i>Perfil de compostos orgânicos voláteis (full-scan)</i>	62
5	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
A	ANEXOS	1
A.1	TABELA DE REGRESSÃO DO AMIDO	1
A.2	RECTA DE CALIBRAÇÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	2
A.3	RECTA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAR A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	2
A.4	ESPECTROS DE MASSA	3
A.5	SOFTWARE GC-MS: IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS	5
A.6	CROMATOGRAMAS E ESPECTROS DE MASSA.....	6

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - VOC's de maior importância produzidos pela pera e principais funções ou manifestações da sua presença	21
Tabela 2 - Quantidades necessárias de solução mãe e de água destilada de modo a preparar as soluções da recta de calibração para a quantificação de compostos fenólicos.	30
Tabela 3 - Quantidades necessárias para a preparação das soluções para a recta de calibração utilizada na determinação da capacidade antioxidante.....	31
Tabela 4 - Parâmetros do método instrumental GC-MS otimizado para a detecção de etileno.	38
Tabela 5 – Parâmetros do método instrumental otimizado para a detecção de etileno.	48
Tabela 6 - Condições dos parâmetros para definir o método instrumental do GC-MS para a detecção de VOCs.	49
Tabela 7 - Valores médios de calibre, peso e dureza, à colheita, de peras provenientes de três pomares distintos.	51
Tabela 8 – Valores médios dos dados da cor da epiderme das peras de cada pomar à colheita.	53
Tabela 9 - Teor de sólidos solúveis e taxa de regressão de amido médios dos frutos de cada pomar, à colheita.	54
Tabela 10 - Valores médios de acidez titulável, quantificação de compostos fenólicos, capacidade antioxidante e de α -farneseno e trienos conjugados relativos aos frutos de cada pomar, à colheita, com os respectivos desvios padrão.	55
Tabela 11 - Tabela resumo com a caracterização físico-química à colheita das peras de cada um dos pomares.	60
Tabela 12 - Compostos orgânicos voláteis detectados em amostra de pera Rocha após 14 dias de <i>shelf life</i> à temperatura ambiente e em excicador com respectivo tempo de retenção (TR), área e percentagem do pico e percentagem de altura do pico (abundância relativa no cromatograma).	62
Tabela 13 - VOCs de interesse referidos na bibliografia e identificados em pera Rocha.	64
Tabela 14 - Condições das câmaras de conservação estudadas.	65
Tabela 15 - Compostos identificados como de maior interesse e detectados para a amostra da câmara 7.	66
Tabela 16 - Compostos identificados como de maior interesse e detectados para a amostra da câmara 8.	67
Tabela 17 - Compostos identificados como de maior interesse e detectados para a amostra da câmara 9.	68
Tabela 18 - Compostos identificados como de maior interesse e detectados para a amostra da câmara 10.	69

Tabela 19 - Compostos identificados como de maior interesse e detectados para a amostra das peras após 1 dia em <i>shelf life</i> no excicador e à temperatura ambiente	71
Tabela 20 – VOCs identificados como de maior interesse e detectados para a amostra das peras após 5 dias em <i>shelf life</i> no excicador e à temperatura ambiente.	72
Tabela 21 - Concentrações e absorvâncias das soluções utilizadas para construir a recta de calibração.	2
Tabela 22 – Concentrações recalculadas, absorvâncias e % de inibição de cada solução utilizada para construir a recta de calibração.....	3

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição Geográfica da pereira Rocha. Principais concelhos produtores de pera Rocha em Portugal e com as maiores áreas de produção. Imagem adaptada de [4]	3
Figura 2. Formas predominantes da pera Rocha.	5
Figura 3 - Epiderme e polpa de frutos Pera Rocha.	6
Figura 4 - Relação do estado de crescimento fisiológico dos frutos climatéricos e não-climatéricos com a produção de voláteis, taxa de respiração e de produção de etileno.[17]	8
Figura 5 - Escaldão superficial em pera Rocha. (fotografia do Rocha Center).....	15
Figura 6 - Incidências de acastanhamento interno em pera Rocha.....	16
Figura 7 - Fórmula estrutural do 1-MCP.[58].....	18
Figura 8 - Esquema de um GC-MS.[82].....	22
Figura 9 - Dentro de uma das câmaras de refrigeração do RochaCenter, quatro contentores com caixas de fruta de diferentes cores, cada uma respectiva a um pomar. Na data da fotografia as condições de atmosfera, no interior dos contentores, ainda não tinham sido estabelecidas. [90]	25
Figura 10 - Espaço de cor L* C* hue°. [91].....	27
Figura 11 - Cromatograma TIC da amostra de etileno (4%) e respectivo espectro de massa correspondente ao pico que se apresenta aos 4,76 min.	33
Figura 12 - Comparação do espectro de massa da amostra com o do etileno da biblioteca de espectros (NIST MS Search 2.0).	34
Figura 13 – Cromatograma TIC da amostra de etileno (4%) resultante da alteração do modo <i>splitless</i> para <i>split</i>	35
Figura 14 - Espectro de massa (EI) do nitrogénio.[99].....	36
Figura 15 - Espectro de massa (EI) do etileno.[100]	36
Figura 16 - Cromatograma TIC da amostra de etileno (4%) obtido depois da alteração da gama de massas.....	37
Figura 17 - Cromatograma da amostra de ar da câmara de conservação em AN.	39
Figura 18 - Peras colocadas no excicador, à temperatura ambiente.....	41
Figura 19 - Vinte peras colocadas no excicador com um zeólito (adsorvente).....	42
Figura 20 - Cromatograma da análise ao ar desadsorvido pelo zeólito colocado juntamente com peras no excicador.....	43

Figura 21 - Cromatograma com pico aos 3,93 min e respectivo espectro de massa (amostra de bananas e maçãs).....	44
Figura 22 - Cromatograma com pico aos 3,93 min (etileno) e aos 9,65 min (etanol) observado em peras mantidas durante 4 dias no excicador.....	45
Figura 23 - Cromatograma da amostra com 1 mL do headspace do etanol puro (96%).	45
Figura 24 - Cromatograma da amostra com 1 mL do headspace do etanol puro (96%) e 3 mL de etileno (4%)..	46
Figura 25 - Cromatograma <i>full scan</i> da amostra de peras após 14 dias em <i>shelf life</i>	49
Figura 26 - Calibre (mm) médio, à colheita, dos frutos de cada pomar e correspondente desvio padrão.....	52
Figura 27 - Peso (g) médio, à colheita, dos frutos de cada pomar e correspondente desvio padrão.....	52
Figura 28 – Dureza média (kg/0,5 cm ²) dos frutos de cada pomar.....	53
Figura 29 – Valores médios da luminosidade(L*), croma (C*) e tonalidade (h)de cada pomar com os respectivos desvios padrão.....	54
Figura 30 - Teor de sólidos solúveis (a) e taxa de regressão do amido (b) médios para os frutos de cada pomar, à colheita	55
Figura 31 - Acidez total titulável (g ácido málico/L) média, à colheita, dos frutos de cada pomar e respectivos desvios padrão.....	56
Figura 32 - Quantidade média de compostos fenólicos (mg/g) dos frutos de cada pomar e repectivos desvios padrão.....	57
Figura 33 - Capacidade antioxidante média expressa em mg de ácido ascórbico/g de fruto.	58
Figura 34 - Concentração média de α -farneseno e de trienos conjugados e respectivo desvio padrão de cada pomar pós colheita.	59
Figura 35 – Cromatograma da amostra da câmara 9 obtido para o método de detecção do etileno (pico aos 3,96 min) e respectivo espectro de massa.	61
Figura 36 - Cromatograma <i>full scan</i> obtido para a câmara 7 (abundância relativa vs. tempo (min)).....	66
Figura 37 - Cromatograma <i>full scan</i> obtido para a câmara 8 (abundância relativa vs. tempo (min)).....	67
Figura 38 - Cromatograma <i>full scan</i> obtido para a câmara 9 (abundância relativa vs. tempo (min)).....	68
Figura 39 - Cromatograma <i>full scan</i> obtido para a câmara 10 (abundância relativa vs. tempo (min)).....	69
Figura 40 - Abundância relativa (%) do etanol em cada câmara de conservação/condição de armanejamento. 70	

Figura 41 - Abundância relativa dos VOCs de maior interesse presentes em cada câmara de conservação/condição de armazenamento.....	70
Figura 42 - Cromatograma <i>full scan</i> obtido para as peras após 1 dia em <i>shelf life</i> (abundância relativa vs. tempo (min)).	71
Figura 43 - Cromatograma <i>full scan</i> obtido para as peras após 5 dias em <i>shelf life</i> (abundância relativa vs. tempo (min)).	72
Figura 44 - Abundância relativa (%) dos VOCs de maior interesse das pêras fechadas durante 1 e 5 dias no excicador, à T ambiente.....	73
Figura 45 - Abundância relativa (%) do etanol de peras fechadas durante 1 e 5 dias no excicador, à temperatura ambiente.....	73
Figura 46 - Estádios de Regressão do Amido em Pera Rocha (Avelar & Rodrigues, 1999).[128].....	1
Figura 47 - Recta de calibração para a quantificação de compostos fenólicos. (A vs. C(g/L))	2
Figura 48 - Recta de calibração para a determinação da capacidade antioxidante. (%Inibição vs. C(g/L))	3
Figura 49 - Espectro de massa (EI) do nitrogénio.[99]	3
Figura 50 - Espectro de massa (EI) do etileno.[100]	4
Figura 51 - Espectro de massa (EI) do α -farneseno.[129]	4
Figura 52 - Espectro de massa (EI) do etanol.[130]	4
Figura 53 - Identificação do etileno por comparação do espectro obtido com espectros pelo software.	5
Figura 54 - Cromatograma e espectro de massa do pico identificado como 3-Octanol para a análise de peras em <i>shelf life</i> durante 14 dias.....	6

ABREVIações E SIGLAS

% (v/v) – Percentagem em volume de soluto por volume de solução

% (w/v) – Percentagem de peso (*weight*) de soluto por volume da solução

1-MCP – 1-metilciclopropeno

AC – Atmosfera controlada

Al₂O₃ – Óxido de alumínio ou alumina

Am – Taxa de regressão do amido (1-10)

amu – *Atomic mass unit* (Da)

AN – Atmosfera normal

ANP – Associação Nacional de Pera Rocha

C₂H₄ – Etileno

cm – Centímetro

CO₂ – Dióxido de carbono

D – Firmeza da polpa (kg/0,5 cm²)

DOP – Denominação de Origem Protegida

DPA – Difenilamina

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

EI – *Electron impact*

FE – Fase estacionária

FM – Fase móvel

g – Grama

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

h – Hora

H₂O – Água

HCl – Ácido clorídrico

HS-SPME – Microextração em fase sólida por *headspace*

IR – Índice refractométrico

KCl – Cloreto de potássio

Kg – Quilograma

Km – Quilómetro

KMnO₄ – Permanganato de potássio

L – Litro

m/z – Razão massa-carga

min – Minutos

mm – Milímetro

N₂ – Nitrogénio

NaOH – Hidróxido de sódio

nm – Nanómetro

O₂ – Oxigénio

°C – Graus Celsius

PI – Padrão interno

ppm – Partes por milhão (mg/L)

PPO – Polifenoloxidase

PSA - *Pressure swing adsorbers*

ROS – Espécies reativas de oxigénio

SIM – *Select ion monitoring*

T – Temperatura

TIC – *Total ion chromatogram*

TR – Tempo de retenção

TSS – Teor de sólidos solúveis

UE – União Europeia

ULO – *Ultra low Oxygen*

VOCs – *Volatile Organic Compounds*

μL – Microlitro

1 INTRODUÇÃO

A pera Rocha é um símbolo da região Oeste, tendo sido reconhecida em 2003 como Denominação de Origem Protegida (DOP), selo da União Europeia que certifica a qualidade e tradição de produtos alimentares e agrícolas. A pera é um dos quatro frutos mais consumidos em Portugal e a variedade Rocha é dos produtos agrícolas portugueses mais exportados sendo que cerca de 60% da produção nacional é vendida nos mercados internacionais.

Dada a sua importância económica e o número de toneladas produzidas anualmente, que impede o seu total escoamento logo após a colheita, é de grande interesse conseguir conservar as peras o máximo de tempo possível mantendo as propriedades organolépticas do fruto de modo que o produto renda o máximo possível, sem que haja desperdício e que mantenha a sua qualidade. É possível conservar a pera em câmaras frigoríficas durante sete a oito meses, desde que em atmosfera controlada (AC). Embora tenham surgido novas tecnologias de armazenamento nos últimos anos (atmosfera *ultra low oxygen* (ULO), 1-MCP), a preservação da qualidade intrínseca da pera continua a ser um desafio para os produtores. Ao longo da conservação com as diferentes tecnologias e protocolos existentes acabam por surgir alguns problemas como a perda de qualidade organoléptica ou o desenvolvimento de acidentes fisiológicos como são o escaldão superficial e o acastanhamento interno.

O presente trabalho foi desenvolvido no RochaCenter ACE, o primeiro centro privado de investigação de pós-colheita e tecnologia em Portugal. Após escritura pública no final de 2017, o centro começou a ser implementado em 2018, sendo maioritariamente financiado pelos sócios que se constituíram num agrupamento complementar de empresas. Sendo um centro de investigação recente, o grande desafio do presente trabalho centrou-se no desenvolvimento, implementação e otimização de métodos de análise cromatográfica com utilização dos recursos disponíveis.

Um dos grandes objetivos do RochaCenter é a realização de análises recorrendo ao uso do GC-MS com o intuito de identificação e quantificação de compostos voláteis produzidos e libertados durante o período de conservação/armazenamento. Através do estudo dos voláteis libertados ambiciona-se uma melhor compreensão do metabolismo e funcionamento da pera Rocha e consequentemente assim uma possível otimização na conservação.

Apesar do GC-MS estar disponível no laboratório, a sua instalação foi finalizada em Fevereiro de 2020 e os estudos recorrendo a este método ainda não se tinham iniciado por toda a investigação a decorrer ser ainda muito recente. Assim, a presente dissertação descreve o início e desenvolvimento dos primeiros testes realizados no RochaCenter com a utilização da presente técnica de análise.

Logo, os objetivos deste trabalho eram fazer uma caracterização físico-química dos frutos de modo a possivelmente mais tarde estabelecer uma relação entre esta e os compostos orgânicos voláteis produzidos, a otimização do método instrumental de análise do GC-MS para a deteção e identificação dos compostos orgânicos voláteis emitidos pela pera, entre eles e sobretudo o etileno. Uma vez definido o método, poderia fazer-se a análise das atmosferas implementadas nas diferentes câmaras de conservação (AN (atmosfera normal), AC, ULO e com 1-MCP) bem como a peras em *shelf life*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A PERA ROCHA

A variedade de pereira “Rocha” pertence à família das Rosáceas, subfamília das Pomóideas, género *Pyrus* e espécie *Pyrus communis* L. É uma variedade portuguesa, obtida casualmente de semente e descoberta em 1836 na fazenda do alquilador Pedro António Rocha, no concelho de Sintra. Apesar da sua produção se encontrar concentrada na região do Ribatejo e Oeste, na orla marítima desde Sintra até Alcobaça, hoje em dia a pera Rocha produz-se um pouco por todo o país, incluindo no Alentejo (Figura 1). A região Oeste representa 86% da área plantada de pereira Rocha e 87% da produção total de pera do Continente. Os principais concelhos produtores são Cadaval, Bombarral, Torres Vedras, Caldas da Rainha, Alcobaça, Lourinhã, Óbidos e Mafra [1][2]. A restante produção é distribuída principalmente por Leiria, Covilhã, Fundão e Ferreira do Alentejo [3].

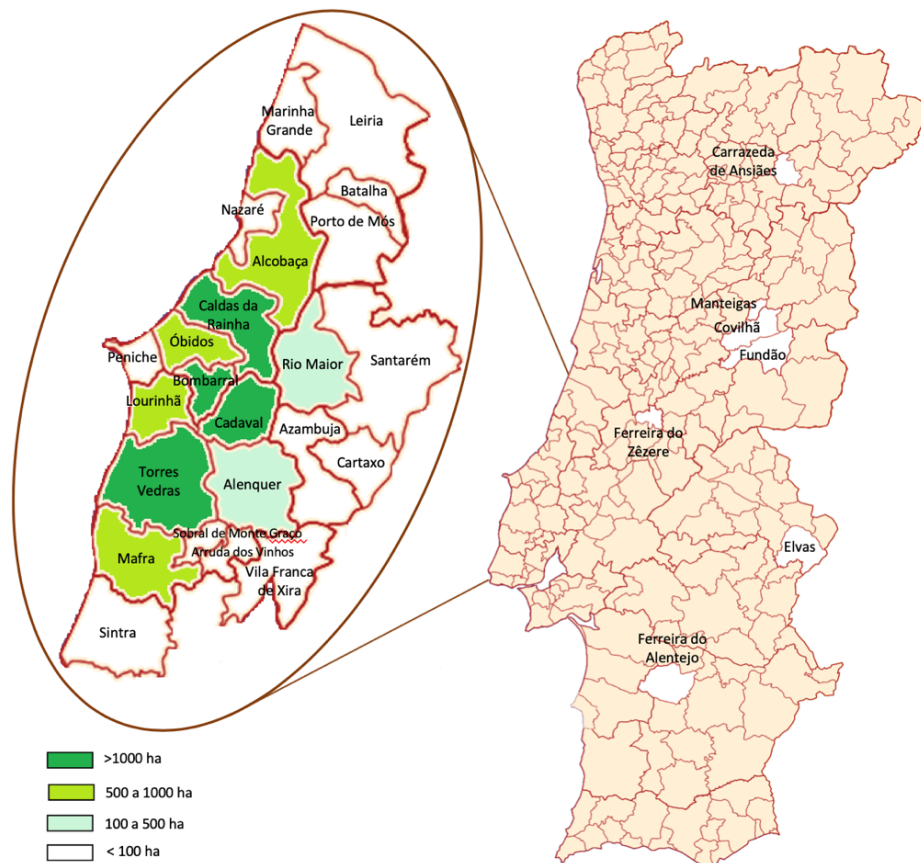


Figura 1 - Distribuição Geográfica da pereira Rocha. Principais concelhos produtores de pera Rocha em Portugal e com as maiores áreas de produção. Imagem adaptada de [4].

As características físicas, químicas e sensoriais da pera Rocha do Oeste estão intimamente relacionadas com a área geográfica de origem, a região do Oeste, que tem condições únicas e determinantes para esta cultura e para lhe dar as suas características (cor, textura e sabor). Estas características são descritas e reconhecidas pela denominação de origem protegida (DOP) [2]. O microclima específico desta região, o relevo, a humidade do ar, o tipo de solo ou o vento bem como a proximidade do mar têm um papel preponderante nas características da pera. A estes fatores associam-se ainda os conhecimentos dos produtores e os métodos locais de produção.

Nesta região de Portugal o clima pode caracterizar-se como moderadamente chuvoso constatando-se que o período de chuvas mais intenso ocorre nos meses de Novembro a Abril. Os pomares mais antigos eram instalados em sequeiro (62% sem rega). No entanto, de modo a otimizar produções e calibres, os novos pomares têm sido instalados com rega.

No que toca às temperaturas, estas exercem uma ação direta sobre o desenvolvimento de todos os órgãos vegetativos (gomos, ramos, raízes, folhas e frutos). Tanto as temperaturas baixas como as muito altas durante o período de atividade vegetativa, limitam o crescimento de ramos e frutos e conseqüentemente as produções. Desta forma, a temperatura média anual do ar desta zona é de 15°C, considerando-se um clima temperado.

O número de dias de geada por ano é reduzido e existe nebulosidade. No que toca à humidade, regista-se uma humidade relativa do ar a variar entre 75 e 85%, determinada pelo mar e pela incidência dos ventos dominantes bem como pelas neblinas noturnas. Conclui-se então que este é um clima de características oceânico na faixa litoral e que se estende até cerca de 10 km da costa [1][2].

No que respeita aos solos, no Oeste, a pereira Rocha ocupa preferencialmente os terrenos onde há um relativo equilíbrio entre os teores de argila e areia fina e valores de pH entre 6 e 7,5. A estrutura destes solos é geralmente instável, estes são predominantemente constituídos por ilite, mineral rico em potássio. Nestes solos, ótimos para a pereira, o perfil apresenta-se diferenciado não apenas em função da natureza da rocha-mãe, mas também em função do declive, da intensidade dos fenómenos erosivos e da drenagem externa, que são, por sua vez, dependentes das características do relevo [5].

É nesta região, com as suas condições edafoclimáticas únicas e de qualidade, que a cultivar Rocha expressa todo o seu potencial conduzindo à classificação de um produto DOP, atribuída pela União Europeia em 2003 [6]. A pera Rocha do Oeste, exclusivamente portuguesa, manteve inalteráveis, ao longo dos anos, as suas características originais que lhe conferem um carácter de exceção reconhecido no mundo inteiro [1].

2.2 FRUTO

A pera da variedade Rocha, obtida na região do Oeste, caracteriza-se por apresentar frutos com várias características específicas.

A sua superfície é lisa e a forma da pera é variável. Podem ser mais arredondadas devido a uma boa polinização e podem ter formas mais alongadas devido ao estímulo partenocárpico (frutos que se formam sem fecundação e as suas sementes não se desenvolvem). As formas predominantes são redonda ovada, redonda piriforme e piriforme ovada (Figura 2). O fruto tem uma fossa basilar inexistente e uma fossa apical muito pouco pronunciada com a coroa clara, de superfície lisa [1][2].



Figura 2. Formas predominantes da pera Rocha.

Em relação ao calibre, que corresponde ao diâmetro na maior secção do fruto, a produção em sequeiro, condicionada pela disponibilidade de água, apresenta elevada percentagem de frutos com calibres entre os 55 e os 65 mm. O calibre mínimo de comercialização é de 45 a 50 mm sendo que os frutos com um valor inferior vão para a indústria. Atualmente são atingidos calibres entre 65 até 75 mm em elevadas percentagens em pomares devidamente instalados, podados, mondados, fertilizados e irrigados.

O fruto apresenta, na maioria dos casos, um pedúnculo comprido, lenhoso e fino. O comprimento do pedúnculo pode variar de 28 a 35 mm. O pedúnculo médio (33 mm) é predominante nos frutos de forma redonda ovada e piriforme, curto (28 mm) nos frutos de forma oblonga piriforme ovalada e direito nos frutos de forma redonda ovada [2].

A epiderme da pera Rocha do Oeste é de cor amarelo-verde claro e apresenta uma carepa típica, em qualquer que seja o formato da pera, notória à volta do pedúnculo, menos acentuada na zona apical e com suaves pontuações dispersas irregularmente por toda a superfície do fruto (Figura 3). A sua cor amarela ornamentada por uma carepa bronzeada permite criar uma imagem atraente, tornando-se mais apelativa do que outras variedades de peras verdes ou avermelhadas. Esta característica é muito importante e típica desta variedade quando cultivada no seu solar de origem [1][7].

A passagem dos frutos por calibradores mais agressivos pode ainda contribuir para que a epiderme apresente ligeiras estrias de cor castanha e, por vezes, encontram-se frutos com manchas tenuemente rosada do lado da incidência de luz solar direta [1].

No que toca à polpa do fruto, esta caracteriza-se pela cor branca (Figura 3), macia-crocante (ou macia-fundente), granulosa, doce, não ácida e muito sumarenta, de perfume ligeiramente acentuado e de excelente

qualidade alimentar. Do ponto de vista nutricional, a pera Rocha é fonte de vitaminas A, B1, B2, C e E e de uma elevada concentração de fibras dietéticas. É ainda uma fonte de proteínas e um poderoso antioxidante [1][7].



Figura 3 - Epiderme e polpa de frutos Pera Rocha.

2.3 IMPORTÂNCIA ECONÓMICA

A produção de pera em Portugal tem um peso considerável na economia do país e na sua balança de exportações.

A área total de cultivo nacional de pera ronda os 13.000 hectares e a produção anual ronda as 190.000 toneladas [8]. O consumo per capita de pera em Portugal é de 6,2 quilos [7], sendo deste modo o quarto fruto mais consumido no país. A variedade Rocha domina de forma esmagadora a produção nacional de peras, com uma representatividade de 95%. As outras variedades de pera produzidas com alguma expressão são a Passe Crassane, a General Leclerc, a Doyennédu Comice, a Lawson, a Carapinheira, a Morettini, a Clap's Favourite, a Pérola e a D. Joaquina [3][8].

A ANP – Associação Nacional de Produtores de Pera Rocha criada em 1993 é uma associação que representa cerca 86% do total nacional de produção de pera Rocha. A ANP, em colaboração com parceiros como a PortugalFresh, tem tido um papel decisivo na divulgação e exportação da pera Rocha, designadamente, gerindo e promovendo comercialmente a Denominação de Origem “Pera Rocha do Oeste”, sempre que as características o permitam [9][10].

A pera Rocha é hoje em dia a campeã da fruta portuguesa no que toca às exportações. As suas vendas no exterior têm crescido e representaram um valor de 90 milhões de euros em 2019, ano em que se registou um crescimento de 16% fazendo face ao ano anterior. Mais de metade da produção nacional é exportada, o que coloca o fruto entre os produtos agrícolas nacionais mais exportados [11].

As exportações constituem cerca de 60% do volume da produção nacional e a fileira da pera Rocha tem uma orientação exportadora elevada, sendo mais de 20 os mercados onde chega este fruto. Portugal exporta maioritariamente para o Brasil, que assegura um quarto das vendas de pera Rocha ao estrangeiro, seguindo-se Marrocos, Reino Unido, França, Alemanha e Espanha, mercados onde a sua presença é fortemente sentida. O fruto é ainda exportado, mas em menor fluxo, para outras geografias como Polónia, Holanda, Irlanda, Suíça, Roménia, Uruguai, Colômbia, Canadá, Emirados Árabes Unidos ou Jordânia [10][11][12].

Os países concorrentes de produção de pera são a China, sendo o maior produtor de pera do mundo, contribuindo anualmente com mais de 60% para a produção mundial. Os Estados Unidos da América e a

Argentina ocupam posições de destaque no ranking mundial com 6/7% da produção mundial em conjunto. A União Europeia representa apenas 13%, destacando-se Itália e Espanha como os principais produtores com cerca de 7% em conjunto da produção mundial. A produção de pera de Portugal corresponde a cerca de 6% da produção anual da UE (dados correspondentes a 2016) [13].

A pera Rocha é uma das cultivares/variedades de maior importância e consumo na Europa sendo que, apesar destes variarem de acordo com a região e país, na Comunidade Europeia as mais relevantes são: Conference (26,2%), William's (12%), Abbé Fétel (11,6%), Blanquilla (9,3%), Rocha (5%), Beurré Bosc (2,7%), entre outras [3].

2.4 DESENVOLVIMENTO FISIOLÓGICO DO FRUTO

É facilmente aceite que os frutos são seres vivos ou entidades biológicas quando estão ligados à planta ou à árvore-mãe no seu habitat natural mas, mesmo depois da colheita, o fruto ainda está vivo continuando a realizar a maior parte das reações metabólicas e a manter os sistemas fisiológicos funcionais tal como quando se encontrava anexado à planta.

A vida dos frutos pode ser dividida, após o vingamento e apesar de não ser fácil fazer uma clara distinção entre o início e o final de cada etapa, em três principais etapas fisiológicas. Estas são o crescimento, a maturação e a senescência.

O crescimento envolve a divisão celular e o aumento subsequente do tamanho das células, que é responsável pelo aumento do diâmetro e peso final do fruto. A maturação normalmente começa antes da fase de crescimento terminar e inclui várias actividades. Distinguem-se dois tipos de maturação, a maturação fisiológica, fase em que o fruto irá continuar o seu desenvolvimento mesmo que separado da árvore ou planta, e a maturação horticultural que é a etapa do desenvolvimento onde o fruto possui as características necessárias para utilização do consumidor [14]. A maturação é o processo que leva ao amadurecimento e, em muitos casos, as duas fases sobrepõem-se. Assim, a fruta é geralmente colhida quando está fisiologicamente madura ou quando já começou o seu amadurecimento, ainda que, por vezes, alguma possa ser colhida mesmo antes da fase de maturação começar.

A senescência é definida como o período em que os processos bioquímicos anabólicos (sintéticos) dão lugar a processos catabólicos (degradativos), levando ao envelhecimento e, finalmente, à morte dos tecidos. A mudança da fase de crescimento para a fase de senescência é fácil de determinar e frequentemente a fase de maturação é descrita como o tempo entre estas, sem qualquer tipo de definição clara nomeadamente das suas bases bioquímicas ou fisiológicas [15].

O amadurecimento é um processo que ocorre na fase final da maturação e no início da senescência e envolve uma série de mudanças fisiológicas, químicas, bioquímicas e sensoriais que levam ao desenvolvimento de um fruto maduro, comestível e com os parâmetros de qualidade desejáveis. As mudanças que ocorrem incluem alterações do metabolismo do açúcar, da firmeza (amolecimento devido a actividades de degradação das paredes celulares), mudanças de cor (perda da cor verde e desenvolvimento da cor amarelada), sabor e

aroma (síntese de compostos voláteis aromáticos) e aumento da susceptibilidade às infecções por agentes patogénicos.

Do ponto de vista fisiológico, segundo o seu amadurecimento, os frutos podem classificar-se em climatéricos e não climatéricos. Neste sentido, os frutos climatéricos como a pera são caracterizados pelo seu grande aumento da taxa de respiração e taxa da biossíntese de etileno durante a fase de amadurecimento (Figura 4), sendo que amadurecem após a colheita, enquanto que nos frutos não-climatéricos existe uma diminuição gradual de ambas as taxas de respiração e de produção de etileno e assim as mudanças ocorrem mais lentamente o que leva a que os frutos tenham que ser colhidos maduros (por exemplo morango, cereja)[16]. Todas as frutas produzem etileno durante o seu desenvolvimento, no entanto as frutas climatéricas produzem quantidades muito maiores durante o amadurecimento do que as não climatéricas.

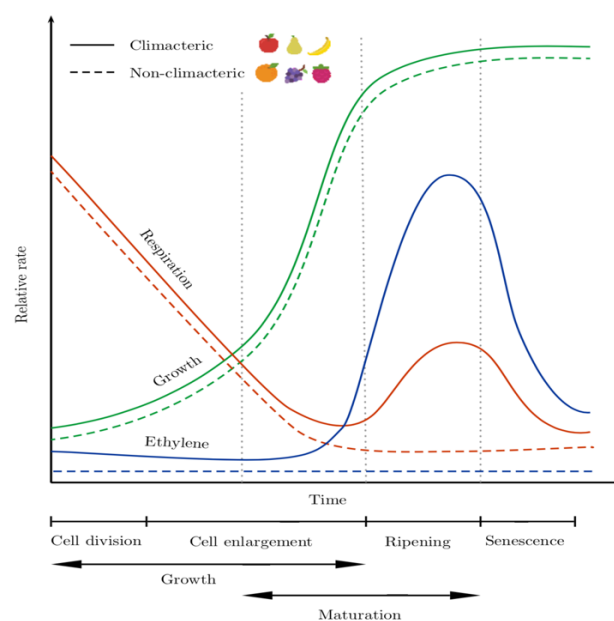


Figura 4 - Relação do estado de crescimento fisiológico dos frutos climatéricos e não-climatéricos com a produção de voláteis, taxa de respiração e de produção de etileno [17].

Uma característica fisiológica importante das plantas e, portanto, dos frutos, é a transpiração, ou seja, perdem água ao mesmo tempo que respiram absorvendo oxigénio e libertando dióxido de carbono e calor. Enquanto na planta, as perdas devido à respiração e transpiração são substituídas pelo fluxo de seiva, que contém água, fotossintatos (principalmente sacarose e aminoácidos) e minerais, após a colheita o fruto depende inteiramente das suas próprias reservas alimentares e teor de humidade. Portanto, as perdas de substratos respiráveis e humidade não são repostas, a fruta começa a ter menos recursos e a senescência começa. Por outras palavras, as frutas são perecíveis.

A respiração e a medição da taxa respiratória dos frutos dá-nos indicações sobre o metabolismo do fruto. Assim, a respiração pode ser descrita como a quebra oxidativa de materiais mais complexos normalmente presentes nas células (como o amido, açúcares e ácidos orgânicos), em moléculas mais simples como o dióxido de carbono e a água, simultaneamente com a produção de energia e outras moléculas que podem ser usadas pelas células para reações sintéticas.

A respiração pode ocorrer na presença de oxigénio (respiração aeróbica) ou na sua ausência (respiração anaeróbica, muitas vezes chamada fermentação). A taxa de respiração do fruto é um bom indicador da sua actividade metabólica e, por isso, um bom guia para perceber o seu potencial tempo de vida em conservação.

O etileno (C_2H_4) é uma hormona das plantas que actua em conjunto com outras de modo a exercer controlo sobre o processo de amadurecimento dos frutos e induzir os processos de senescência. Como referido anteriormente, durante o amadurecimento dos frutos climatéricos é produzida uma grande quantidade de etileno, necessária para completar o processo de amadurecimento. A produção de etileno é um processo autocatalítico uma vez que esta desencadeia mais produção. O etileno liga-se a um receptor específico, formando um complexo que então desencadeia o amadurecimento. A sua acção pode ser afectada alterando a quantidade de receptores ou interferindo na ligação do etileno aos receptores [15].

2.5 ESTADO DE MATURAÇÃO

A época de colheita da pera Rocha decorre entre os meses de Agosto e Setembro, estando relacionada com a época de plena floração e de acordo com o tipo de maturação desejado e objetivo comercial do produtor/central fruteira. Continua a ser feita de modo tradicional e à mão, agarrando o fruto e inclinándolo ligeiramente no sentido lateral [1][2].

Sem considerar os factores de pré-colheita, uma conservação prolongada e de êxito implica dar o máximo de atenção à colheita, sendo importante seleccionar o momento ótimo da mesma, assim como a toda a manipulação subsequente. Uma colheita fora de tempo, mal efetuada ou caracterizada por um manuseamento descuidado, põe em causa a qualidade intrínseca da fruta produzida respeitando as técnicas culturais recomendadas. O estado de maturação no momento da colheita é o fator determinante para a escolha da tecnologia de conservação a adoptar. Um fruto considera-se maduro fisiologicamente quando os processos de crescimento terminaram e os processos envolvidos na senescência ainda não são predominantes. Por outro lado, as substâncias de reserva existentes no fruto nesse estado de evolução, permitem-lhes atingir o nível máximo de qualidade típica para a variedade [1]. Cada consumidor pode ter um conceito diferente acerca da qualidade dos frutos e este conceito resulta da junção de vários factores como o tamanho do fruto, o aroma, a cor da epiderme, o sabor e a firmeza do fruto no momento da compra e/ou consumo [18].

As peras colhidas muito cedo, quando comparadas com frutos colhidos num estado fisiológico verde-maduro podem normalmente ser armazenadas por mais tempo, mas nesse caso, os frutos são mais pequenos, mais suscetíveis a escaldões superficiais e deficientes em relação à sua capacidade de, no processo de amadurecimento, desenvolver o seu aroma e sabor característico. Por outro lado, os frutos colhidos posteriormente são maiores, apresentam pele com uma cor mais apelativa e um sabor melhor, mas podem contar com um tempo de armazenamento menor, um amolecimento acentuado e são mais suscetíveis a acidentes fisiológicos nomeadamente acastanhamentos internos. Portanto, os frutos devem ser colhidos num estado de maturação ideal e adequado à tecnologia e uso pretendido de forma a reduzir as perdas pós-colheita e permitindo alcançar uma qualidade intrínseca aceitável após o armazenamento. Para conseguir manter a qualidade das peras depois da colheita com sucesso em frigoconservação, é muito importante caracterizar o

estado de maturação em que o fruto se encontra no momento da colheita através dos principais índices de maturação [18].

Os índices ou testes de maturação são medidas que permitem a caracterização físico-química e organoléptica dos frutos durante os períodos de pré-colheita e colheita, podendo ser utilizados para determinar se um fruto está maduro e o momento óptimo de colheita, sendo fundamentais para decidir qual a maneira mais correta de conservá-los ou do destino a dar-lhes. Estes testes devem ser simples, fáceis de executar no campo e/ou à entrada da central fruteira e devem requerer equipamento económico. O índice deve ser preferencialmente objectivo, ou seja uma medição, em vez de subjectivo como uma avaliação (estimativa) e deve estar relacionado com a qualidade e vida pós-colheita de forma consistente (para todos os anos, locais, etc). Se possível, deve ser não destrutivo [19][14].

Para além da determinação da data de colheita com base no número de dias contados após a plena floração (133 a 138 dias, no caso da Pera Rocha)[1], no período de pré-colheita e colheita do fruto aplicam-se outros testes de maturação. Determinar a dureza da polpa (D) com um penetrómetro, talvez o teste mais utilizado, permite uma avaliação rápida do estado de maturação de um fruto uma vez que ao longo do período de maturação dá-se uma progressiva hidrólise das pectinas que se traduz numa perda de firmeza da polpa do fruto. A taxa de regressão do amido (Am), é baseada no princípio de que ao longo do processo de maturação o amido dos frutos se vai transformando em açúcares logo, quanto mais baixa for esta taxa maior a quantidade de amido presente no fruto e, conseqüentemente, mais atrasado o seu estado de maturação. A cor da epiderme lê-se em laboratório com um colorímetro ou recorrendo a tabelas existentes para as diversas variedades, e é um parâmetro que condiciona muitas vezes a colheita e em especial a opinião do consumidor em relação ao fruto em questão. O índice refratométrico (IR) é determinado com um refractómetro e indica a percentagem de sólidos solúveis (associados a açúcares) presente nos frutos, importante uma vez que como estes são facilmente detectados pelo consumidor, são considerados um bom indicador da qualidade gustativa do fruto. A determinação da acidez total titulável faz-se em laboratório e permite conjuntamente com o IR caracterizar o sabor e o odor típico da variedade. Alguns dos diferentes parâmetros mencionados podem ser relacionados resultando na construção de índices que permitem uma melhor avaliação do estado real de desenvolvimento e maturação dos frutos. Destes índices, um dos mais utilizados é o índice de Streiff que relaciona a dureza da polpa, a taxa de regressão do amido e o índice refractométrico ($D/Am \cdot IR$) [19].

A data de colheita é então determinada quando estes parâmetros atingem certos valores, de modo a conferir a melhor qualidade à pera quando esta chegar ao consumidor. Os valores de referência utilizados para a cultivar Rocha à colheita, para os casos de longa conservação, são os seguintes: a dureza, por exemplo, deve encontrar-se entre os 5,1 e 6,4 kg/0,5 cm², o teor de sólidos solúveis (índice refratométrico) entre os 12 e 14 % °Brix, a acidez titulável entre 2 a 3 g/L de ácido málico, o amido entre os valores 5 e 7 da tabela de regressão do amido e o índice de Streiff entre os valores 0,07 e 0,09 [5].

Outros índices a considerar, mas que requerem equipamentos laboratoriais mais específicos e difíceis de medir em campo, são a produção interna de etileno, a emissão de voláteis aromáticos e a taxa de respiração [18].

Uma vez que a pera continua fisiologicamente ativa, após a colheita há outras operações igualmente determinantes para a qualidade da pera Rocha, nomeadamente a pré-refrigeração que elimina o calor da fruta proveniente do pomar, fazendo descer a temperatura do interior do fruto logo após a colheita, diminuindo a respiração e conseqüentemente a actividade catalítica de diferentes enzimas, incluindo as envolvidas nas diferentes etapas do processo de respiração. Ao diminuir a taxa de respiração, desaceleram-se então bruscamente os processos de maturação. Assim, é necessário não só arrefecer os frutos mas arrefecê-los o mais rapidamente possível após a colheita. Quanto mais depressa se baixar a taxa metabólica, menos processos de maturação e senescência tomarão lugar e melhor conservadas ficarão as características do fruto à colheita, mantendo as suas características intrínsecas e a possibilidade de desenvolver um alto nível de qualidade que garanta a satisfação do cliente [1][20][16].

Assim, depois de colhida, a pera Rocha do Oeste é guardada com cuidado em caixas de plástico ou palotes, colocados ao longo das linhas das árvores. Em seguida, as caixas/palotes são transportados para a central fruteira onde as peras são avaliadas, codificadas por lotes e identificadas. Seguem, depois, para as câmaras frigoríficas onde são arrefecidas (entre 0 a 1°C) e conservadas com a tecnologia e atmosfera mais adequada [1].

Hoje em dia, a conservação e armazenamento em atmosfera controlada (AC) e em oxigénio ultra baixo (ULO) tornam a maturação da pera regulável, sendo possível armazená-la durante muito tempo. Pelas suas características e tecnologias utilizadas, estes frutos apresentam uma elevada capacidade de conservação, permitindo a sua comercialização praticamente durante todo o ano, apesar de ser um produto com apenas uma época de colheita.

2.6 ARMAZENAMENTO E CONSERVAÇÃO DA PERA ROCHA

A baixa temperatura foi desde sempre o principal método utilizado para estender o armazenamento e a vida útil das frutas no mercado.

Dadas as características da pera Rocha, pode afirmar-se que tendo em atenção os cuidados culturais adequados, conserva-se razoavelmente bem (com a qualidade organoléptica pretendida) até no máximo quatro meses em câmaras onde apenas se aplica o frio, uma temperatura entre os -0,5 e os 0,5°C, e a uma humidade relativa entre os 92% a 95% [1]. Neste caso a atmosfera não sofre qualquer alteração apresentando a composição normal de 78% de N₂, 21% de O₂ e 0,03% de CO₂.

A maioria dos produtos hortofrutícolas são constituídos por quantidades elevadas de água, e por isso a transpiração é uma das causas da diminuição da qualidade da pera e da generalidade dos hortofrutícolas depois da colheita, associada à perda de água por evaporação das células da epiderme. A sua intensidade é influenciada por vários fatores ambientais principalmente a humidade relativa do ar e a temperatura e, por

esta razão, estas devem estar controladas e devem encontrar-se dentro dos valores mencionados anteriormente, reduzindo as perdas de água quantitativas (ao nível do peso) e qualitativas (evitando o enrugamento da epiderme causado pela turgência no interior das suas células) [21][22]. Também existem fatores relacionados com o fruto que podem influenciar a sua perda de água, como o seu estado fisiológico, danos mecânicos ou a razão superfície/volume do fruto [21].

No armazenamento, tal como na fase de pré-refrigeração, as atividades fisiológicas da pera são inibidas pelas baixas temperaturas e pela alteração da atmosfera de conservação. Ao reduzir o metabolismo geral, atrasam-se os processos de amadurecimento e senescência por meio do controle da taxa de respiração e da inibição da produção de etileno. A baixa temperatura é eficaz em diminuir as atividades catalíticas de diferentes enzimas, incluindo aquelas envolvidas nas diferentes etapas da respiração e da produção de etileno, uma vez que o etileno é produzido pela ação de duas enzimas que dependem de fatores genéticos bem como da temperatura e da concentração de oxigénio [23]. Como explicado anteriormente, a produção interna de etileno, aliada ao aumento da taxa respiratória, regula o estado de maturação. O ciclo de produção de etileno pode ser regulado pelo próprio etileno produzido, levando à nova produção das enzimas. Assim, a produção de etileno induz a sua própria produção, sendo por isso um fator crítico que deve ser controlado no armazenamento dos frutos a longo prazo.

A pera é considerada um fruto climatérico (Figura 4), caracterizado pelo aumento drástico da taxa de respiração durante o amadurecimento que pode ser detectado apenas após ou simultaneamente a um aumento da produção de etileno. A perecibilidade dos frutos climatéricos é assim mais rápida e severa do que em frutos não climatéricos [24]. Logo, a pera apresenta uma taxa de produção de etileno bastante elevada quando se encontra à temperatura ambiente, 20°C, encontrando-se entre os 10 e os 100 $\mu\text{L C}_2\text{H}_4/\text{kg/h}$ [21][25]. Elevadas concentrações de etileno levam ao aumento da atividade respiratória,[26] assim, por um lado a produção de etileno em frutos pode ser benéfica, uma vez que pode ser usada como hormona de regulação e controlo dos processos de maturação, sendo que a produção de etileno aumenta com o grau de maturação do fruto [27]. Por outro lado, quando em excesso o etileno pode ser prejudicial porque condiciona o armazenamento, acelerando o processo de senescência ou mesmo influenciando outras reações indesejáveis.

Três dos principais fatores que influenciam a atividade respiratória e produção de etileno são a temperatura, a composição da atmosfera e danos mecânicos que originam reações de stress no fruto [27].

2.6.1 ARMAZENAMENTO EM ATMOSFERA CONTROLADA

Quando se pretende manter a qualidade por períodos mais longos de conservação, entre sete a oito meses, a alternativa assenta na conservação em atmosfera controlada (AC), em que são alteradas e reguladas as percentagens dos componentes da atmosfera normal (78% N_2 , 21% O_2 , e 0,03% CO_2) dentro da câmara. Este procedimento é efectuado diminuindo a concentração de oxigénio e aumentando a concentração de dióxido de carbono de modo a minimizar a respiração e produção de etileno através na inibição de enzimas, o amadurecimento rápido dos frutos, a sua senescência e o desenvolvimento e invasão de agentes patogénicos [28].

Assim, existe uma melhor retenção da cor da epiderme (menor amarelecimento), da firmeza, da suculência e também da doçura da pera durante o seu armazenamento em AC [29]. Esta técnica permite ainda que a pera, após saída das respetivas câmaras, inicie um processo de maturação fisiológica normal, desenvolvendo as suas potenciais características organolépticas.

Em suma, alcançam-se bons resultados com uma atmosfera com uma concentração de 2,5% de O₂ e 0,5% de CO₂, desde que entre outros factores se disponha de condições particulares das câmaras, a saber, um bom dimensionamento, estanquicidade absoluta, humidade relativa superior a 95%, uma temperatura na base dos -0,5 a 0,5°C e um controlo muito apertado dos gases constituintes da atmosfera [1].

2.6.2 ARMAZENAMENTO EM ATMOSFERA COM REDUZIDO TEOR DE OXIGÉNIO (*ULTRA LOW OXYGEN*)

O armazenamento em atmosferas *Ultra Low Oxygen* (ULO) é uma tecnologia de aplicação mais recente que visa minimizar as perdas no período de pós-colheita, reduzindo a pressão parcial do O₂ para valores abaixo de 1%. Estas condições causam um maior atraso no amadurecimento, uma vez que reduzem a perda de ácidos e de açúcares durante a respiração assim como a taxa de biossíntese de etileno dos frutos. No entanto, a conservação em ULO pode causar alguns efeitos prejudiciais, como o aumento da incidência de escurecimento na polpa. Isto pode acontecer se o armazenamento for feito por um período de tempo demasiado longo ou se se estabelecerem pressões parciais de O₂ demasiado baixas [30].

Normalmente, para a pera Rocha utiliza-se uma concentração de O₂ de 0,5% e também neste caso a concentração de CO₂ é de 0,5%.

Como referido anteriormente, é necessário o controlo muito apertado dos gases constituintes da atmosfera de conservação, o controlo de produção de diferentes voláteis associados quer a processos de respiração quer a processos de fermentação (associados por sua vez ao risco de hipoxia) e a capacidade de remoção dos compostos que conduzam ao amadurecimento dos frutos são fundamentais para o sucesso da longa conservação em condições que permitam aos frutos, após saída do frio, retomar o seu processo normal de amadurecimento.

É necessário sobretudo controlar o CO₂, produto do metabolismo, em todos os casos. As instalações modernas estão equipadas com analisadores electrónicos de alta precisão que, com uma gestão informatizada, permitem memorizar todas as concentrações de gases na câmara, visualizar-las no ecrã do computador e actuar sobre os diversos aparelhos no caso de haver desvios dos *setpoints* pretendidos de modo a corrigir e estabilizar estes valores [31].

Nas atmosferas modificadas, AC ou ULO, utilizam-se gases inertes para reduzir a quantidade de O₂, normalmente N₂ ou uma mistura de N₂ e CO₂. O método mais utilizado geralmente para remover rapidamente o O₂ do ar é libertar N₂ na atmosfera da câmara de AC ou ULO. Para isso utilizam-se geradores de N₂ de modo a produzir N₂ directamente no local. O ar que sai da câmara é separado em N₂ e O₂ pelo sistema PSA (*Pressure swing adsorbers*) utilizando dois leitos de peneira molecular de carbono, constituído por carvão activado, que

adsorve os gases como o O₂ e o CO₂ e permite que o nitrogénio passe através do leito adsorvente, voltando para a câmara de conservação [32].

Para controlar e remover o CO₂ da atmosfera de conservação, são utilizados sistemas de *Scrubbers*. O sistema mais usado está formado por duas torres de absorção, dois leitos cilíndricos de carvão activado, colocados no interior da câmara. O ar da câmara é pressurizado por uma das torres de absorção do equipamento, até à saturação do carvão activado com CO₂. De seguida, o ar é automaticamente canalizado para a segunda torre de absorção [33]. Outros *scrubbers* de peneira molecular têm vindo a ser usados para adsorver o CO₂, como zeólitos de silicato de alumínio.

A remoção do etileno também é crítica uma vez que, mesmo uma concentração muito baixa deste gás (< 0,1 ppm), pode induzir o amadurecimento e a senescência dos frutos. Existem diferentes formas de remover ou bloquear a sua produção. Pode ser por via da oxidação catalítica do etileno a H₂O e CO₂, por adsorventes como carvão activado e outras descritas abaixo, ou utilizando tratamentos de pós-colheita com efeito bloqueador nos receptores de etileno dos frutos.

Quando o etileno é produzido, este é oxidado em *scrubbers* que contêm fortes oxidantes como o permanganato de potássio, KMnO₄, [33] que é suportado num substrato sólido, material inerte poroso, com uma grande área superficial como argilas ou carvão activado, por exemplo. Alguns destes materiais conseguem adsorver o etileno, criando assim um sistema de adsorção-oxidação onde o material de suporte adsorve o etileno e o permanganato (MnO₄⁻) o oxida. O desempenho dos *scrubbers* depende fortemente dos suportes porosos e de fatores externos como a temperatura e a humidade relativa.

2.6.3 ACIDENTES FISIOLÓGICOS

Estima-se que a impossibilidade de conservar a pera Rocha de forma eficaz, possa levar a quebras nas vendas e consequentes perdas económicas na ordem dos 22 a 39 milhões de euros (dados de 2013). Dada a elevada importância da pera Rocha para o setor hortofrutícola nacional, é importante o investimento no estudo deste fruto de modo a desenvolver estratégias que permitam o seu melhor armazenamento e conservação, garantindo elevados padrões de qualidade durante todo o seu ciclo de vida e durante todo o ano, potenciando assim esta mais-valia nacional [35].

Como visto anteriormente, o armazenamento em atmosfera controlada e em atmosfera ULO permitem, de um modo geral, o aumento do tempo de conservação das peras. No entanto, podem surgir problemas: um conjunto de acidentes fisiológicos externos e internos, desencadeados pela exposição dos frutos às condições de armazenamento e condicionados pelas suas condições e tratamentos pré-colheita efectuados. Os principais acidentes fisiológicos que ocorrem em pera Rocha em conservação prolongada são o escaldão superficial, os acastanhamentos internos e diversas alterações enzimáticas [36].

- **Escaldão superficial**

O escaldão superficial, visível na epiderme dos frutos, é um acidente fisiológico que pode ocorrer devido ao armazenamento prolongado a baixas temperaturas. Manifesta-se através do aparecimento de manchas

castanhas na epiderme dos frutos (acastanhamento das células), podendo por vezes ser muito escuras e até chegar a ser pretas. Este pode ainda fazer com que a hipoderme do fruto se torne rugosa e pode também provocar escaldão das lenticelas (órgãos de arejamento, de formato poroso). Isto acontece como resultado da morte de muitas camadas de células abaixo da epiderme dos frutos. Os primeiros sintomas surgem a partir dos 4 meses de armazenamento (em atmosferas normal) e uma vez com escaldão superficial, os frutos perdem drasticamente o seu valor comercial no mercado fresco. Por vezes, o escaldão pode ser visível ainda dentro das câmaras, mesmo antes dos frutos passarem para a temperatura ambiente. O acastanhamento ocorre apenas em células que contêm cloroplastos e os tecidos com escaldão estão associados a uma grande perda de água [37][38][39].

Quando o escaldão superficial é ligeiro (Figura 5), apenas as células da hipoderme mais externa são afetadas mas quando este é severo, todas as camadas da hipoderme são afetadas. Neste último caso, as células colapsam em direção radial, fazendo com que a área abrangida se afunde. Está geralmente aceite que o escaldão é resultado de um processo oxidativo (que envolve stress oxidativo) em que o α -farneseno e os produtos da sua oxidação, trienos conjugados, têm um papel predominante. Os trienos são altamente reativos e provocam a disrupção das membranas das células da casca da fruta, levando a polifenoloxidase (PPO) a entrar em contacto com os substratos fenólicos, mediando o acastanhamento enzimático [40][41].



Figura 5 - Escaldão superficial em pera Rocha. (fotografia do Rocha Center)

- **Acastanhamento interno**

O acastanhamento interno, tal como o escaldão superficial, é um acidente fisiológico que surge tipicamente durante o armazenamento prolongado a baixas temperaturas e em atmosfera controlada, mas pelo contrário não se manifesta na parte externa do fruto. Os frutos danificados (Figura 6) podem apresentar escurecimento radial, escurecimento assimétrico e manchas castanhas secas e escuras na polpa [42].

Também pode ocorrer a formação de cavidades secas aleatórias no interior da polpa, isoladamente ou ao mesmo tempo que as manchas escurecidas em casos mais severos, que levem à perda de água [43][44]. As cavidades apresentam diferentes padrões podendo ser pequenos pontos escuros com distribuição em estrela correspondente aos cinco carpelos, zonas com lesões distribuídas aleatoriamente ou cavidades distribuídas aleatoriamente, geralmente de maior tamanho [45]. Existem dois tipos principais de acastanhamento interno sendo estes o *core browning* que se caracteriza pela decomposição da polpa surgindo um centímetro abaixo da

zona da casca e vai-se desenvolvendo para a cavidade central, e o *brown heart* onde surgem cavidades secas derivadas de lesões nos tecidos da região central do fruto, na zona carpelar, podendo expandir-se concentricamente para o tecido da polpa do fruto [43][44][46]. No entanto, após o agravamento dos sintomas torna-se difícil identificar qual deles está em causa.



Figura 6 - Incidências de acastanhamento interno em pera Rocha.

Ambos podem ocorrer através de mecanismos ligados aos processos de senescência. Os níveis elevados de CO₂ provocam uma aceleração dos processos de desenvolvimento do *brown heart* fazendo surgir os sintomas associados a este, tendo assim o efeito de agravar os sintomas. No entanto, o *core browning* está mais associado a danos oxidativos uma vez que, em condições de senescência, apenas os frutos armazenados em concentrações elevadas de CO₂ desenvolveram sintomas [47][48].

Existem vários fatores que podem afetar o aparecimento de acastanhamentos internos, não estando explicado o modo como se conjugam entre si, o que dificulta a identificação dos mecanismos envolvidos no seu desenvolvimento. Além de fatores associados ao fruto como por exemplo o seu estado de maturação, o efeito da conservação prolongada em atmosfera controlada foi uma hipótese apresentada como causadora deste acidente fisiológico. Níveis desadequados de O₂ e CO₂, no caso, uma concentração demasiado baixa de O₂ e uma demasiado elevada de CO₂, podem causar situações de stress (alterações significativas das condições normais) na pera e afetar a sua atividade fisiológica [42] podendo estar na origem do escurecimento enzimático ou do metabolismo fermentativo do fruto.

Normalmente, no metabolismo das células vegetais produzem-se espécies reativas de oxigénio (ROS) nas reações de auto-oxidação e os seus níveis são mantidos em equilíbrio ou mesmo removidos pelo sistema antioxidante. No entanto, as ROS são acumuladas devido ao armazenamento em atmosfera controlada a baixas temperaturas associado ao elevado nível de CO₂, causando o seu excesso um défice no sistema antioxidante. Quando ocorre este desequilíbrio, existe um stress oxidativo. Em condições de stress, a produção de ROS aumenta e estas acumulam-se, fazendo com que o sistema antioxidante acabe por não ser suficiente devido à intensa atividade oxidativa, contribuindo para anomalias e danos irreversíveis no metabolismo das células [42].

O sistema antioxidante da pera é composto essencialmente por ácido ascórbico, compostos fenólicos e várias enzimas. Um dos factores que pode afectar a concentração de ácido ascórbico e fenóis totais na pera é a

data de colheita pois, quanto mais tardia for, mais baixas são tornando o fruto mais susceptível aos acidentes fisiológicos [49].

Em relação ao escurecimento enzimático, sabe-se que os acastanhamentos internos podem ter origem na rutura das membranas intracelulares. A enzima polifenoloxidase (PPO), presente em diferentes compartimentos celulares, na presença de oxigénio é responsável pela oxidação enzimática dos compostos fenólicos em o-quinonas formando polímeros escuros de cor castanha denominados melaninas, dando assim lugar ao acastanhamento dos tecidos. Esta rutura pode ser provocada por diversos fatores [50]. As o-quinonas podem ainda ter um efeito negativo reagindo com proteínas, aminoácidos e outros nutrientes [51].

Uma das consequências do stress oxidativo é a peroxidação lipídica nas membranas, que é uma reacção iniciada devido ao excesso de ROS. Esta peroxidação caracteriza-se por uma cadeia de reacções de oxidação em ácidos gordos polinsaturados de fosfolípidos da membrana, formando-se peróxidos lipídicos, reactivos com metais, formando aldeídos e substâncias tóxicas para as células [52]. A peroxidação lipídica pode estar directamente associada à desintegração da membrana.

Uma vez que a atividade da enzima PPO é inativada a um pH abaixo de 4,0, esta pode ser controlada [53][54]. No entanto, o pH é um fator difícil de controlar durante o armazenamento. Os antioxidantes da pera como o ácido ascórbico e os ácidos fenólicos, contribuem para que exista mais acidez e assim menor pH, contribuindo para reduzir a atividade da enzima PPO. Esta também pode ser controlada através da temperatura, quanto maior, maior é a atividade enzimática. A PPO é considerada a principal enzima associada ao acastanhamento em hortofrutícolas, sendo a sua presença e quantidade variáveis com a cultivar.

A composição gasosa no interior dos frutos é um fator muito importante no desenvolvimento dos acastanhamentos, principalmente as concentrações baixas de O₂ e elevadas de CO₂ que podem levar ao início do metabolismo fermentativo durante o armazenamento [42]. Quando a concentração de O₂ na atmosfera é muito baixa, o CO₂ fica retido no interior dos frutos. Ao mudar para o metabolismo fermentativo pode gerar-se uma deficiência energética e assim alterar os processos de manutenção do fruto. Deste modo, geram-se espécies ROS que se acumulam uma vez que o sistema antioxidante pode não conseguir combatê-las. Consequentemente estas provocam a rotura das membranas das células e dá-se o acastanhamento dos tecidos dos frutos [42].

Também pode ocorrer nos frutos a acumulação de metabolitos tóxicos para as células, tais como o etanol e o acetaldeído, devido ao metabolismo fermentativo. Estes podem causar a perda de integridade das membranas, levando à sua rotura e provocando o acastanhamento [42][55].

2.6.4 UTILIZAÇÃO DE DIFENILAMINA (DPA)

De modo a controlar e/ou minimizar o aparecimento destes problemas, começou a utilizar-se nos tratamentos pós-colheita um antioxidante, a difenilamina (DPA). Este produto demonstrou ser eficaz no controlo da oxidação do α -farneseno [37], sendo assim a substância reconhecida oficialmente para o controlo do escaldão superficial e que também reduzia os acidentes internos, os danos pelo CO₂ e os acastanhamentos

epidérmicos devidos a abrasões. Para além deste, utilizavam-se e continuam a ser utilizados fungicidas nos tratamentos pré ou pós-colheita, encontrando-se atualmente homologados para aplicações pós-colheita as substâncias ativas fludioxonil, imazalil e tiabendazol, com o objetivo de prevenir podridões dos frutos [36].

No entanto, em 2013 a União Europeia proibiu o uso da difenilamina depois de um exaustivo processo de avaliação do risco devido aos perigos para o funcionamento dos glóbulos vermelhos do sangue, tendo sido proibido efetivamente o seu uso a partir desse mesmo ano, no espaço comunitário [56].

2.6.5 UTILIZAÇÃO DE 1-MCP

Uma das soluções atualmente utilizadas em substituição da DPA, é o 1-meticiclopropeno, denominado comumente por 1-MCP (C_4H_6). O 1-MCP (Figura 7) é uma molécula que tem facilidade em estabelecer ligações de carácter irreversível com os receptores de etileno dos frutos [36][57].

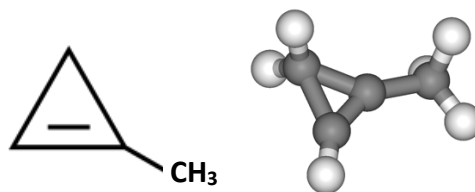


Figura 7 - Fórmula estrutural do 1-MCP.[58]

O etileno é um gás que funciona como hormona chave na regulação e controlo dos vários processos no ciclo de vida das plantas e dos frutos, dando respostas de defesa em casos de stresses bióticos e abióticos, influenciando também os processos de senescência e amadurecimento dos frutos [59][60]. Neste último caso estão incluídas alterações na cor provocadas pela degradação da clorofila, alterações na firmeza devido a transformações nas pectinas das paredes celulares, e no seu sabor e valor nutricional devido à transformação dos seus compostos de reserva em açúcares simples. A inibição da produção do etileno é então bastante importante na manutenção de estados mais atrasados de maturação [61].

O 1-MCP foi homologado em Portugal em 2011 para aplicação em pera Rocha sendo considerado um inibidor da ação do etileno que previne o escaldão superficial e o acastanhamento interno e retarda o amadurecimento. Encontra-se homologado para aplicação em frio normal e em atmosfera controlada, com ensaios de eficácia efetuados em atmosferas de 4% de O_2 [36].

Não obstante, considera-se que a sua eficácia é menor do que a da DPA e tem o efeito negativo de inibir os processos associados à maturação dos frutos, dificultando o seu amadurecimento pós-conservação (permanecendo no estado de *evergreen*) e dando-lhes por vezes um sabor amargo, mesmo após a exposição ao ar e temperatura ambiente [56].

2.7 COMPOSTOS VOLÁTEIS

Existe uma quantidade considerável de publicações na literatura que examina os compostos orgânicos voláteis de frutas como maçãs, laranjas, mangas, e têm sido realizados muitos estudos em peras, mas a maior parte destes são apenas dedicados ao estudo da fisiologia e dos constituintes químicos não voláteis [62].

O aroma e o sabor têm um papel importante na qualidade da fruta e são devidos a uma mistura complexa de muitos compostos orgânicos voláteis (VOCs). Estas características são específicas de cada espécie e até de cada cultivar [63]. O perfil e a composição dos VOCs é influenciada não só pela genética e o estado de maturação no momento de colheita, mas também pelas características do ambiente em que a fruta se encontra, pelas práticas de cultivo, o manuseio pós-colheita e as condições de armazenamento [64].

Existe uma diminuição na produção de VOCs em frutos armazenados em atmosfera controlada e em condições ULO, após voltarem para as condições de atmosfera normal e temperatura ambiente [65]. Lara *et al.* (2002) concluíram que a inibição da biossíntese dos voláteis pelo armazenamento em AC era principalmente causada pelo fornecimento limitado de precursor/substrato às enzimas relacionadas e não pela degradação ou inibição da própria enzima.

Também segundo Plotto *et al.* (1998)[66], num estudo feito à maçã Gala, concluíram que as frutas conservadas em atmosfera normal emitem mais voláteis e são geralmente preferíveis em relação às conservadas em atmosfera controlada uma vez que todos os caracteres frutados e florais diminuíram em AC. Em peras Conference e Alexander Lucas, em condições de AC e tratadas com 1-MCP, chegou-se à conclusão que a produção de etileno e o desenvolvimento de compostos aromáticos eram reduzidos [67].

O perfil de voláteis da pera inclui ésteres, alcóois, aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos (terpenos) [68][63][69]. O grupo dos ésteres é o mais importante sendo que é a classe de compostos orgânicos voláteis predominante e que confere e atribui aos frutos o seu sabor e aroma frutado predominante e associado a fruta madura, apesar de alguns ésteres serem descritos como atribuidores de um carácter mais floral frutado.

A concentração dos ésteres aumenta significativamente com o aumento da maturação dos frutos, especialmente os acetatos de etilo, propilo, butilo e hexilo. A concentração destes compostos atinge o seu máximo mesmo antes do fruto estar totalmente maduro [70][62].

O acetato de hexilo é o éster mais importante e oferece às peras o aroma frutado e o cheiro característico. Juntamente com o acetato de butilo, responsável pelo aroma doce frutado, podem representar cerca de 70% de todos os voláteis aromáticos. Por outro lado, o acetato de etilo, apesar de ser um éster, confere à fruta um mau sabor. Elevados níveis deste composto são normalmente associados ao excesso de maturação e ao metabolismo anaeróbico [71].

Sabe-se que o etileno é o principal composto produzido quando os frutos começam a amadurecer e é, ao mesmo tempo, o responsável pelo amadurecimento e pela sua regulação. Assim, quanto mais maduro

estiver o fruto maior será a quantidade de etileno presente permitindo, através da sua determinação, saber o estado de amadurecimento das peras dentro das câmaras.

A baixa concentração de O₂ e a alta concentração de CO₂ limitam a ação do etileno e a respiração aeróbica, resultando numa diminuição da actividade metabólica e num armazenamento prolongado. A redução da ação do etileno impede ainda a produção normal de voláteis limitando a biossíntese dos ésteres, a actividade da lipoxigenase e a β-oxidação [72].

Por outro lado, a produção de etanol e de acetaldeído está normalmente associada a processos anaeróbicos sendo que, sob condições aeróbicas, são produzidas pequenas quantidades destes compostos ou até mesmo nada [73]. O acetaldeído aumenta durante o amadurecimento [71]. Os processos anaeróbicos ocorrem devido à atmosfera controlada, nomeadamente devido à baixa concentração de oxigénio que leva a que os frutos iniciem o metabolismo fermentativo, sendo este uma das causas da ocorrência de acastanhamentos internos. Uma concentração excessiva de etanol e especialmente de acetaldeído, pode ainda tornar-se citotóxica e causar danos às células [74].

Deuchande *et al.* (2016) desenvolveram um trabalho onde, comparando peras em AC dita normal (3 kPa O₂ + 0,5 kPa CO₂) e peras em AC com concentração elevada de CO₂ (1 kPa O₂ + 10 kPa CO₂), verificaram que a existência de maior incidência de acastanhamentos internos (AI) em frutos armazenados em elevado CO₂ estava positivamente correlacionada com os metabolitos fermentativos. Estes resultados indicam que estes metabolitos estão envolvidos na ocorrência desta lesão na pera Rocha. Em 2017, Deuchande *et al.*, identificaram a concentração de etanol como o melhor indicador de AI durante o armazenamento, e desenvolveram e validaram vários modelos para a previsão de AI [75].

Os álcoois e aldeídos também contribuem para o sabor e o aroma característico do fruto assim como servem como precursores para a síntese de ésteres [68]. Os aldeídos proporcionam o típico aroma “verde” que se assemelha a relva ou folhas esmagadas. O total de aldeídos detetados aumentou durante o amadurecimento num estudo feito por Zlatic *et al.* (2016) em peras Bartlett, o que vai ao encontro dos resultados obtidos, num outro estudo, para a pera Anjou [76].

Em condições de ULO a síntese de álcoois pode ser suprimida, à excepção do etanol uma vez que o seu aumento está associado com o metabolismo anaeróbico que ocorre durante o armazenamento nas condições referidas (Bonghi *et al.*, 1999). Do ponto de vista do aroma, o 1-butanol tem um carácter mais frutado em relação a outros álcoois e era aquele que estava presente em todas as peras, segundo um estudo de Wang *et al.* (2019) feito com peras de diferentes variedades [77].

Os níveis de α-farneseno estão correlacionados com o desenvolvimento de escaldão superficial em maçãs e em peras e o seu nível pode ser usado para prever este acidente fisiológico [64]. Li *et al.* (2003) reportaram que peras Nanguoli armazenadas em condições de ULO apresentavam níveis de α-farneseno mais elevados [64].

Chen *et al.* (2006) detectaram que em pera Kuerle Fragrant os VOCs mais importantes foram o hexanal (17,80%), o hexanoato de etilo (12,96%), o butanoato de etilo (11,29%), o acetato de etilo (9,69%), o α -farneseno (2,31%) e o acetato de hexilo (2,94%) [62]. Estes resultados vão de encontro aos obtidos por Takeoka *et al.* (1992) em peras asiáticas onde o hexanoato de etilo, o butanoato de etilo, o acetato de hexilo, o heptanoato de etilo, o hexanal, o pentanoato de etilo, o propanoato de etilo, o 2-metilbutanoato de etilo e o 2-metilpropanoato de etilo foram identificados como importantes contribuidores para o aroma da pera [78].

Os compostos voláteis recolhidos de fruta intacta, reflectem os cheiros e os sinais de amadurecimento que os consumidores percebem e assimilam dos frutos. Os voláteis gerados depois da disrupção dos tecidos representam o sabor que se percebe enquanto se come. Os VOCs podem ter um papel importante na percepção de sabor dos consumidores assim como definir o estado de amadurecimento, a qualidade alimentar e a frescura da fruta da perspectiva do seu sabor [68].

Na tabela 1 estão representadas as principais famílias de compostos e os principais VOCs produzidos pelos frutos bem como as suas principais características.

Tabela 1 - VOC's de maior importância produzidos pela pera e principais funções ou manifestações da sua presença

			Compostos orgânicos voláteis	
Pera	Famílias de VOCs		Funções e manifestações da sua presença nos frutos	
	Ésteres	Acetato de etilo		Mau sabor e excesso de maturação. Associado ao metabolismo anaeróbico
Acetato de propilo		Um dos compostos mais abundantes		
Acetato de butilo		Aroma doce-frutado		
Acetato de hexilo		Aroma frutado e cheiro característico de pera		
Álcoois	1-butanol		Carácter mais frutado em relação aos outros álcoois	
	Etanol		Produto do metabolismo anaeróbico	
Aldeídos	Acetaldeído		Produto do metabolismo anaeróbico	
	Hexanal		Importante contributor para o aroma da pera	
Terpeno	α -Farneseno		Escaldão superficial	
Alceno	Etileno		Hormona do amadurecimento	

2.8 DETECÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS ATRAVÉS DE CROMATOGRÁFIA GASOSA ACOPLADA COM ESPETROMETRIA DE MASSA (GC-MS)

A detecção e a avaliação do tipo e severidade de desordens de acastanhamento interno nos frutos é, na maior parte dos casos, um processo destrutivo e amostral uma vez que os sintomas se manifestam no interior das peras. Assim, como não se podem aproveitar os frutos analisados existe algum prejuízo e existe também a possibilidade da desvalorização económica da fruta não avaliada sendo que são comercializados frutos lesados juntamente com frutos não lesados, sem haver qualquer distinção entre eles.

Neste sentido, em alguns calibradores de tecnologia mais recente e recorrendo à análise por infravermelhos é possível identificar os frutos afectados, segregá-los e fazer lotes com poucos ou nenhuns frutos afetados. No entanto, a sofisticação da metodologia e os seus custos elevados de implementação dificultam e inviabilizam o seu uso na generalidade das centrais hortofrutícolas.

Nos últimos anos têm sido diversos os estudos que visam a identificação de compostos que funcionem como marcadores químicos para a detecção de acastanhamentos internos nos frutos, como é o caso do ácido ascórbico. Da mesma forma, os teores em compostos voláteis (o etanol, o acetaldeído e o etileno) são descritos como bons marcadores na identificação de lesões desenvolvidas em frutos sujeitos a diferentes condições de stress (frio, calor, desidratação, baixa concentração de oxigénio) [73][74][79].

No entanto, encontra-se ainda por esclarecer se estes compostos permitem a detecção atempada de desordens de acastanhamento interno em pera armazenada em condições de AC.

O desenvolvimento de métodos não destrutivos para detectar acidentes fisiológicos em frutos levou à aplicação de um método hifenado, a cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (GC-MS) de modo a detetar os compostos orgânicos voláteis produzidos por frutos e que possam ser utilizados como sinalizadores de sintomas de escaldão superficial, acastanhamentos internos ou outros problemas de conservação.

Apesar deste método exigir um extenso desenvolvimento e de precisar de ser otimizado para cada fruto e para cada cultivar, oferece um modo relativamente rápido e fiável para a deteção dos acidentes fisiológicos pós-colheita durante o período de armazenamento [80].

A cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa é uma técnica híbrida que combina duas técnicas analíticas (Figura 8) que ajudam a detetar e a determinar os componentes de uma mistura química complexa. Esta técnica agrega o potencial da capacidade de separação de um cromatógrafo gasoso (GC) com as propriedades de deteção de um espectrómetro de massas (MS) de modo a obter uma ferramenta analítica mais eficiente e rápida. Assim, o GC consegue separar todos os compostos voláteis de uma amostra e o MS fragmenta os compostos e identifica-os com base na sua massa, permitindo uma análise qualitativa e quantitativa [81].

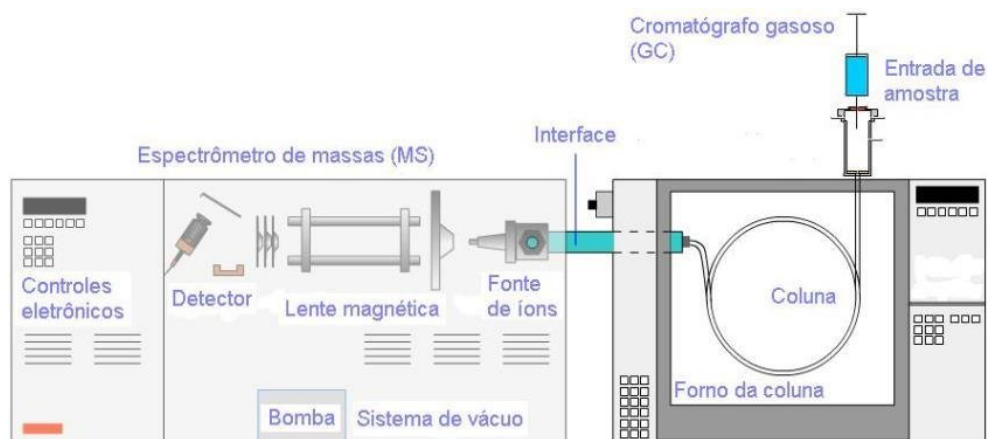


Figura 8 - Esquema de um GC-MS.[82]

A GC-MS oferece uma identificação da amostra melhorada, uma maior sensibilidade, a possibilidade de uma maior variedade de amostras serem analisadas e resultados mais rápidos, o que permite uma extensão de aplicações do GC-MS em diversas áreas. Compostos aromáticos como ácidos gordos, ésteres, aldeídos, álcoois e terpenos presentes na comida e em bebidas podem ser analisados por GC-MS [83].

A amostra é injetada no injetor do GC e, se esta estiver no estado líquido, é vaporizada. Do injetor, a amostra em estado gasoso, passa para a coluna onde são separados os vários componentes presentes na mistura. Neste caso é usada uma coluna capilar, cujas paredes internas estão recobertas com um filme fino de uma fase estacionária (FE) sólida. A FE deve ter características relativamente próximas das dos solutos a ser separados e deve interagir diferencialmente com os componentes da amostra. Idealmente a FE deve ter uma ampla gama de temperaturas de uso (maior flexibilidade na otimização da separação), uma boa estabilidade química e térmica (maior durabilidade da coluna e não reagir com componentes da amostra), pouca viscosidade (maior eficiência, menor resistência à transferência do analito entre fases) e um elevado grau de pureza (ausência de picos desconhecidos nos cromatogramas), de modo a não deixar vestígios na amostra que depois possam ser detetados com esta e causar interferências.

Os compostos fazem o seu percurso pelo injetor e pela coluna com o auxílio de um gás inerte pressurizado (que pode ser hidrogénio, hélio, árgon ou nitrogénio) denominado como gás de arraste, que não interage com o soluto. No mecanismo de fase estacionária sólida ocorre o fenómeno de adsorção na interface entre o gás de arraste (fase móvel – FM) e a FE [84].

À medida que os componentes da mistura são separados, estes eluem da coluna em tempos diferentes, correspondente ao seu tempo de retenção. No forno é possível controlar a temperatura da coluna que é essencial para a obtenção de uma boa separação dos compostos da mistura e uma boa resolução. As gamas de temperatura em função do tempo são programadas de acordo com a composição da amostra [85][86].

Podem fazer-se análises isotérmicas, onde a temperatura se mantém constante ou pode programar-se a temperatura. Geralmente, as condições isotérmicas são usadas quando a mistura tem poucos compostos e estes tem uma polaridade e um ponto de ebulição similares. Quando a amostra tem muitos compostos com uma grande variedade de pontos de ebulição, um programa de temperatura é necessário para separar todos os componentes da mistura. Assim, os compostos podem ser separados com base no seu ponto de ebulição [84].

Uma vez que os componentes saem da coluna do GC, estes passam na interface entre o GC e o MS e de seguida são ionizados pelo espectrómetro de massa usando uma fonte de ionização química ou de impacto de electrões. O impacto de electrões (EI) é o tipo de ionização mais usado em GC-MS. As moléculas na fase gasosa são bombardeadas com electrões de alta energia o que resulta na produção de um ião molecular positivo (M^+) com um e^- desemparelhado. Estes iões, têm bastante energia interna e, ao passar para um estado de energia mais baixo, vão fragmentar-se resultando nos múltiplos picos do espectro de massa [85][87].

Os iões, quando fazem o percurso da fonte de iões até ao analisador massa/carga (m/z) e depois até ao detetor, estão em movimentação livre. O seu caminho e direcção deve ser determinado unicamente pelo campo

elétrico ou magnético usado para os separar de acordo com os seus valores de m/z . Por esta razão, o MS tem de ser operado a uma pressão muito baixa, isto é, a vácuo. Os iões não podem chocar com nada que os possa fazer mudar de direcção ou que os possa fragmentar e, como tal, o MS é operado a pressões muito baixas, na ordem dos 10^{-3} Pa ou menos. O GC-MS é um sistema dinâmico em que o gás de arraste é continuamente introduzido e de forma a manter a pressão necessária para a operação, o gás tem de ser também continuamente removido. A função do sistema de vácuo é assim a de remover o gás ao mesmo tempo que se mantém a pressão ao nível adequado [85][87].

Depois de ionizada, a amostra segue para um analisador de massa, isto é, um filtro de massa que separa a mistura de iões formados segundo a relação massa-carga (m/z). O analisador de massa é um quadrupolo que é composto por quatro hastes metálicas paralelas nas quais se aplica um potencial eléctrico constante. Os iões entram no espaço entre os cilindros, numa das extremidades, e são acelerados. Para cada voltagem aplicada, somente iões com certo valor de m/z possuem uma trajetória estável e são capazes de atravessar o quadrupolo [87][88].

Os últimos passos do processo envolvem a deteção e análise dos iões, onde os picos dos diferentes compostos aparecem em função da sua razão m/z . Ao mesmo tempo, a altura de cada pico é proporcional à quantidade de composto presente na mistura. Uma amostra complexa irá produzir muitos picos diferentes e a leitura final será um espectro de massa. Juntamente com o espectro de massa obtém-se um cromatograma criado somando as intensidades de todos os picos do espectro de massa que pertencem ao mesmo *scan*. Este é o chamado TIC (*Total Ion Chromatogram*) e é similar a um cromatograma de um GC [89]. De modo a identificar e quantificar os compostos e analitos desconhecidos, utilizam-se bibliotecas de espectros de massa fornecidas pelos *softwares* dos programas de operacionalização dos equipamentos [85][86][87].

A GC-MS pode ser usada nos modos *full scan MS* ou *select ion monitoring* (SIM) para cobrir uma vasta gama de razões m/z ou para reunir dados para massas específicas que sejam de interesse, respetivamente [85].

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

Neste estudo foram utilizadas amostras de peras da variedade Rocha da campanha de 2020/2021 provenientes de três pomares diferentes da região do Oeste, dois do concelho do Cadaval e um do concelho do Bombarral. Os frutos foram colhidos em Agosto de 2020 e colocados, na mesma semana, nas câmaras de conservação (Figura 9) à escala piloto do RochaCenter. As câmaras de refrigeração encontravam-se a -1°C e dentro das câmaras estavam os contentores com diferentes condições atmosféricas e humidade relativa de 90-93%. Neste trabalho foram estudadas peras conservadas em atmosfera normal, em condições de AC, de ULO e peras tratadas com 1-MCP (312 ppb, segundo o protocolo homologado) em AC. Cada contentor, com cerca de $0,5\text{ m}^3$, tinha no seu interior duas caixas de peras de cada pomar ($\pm 30\text{ kg/pera/pomar}$).



Figura 9 - Dentro de uma das câmaras de refrigeração do RochaCenter, quatro contentores com caixas de fruta de diferentes cores, cada uma respectiva a um pomar. Na data da fotografia as condições de atmosfera, no interior dos contentores, ainda não tinham sido estabelecidas [90].

3.2 REAGENTES

Os reagentes utilizados para as diferentes metodologias foram: água destilada (Blandis), iodo (99+%, pure, Acros Organics) e iodeto de potássio (98%, extra pure, Acros Organics) para determinar a taxa de regressão do amido, NaOH (Pellets, Fisher Chemical) para a determinação da acidez total titulável, ácido gálico (Acros Organics), carbonato de sódio (extra pure 99,95%, Acros Organics) e Folin-Ciocalteu reagente fenólico (Fisher Scientific) para a quantificação dos compostos fenólicos, metanol (analytical reagent grade 99,9%, Fisher Chemical), HCl (analytical reagent grade, 37%, Fisher Chemical) para fazer a solução extratora, ácido ascórbico (analytical reagent grade, 99,7%, Fisher Chemical) e DPPH (95%, Alfa Aesa, Thermo Fisher Scientific) para determinar a capacidade antioxidante, Hexano (Carlo Erba Reagents) para a quantificação de α -farneseno e trienos conjugados.

3.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FRUTOS PÓS-COLHEITA

Para estas análises foram utilizadas três amostras, cada uma constituída por 20 frutos, selecionados aleatoriamente, provenientes de cada um dos três pomares, de forma a obter uma amostra heterogénea. Os frutos não foram analisados imediatamente à sua chegada do campo uma vez que se encontravam quentes, tendo sido deixados a estabilizar, até ficarem à temperatura ambiente ($\pm 20^\circ\text{C}$).

3.3.1 DETERMINAÇÃO DA COR

De modo a determinar a cor dos frutos utilizou-se um colorímetro (Chroma Meter CR 400, KONICA MINOLTA), que foi primeiramente calibrado com a placa branca de calibração, que vem com o aparelho. As medições foram realizadas numa zona representativa da epiderme de cada fruto de cada amostra [1][19].

A colorimetria é a ciência e o conjunto de técnicas que procura descrever, quantificar e simular, com o auxílio de modelos matemáticos, a percepção da cor pelos seres humanos. Esta tenta representar a interação da luz com os materiais que é percebida pelo olho e interpretada pelo cérebro.

O equipamento mediu os parâmetros L^* , a^* e b^* . O L^* representa a luminosidade da amostra (intervalo de variação de 0 a 100 correspondendo a preto e branco), o parâmetro a^* , a cor de superfície com variações de cor entre vermelho e verde (+60 a -60) e o parâmetro b^* , a cor de fundo com variações entre amarelo e azul (+60 a -60). A aproximação das coordenadas a^* e b^* a zero indica cores neutras como o branco, cinzento e preto. Estes parâmetros permitem ainda calcular a saturação ou cromaticidade da cor (C^*) e a tonalidade (hue°) de acordo com as equações (1) e (2), respectivamente:

$$C^* = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})} \quad (1)$$

$$\text{hue}^\circ = \text{arc tan} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (2)$$

Assim, do aparelho foi possível retirar os valores de L^* , C^* e $^\circ\text{hue}$.

A cromaticidade é uma medida do croma ou da saturação da cor e representa a distância ao eixo neutro. O atributo de cor Hue pode ser definido como o ângulo ($0-360^\circ$) que transmite a tonalidade de cor, sendo que ângulos entre 0° e 90° correspondem aos tons mais quentes como vermelhos, laranjas e amarelos, os ângulos de 90° a 180° representam os tons amarelos, verdes e cianos de 180° a 270° os cianos, azuis e púrpuras e por fim, de 270° a 360° correspondem aos púrpuras, magentas e os vermelhos novamente (Figura 10) [91].

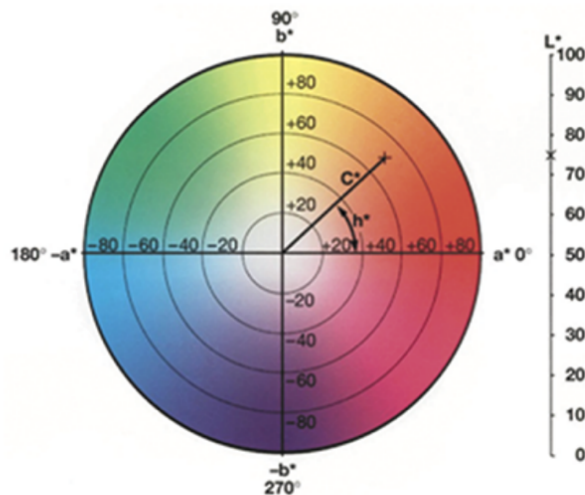


Figura 10 - Espaço de cor L* C* hue^o [91].

3.3.2 PESO

Para avaliar o peso médio dos frutos de cada pomar, as peras foram pesadas individualmente numa balança analítica de precisão (Fisherbrand, Precision Series, Fisher Scientific, modelo FPRS4202/E) e aplicou-se a equação 3, que se apresenta de seguida. A balança tem precisão de decigramas e os resultados são expressos em gramas.

$$\text{Peso médio amostra} = \frac{\sum \text{Peso do fruto}}{n} \quad (3),$$

Onde n representa o número de frutos que constituem a amostra.

3.3.3 CALIBRE

Os calibres foram determinados com um paquímetro/craveira mecânica digital (Calibre Digital, POWERFIX, Profi, modelo HG00962A), colocando-o na zona aparentemente mais larga da secção equatorial, zona de maior diâmetro do fruto. A craveira tem precisão de 0,01 mm e os resultados são apresentados em milímetros [1][19].

$$\text{Calibre médio amostra} = \frac{\sum \text{Calibre do fruto}}{n} \quad (4),$$

Onde n representa o número de frutos que constituem a amostra.

3.3.4 FIRMEZA DA POLPA

Para este teste utilizou-se um penetrómetro (Turoni, Fruit Pressure Tester, modelo FT 327) com precisão de 0,1 kg e um ponteiro de 8 mm de diâmetro (utilizado para as peras).

Em primeiro lugar retirou-se uma pequena e fina película da epiderme do fruto de duas zonas diametralmente opostas (da zona equatorial) utilizando a lâmina peladora do equipamento. Nas superfícies do fruto sem casca foi possível inserir o penetrómetro directamente na polpa. A penetração deve ser perpendicular ao corte feito, com o fruto seguro e apoiado na bancada, e a força aplicada deve ser moderada e

uniforme, até à ranhura do ponteiro do aparelho. Esta operação deve ser efetuada rapidamente, pois a velocidade de introdução do penetrómetro afeta o resultado final (maior velocidade, melhor leitura). O valor da dureza do fruto é a média dos dois valores determinados em cada pera e é expresso em kg/0,5cm² (mais utilizado no caso das peras) [1][19].

3.3.5 TEOR EM SÓLIDOS SOLÚVEIS (TSS)

O teor em sólidos solúveis foi determinado com um refratómetro digital (Pocket Refractometer, ATAGO, modelo S710133) através do índice refractométrico, expresso em °Brix (percentagem de sólidos solúveis por 100 g de produto) ou %Brix (aparelho de 0 a 53%).

A quantificação dos sólidos solúveis consiste na contagem dos compostos que se encontram dissolvidos no sumo da fruta. Sendo que a maior parte destes são açúcares, a análise por refratometria é muitas vezes equiparada ao teor de açúcar do sumo do fruto [92].

Antes de proceder às medições das amostras o aparelho foi calibrado com água destilada. De seguida cortou-se uma fatia de cada lado das peras e estas fatias foram espremidas de modo a inserir algumas gotas de sumo do fruto no óculo do refratómetro. Para a caracterização da amostra calculou-se a média dos TSS de todos os frutos [1][19].

$$TSS \text{ médio amostra} = \frac{\sum \text{°Brix do fruto}}{n} \quad (5),$$

Onde n representa o número de frutos que constituem cada amostra.

3.3.6 TESTE DE REGRESSÃO DO AMIDO

Após a medição do teor em sólidos solúveis as peras foram cortadas ao meio, equatorialmente, e a parte dos frutos com pedúnculo foi colocada num recipiente com fundo plano e com aproximadamente 2 a 3mm de altura de uma solução de iodo. A solução de iodo foi preparada com 10 g de iodo, 40 g de iodeto de potássio e 1 L de água tendo permanecido em agitação (placa de agitação, Fisher brand) durante 48 horas com aquecimento a 115°C. A sua conservação foi feita em frasco de vidro no escuro revestido com papel de alumínio.

Após 30 segundos de imersão, os frutos foram retirados da solução de iodo e deixados a escorrer, ao ar, durante 5 a 10 minutos. A coloração da polpa foi comparada com a da Tabela de Regressão de Amido que se encontra em anexo (Anexo A.1). O amido presente no fruto reage com a solução fazendo com que a sua polpa apresente uma cor escura [1][19]. Foi calculado a taxa de regressão média com base na equação (6):

$$Grau \text{ amido médio amostra} = \frac{\sum \text{Grau amido do fruto}}{n} \quad (6),$$

Onde n representa o número de frutos que constituem cada amostra.

3.3.7 ACIDEZ TOTAL TITULÁVEL

A determinação deste parâmetro baseia-se numa reacção ácido-base, ou seja, entre os ácidos presentes no sumo do fruto e uma base titulante, neste caso o NaOH. O ácido málico é um dos ácidos presentes na pera, mais utilizado na literatura, e por isso o valor de acidez expressou-se em ácido málico (g/L).

Em primeiro lugar, foi necessário preparar 500 mL de uma solução de NaOH a 0,1M a partir de NaOH a 1M. Realizou-se o cálculo para saber quanto se deveria pesar de NaOH para fazer 500 mL de solução a 1M. Numa balança analítica foi necessário pesar 19,999 g de NaOH. A solução a 0,1M preparou-se a través de uma diluição. Colocaram-se 50 mL da solução de NaOH 1M num balão volumétrico de 500 mL perfazendo depois o volume com água destilada.

Cada amostra corresponde a um pomar diferente e foram utilizadas cinco peras de cada um para extrair 25 mL de sumo puro, necessário para realizar a titulação. O sumo foi feito com uma liquificadora comercial e colocado num copo de 100 mL. A montagem experimental consistia de uma bureta de 50 mL num suporte, que se encheu com a solução de NaOH a 0,1M, e por baixo uma placa de agitação com o copo com a amostra de sumo puro ao qual se adicionou um agitador magnético. Enquanto o sumo se encontrava em agitação, foram adicionadas gotas da solução básica presente na bureta até se atingir o ponto de equivalência de pH = 8,15. O pH foi medido com um potenciómetro (Seven compact duo S213, Mettler Toledo). O volume de NaOH gasto foi quantificado de modo a determinar a acidez de acordo com a equação (7):

$$\text{Acidez titulável (g/L)} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times M_{\text{NaOH}}}{V_{\text{amostra}}} \times Eq \quad (7),$$

onde V_{NaOH} representa o volume da solução de NaOH gasto na titulação, Eq (67,04) é o factor de equivalência-grama correspondente ao ácido málico, M é a concentração da solução básica e V_{amostra} é o volume de amostra que foi titulado.

Para alguns casos, em que se ultrapassou o ponto de equivalência foi necessário corrigir o volume de solução gasto recorrendo à equação (8):

$$V_{\text{NaOH corrigido}} = 8,15 \times \frac{V_{\text{NaOH}}}{\text{pH}_{\text{final}}} \quad (8)$$

Seguiu-se o protocolo utilizado no RochaCenter (nº 01.2020) adaptado de [93].

3.3.8 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Para a determinação dos compostos fenólicos utilizou-se o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. À chegada das peras, separaram-se cinco frutos de cada pomar e cada pera foi cortada em quatro partes iguais. Estes foram colocados em sacos plásticos e em gelo seco de modo a não oxidarem e foram conservados a -80°C a aguardar a realização das análises.

3.3.8.1 Reta de calibração

Elaborou-se a reta de calibração preparando várias soluções de ácido gálico de concentrações diferentes e conhecidas. Para a solução mãe, pesaram-se 0,5 g de ácido gálico numa balança analítica e adicionou-se 500

mL de água destilada de modo a obter uma concentração de 1 g/L. As outras soluções foram preparadas através da diluição da solução mãe (Tabela 2).

Tabela 2 - Quantidades necessárias de solução mãe e de água destilada de modo a preparar as soluções da reta de calibração para a quantificação de compostos fenólicos.

	V solução mãe (mL)	V água destilada (mL)	C (g/L)
Solução 2	20	5	0,8
Solução 3	15	10	0,6
Solução 4	10	15	0,4
Solução 5	20	60	0,2
Solução 6	5	95	0,05

De cada uma das soluções foram pipetados 50 μ L para tubos de ensaio e foram adicionados 250 μ L do reagente fenólico Folin-Ciocalteu e 4,2 mL de água desionizada. No vortex (FisherBrand) misturou-se tudo vigorosamente à velocidade máxima. Adicionou-se ainda aos tubos de ensaio 500 μ L de uma solução de carbonato de sódio a 20% (w/v) e as misturas foram deixadas a incubar durante 2 horas à temperatura ambiente (20 °C). O branco foi realizado tendo em conta o mesmo procedimento, substituindo apenas a amostra por água desionizada.

Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram colocadas nas cuvets e no espectrofotómetro para ler a absorvância a um comprimento de onda de 765 nm.

3.3.8.2 Extração

Para efectuar a determinação do teor de fenóis totais foi necessário realizar a extração dos compostos fenólicos. Para tal, foi necessário retirar as amostras do frio. Uma vez descongeladas, pesaram-se 10 g (peso fresco) de polpa com epiderme. Preparou-se uma solução de metanol: ácido clorídrico: água (79,5: 0,5: 20) (v/v/v) num balão volumétrico de 100 mL. Depois da solução extratora preparada juntou-se 10 mL às amostras e foram deixadas em agitação durante duas horas e tapadas da luz com papel de alumínio.

Após as duas horas as amostras homogeneizadas foram filtradas para tubos de Falcon com o auxílio de um funil forrado com papel de filtro (150 mm diâmetro, FisherBrand).

3.3.8.3 Método Colorimétrico

O método de Folin-Ciocalteu baseia-se na redução do agente Folin-Ciocalteu em meio alcalino, através da reação com os compostos fenólicos presentes na amostra. Ao reduzir-se, o fosfomolibdato-fosfotungstato transforma-se em molibdénio que apresenta uma coloração azul. Assim, foi possível fazer a leitura da solução no espectrofotómetro. Quanto mais forte for a cor azul, maior será a quantidade de compostos fenólicos.

Desta forma, misturaram-se 50 μ L do extrato filtrado com 250 μ L do reagente fenólico Folin-Ciocalteu e 4,2 mL de água desionizada, procedendo-se da mesma forma que para fazer a recta de calibração. Adicionou-se 500 μ L da solução de carbonato de sódio previamente preparada e deixou-se incubar durante 2 horas. As amostras foram colocadas cuvets e no espectrofotómetro foram lidas as absorvâncias a 765 nm.

Seguiu-se o protocolo utilizado no RochaCenter (nº 03.2020) adaptado de [94].

3.3.9 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Utilizou-se o método do DPPH para determinar a capacidade antioxidante dos frutos.

3.3.9.1 Solução de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)

De modo a preparar a solução de DPPH foi necessário pesar numa balança analítica 0,024 g deste composto em vidro de relógio. Na *hotte* e recorrendo a um funil passou-se o DPPH para um frasco de Schott onde foram adicionados 100 mL de metanol. Agitou-se a mistura até se obter uma solução homogénea.

De seguida, foi necessário realizar uma diluição 1:5. Para tal, na *hotte* pipetou-se 6 mL da solução de DPPH anterior para um frasco de Schott e adicionaram-se 24 mL de metanol, de forma a obter 30 mL de solução. Agitou-se a mistura até se obter uma solução homogénea.

3.3.9.2 Reta de calibração

Preparou-se uma solução mãe de 0,25 g de ácido ascórbico/L, tendo sido necessário pesar num vidro de relógio 0,00625 g de ácido ascórbico numa balança analítica, passar para um balão volumétrico de 25 mL e perfazer o volume com água destilada. Depois de misturar tudo até se obter uma solução homogénea foi possível fazer as restantes soluções para poder construir a reta de calibração (Tabela 3).

Tabela 3 - Quantidades necessárias para a preparação das soluções para a reta de calibração utilizada na determinação da capacidade antioxidante.

	V solução anterior (mL)	V água destilada (mL)	C (g/L)
Solução 2	8	2	0,20
Solução 3	7,5	2,5	0,15
Solução 4	3,3	1,7	0,10
Solução 5	2,5	2,5	0,05
Solução 6	1	4	0,01

Pipetou-se 50 µL de cada solução para um tubo de Falcon e adicionou-se 950 µL de solução diluída de DPPH a cada tubo. Os tubos foram colocados em agitação na placa de agitação durante 15 minutos. Uma vez prontas, as amostras foram passadas para as cuvetes e colocadas no espectrofotómetro onde as suas absorvâncias foram lidas a um comprimento de onda de 515 nm. O branco foi realizado tendo em conta o mesmo procedimento, substituindo apenas a amostra por água desionizada.

3.3.9.3 Extração de antioxidantes

Para cada amostra, pesou-se um total de 10 g retiradas de cinco frutos colocando-as em copos de 100 mL. Foram utilizados 10 mL da solução extratora previamente preparada para juntar a cada amostra e uma vez adicionados colocou-se também um agitador magnético em cada copo e estes permaneceram durante 2 horas sobre a placa de agitação. Por fim, filtraram-se os extratos, com o auxílio de um funil e de papel de filtro, para tubos de Falcon.

3.3.9.4 Método DPPH

De cada extrato de pera preparado, pipetou-se 50 µL para um tubo de Falcon e adicionou-se 950 µL de solução diluída de DPPH. Os tubos foram colocados em agitação na placa de agitação durante 15 minutos. Uma vez prontas, as amostras foram passadas para as cuvets e colocadas no espectrofotômetro onde as suas absorvâncias foram lidas a um comprimento de onda de 515 nm.

Seguiu-se o protocolo utilizado no RochaCenter (nº 05.2020) adaptado da referência [95].

3.3.10 TRIENOS CONJUGADOS E α -FARNESENO

Previamente, tal como para a quantificação de compostos fenólicos, foi necessário descongelar os quartos dos frutos que se tinham cortado e conservado a -80°C.

Cada amostra, para esta análise, foi constituída por dois quadrantes da zona equatorial de cada um de cinco frutos. De cada quadrante cortaram-se finos discos de epiderme com diâmetro aproximado de 1,5 cm, foram colocados num tubo de Falcon e pesados numa balança analítica. Adicionou-se aos tubos de Falcon 5 mL de hexano e foram deixados em agitação durante 10 minutos. Procedeu-se à filtração do extrato para um novo tubo de Falcon e perpez-se o volume até aos 5 mL com hexano. Por fim, analisaram-se as amostras por espectrofotometria de UV, num espectrofotômetro (Genesys 10uv Scanning, Thermo Scientific) a dois comprimentos de onda diferentes, 232 nm para o α -farneseno e 281 nm para os trienos conjugados, tendo-se obtido os resultados em absorvância. De forma a obter a concentração, os cálculos foram feitos através da lei de Lambert-Beer, com a expressão (9):

$$A = \varepsilon \times C \times b \quad (9),$$

onde A representa a absorvância, ε a absorvidade molar ((g/L)⁻¹cm⁻¹), C a concentração (g/L) e b o percurso óptico (1 cm). Sendo os valores de absorvidade molar de $\varepsilon_{232} = 24,740$ para o α -farneseno e de $\varepsilon_{281} = 25,000$ para os trienos conjugados. Os resultados para a concentração foram apresentados em µg/g de fruto (peso fresco).

Seguiu-se o protocolo utilizado no RochaCenter (nº 02.2020) adaptado da referência [96].

3.4 ANÁLISE DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS: OPTIMIZAÇÃO DO MÉTODO

3.4.1 EQUIPAMENTO

As amostras foram analisadas num GC (TRACE 1300 Gas Chromatograph, ThermoFisher Scientific) acoplado a um MS (ISQ QD Single Quadrupole Mass Spectrometer, ThermoFisher Scientific) equipado com uma fonte de ionização por impacto eletrónico e um quadrupolo como analisador de massa. A coluna cromatográfica utilizada foi uma TraceGOLD™ TG-WAXMS (ThermoFisher Scientific) de fase estacionária polar, de polietilenoglicol, de 0,5 µm de grossura, 0,25 mm de diâmetro interno e 60 m de comprimento.

O *software* utilizado para definir os parâmetros do método analítico, aquisição e processamento dos dados foi o Thermo Xcalibur versão 3.1 da Thermo Fisher Scientific.

3.4.2 IDENTIFICAÇÃO DO ETILENO

O etileno é um dos compostos voláteis mais importantes para este estudo, foi por isso necessário em primeiro lugar otimizar um método para identificá-lo utilizando o GC-MS.

Utilizou-se como amostra o gás de uma garrafa que continha uma mistura de nitrogénio e etileno, sendo a concentração de etileno de 4% (v/v) (Air Liquide).

Para proceder à análise foi necessário utilizar um tubo de borracha para passar o gás da garrafa para uma ampola de recolha de gases de vidro de aproximadamente 250 mL. Primeiro, fez-se passar o gás pela ampola durante uns segundos, de modo a fazer uma purga, e só depois se fechou uma das torneiras para começar a enchê-la. Após alguns segundos fechou-se a garrafa e a outra torneira da ampola e retirou-se o tubo de borracha. Através do septo da ampola extraiu-se a amostra com uma seringa *gas tight* de 1 mL (ThermoFisher Scientific).

A amostra foi analisada no GC-MS, utilizando uma temperatura do injector de 200 °C, modo *splitless*, e como gás de arraste o hélio (Air Liquide) com um caudal de 1 mL/min. Sabendo que o etileno é um composto muito volátil, colocou-se o forno a uma temperatura o mais baixa possível começando nos 30 °C, onde permaneceu durante 4,5 minutos. De seguida decidiu-se aumentar 20 °C por minuto até chegar aos 100 °C, onde permaneceu durante 5 minutos. A detecção foi feita utilizando 70 eV de energia de ionização, 200 °C de temperatura da fonte de iões e 200 °C de temperatura da interface. Definiu-se uma gama de massas do m/z de 1 ao 35 (amu) pois a amostra continha apenas N₂, etileno e, possivelmente, vestígios de ar.

Como nas amostras reais se pretendiam identificar todos os compostos orgânicos voláteis produzidos pela pera, fazer uma análise *full scan* (Figura 11) era essencial. Assim, começou por se fazer um *full scan* com um cromatograma TIC (*Total ion chromatogram*) para analisar o padrão de modo a perceber se assim se detectaria o etileno. Sendo possível, poderia fazer-se apenas uma análise para detectar o etileno e todos os outros compostos.

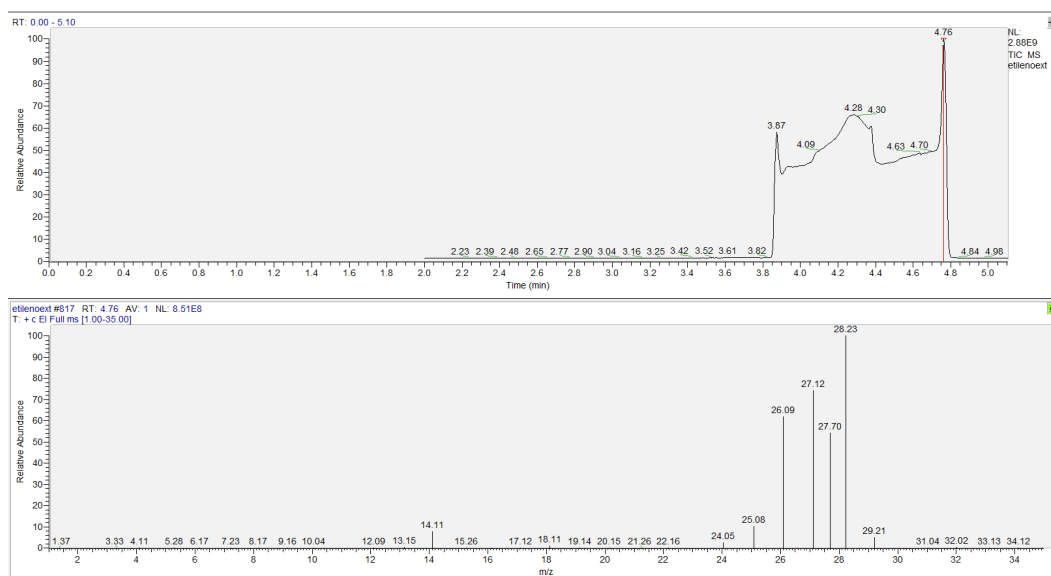


Figura 11 - Cromatograma TIC da amostra de etileno (4%) e respetivo espetro de massa correspondente ao pico que se apresenta aos 4,76 min.

No cromatograma da figura 11 é possível verificar que existe um pico, ou vários picos, que não se encontram bem definidos. Isto pode acontecer devido a uma amostra não injectada correctamente, a interferências entre os compostos, podendo estes estar a ser eluídos ao mesmo tempo, acabando assim por haver também possibilidade de sobreposição ou por interferências no espectro de massa. Pode também ser devido ao ruído, ou devido a um método não definido correctamente.

O cromatograma é construído através do sinal do espectro de massa, como explicado anteriormente. Logo, a cada ponto do cromatograma corresponde um espectro de massa. Assim, verificou-se que para o ponto do pico que se formou aos 4,76 min, o espectro de massa correspondia ao espectro do etileno com uma probabilidade de 95,2% (anexo A.5), através de um conjunto de bibliotecas de espectros de massa (NIST MS Search 2.0). O *software* procede à comparação do espectro de massa do composto que se pretende identificar, com todos os espectros existentes nas bibliotecas disponíveis (mainlib, replib, gplib, msmslib, mssearchtoxi, mssearchvolatile, nist_msms, nist_msms2, nist_ri, nistdemo, trlib, txlib e wiley6). Após fazer a comparação, devolve uma lista com todos os compostos que poderiam ser, por ordem de probabilidade (Figura 12).

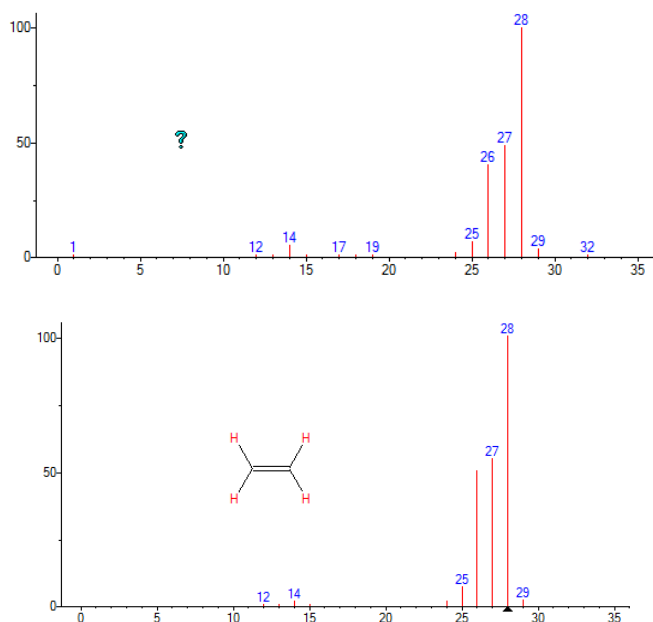


Figura 12 - Comparação do espectro de massa da amostra com o do etileno da biblioteca de espectros (NIST MS Search 2.0).

Foi então necessário alterar o método instrumental para conseguir um pico mais definido. Alterou-se o modo *splitless* para *split* (Figura 13) e definiu-se uma razão *split* de 33,3. Optou-se inicialmente por utilizar o modo *splitless* uma vez que este é adequado para amostras pouco concentradas, no entanto, este não tem efeito em amostras gasosas. Realizaram-se análises com uma razão *split* de 20, 33,3, 60 e 80 com o objectivo de perceber a influência deste parâmetro no cromatograma e poder escolher o valor que apresentasse melhores resultados.

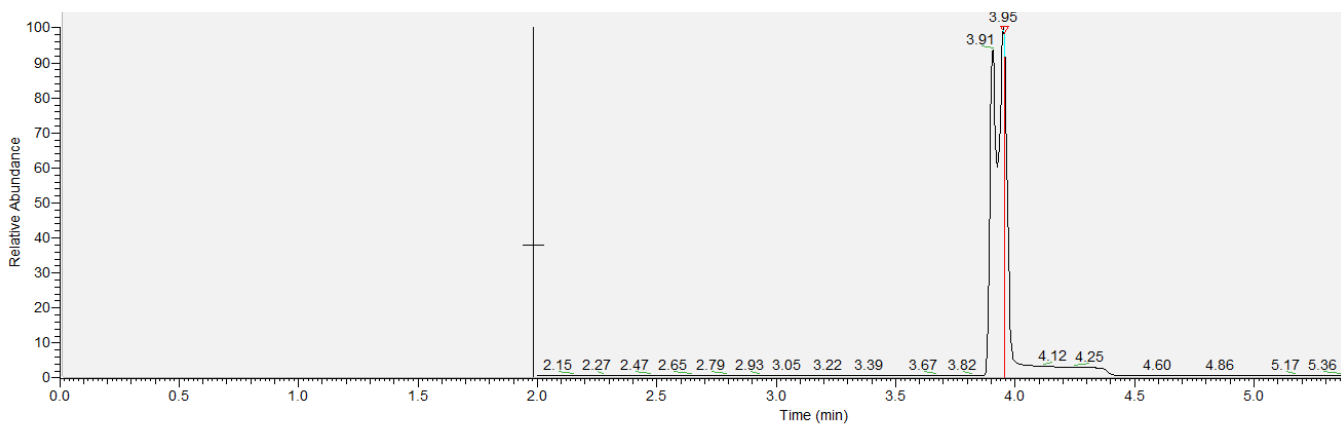


Figura 13 – Cromatograma TIC da amostra de etileno (4%) resultante da alteração do modo *splitless* para *split*.

Ao alterar de *splitless* para *split*, o pico ficou bastante mais definido como se pode observar no cromatograma da figura 13, no entanto, continuou a não estar otimizado uma vez que era um pico duplo. Os picos devem estar bem definidos de modo a ser possível fazer uma integração do pico e uma quantificação do composto em causa o mais correcta possível. O valor de razão de *split* que apresentou melhores resultados foi o de 33,3.

Alterou-se o programa de temperatura implementando um aumento elevado da T, de 100 °C/min no tempo em que saiu o primeiro pico, aos 3,91 min, de modo a ver se ocorria uma separação dos picos, o que não se verificou.

Como referido anteriormente, o gás utilizado como amostra era uma mistura onde o etileno estava presente numa concentração de apenas 4%, sendo o restante correspondente ao nitrogénio.

A detecção do etileno é normalmente feita por GC-FID apesar do GC-MS ser uma técnica com mais sensibilidade [64][67][72][97]. Inicialmente iria desenvolver-se um método instrumental no GC-FID para o estudo do etileno, no entanto, a coluna que se encontrava disponível não se encontrava nas melhores condições, pelo que não foi possível utilizar esta técnica.

Geralmente não se desenvolvem métodos de detecção do etileno para o GC-MS pelo facto de a massa molecular nominal do etileno coincidir com a massa molecular nominal do nitrogénio (Figuras 14 e 15), que é um elemento bastante abundante que produz um *background* elevado do m/z 28 na resolução comparativamente baixa de um analisador de massa quadrupolo [98]. Sendo assim, foi um grande desafio analisar o etileno com um GC-MS.

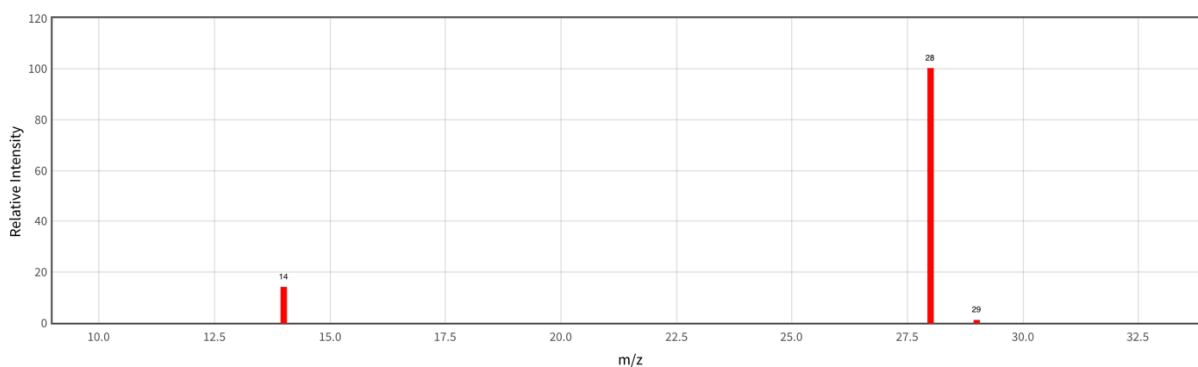


Figura 14 - Espectro de massa (EI) do nitrogénio [99].

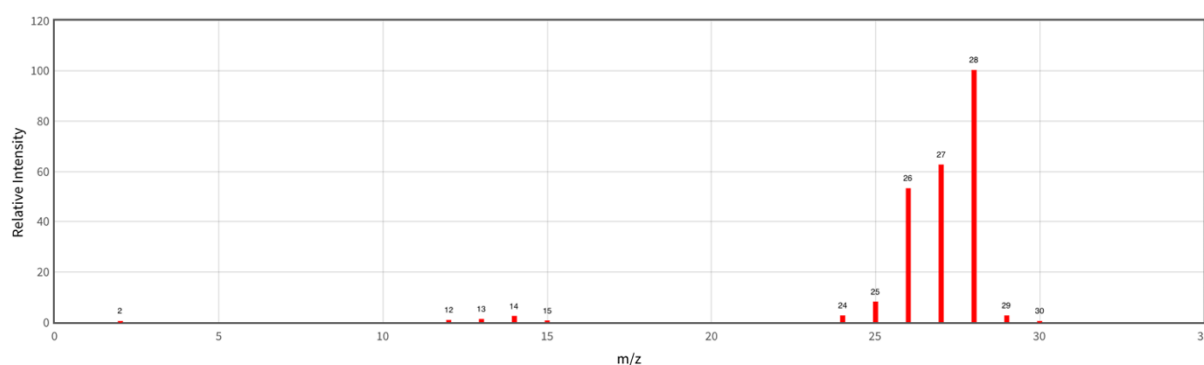


Figura 15 - Espectro de massa (EI) do etileno [100].

A presença de nitrogénio no analisador, mesmo que em baixas concentrações, cria um nível de *background signal* (sinal de fundo) inaceitavelmente elevado num instrumento de discriminação de massa baixa, como é o quadrupolo, que não consegue fazer a distinção dos dois compostos com base nas diferenças na massa exacta (o nitrogénio elementar tem uma massa monoisotópica de 28,0061 contra 28,0313 para o etileno). Embora esta distinção possa ser feita com um instrumento de resolução mais elevada, como um espectrómetro de massa de tempo de voo (GC-TOFMS), seria de maior interesse conseguir fazer a detecção de etileno usando o tipo de espectrómetro de massa mais comumente encontrado em laboratórios de pesquisa de plantas e frutos [98].

O nitrogénio, sendo o principal componente do ar, é inevitavelmente injetado juntamente com a amostra, representando potencial para ser uma grande fonte de ruído de fundo. Pereira *et al.* (2017) conseguiram uma separação cromatográfica razoável do nitrogénio presente na amostra do etileno utilizando uma fase estacionária Al_2O_3/KCl (fase de alumina menos polar), mas os níveis de fundo persistentes do nitrogénio continuaram a limitar a sensibilidade do etileno ao monitorizar m/z 28. Esta coluna era também especializada para a análise de pequenos e leves hidrocarbonetos (C1-C8).

O etileno apresenta, para além do seu ião molecular, que é o pico de maior abundância no seu espectro de massa, os iões M1 (m/z 27) e M2 (m/z 26) resultantes de perdas sucessivas do radical H (ou, alternativamente, perda de H_2) e que são formados com uma abundância relativa de 62,3% e 52,9%, respectivamente (Figura 15). Assim, para reduzir o ruído de fundo do detector, começou-se a explorar estes picos de massa que não se encontram presentes no espectro do nitrogénio [98].

Procedeu-se então a uma nova análise alterando apenas a gama de massas para 23-27,3 m/z, uma vez que em relação à coluna, seria necessário utilizar a que se encontrava disponível.

O elevado sinal de fundo associado com o nitrogénio fica reduzido quando se monotoriza apenas a gama de 23-27 m/z, que representam produtos da fragmentação do etileno, não produzidos pelo N₂.

Obteve-se um cromatograma (Figura 16) com um único pico bem definido. O espectro de massa correspondente a este pico apresentava os iões m/z 24, 25, 26 e 27 unicamente presentes no etileno. Logo, pode concluir-se que este pico corresponde ao etileno.

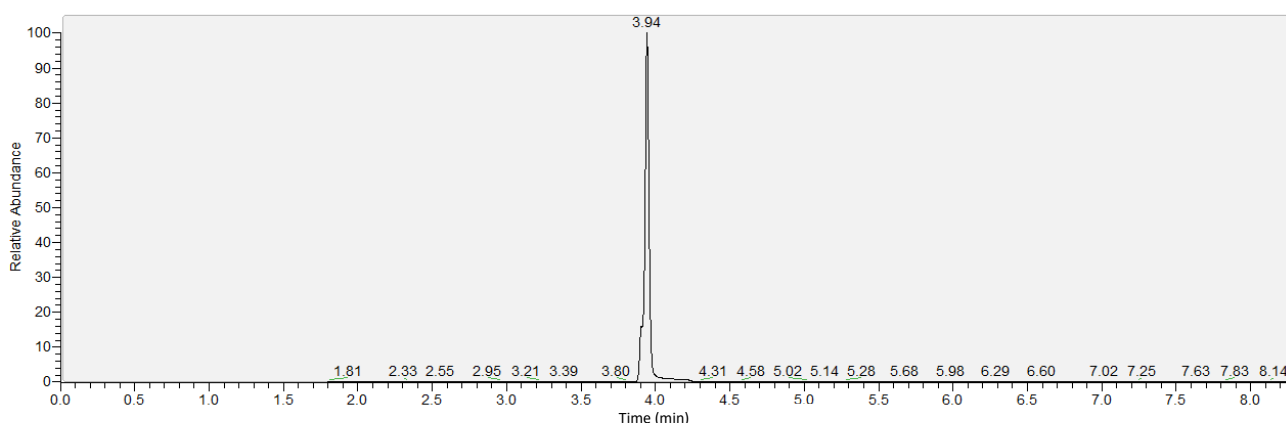


Figura 16 - Cromatograma TIC da amostra de etileno (4%) obtido depois da alteração da gama de massas.

No entanto, foi necessário ter em conta que as amostras do ar envolvente dos frutos não vão estar tão concentradas em etileno, podendo haver mais dificuldades em detetar este composto.

Posteriormente alterou-se o caudal da fase móvel de modo a perceber se este teria alguma influência significativa nos resultados. Este foi definido para valores de 0,5 , 0,8 , 1,2 , 1,5 e 1,8 mL/min. Mudar o caudal do gás de arraste de 1 para 0,8 mL/min apenas fez com que o pico aparecesse um pouco mais tarde (maior tempo de retenção) passando a eluir apenas aos 4,37 min. Verificou-se o mesmo efeito para um caudal de 0,5 mL/min, resultando num tempo de retenção ainda mais elevado como seria de esperar (5,53 min). Pelo contrário, ao aumentar o caudal do hélio para 1,2 , 1,5 e 1,8 mL/min o pico apareceu uns segundos mais cedo. Contudo, para os dois últimos observou-se já uma perturbação no pico, deixando este de ser uniforme e bem definido. Optou-se então por realizar as análises com um caudal de 1 mL/min.

Também se realizaram várias análises alterando apenas a temperatura do injector (200–150 °C) e não se verificou nenhum efeito na sensibilidade ao etileno.

Assim, definiu-se o método para fazer a detecção do etileno com o hélio como fase móvel, 70 eV de energia de ionização e de acordo com o descrito na tabela seguinte (Tabela 4).

Tabela 4 - Parâmetros do método instrumental GC-MS otimizado para a detecção de etileno.

GC		MS	
T injector (°C)	150	T interface (°C)	180
Modo	<i>Split</i>	T fonte iões (°C)	180
Razão <i>split</i>	33.3	<i>Time</i> (min)	1.8
Caudal (mL/min)	1	m/z (amu)	23.5 – 27.3
Programa de T	30 °C por 4,5min → 20 °C/min até 100 °C durante 10 min		

Estabeleceu-se um incremento de T bastante elevado (20 °C/min) para eliminar possíveis vestígios de outros voláteis presentes. Definiu-se um atraso de solvente (*Time*) de 1,8 min de modo a eliminar o excesso de nitrogénio, e que foi implementado para reduzir o desgaste do filamento. Fizeram-se análises também para um *Time* de 2 e 3 min mas os resultados foram semelhantes.

Dados os problemas causados pela presença do nitrogénio e dificuldade em detectar o etileno e conseguir um pico bem definido de modo a ser possível a sua quantificação, foi necessário definir dois métodos instrumentais diferentes. Um destes métodos seria especificamente para a detecção e quantificação do etileno com o GC-MS, uma vez que se tem o objectivo de encontrar e estudar este composto em concreto. O outro método seria um *full scan* para detectar e identificar todos, ou o maior número possível, dos compostos produzidos pela pera Rocha durante o seu metabolismo e conservação.

Algumas das análises feitas a amostras reais, explicadas e descritas no capítulo seguinte, realizaram-se antes de se ter desenvolvido o método de detecção do etileno, não tendo sido aplicado por esta razão.

3.4.3 ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS

Inicialmente, um dos objetivos deste estudo era fazer a monitorização dos voláteis produzidos pelas peras durante os primeiros três meses da sua conservação, tanto da quantidade produzida de cada um, como perceber que compostos é que são produzidos e se ao longo do tempo iam aparecendo outros novos.

Câmara de armazenamento em AN

Assim, a primeira amostra que se analisou foi a atmosfera gasosa da câmara de armazenamento número 9 do RochaCenter, que se encontrava em condições de atmosfera normal. Para recolher a atmosfera da câmara de conservação utilizou-se uma bomba (AgroFresh). O lado da bomba que puxava o ar ligou-se à câmara e o lado por onde saía o ar ligou-se à ampola de recolha de gases de vidro. Através do septo da ampola extraiu-se a amostra com uma seringa *gas tight* de 1 mL.

A amostra foi analisada no GC-MS, com uma temperatura do injector de 200 °C e em modo *splitless*, uma vez que, encontrando-se nos meses iniciais de conservação, sabia-se à partida que a concentração dos compostos seria muito pequena, e como referido anteriormente o modo *splitless* era usado para baixas

concentrações. O gás de arraste utilizado foi o hélio com um caudal constante de 1 mL/min. O programa de temperatura para o forno começou nos 30 °C, onde permaneceu durante 4,5 minutos. De seguida houve um aumento de 20 °C por minuto até chegar aos 100 °C, onde permaneceu durante 3 minutos e por fim, aumentou 10 °C por minuto até chegar aos 200 °C, permanecendo a esta temperatura durante 10 minutos. A deteção foi feita utilizando 70 eV de energia de ionização, uma temperatura de fonte de iões de 200 °C e temperatura da interface de 200 °C. Começou por se fazer um *full scan* numa gama de massas de 1 a 400 m/z (Figura 17).

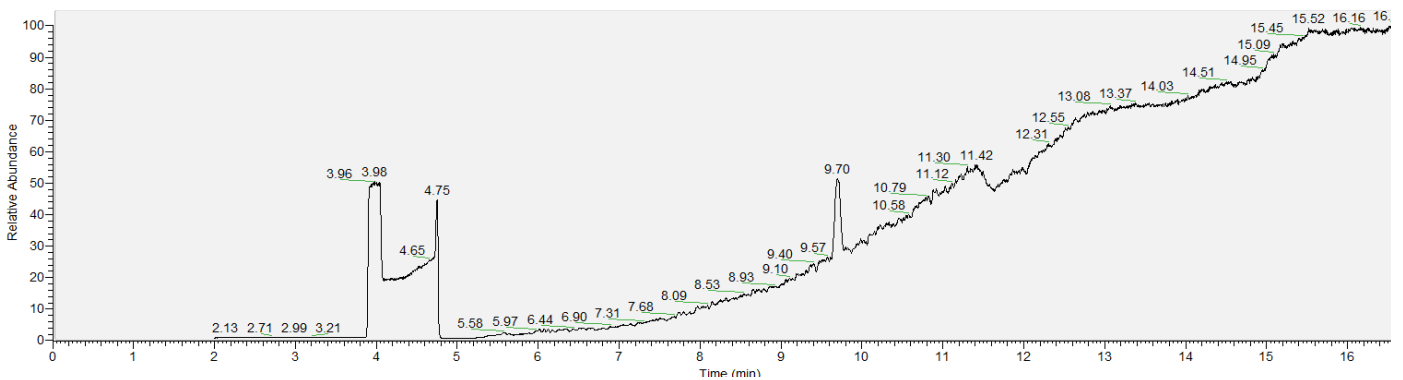


Figura 17 - Cromatograma da amostra de atmosfera gasosa da câmara de conservação em AN.

Nesta análise ocorreu um problema de ruído (Figura 17). Este foi-se agravando ao longo do cromatograma, ou seja, à medida que a temperatura do forno aumenta. Este ruído pode estar também presente porque se definiu uma gama de massas muito elevadas até ao m/z 400, podendo estar a ser detectados picos que causam interferências. No entanto, na maioria dos estudos realizados anteriormente com esta técnica, definiram-se gamas de massa até valores bastante elevados (entre os m/z 350 e os 550) [70][77][78][101][102]. Poderia também ser causado por uma fuga de ar ou um problema de controlo da pressão da coluna.

Para verificar esta possibilidade e perceber de onde poderia vir a fuga molhou-se um papel em acetona e passou-se ao lado da válvula de ventilação do MS, das porcas da coluna do GC ou do injetor. Ao fazer um *scan now* para uma gama de massas de 44-60 m/z, o pico 58 (da acetona) dispararia se houvesse uma fuga no sítio onde se passou o papel. Caso houvesse as soluções seriam mudar o septo do injetor, apertar a válvula de ventilação do MS, a porca da interface (nunca apertar demasiado) ou a porca que liga a coluna ao injetor. Fez-se então o teste da acetona, tendo-se comprovado que não havia qualquer fuga no sistema.

Alterou-se o programa de temperatura do forno, de modo a perceber de que forma esta poderia afetar os resultados. O ruído diminuía para um ritmo de aumento de temperatura mais lento, tendo-se verificado menor intensidade aumentando de 30 °C para 200 °C a um ritmo de 1 °C/min. Apesar da coluna poder ser utilizada até aos 240 °C, para 200 °C já se verificava bastante ruído. Ao diminuir esta temperatura, o ruído também diminuiu.

Alterou-se também a gama de massas para vários valores. O ruído diminuiu para valores mais baixos de m/z (300, 200 e 150). Dos compostos que se tinham definido como compostos de interesse o único que

apresenta picos no espectro de massa com m/z superior a 200 é o α -farneseno (anexo A.4.3) e não são picos significativos, podendo este ser identificado mesmo para uma gama de massa que vá apenas até ao m/z 150.

Existe também outro fator que agrava o ruído no cromatograma que é o *bleeding* da coluna do GC. Este é o normal sinal de fundo gerado pela fase estacionária da coluna. Esta degrada-se e sai da coluna dando sinal no detetor. Quanto maior a temperatura, maior o nível de *bleeding* sendo por isso recomendado operar a coluna sempre a pelo menos 20-30 graus abaixo do limite máximo da coluna [103].

Apesar de ter sido possível melhorar bastante o cromatograma, não se conseguiu detectar e identificar qualquer composto para além de água e os componentes do ar, que eluem todos ao mesmo tempo. O etileno é eluído também juntamente com estes compostos mas não foi detectada a sua presença.

Exsicador

Tendo em conta que a conservação estava ainda em meses iniciais, os voláteis encontravam-se ainda a níveis baixos, o que poderia ser o motivo da dificuldade na sua identificação e otimização do método. Por isso definiu-se uma estratégia para concentrar os voláteis e fomentar a sua produção, colocando os frutos num espaço mais pequeno, tendo uma câmara de instalação piloto. Esta câmara seria um exsicador, onde os frutos seriam colocados sem qualquer tipo de controlo da atmosfera e à temperatura ambiente de modo a que amadurecessem normal e naturalmente.

Assim, cinco peras (740,15 g) foram colocadas dentro de um exsicador (Figura 18). Passados cinco dias, recolheu-se o ar do exsicador para uma ampola de recolha de gases da mesma forma que se procedeu para retirar o ar da câmara. Através do septo da ampola extraiu-se a amostra com a seringa *gas tight* de 1 mL.

Injectou-se a amostra no GC-MS e fez-se uma análise para ver se se detectava a presença de etileno utilizando uma gama de massas de 1-35 m/z . Definiu-se o modo *splitless* uma vez que a amostra estaria provavelmente pouco concentrada. O programa de temperatura e o caudal da FM foram os presentes na tabela 4. As T do injetor, da interface e da fonte de iões mantiveram-se iguais às da análise anterior. Utilizou-se este método porque, apesar de ter apresentado um pico bastante irregular (análise da Figura 11), resultou para a deteção de etileno no padrão a 4%. No entanto, não se obtiveram resultados para esta amostra.



Figura 18 - Peras colocadas no exsicador, à temperatura ambiente.

Realizaram-se as mesmas análises após sete dias de se terem colocado as peras no exsicador e após dez dias, pois as peras ao amadurecerem começam a produzir mais VOCs. Tendo-se obtido os mesmos resultados, colocaram-se mais 15 peras no exsicador para tentar aumentar a quantidade de etileno e de todos os outros VOCs. Uma vez que não foi possível detetar etileno nem outros compostos orgânicos voláteis mesmo fazendo a experiência no exsicador, com cerca de 20 peras, passados vários dias e com as peras num estado de maturação visivelmente avançado, concluiu-se que a solução não seria colocar mais frutos no exsicador nem deixá-los lá durante mais tempo. Contudo, as experiências seguintes foram feitas sempre com amostras com cerca de 20 frutos.

Adsorventes

Como o etileno e os outros compostos voláteis são produzidos pelas peras em quantidades muito pequenas, uma possível solução para permitir a detecção destes compostos seria a sua concentração antes de realizar a análise. Habitualmente para realizar este tipo de análises é necessário concentrar os compostos previamente, existindo já uma técnica para o fazer [68][77][102][104]. A microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME) é uma técnica de extração e pré-concentração bastante simples uma vez que a amostra é fácil de preparar e não é destruída. A extração é feita através de uma fibra própria, havendo vários tipos diferentes que devem ser escolhidos de acordo com os compostos que se pretendem analisar. É necessário ainda um *holder*, onde se coloca a fibra para fazer a injeção no GC-MS, neste caso. A desadsorção é feita colocando a fibra no injectador do GC-MS onde permanece durante o tempo e temperatura adequados.

Este material não se encontrava disponível no laboratório tendo sido necessário encontrar uma alternativa. Recorreu-se à utilização de diferentes adsorventes: três tipos diferentes de carvão activado, norit RB2, norit RB4 (Cabot), fibra (ACC-507-15, 120 g/m², 0,5 mm, Kynol) e um zeólito (peneiro molecular 5A em *pellets*, Sigma Aldrich). Como estes materiais podem ter capacidades de adsorção diferentes, foram todos utilizados para ver se com o auxílio de algum deles se conseguiriam obter resultados, e ao obter resultados, possivelmente fazer até uma comparação entre eles.

Antes de serem utilizados, os adsorventes tiveram de ser tratados de forma a remover a humidade. Estes eram pesados e colocados sobre vidros de relógio e postos dentro da estufa, programada para 150 °C, onde permaneciam durante uma hora.



Figura 19 - Vinte peras colocadas no excicador com zeólito (adsorvente).

Experimentou-se primeiro o carvão activado norit RB4. Preparou-se então o ensaio experimental colocando 20 peras (2,93 Kg) num excicador com uma quantidade de 1,2965 g de carvão activado num vidro de relógio pousado sobre as peras. Após cinco dias passou-se o carvão activado para um *vial* de vidro de 10 mL e fechou-se com a respectiva tampa (d=18mm), com septo de silicone/PTFE (La-Pha-Pack). Utilizou-se um secador de cabelo, na sua potência máxima, durante 5 minutos para aquecer a amostra e desorver os compostos que podiam estar adsorvidos. Com a seringa extraiu-se a amostra através do septo da tampa do *vial*.

Fez-se a injeção no GC-MS e iniciou-se a análise. As condições do GC permaneceram as mesmas tendo-se alterado apenas o final do programa de temperatura, que chegou até aos 100 °C onde permaneceu durante 5 minutos. Esta primeira análise foi feita com o objetivo de tentar detetar especificamente o etileno e por isso utilizou-se um método específico com uma gama de massas de 1-35 m/z.

Não se detetou etileno desta forma e por isso repetiu-se a análise na gama de massas de 1-27,5 m/z. Também não se detetou etileno, mas em ambas as análises apareceu um pico aos 9,37 min. Identificou-se o composto recorrendo à comparação do espectro de massa com os da biblioteca de espetros, que indicou, com maior probabilidade, ser o etanol. Para confirmar que este composto era o etanol, repetiu-se novamente a análise para uma gama de massas de 1-50 m/z, uma vez que este VOC tem picos no espectro de massa entre os 40 e os 50 m/z (anexo A.4.4) e as análises anteriores não abrangiam esta gama de massas. Pode concluir-se que o pico detetado para um TR de 9,37 min era de facto correspondente ao etanol.

Como se detetou o etanol, havia a possibilidade de haver mais algum composto e por isso correu-se a amostra novamente mantendo a gama de massas mas alterando desta vez o programa de temperatura de modo a fazer uma análise que chegasse a uma temperatura mais elevada e que demorasse mais tempo, de forma a dar tempo aos compostos para eluirem. As condições desta análise foram: 30 °C durante 4,5 minutos,

aumento de 15 °C/min até os 150 °C seguido de um patamar com duração de 5 minutos. Não se observou nenhum outro pico no cromatograma.

Realizou-se outra análise para verificar se apareciam compostos para uma gama de massas de 40-120 m/z mas também sem sucesso. Fez-se ainda outra análise para uma gama de massas de 25-27,5 m/z de modo a tentar encontrar o etileno, mas o espectro de massa correspondente ao TR onde deveria sair o etileno tinha apenas a presença do m/z 27. Alterou-se o modo *splitless* para *split* com uma razão de 33,3 tendo resultado num cromatograma com os mesmos picos, mas mais definidos.

O primeiro pico que aparece em todos os cromatogramas, é o pico gerado pela deteção de todos os componentes da atmosfera e muito voláteis, que se encontram em estado gasoso à temperatura ambiente. Como estes compostos estão presentes em grandes quantidades, este pico tem uma grande intensidade relativa e os seus sinais no espectro de massa acabam por causar interferências, não permitindo que outros compostos apareçam porque devem encontrar-se em quantidades muito inferiores. Com o objetivo de evitar este pico, definiu-se uma gama de massas para que o N₂, o O₂, o CO₂ e a água não fossem detetados. Definiu-se então uma gama de massas de 47-200 m/z, apesar de na literatura se definirem sempre métodos com início entre os m/z 30 e o 35. Modificou-se também o programa de temperatura (Tabela 4) permanecendo apenas 3 min nos 100 °C e por fim aumentando 2 °C/min até aos 180 °C durante 5 minutos. Esta análise resultou num cromatograma com muito ruído (Figura 20).

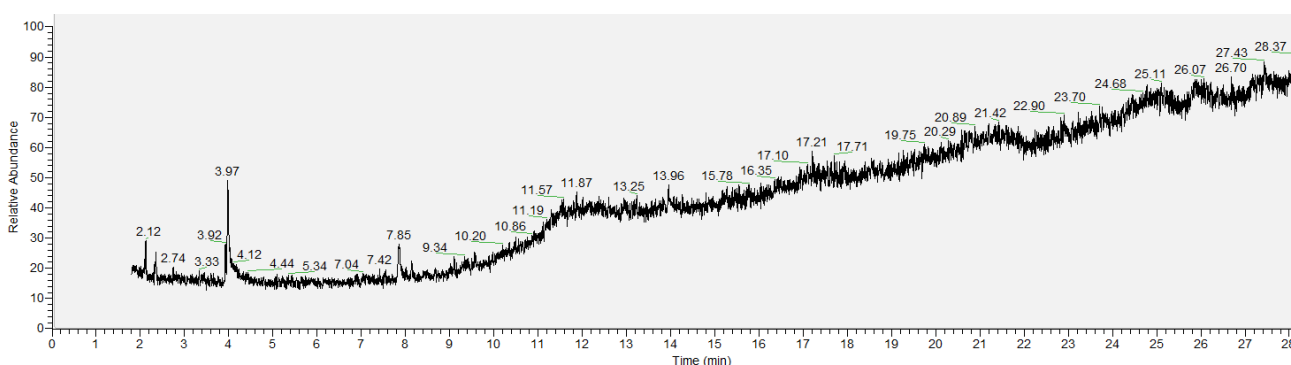


Figura 20 - Cromatograma da análise ao ar desorvido pelo zeólito colocado juntamente com peras no exsiccador.

Alterou-se a temperatura do injetor, a temperatura da interface e a temperatura da fonte de iões para 180 °C e a injeção para o modo *splitless*. Este método fez com que aparecessem picos mas com muito ruído e mal definidos. Alterou-se ainda a gama de massas para 47-150 m/z mas não se verificou uma melhoria significativa.

Tentou fazer-se esta experiência com todos os tipos de adsorventes disponíveis (diferentes tipos de carvão ativado e zeólito), com vários métodos (alterando principalmente o programa de temperatura e a gama de massas), para diferentes tempos de *shelf life* (7, 10 e 14 dias) mas mesmo assim não foi possível detetar etileno nem qualquer outro composto. Apesar de não terem conduzido a resultados que permitissem identificar outros compostos para além da deteção de etanol, os adsorventes continuaram a ser aplicados nas experiências seguintes.

Bananas e maçãs

Realizou-se uma experiência com bananas e maçãs, uma vez que são frutos que produzem quantidades mais elevadas de etileno do que a pera Rocha. Colocaram-se dentro de um exsiccador três bananas e três maçãs (compradas no supermercado mais próximo, no próprio dia), uma quantidade de 1,7906 g de carvão ativado norit RB4 num vidro de relógio e fechou-se o exsiccador. Após sete dias procedeu-se à análise da amostra. Abriu-se o exsiccador, colocou-se o carvão ativado num *vial* de vidro de 10 mL e fechou-se com a respetiva tampa com septo. Para desorver os compostos aqueceu-se o carvão ativado com um secador de cabelo, na sua potência máxima, durante 5 minutos. Com a seringa retirou-se a amostra de gás através do septo da tampa do *vial* e fez-se a injeção no GC.

Numa tentativa de detetar o etileno, utilizou-se um método mais adequado para este, com uma gama de massas de 23,5-27,3 m/z. Utilizou-se o método descrito na Tabela 4 mas com a temperatura do injetor de 180 °C e as temperaturas de interface e da fonte de iões igual a 200 °C, tendo-se obtido o cromatograma da Figura 21.

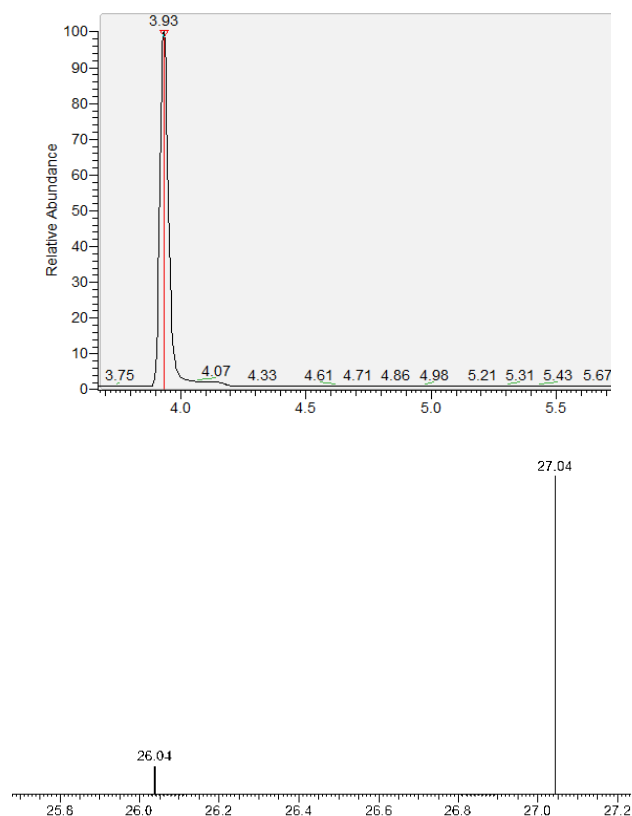


Figura 21 - Cromatograma com pico aos 3,93 min e respetivo espetro de massa (amostra de bananas e maçãs).

Apareceram dois picos no cromatograma (Figura 21), o inicial aos 3,93 min, onde deveria eluir o etileno, e um aos 9,29 , correspondente ao etanol. Ao pico do cromatograma formado aos 3,93 min correspondia um espetro de massa que apresentava o m/z 26 e o 27 podendo ser indicativos da presença de etileno. No entanto, ao fazer esta mesma análise para o etileno a 4% da garrafa apareceram os picos 24, 25, 26 e 27 m/z no espetro de massa. Experiências feitas para peras, com diferentes adsorventes e com o mesmo método

deram o mesmo resultado. Por exemplo para peras em *shelf life* durante quatro dias colocadas no exsicador com fibra de carvão ativado (0,1861 g) durante 17 horas (*overnight*) na figura 22:

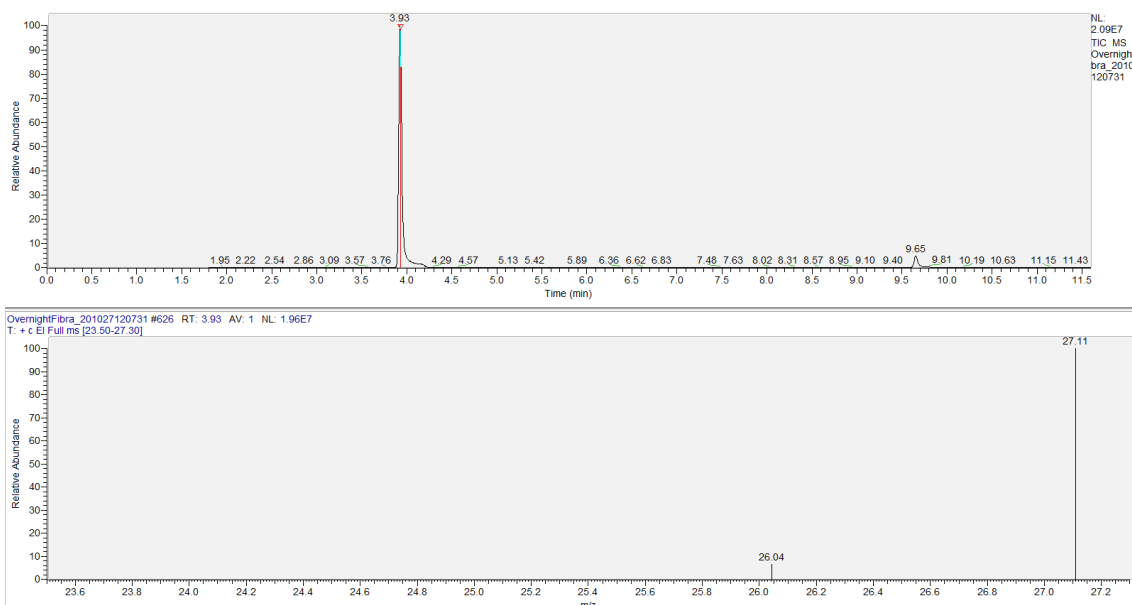


Figura 22 - Cromatograma com pico aos 3,93 min (etileno) e aos 9,65 min (etanol) observado em peras mantidas durante 4 dias no exsicador.

Para comprovar se os picos correspondiam ao etanol e ao etileno injetou-se uma quantidade de cada composto puro no *vial* da amostra. Para o etanol, colocou-se etanol puro (96%) num *vial*, fechou-se o *vial* e aqueceu-se na placa de aquecimento durante uns segundos de modo a evaporar. Com a seringa retirou-se 1 mL do *headspace* e injetou-se na amostra. Fez-se a análise recorrendo ao mesmo método e verificou-se um aumento da intensidade do pico de etanol, passando agora a ser mais intenso do que o suposto do etileno (Figura 23).

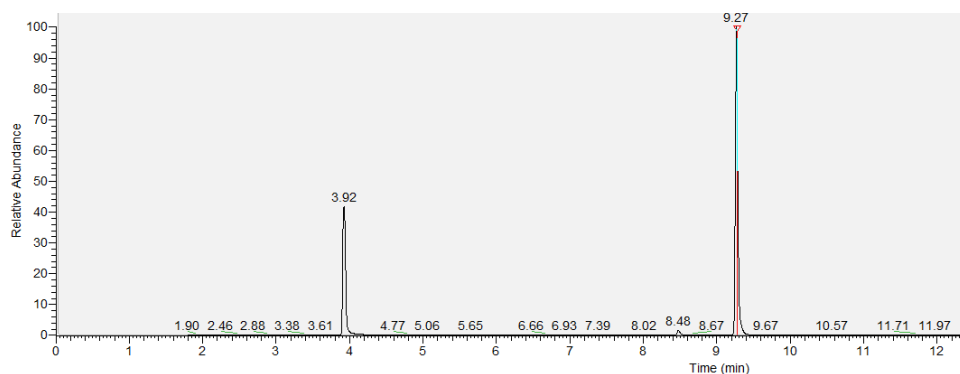


Figura 23 - Cromatograma da amostra com 1 mL do headspace do etanol puro (96%).

De seguida recolheu-se ar da garrafa de etileno (4%) e foram injetados 3 mL na amostra (três injeções com a seringa de 1 mL). Fez-se a análise e o pico do etileno aumentou, passando agora a ser este o mais intenso (Figura 24). No entanto, o espectro de massa correspondente a este pico continuou a apresentar apenas os picos de m/z 26 e 27.

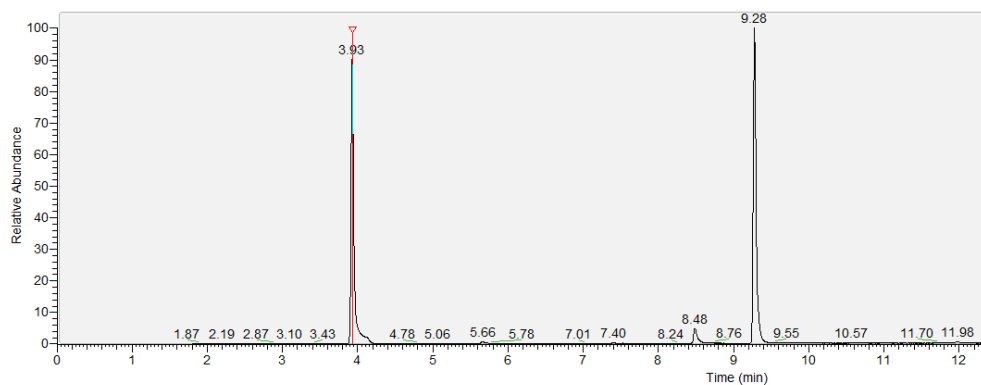


Figura 24 - Cromatograma da amostra com 1 mL do headspace do etanol puro (96%) e 3 mL de etileno (4%).

O aparecimento de nitrogénio neste método SIM não é inesperado, dada a incompleta discriminação de m/z no quadrupolo, especialmente para amostras de *headspace*, que apresentam uma elevada concentração de nitrogénio, levando à sobreposição parcial dos traços de massa (ou seja, baixos níveis de iões de nitrogénio com um valor de massa de 28 Da atingem o detector que monitoriza m/z 26–27).

Este problema é agravado pela injeção de grandes volumes de amostra geralmente necessários para conseguir detetar etileno em amostras de *headspace* pouco concentradas, o que acaba por comprometer também a separação cromatográfica do nitrogénio e do etileno [98]. Ao utilizar o mesmo método mas para uma gama de massas de 1-35 m/z não se conseguiu detetar o etileno.

Pereira *et al.* (2017) verificaram também que uma injeção pulsada em modo *splitless* melhorou significativamente esta situação, resultando num aumento da área do pico de etileno em comparação com as injeções *splitless* normais nas mesmas condições. Este método utiliza um caudal da coluna mais elevado durante a injeção para varrer a amostra rapidamente para fora da entrada da coluna, reduzindo a perda de analito devido a adsorção ou decomposição térmica [105].

Por outro lado, esta técnica de injeção não produziu um aumento no sinal do nitrogénio. O aumento inicial da pressão do topo da coluna que ocorre durante a injeção *splitless* pulsada aparentemente favorece a introdução de etileno na coluna. Esta melhoria na deteção de etileno pode ser resultado da perda de amostra minimizada através da válvula de purga do septo, que é mais proeminente sem injeção pulsada. Contudo, não foi possível aplicar este método uma vez que o *software* não permitia programar um caudal da fase móvel da mesma forma que foi feito neste estudo. Fez-se uma tentativa programando o caudal da única forma possível, definindo um valor de 1,5 mL/min durante 30 segundos seguido de 1 mL/L para o resto da análise. Os resultados permaneceram iguais.

Em relação ao perfil completo de compostos orgânicos voláteis, realizou-se de novo o método da gama de massas de 47-200 m/z que se tinha aplicado para a amostra de peras, na esperança de que esta amostra se encontrasse mais concentrada e fosse possível detetar algum VOC. Alterou-se apenas a T do injetor, a T da interface e a T da fonte de iões para 150, 180 e 180 °C, respetivamente. Não se obtiveram resultados. Concluiu-se que provavelmente o problema não estaria na quantidade de compostos produzida mas sim possivelmente no modo de preparação da amostra, havendo outros factores como a forma de aquecer os adsorventes.

Método de aquecimento das amostras

Assumindo que as amostras não se encontravam ainda concentradas o suficiente para possibilitarem a sua detecção no MS, o problema poderia estar no método de aquecimento dos adsorventes, que poderia não ser suficientemente eficaz para fazer com que estes começassem a libertar os compostos, ou que os libertassem na sua totalidade.

Passou a utilizar-se uma placa de agitação com aquecimento (Fisherbrand). Colocou-se o *vial* com a amostra em cima da placa e ligou-se o aquecimento nos 150 °C no caso do carvão ativado e no caso do zeólito experimentaram-se várias temperaturas diferentes (150-300 °C). Não se notaram diferenças nos resultados.

Recorreu-se, por último, à estufa para aquecer as amostras. Como dentro da estufa a temperatura é uniforme poderia ser mais eficaz, uma vez que o *vial* ficaria todo à mesma temperatura. Definiu-se uma temperatura de 150 °C para o carvão activado e 170 °C para o zeólito. Foi necessário ter em atenção a temperatura máxima a que podia estar submetido o septo da tampa do *vial* (cerca de 200 °C). Também não se notaram diferenças nos resultados. No entanto, continuou a usar-se este último método como forma de aquecer os adsorventes, uma vez que parecia ser o mais adequado.

Peras no exsiccador

Devido à dificuldade em reproduzir os volumes injetados, uma vez que a injeção da amostra no GC-MS é feita com uma seringa de forma manual, de modo a fazer a quantificação dos compostos, utiliza-se o método de calibração do padrão interno que contribui para melhorar a precisão. O padrão interno (PI) é um composto ausente na amostra mas com características químicas semelhantes ao composto (neste caso compostos) que se pretende determinar. Optou-se pela utilização do DL-3-Octanol (Thermo Fisher Scientific).

Assim, foi necessário definir uma quantidade e concentração a utilizar na análise, tendo em conta o valor das concentrações dos compostos que se pretendem identificar. Como o GC-MS constrói os picos do cromatograma com base na abundância relativa, o pico do padrão interno deveria ser sempre um ponto de referência. Já definida a concentração de padrão interno a utilizar, preparou-se a solução e começou a juntar-se às amostras para que quando se obtivessem resultados, estas já contavam com o PI e poderia ser feita a quantificação dos compostos posteriormente.

Continuaram a realizar-se experiências com peras no exsiccador. As peras eram sempre retiradas do frio e deixadas à temperatura ambiente de um dia para o outro. Retiraram-se 30 peras da câmara frigorífica que se encontrava a -1 °C e foram deixadas na bancada do laboratório durante um dia para ficarem à temperatura ambiente. No dia seguinte as peras foram colocadas no exsiccador, com 106,7 µL de uma solução de padrão interno de 1g/L de DL-3-Octanol e uma quantidade de 0,3832 g de zeólito num vidro de relógio.

Desta vez as peras foram deixadas em *shelf life* e só eram colocadas no exsiccador pontualmente, quando se pretendia fazer uma análise. Por exemplo, passados 5 dias de *shelf life*, as peras eram colocadas com o adsorvente (0,5334 g) no exsiccador. Passadas 24 horas abria-se o exsiccador e a amostra era analisada. Para fazer os sete dias (0,3209 g), deixava-se as peras mais dois dias no exsiccador aberto. Ao passar este tempo voltava a proceder-se da mesma forma. Fez-se também para 10 (0,4411 g) e 14 dias (0,3331 g) de *shelf life*.

Com este método de amostragem pretendia-se que as peras conseguissem realizar o seu processo de respiração normalmente, sendo que estando muitos dias fechadas no exsicador sem renovação do ar poderia ter algum efeito nos resultados. No entanto, não se obtiveram novos resultados.

Por fim, já no final desta experiência, para a análise do ar das peras que se encontravam há 14 dias em *shelf life*, alterou-se o parâmetro *Time* do MS, que corresponde ao tempo que passa desde que o GC inicia a análise até ao momento em que o sistema do MS começa a adquirir os dados. Este parâmetro serve nomeadamente para permitir que o solvente passe pela coluna antes do início da aquisição de dados no MS, de modo a não interferir nas análises. Este estava definido para 2 minutos e foi alterado para 4,5. Desta forma finalmente obtiveram-se resultados.

Ao alterar o parâmetro *Time (min)* foi possível eliminar o pico de grande intensidade que surgia sempre aos 3,93 min, que correspondia aos gases componentes da atmosfera e a todos os compostos mais voláteis de baixo peso molecular que à temperatura ambiente se encontram no estado gasoso. Este pico poderia estar a causar uma grande interferência e um grande ruído de fundo no espectro de massa. De facto, com o método alterado, obteve-se um cromatograma com bastantes picos e bem definidos. O problema encontrava-se assim no método de análise, sendo possível então que se pudessem ter obtido resultados com todas as condições experimentadas anteriormente como por exemplo todos os adsorventes, os métodos de aquecimento, os métodos de recolha ou a quantidade de peras colocadas no exsicador.

3.4.4 DETEÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS

Definiu-se como método para a deteção do etileno (Tabela 5), o método desenvolvido no capítulo 3.4.1.

Tabela 5 – Parâmetros do método instrumental otimizado para a deteção de etileno.

GC		MS	
T injector (°C)	150	T interface (°C)	180
Modo	<i>Split</i>	T fonte iões (°C)	180
Razão <i>split</i>	33.3	<i>Time (min)</i>	1.8
Caudal (mL/min)	1	m/z (amu)	23.5 – 27.3
Programa de T	30 °C por 4,5min → 20 °C/min até 100 °C por 1min → 2 °C/min até 150 °C por 10 min		

Alterou-se apenas o programa de temperatura, comparando com o método presente na tabela 4, de modo a que fosse possível detar também o padrão interno.

A amostra das peras que permaneceram 14 dias em *shelf life* foi analisada no GC-MS, com recurso às condições da tabela 6. Os compostos (Figura 25) foram identificados por comparação dos espectros de massa obtidos com os que se encontravam na base de dados das bibliotecas espectrais.

Tabela 6 - Condições dos parâmetros para definir o método instrumental do GC-MS para a detecção de VOCs.

GC		MS	
T injector (°C)	150	T interface (°C)	180
Modo	<i>Split</i>	T fonte iões (°C)	180
Razão <i>split</i>	33.3	<i>Time</i> (min)	4.5
Caudal (mL/min)	1	m/z (amu)	33 - 150
Programa de T	30 °C por 4,5min → 20 °C/min até 100 °C por 1min → 2 °C/min até 150 °C por 10 min		

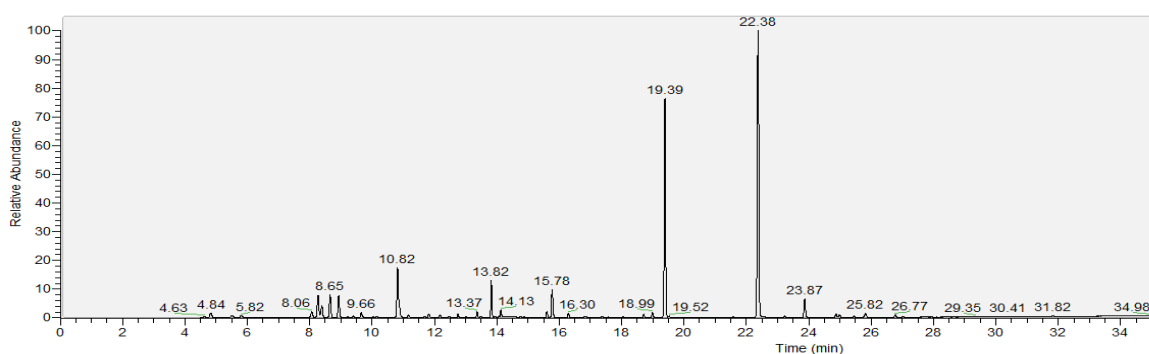


Figura 25 - Cromatograma *full scan* da amostra de peras após 14 dias em *shelf life*.

Uma vez que o equipamento estava funcional e que o método já se encontrava otimizado, procedeu-se à análise do ar das câmaras de conservação. Colocou-se uma quantidade de 0,2658 g de zeólito num vidro de relógio na câmara 7, 0,2975 g na câmara 8, 0,2695 g na câmara 9 e 0,2176 g na 10. Utilizou-se zeólito para realizar estas últimas experiências pois foi o adsorvente que se utilizou na análise em que finalmente se obtiveram resultados, e como já não existia muita quantidade de carvão activado no laboratório, seria mais correto comparar resultados de experiências feitas nas mesmas condições.

Os vidros de relógio com zeólito foram retirados das câmaras no dia seguinte. Os *pellets* foram colocados em *vials*, e posteriormente aquecidos na estufa a 170 °C durante 5 minutos. O ar foi retirado com uma seringa de 1 mL através do septo do *vial* e injetado no GC-MS, programado com o método instrumental descrito na tabela 5.

De seguida, realizou-se uma última experiência que consistiu em colocar peras no exsiccador com uma quantidade de zeólito mais abundante de modo a ser possível retirar duas amostras. As peras ficaram fechadas no exsiccador, que era aberto apenas para retirar zeólito. Estas amostras foram retiradas ao longo do tempo, sendo que a primeira foi retirada após um dia e a segunda após cinco dias. Procedeu-se da forma descrita anteriormente para extrair o ar da amostra, mas utilizou-se uma seringa de 500 µL. Foi aplicado o mesmo método instrumental (Tabela 6).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FRUTOS PÓS-COLHEITA

Realizou-se a avaliação dos parâmetros de qualidade das peras Rocha provenientes da colheita em três pomares distintos de modo a caracterizar o estado de maturação em que estas se encontravam. Os três pomares, apesar de estarem todos localizados na zona Oeste estiveram sobre diferentes condições de produção, nomeadamente temperaturas, rega e adubação. Assim, a análise dos resultados considerará os pomares individualmente, estabelecendo-se alguma comparação pontualmente. Deste modo, também é possível obter uma ideia da variabilidade que existe entre pomares.

A cor, o peso fresco, o calibre e a dureza podem ser consideradas as características físicas mais importantes e de maior interesse e por esta razão foram medidas logo à colheita dos frutos (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores médios de calibre, peso e dureza, à colheita, de peras provenientes de três pomares distintos.

Amostra	Calibre (mm)	Peso (g)	Dureza (kg/0,5 cm ²)
Pomar 1	67,7 ± 4,8	189,2 ± 39,6	5,08 ± 0,34
Pomar 2	60,5 ± 2,0	140,3 ± 8,5	4,87 ± 0,62
Pomar 3	67,2 ± 2,8	175,3 ± 18,0	5,01 ± 0,48

Em relação ao peso fresco, tendo em consideração que o calibre dos frutos era em média superior a 60 mm, naturalmente, o peso também iria ser elevado estando estas características correlacionadas pois ambas aumentam com o avançar da maturação fisiológica como comprovado num estudo feito a fisálias [106], a peras Shinsseiki [107] e a peras Rocha colhidas em várias datas ao longo do processo de maturação [108]. Do ponto de vista fisiológico, no momento da colheita, os frutos já se encontram no seu máximo desenvolvimento e com a fase de crescimento já concluída. Sendo que se verificou que o pomar 1 foi o que registou um calibre médio maior (Figura 26), de 67,7 mm correspondendo ao maior peso médio, de 189,2 g (Tabela 7). Os pomares 1 e 3 apresentaram valores de calibre e peso acima do mais comum para pera Rocha (60/65 mm e 123/153 g) [2].

Os desvios padrão foram pequenos, o que pode ser explicado pelo facto de se ter como objectivo, na recolha da amostra, que os frutos fossem semelhantes e de calibres superiores a 60 mm, tendo sido escolhidos apenas os frutos mais representativos da média de cada pomar. O calibre, tal como outras características, tem uma relação com o escaldão superficial e com os acastanhamentos internos, pois frutos de tamanho grande têm mais tendência a desenvolver mais escaldão do que os mais pequenos [109] e o mesmo acontece no caso dos acastanhamentos internos [42]. Assim, era de interesse ter amostras de frutos com calibres maiores uma vez que, com os frutos armazenados, se pretende estudar os acidentes fisiológicos ao longo do período de conservação.

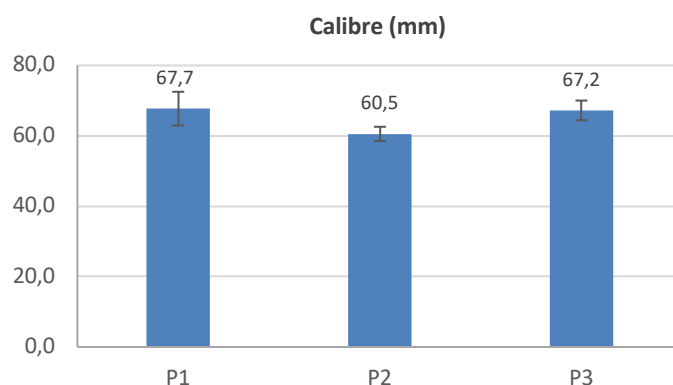


Figura 26 - Calibre (mm) médio, à colheita, dos frutos de cada pomar e correspondente desvio padrão.

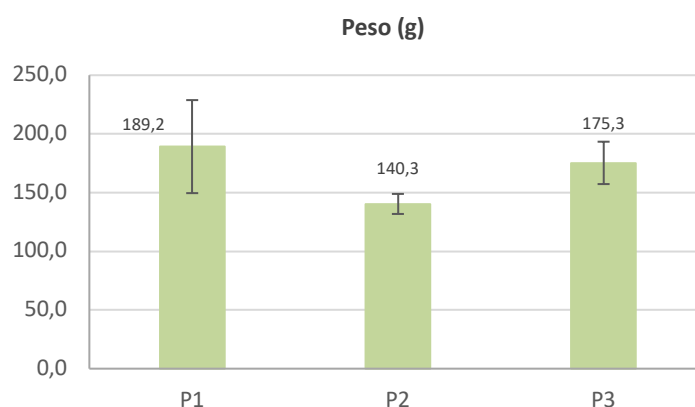


Figura 27 - Peso (g) médio, à colheita, dos frutos de cada pomar e correspondente desvio padrão.

As diferenças de crescimento podem ser explicadas pelos factores de pré-colheita, como o solo, regas e condições climáticas durante o crescimento, pois o calibre e o peso são referenciados como parâmetros muito sensíveis a estes, e por isso não podem ser usados como índices de maturação isoladamente [110].

Relativamente à firmeza média da polpa, como se pode verificar pela tabela 7 e figura 28, não existiram diferenças significativas entre as amostras.

A determinação da firmeza da polpa é um teste muito utilizado para uma avaliação rápida do estado de maturação de um fruto, sobretudo em peras, tendo já um carácter mais técnico. A dureza é um parâmetro com uma evolução decrescente ao longo do tempo, uma vez que esta vai diminuindo à medida que os frutos amadurecem, o que faz com que vão ficando moles e vão perdendo a sua resistência aos danos mecânicos provocados pelo seu manuseamento.

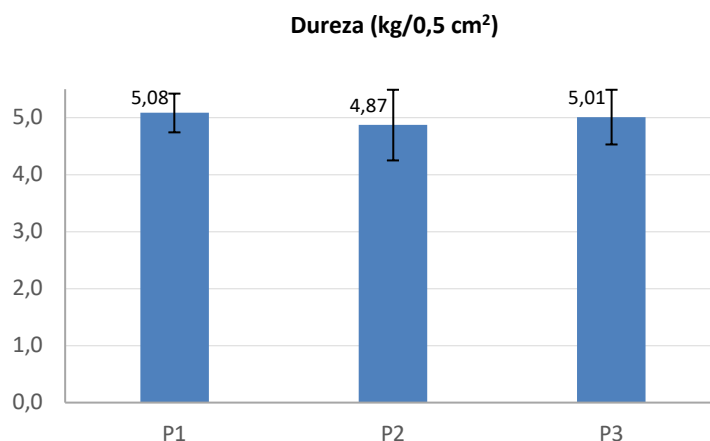


Figura 28 – Dureza média (kg/0,5 cm²) dos frutos de cada pomar.

No caso da pera Rocha, o valor de referência da dureza da polpa para a altura óptima de colheita situa-se entre os 5,1 e os 6,4 kg/0,5 cm²[1][5]. Todos os pomares em análise apresentam uma firmeza média inferior ao valor mínimo do intervalo apresentado, sendo este valor de 5,08 ± kg/0,5 cm² para o pomar 1, de 4,87 kg/0,5 cm² para o pomar 2 e de 5,01 kg/0,5 cm² para o pomar 3, o que significa que já se encontravam num nível de maturação mais avançado do que o nível óptimo para a colheita. Neste ano, em particular devido à existência de diferentes épocas de floração, os pomares apresentam frutos de diferentes florações e com calibres muito diferentes tendo sido opção da maioria dos fruticultores atrasar a colheita potenciando assim o aumento de calibre em detrimento da firmeza da polpa.

A cor de fundo da pera Rocha vai evoluindo desde o verde até ao amarelo, devido à clorofila, e esta ajuda a prever o início da colheita que ocorre quando predomina uma tonalidade de um verde claro. A variação da cor depende essencialmente das diferenças de temperatura diurnas e nocturnas durante o período de desenvolvimento do fruto. A tonalidade (hue^o), como referido anteriormente, quando se encontra entre os 90 e os 180^o representa as cores de amarelos a verdes. Assim, à medida que este valor vai diminuindo reflete a passagem de verde para amarelo. Os valores médios para os diferentes pomares são todos bastante semelhantes e sendo que o mais elevado correspondeu a 107,54 ° ± 1,89 (Tabela 8) podendo concluir-se que as peras tinham um tom verde claro, como se pode verificar pelos valores apresentados para o hue^o na figura 29.

Tabela 8 – Valores médios dos dados da cor da epiderme das peras de cada pomar à colheita.

Amostra	L *	C *	hue ^o
Pomar 1	66,24 ± 2,81	47,95 ± 1,47	106,44 ± 2,04
Pomar 2	67,46 ± 2,94	44,63 ± 2,76	105,21 ± 3,15
Pomar 3	65,88 ± 3,22	47,55 ± 1,72	107,54 ± 1,89

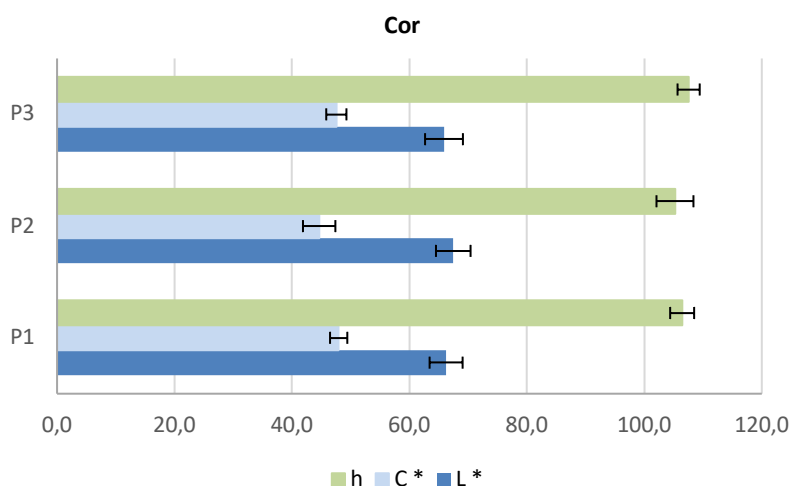


Figura 29 – Valores médios da luminosidade(L*), cromagem (C*) e tonalidade (h°) de cada pomar com os respectivos desvios padrão.

O índice refractométrico evidencia o teor em matérias solúveis existentes nos frutos, das quais fazem parte os açúcares. Este índice encontra-se muito ligado ao estado de maturação do fruto e em especial à sua qualidade organoléptica. Permite apreciar a quantidade de açúcar presente no fruto uma vez que 80% da matéria seca de um fruto são açúcares. De uma forma geral, as peras atingem melhor qualidade nos anos em que as temperaturas de verão são mais elevadas e não se verificam excessos de água devido a chuva ou rega. Para que o fruto seja considerado de qualidade superior, existem resíduos mínimos e resíduos ótimos que devem estar presentes no momento da colheita, sendo estes valores de 12 e 14%, respectivamente [5]. Geralmente, o fruto da parte interna de uma árvore em formação não alcança o nível mínimo de açúcares preconizados [1]. Como se pode verificar pelos dados da tabela 9, os TSS de dois pomares encontram-se abaixo do intervalo referido e não existem diferenças significativas entre pomares, sendo que é ao pomar 2 que corresponde o valor mais elevado, de $12,64 \pm 0,77$ °Brix e único dentro do intervalo.

Tabela 9 - Teor de sólidos solúveis e taxa de regressão de amido médios dos frutos de cada pomar, à colheita.

Amostra	°Brix	Taxa Regressão do Amido
Pomar 1	$11,91 \pm 0,74$	$8,6 \pm 1,0$
Pomar 2	$12,64 \pm 0,77$	$7,7 \pm 1,3$
Pomar 3	$10,48 \pm 0,81$	$7,0 \pm 0,8$

Durante a maturação da pera Rocha o amido transforma-se em açúcares solúveis por hidrólise, podendo ser um bom indicador quer do seu estado de maturação quer do seu potencial organoléptico. O teste da taxa de regressão do amido possibilita a apreciação do conteúdo em amido na polpa dos frutos e a extrapolação do seu grau de maturação. A uma menor quantidade de amido e a uma maior quantidade de sólidos solúveis, corresponde um fruto mais maduro e uma cor mais clara quando a polpa do fruto é exposta a uma solução de iodo. Tendo em vista o sucesso da conservação frigorífica, à colheita, a maior parte dos frutos deverá ter valores da taxa de regressão do amido entre 5 e 7. Frutos com taxa de regressão do amido de valores inferiores a 4 dificilmente amadurecerão. Por outro lado, os frutos com valores iguais ou superiores a 8 terão de entrar

no circuito comercial o mais rapidamente possível [1]. Pelos resultados obtidos (Tabela 9) concluiu-se que os frutos dos três pomares já se encontravam num estado de maturação mais avançado do que deveriam estar para o momento óptimo de colheita. Estes resultados estão de acordo com os previamente obtidos para a firmeza da polpa.

Assim, tanto o °Brix como a taxa de regressão do amido são índices de maturação relacionados com a quantidade de açúcares no fruto. No entanto, como se pode ver pelas figuras 30a e 30b o TSS e a taxa de regressão do amido não são proporcionais. Ao contrário do esperado, o pomar com o valor mais elevado de °Brix não corresponde ao pomar com a maior taxa de regressão do amido. Como referido anteriormente, o teor em sólidos solúveis não quantifica directamente os açúcares do fruto, uma vez que o seu valor não representa apenas a quantidade de açúcares, mas sim de todos os sólidos solúveis que existem no fruto e o grau do amido é um índice de maturação subjectivo, pois é alguém que atribui o valor que julga ser o mais adequado em comparação com a tabela existente.

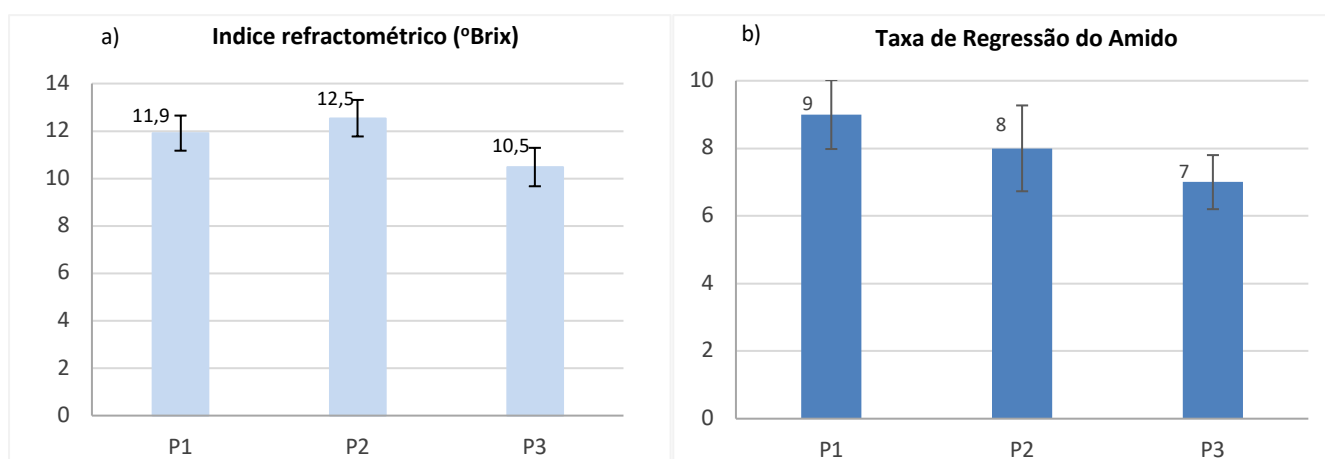


Figura 30 - Teor de sólidos solúveis (a) e taxa de regressão do amido (b) médios para os frutos de cada pomar, à colheita .

Para a caracterização química dos frutos, para além de analisar a quantidade de açúcares dos frutos, determinou-se a acidez total titulável (expressa em g ácido málico/L), a quantidade de compostos fenólicos (expressos em mg ácido gálico/g fruto), a capacidade antioxidante (expressa em mg ácido ascórbico/g fruto) e a quantidade de trienos conjugados e α -farneseno ($\mu\text{g/g}$ fruto) (Tabela 10).

Tabela 10 - Valores médios de acidez titulável, quantificação de compostos fenólicos, capacidade antioxidante e de α -farneseno e trienos conjugados relativos aos frutos de cada pomar, à colheita, com os respetivos desvios padrão.

Amostra	pH	Acidez (g/L ác. málico)	Compostos Fenólicos (mg/g ác.gálico)	Capacidade antioxidante (mg/g ác. Ascórbico)	α -Farneseno ($\mu\text{g/g}$)	Trienos conjugados ($\mu\text{g/g}$)
Pomar 1	4,72 \pm 0,24	1,29 \pm 0,29	0,146 \pm 0,006	0,103 \pm 0,002	33,4 \pm 13,9	18,3 \pm 5,9
Pomar 2	4,43 \pm 0,08	1,63 \pm 0,37	0,148 \pm 0,016	0,102 \pm 0,010	28,6 \pm 3,6	12,6 \pm 3,1
Pomar 3	4,42 \pm 0,11	1,64 \pm 0,24	0,154 \pm 0,002	0,098 \pm 0,005	26,1 \pm 20,4	14,4 \pm 12,7

A acidez total titulável é também um índice de maturação que apesar de só poder ser analisado em laboratório, é um dos parâmetros mais utilizados na caracterização química dos frutos e como parâmetro de qualidade.

Para a obtenção de uma pera Rocha característica e de boa qualidade, a acidez deverá apresentar valores entre os 2 e os 3 g/L de ácido málico [2]. A qualidade da pera é tanto maior quanto maior a quantidade de açúcares e de ácidos e o respectivo coeficiente. A quantidade de ácidos e de açúcares e em especial o balanço destes dois constituintes são responsáveis pela percepção organoléptica dos frutos pelo consumidor. Contudo, os valores de acidez geralmente vão diminuindo ao longo do processo de maturação, no qual os ácidos são consumidos durante o processo respiratório dos frutos. Apesar de terem taxas metabólicas muito baixas, o teor de ácidos nos frutos vai também diminuindo ao longo do período de conservação no frio. Este comportamento decrescente verificou-se em estudos com pêra Rocha feitos por Saquet *et al.* (2017) após de 257 dias de conservação e um tempo de prateleira de 7 dias [93].

Os resultados obtidos, para a acidez titulável à colheita, foram bastante semelhantes para os três pomares sendo que todos eles se encontram abaixo do valor mínimo indicado para o fruto no momento da colheita. O valor mais elevado dos três pomares foi de $1,64 \pm 0,24$ g ácido málico/L para o pomar 3 (Figura 31). Como os valores estão abaixo dos valores mínimos indicados para os frutos à colheita, talvez estes resultados sejam reflexo de um estado de maturação mais avançado dos frutos, o que consubstancia os resultados obtidos para a cor e para a dureza.

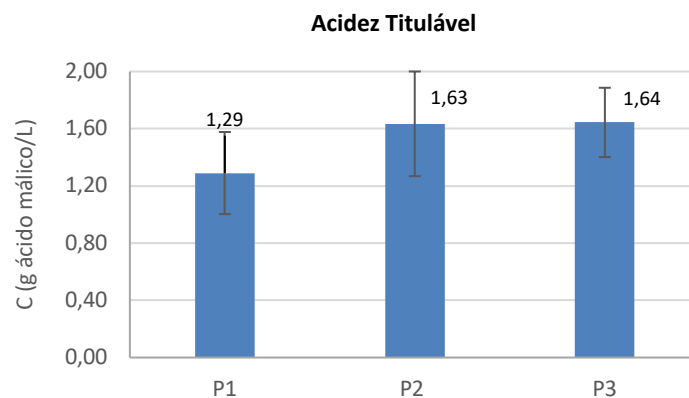


Figura 31 - Acidez total titulável (g ácido málico/L) média, à colheita, dos frutos de cada pomar e respetivos desvios padrão.

No que concerne a capacidade antioxidante, foi avaliada a capacidade antioxidante total dos frutos e a quantidade de compostos fenólicos presentes, pois estes são responsáveis pela capacidade antioxidante dos frutos. Os compostos fenólicos são geralmente determinados na caracterização de diferentes frutos [62][94][111].

Os compostos fenólicos caracterizam-se por possuírem pelo menos um anel aromático ao qual se encontra ligado um ou mais grupos hidroxilo. Estes são produzidos pela maioria das plantas e desempenham diversas funções como a defesa de agentes patogénicos, proteção contra condições climáticas desfavoráveis como a temperatura extrema, o stresse nutricional e hídrico, a radiação ultravioleta e a oxidação das

biomoléculas [112]. Estas funções devem-se à sua capacidade antioxidante, isto é, a sua capacidade de agir como agentes redutores, dadores de prótons e neutralizadores de radicais livres, proporcionando uma estabilidade oxidativa [112]. A inibição da formação de espécies reativas durante o curso normal do metabolismo permite prevenir a ocorrência de danos nos lípidos, proteínas e ácidos nucleicos e consequentes lesões e morte celular. Para além destas funções, os compostos fenólicos contribuem para a reprodução e crescimento das plantas, e para o desenvolvimento de pigmentos e compostos voláteis que estão relacionados com as suas características organolépticas [112].

A quantidade de compostos fenólicos depende de diversos fatores como são a espécie do fruto, as condições de crescimento e o grau de maturação no momento da colheita [112].

Os três pomares apresentaram valores bastante próximos, de $0,146 \pm 0,006$ mg ácido gálico/g de fruto para o pomar 1, $0,148 \pm 0,016$ mg de ácido gálico/g de fruto para o pomar 2 e de $0,154 \pm 0,002$ mg ácido gálico/g de fruto para o pomar 3 (Figura 32), sendo este último o que apresenta um teor de fenóis mais elevado.

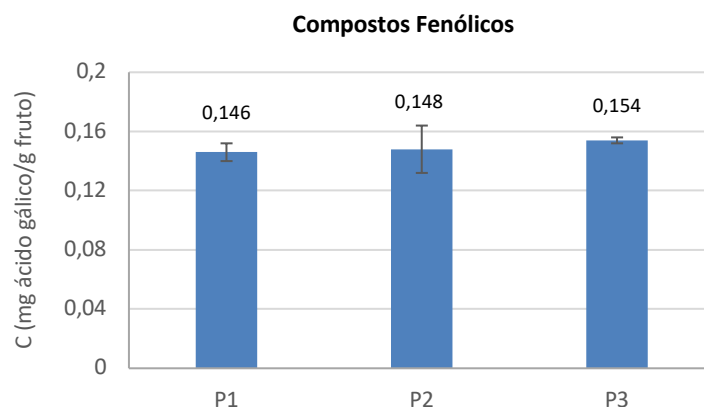


Figura 32 - Quantidade média de compostos fenólicos (mg/g) dos frutos de cada pomar e repetivos desvios padrão.

A quantidade de compostos fenólicos nos frutos tem tendência a diminuir com o tempo, tanto logo após a colheita como ao longo de todo o período de maturação, assim como durante o armazenamento. Este decréscimo é normalmente provocado pela oxidação dos fenóis provocada pela PPO à medida que o fruto vai amadurecendo, reduzindo a sua capacidade antioxidante [113].

Para além da quantidade de compostos fenólicos, também a capacidade antioxidante dos frutos diminui ao longo do tempo de conservação como comprovado por Silva *et al.* (2001) num estudo efetuado em pera Rocha [114].

A capacidade antioxidante total média dos frutos dos pomares foi de $0,103 \pm 0,002$ mg de ácido ascórbico/g de fruto para o pomar 1, $0,102 \pm 0,010$ para o pomar 2 e $0,098 \pm 0,005$ para o pomar 3 (Figura 33), o que configura resultados bastante semelhantes entre pomares. Seria de esperar que o pomar com maior teor de compostos fenólicos correspondesse ao pomar com maior capacidade antioxidante, no entanto, tal não se verifica. Isto pode ser explicado pelo facto de os compostos fenólicos não terem todos a mesma capacidade antioxidante, sendo que esta depende da estrutura dos compostos (número e posição dos grupos hidroxilo e

natureza das substituições nos anéis aromáticos) e do seu poder redutor. Deve-se também ao facto de possivelmente existirem outros compostos antioxidantes produzidos pela pera para além dos compostos fenólicos, como a vitamina C [52][115].

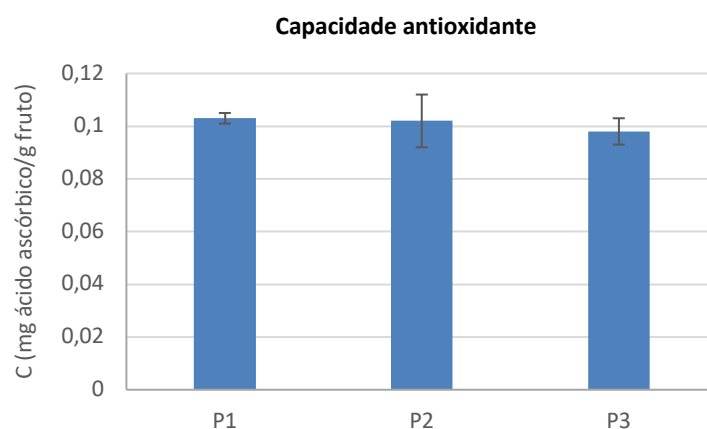


Figura 33 - Capacidade antioxidante média expressa em mg de ácido ascórbico/g de fruto.

Assim, apesar de ter sido o pomar 3 a apresentar um teor de compostos fenólicos mais elevado, espera-se que, no caso de haver problemas fisiológicos, os frutos do pomar 1 apresentem menor tendência para desenvolver escaldão superficial e acastanhamentos internos, uma vez que uma maior capacidade antioxidante protegeria melhor os frutos dos danos oxidativos. Esta relação foi comprovada por Pintó (2001) cujo estudo concluiu que os frutos que tinham acastanhamentos internos tinham um nível mais baixo de ácido ascórbico [116], e por Saba *et al.* (2016) que concluiu que a uma menor incidência acastanhamentos internos correspondia uma maior capacidade antioxidante, para pera Bakhi [117].

Os factores pós-colheita que mais influenciam o aparecimento de escaldão superficial durante a sua conservação são o estado de maturação dos frutos à colheita, as condições de armazenamento e a aplicação de tratamentos para o controlo deste acidente fisiológico. Atendendo ao estado de maturação dos frutos à colheita, podemos pensar que, este ano, a probabilidade de ocorrência de acidentes fisiológicos é mais elevada.

A quantidade de α -farneseno tem também uma relação com os acidentes fisiológicos, em particular com o escaldão superficial. A sua oxidação resulta na produção dos trienos conjugados. Quanto maior for a concentração de α -farneseno, mais α -farneseno existe para oxidar, logo maior é a produção de trienos conjugados. Quanto maior for a concentração de trienos conjugados, maior a possibilidade de incidência de escaldão superficial, pois estes são altamente reactivos e podem provocar a disrupção das membranas celulares e posterior acastanhamento enzimático, como explicado anteriormente. A quantidade de trienos conjugados depende então também dos antioxidantes que existem na epiderme dos frutos.

O pomar 1 foi o que apresentou uma concentração média mais elevada tanto de α -farneseno ($33,4 \pm 13,9 \mu\text{g/g}$ fruto) como de trienos conjugados ($18,3 \pm 5,9 \mu\text{g/g}$ fruto). O pomar 3 apresentou a menor concentração de α -farneseno ($26,1 \pm 20,4 \mu\text{g/g}$ fruto) e o pomar 2 a menor concentração de trienos conjugados ($12,6 \pm 3,1 \mu\text{g/g}$ fruto) (Figura 34). Poderia dizer-se então que o mais provável de desenvolver e ter

incidências de escaldão superficial seria o pomar 1 que no entanto é o pomar cujos frutos apresentam maior capacidade antioxidante.

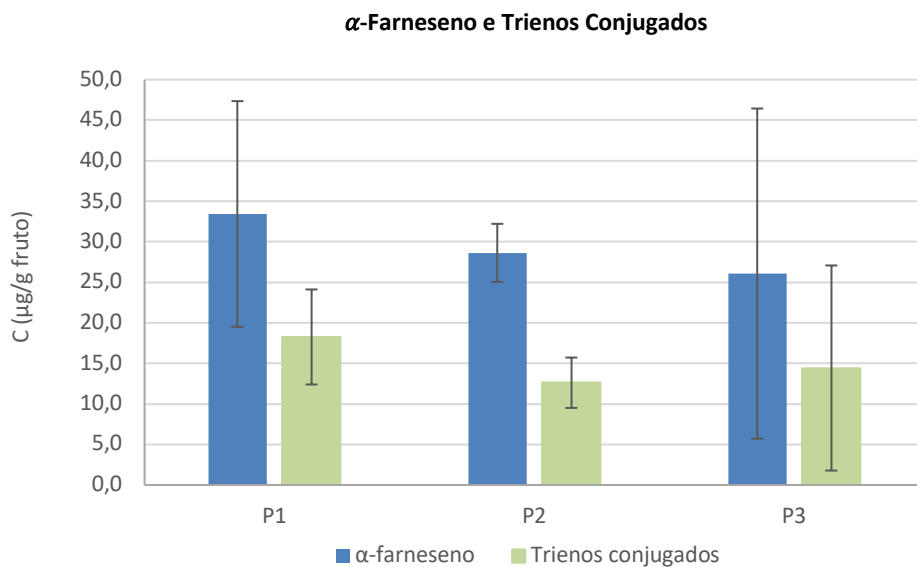


Figura 34 - Concentração média de α -farneseno e de trienos conjugados e respetivo desvio padrão de cada pomar pós colheita.

Um estudo feito a pera Rocha mostrou que as peras de colheita precoce apresentaram, em média, um valor mais elevado de concentração de α -farneseno ($60,3 \pm 5,0 \mu\text{g/g}$) do que as peras de colheita tardia ($28,6 \pm 4,5 \mu\text{g/g}$). Durante o armazenamento os valores foram-se alterando e a concentração de α -farneseno das peras de colheita tardia chegou a ser superior à dos frutos de colheita precoce. Contudo, o valor máximo atingido foi mais elevado para as peras de colheita precoce. As peras colhidas na altura óptima de colheita foram as que apresentaram valores mais baixos ($15,0 \pm 2,4 \mu\text{g/g}$). A mesma relação se verificou para os níveis de trienos conjugados [37].

Assim, comparando estes valores com os resultados obtidos poderia dizer-se que estas peras tinham sido colhidas depois da altura óptima de colheita, altura em que já estariam num estado de maturação mais elevado. Apesar das peras neste estado serem menos susceptíveis ao desenvolvimento do escaldão superficial do que as peras de colheita precoce, são mais susceptíveis em comparação com as peras de colheita óptima [37].

Após análise dos índices de maturação (Tabela 11) é possível concluir que os frutos dos três pomares já se encontravam num estado de maturação superior ao estado de maturação óptimo para a colheita visto apresentarem uma firmeza da polpa e uma acidez total titulável inferiores às recomendadas e um índice de regressão do amido mais elevado. Pelos resultados obtidos pode afirmar-se que o pomar 2 era aquele que se encontrava num estado de maturação mais avançado. De facto, este ano a colheita foi realizada um pouco mais tarde pois houve várias florações e foi necessário esperar que uma maioria dos frutos atingisse o calibre óptimo e mais valorizado comercialmente ($> 60 \text{ mm}$).

O momento óptimo para a colheita dos frutos é definido no sentido de proporcionar uma conservação adequada e o mais prolongada possível, assegurando que os frutos atinjam e mantenham a sua qualidade

fisiológica e organoléptica. Para tal, o estado de desenvolvimento fisiológico e de maturação dos frutos é um factor determinante. Neste caso, os frutos dos três pomares foram colhidos tardiamente fazendo com que, apesar de serem frutos maiores e de apresentarem epiderme com uma cor mais apelativa e um sabor melhor, possam contar com um tempo de armazenamento menor, um amolecimento acentuado e uma maior susceptibilidade a acidentes fisiológicos nomeadamente acastanhamentos internos, o que conduzirá a uma provável perda da sua qualidade e valorização comercial. Um estudo realizado por Zerbini *et al.* (2002) em peras Conference comprova que frutos colhidos num estado de maturação mais elevado têm mais tendência a apresentar acastanhamentos internos.

Por outro lado, estudos realizados a peras Suli, demonstraram que frutos provenientes de uma colheita precoce, após armazenamento a baixas temperaturas, tiveram mais susceptibilidade a ficar danificados por escaldão superficial [118]. Num estudo realizado a pera Rocha concluiu-se que tal como para as peras Suli, os níveis de α -farneseno dos frutos de colheita precoce foram sempre superiores quando comparados com os provenientes de frutos de outras épocas de colheita, mas que os níveis dos frutos da colheita tardia apresentaram-se sempre superiores aos dos frutos da colheita óptima. Para os trienos conjugados verificou-se que a sua evolução foi muito similar para todos os frutos [96].

Tabela 11 - Tabela resumo com a caracterização físico-química à colheita das peras de cada um dos pomares.

Parâmetro analisado	Pomar 1	Pomar 2	Pomar 3
Calibre (mm)	67,7 ± 4,8	60,5 ± 2,0	67,2 ± 2,8
Peso (g)	189,2 ± 39,6	140,3 ± 8,5	175,3 ± 18,0
Dureza (kg/0,5 cm ²)	5,08 ± 0,34	4,87 ± 0,62	5,01 ± 0,48
Cor (hue°)	106,44 ± 2,04	105,21 ± 3,15	107,54 ± 1,89
Taxa Regressão do Amido	8,6 ± 1,0	7,7 ± 1,3	7,0 ± 0,8
TSS (°Brix)	11,91 ± 0,74	12,64 ± 0,77	10,48 ± 0,81
pH	4,72 ± 0,24	4,43 ± 0,08	4,42 ± 0,11
Acidez (g/L ác. málico)	1,29 ± 0,29	1,63 ± 0,37	1,64 ± 0,24
Compostos Fenólicos (mg/g ác.gálico)	0,146 ± 0,006	0,148 ± 0,016	0,154 ± 0,002
Cap. antioxidante (mg/g ác. ascórbico)	0,103 ± 0,002	0,102 ± 0,010	0,098 ± 0,005
α -Farneseno (µg/g)	33,4 ± 13,9	28,6 ± 3,6	26,1 ± 20,4
Trienos conjugados (µg/g)	18,3 ± 5,9	12,6 ± 3,1	14,4 ± 12,7

4.2 ANÁLISE DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS

Pretendia-se identificar todos os VOCs produzidos pela pera, tanto o etileno que é um composto que se conhece e se sabe que é produzido pela pera, como todos os outros que não se conhecem. Existem bastantes estudos feitos para outros frutos e outras variedades de peras, mas para a pera Rocha especificamente não existem muitos dados relativamente a este tema. Enquanto para detectar o etileno sabe-se qual é o composto que se procura (sendo possível definir certos parâmetros para ir ao seu encontro), para fazer o perfil de todos

os compostos produzidos pela pera não se sabe ao certo o que procurar nem o que se vai encontrar, apesar de haver uma série de compostos que seria de esperar que estivessem presentes.

Assim, quando se pretende identificar os diferentes componentes da amostra (desconhecidos), neste caso os VOCs com um espectro de massa, utilizar o modo *full scan* é indispensável. Por outro lado, o modo SIM é adequado para fazer uma análise quantitativa dos componentes que se sabe que estão presentes na amostra, quando se conhece o espectro de massa dos componentes que se pretendem analisar, como é o caso do etileno. Concluiu-se então que seria necessário desenvolver dois métodos diferentes. Um para a detecção do etileno, e outro para todos os outros VOCs.

4.2.1 DETECÇÃO DO ETILENO

Detectou-se apenas para a câmara 9 (AN) um pico cujo espectro de massa apresentava os iões de m/z 24, 25, 26 e 27 (Figura 35), representativos do espectro de massa do etileno. No entanto, o pico no cromatograma não saiu tão definido como se esperava. As outras câmaras apresentaram um pico no cromatograma similar mas o respectivo espectro de massa apresentou apenas os iões de m/z 26 e 27. O mesmo se verificou para as amostras das peras no excicador. Contudo, como estas amostras tiveram de ser injectadas no GC-MS com uma seringa *gas tight* de 500 μL , a quantidade de amostra pode não ter sido suficiente para que o analito fosse detectado.

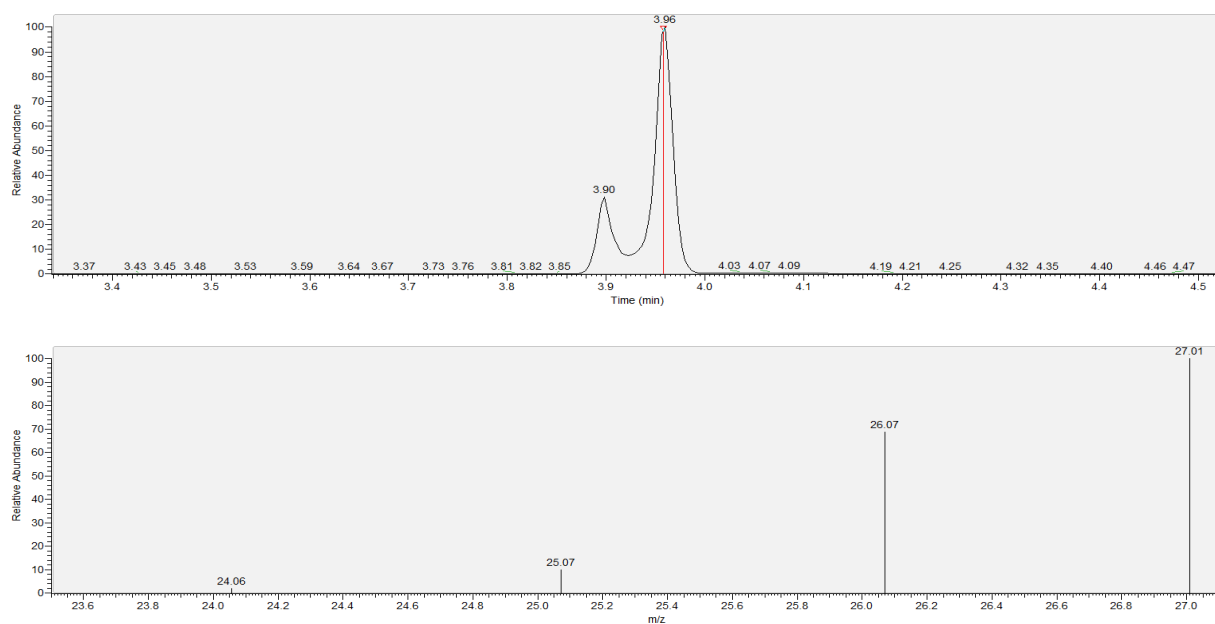


Figura 35 – Cromatograma da amostra da câmara 9 obtido para o método de detecção do etileno (pico aos 3,96 min) e respetivo espectro de massa.

Ao utilizar o modo SIM para detectar um composto específico, e posteriormente quantificá-lo devem-se considerar iões que são abundantes, pois estes são facilmente detetáveis mesmo a baixas concentrações. No caso de se escolher um ião com uma abundância muito baixa, apesar de ser um ião único do composto, este composto pode não ser detetado se estiver a baixas concentrações [119]. Este poderá ser o caso dos iões m/z 24 e 25 do etileno, que contam com uma abundância relativa muito inferior em comparação com os iões m/z

26 e 27 (Figura 15). O facto dos iões não aparecerem em todas as amostras das câmaras de conservação, poderá ser explicado pelas reduzidas concentrações de etileno. Naturalmente, a câmara 9, é a que apresenta uma maior quantidade de etileno, pois encontra-se em condições de atmosfera normal e é por isso a que menos atrasa a maturação dos frutos.

Realizou-se no Instituto Superior Técnico a análise de três amostras no GC-FID, uma de zeólito saturado com etileno a 4%, uma de zeólito colocado na câmara 9 (condições de AN) e uma de zeólito colocado no exsicador com peras que se encontravam há 7 dias em condições de atmosfera normal à temperatura ambiente (*shelf life*). Utilizou-se uma coluna CP SIL 5 CB (Agilent), de fase estacionária apolar (ao contrário da utilizada no GC-MS). Em primeiro lugar injectou-se 1 mL de etileno puro (100%) de modo a saber o tempo de retenção (1,42 min). Sabendo que o pico do etileno deveria aparecer no cromatograma aos 1,42 minutos, injectaram-se as amostras (1 mL). Verificou-se que as três amostras apresentavam um pico no TR referido confirmando assim a presença de etileno.

4.2.2 PERFIL DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (FULL-SCAN)

O etileno é um composto orgânico endógeno e volátil bastante importante para as peras, estando relacionado com a sua maturação. Para além do etileno, as peras produzem outros VOCs. Era então também objetivo deste trabalho identificar quais são estes compostos. Não existem muitos estudos feitos em pera Rocha neste sentido, no entanto é de grande interesse, uma vez que estes compostos podem ser importantes para perceber melhor o processo de maturação dos frutos e o desenvolvimento de certos problemas como são os acidentes fisiológicos, existindo possivelmente uma relação entre estes e os VOCs presentes.

Ao analisar a amostra das peras colocadas no exsicador após 14 dias de *shelf life* com o método otimizado (Figura 27) foi possível identificar 40 compostos orgânicos voláteis que se apresentam de seguida na tabela 12, com o respectivo tempo de retenção, área do pico do cromatograma, percentagem de área e percentagem de altura, de modo a perceber a abundância relativa de cada composto. Apresentou-se também a probabilidade de identificação do composto dada pelo *software*. Identificaram-se compostos de todos os grupos como ésteres, álcoois, aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos.

Não foi possível fazer a quantificação dos compostos, de modo a saber a quantidade produzida pelas peras, uma vez que não foi possível preparar as retas de calibração. No entanto, colocou-se juntamente com a amostra uma quantidade de padrão interno, composto do qual se conhece a sua concentração. Assim, a área do pico correspondente a este pode servir, não exatamente como termo de comparação, mas como uma referência. O DL-3-Octanol a uma concentração de 1 g/L resultou num pico de 8,59E+07 de área e numa altura do pico de 2,12% (correspondendo à abundância relativa).

Tabela 12 - Compostos orgânicos voláteis detetados em amostra de pera Rocha após 14 dias de *shelf life* à temperatura ambiente e em exsicador com respetivo tempo de retenção (TR), área e percentagem do pico e percentagem de altura do pico (abundância relativa no cromatograma).

	TR	Composto	R. Match	Prob. (%)	Área	%Área	%Altura
Eter	4,84	Éter etílico*	908	92,64	2,86E+07	0,76	0,51
Ésteres	9,66	Acetato de etilo	933	92,09	2,28E+07	0,61	0,61

	13,82	Acetato de butilo	928	91,49	1,13E+08	3,01	4,39
	16,3	Acetato de amila	904	78,06	1,46E+07	0,39	0,47
	17,56	Butanoato de butilo	912	76,88	2,35E+06	0,06	0,06
	17,95	Butil-2-metil-butanoato	886	37,4	2,18E+06	0,06	0,04
	18,05	Hexanoato de etilo	891	74,16	5,09E+06	0,14	0,15
	19,39	Acetato de hexilo	939	88,91	9,06E+08	24,16	25,75
	21,58	Acetato de octilo	826	24,9	2,25E+06	0,06	0,06
	23,24	Acetato de heptilo	916	76,38	6,14E+06	0,16	0,15
	24,88	Hexanoato de butilo	890	73,17	1,58E+07	0,42	0,36
	24,99	Butanoato de hexilo	943	83,39	1,37E+07	0,37	0,32
	25,46	Butanoato de 2-metil-hexilo	904	73,18	6,31E+06	0,17	0,14
	25,82	Octanoato de etilo	908	83,42	2,01E+07	0,54	0,46
	27,02	Etil (E)-2-octenoato	771	66,63	2,88E+06	0,08	0,06
Álcoois	10,82	Etanol	988	89,9	2,39E+08	6,38	5,72
	15,78	1-Butanol	932	65,7	1,17E+08	3,11	3,24
	17,37	2-metil-1-Butanol	912	46,84	5,24E+06	0,14	0,12
	18,71	1-Pentanol	947	65,99	1,35E+07	0,36	0,38
	22,38	1-Hexanol	915	52,65	1,32E+09	35,15	33,56
	26,77	1-Heptanol	932	52,44	1,09E+07	0,29	0,24
Aldeídos	5,81	Acetaldeído	970	85,72	1,27E+07	0,34	0,23
	7,42	Propanal	848	63,7	1,58E+06	0,04	0,03
	9,4	Butanal	888	77,46	7,69E+06	0,21	0,16
	11,82	Pentanal	856	45,6	1,50E+07	0,4	0,39
	14,13	Hexanal	907	72,13	2,69E+07	0,72	0,81
	16,82	Heptanal	808	36,72	3,80E+06	0,1	0,08
Hidrocarbonetos*	5	cis-1-etil-2-metil-ciclopropano	860	18,61	3,90E+06	0,1	0,05
	5,53	Heptano	895	51,85	1,38E+07	0,37	0,21
	6,72	(E,Z)-2,4-Hexadieno	938	10,43	1,91E+06	0,05	0,04
	7,22	Octano	817	12,82	1,28E+06	0,03	0,03
	7,61	(Z),(Z)-2,4-Hexadieno	908	19,72	2,24E+06	0,06	0,04
	12,48	(1,2-dimetilpropil)-ciclopropano	840	41,34	5,26E+06	0,14	0,14
	12,75	2,5-dimetil-2,4-Hexadieno	936	23,94	1,09E+07	0,29	0,38
	13	1,5-dimetil-1,4-ciclohexadieno	902	30,67	3,14E+06	0,08	0,08
	15,61	p-Xileno	973	38,48	2,34E+07	0,62	0,72
Cetonas	10,03	2-Butanona	934	87,46	3,73E+06	0,1	0,09
	12,18	2,4-dimetil-3-Pentanona*	944	71,69	1,10E+07	0,29	0,33
	13,37	1-(2-metil-1-ciclopenten-1-il)-etanona*	856	42,1	1,77E+07	0,47	0,63
	18,99	3-Octanona*	899	66,95	2,17E+07	0,58	0,63

Os compostos presentes em maior abundância foram os álcoois (43,35%) seguidos pelos ésteres (32,96%), o que não se verifica para outros estudos, sendo que habitualmente os ésteres representam o grupo mais significativo de compostos produzidos por peras [62][70][71][102]. No entanto, é necessário ter em conta que os frutos analisados estavam num exsicador e não se encontravam nas mesmas condições das referidas na bibliografia. Os compostos assinalados com * não foram mencionados na literatura consultada.

Foi possível então identificar alguns daqueles que se haviam definido inicialmente (Tabela 1) como os compostos orgânicos voláteis de maior interesse para este estudo (Tabela 13).

Tabela 13 - VOCs de interesse referidos na bibliografia e identificados em pera Rocha.

Composto	TR (min)	R. Match	Prob. (%)	Área	%Área
Acetaldeído	5,81	955	69,7	1,27E+07	0,34
Acetato de etilo	9,66	927	88,4	2,28E+07	0,61
Etanol	10,82	986	90	2,39E+08	6,38
Acetato de butilo	13,82	945	91,6	1,13E+08	3,01
Hexanal	14,13	924	72,5	2,69E+07	0,72
1-butanol	15,78	935	66,4	1,17E+08	3,11
Hexanoato de etilo	18,05	889	82,1	5,09E+06	0,14
Acetato de hexilo	19,39	950	88,8	9,06E+08	24,16
1-Hexanol	22,38	915	52,65	1,32E+09	35,15

O composto que apareceu com maior abundância relativa e maior área do pico foi o 1-hexanol (35,15%). Apesar de não ter sido definido de início como um dos compostos de maior interesse para analisar, é um composto bastante abundante em alguns tipos de pera como a Doyenne du Comice, a Bartlett, cinco cultivares chinesas, e mesmo em pera Rocha [120][121]. No entanto, não foi explicado o seu possível significado ou função. Numa experiência feita em maçãs concluiu-se que a quantidade de hexanol pode ser um bom indicador para o desenvolvimento de *soft scald*, pois as maçãs com maior incidência deste acidente fisiológico apresentavam níveis mais elevados deste composto [122]. Poderia então ser de grande interesse verificar se este composto estará também relacionado com o escaldão superficial em pera Rocha.

O composto mais abundante a seguir ao 1-hexanol foi o acetato de hexilo o que pode fazer sentido uma vez que a presença de hexanol produz um aumento da quantidade deste composto [122].

O etanol foi também um dos compostos mais abundantes. Este é um produto do metabolismo anaeróbico que pode ter iniciado visto que as peras estiveram fechadas no exsicador durante bastantes horas (24h) sem renovação do ar. Este pode estar relacionado com a incidência de acastanhamentos internos [74].

Num estudo feito a peras Conference verificou-se que a concentração de etanol nas peras era muito baixa à colheita, tendo aumentado após seis meses de armazenamento. Este aumentou ainda mais durante o seu tempo em *shelf life* [123]. A concentração de acetaldeído, apesar de ser muito mais baixa do que a de etanol, também aumentou proporcionalmente. Durante o tempo de *shelf life* após conservação, as

concentrações de acetaldeído aumentaram especialmente para peras armazenadas em condições de AN ou condições de níveis de O₂ mais elevados e de CO₂ mais baixos.

Um dos álcoois mais abundantes foi também o 1-butanol, um dos álcoois mais importantes para a pera sendo responsável pelo aroma frutado. Este álcool aumenta com o evoluir da maturação [71]. Este é necessário para a produção de acetato de butilo [65] que em conjunto com o acetato de hexilo são os ésteres mais abundantes em pera Rocha [121] e noutras variedades como a Bartlett, Anjou ou Comice [124].

Como foi possível obter resultados para as peras em *shelf life* colocadas no exsicador, fez-se a experiência para ver se resultaria para as câmaras de conservação e para possivelmente poder fazer uma comparação dos resultados. Assim, analisou-se a atmosfera gasosa das câmaras colocadas sob as condições descritas na tabela 14.

Tabela 14 - Condições das câmaras de conservação estudadas.

Câmara	T (°C)	HR (%)	O ₂ (%)	CO ₂ (%)	1-MCP
7	- 0,5	90-95	4	0,5	312 (ppb)
8			0,5	0,5	-
9			20,8	0,03	-
10			2,5	0,5	-

O aroma das peras é uma das características mais importantes para o consumidor e verifica-se que este é influenciado pelas condições de armazenamento e pelos tratamentos pós-colheita [71][121]. Os VOCs que contribuem para o aroma da fruta são produzidos através de processos metabólicos durante o amadurecimento, a colheita, o pós-colheita, a conservação e variam consoante a cultivar. De modo a manter a qualidade organoléptica da fruta, é importante saber como é que a composição dos VOCs produzidos é influenciada pelos tratamentos aplicados [125].

É necessário ter em conta que na maior parte dos estudos as peras são retiradas das condições de conservação, colocadas em frascos e deixadas à T ambiente até atingirem o equilíbrio [71][121]. Neste trabalho analisaram-se os compostos que se produziram dentro das câmaras.

O ar das câmaras foi analisado dia 9 de Dezembro de 2020, correspondendo já a aproximadamente quatro meses de conservação.

Câmara 7 (1-MCP)

A análise do ar da câmara 7 é apresentada no cromatograma da figura 36 onde se deteta a presença de sete picos principais (Tabela 15). Dos VOCs mais abundantes três são álcoois, três são ésteres e um aldeído.

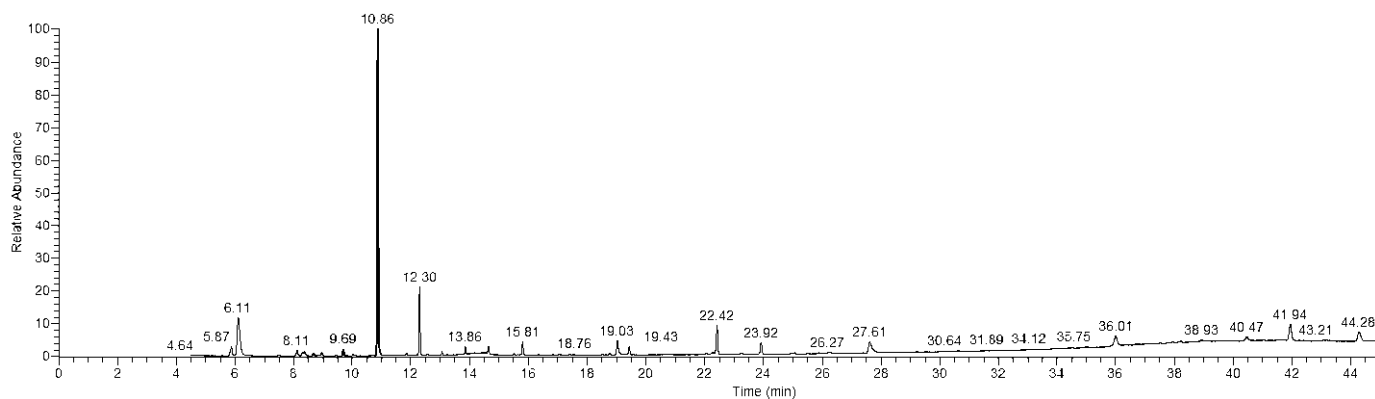


Figura 36 - Cromatograma *full scan* obtido para a câmara 7 (abundância relativa vs. tempo (min)).

Os compostos detetados com maior abundância relativa foram o etanol, o 1-hexanol, o 1-butanol, o acetaldeído e os acetatos de hexilo e butilo (Tabela 15).

Tabela 15 - Compostos identificados como de maior interesse e detetados para a amostra da câmara 7.

Composto	TR (min)	R. Match	Prob. (%)	Área	%Área	%Altura
Acetaldeído	5,87	952	81,23	1,14E+07	1,61	1,13
Acetato de etilo	9,69	924	90,55	6,21E+06	0,88	0,9
Etanol	10,86	985	90,07	2,48E+08	35,06	42,83
Acetato de butilo	13,86	943	86,55	5,26E+06	0,74	1,06
1-butanol	15,81	930	74,2	1,14E+07	1,61	1,76
Acetato de hexilo	19,43	927	91,31	8,08E+06	1,14	1,09
1-hexanol	22,42	921	57,31	3,10E+07	4,38	3,79

Como referido anteriormente o 1-MCP é um inibidor da ação do etileno. Sendo o etileno o composto que promove o amadurecimento dos frutos, se este for inibido os frutos não irão amadurecer, logo a produção de compostos voláteis nestas condições será muito menor do que o normal. Este efeito do 1-MCP foi comprovado por Rizzolo *et al.* (2005) num estudo feito a peras Conference [126]. Em condições de AC e com aplicação de 1-MCP verificou-se o mesmo para peras Alexander Lucas [67]. Os VOCs produzidos dependem do tempo de armazenamento da concentração de 1-MCP aplicada. Este efeito não se verificou tanto para frutos de colheita tardia, mas ainda assim a redução da produção dos ésteres é significativa [126].

Câmara 8 (ULO)

A análise do ar da câmara 8 é apresentada no cromatograma da figura 37 onde se deteta a presença de oito picos principais (Tabela 16). Dos VOCs mais abundantes três são álcoois, quatro são ésteres e um aldeído.

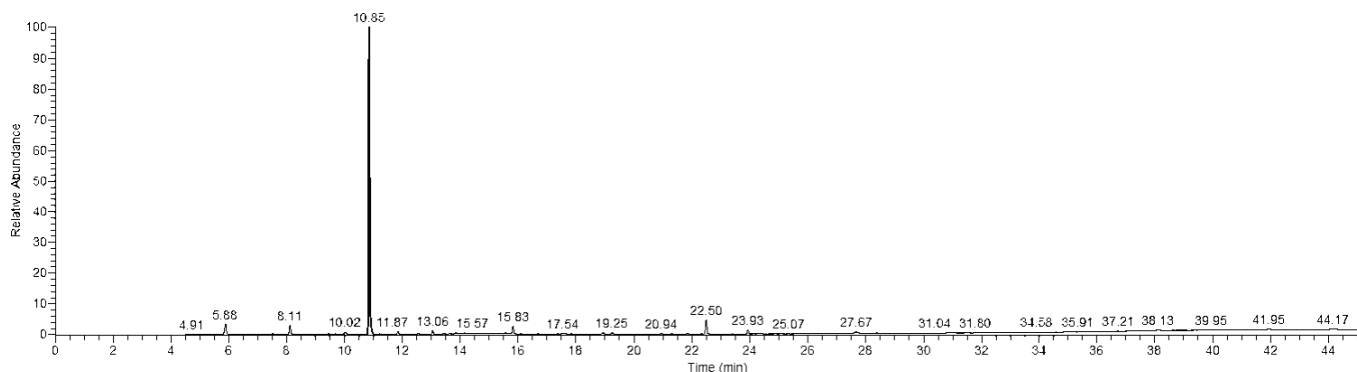


Figura 37 - Cromatograma *full scan* obtido para a câmara 8 (abundância relativa vs. tempo (min)).

O composto com maior abundância relativa foi também o etanol (Tabela 16), tendo sido a maior das registadas para as diferentes câmaras de conservação. Tal pode ser uma vez mais explicado por alguma prevalência de respiração anaeróbica uma vez que esta é a câmara que se encontra com um menor nível de oxigénio. No entanto, também se produziram outros compostos voláteis, sendo o 1-hexanol e acetaldeído os compostos com uma maior abundância a seguir ao etanol. As abundâncias relativas dos ésteres não foram significativas, o que vai de encontro ao que foi dito anteriormente.

Tabela 16 - Compostos identificados como de maior interesse e detetados para a amostra da câmara 8.

Composto	TR (min)	R. Match	Prob. (%)	Área	%Área	%Altura
Acetaldeído	5,88	966	83,43	3,65E+07	3,32	2,38
Acetato de etilo	9,7	900	90,78	2,56E+06	0,23	0,23
Etanol	10,85	973	89,08	7,56E+08	68,75	71,77
Acetato de propilo	11,7	921	87,03	1,57E+05	0,01	0,02
Acetato de butilo	13,86	906	92,62	2,52E+06	0,23	0,29
1-Butanol	15,83	934	69,64	2,29E+07	2,08	1,78
Acetato de hexilo	19,25	936	87,01	4,53E+06	0,41	0,36
1-Hexanol	22,5	927	60,77	4,35E+07	3,95	3,29

Estudos concluíram que baixos níveis de oxigénio durante o período de conservação a frio afetavam o metabolismo dos frutos, reduzindo o seu amarelecimento, inibindo a produção de etileno e alguns ésteres e afetando a sua emissão durante o período de *shelf life* subsequente [126][127]. Para peras Conference e Alexander Lucas verificou-se que esta redução era menos pronunciada em ULO do que para tratamentos com 1-MCP, e que esta ocorre independentemente do estado de maturação à colheita [126].

Câmara 9 (AN)

A análise do ar da câmara 9 é apresentada no cromatograma da figura 38 onde se detecta a presença de sete picos principais (Tabela 17). Dos VOCs mais abundantes três são álcoois, três são ésteres e um aldeído.

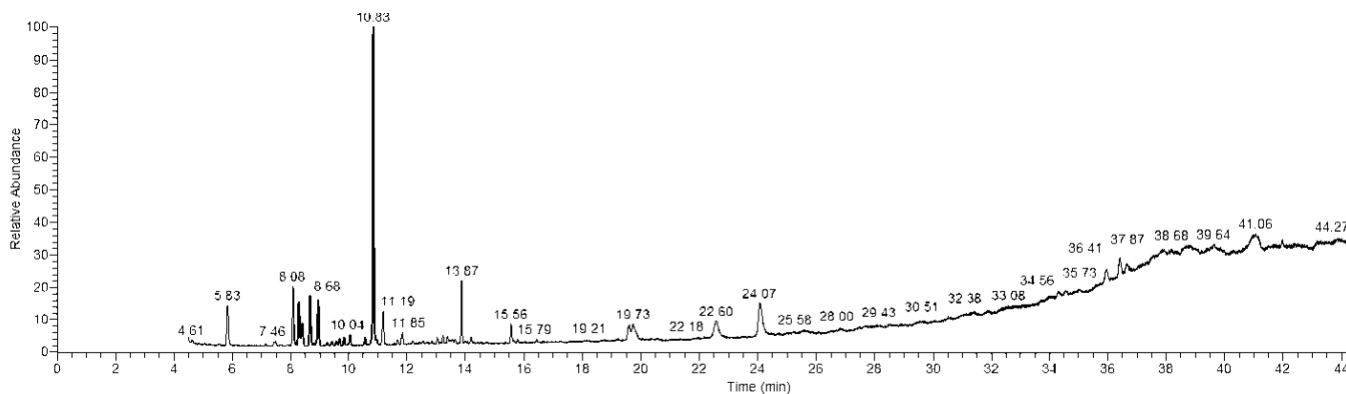


Figura 38 - Cromatograma *full scan* obtido para a câmara 9 (abundância relativa vs. tempo (min)).

O composto que apresentou maior abundância relativa a seguir ao etanol foi o acetato de butilo e de seguida o acetaldeído, o 1-hexanol e o acetato de hexilo (Tabela 17).

Tabela 17 - Compostos identificados como de maior interesse e detetados para a amostra da câmara 9.

Composto	TR (min)	R. Match	Prob. (%)	Área	%Área	%Altura
Acetaldeído	5,83	955	81,67	7,28E+06	2,86	1,99
Acetato de etilo	9,68	868	83,38	9,46E+05	0,37	0,35
Etanol	10,83	981	88,93	3,55E+07	13,94	15,46
Acetato de butilo	13,87	926	92,34	6,46E+06	2,54	3,11
1-Butanol	15,56	904	59,88	2,53E+06	0,99	0,93
Acetato de hexilo	19,59	892	73,49	4,05E+06	1,59	0,68
1-Hexanol	22,58	891	41,24	4,50E+06	1,76	0,62

Para todas as câmaras o composto mais abundante foi o etanol, com menos abundância relativa na câmara 9, como seria de esperar uma vez que é a câmara com um nível de oxigénio mais elevado, permitindo que as peras realizassem a respiração aeróbica. No entanto, mesmo em condições de AN as peras demonstram em parte uma respiração anaeróbica junto com um metabolismo aeróbico [123]. Também se comprovou para diferentes variedades de pera que estas produzem etanol no seu amadurecimento normal ao ar [123].

A câmara de AN é assim também a que apresenta uma maior variedade e quantidade de VOCs em termos de abundância relativa.

Câmara 10 (AC)

A análise do ar da câmara 10 é apresentada no cromatograma da figura 39 onde se deteta a presença de seis picos principais (Tabela 18). Dos VOCs mais abundantes três são álcoois, dois são ésteres e um aldeído.

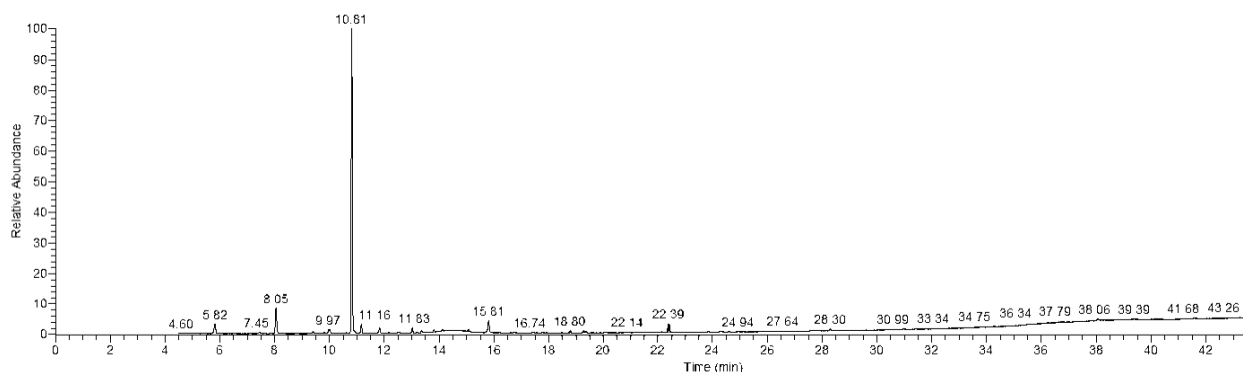


Figura 39 - Cromatograma *full scan* obtido para a câmara 10 (abundância relativa vs. tempo (min)).

O composto que apresentou uma abundância relativa bastante maior do que os outros VOCs foi o etanol, seguido pelo 1-butanol, o acetaldeído e o 1-hexanol, sendo as abundâncias relativas dos ésteres já bastante inferiores (Tabela 18).

Tabela 18 - Compostos identificados como de maior interesse e detetados para a amostra da câmara 10.

Composto	TR (min)	R. Match	Prob. (%)	Área	%Área	%Altura
Acetaldeído	5,82	964	83,48	1,08E+07	2,54	1,58
Etanol	10,81	990	90,52	2,19E+08	51,32	50,8
Acetato de butilo	13,81	904	92,48	1,66E+06	0,39	0,46
1-Butanol	15,81	902	56,57	1,20E+07	2,8	2
Acetato de hexilo	19,29	930	70,35	1,92E+06	0,45	0,34
1-Hexanol	22,39	923	60,13	8,49E+06	1,99	1,5

Existe também uma diminuição na produção de VOCs em frutos armazenados em atmosfera controlada, após voltarem para as condições de atmosfera normal e temperatura ambiente [65][66].

Tal como verificado na análise do ar das diferentes câmaras em estudo (Figura 40), Rizzolo *et al.* (2005) também verificaram que em condições de AN, AC e diferentes quantidades de 1-MCP, o composto presente nas atmosferas, em maior concentração, era sempre o etanol [126].

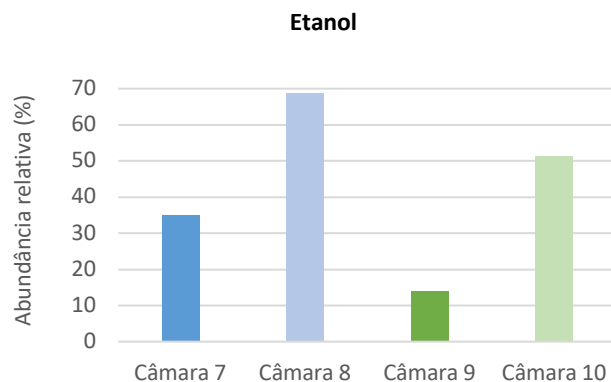


Figura 40 - Abundância relativa (%) do etanol em cada câmara de conservação/condição de armazenamento.

Para todas as condições de conservação verificou-se que se produziram com maior importância sempre os mesmos compostos. Contudo, apresentaram diferentes abundâncias relativas entre eles para cada câmara (Figura 41). Para as câmaras 8 e 10 os ésteres não apresentaram abundâncias relativas significativas em comparação com os outros compostos de interesse detetados. Já para a câmara 9 os ésteres foram dos compostos mais significativos a seguir ao etanol e para a câmara 7 os acetato de butilo e de hexilo só aparecem a seguir aos álcoois e ao acetaldeído mas com percentagens mais significativas.

Verificou-se também que apenas para a câmara 9 se detetou o acetato de butilo em maior abundância do que o acetato de hexilo.

Em todas as câmaras foi detetada a presença de α -farneseno, exceto na câmara 10, ainda que em picos quase inexistentes, estando situados numa zona do cromatograma que já havia bastante ruído, possivelmente devido ao *bleeding* da coluna. A concentração deste composto era provavelmente muito baixa. Obteve-se um pico mais significativo e bem definido apenas para as peras tratadas com 1-MCP.

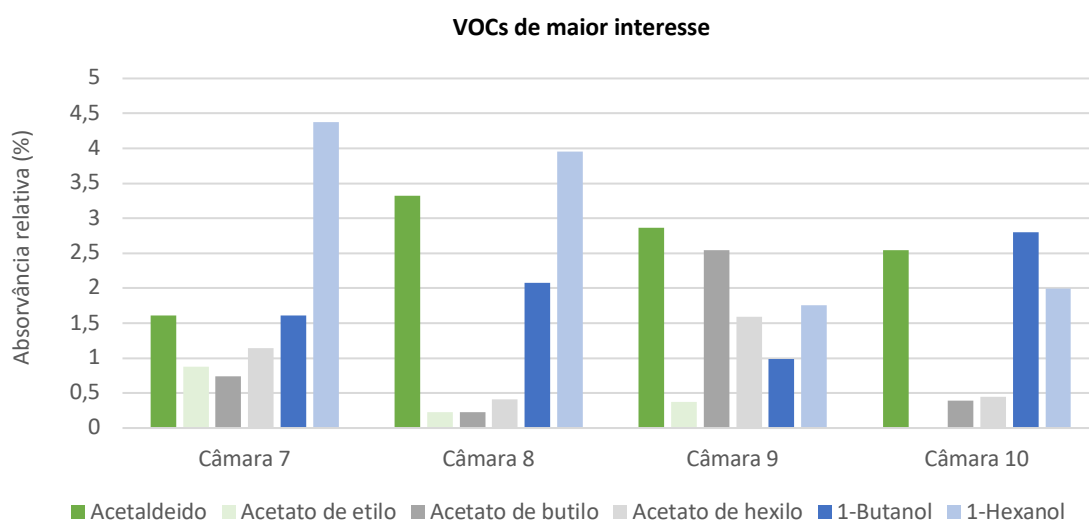


Figura 41 - Abundância relativa dos VOCs de maior interesse presentes em cada câmara de conservação/condição de armazenamento.

Ao longo de uma semana, foi ainda realizada a monitorização, da atmosfera do exsiccador com peras e à temperatura ambiente.

Peras dia 1

A análise do ar do exsiccador ao final de 24 horas com peras à temperatura ambiente é apresentada no cromatograma da figura 42 onde se deteta a presença de nove picos principais (Tabela 19). Dos VOCs mais abundantes quatro são álcoois, quatro são ésteres e um aldeído.

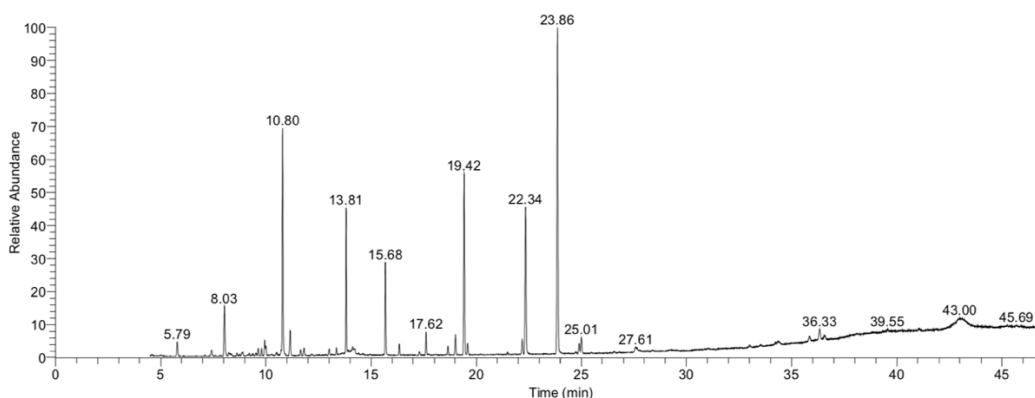


Figura 42 - Cromatograma *full scan* obtido para as peras após 1 dia em *shelf life* (abundância relativa vs. tempo (min)).

Para além do padrão interno colocado nas peras e o etanol, os compostos que apresentaram maior abundância relativa foram o acetato de hexilo, o 1-hexanol, o acetato de butilo e o 1-butanol (Tabela 19).

Tabela 19 - Compostos identificados como de maior interesse e detetados para a amostra das peras após 1 dia em *shelf life* no exsiccador e à temperatura ambiente.

Composto	TR (min)	R. Match	Prob. (%)	Área	%Área	%Altura
Acetaldeído	5,79	963	81,2	5,12E+06	0,94	0,77
Acetato de etilo	9,64	942	93,12	2,28E+06	0,42	0,4
Etanol	10,8	980	88,44	5,92E+07	10,83	12,17
Acetato de propilo	11,65	917	62,41	2,00E+06	0,37	0,33
1-Propanol	13,01	955	55,02	2,19E+06	0,4	0,35
Acetato de butilo	13,81	928	92,57	3,15E+07	5,77	7,82
1-Butanol	15,68	922	62,65	2,46E+07	4,5	5
Acetato de hexilo	19,42	938	90,23	5,55E+07	10,16	9,79
1-Hexanol	22,34	922	62	5,08E+07	9,3	7,89

Em relação ao etanol, verificou-se o mesmo que anteriormente para as diferentes amostras. Apesar de estas peras se encontrarem ao ar (atmosfera normal), como permaneceram fechadas no exsiccador e não havia uma renovação do ar que se encontrava lá dentro, ao respirar foram esgotando o O₂ disponível.

Para a amostra analisada apenas após um dia das peras terem sido colocadas no exsiccador já se verificou uma abundância relativa maior para o etanol. Isto pode sugerir que as peras em apenas um dia sem renovação do ar dão início ao seu metabolismo anaeróbico.

Peras dia 5

A análise do ar do exsiccador ao final de cinco dias com peras à temperatura ambiente é apresentada no cromatograma da figura 43 onde se deteta a presença de oito picos principais (Tabela 20). Dos VOCs mais abundantes três são álcoois, três são ésteres e dois são aldeídos.

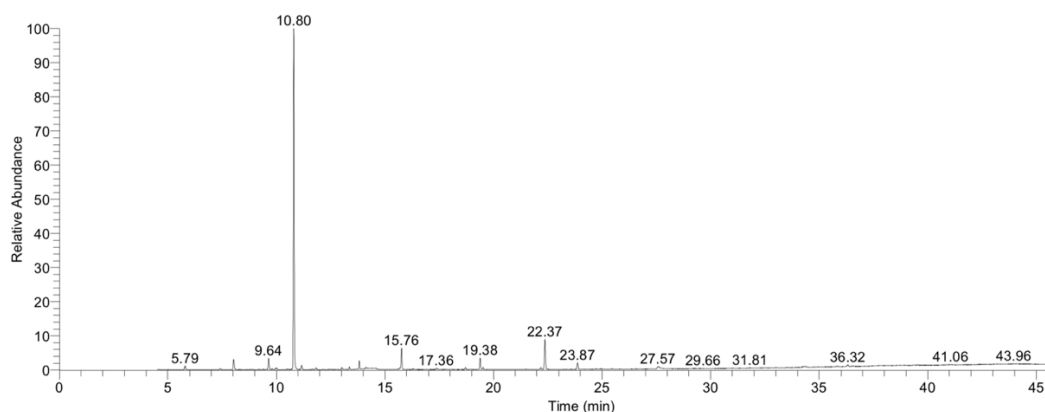


Figura 43 - Cromatograma *full scan* obtido para as peras após 5 dias em *shelf life* (abundância relativa vs. tempo (min)).

A seguir ao etanol o composto que apresentou uma maior abundância relativa foi o 1-hexanol, seguido pelo 1-butanol. O acetato de hexilo e o acetato de etilo contaram já com uma abundância relativa muito semelhante, sendo o etanol um precursor do acetato de etilo (Tabela 20).

Tabela 20 – VOCs identificados como de maior interesse e detetados para a amostra das peras após 5 dias em *shelf life* no exsiccador e à temperatura ambiente.

Composto	TR (min)	R. Match	Prob. (%)	Área	%Área	%Altura
Acetaldeído	5,79	964	82,53	7,66E+06	0,84	0,64
Acetato de etilo	9,64	931	91,39	2,02E+07	2,22	2,04
Etanol	10,8	978	89,59	5,32E+08	58,55	61,78
Acetato de butilo	13,82	922	92,32	1,10E+07	1,21	1,51
Hexanal	14,13	855	62,09	2,59E+06	0,28	0,25
1-Butanol	15,76	927	67,46	3,90E+07	4,29	3,85
Acetato de hexilo	19,38	939	90,31	2,06E+07	2,26	2,05
1-Hexanol	22,37	918	51,19	6,28E+07	6,9	5,39

Para nenhuma das amostras se verificou a presença de α -farneseno, o que pode ser explicado pela existência de ruído que pode ter provocado interferências, especialmente se a concentração deste composto se encontrar a níveis muito baixos.

Passados cinco dias verificou-se um grande aumento do etanol. Sendo que não foi possível fazer uma quantificação dos compostos, não se pode afirmar que as concentrações dos VOCs aumentaram ao longo do tempo. Contudo, sabendo que o zeólito foi colocado desde o início e deixado a adsorver durante os 5 dias, é provável que se tenha produzido mais etanol e também outros VOCs, uma vez que apesar dos picos respetivos a estes compostos passarem quase despercebidos, houve uma alteração da abundância relativa entre eles.

A alteração da atmosfera no exsicador patente na alteração da abundância relativa dos VOCs detetados como mais abundantes (Figura 44) e do etanol (Figura 45) demonstra a capacidade metabólica dos frutos e a sua capacidade de amadurecimento e de resposta às condições ambientais nomeadamente a temperatura e a alteração da concentração de oxigénio no ambiente em que os frutos se encontram.

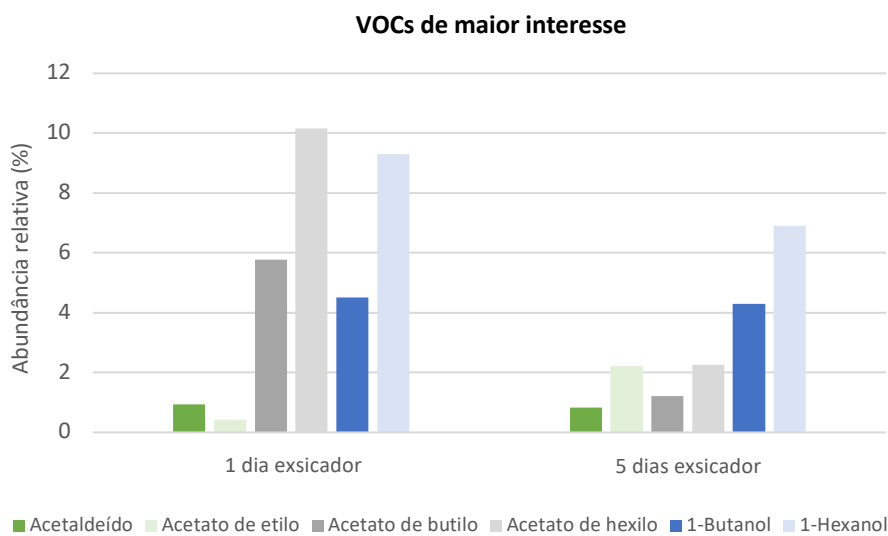


Figura 44 - Abundância relativa (%) dos VOCs de maior interesse das pêras fechadas durante 1 e 5 dias no exsicador, à T ambiente.

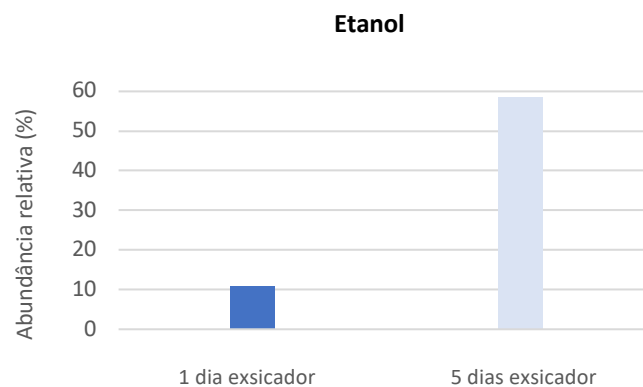


Figura 45 - Abundância relativa (%) do etanol de peras fechadas durante 1 e 5 dias no exsicador, à temperatura ambiente.

Estas evoluções da atmosfera permitem-nos pensar que, ao longo do processo de armazenamento industrial, embora mais subtis, podem existir alterações que nos permitirão monitorizar o estado de evolução dos frutos e, quem sabe, poder ter uma ferramenta analítica para a tomada de decisão na abertura faseada das câmaras frigoríficas.

5 CONCLUSÕES

O estado de maturação dos frutos à colheita é muito importante uma vez que é um dos factores determinantes para a tomada de decisão da tecnologia de conservação a utilizar, condicionando a conservação prolongada com sucesso. Assim, é importante fazer sempre testes de caracterização físico-química dos frutos à colheita de modo a perceber quais as melhores condições de conservação a aplicar. Neste caso, esta caracterização físico-química do fruto foi muito importante pois todos estes factores poderão ter uma relação com os compostos orgânicos voláteis produzidos pelas peras durante a sua maturação e conservação.

As peras da colheita 2020/2021 apresentaram um valor de peso e calibre acima do valor mais comum para a pera Rocha. Apesar de se terem verificado, em média, tons verde mais claro dentro do intervalo e valores de grau Brix abaixo do intervalo de colheita óptima para as peras analisadas, estas apresentaram valores de firmeza da polpa, teor de sólidos solúveis e de acidez total titulável consideravelmente baixos, abaixo dos valores estipulados para a colheita, e taxas de regressão do amido acima do ideal. Concluiu-se que os frutos já se encontravam num estado de maturação mais avançado do que o definido para a altura de colheita óptima (pré-climatérico) justificando o atraso na colheita pela existência de frutos de diversas florações e pela decisão dos fruticultores terem beneficiado o aumento de calibre dos frutos em detrimento do seu estado de maturação.

Um estado de maturação mais avançado pode levar a uma conservação mais problemática, em que surjam mais acidentes fisiológicos.

Atendendo à necessidade de compreender melhor a fisiologia dos frutos durante o período de conservação seria interessante relacionar o estado de maturação das peras com os compostos orgânicos voláteis que estas produzem e em que quantidades. Deste modo, foi desenvolvido um método analítico baseado em GC-MS para fazer a detecção e identificação dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelas peras quer em câmara de conservação quer no período de *shelf life*.

Concluiu-se que seria necessário definir e utilizar métodos específicos para fazer a análise ao etileno e para fazer uma análise aos restantes compostos orgânicos voláteis.

A optimização de um método para a detecção de etileno por GC-MS apresentou maiores dificuldades quer devido à complexidade das amostras em si quer pelas baixas concentrações em que este composto se encontrava.

Foi ainda possível definir um método em GC-MS que permitiu estabelecer o perfil de VOCs produzidos e emitidos pelas peras. As condições operatórias foram as seguintes: temperatura do injectador 150 °C; modo *split*, razão *split* de 33,3. Gás de arraste: hélio com um caudal de 1 mL/min. A temperatura do forno foi programada a 30 °C durante 4,5 minutos; aumento de 20 °C/min até 100 °C, 1 minuto a 100°C seguido de aumento de 2 °C por minuto até aos 150 °C e 10 minutos a esta temperatura. A detecção foi feita utilizando 70 eV de energia de ionização uma temperatura de fonte de iões de 180 °C e temperatura da interface de 180 °C. Começou por se fazer um *full scan* numa gama de massas de 33 a 150 m/z.

Uma vez definido o método, a atmosfera gasosa envolvente das peras colocadas em diferentes condições de conservação e em *shelf life* foi analisada, tendo-se detectado mais de 40 VOCs de diferentes grupos químicos, nomeadamente ésteres, álcoois, aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos

Para as peras em *shelf life* durante catorze dias observou-se principalmente a presença de 1-hexanol, acetato de hexilo, etanol e 1-butanol sendo o grupo de compostos presentes em maior abundância os álcoois (43%) e o principal o 1-hexanol (35%).

Pela análise da atmosfera das câmaras de conservação, concluiu-se que em todas as condições de conservação utilizadas (atmosfera normal, atmosfera controlada, atmosfera controlada + 1-MCP e atmosfera ULO) o composto que as peras produzem em maior quantidade é o etanol. Também produzem outros álcoois principalmente, o 1-butanol e o 1-hexanol. Para as peras conservadas em AN, AC com 1-MCP, em AC e ULO houve uma maior produção de álcoois do que de ésteres. A câmara de ULO foi a que contou com um valor de abundância relativa de etanol maior (68%), seguindo-se a de AC (51%), a de AC+1-MCP (35%) e finalmente a de AN (14%).

Para as peras colocadas em *shelf life* verificou-se a produção dos compostos voláteis de maior interesse (acetaldeído, acetato de etilo, etanol, acetato de propilo, 1-propanol, acetato de butilo, 1-butanol, acetato de hexilo, 1-hexanol), sendo que para as de dia 1 nestas condições a abundância de etanol foi inferior (11%) e a dos ésteres bastante superior comparativamente com as de 5 dias. Para as peras em *shelf life* e fechadas no exsiccador durante cinco dias, a abundância de etanol foi bastante elevada (59%) e os álcoois voltaram a ser os compostos mais significativos.

Concluiu-se que o 1-hexanol, apesar de não ter sido identificado com um composto de maior interesse para a pera na revisão da literatura, encontrava-se sempre presente e está entre os compostos de maior abundância relativa, sendo frequentemente o composto mais abundante a seguir ao etanol.

Prespectivas futuras

Após otimizado o método de análise e feita a identificação dos vários compostos voláteis produzidos pelas peras seria interessante, realizar regularmente, ao longo de todo o tempo de conservação, análises da atmosfera gasosa das câmaras para se perceber quais os compostos que se vão formando de modo a avaliar a pertinência destas análises na tomada de decisão de abertura de câmaras.

Seria importante também fazer a quantificação de todos os compostos identificados. No entanto, para fazer a quantificação é necessário utilizar reagentes puros para construir as respectivas rectas de calibração. Como dificilmente será possível ter disponível no laboratório todos os compostos, poderia começar-se por fazer uma quantificação dos compostos que à partida se sabe serem os mais importantes para a pera, designadamente os atributos do sabor e aroma, ou os que estão relacionados com os acidentes fisiológicos, como são o acetato de etilo, propilo, butilo e hexilo, o 1-butanol, o etanol, o acetaldeído, o hexanal, o α -farneseno e o 1-hexanol.

Uma vez que a forma de realizar as experiências foi definida de acordo com a que tinha sido adotada quando se obtiveram resultados pela primeira vez, e isto foi possível devido à alteração do parâmetro *Time* do aparelho, seria interessante realizar as análises com o parâmetro *Time* já alterado mas fazer as experiências de todas as formas que se tinha tentado inicialmente (como recolher a atmosfera diretamente sem utilizar adsorventes ou utilizar menos peras no exsicador).

Para a colheita de 2020/2021, como as peras ainda se encontram no quinto mês de conservação, seria interessante monitorizar os VOCs das câmaras de modo a avaliar a sua evolução e fazer uma comparação dos resultados obtidos para as diferentes atmosferas de conservação.

Para tentar perceber melhor o funcionamento normal do metabolismo da pera e do processo de maturação, poderiam ser realizadas experiências com peras à temperatura ambiente como nas experiências realizadas neste trabalho com o exsicador. Contudo, em vez de deixar as peras fechadas durante todo o período da experiência, estas deveriam ser colocadas dentro do exsicador apenas nos dias em que se pretendesse fazer as análises, uma vez que já se comprovou que ao deixar as peras fechadas sem que haja renovação do ar, estas dão início à respiração anaeróbica o que faz com que acabem por produzir uma grande quantidade de etanol e que pode alterar de alguma forma os VOCs produzidos.

Seria interessante também fazer um estudo dos compostos produzidos e a sua evolução para peras colhidas em diferentes alturas (colheita precoce, ótima e tardia) de modo a perceber a diferença e poder chegar a alguma conclusão relativamente aos VOCs da colheita ótima (relacionar os VOCs produzidos com o porquê de aquela época de colheita ser ótima).

Finalmente poderia realizar-se um estudo mais completo utilizando diferentes adsorventes e comparar resultados para avaliar quais os que têm uma maior capacidade de adsorção e qual seria o mais adequado para utilizar na concentração dos VOCs produzidos pelas peras, uma vez que neste estudo apenas se conseguiu um resultado preliminar com o zeólito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J. Soares, A. Silva, J. Alexandre, O Livro da Pera Rocha, ANP-Asso, 2000.
- [2] A. Associação Nacional de Produtores de Pera, Caderno de Especificações Pera Rocha do Oeste - Denominação de Origem, (1997) 13.
- [3] Pera – Centro Frutologia Compal, (n.d.). <https://centrofrutologiacompal.pt/pera/#em-portugal> (accessed May 31, 2020).
- [4] A. Torres Paulo, A., Seviante Pinto, A., Machado, R. & Torneiro Martins, Distribuição Geográfica da pereira Rocha, Pera Rocha Do Oeste, ANP 10 Anos, Coord. Torres Paulo, A., ANP, Cadaval,. (2003) 1–34.
- [5] R.M. DeSousa, Manual de Boas Práticas de Fruticultura, 3º Fascículo - A Pereira Rocha. (2020) 1–9.
- [6] F. Fischler, REGULAMENTO (CE) N.o 492/2003 DA COMISSÃO de 18 de Março de 2003 que completa o anexo do Regulamento (CE) n.o 2400/96 relativo à inscrição de determinadas denominações no registo das denominações de origem protegidas e das indicações geográficas protegida, J. Of. Da União Eur. 16 (2003).
- [7] Pera Rocha – Pêra Rocha, (n.d.). <http://perarocha.pt/pera-rocha/> (accessed May 31, 2020).
- [8] B. Fonseca, Produção e Comercialização de Pera | MarketingAgricola.pt, (n.d.). <https://marketingagricola.pt/producao-e-comercializacao-de-pera/> (accessed May 31, 2020).
- [9] PortugalFresh - Associados, (n.d.). <https://www.portugalfresh.org/pt/associados/os-nossos-associados> (accessed September 28, 2020).
- [10] ANP – Pêra Rocha, (n.d.). <https://perarocha.pt/anp/> (accessed May 31, 2020).
- [11] R. de Sousa Silva, Jornal de Leiria - Exportação de pêra rocha cresce 16% e vale 90 milhões de euros, (n.d.). <https://www.jornaldeleiria.pt/noticia/exportacao-de-pera-rocha-cresce-16percent-e-vale-90-milhoes-de-euros> (accessed May 31, 2020).
- [12] Agência Lusa, Exportações de pera rocha sobem para os 90 milhões de euros em 2019 – Observador, (n.d.). <https://observador.pt/2020/01/31/exportacoes-de-pera-rocha-sobem-para-os-90-milhoes-de-euros-em-2019/> (accessed May 31, 2020).
- [13] Ficha de Internacionalização, 2016.
- [14] M.S. Reid, Maturation and Maturity Indices, in: A.A. Kader (Ed.), Chapter 6. Postharvest Technol. Hortic. Crop., Third Edit, Oakland, 2002: pp. 55–62. <https://doi.org/10.1038/78467>.
- [15] J.B. Wills, R. B. H., Golding, Physiology and Biochemistry, in: J.B. Wills, R. B. H., Golding (Ed.), Postharvest an Introd. to Physiol. Handl. Fruit Veg., School of Environmental and Life Sciences, University of Newcastle, University Dr, Callaghan NSW 2308, Australia., 2016: pp. 33–59.

- [16] D. Valero, M. Serrano, F. Group, *Postharvest biology and technology for preserving fruit quality*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2010.
- [17] J. Valente, R. Almeida, L. Kooistra, A comprehensive study of the potential application of flying ethylene-sensitive sensors for ripeness detection in apple orchards, *Sensors (Switzerland)*. 19 (2019). <https://doi.org/10.3390/s19020372>.
- [18] A.A. Saquet, Storage of pears, *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 246 (2019) 1009–1016. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.091>.
- [19] A.C. Rodrigues, Pera Rocha, *Colheita e Conservação*, Cad. Rurais. (n.d.).
- [20] S. Brizzolara, G.A. Manganaris, V. Fotopoulos, C.B. Watkins, P. Tonutti, Primary Metabolism in Fresh Fruits During Storage, *Front. Plant Sci.* 11 (2020) 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00080>.
- [21] D. Almeida, *Manuseamento de produtos Hortofrutícolas*, 1ª edição, Sociedade, Principia, Publicações Universitárias e Científicas, Porto, 2005.
- [22] T.A. Nguyen, P. Verboven, A. Schenk, B.M. Nicolai, Prediction of water loss from pears (*Pyrus communis* cv. Conference) during controlled atmosphere storage as affected by relative humidity, *J. Food Eng.* 83 (2007) 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.02.015>.
- [23] A.A. Kader, *Postharvest biology and technology: an overview*, in: *Postharvest Technol. Hortic. Crop.*, 1985: pp. 15–20. <https://pdfs.semanticscholar.org/f79c/fde7f960f302b034a7f6e60ec944a71787d2.pdf>.
- [24] V. Paul, R. Pandey, Role of internal atmosphere on fruit ripening and storability - A review, *J. Food Sci. Technol.* 51 (2014) 1223–1250. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0583-x>.
- [25] A.A. Kader, *Modified atmospheres during transport and storage*, in: *Postharvest Technol. Hortic. Crop.*, University of California 3311, 1992.
- [26] A.E. Watada, K. Abe, N. Yamuchi, *Physiological Activities of Partially Processed Fruits and Vegetables*, (1990).
- [27] 1999. Saltveit, M. E., Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables, *Postharvest Biol. Technol.* 15 (1999) 276–292.
- [28] J.J. Gonzalez, R.C. Valle, S. Bobroff, W. V. Biasi, E.J. Mitcham, M.J. McCarthy, Detection and monitoring of internal browning development in “Fuji” apples using MRI, *Postharvest Biol. Technol.* 22 (2001) 179–188. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00183-6](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00183-6).
- [29] A.C. Galvis-Sánchez, S.C. Fonseca, A.M.M.B. Morais, F.X. Malcata, Physicochemical and sensory evaluation of “Rocha” pear following controlled atmosphere storage, *J. Food Sci.* 68 (2003) 318–327. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb14159.x>.
- [30] M.S. de Martin, C.A. Steffens, C.V.T. do Amarante, A. Brackmann, M.F. Rodrigues, C. Soethe, *Peras*

- 'rocha' armazenadas em atmosfera controlada com ultrabaixo O₂ e com baixo O₂ associado a diferentes teores de CO₂, *Rev. Bras. Frutic.* 39 (2017). <https://doi.org/10.1590/0100-29452017143>.
- [31] F.R. Thewes, A. Brackmann, V. Both, A. Weber, R. de O. Anese, T. dos S. Ferrão, R. Wagner, The different impacts of dynamic controlled atmosphere and controlled atmosphere storage in the quality attributes of 'Fuji Suprema' apples, *Postharvest Biol. Technol.* 130 (2017) 7–20. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.04.003>.
- [32] S. Bodbodak, M. Moshfeghifar, *Advances in controlled atmosphere storage of fruits and vegetables*, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804313-4.00002-5>.
- [33] M.I. Chitarra, 6.4. Controlo e modificação da atmosfera, in: *Pós-Colheita Frutas e Hortaliças Fisiol. e Manuseio*, 2nd ed., Universidade Federal de Lavras, 2005: pp. 418–441.
- [34] M.H. Álvarez-Hernández, F. Artés-Hernández, F. Ávalos-Belmontes, M.A. Castillo-Campohermoso, J.C. Contreras-Esquivel, J.M. Ventura-Sobrevilla, G.B. Martínez-Hernández, Current Scenario of Adsorbent Materials Used in Ethylene Scavenging Systems to Extend Fruit and Vegetable Postharvest Life, *Food Bioprocess Technol.* 11 (2018) 511–525. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2076-7>.
- [35] Produtores de pera rocha preocupados com quebras nas vendas por alterações comunitárias, *Dinheiro Vivo*. (n.d.). <https://www.dinheirovivo.pt/economia/produtores-de-pera-rocha-preocupados-com-quebras-nas-vendas-por-alteracoes-comunitarias/> (accessed May 31, 2020).
- [36] D. Almeida, Novas recomendações para o armazenamento prolongado de pera 'Rocha' produzida na região Oeste de Portugal, Pre-Print Da Comun. Apresentada Ao VIII Congr. Ibérico Ciências Hortícolas, Coimbra, Port. 7 a 10 Junho 2017. (2017) 1–8. https://www.isa.ulisboa.pt/files/fl/pub/articles/2017-07/Almeida_Recomendacoes_armazenamento_pera_Rocha_Congresso_Iberico_Ciencias_Horticolas.pdf.
- [37] N. Isidoro, D.P.F. Almeida, α -Farnesene, conjugated trienols, and superficial scald in "Rocha" pear as affected by 1-methylcyclopropene and diphenylamine, *Postharvest Biol. Technol.* 42 (2006) 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.05.003>.
- [38] S. Lurie, C.B. Watkins, Superficial scald, its etiology and control, *Postharvest Biol. Technol.* 65 (2012) 44–60. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.11.001>.
- [39] P.R. Schotsmans, W. C., DeLong, J. M., Larrigaudière, C. & K., Effects on Physiological Disorders, in: *Modif. Control. Atmos. Storage, Transportation, Packag. Hortic. Commod.*, Boca Raton: CRC Press, 2009: pp. 160–179.
- [40] C. Larrigaudière, A.P. Candan, J. Giné-Bordonaba, M. Civello, G. Calvo, Unravelling the physiological basis of superficial scald in pears based on cultivar differences, *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 213 (2016) 340–345. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.10.043>.

- [41] B.D. Whitaker, Genetic and biochemical bases of superficial scald storage disorder in apple and pear fruits, *Acta Hort.* 989 (2013) 47–60. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.989.3>.
- [42] C. Franck, J. Lammertyn, Q.T. Ho, P. Verboven, B. Verlinden, B.M. Nicolai, Browning disorders in pear fruit, *Postharvest Biol. Technol.* 43 (2007) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.08.008>.
- [43] J.B. Adams, Effect of enzymatic reactions on color of fruits and vegetables, in: *Enzym. Fruit Veg. Process. Chem. Eng. Appl.*, 2010: pp. 19–43. https://books.google.pt/books?id=6ZTLBQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.
- [44] C. Larrigaudière, I. Lenthalic, J. Puy, E. Pintó, Biochemical characterisation of core browning and brown heart disorders in pear by multivariate analysis, *Postharvest Biol. Technol.* 31 (2004) 29–39. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(03\)00132-7](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(03)00132-7).
- [45] J. Lammertyn, N. Scheerlinck, P. Jancsó, B.E. Verlinden, B.M. Nicolai, A respiration-diffusion model for “Conference” pears I: Model development and validation, *Postharvest Biol. Technol.* 30 (2003) 29–42. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(03\)00061-9](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(03)00061-9).
- [46] T. Deuchande, F. Fidalgo, C. Larrigaudière, D.P.F. Almeida, Internal browning disorders during storage of ‘Rocha’ pear: effects of harvest maturity and CO₂ partial pressure, *Av. En Poscosecha Frutas y Hortalizas.* (2012) 583–588.
- [47] C. Larrigaudière, E. Pintó, I. Lenthalic, M. Vendrell, Involvement of oxidative processes in the development of core browning in controlled-atmosphere stored pears, *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 76 (2001) 157–162. <https://doi.org/10.1080/14620316.2001.11511343>.
- [48] I. Lenthalic, E. Pintó, J. Graell, C. Larrigaudière, Effects of CO₂ pretreatment on oxidative metabolism and core-browning incidence in controlled atmosphere stored pears, *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 78 (2003) 177–181. <https://doi.org/10.1080/14620316.2003.11511603>.
- [49] M.W. Davey, M. Van Montagu, D. Inzé, M. Sanmartin, A. Kanellis, N. Smirnoff, I.J.J. Benzie, J.J. Strain, D. Favell, J. Fletcher, Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing, *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 825–860. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0010\(20000515\)80:7<825::aid-jsfa598>3.3.co;2-y](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0010(20000515)80:7<825::aid-jsfa598>3.3.co;2-y).
- [50] R.H. Veltman, M.G. Sanders, S.T. Persijn, H.W. Peppelenbos, J. Oosterhaven, Decreased ascorbic acid levels and brown core development in pears (*Pyrus communis* L. cv. Conference), *Physiol. Plant.* 107 (1999) 39–45. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.100106.x>.
- [51] P.M.A. Toivonen, D.A. Brummell, Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables, *Postharvest Biol. Technol.* 48 (2008) 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.09.004>.

- [52] C.M.D.M. Sousa, H.R.E. Silva, G.M. Vieira, M.C.C. Ayres, C.L.S. Da Costa, D.S. Araújo, L.C.D. Cavalcante, E.D.S. Barros, P.B.D.M. Araújo, M.S. Brandão, M.H. Chaves, Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais, *Quim. Nova.* 30 (2007) 351–355. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021>.
- [53] M.H. Gomes, T. Vieira, J.F. Fundo, D.P.F. Almeida, Polyphenoloxidase activity and browning in fresh-cut “Rocha” pear as affected by pH, phenolic substrates, and antibrowning additives, *Postharvest Biol. Technol.* 91 (2014) 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.12.013>.
- [54] R. Yoruk, M.R. Marshall, Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review, *J. Food Biochem.* 27 (2003) 361–422. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2003.tb00289.x>.
- [55] C. Chervin, C.J. Brady, B.D. Patterson, J.D. Faragher, Could studies on cell responses to low oxygen levels provide improved options for fruit storage and disinfestation?, *Postharvest Biol. Technol.* 7 (1996) 289–299. [https://doi.org/10.1016/0925-5214\(95\)00048-8](https://doi.org/10.1016/0925-5214(95)00048-8).
- [56] Conservação da pera Rocha: Novas recomendações - Agrozapp, Agrozapp. (n.d.). <https://www.agrozapp.pt/artigos/Técnicos/conservaco-da-pera-rocha-novas-recomendaces> (accessed May 31, 2020).
- [57] E.C. Sisler, M. Serek, Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments, *Physiol. Plant.* 100 (1997) 577–582. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1997.1000320.x>.
- [58] 1-Methylcyclopropene, (n.d.). <https://enacademic.com/dic.nsf/enwiki/8818949> (accessed December 28, 2020).
- [59] A.A. Kader, Regulation of Fruit Physiology By Controlled/Modified Atmospheres, *Acta Hort.* (1995) 59–70. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1995.398.6>.
- [60] Z. Lin, S. Zhong, D. Grierson, Recent advances in ethylene research, *J. Exp. Bot.* 60 (2009) 3311–3336. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp204>.
- [61] A. Millerd, J. Bonner, J.B. Biale, The Climacteric Rise in Fruit Respiration as Controlled by Phosphorylative Coupling, *Plant Physiol.* 28 (1953) 521–531. <https://doi.org/10.1104/pp.28.3.521>.
- [62] L.C. Ji, H.W. Ji, Q. Wang, H. Deng, S.H. Xiao, Changes in the volatile compounds and chemical and physical properties of Kuerle fragrant pear (*Pyrus serotina* Reld) during storage, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 8842–8847. <https://doi.org/10.1021/jf061089g>.
- [63] L. Wang, E. Baldwin, W. Luo, W. Zhao, J. Brecht, J. Bai, Key tomato volatile compounds during postharvest ripening in response to chilling and pre-chilling heat treatments, *Postharvest Biol. Technol.* 154 (2019) 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.04.013>.
- [64] G. Li, H. Jia, R. Wu, Y. Teng, Changes in volatile organic compound composition during the ripening of

- “Nanguoli” pears (*Pyrus ussuriensis* Maxim) harvested at different growing locations, *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 88 (2013) 563–570. <https://doi.org/10.1080/14620316.2013.11513007>.
- [65] I. Lara, R.M. Miró, T. Fuentes, G. Sayez, J. Graell, M.L. López, Biosynthesis of volatile aroma compounds in pear fruit stored under long-term controlled-atmosphere conditions, *Postharvest Biol. Technol.* 29 (2003) 29–39. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00230-2](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00230-2).
- [66] A. Plotto, M.R. McDaniel, J.P. Mattheis, Characterization of “Gala” apple aroma and flavor: Differences between controlled atmosphere and air storage, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 124 (1999) 416–423. <https://doi.org/10.21273/jashs.124.4.416>.
- [67] M.V. Hendges, D.A. Neuwald, C.A. Steffens, R. Vidrih, E. Zlatić, C.V.T. do Amarante, 1-MCP and storage conditions on the ripening and production of aromatic compounds in Conference and Alexander Lucas pears harvested at different maturity stages, *Postharvest Biol. Technol.* 146 (2018) 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.08.006>.
- [68] J. Song, C.F. Forney, Flavour volatile production and regulation in fruit, *Can. J. Plant Sci.* 88 (2008) 537–550. <https://doi.org/10.4141/CJPS07170>.
- [69] C. Santinho, M.G. Barreiro, R. De Sousa, L. Vilas Boas, Volatile Compounds of Rocha Pear Clones After Storage Under Regular or Controlled Atmospheres, (n.d.).
- [70] H. Shiota, Changes in the volatile composition of La France pear during maturation, *J. Sci. Food Agric.* 52 (1990) 421–429. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740520315>.
- [71] E. Zlatić, V. Zadnik, J. Fellman, L. Demšar, J. Hribar, Ž. Čejčić, R. Vidrih, Comparative analysis of aroma compounds in “Bartlett” pear in relation to harvest date, storage conditions, and shelf-life, *Postharvest Biol. Technol.* 117 (2016) 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.02.004>.
- [72] C. Lumpkin, J.K. Fellman, D.R. Rudell, J. Mattheis, Scarlett spur red delicious’ apple volatile production accompanying physiological disorder development during low pO₂ controlled atmosphere storage, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 1741–1754. <https://doi.org/10.1021/jf405267b>.
- [73] T.W. Kimmerer, T.T. Kozłowski, Ethylene, Ethane, Acetaldehyde, and Ethanol Production By Plants under Stress, *Plant Physiol.* 69 (1982) 840–847. <https://doi.org/10.1104/pp.69.4.840>.
- [74] T. Deuchande, C. Larrigaudière, J. Giné-Bordonaba, S.M.P. Carvalho, M.W. Vasconcelos, Biochemical basis of CO₂-related internal browning disorders in pears (*Pyrus communis* L. cv. Rocha) during long-term storage, *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 4336–4345. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00740>.
- [75] T. Deuchande, C. Larrigaudière, U. Guterres, S.M.P. Carvalho, M.W. Vasconcelos, Biochemical markers to predict internal browning disorders in Rocha pear during storage under high CO₂, (2017). <https://doi.org/10.1002/jsfa.8219>.
- [76] L.C. Argenta, X. Fan, J.P. Mattheis, Influence of 1-methylcyclopropene on ripening, storage life, and

- volatile production by d'Anjou cv. pear fruit, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 3858–3864. <https://doi.org/10.1021/jf034028g>.
- [77] C. Wang, W. Zhang, H. Li, J. Mao, C. Guo, R. Ding, Y. Wang, L. Fang, Z. Chen, G. Yang, Analysis of volatile compounds in pears by HS-SPME-GC×GC-TOFMS, *Molecules*. 24 (2019) 1–10. <https://doi.org/10.3390/molecules24091795>.
- [78] G.R. Takeoka, R.G. Buttery, R.A. Flath, Volatile Constituents of Asian Pear (*Pyrus Serotina*), *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 1925–1929. <https://doi.org/10.1021/jf00022a040>.
- [79] C.F. Forney, M.A. Jordan, Induction of Volatile Compounds in Broccoli by Postharvest Hot-Water Dips, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 5295–5301. <https://doi.org/10.1021/jf980443a>.
- [80] S. Tonetto de Freitas, S. Pareek, Fututre Studies on Postharvest Physiological Disorders in Fruit and Vegetables, in: *Postharvest Physiol. Disord. Fruits Veg.*, Boca Raton: CRC Press, 2018: p. 332. https://books.google.pt/books?id=-PSDDwAAQBAJ&pg=PA332&lpg=PA332&dq=gc+ms+to+detect+internal+browning&source=bl&ots=-OVpRtDwxz&sig=ACfU3U25op4yYbSQzXzQPaNhM0UtkjUtog&hl=pt-PT&sa=X&ved=2ahUKewi_2_XS1dLpAhUExhoKHfVICKsQ6AEwAHoECAoQAQ#v=onepage&q=gc ms to de.
- [81] O.D. Sparkman, Z.E. Penton, F.G. Kitson, Introduction and History, *Gas Chromatogr. Mass Spectrom. A Pract. Guid.* (2011) 2–13. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-373628-4.00001-0>.
- [82] Esquema de um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrómetro de massa, (n.d.). https://www.researchgate.net/figure/Figura-159-Esquema-de-um-cromatografo-gasoso-acoplado-a-um-espectrometro-de-massas_fig42_325742385 (accessed June 5, 2020).
- [83] S. Cheriyeath, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Applications*, News Med. Life Sci. (n.d.). [https://www.news-medical.net/life-sciences/Gas-Chromatography-Mass-Spectrometry-\(GC-MS\)-Applications.aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Gas-Chromatography-Mass-Spectrometry-(GC-MS)-Applications.aspx) (accessed June 1, 2020).
- [84] O.D. Sparkman, Z.E. Penton, F.G. Kitson, Section 1: The Fundamentals of GC/MS, 2011. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-373628-4.00002-2>.
- [85] Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) Information | Thermo Fisher Scientific - PT, (n.d.). <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/gas-chromatography-mass-spectrometry-gc-ms-information.html> (accessed June 1, 2020).
- [86] S. Cheriyeath, *Hybrid Analytical Techniques: GC-MS, LC-MS, GC-IR, LC-NMR*, News Med. Life Sci. (n.d.). <https://www.news-medical.net/life-sciences/Hybrid-Analytical-Techniques-GC-MS-LC-MS-GC-IR-LC-NMR.aspx> (accessed June 1, 2020).

- [87] O.D. Sparkman, Z.E. Penton, F.G. Kitson, Mass Spectrometry Instrumentation, in: Gas Chromatogr. Mass Spectrom. A Pract. Guid., 2011: pp. 89–148. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373628-4.00004-6>.
- [88] W. McFadden, Techniques of Combined Gas Chromatography/Mass Spectrometry: Applications in Organic Analysis, Wiley-Interscience, Berkeley, California, 1973.
- [89] Shimadzu, Total Ion Chromatogram, (n.d.). https://www.ssi.shimadzu.com/products/gas-chromatography-mass-spectrometry/total_ion.html (accessed September 5, 2020).
- [90] RochaCenter - Instalações, (n.d.).
- [91] M.D. Ferreira, P.C. Spricigo, Colorimetria: Princípios e aplicações na agricultura, Instrumentação Em Frutas e Hortalças. (2017) 209–220. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/170416/1/Parte-4-cap-1-Colorimetria-....pdf>.
- [92] R. Harrill, Using a Refractometer To Test the Quality of Fruits & Vegetables, (1994). https://nutritionalbalancing.org/center/htma/food/_p/_file_dwnld.php?index=16.
- [93] A.A. Saquet, J. Streif, D.P.F. Almeida, Responses of ‘Rocha’ pear to delayed controlled atmosphere storage depend on oxygen partial pressure, Sci. Hortic. (Amsterdam). 222 (2017) 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.05.006>.
- [94] C.M.D.B.C. Brito, Caracterização da Camarinha (Corema album): Estudo da viabilidade de incorporação em produtos alimentares, 2018.
- [95] J. Salta, A. Martins, R.G. Santos, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, J. Justino, A.P. Rauter, Phenolic composition and antioxidant activity of Rocha pear and other pear cultivars - A comparative study, J. Funct. Foods. 2 (2010) 153–157. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.02.002>.
- [96] N. Isidoro, Evolução do a-farneseno e dos Trienos Conjugados e Sua Relação Com a Incidência de Escaldão Superficial Durante o Armazenamento de Pêra Rocha. Efeitos da Data de Colheita, da Atmosfera Controlada, da Difenilamina e do 1-metilciclopropeno, Porto, 2005.
- [97] J. Goliáš, J. Létal, J. Balík, J. Kožíšková, Effect of controlled atmosphere storage on production of volatiles and ethylene from cv. Zaosuli pears, Hortic. Sci. 43 (2016) 117–125. <https://doi.org/10.17221/160/2015-HORTSCI>.
- [98] L. Pereira, M. Pujol, J. Garcia-Mas, M.A. Phillips, Non-invasive quantification of ethylene in attached fruit headspace at 1 p.p.b. by gas chromatography–mass spectrometry, Plant J. 91 (2017) 172–183. <https://doi.org/10.1111/tpj.13545>.
- [99] NIST - Nitrogen, (n.d.). <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C7727379&Mask=200> (accessed November 1, 2020).
- [100] NIST - Ethylene, (n.d.). <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C74851&Mask=200> (accessed

November 1, 2020).

- [101] G. Qin, S. Tao, Y. Cao, J. Wu, H. Zhang, W. Huang, S. Zhang, Evaluation of the volatile profile of 33 *Pyrus ussuriensis* cultivars by HS-SPME with GC-MS, *Food Chem.* 134 (2012) 2367–2382. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.053>.
- [102] Y. Chen, H. Yin, X. Wu, X. Shi, K. Qi, S. Zhang, Comparative analysis of the volatile organic compounds in mature fruits of 12 Occidental pear (*Pyrus communis* L.) cultivars, *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 240 (2018) 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.014>.
- [103] D. Rood, Gas chromatography problem solving and troubleshooting, *J. Chromatogr. Sci.* 33 (1995) 277. <https://doi.org/10.1093/chromsci/33.5.277>.
- [104] X.K. Yi, G.F. Liu, M.M. Rana, L.W. Zhu, S.L. Jiang, Y.F. Huang, W.M. Lu, S. Wei, Volatile profiling of two pear genotypes with different potential for white pear aroma improvement, *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 209 (2016) 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.06.034>.
- [105] P.L. Wylie, Improved gas chromatographic analysis of organophosphorus pesticides with pulsed splitless injection., *J. AOAC Int.* 79 (1996) 571–577. <https://doi.org/10.1093/jaoac/79.2.571>.
- [106] C.A.G. Sbrussi, C. Zucareli, A.M. Prando, B.V. de A.B. da Silva, Estádios de maturação do desenvolvimento dos frutos e qualidade fisiológica de sementes de *Physalis peruviana*, *Rev. Ciência Agronômica*. 45 (2014) 543–549.
- [107] S.R.B. Lombardi, D.M. De Moraes, D. Camelatto, Avaliação do crescimento e da maturação pós-colheita de pêras da cultivar shinsseiki, *Pesqui. Agropecuária Bras.* 35 (2000) 2399–2405. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2000001200010>.
- [108] R.C.B. Gomes, Previsão do estado de maturação, qualidade e relação do potencial de conservação com o índice de maturação medido com o 'DA -meter' em pêra 'Rocha,' (2018) 55.
- [109] E. Kupferman, Storage scald of apples, *Postharvest Inf. Netw.* (2001) 1–7.
- [110] C.H. Crisosto, Stone fruit maturity indices: a descriptive review, *Postharvest News Inf.* 5 (1994) 65N-68N.
- [111] C. Aubert, G. Chalot, S. Lurol, A. Ronjon, V. Cottet, Relationship between fruit density and quality parameters, levels of sugars, organic acids, bioactive compounds and volatiles of two nectarine cultivars, at harvest and after ripening, *Food Chem.* 297 (2019) 124954. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.124954>.
- [112] P. Neves, Importância dos compostos fenólicos dos frutos na promoção da saúde, (2015) 80. https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/5241/1/PPG_15639.pdf.
- [113] A.C. Galvis-Sánchez, S.C. Fonseca, Á. Gil-Izquierdo, M.I. Gil, F.X. Malcata, Effect of different levels of

- CO₂ on the antioxidant content and the polyphenol oxidase activity of “Rocha” pears during cold storage, *J. Sci. Food Agric.* 86 (2006) 509–517. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2359>.
- [114] F.J.P. Silva, M.H. Gomes, F. Fidalgo, J.A. Rodrigues, D.P.F. Almeida, Antioxidant properties and fruit quality during long-term storage of “rocha” pear: Effects of maturity and storage conditions, *J. Food Qual.* 33 (2010) 1–20. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2009.00289.x>.
- [115] N. Balasundram, K. Sundram, S. Samman, Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chem.* 99 (2006) 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>.
- [116] E. Pintó, I. Lenthalic, M. Vendrell, C. Larrigaudière, Role of fermentative and antioxidant metabolisms in the induction of core browning in controlled-atmosphere stored pears, *J. Sci. Food Agric.* 81 (2001) 364–370. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200102\)81:3<364::AID-JSFA828>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200102)81:3<364::AID-JSFA828>3.0.CO;2-N).
- [117] M. Koushesh Saba, S. Moradi, Internal browning disorder of eight pear cultivars affected by bioactive constituents and enzyme activity, *Food Chem.* 205 (2016) 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.022>.
- [118] W. Wang, Production area and harvest date influence superficial scald incidence and ultra - structure of ‘ Suli ’ pear skin during long term storage, (2020) 234–243. <https://doi.org/10.25177/JFST.5.5.RA.10670>.
- [119] Agilent Technologies, Setting up a SIM Acquisition Method, (2015) 1–2. <http://www.chem.agilent.comhttp://www.chem.agilent.comhttp://www.chem.agilent.comhttp://www.chem.agilent.com>.
- [120] X. Li, X. Li, T. Wang, W. Gao, Nutritional Composition of Pear Cultivars (*Pyrus* spp.), Elsevier Inc., 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00024-6>.
- [121] A.M.A. Fonseca, C. Dias, A.L. Amaro, N. Isidoro, M. Pintado, A.J.D. Silvestre, S.M. Rocha, The impact of plant-based coatings in “ROCHA” pear preservation during cold storage: A metabolomic approach, *Foods* 9 (2020). <https://doi.org/10.3390/foods9091299>.
- [122] R.B.H. Wills, Relationship Between Hexanol Levels in Apples and the Development of Soft Scald, *J. Hortic. Sci.* 48 (1973) 165–168. <https://doi.org/10.1080/00221589.1973.11514516>.
- [123] A.A. Saquet, J. Streif, Fermentative metabolism in “Conference” pears under various storage conditions, *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 81 (2006) 910–914. <https://doi.org/10.1080/14620316.2006.11512158>.
- [124] A. Suwanagul, D.G. Richardson, Identification of headspace volatile compounds from different pear (*Pyrus communis* L.) varieties, *Acta Hortic.* 475 (1998) 605–623. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1998.475.73>.
- [125] A. Rizzolo, A. Polesello, S. Polesello, Use of headspace capillary GC to study the development of volatile

- compounds in fresh fruit, *J. High Resolut. Chromatogr.* 15 (1992) 472–477. <https://doi.org/10.1002/jhrc.1240150713>.
- [126] A. Rizzolo, P. Cambiaghi, M. Grassi, P.E. Zerbini, Influence of 1-methylcyclopropene and storage atmosphere on changes in volatile compounds and fruit quality of conference pears, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 9781–9789. <https://doi.org/10.1021/jf051339d>.
- [127] L. Torregrosa, G. Echeverria, J. Illa, J. Giné-Bordonaba, Emission of VOCs and quality evolution in response to repeated oxygen pull downs on ‘Conference’ pears during long-term cold storage, *Postharvest Biol. Technol.* 170 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111322>.
- [128] M.L. Avelar, A.C. Rodrigues, Vantagens da Atmosfera Controlada na conservação da Pêra Rocha, *Frutas, Legum. e Flores.* (1999).
- [129] NIST - α -Farnesene, (n.d.).
- [130] NIST - Ethanol, (n.d.).

A.1 TABELA DE REGRESSÃO DO AMIDO

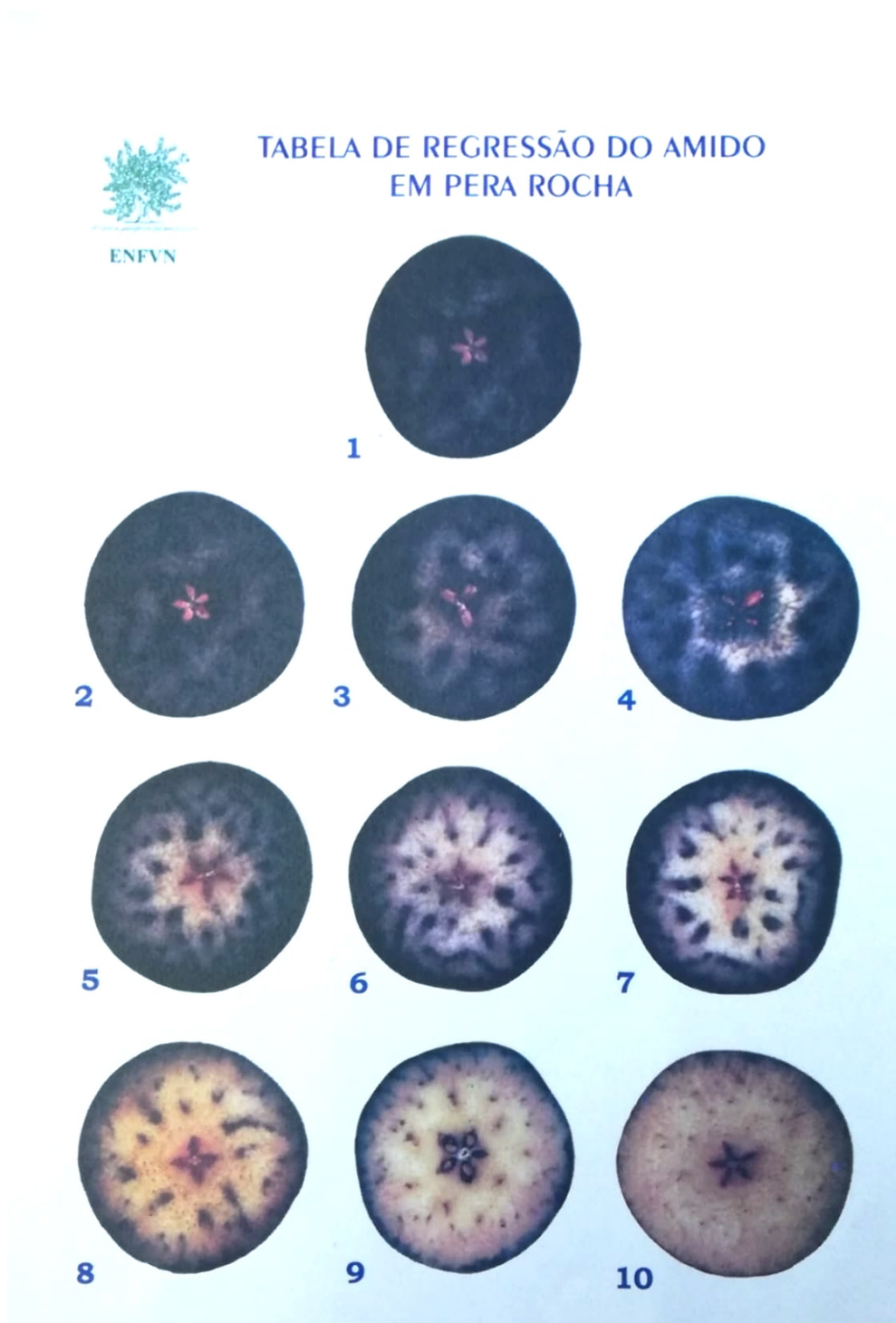


Figura 46 - Estádios de Regressão do Amido em Pera Rocha (Avelar & Rodrigues, 1999).[128]

A.2 RECTA DE CALIBRAÇÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Pesou-se uma massa de ácido gálico de 0,5136 g, tendo-se obtido uma concentração de solução mãe de 1,0272 g/L. Apresentam-se as concentrações das outras soluções recalculadas e respectivas absorvâncias, tendo sido feitas duas repetições de cada ponto:

Tabela 21 - Concentrações e absorvâncias das soluções utilizadas para construir a recta de calibração.

	C (g/L)	A1	A2	Média
1	1,0272	0,524	0,508	0,516
2	0,82176	0,398	0,392	0,395
3	0,61632	0,283	0,304	0,294
4	0,41088	0,186	0,159	0,173
5	0,2568	0,081	0,071	0,076
6	0,05136	0,003	0,002	0,003
7	0,025	0,005	0,006	0,006

O último ponto, correspondente à solução 7, foi desprezado.

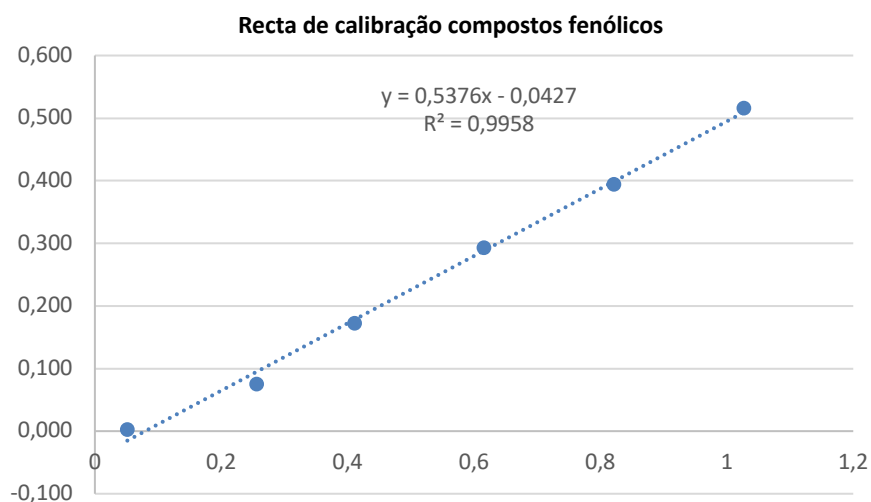


Figura 47 - Recta de calibração para a quantificação de compostos fenólicos. (A vs. C(g/L))

$$A = 0,5376 \times C(g/L) - 0,0427$$

A.3 RECTA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAR A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Pesou-se uma massa de ácido ascórbico de 0,0064 g, tendo-se obtido uma concentração de solução de 0,256 g/L. Apresentam-se as concentrações das outras soluções recalculadas e respectivas absorvâncias, tendo sido feitas duas repetições de cada ponto:

Tabela 22 – Concentrações recalculadas, absorvâncias e % de inibição de cada solução utilizada para construir a recta de calibração.

	C (g/L)	A1	A2	% inibição 1	% inibição 2	% inibição méd.
1	0,256	0,063	0,063	94,87	94,87	94,87
2	0,2048	0,069	0,069	94,38	94,38	94,38
3	0,1536	0,088	0,089	92,83	92,75	92,79
4	0,101376	0,269	0,392	78,08	68,05	73,06
5	0,050688	0,798	0,725	34,96	40,91	37,94
6	0,010138	1,122	1,127	8,56	8,15	8,35
7	0,005069	1,168	1,161	4,81	5,38	5,09

Os pontos correspondentes às soluções 1 e 2 foram desprezados.

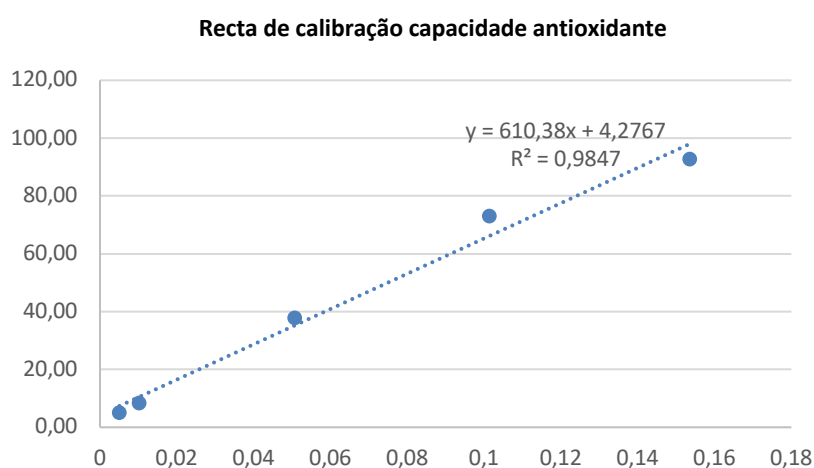


Figura 48 - Recta de calibração para a determinação da capacidade antioxidante. (%Inibição vs. C(g/L))

$$\% \text{ Inibição} = 610,38 \times C(\text{g/L}) + 4,2767$$

A.4 ESPECTROS DE MASSA

A.4.1 NITROGÉNIO

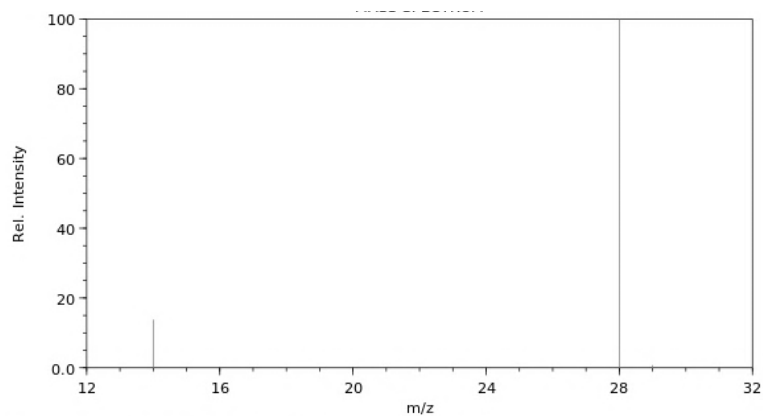


Figura 49 - Espectro de massa (EI) do nitrogénio.[99]

A.4.2 ETILENO

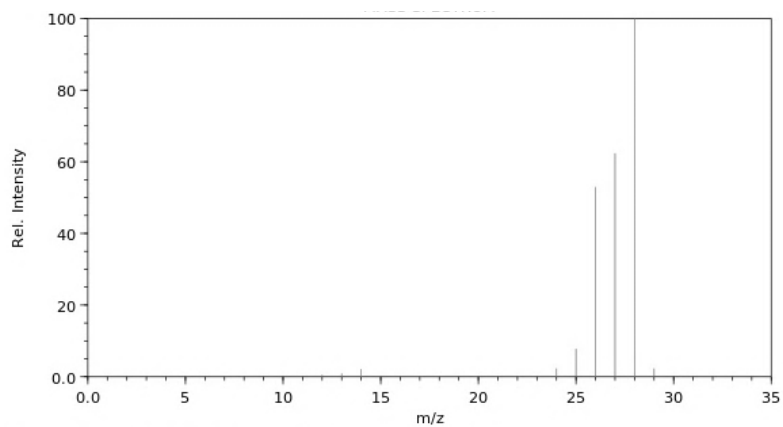


Figura 50 - Espectro de massa (EI) do etileno.[100]

A.4.3 α -FARNESENO

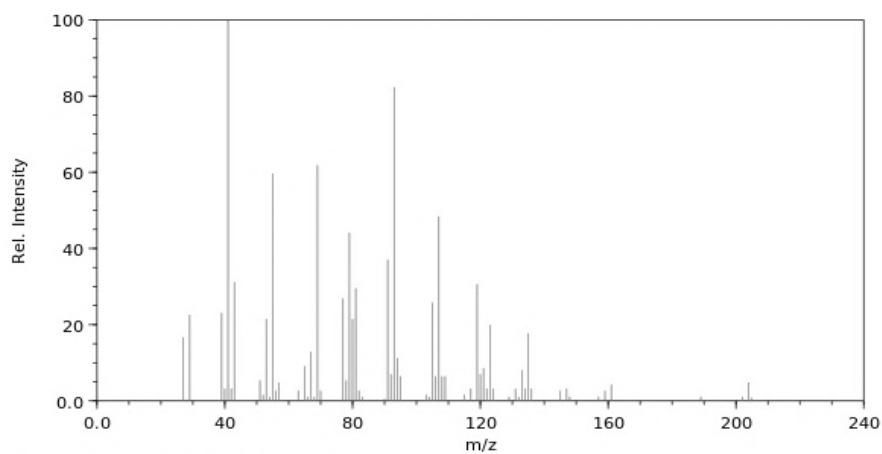


Figura 51 - Espectro de massa (EI) do α -farneseno.[129]

A.4.4 ETANOL

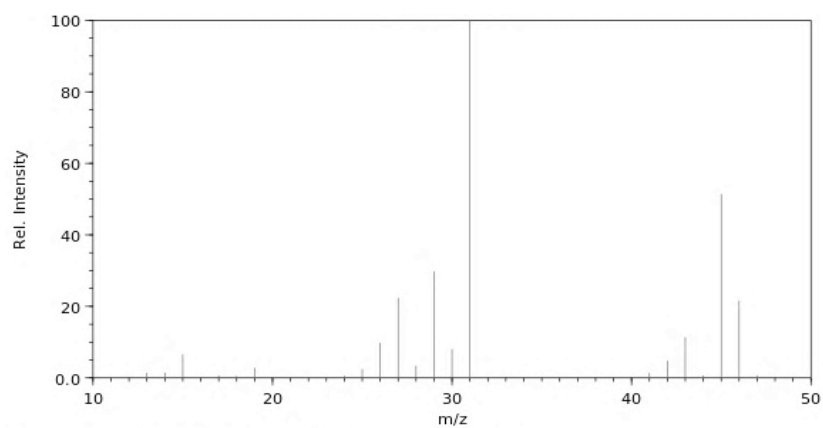


Figura 52 - Espectro de massa (EI) do etanol.[130]

A.5 SOFTWARE GC-MS: IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS

#	Lib.	Match	R.Match	Prob. (%)	Name
1	R	914	916	95.2	Ethylene
2	ni	911	913	95.2	Ethylene
3	M	911	913	95.2	Ethylene
4	M	767	769	2.78	3-Methyl-1,2-diazirine
5	R	752	754	1.68	Ethane
6	ni	748	750	1.68	Ethane
7	M	748	750	1.68	Ethane
8	R	722	724	1.68	Ethane
9	M	660	662	0.14	Ethane, diazo-
10	M	657	657	0.12	1-Propene, 3-azido-
11	ni	612	612	0.02	Succinic anhydride
12	M	612	612	0.02	Succinic anhydride
13	ni	572	573	0.00	Trimethylene oxide
14	M	572	573	0.00	Trimethylene oxide
15	R	564	564	0.00	Acetonitrile, hydroxy-
16	ni	553	565	0.00	1,2,4,5-Tetrazine

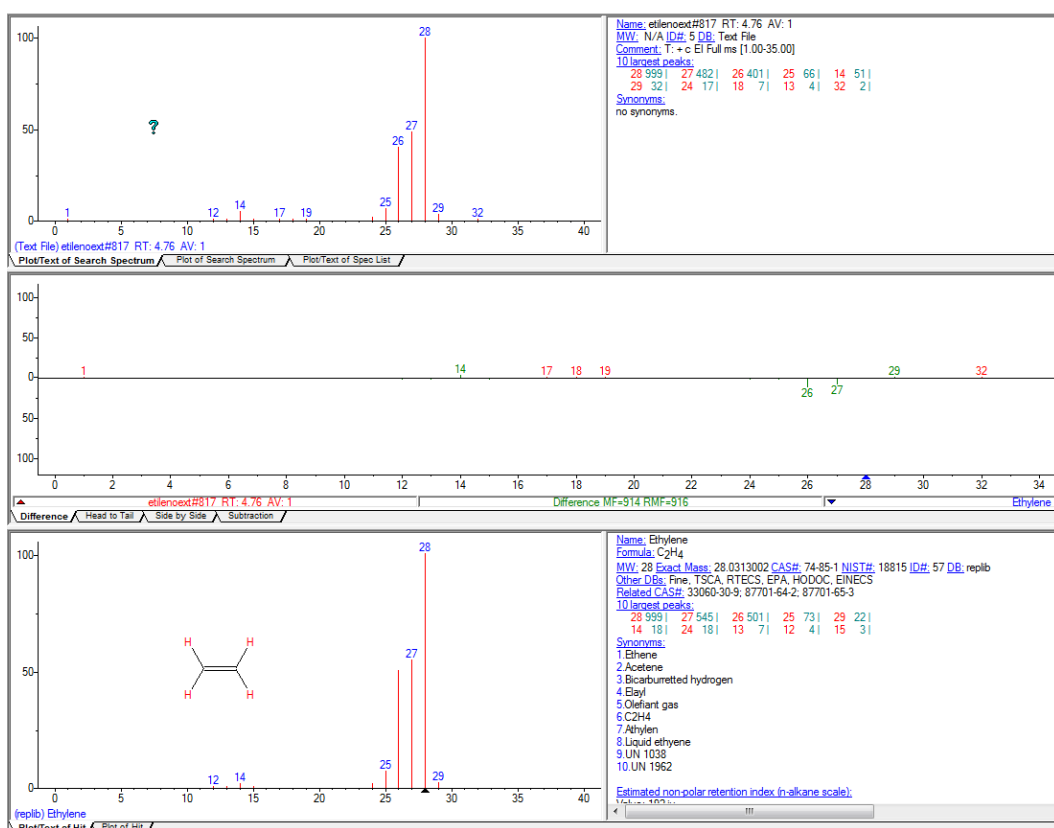


Figura 53 - Identificação do etileno por comparação do espectro obtido com espectros pelo software.

A.6 CROMATOGRAMAS E ESPECTROS DE MASSA

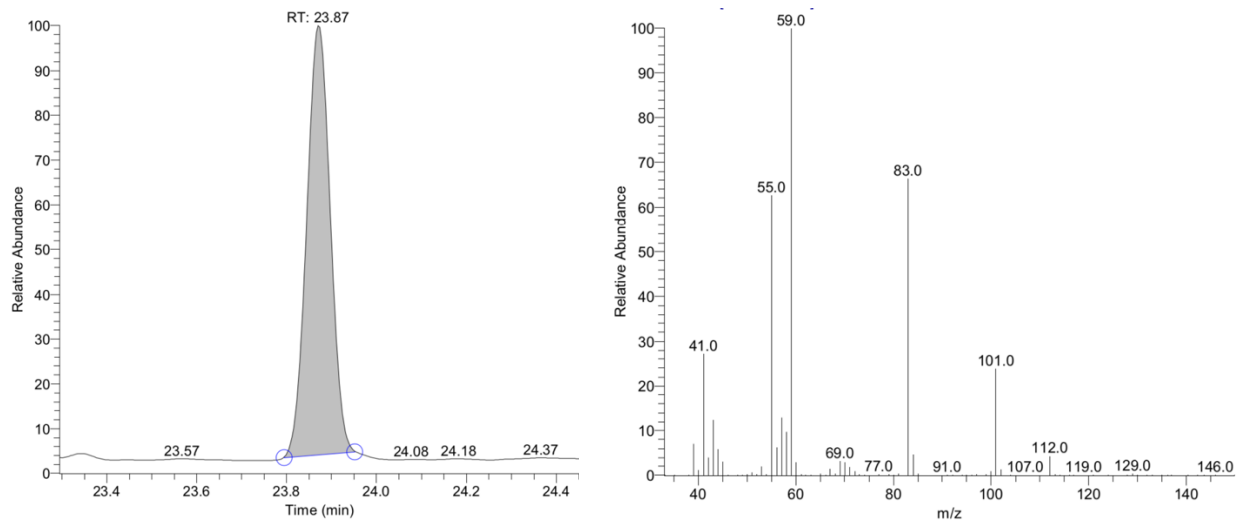


Figura 54 - Cromatograma e espectro de massa do pico identificado como 3-Octanol para a análise de peras em *shelf life* durante 14 dias.