

# **Caracterização da Atmosfera das Câmaras de Conservação de Frutos**

**Rafael Marçal Almeida**

Dissertação para a obtenção de Grau de Mestre em

**Engenharia Química**

## **Orientadoras**

Professora Doutora Maria Filipa Gomes Ribeiro

Professora Doutora Ana Cristina Ferreira de Oliveira Rodrigues

## **Júri**

Presidente: Professora Doutora Maria Teresa Nogueira Leal da Silva Duarte

Orientadora: Professora Doutora Maria Filipa Gomes Ribeiro

Vogal: Doutor Auguste Rodrigues Fernandes

**Novembro 2021**



## **Declaração**

*Declaro que o presente documento é um trabalho original da minha autoria e que cumpre todos os requisitos do Código de Conduta e Boas Práticas da Universidade de Lisboa.*

**Em colaboração com:**



**ROCHACENTER**  
CENTRO DE PÓS-COLHEITA E TECNOLOGIA, ACE

## Agradecimentos

À Professora Doutora Maria Filipa Gomes Ribeiro e à Professora Doutora Ana Cristina Ferreira de Oliveira Rodrigues, pela orientação, esforço, ajuda, disponibilidade e por todos os conhecimentos transmitidos ao longo da realização deste projeto.

À Catarina Brito, ao Alexandre Elias e à Cláudia Oliveira, pela disponibilidade e interesse no acompanhamento deste projeto, bem como pela ajuda, apoio e motivação constante.

Ao Doutor Auguste Fernandes pela disponibilidade e simpatia.

Às Doutoras Amélia Pilar Rauter, Maria José Lourenço, Cristina Oliveira, Ana Paula Carvalho e aos Doutores José Manuel Nogueira e Ricardo Silva, da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, pela disponibilidade para o esclarecimento de dúvidas e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos meus pais, Tony e Marta, e à minha irmã Inês por serem os meus pilares de sustentação e por me darem sempre o apoio, a motivação, a direção e a companhia que precisei não só para a realização deste projeto, mas também para todas as atividades da minha vida.

À minha família, pelo apoio contante e pela motivação incondicional. Em especial, ao meu bisavô Armando, que faleceu na etapa final deste trabalho, e que nunca será esquecido.

À Beatriz Corredoura, por todo o afeto, apoio e cumplicidade, essencial para a realização deste projeto.

Aos meus colegas e amigos que me acompanharam ao longo do meu percurso académico, nomeadamente ao Rafael Taranta, Gil Gonçalves, Beatriz Estevens, Maria Inês Cotovio, Ana Francisca Moreira, Miguel Correia, Jorge Zeferino, Mariana Pereira, Mafalda Sena e Margarida Pinheiro, pela companhia, camaradagem, amizade, ajuda e motivação e pelos bons momentos que preencheram os últimos anos, fazendo-os parecerem menos penosos.

A todos, muito obrigado.



## Resumo

A pera *Rocha* do Oeste DOP, *Pyrus communis* L., é uma variedade de pera, nativa de Portugal. Os frutos podem ser armazenados durante vários meses, em diferentes atmosferas. Ao longo da conservação, quer pelas características do fruto, quer pelas atmosferas utilizadas, podem desenvolver-se problemas fisiológicos nas peras, como acastanhamentos internos e escaldão superficial.

O objetivo deste trabalho é a identificação e quantificação de compostos voláteis presentes nas atmosferas de armazenamento e conservação de pera *Rocha*, ao longo do período de permanência dos frutos nas câmaras, e associá-los ao estado fisiológico dos frutos. Esta identificação e quantificação foi realizada recorrendo a um cromatógrafo gasoso (acoplado com detetor por espectrometria de massa – GC-MS – e com detetor por ionização de chama – GC-FID). Para a quantificação dos voláteis foram elaboradas retas de calibração para os mais abundantes.

Foi realizada uma caracterização físico-química dos frutos, quer à colheita, quer no final do período de armazenamento depois de sujeitos a atmosferas de conservação diferentes, de modo a avaliar o efeito das mesmas nos acidentes fisiológicos. Os compostos voláteis produzidos pelas peras foram analisados a partir da atmosfera do exsicador durante o período *shelf-life*, após saída da conservação, e da atmosfera da câmara ao longo do período de conservação. Dada a concentração reduzida dos compostos voláteis nas atmosferas, recorreu-se à utilização de quatro zeólitos para a sua adsorção e concentração. Ao longo das análises realizadas por GC-MS aos voláteis produzidos por pera *Rocha*, foram detetados 29 compostos, dos quais oito são pertencentes ao grupo dos álcoois, seis aos aldeídos, cinco às cetonas e três aos ésteres, entre outros. Os compostos mais abundantes nas atmosferas pertencem à família dos álcoois, com uma abundância relativa superior a 70% em qualquer das situações analisadas. De realçar que, nas atmosferas analisadas, foram observadas maiores concentrações de etanol, acetaldeído e acetona. Foi também realizada uma monitoração da concentração de etileno em diferentes câmaras ao longo do período de conservação, por GC-FID. As concentrações de etileno obtidas no início da campanha de 2021/2022 são inferiores às obtidas no final da campanha 2020/2021, pelo facto de uma análise corresponder ao final do período de conservação e a outra no início do mesmo. Apesar das semelhanças nas quantidades adsorvidas, foi possível constatar que o zeólito NaY, da UOP, é, por norma, o adsorvente que mais etileno concentrou, assim como outros compostos voláteis. O presente estudo indica que a mordenite utilizada não será uma boa escolha para a remoção de etileno das câmaras, uma vez que, por norma, é o adsorvente que menos concentra este composto. Não foi possível associar o estado fisiológico das peras com os compostos voláteis produzidos, pois seria necessário um maior número de amostras de pomares, de atmosferas e mais tempo de análise de modo a ser possível fazer uma análise multifactorial.

**Palavras-chave:** Pera *Rocha*, etileno, compostos voláteis, GC-MS, GC-FID, atmosferas de conservação, 1-MCP, zeólitos, *shelf-life*, NaY, 5-A, CBV 10-A.

## Abstract

Pera *Rocha* do Oeste DOP, *Pyrus communis* L., is a pear variety native from Portugal. The fruits can be stored for several months during conservation, in different atmospheres, and physiological problems can occur, either due to its characteristics or the atmospheres used, such as internal browning and superficial scald.

The objective of this work is to identify and quantify the volatile compounds produced by the *Rocha* pears throughout its permanence in the conservation chambers, and to associate them with the physiological state of the fruits. The identification and quantification were carried out using a gas chromatograph, with mass spectrometry detector (GC-MS) and with flame ionization detector (GC-FID). Calibration curves were prepared for the most abundant volatiles.

A physical-chemical characterization of the fruits was carried out, both at harvester and at the end of the storage period, after being subjected to different conservation atmospheres. The volatile compounds produced by pears were analysed not only in the *shelf-time* period, in a desiccator after removal from conservation, but also in a chamber throughout the conservation period. Given the low concentration of volatile compounds in the conservation chambers, four zeolites were used for the adsorption and concentration of volatile compounds. During the analyses carried out by GC-MS, 29 compounds were detected, eight of which belonging to the alcohols group, six to aldehydes, five to ketones and three to esters, among others. The most abundant compounds were alcohols, with a relative abundance higher than 70% in all of the analyses performed. Monitoring of ethylene concentration in different chambers throughout the conservation period, at the end of the 2020 harvest and at the beginning of the 2021 harvest, was also carried out by GC-FID. The ethylene concentrations obtained in the 2021 harvest are lower than those obtained in the 2020 harvest, since one analysis was carried out at the end of the conservation period and another at the beginning of it. Despite the similarities, it was possible to verify that the zeolite NaY, from UOP, is the adsorbent that generally concentrated more ethylene, as well as other volatile compounds. It was also concluded that the mordenite used is not the best choice for ethylene removal. It was not possible to associate the physiological state of the pears with the volatile compounds produced, as more samples would be needed.

**Keywords:** *Rocha* pear, volatile compounds, GC-MS, GC-FID, conservation atmospheres, 1-MCP, zeolites, *shelf-life*, NaY, 5-A, CBV 10-A.

# Índice

1. Introdução .....	1
2. Revisão da Literatura .....	3
2.1. Pera <i>Rocha</i> .....	3
2.1.1. Conservação – Técnicas e problemas fisiológicos resultantes.....	5
2.1.2. Compostos Voláteis.....	9
2.2. Metodologias Analíticas.....	16
2.2.1. Cromatografia .....	16
2.2.2. Cromatografia Gasosa.....	17
2.3. Zeólitos.....	21
3. Metodologia Experimental.....	28
3.1. Amostras .....	28
3.2. Caracterização físico-química dos frutos.....	29
3.3. Equipamento e Reagentes .....	30
3.4. Procedimento Experimental.....	31
3.5. Cálculo da Incerteza dos Calibradores .....	32
3.6. Validação estatística do método analítico.....	35
3.7. Cálculo da Incerteza dos Resultados .....	36
4. Resultados e Discussão.....	37
4.1. Caracterização físico-química dos frutos.....	37
4.2. Otimização do método cromatográfico .....	40
4.3. Otimização da desorção dos compostos .....	44
4.4. Retas de Calibração .....	51
4.5. <i>Shelf-life</i> .....	53
4.6. Campanha de 2020/2021 .....	60
4.6.1. Análises por GC-MS .....	60
4.6.2. Análises por GC-FID.....	65
4.7. Campanha de 2021/2022 .....	67
5. Conclusão e Perspetivas Futuras.....	70
6. Bibliografia .....	73

Anexo I – Análises Prévias.....	I
Peras e Bananas.....	I
Peras <i>Conference</i> .....	II
Anexo II – Retas de calibração.....	VI
Acetaldeído.....	VI
Acetato de Etilo.....	VIII
Acetato de <i>n</i> -Butilo.....	X
1-Butanol .....	XII
Etanol.....	XIV
Etileno.....	XVI

## Índice de Tabelas

Tabela I - Condições de armazenamento das diferentes câmaras relativas à colheita de 2020-2021.	28
Tabela II - Condições de armazenamento das diferentes câmaras relativas à colheita de 2021-2022. .....	28
Tabela III - Características dos zeólitos utilizados (informação proveniente do IST). ....	30
Tabela IV – Valores médios de firmeza, de IR, de índice de Streiff e da TRA dos três pomares e respetivo desvio padrão, à chegada ao RochaCenter, nas duas colheitas. ....	37
Tabela V – Valores médios de firmeza, de IR e respetivo desvio padrão e valores de incidência de ES das peras dos três pomares, armazenadas em cada câmara, no final do período de armazenamento e no de shelf-life, em maio de 2021. ....	37
Tabela VI – Condições dos parâmetros instrumentais para análise dos compostos voláteis por GC-FID. .....	40
Tabela VII – Condições dos parâmetros de GC para análise dos compostos voláteis por GC-MS. ....	43
Tabela VIII – Condições dos parâmetros de MS para análise dos compostos voláteis por GC-MS. ...	43
Tabela IX – Condições de desorção para zeólitos expostos no exsicador.....	49
Tabela X – Condições de desorção para zeólitos expostos nas câmaras. ....	50
Tabela XI – Respostas instrumentais a cada calibrador de acetato de etilo. ....	51
Tabela XII – Resultados do teste de Grubbs para a identificação de outliers nos valores limite de área para cada calibrador.....	51
Tabela XIII – Compostos voláteis detetados na análise ao ar de um exsicador por GC-MS, contendo peras Rocha previamente armazenadas em AN, em condições shelf-life, durante uma semana a cerca de 23 °C. ....	53
Tabela XIV – Quantificação dos compostos presentes no ar de um exsicador, contendo peras Rocha previamente armazenadas em AN, em condições shelf-life, durante uma semana a cerca de 23 °C. Incerteza expandida com k=2. O (*) indica uma quantificação com recurso à extrapolação da gama de trabalho, baseada na linearidade da reta de calibração. ....	54
Tabela XV – Compostos voláteis identificados na análise ao ar de um exsicador por GC-MS, contendo peras Rocha previamente armazenadas em ULO + AN, em condições shelf-life, durante uma semana, a cerca de 23 °C. Zeólito NaY UOP. ....	55
Tabela XVI – Compostos voláteis identificados na análise ao ar de um exsicador, por GC-MS, contendo peras Rocha previamente armazenadas em ULO + AN, em condições shelf-life, durante uma semana, a cerca de 23 °C. Zeólito NaY GD.....	56
Tabela XVII – Compostos voláteis identificados na análise ao ar de um exsicador, por GC-MS, contendo peras Rocha previamente armazenadas em ULO + AN, em condições shelf-life, durante uma semana, a cerca de 23 °C. Zeólito CBV.....	56
Tabela XVIII – Compostos voláteis identificados na análise ao ar de um exsicador, por GC-MS, contendo peras Rocha previamente armazenadas em ULO + AN, em condições shelf-life, durante uma semana, a cerca de 23 °C. Zeólito 5-A.....	56

Tabela XIX – Quantificação dos compostos resultantes da desorção de zeólitos NaY GD, CBV e 5-A, expostos a um exsicador, contendo peras Rocha previamente armazenadas em ULO + AN, em condições shelf-life, durante uma semana a cerca de 23 °C. Incerteza expandida com k=2. O (*) indica uma quantificação com recurso à extrapolação da gama de trabalho, baseada na linearidade da reta de calibração. ....	58
Tabela XX - Quantificação de etileno por análise ao ar de dois exsicadores, contendo peras Rocha previamente armazenadas em AN e em ULO + AN, em condições shelf-life, durante uma semana a cerca de 23 °C.....	59
Tabela XXI - Compostos voláteis identificados por GC-MS, resultantes da desorção de zeólito CBV, exposto durante uma semana na câmara 7 (06/04/2021). ....	60
Tabela XXII - Compostos voláteis identificados por GC-MS, resultantes da desorção de zeólito 5-A, exposto durante uma semana na câmara 7 (06/04/2021). ....	61
Tabela XXIII - Quantificação dos compostos resultantes da desorção de zeólito CBV e 5-A, exposto durante uma semana na câmara 7 (06/04/2021). Incerteza expandida com k=2. O (*) indica uma quantificação com recurso à extrapolação da gama de trabalho, baseada na linearidade da reta de calibração. ....	62
Tabela XXIV - Compostos voláteis identificados por GC-MS, resultantes da desorção de zeólito NaY UOP, exposto durante uma semana na câmara 7 (13/04/2021). ....	63
Tabela XXV - Quantificação dos compostos resultantes da desorção de zeólito NaY UOP, exposto durante uma semana na câmara 7 (13/04/2021). Incerteza expandida com k=2. O (*) indica uma quantificação com recurso à extrapolação da gama de trabalho, baseada na linearidade da reta de calibração. ....	64
Tabela XXVI – Compostos detetados por análise ao ar de um exsicador, por GC-MS, contendo peras e bananas, em condições shelf-life, durante uma semana a cerca de 23 °C. ....	I
Tabela XXVII – Compostos voláteis identificados na análise ao ar de um exsicador, por GC-MS, contendo peras Conference, em condições shelf-life, durante uma semana, a cerca de 23 °C. Desorção de 100 mg de zeólito NaY UOP, durante 30 min a 200 °C. ....	III
Tabela XXVIII – Quantificação dos compostos presentes no ar de um exsicador, contendo peras Conference, em condições shelf-life, durante uma semana a cerca de 23 °C. Desorção de 100 mg de zeólito NaY UOP, durante 30 min a 200 °C. Incerteza expandida com k=2. O (*) indica uma quantificação com recurso à extrapolação da gama de trabalho, baseada na linearidade da reta de calibração. ....	III
Tabela XXIX – Compostos voláteis identificados na análise ao ar de um exsicador, por GC-MS, contendo peras Conference, em condições shelf-life, durante uma semana, a cerca de 23 °C. Desorção de 100 mg de zeólito NaY GD, durante 45 min a 200 °C. ....	III
Tabela XXX – Compostos voláteis identificados na análise ao ar de um exsicador, por GC-MS, contendo peras Conference, em condições shelf-life, durante uma semana, a cerca de 23 °C. Desorção de 100 mg de zeólito CBV, durante 45 min a 200 °C. ....	IV
Tabela XXXI – Compostos voláteis identificados na análise ao ar de um exsicador, por GC-MS, contendo peras Conference, em condições shelf-life, durante uma semana, a cerca de 23 °C. Desorção de 100 mg de zeólito 5-A, durante 45 min a 200 °C. ....	IV

Tabela XXXII – Quantificação dos compostos resultantes da desorção de zeólitos NaY GD, CBV e 5-A, expostos a um exsiccador, contendo peras Conference, em condições shelf-life, durante uma semana a cerca de 23 °C. Desorção de 100 mg de zeólito, durante 30 min a 200 °C. Incerteza expandida com $k=2$ . O (*) indica uma quantificação com recurso à extrapolação da gama de trabalho, baseada na linearidade da reta de calibração. ....	V
Tabela XXXIII - Respostas instrumentais de GC-MS a cada calibrador de acetaldeído, e respetiva incerteza expandida ( $k=2$ ). ....	VI
Tabela XXXIV - Testes de linearidade ANOVA Lack-of-fit e de homoscedasticidade da reta de calibração do acetaldeído.....	VI
Tabela XXXV - Respostas instrumentais de GC-MS a cada calibrador de acetato de etilo, e respetiva incerteza expandida ( $k=2$ ). ....	VIII
Tabela XXXVI - Testes de linearidade ANOVA Lack-of-fit e de homoscedasticidade da reta de calibração do acetato de etilo.....	VIII
Tabela XXXVII - Respostas instrumentais de GC-MS a cada calibrador de acetato de n-butilo, e respetiva incerteza expandida ( $k=2$ ). ....	X
Tabela XXXVIII - Testes de linearidade ANOVA Lack-of-fit e de homoscedasticidade da reta de calibração do acetato de n-butilo.....	X
Tabela XXXIX - Respostas instrumentais de GC-MS a cada calibrador de 1-butanol, e respetiva incerteza expandida ( $k=2$ ). ....	XII
Tabela XL - Testes de linearidade ANOVA Lack-of-fit e de homoscedasticidade da reta de calibração do 1-butanol. ....	XII
Tabela XLI - Respostas instrumentais de GC-MS a cada calibrador de etanol, e respetiva incerteza expandida ( $k=2$ ). ....	XIV
Tabela XLII - Teste de linearidade ANOVA Lack-of-fit da reta de calibração do etanol. ....	XIV
Tabela XLIII - Respostas instrumentais de GC-FID a cada calibrador de etileno.....	XVI
Tabela XLIV - Testes de linearidade ANOVA Lack-of-fit e de homoscedasticidade da reta de calibração do etileno.....	XVI

## Índice de Figuras

Figura 1 – Identificação da distribuição geográfica dos concelhos de produção de pera Rocha. Adaptado de [3], [4].	3
Figura 2 - Exemplar de pera Rocha. RochaCenter.	4
Figura 3 – Instalação piloto com câmaras frigoríficas contendo contentores, onde podem ser ensaiadas diferentes atmosferas de conservação. RochaCenter, Bombarral.	5
Figura 4 - Escaldão superficial em pera Rocha. Retirado de [18].	6
Figura 5 - Acidentes fisiológicos internos observados na pera Rocha. A – Core browning; B – White cavity; C – Necrotic cavity; D – Flesh browning. Retirado de [20].	8
Figura 6 – Representação esquemática das reações de formação de etanol e acetaldeído a partir do piruvato. Adaptado de [46].	10
Figura 7 - Representação das vias metabólicas de produção de ésteres, tendo como precursores álcoois e acetil coenzima-A ( <b>A</b> ) e etanol e acil coenzima-A ( <b>B</b> ). Adaptado de [44].	14
Figura 8 - Representação de diferentes tipos de ésteres: acetato (em cima) e éster etílico (em baixo).	14
Figura 9 - Reação genérica de metabolização de aminoácidos a álcoois. Adaptado de [44].	15
Figura 10 - Representação esquemática dos diferentes constituintes de um cromatógrafo gasoso. Obtido de [74].	17
Figura 11 - Representação esquemática de um detetor FID. Obtido de [74].	19
Figura 12 - Representação esquemática de um detetor MS do tipo EI. Retirado de [76].	20
Figura 13 - Tipos de SBUs, seus símbolos e número de ocorrências em estruturas já identificadas, entre parênteses. Adaptado de [88].	23
Figura 14 - Estrutura de uma faujasita (FAU). Adaptado de [88] e de [89].	24
Figura 15 - Estrutura de uma mordenite. Retirado de [89].	26
Figura 16 - Estrutura cristalina do tipo LTA.	26
Figura 17 - Peras Rocha, RochaCenter.	29
Figura 18 – Otimização do método de análise por GC-FID. Cromatograma da análise ao etileno, de concentração de 100 ppm, segundo descrito por [20] (em cima). Cromatograma da análise ao etileno, da mesma concentração, com otimização feita.	40
Figura 19 – Cromatograma. Todos os picos foram identificados como sendo devidos a 1-hexanol.	41
Figura 20 – Cromatograma evidenciando possível bleeding da coluna.	42
Figura 21 – Comparação de diferentes cromatogramas a análises à mesma concentração de 1-hexanol. O cromatograma com temperatura do injetor de 200 °C (em cima) apresenta uma linha de base com maior ruído do que utilizando uma temperatura do injetor de 180 °C (em baixo).	42
Figura 22 – Representação gráfica dos dados recolhidos na análise por termogravimetria.	44
Figura 23 – Testes de desorção dos compostos voláteis do zeólito 5-A, utilizando 500 mg deste adsorvente num vial, colocado numa estufa a 200 °C durante 10 minutos ( <b>A</b> ), 15 minutos ( <b>B</b> ) e 20 minutos ( <b>C</b> ). Injeção de 1 mL do head space no GC-MS. Peras Conference.	46

Figura 24 – Testes de desorção dos compostos voláteis do zeólito 5-A, utilizando 500 mg deste adsorvente num vial, colocado numa estufa a 200 °C durante 10 minutos (A) e 20 minutos (B). Injeção de 0,5 mL do headspace no GC-MS. Peras Conference. ....	46
Figura 25 – Testes de desorção dos compostos voláteis do zeólito NaY UOP, utilizando 250 mg deste adsorvente num vial, colocado numa estufa a 200 °C durante 20 minutos. Injeção de 1 mL (A), 0,5 mL (B) e 0,2 mL (C) do headspace no GC-MS. Peras Conference. ....	47
Figura 26- Teste de desorção de compostos voláteis do zeólito NaY UOP, tuilizando 100 mg deste adsorvente num vial, colocado numa estufa a 200 °C durante 20 minutos. Injeção de 1 ml do headspace no GC-MS. Peras Conference.....	48
Figura 27 – Pormenor de cromatogramas de análises de compostos voláteis em diferentes condições de desorção, para tempos de retenção superiores a 9,80 e inferiores a 20,00 min e temperatura de 200 °C. As condições foram: A – 100 mg durante 30 min; B – 70 mg durante 45 minutos; C – 50 mg durante 45 minutos; D – 50 mg durante 60 min. Peras Rocha, GC-MS.....	49
Figura 28 – Testes de desorção dos compostos voláteis do zeólito NaY UOP, colocado num vial a 200 °C durante 45 minutos numa quantidade de 50 mg (A), 100 mg (B) e 150 mg (C). Injeção de 1 mL do headspace no GC-MS. Peras Rocha, GC-MS. ....	50
Figura 29 – Regressão linear obtida para as respostas instrumentais em função das concentrações dos calibradores de acetato de etilo.....	52
Figura 30 - Abundância relativa das várias famílias de compostos detetados por análise ao ar de um exsicador por GC-MS, contendo peras Rocha previamente armazenadas em AN, em condições shelf-life, durante uma semana a cerca de 23 °C. ....	54
Figura 31 – Abundância relativa das várias famílias de compostos detetados por análise ao ar de um exsicador, contendo peras Rocha previamente armazenadas em ULO +AN, em condições shelf-life, durante uma semana a cerca de 23 °C, recorrendo aos diferentes zeólitos. ....	57
Figura 32 - Abundância relativa das várias famílias de compostos detetados resultantes da desorção de zeólito CBV e 5-A, expostos durante uma semana na câmara 7 (06/04/2021). ....	62
Figura 33 - Abundância relativa das várias famílias de compostos detetados resultantes da desorção de zeólito NaY UOP, exposto durante uma semana na câmara 7 (13/04/2021). ....	63
Figura 34 - Evolução da concentração de etileno ao longo do tempo em diferentes câmaras, utilizando diferentes zeólitos. Colheita de 2020/2021. GC-FID. ....	65
Figura 35 - Evolução da concentração de etileno ao longo do tempo em diferentes câmaras, utilizando diferentes zeólitos. Colheita de 2021/2022. GC-FID. ....	67
Figura 36 - Relação entre estado fisiológico com a produção de etileno, taxa de respiração e crescimento em frutas climatéricas e não climatéricas. Retirado de [115]. ....	68
Figura 37 – Abundância relativa das várias famílias de compostos detetados por análise ao ar de um exsicador, contendo peras e bananas, em condições shelf-life, durante uma semana a cerca de 23 °C. ....	II
Figura 38 - Abundância relativa das várias famílias de compostos detetados por análise ao ar de um exsicador, contendo peras Conference, em condições shelf-life, durante uma semana a cerca de 23 °C. ....	V

Figura 39 - Representação gráfica da reta de calibração do acetaldeído e respetiva equação.  $R^2=0,9972$ . ..... VII

Figura 40 - Representação gráfica da reta de calibração do acetato de etilo e respetiva equação.  $R^2=0,9957$ . ..... IX

Figura 41 - Representação gráfica da reta de calibração do acetato de n-butilo e respetiva equação.  $R^2=0,9911$ . ..... XI

Figura 42 - Representação gráfica da reta de calibração do 1-butanol e respetiva equação.  $R^2=0,9946$ . ..... XIII

Figura 43 - Representação gráfica da reta de calibração do etanol e respetiva equação.  $R^2=0,9923$ . ..... XV

Figura 44 - Representação gráfica da reta de calibração do etileno e respetiva equação.  $R^2=0,9964$ . ..... XVII

## Abreviações e Siglas

**AC** – Atmosfera Controlada;

**AD** – Atmosfera Dinâmica;

**AI** – Acastanhamento Interno;

**AN** – Atmosfera Normal;

**DOP** – Denominação de Origem Protegida;

**ATP** – Trifosfato de Adenosina;

**ECD** – Detetor de Captura Eletrônica;

**EI** – *Electron Impact Ionization*;

**ES** – Escaldão Superficial;

**FID** – Detetor por Ionização de Chama;

**GC** – Cromatógrafo Gasoso;

**GC-FID** – Cromatografia Gasosa acoplada com detetor por Ionização de Chama;

**GC-MS** – Cromatografia Gasosa acoplada com detetor por Espectrometria de Massa;

**HS-SPME** – *HeadSpace Solid Phase Microextraction (Microextração em Fase Sólida por HeadSpace)*;

**IR** – Índice Refratométrico;

**IUPAC** – *International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)*;

**IZA** – *International Zeolite Association (Associação Internacional de Zeólitos)*;

**LO** – *Low Oxygen*;

**MS** – Espectrometria de Massa;

**TCD** – Detetor de Condutividade Térmica;

**TRA** – Taxa de Regressão de Amido;

**ULO** – *Ultra-Low Oxygen*;

**1-MCP** – 1-Metilciclopropeno.



# 1. Introdução

A pera *Rocha do Oeste* é uma variedade portuguesa de pera, que é reconhecida com Denominação de Origem Protegida (DOP), certificando a qualidade do produto e as regras sob as quais é produzida, num determinado território, sendo neste caso o Oeste do país. Esta região, compreendida entre Sintra e Pombal, é a razão para a pera *Rocha* ser intitulada pera *Rocha do Oeste*. [1]

Apesar de ser um produto possível de ser armazenado durante vários meses, ao longo da conservação, quer pelas características do fruto, quer pelas atmosferas utilizadas, podem ser originados problemas fisiológicos no fruto, como acastanhamentos internos e escaldão superficial. Com o intuito de compreender a fisiologia e as vias bioquímicas do fruto que condicionam a sua maturação e conservação, de melhorar as tecnologias pós-colheita existentes e de fazer vigilância tecnológica de forma a garantir uma fruta de qualidade ao consumidor, nomeadamente através do armazenamento a longo prazo, o RochaCenter foi criado. O RochaCenter – Centro de Pós-Colheita e Tecnologia, A.C.E., é um agrupamento de empresas que, no seu conjunto, produzem cerca de 85% da produção nacional organizada de pera *Rocha*. O centro foi constituído em outubro de 2017, e é o primeiro centro privado de pós-colheita em Portugal e dispõe de uma instalação piloto para ensaio de diferentes tecnologias de pós-colheita no armazenamento e conservação dos frutos. Tem ainda a capacidade de realizar um conjunto de análises de forma a avaliar os frutos e as suas características, relacionando-as com as diferentes atmosferas de armazenamento e de outros tratamentos pós-colheita que possam ser realizados.

O objetivo deste trabalho é a identificação e quantificação dos compostos voláteis presentes nas câmaras de armazenamento e conservação de pera *Rocha*, ao longo do período de permanência da fruta nessas câmaras. Pretende-se associar os voláteis presentes ao estado fisiológico da pera *Rocha*, com o objetivo final de, em ambiente industrial, ter uma ferramenta de decisão para a abertura das câmaras. Esta identificação e quantificação será realizada recorrendo a um cromatógrafo gasoso (GC), acoplado com um detetor por espectrometria de massa (GC-MS) e com um detetor por ionização de chama (GC-FID). Para tal, otimizaram-se métodos de análise para cada uma das técnicas referidas, tendo como base trabalhos anteriormente elaborados. Determinou-se quais os melhores zeólitos a utilizar, e otimizou-se também o método de desorção dos compostos. As amostras foram retiradas, semanalmente, de quatro câmaras com atmosferas de conservação diferentes, nomeadamente apresentando diferentes valores de oxigénio. Foi ainda analisada a libertação de voláteis durante o período de *shelf-life*, que corresponde ao período em que as frutas são colocadas a uma atmosfera normal e à temperatura ambiente, de forma a simular as condições em que são sujeitas durante a cadeia de distribuição ao consumidor.

O presente trabalho também está enquadrado no projeto Nano4Fresh – Nanomaterials for an environmentally friendly and sustainable handling of perishable products, (PRIMA/0016/2019), que visa otimizar o processo de conservação, erradicando a aplicação de produtos químicos em tecnologias

pós-colheita. Assim, o controlo do amadurecimento do fruto é feito através da remoção reversível de compostos voláteis, nomeadamente o etileno, pelo uso de adsorventes, tais como zeólitos.

## 2. Revisão da Literatura

### 2.1. Pera Rocha

A pera *Rocha*, *Pyrus communis* L., é uma variedade de pera, nativa de Portugal, com DOP. Portugal é atualmente o quinto maior produtor de pera, sendo a pera *Rocha* a quarta maior variedade cultivada na União Europeia [2]. Em Portugal, a pera *Rocha* representa mais de 95% da produção nacional de pera, sendo produzida maioritariamente nas regiões do Ribatejo e do Oeste (**Figura 1**). Só a produção dos concelhos de Bombarral, Cadaval, Caldas da Rainha e Lourinhã representa cerca de 70% da produção total de pera *Rocha* [3], [4].

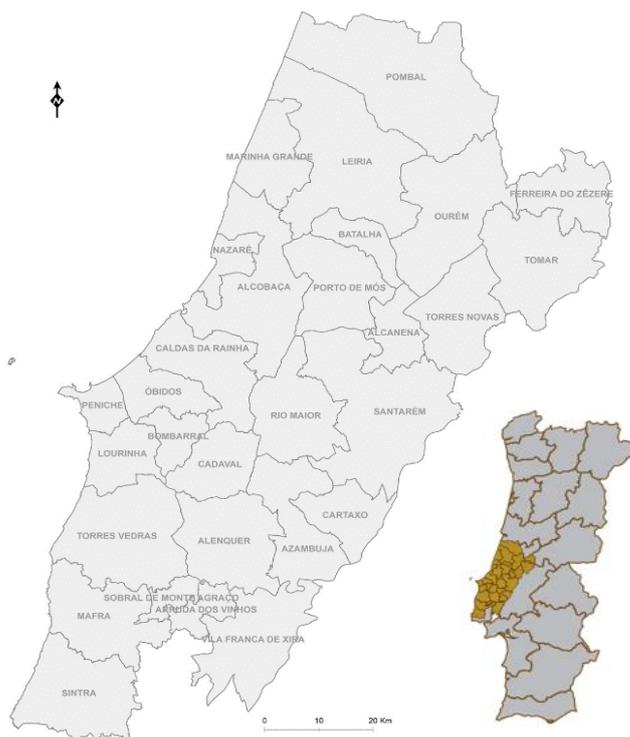


Figura 1 – Identificação da distribuição geográfica dos concelhos de produção de pera *Rocha*. Adaptado de [3], [4].

A denominação de pera *Rocha* está associada à sua origem, a “Fazenda do Rocha”, na zona da Ribeira de Sintra, concelho de Sintra, no início do século XIX. Pedro António Rocha, proprietário da fazenda, afirmava que nela havia uma pereira cujos frutos apresentavam um sabor único e, nos meses de setembro, organizava visitas à propriedade para a população provar o fruto. Desde então, em homenagem ao proprietário, o fruto passou a ser denominado como “pera do Rocha” (**Figura 2**), tendo evoluído para, simplesmente, pera *Rocha*. [5]



Figura 2 - Exemplo de pera *Rocha*. RochaCenter.

Tradicionalmente, a colheita da pera *Rocha* é realizada a partir da segunda metade do mês agosto. As condições ambientais da região Oeste, nomeadamente a precipitação moderada, a temperatura amena, a humidade, o reduzido número de dias de geada e a existência de um verão ameno e seco, aliado à proximidade do oceano, conferem à pera *Rocha* a sua cor, textura e sabor característico, que faz com que seja dos frutos mais apreciados em Portugal. Para além de ser consumida em larga escala em Portugal, a pera *Rocha* é também reconhecida em mercados internacionais. Segundo uma nota oficial, publicada no site do Governo da República Portuguesa em agosto de 2020, produz-se em média 200 mil toneladas anuais de pera *Rocha*, sendo exportado cerca de 70% da produção, que representa cerca de 80 milhões de euros de faturação. [6], [7]

### 2.1.1. Conservação – Técnicas e problemas fisiológicos resultantes

A pera *Rocha*, depois de colhida, deve ser armazenada e conservada recorrendo a diferentes tecnologias de forma a poder estar disponível para consumo nos meses seguintes, mantendo as suas qualidades características. Tal é conseguido pela utilização de diferentes tecnologias de pós-colheita (**Figura 3**), que visam a redução dos processos metabólicos do fruto já colhido, não afetando as suas qualidades desejadas, como o aroma, o sabor e a textura. [8]



Figura 3 – Instalação piloto com câmaras frigoríficas contendo contentores, onde podem ser ensaiadas diferentes atmosferas de conservação. RochaCenter, Bombarral.

As cultivares de peras podem ser divididas em dois grupos: as peras “de Inverno”, que requerem temperaturas frias para a indução da metabolização autocatalítica do etileno, que amadurecem lentamente e que são aptas para um armazenamento prolongado; e as peras “de Verão”, que não necessitam de temperaturas baixas para a produção de etileno e que amadurecem rapidamente durante o armazenamento. A pera *Rocha* é uma cultivar intermédia entre estes dois grupos, pois não necessita de temperaturas frias para amadurecer, e porque tem a característica de poder ser armazenada durante longos períodos, potenciado se houver um cuidado especial durante a apanha, transporte e acondicionamento dos frutos. [9], [10]

Os frutos podem ser armazenados em **atmosferas normais (AN)** refrigeradas e com composição gasosa de cerca de 78% de N<sub>2</sub>, 21% de O<sub>2</sub> e 0,03% de CO<sub>2</sub>. A redução da temperatura faz com que se reduza significativamente o metabolismo da fruta. No entanto, se esta conservação for feita por

períodos prolongados, tem a desvantagem de potenciar a ocorrência de escaldões superficiais. O controlo da humidade durante o armazenamento e a sua permanência em níveis elevados é importante, já que previne a perda de massa por parte dos frutos. É possível conservar a pera *Rocha* em AN, em temperaturas entre 0 °C e 1 °C, durante cerca de cinco meses, sendo uma atmosfera de conservação indicada para frutos mais maduros e para vendas até dezembro. [5], [11]–[13]

O **escaldão superficial (ES)** é um problema fisiológico que ocorre nos frutos após um período prolongado de armazenamento em AN a temperaturas baixas, manifestando-se por zonas castanhas na epiderme da fruta (**Figura 4**), alterando a sua aparência e o seu valor comercial. Na pera *Rocha*, este fenómeno, também dependente de fatores pré-colheita, começa a ser notado depois dos quatro meses de conservação em AN, a baixas temperaturas. Este problema pode resultar de um processo de síntese, acumulação e oxidação do  $\alpha$ -farneseno – induzido pelas temperaturas baixas, formando trienos conjugados, que são responsáveis pela perturbação e alteração das membranas celulares – podendo estar também relacionado com a produção de etileno. A existência de antioxidantes naturais no fruto, como o ácido ascórbico, por exemplo, pode ser um fator importante para evitar ou minimizar o escaldão superficial. [14]–[17]



Figura 4 - Escaldão superficial em pera *Rocha*. Retirado de [18].

Uma atmosfera que se diferencie da AN, no que diz respeito aos teores dos seus constituintes, é denominada como **atmosfera controlada (AC)**. Comparativamente às AN, atmosferas com teor reduzido de oxigénio e mais elevado de dióxido de carbono, em combinação com temperaturas baixas (-0,5 a -1 °C), são aplicadas com o intuito de prolongar o armazenamento de peras ao longo de vários meses, não só por reduzir a respiração e outras vias metabólicas, como também prevenir o crescimento microbiano. No entanto, um menor teor em oxigénio e níveis elevados de dióxido de carbono, face a AN, podem potenciar o surgimento de zonas acastanhadas no interior da pera, para além da produção

de aromas e sabores desagradáveis relacionados com a produção de metabolitos fermentativos. [11], [12], [16], [19]–[22]

Almeida [2] refere as condições ideais para o armazenamento da pera *Rocha* em AC. Segundo o seu trabalho, a temperatura de armazenamento deve estar situada entre -1 e 0 °C, a humidade relativa deve tomar valores entre os 93 e os 95%, o teor de oxigénio entre os 0,2 e 0,5 kPa e o dióxido de carbono inferior a 0,7 kPa.

As concentrações de oxigénio normalmente utilizadas em AC são superiores aos limites fisiológicos dos frutos, de forma a prevenir a fermentação em frutas mais sensíveis e, por isso, evitar a perda de valor comercial do fruto. No entanto, é possível monitorizar uma concentração mínima de oxigénio que não cause a passagem de um metabolismo aeróbio para um anaeróbio. Esta técnica é praticável recorrendo à medição de um biomarcador dentro da câmara – sendo um exemplo o etanol, por ser o metabolito final da respiração anaeróbia – à medida que a concentração de oxigénio é progressivamente reduzida. Assim, a um aumento da concentração de etanol dentro da câmara corresponderá um aumento da concentração de oxigénio, permitindo trabalhar a atmosfera, de forma dinâmica, no limite da respiração aeróbia. A este tipo de atmosfera de conservação dá-se o nome de **atmosfera dinâmica (AD)**. [12], [23]

Foi determinado que, para várias espécies hortícolas, o período de conservação em atmosferas contendo teores inferiores a 2 kPa de oxigénio aumentava sem efeitos adversos. Assim, definem-se atmosferas **low-oxygen** (LO) contendo entre 1,5 e 2 kPa de oxigénio, e **ultra-low oxygen** (ULO), entre 0,8 e 1,2 kPa [24]. Para além do retardamento do amadurecimento, a conservação sob estas condições reduz a perda de ácidos e açúcares durante a respiração, assim como a biossíntese de etileno. No entanto, quando os frutos são expostos a estas condições durante um período de tempo superior ao suposto, e quanto menor for o teor da atmosfera em oxigénio, maior são as incidências de acidentes fisiológicos, nomeadamente a ocorrência de acastanhamentos internos. A utilização deste tipo de atmosferas de conservação permite, no entanto, um controlo do ES. Estudos com pera *Rocha*, armazenada numa atmosfera ULO, estática, contendo 0,5 kPa de oxigénio, permitiram concluir a viabilidade da sua conservação durante mais do que oito meses sem a ocorrência de problemas, mantendo ainda a qualidade adequada após 7 dias de *shelf-life*, à temperatura ambiente. [12], [24]–[26]

Os **acastanhamentos internos** (AI) são um problema fisiológico detetável no interior do fruto, e podem-se manifestar sob variadas formas. O acastanhamento pode iniciar-se na zona carpelar do fruto, estendendo-se ao longo do tempo para perto da epiderme, podendo ainda originar cavidades na polpa (**Figura 5**). Os fatores que potenciam estes acontecimentos são a combinação de temperaturas baixas, valores mais altos de dióxido de carbono e baixos de oxigénio dentro das câmaras de conservação, levando a dificuldade na permeabilidade gasosa dos frutos e à formação de metabolitos provenientes da fermentação alcoólica. Outro fator importante para a incidência deste fenómeno fisiológico é a acumulação, no interior do fruto, de espécies reativas de oxigénio, como o superóxido ( $O_2^-$ ) ou o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), que levam à desnaturação das proteínas e a peroxidação de lípidos, com destruição das paredes celulares. O mecanismo de defesa das plantas envolve a produção e

mobilização de antioxidantes, como o ácido ascórbico, tendo sido verificado que, quando o teor de ácido ascórbico no fruto é inferior a um certo valor limite, o AI é potenciado, estando este valor limite dependente da variedade de pera. O AI também se verifica com maior intensidade nas frutas com apanha posterior à data determinada como ótima. De forma a combater este fenómeno, é recomendado o armazenamento a temperaturas baixas imediatamente a seguir à colheita, e diferir a aplicação das condições de AC para duas semanas depois. Foi também observado que o pré-tratamento de peras com dióxido de carbono antes do armazenamento utilizando uma atmosfera LO foi importante para o aumento do teor de ácido ascórbico. [27]–[32]



Figura 5 - Acidentes fisiológicos internos observados na pera Rocha. A – *Core browning*; B – *White cavity*; C – *Necrotic cavity*; D – *Flesh browning*. Retirado de [20].

Num estudo com pera *Rocha*, a incidência de AI foi verificada em 15-20% de peras armazenadas em AD, utilizando como biossensor o etanol, sendo que não foram verificadas incidências quando utilizado um sensor de fluorescência de clorofila. Numa continuação do estudo, foi concluído que a incidência de AI está dependente da regulação de antioxidantes. A fermentação também poderá estar relacionada com a incidência de AI, não só de forma direta, através da ação dos metabolitos fermentativos, mas também de forma indireta, através da desregulamentação energética do fruto, dificultando a regeneração de ácido ascórbico. [33], [34]

Será relevante referir o modo como a concentração do oxigénio é manipulada, dado que é o principal ponto divergente em qualquer um dos tipos de atmosfera de conservação acima referidos. Para a remoção do oxigénio, é prática comum a injeção de nitrogénio, que terá de ser realizada de forma lenta para prevenir danos nas peras. De forma ao processo ser mais vantajoso economicamente, é comum a instalação de um gerador, de forma a produzir o referido gás no local. [24]

### 2.1.2. Compostos Voláteis

A respiração, nos seres vivos, é um processo essencial para a vida, tendo um papel fundamental para o crescimento, desenvolvimento e reprodução. Na respiração, dá-se a oxidação de substratos, nomeadamente açúcares, que origina uma sequência de reações levando à formação de água e à libertação de dióxido de carbono. Durante esta transformação, é libertada energia, temporariamente armazenada sob a forma de trifosfato de adenosina (ATP) ou de outros nucleótidos, podendo estes ser regenerados constantemente. [35]

Os compostos voláteis são produzidos em menor quantidade em armazenamentos com teores baixos de O<sub>2</sub> do que em armazenamentos em AN. [36]

Recentemente, Torregrosa *et al.* [37], observaram que as emissões de compostos voláteis em peras *Conference*, armazenadas a temperaturas de 0 °C com humidade relativa de 95% e com baixos teores de oxigénio (entre 0,4 e 2 kPa), foram substancialmente inferiores quando comparadas com a mesma variedade de peras, armazenadas a 20°C em AN.

Hendges *et al.* [38], na quantificação de compostos voláteis produzidos pelas variedades *Conference* e *Alexander Lucas*, também concluíram que a produção de compostos voláteis foi inferior em peras armazenadas em condições ULO, independentemente do seu estado de maturação à colheita. Observaram ainda que a produção dos compostos voláteis estudados foi semelhante em peras armazenadas em AC (entre 0,7 e 2 kPa O<sub>2</sub>) e em AN, não tendo sido, no entanto, estudados os metabolitos fermentativos. Foi também verificado que a libertação de compostos voláteis foi maior em frutas de uma colheita mais tardia comparativamente a uma primeira colheita, quando ambas sujeitas a tratamento com 1-metilciclopropeno (1-MCP).

Num outro estudo [39], verificou-se que a produção de compostos voláteis em peras *Bartlett* é inferior em condições ULO comparativamente a AN, aumentando depois em período *shelf-life*. A evolução dos frutos no período de *shelf-life* não traduz uma diferença significativas em peras colhidas na data ótima e uma semana depois da data comercial. O mesmo se verifica entre os compostos voláteis produzidos pelas peras colhidas em semanas diferentes.

Apesar da carência de estudos quantitativos dos componentes voláteis emitidos pela pera *Rocha*, existem alguns estudos onde se realizou uma abordagem qualitativa. Num estudo de Gomes *et al.* [40], observou-se que os ésteres, principalmente os acetatos, representam grande parte dos compostos voláteis associados a esta variedade de pera, quando cortada e embalada, sendo que, em condições anaeróbias, o etanol e o acetato de etilo aumentavam as suas concentrações.

No trabalho de Barbosa [18], realizado no RochaCenter com os mesmos equipamentos (entre os quais o GC-MS) e, em parte, às mesmas amostras de pera *Rocha*, em condições iguais de armazenamento (campanha de 2020-2021), foram identificados o acetaldeído, o acetato de etilo, o etanol, o acetato de butilo, o 1-butanol, o acetato de hexilo e o 1-hexanol como os compostos voláteis em maior expressão.

Os compostos voláteis são produzidos através de processos metabólicos e de amadurecimento, e variam entre espécies [41]. Em atmosferas com baixos teores de oxigênio, a biossíntese de compostos voláteis é também regulada pelo fornecimento do precursor e não só pela atividade enzimática [36]. Foi também verificado que, em fases iniciais do amadurecimento de maçãs, a carência de substratos provenientes da metabolização de ácidos gordos e de aminoácidos é um fator limitante para a formação de compostos voláteis e não propriamente as enzimas que catalisam essa formação. Esta supressão pode ser ultrapassada aplicando tratamentos com precursores de compostos voláteis [42]. É, por isso, necessário compreender esses processos de forma a associar diferentes compostos voláteis e suas variações às diferentes atmosferas de conservação.

### ***Etanol e Acetaldeído***

A glicólise é um processo definido como a sequência de reações enzimáticas em que uma molécula de glucose origina duas moléculas de piruvato e duas moléculas de ATP. As moléculas de piruvato podem seguir, de forma geral, três destinos: a produção de etanol, de lactato ou de dióxido de carbono (**Figura 6**). Enquanto as primeiras duas vias são típicas de um processo anaeróbio (tendo o nome de fermentação alcoólica e de fermentação láctica, respetivamente), sem a presença de oxigênio, a metabolização do piruvato a dióxido de carbono e água é realizada em condições aeróbias, com a presença de oxigênio, recorrendo ao ciclo do ácido cítrico e à fosforilação oxidativa. [43], [44]

A produção de grande parte dos álcoois é suprimida em condições de hipoxia, com a exceção do etanol, cuja formação está associada ao metabolismo anaeróbico, através de uma série de reações enzimáticas, que têm como produto intermediário o acetaldeído. Estes dois componentes contribuem para o aroma e sabor da fruta e servem também de precursores para outros compostos voláteis. Apesar do etanol se encontrar em maior quantidade, o acetaldeído é também acumulado durante a fermentação. [39], [45]–[47]

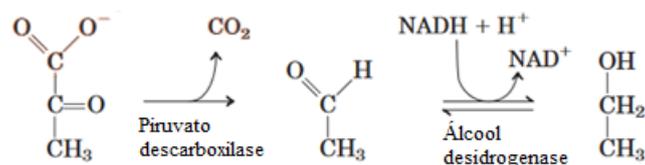


Figura 6 – Representação esquemática das reações de formação de etanol e acetaldeído a partir do piruvato. Adaptado de [46].

Num estudo com morangos, Ke *et al.* [48], reportaram que a atividade das enzimas responsáveis pela formação destes dois compostos, a piruvato descarboxilase e a álcool desidrogenase, é aumentada quando os frutos são colocados em AC em comparação com outros colocados em AN.

Estes resultados foram também verificados em peras *Conference*, segundo o estudo de Saquet *et al.* [49], especialmente em atmosferas com menor teor de oxigênio. Verificou-se ainda que, em *shelf-life* de frutos armazenados em AN, a produção de aldeídos foi maior, tendo-se observado uma baixa produção de etanol. Já nos frutos armazenados em AC, a produção de acetaldeído e de etanol aumentou durante o período de *shelf-life*. A produção e acumulação destes metabolitos pode ser explicada pelo aumento metabólico dos frutos durante este período, aliada à difusão gasosa dificultada, sendo que o acetaldeído poderá ser também produzido segundo a metabolização do ácido ascórbico. Também em peras *Bartlett* se verificou um aumento da concentração de acetaldeído em condições ULO, que se manteve durante o período de *shelf-life*. [39]

Larrigaudière *et al.* [14] investigaram a capacidade antioxidante do etanol em peras *Blanquilla*, e verificaram que o armazenamento de peras em condições ULO, ao favorecer o metabolismo fermentativo e a produção subsequente de etanol, inibiu a existência de ES, num processo aparentemente independente do etileno e do  $\alpha$ -farneseno.

Gomes *et al.* [40] estudaram a produção de compostos voláteis produzidos por pera *Rocha* cortada e embalada em bolsas, armazenadas em diferentes condições de temperatura e concentrações de oxigênio. Neste trabalho, foi concluído que a produção de etanol foi maior em temperaturas de armazenamento mais altas e em atmosferas com menores teores de oxigênio.

Tendo ainda como objeto de estudo a pera *Rocha*, Gomes [50] sugeriu a relação entre o aumento da concentração destes metabolitos fermentativos e a incidência de AI.

Está bem documentado a relação entre o armazenamento de frutos em atmosferas com teores baixos de oxigênio e a produção de etanol e acetaldeído. No entanto, a produção destes metabolitos não é exclusiva de condições de baixo oxigênio [51]. Em peras *Bartlett*, Nanos *et al.* [52] determinaram que o etanol e o acetaldeído aumentam com os processos de senescência, ao longo do período de armazenamento, mesmo em condições de AN. Chervin *et al.* [53] obteve a mesma conclusão ao analisar maçãs *Packham's Triumph*. A equipa de Chervin verificou ainda que, quando os frutos são expostos em condições *shelf-life*, a produção de etanol é potenciada em frutas anteriormente armazenadas em AN, e que diminuía em frutas armazenadas em atmosferas de baixo oxigênio. Em relação ao acetaldeído, verificou-se um aumento da sua produção em condições *shelf-life*, quer para as peras armazenadas em AN, quer para as armazenadas em atmosferas de baixo oxigênio.

## **Etileno**

O etileno é um hidrocarboneto gasoso produzido pelo fruto, também conhecido como “hormona do amadurecimento”, e que também pode estar envolvido na defesa e nas adaptações a stresses ambientais. É responsável pelo desenvolvimento da cor e do sabor característico do fruto, acontecimentos típicos da fisiologia, da senescência e do amadurecimento do fruto. As concentrações mais elevadas de etileno podem ainda ser responsáveis por problemas na sua fisionomia, tais como o AI e ES. Assim, o controlo da produção e da concentração de etileno nas câmaras é bastante importante no tratamento pós-colheita, de forma a manter a qualidade durante o armazenamento, mesmo no de longa duração. [12], [54]–[56]

Esta hormona é ativa em concentrações na ordem dos *ppm*, e é produzida por processos metabólicos, com participação do oxigénio, sendo sensíveis a altas concentrações de dióxido de carbono. No amadurecimento de frutas climatéricas, o etileno promove a sua própria síntese. No início do amadurecimento, a concentração de etileno aumenta rapidamente para níveis de saturação, e por essa razão torna-se desnecessário a utilização de promotores externos. Além deste facto, a taxa de produção de etileno é muito superior à taxa da sua perda por difusão, o que faz com que a remoção de etileno da atmosfera exterior ao fruto através de ventoinhas, por exemplo, não tenha o efeito desejado. [57]

A ação do etileno pode ser bloqueada por compostos como o dióxido de carbono, utilizado em câmaras de armazenamento em AC; prata ou olefinas cíclicas insaturadas, sendo o composto mais utilizado o 1-metilciclopropeno (1-MCP). O 1-MCP é um antagonista não-competitivo do etileno, bloqueando os seus recetores no fruto, sendo homologado desde 2011 para aplicação em frio normal e em AC. Por ser um antagonista não-competitivo, o aumento da concentração de etileno não altera a ligação do 1-MCP ao recetor, tendo este uma afinidade de ligação ao recetor maior do que a do etileno. O 1-MCP foi a resposta para a proibição da utilização da difenilamina, um antioxidante forte utilizado para controlar o ES, o AI e outros acidentes fisiológicos. Apesar de continuar a ser utilizada noutras partes do mundo, a difenilamina foi proibida no espaço comunitário da UE por se verificar ter um carácter perigoso para o funcionamento dos glóbulos vermelhos no sangue. O 1-MCP consegue reduzir o ES resultante do armazenamento da pera em atmosferas com alto teor de oxigénio. No entanto, apresenta a desvantagem de poder potenciar problemas internos no fruto e de proporcionar um amadurecimento inadequado. Este facto pode ser contrariado com uma colheita mais tardia, ou seja, com a aplicação do produto em câmaras com frutos que apresentem, à colheita, uma firmeza de polpa inferior. [2], [12], [19], [20], [57], [58]

Zhou *et al.* [15] observaram que a utilização de 1-MCP reduz a incidência de ES e AI durante o armazenamento em AN e no período de *shelf-life*, inibindo o metabolismo de  $\alpha$ -farneseno e reduzindo a acumulação de trienos conjugados, que são resultado da sua oxidação.

Saquet e Almeida [9], ao analisarem a concentração de etileno na fruta sob diferentes tratamentos e ao longo de vários dias de armazenamento, verificaram que uso do 1-MCP atrasou o pico de produção de etileno e reduziu a sua intensidade em cerca de 60%.

A combinação do tratamento das peras com 1-MCP, aliado a um armazenamento em condições de AC, é capaz de reduzir de forma eficaz a produção de etileno no período *shelf-life*. Esta supressão é mais potente quanto menor for o teor de oxigénio nas câmaras de armazenamento, mas revela problemas fisiológicos internos adjacentes. [20], [59]

A eficácia dos inibidores de etileno está dependente do estado de maturação da fruta. Quanto mais madura estiver a fruta, mais recetores de etileno terá. Assim, a aplicação de inibidores de etileno, como o 1-MCP, num estado posterior de maturação, poderá levar a uma maior produção de etileno comparativamente a um tratamento nos estados iniciais de maturação. O tratamento com 1-MCP inibe a produção de compostos voláteis em peras armazenadas em AN e AC. [38]

As medições do etileno são tradicionalmente realizadas recorrendo a técnicas de GC-FID, apesar de carecerem de sensibilidade para detetar os limites de quantificação (LOD), sendo comum a necessidade de concentrar este composto volátil. A sua deteção por GC-MS revela-se difícil, uma vez que a massa molecular nominal do etileno coincide com a do nitrogénio [20], [37], [38], [56], [60], [61]

### **Ésteres e outros álcoois**

Os ésteres, juntamente com os aldeídos, são os principais contribuintes para o aroma das peras, independentemente das espécies e cultivares [36]. Wang *et al.* [62], num estudo com cinco cultivares, observou que os ésteres são a classe de compostos voláteis mais predominante, seguido dos álcoois e dos aldeídos. Liu *et al.* [63], num estudo com peras *Korla*, verificou que os compostos orgânicos mais abundantes foram os aldeídos, apesar de se ter detetado um número maior de ésteres, de concentrações baixas.

Os ésteres presentes nos compostos voláteis são formados através de reações de esterificação entre álcoois e acil coenzima-A, que é responsável pelo metabolismo de ácidos gordos e de aminoácidos, ou pela acetil coenzima-A (**Figura 7**). A produção do acetato de etilo, por exemplo, tem como precursores o etanol e a acetil coenzima-A. [44], [47], [64]

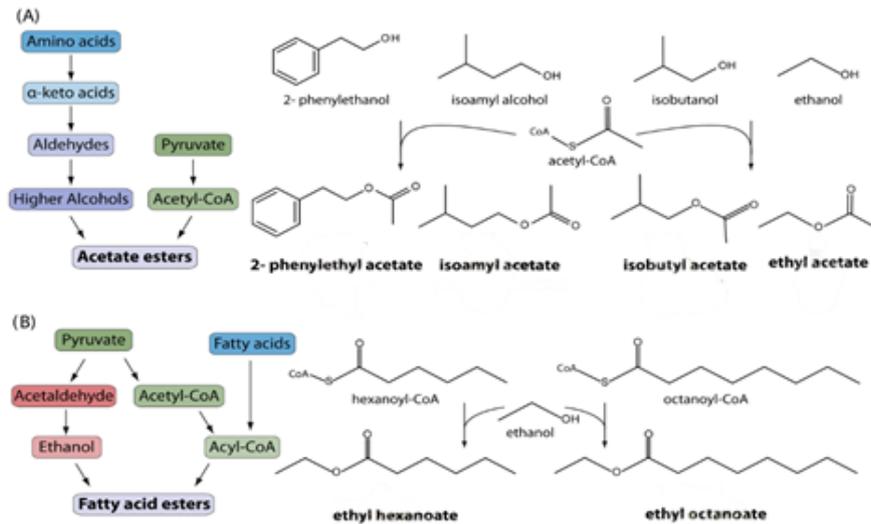


Figura 7 - Representação das vias metabólicas de produção de ésteres, tendo como precursores álcoois e acetyl coenzima-A (A) e etanol e acil coenzima-A (B). Adaptado de [44].

Representado na **Figura 7** estão duas diferentes vias metabólicas para a produção de ésteres. A segunda forma (B) tem como precursores o etanol e os ácidos gordos, que na sua metabolização foram conjugados com a acil coenzima-A, cuja atividade aumenta durante a maturação. A via metabólica que origina este tipo de ésteres em peras é denominada como oxidação- $\beta$ , e tem como base a remoção de unidades  $C_2$  (acetyl CoA) do ácido gordo precursor. Os ésteres resultantes aparecem sob a forma de um éster etílico, caracterizado por uma terminação etil ligada ao oxigénio (**Figura 8**). É por esta via que se forma o hexanoato de etilo, por exemplo. A primeira (A) forma os acetatos, tendo como recurso a acetyl coenzima-A, proveniente da via aeróbica da transformação do piruvato, e álcoois resultantes da desaminação, descarboxilação e redução de aminoácidos (**Figura 9**). Alguns exemplos destes álcoois são, por exemplo, o 1-propanol, o 1-butanol e o isobutanol. A reação de esterificação entre os álcoois e a acetyl coenzima-A leva à formação de acetatos, como é o caso do acetato de etilo e o acetato de hexilo. [16], [44], [65], [66]

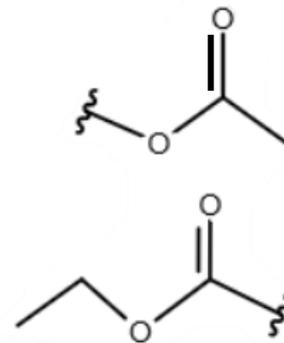


Figura 8 - Representação de diferentes tipos de ésteres: *acetato* (em cima) e *éster etílico* (em baixo).

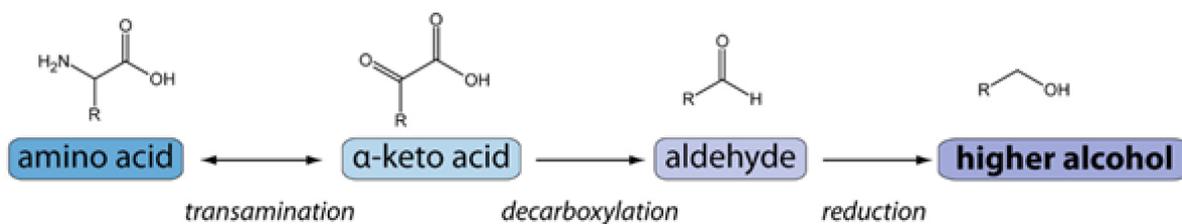


Figura 9 - Reação genérica de metabolização de aminoácidos a álcoois. Adaptado de [44].

Em peras *Pingxiangli* [64] e *La France* [8], a concentração de ésteres, com especial foco no acetato de etilo, no acetato de propilo e no acetato de hexilo, aumenta ao longo do período de conservação e é inibida em fruta tratada com 1-MCP.

O facto de os tratamentos com inibidores de etileno inibirem a produção de ésteres está amplamente verificado. Nas peras *Ruanerli* [61], o número de compostos voláteis aumenta com a aplicação de 1-MCP mas as suas concentrações são menores, especialmente as de ésteres, em comparação com frutas sem tratamento de 1-MCP e sem armazenamento em frio. Também no trabalho de Hendges *et al.* [38], foi verificado que uso de 1-MCP em atmosferas controladas reduz significativamente a produção de ésteres em peras *Conference*. Já num trabalho com a pera *Nanguo* [67], observou-se que o uso de 1-MCP afetou significativamente as concentrações de alguns ésteres e aldeídos, como o acetato de etilo. O tratamento, apesar de ter aumentado a concentração de alguns ésteres, diminui a concentração total deste grupo de compostos orgânicos.

Verificou-se que, na variedade *Bartlett* [39], as peras armazenadas em atmosferas ULO a -1 °C produzem menor quantidade de compostos voláteis, nomeadamente ésteres e álcoois, do que as que são armazenadas na mesma atmosfera, a 1 °C.

No trabalho de Gomes *et al.* [40], acerca da análise qualitativa dos compostos voláteis em pera *Rocha* cortadas e embaladas em bolsas de polietileno de baixa densidade, verificou-se que os acetatos representavam cerca de 20 a 25% do total de compostos voláteis, onde o acetato de butilo corresponde a cerca de metade do total deste grupo, logo seguido do acetato de etilo. A concentração deste grupo de compostos orgânicos foi mais elevada em atmosferas com baixo teor de oxigénio, sendo que o maior responsável por isso foi o aumento da concentração de acetato de etilo.

A pera *Blanquilla* revelou diferenças significativas na produção de compostos voláteis dependendo de o amadurecimento ter sido feito ou não na árvore. Em peras armazenadas durante 6 dias, a 20 °C e com humidade relativa de 85%, o acetato de hexilo revelou ser o composto volátil mais concentrado, seguido pelo acetato de butilo. No amadurecimento feito na árvore, o composto mais concentrado foi o hexanal até ao 25º dia, sendo também neste período que os acetatos anteriores se começaram a tornar mais recorrentes. [60]

## 2.2. Metodologias Analíticas

### 2.2.1. Cromatografia

A descoberta da cromatografia é atribuída a M. S. Tswett, em 1903, ao interpretar uma adsorção de pigmentos de cloroplastos em mais de 100 fases polares sólidas numa coluna vertical de vidro, num processo semelhante ao que é hoje chamado por cromatografia de adsorção em coluna. [68]

Nos anos seguintes, a cromatografia foi bastante desenvolvida, tendo sido publicados, em 1938, trabalhos relativos à cromatografia em camada fina. [69]

A IUPAC (International Union for Pure and Applied Chemistry – em português, União Internacional de Química Pura e Aplicada) é a autoridade mundial na nomenclatura e terminologias químicas, bem como na padronização de métodos de medição. A cromatografia, segundo a definição da IUPAC, é “um método físico de separação, no qual os componentes a ser separados estão distribuídos em duas fases, uma estacionária e a outra móvel numa determinada direção.” [70]

Além de ter a função de separar os diferentes analitos, em certas técnicas de cromatografia é possível identificá-los com recurso a comparações de análises realizadas anteriormente, cujos resultados estão presentes em bases de dados, e quantificá-los com recurso a calibradores. Estas técnicas baseiam-se no transporte dos componentes de uma mistura através de uma fase estacionária por uma fase móvel. A separação cromatográfica dá-se pela diferença de afinidades dos componentes entre a fase estacionária e a fase móvel (eluente). O analito deve ser solúvel na fase móvel e capaz de interagir com a fase estacionária. Se um dado composto tem uma maior afinidade com a fase estacionária do que com o eluente, o seu tempo de retenção será maior, enquanto que se a sua afinidade for maior para o eluente, o tempo de retenção será menor. [71]

O resultado da separação é representado num cromatograma, em que as posições dos picos (correspondentes a determinados tempos de retenção) são utilizadas para identificar o componente, e as áreas dos picos permitem uma análise quantitativa a partir da utilização de calibradores de concentração conhecida. [71]

## 2.2.2. Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa foi introduzida em 1941 por Martin e Synge, tendo-lhes sido atribuído, em 1952, o Prémio Nobel pelo seu trabalho centrado na cromatografia de partição líquido-líquido. Na década de 50', a cromatografia gasosa evidenciou bastantes e significativos desenvolvimentos, tais como a introdução de vários tipos de detetores, por exemplo. Neste tipo de cromatografia, a fase móvel é chamada de *gás de transporte* ou *de arraste*. Este gás tem a função de transportar continuamente os analitos pela coluna, e deve ser quimicamente inerte (de forma a não reagir com os analitos) e puro (com o intuito de não introduzir impurezas que possam modificar a análise), e normalmente são usados o hélio, o hidrogénio e o nitrogénio, sendo o primeiro o mais comumente utilizado. [72], [73]

Nesta técnica, a amostra é injetada numa válvula de injeção, ou *injetor*. Por ação do gás de transporte, a amostra é levada através da coluna, onde há a separação dos analitos, sendo depois detetados (**Figura 10**). [74]

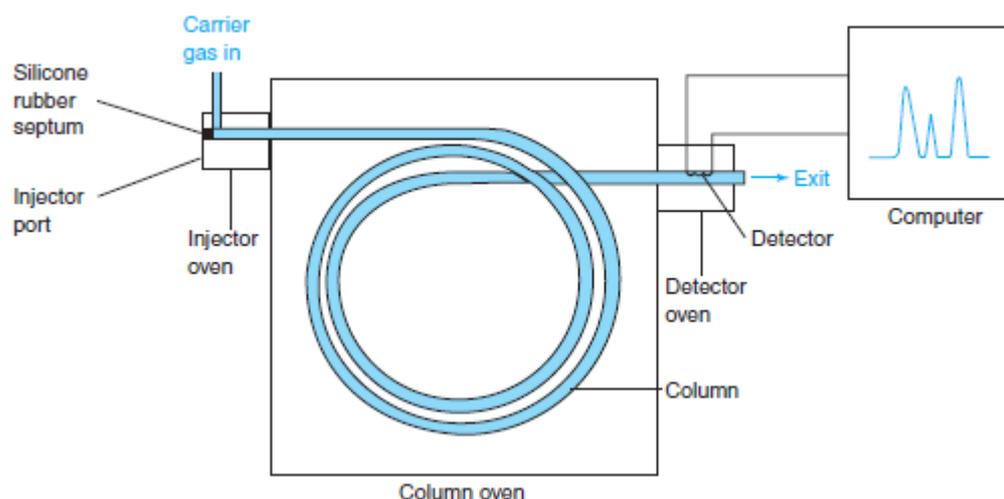


Figura 10 - Representação esquemática dos diferentes constituintes de um cromatógrafo gasoso. Obtido de [74].

O injetor é usado para vaporizar a amostra, quando líquida, devendo a sua temperatura estar 50 °C acima da temperatura de ebulição do componente menos volátil presente na amostra. Existem três modos de injeção: *split injection*, *splitless injection* e *on-column injection*. [74]

A *split injection* é usada quando a amostra está concentrada no analito de interesse. Neste modo de injeção, a temperatura do injetor é alta e apenas cerca de 2% da amostra chega à coluna, sendo a restante desprezada. Esta proporção de amostra que é rejeitada, chamada de *split ratio*, está situada normalmente entre 50:1 e 500:1. As análises quantitativas neste modo de injeção podem não ser muito fiáveis, uma vez que o *split ratio* pode variar entre análises. [73], [74]

A *splitless injection* é usada quando o analito representa menos de 0,01% da amostra. A temperatura do injetor já não é tão elevada como no modo de injeção anterior, mas apresenta um tempo de residência maior. [74]

A *on-column injection* é usada para compostos que se decompõem acima dos seus pontos de ebulição. É considerada a técnica mais precisa. [73], [74]

Na coluna é onde os diferentes analitos são separados, eluindo em momentos diferentes com base na afinidade com a fase estacionária. As colunas podem ser *capilares*, que contém uma camada fina de fase estacionária, podendo esta ser um sólido adsorvente ou um líquido viscoso e não volátil, ou *packed*, estando quase completamente preenchidas com fase estacionária. As análises realizadas com colunas capilares têm uma maior resolução, maior rapidez e sensibilidade do que as *packed columns* tendo, no entanto, menores capacidades de amostra. Se a fase estacionária for líquida, a coluna deve ser selecionada de acordo com a polaridade dos compostos a separar, sendo que a separação ocorre por diferenças de partição. Se, por outro lado, a fase estacionária for sólida, deverá ser constituída por granulados finos de forma a existir uma elevada área superficial. Nestes casos, recorre-se normalmente a polímeros porosos ou a sólidos inorgânicos, sendo a separação resultado de diferentes processos reversíveis de adsorção. O uso de fases estacionárias sólidas requer uma temperatura da coluna superior ao ponto de ebulição dos analitos, sendo favorável para a separação de gases. Por outro lado, se a fase estacionária for líquida, a temperatura da coluna pode ser inferior ao ponto de ebulição dos analitos, o que revela uma vantagem se se pretende separar compostos orgânicos pouco voláteis. [72]–[74]

A escolha da temperatura da análise revela-se de grande importância, uma vez que dela depende uma boa separação dos analitos, com uma boa resolução, ao aumentar a pressão de vapor e diminuir os tempos de retenção. O aquecimento pode ser feito de modo isotérmico, onde a temperatura é constante, sendo este o modo mais indicado para compostos com polaridade, retenção e volatilidade semelhante. Para compostos com diferentes polaridades e/ou volatilidades muito diferentes, existindo uma relação entre a retenção e a temperatura, o modo de aquecimento mais adequado é em rampa. Neste caso, há a necessidade de estabilização de temperatura entre análises. Uma vez que o ar é pouco condutor de calor, todos os fornos dos cromatógrafos gasosos são equipados com uma ventoinha, de forma a garantir a circulação do ar e a uniformização da temperatura. [73]

O detetor, parte integrante do cromatógrafo, é o dispositivo que lê a informação acerca dos solutos que saem da coluna. Idealmente, deve obedecer a algumas características, tais como ter uma boa sensibilidade, reprodutibilidade e estabilidade. Entre os detetores mais comuns destacam-se o *detetor de ionização de chama* (FID), o *detetor de condutividade térmica* (TCD), o *detetor de captura eletrónica* (ECD) e a *espetrometria de massa* (MS). Toda a parte experimental foi realizada com MS e FID, pelo que apenas estes dois detetores serão explorados no meu modo de funcionamento.

### ***Deteção por Ionização de Chama (FID)***

O **FID**, introduzido em 1958, é um detetor robusto, versátil, que permite obter limites de deteção baixos e que não necessita de muita manutenção. [73]

Esta técnica utiliza uma chama de H<sub>2</sub>/ar, pela qual passa a amostra, oxidando moléculas orgânicas e produzindo partículas eletricamente carregadas (iões), desencadeando um sinal elétrico que é então medido. O efluente da coluna é misturado com H<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, sendo depois queimado. Como numa chama de H<sub>2</sub>+O<sub>2</sub> não existem iões, não há condução de corrente elétrica.



Quando um composto orgânico é queimado, são formados iões. O movimento dos iões é medido como corrente elétrica entre dois eléctrodos, estando um colocado na base da chama e outro por cima da mesma (**Figura 11**). [73]

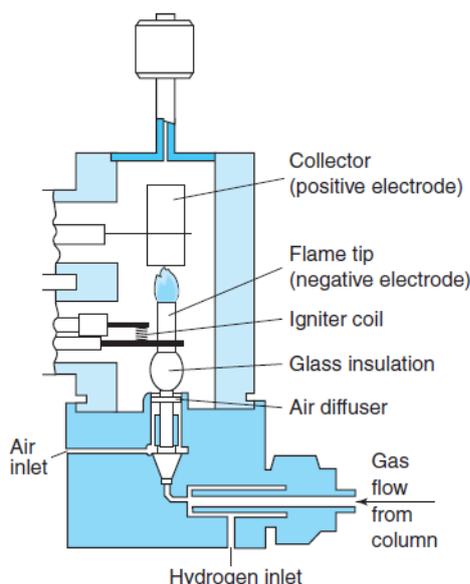


Figura 11 - Representação esquemática de um detetor FID. Obtido de [74].

Este tipo de deteção apresenta como vantagem exibir uma grande sensibilidade, sendo uma desvantagem o facto de ser uma técnica destrutiva. Para além disso, moléculas como o monóxido de carbono, dióxido de carbono e o formaldeído, por exemplo, em que os seus átomos de carbono não são convertidos em metano sob as condições do FID, não são detetáveis por esta técnica. [73]

### **Deteção por Espectrometria de Massa (MS)**

A **MS** é uma técnica destrutiva, que produz e analisa iões das moléculas de analito pelas suas massas. É uma técnica bastante utilizada para a análise qualitativa e na quantificação de compostos. Existem várias variantes associadas à espectrometria de massa. Na mais utilizada, a de *electron impact ionization* (**EI**), as moléculas de analito são convertidas em iões positivos através do impacto de eletrões, sendo depois separados consoante o seu rácio massa/carga, (*m/z*), pela aplicação de um

campo magnético. Uma vez que os iões não podem chocar ou fragmentar-se, a pressão num MS é muito reduzida, sendo também necessária para remover o gás de arraste. De seguida, um transdutor converte a abundância de iões num sinal eléctrico (**Figura 12**). No final da análise, esta técnica produz uma representação gráfica da abundância em função do rácio ( $m/z$ ) dos iões, ou seja, um espectro de massa, que é depois comparado com bibliotecas que contêm espectros de moléculas conhecidas, de forma a identificar o composto que originou um determinado espectro. [72], [74]–[76]

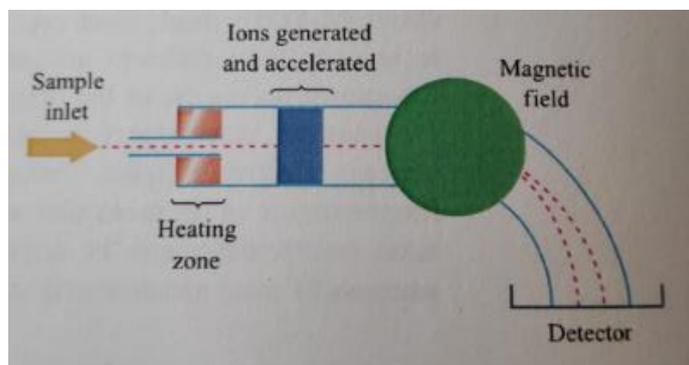


Figura 12 - Representação esquemática de um detetor MS do tipo EI. Retirado de [76].

A técnica cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC-MS) é uma combinação de duas técnicas analíticas. Utilizando apenas a técnica de MS para analisar uma amostra com vários constituintes, o espectro de massa será confuso uma vez que os espectros dos diferentes compostos vão estar ininterruptos. Analisando a mesma amostra, agora apenas por GC, a identificação dos compostos é apenas baseada nos tempos de retenção de compostos conhecidos, o que pode levar a alguma falta de clareza. Assim, quando acopladas estas duas técnicas, o GC tem a função de separar os componentes, enquanto a sua identificação é realizada com base na informação proveniente do MS. A soma de todos os picos obtidos no espectro de massa origina o cromatograma. Para cada análise, podem definir-se os modos *full scan* ou *SIM (Select Ion Monitoring)*. No primeiro modo, o MS cobre uma gama extensa de rácio  $m/z$ , enquanto no segundo é possível restringir a gama para os valores de interesse. [77]

## 2.3. Zeólitos

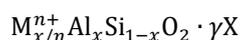
Num trabalho realizado anteriormente no RochaCenter, do qual este é a continuação ([18]), tentou-se extrair diretamente o ar das câmaras de conservação das peras *Rocha*. No entanto, verificou-se que não foi possível detetar nem identificar qualquer composto para além da água e dos componentes do ar. Uma vez que concentração dos compostos aromáticos é normalmente muito reduzida, na gama dos *ppm* ou *ppb*, é recorrente, para cumprir os limites de deteção analítica, concentrar os compostos voláteis antes da análise. [78]

A metodologia mais utilizada atualmente para extração e concentração dos compostos voláteis, neste tipo de estudos, é a microextração em fase sólida por *headspace* (*head space solid phase microextraction*, HS-SPME). O dispositivo usado nesta técnica é composto por uma fibra de sílica revestida por um polímero, que é inserida numa microsseringa modificada. Esta fibra é responsável pela adsorção dos compostos voláteis de uma dada amostra e, de seguida, é geralmente inserida num sistema GC-MS para a identificação e quantificação dos compostos. Esta técnica é bastante utilizada devido à sua rapidez, sensibilidade e por não ser necessário recorrer a solventes de extração. No entanto, apresenta algumas desvantagens, tais como a pouca repetibilidade de ensaios. [45], [78]

Um outro sistema já utilizado para a adsorção de VOCs é o MonoTrap, cuja estrutura consiste em sílica pura e/ou sílica com carvão ativado ou grafite para fornecer uma maior área superficial. Esta técnica dispõe de uma maior área superficial e maior sensibilidade do que a técnica de HS-SPME. [79]

Estes equipamentos não estavam disponíveis no RochaCenter e, por isso, recorreu-se à alternativa de usar adsorventes para a extração e concentração dos compostos voláteis. No trabalho anterior, foram utilizados três tipos diferentes de carvão ativado e um zeólito 5-A, em *pellets*.

Os zeólitos são materiais microporosos (que, segundo a definição da IUPAC, contêm poros que não excedem os 2 nm), cristalinos e inorgânicos, surgindo tetraedricamente sob a forma de  $TO_4$ , sendo T um átomo de, por exemplo, Si ou Al. Geralmente, a maioria das redes de zeólitos são constituídas por conexões entre  $[SiO_4]$  e  $[AlO_4]$ . Esta carga negativa é compensada com catiões, como o  $Na^+$  e o  $Ca^{2+}$ , localizados no interior de cavidades relativamente largas dentro da estrutura, podendo ser penetradas por moléculas suficientemente pequenas, produzindo um efeito de “molecular sieving”. O rácio Si/Al é sempre superior a 1, visto que as ligações Al – O – Al não são observadas nestes compostos. Assim, a fórmula empírica dos zeólitos é



onde  $x$  tem valores entre 0 e 0.5,  $M^{n+}$  é o catião e X uma molécula neutra, como a água, que pode estar presente dentro dos microporos. Os zeólitos podem ser hidrofóbicos, se tiverem um alto teor em sílica (Si/Al elevado) uma vez que haverá predominância das ligações Si – O – Si, ou hidrofílicos, se tiverem baixos teores de sílica. Um rácio de Si/Al elevado também favorece a estabilidade térmica. [70], [80]–[82]

Os zeólitos podem ser sintéticos, de pureza extremamente elevada e com composição e dimensões de poros bem definidos, ou originados de forma natural durante fenômenos de atividade vulcânica, por exemplo. Devido às suas características, estes materiais são muito atrativos atualmente, nomeadamente pela sua estabilidade térmica, elevada área superficial e seletividade, possuindo acidez intrínseca, e sínteses simples e de baixo custo. A sua gama de aplicações abrange processos industriais, nomeadamente em adsorção, catálise e troca iónica, uma vez que os catiões são permutáveis. A título do exemplo, e para além da sua utilização comum em catálise nas indústrias petrolíferas em processos oxidativos e de “cracking”, são fundamentais para o ramo da química verde na descontaminação de agentes industriais por minimizarem o recurso a solventes orgânicos, que geralmente trazem um grau de toxicidade associado. Dada a sua capacidade em trocar iões, os zeólitos também são utilizados no tratamento de águas “duras” (com alto teor em magnésio e cálcio). [80], [81], [83], [84]

Estes materiais, cuja origem etimológica da sua designação provém do grego, derivada das palavras “zeo” e “lithos” que, de uma forma literal, significa “pedra que ferve”. Esta designação foi originada quando, em 1756, o mineralogista sueco Axel Cronstedt, ao sujeitar um dado mineral ao calor, observou que era libertado vapor e que esse mineral parecia estar em ebulição, dada a rápida evaporação de água. Mais tarde, em 1862, o químico francês Henri Sainte-Claire Deville tentou sintetizar zeólitos num laboratório, sendo que o marco mais importante se deu na década de 1950 quando começaram a ser produzidos industrialmente por Milton e Breck, da empresa Union Carbide, por processos ainda hoje comumente utilizados. [85], [86]

A síntese de zeólitos pode ser direcionada para a obtenção de estruturas com formas e dimensões específicas, com elevada homogeneidade, de forma a ultrapassar as limitações apresentadas pela microporosidade, aumentando consideravelmente a acessibilidade aos microporos e criando canais mesoporosos de acesso, aumentando a atividade catalítica. Os zeólitos sintéticos mais comuns são os do tipo A, X, Y e ZSM-5. [86], [87]

É possível classificar os zeólitos conforme as suas estruturas e tamanhos. Tendo como unidade primária a rede tetraédrica, pode-se considerar unidades secundárias (*secondary building units* ou SBU), sendo elas uma combinação de tetraedros. Estas SBU organizam-se para formar os poros e canais, concebendo as características estruturais de um dado tipo de zeólito. Estes materiais podem ser classificados quanto ao tamanho dos poros ou canais através do número de átomos que os constituem (**Figura 13**): [80], [88]–[90]

- Zeólito de poros pequenos, com aberturas compostas por, pelo menos, 8 átomos de Si ou Al, e diâmetro médio entre 0,30 e 0,45 nm;
- Zeólito de poros médios, com aberturas compostas por 8 a 10 átomos de Si ou Al, e diâmetro médio entre 0,45 e 0,60 nm;
- Zeólito de poros largos, com aberturas compostas por 10 a 12 átomos de Si ou Al, e diâmetro entre 0,60 e 0,80 nm;

- Zeólitos de poros extra-largos, com aberturas compostas por mais de 14 átomos de Si ou Al, e diâmetros maiores do que 0,80 nm.

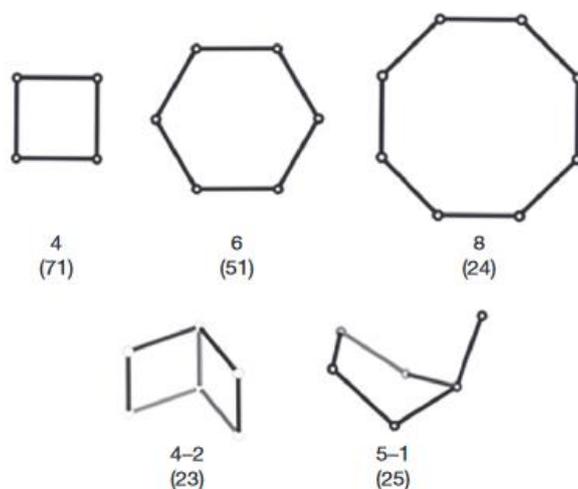


Figura 13 - Tipos de SBUs, seus símbolos e número de ocorrências em estruturas já identificadas, entre parênteses. Adaptado de [88].

Estes canais e aberturas agregam-se depois para formar estruturas cristalinas específicas, que seguem um determinado padrão. A Comissão de Estruturas da IZA (*International Zeolite Association*), atualiza regularmente na sua página da internet o número de estruturas já identificadas. À data deste documento, já se conhecem mais de 250 tipos de estruturas, específicas de cada tipo de zeólito. Para designar mais facilmente as estruturas zeolíticas, a Comissão definiu um código simples composto por apenas 3 letras maiúsculas. A título de exemplo, o código para designar uma mordenite é MOR. [88], [91]

Os zeólitos utilizados no trabalho foram dois NaY, produzidos em empresas diferentes, o 5-A e o CBV 10-A.

O zeólito **NaY** é um zeólito do tipo Y que, conjuntamente com o zeólito do tipo X, pertence à família das faujasites (FAU). Esta estrutura, cúbica ( $a \approx 0,243$  nm), é formada por poros tridimensionais e perpendiculares entre si com diâmetros que variam em torno dos 0,74 nm, e por uma abertura formada por um conjunto de 12 átomos associados a uma estrutura anelada (**Figura 14**). A sua forma estrutural é  $[(Ca,Mg,Na_2)_{29} (H_2O)_{240}] [Al_{58}Si_{134}O_{384}]$ , sendo que, aplicado ao caso, quando se refere a NaY considera-se um zeólito do tipo Y com catião de sódio. Dadas as suas propriedades estruturais, como uma baixa densidade (12,7 átomos de Si ou Al por 1000 Å<sup>3</sup>) e cerca de 50% de volume não-ocupado, fazem com que os zeólitos com estrutura FAU sejam termicamente estáveis, o que é ideal para muitas aplicações catalíticas. [88], [89]

Os zeólitos Y distinguem-se dos zeólitos X através do rácio de Si/Al, tal que os zeólitos Y apresentam valores de Si/Al superiores a 1,5, enquanto os zeólitos X possuem valores entre 1 e 1,5 (mais catiónicos, ou seja, com maior abundância de alumínio). [92], [93]

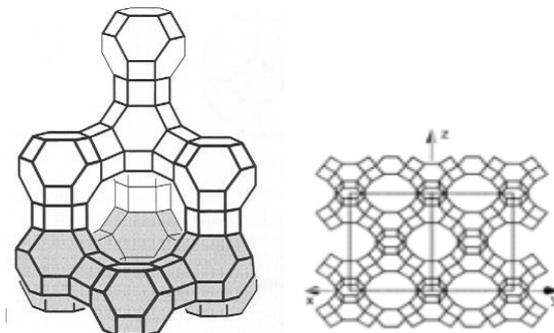


Figura 14 - Estrutura de uma faujasita (FAU). Adaptado de [88] e de [89].

A remoção de silício de zeólitos Y após síntese foi primeiramente patenteada em 1967 pelo químico Dean Arthur Young. Young aclamou que, após um tratamento alcalino, os zeólitos demonstraram um grande aumento na capacidade de adsorção de moléculas de benzeno, conservando o grau de cristalinidade inicial, especulando que o efeito se deveria a um melhor acesso aos centros microporosos do zeólito. [94]

Só em 2000 é que este fenómeno foi inteiramente compreendido com a contribuição do trabalho dos grupos de investigação de Matsukata e Groen, que evidenciaram a alteração da porosidade dos zeólitos ZSM-5 e MFI através da dessilicação, estabelecendo pela primeira vez condições ideais para o processo, definindo que a acidez destes zeólitos permaneceria inalterada assim como a área superficial e a dimensão dos microporos, ao mesmo tempo que a atividade catalítica e capacidade de difusão, comparativamente aos zeólitos iniciais estritamente microporosos seria consideravelmente elevada. Concluiu-se que, de facto, o processo seria essencialmente responsável pela inserção de mesoporosidade nos zeólitos por remoção de átomos de silício. [95], [96]

O zeólito Y é usado essencialmente no *cracking* catalítico na indústria petrolífera, sendo também utilizado para aumentar o rendimento de gasolina e gasóleo. Para além destas aplicações, é usado também na remoção de álcool em cervejas, na preparação de insulina e na separação de fases gasosas ou líquidas, incluindo em membranas. [82]

Zhao *et al.* [97], realizou um estudo sobre a capacidade de remoção de compostos voláteis de diferentes adsorventes. Neste, modificaram um zeólito NaY (Si/Al=2.45) para obter um zeólito hidrofóbico (Si/Al=300), e analisaram a sua capacidade de adsorção de vários compostos, como o benzeno, o hexano e água. Foi concluído que zeólitos hidrofóbicos revelaram boas capacidades de remoção de compostos voláteis em concentrações baixas e com humidade elevada.

Também com o objetivo de reduzir a acumulação de etileno durante o período de armazenamento de frutos, Patdhanagul *et al.* [98] estudaram a adsorção deste composto pelo zeólito NaY. No seu trabalho, não só avaliaram a capacidade de adsorção de etileno pelo NaY, mas também por modificações deste zeólito com recurso a soluções de surfactantes catiónicos, com concentrações entre os 0,1 e 3,0 mM. Foi observado que o zeólito NaY modificado com PTAB (C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>BrN) tem uma maior capacidade de adsorção do que o zeólito “não-modificado”, ambos com um rácio Si/Al perto de 2, e que quando usada uma concentração de 0,5 mM de PTAB, conseguiu-se aumentar a capacidade de adsorção de 85,55 para 111,19 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>.

A capacidade de adsorção dos zeólitos pode aumentar ou diminuir consoante o metal que contrabalança a carga negativa da estrutura zeolítica. A adsorção de alguns compostos voláteis pode ser facilitada devido às interações fortes entre o catião metálico e as moléculas voláteis, mas também pode ser dificultada pela redução da área superficial e pela obstrução dos poros do zeólito [99]. O grupo de Sue-aok *et al.*[100], estudou a capacidade de adsorção de etileno em zeólitos NaY modificados com diferentes metais alcalinos (K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> e Cs<sup>+</sup>). Neste estudo, observaram que a capacidade de adsorção máxima foi conseguida quando o zeólito NaY foi modificado com 5 mM de KNO<sub>3</sub>, 102,45 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>, e que todas as modificações adsorvem melhor etileno do que o zeólito “não-modificado”. No entanto, devido ao bloqueio do centro de ligação entre o oxigénio do adsorvente e o hidrogénio do etileno, a capacidade de adsorção diminui com o aumento do tamanho do metal introduzido.

Num estudo de Kim *et al.* [101], foi realizada uma comparação da adsorção de compostos voláteis, não só aromáticos como o benzeno e tolueno, mas também etanol e iso-propanol, entre diferentes zeólitos. Foi verificado que as faujasites, entre os quais um NaY, demonstrou uma maior capacidade de adsorção para todos os compostos do que mordenites, devido ao maior tamanho dos seus canais. Num outro estudo de Lv *et al.* [102], também foi observado que o zeólito NaY exibe uma boa capacidade de adsorção de tolueno em ambientes secos, enquanto em ambientes húmidos existe uma adsorção competitiva com a água.

A partir de simulações computacionais, Hessou *et al.* [103] avaliaram a capacidade de adsorção de variados compostos, como o formaldeído, acetaldeído, propanal, acetona e 2-propanol por um zeólito NaY. Dos compostos avaliados, determinou-se que o metano será o composto com menor intensidade de adsorção, avaliada pela energia de interação, medida em kJ/mol. Determinou-se também que todos os aldeídos enunciados anteriormente serão adsorvidos de forma intensa, sendo que a energia de interação aumenta com o número de carbonos do aldeído. A acetona e o 2-propanol são adsorvidos com energias de interação semelhantes à do propanal.

O zeólito **CBV 10-A** utilizado tem um rácio Si/Al de 7, com estrutura cristalina de uma mordenite (MOR). Esta estrutura contém dois tipos de canais interligados: um, constituído por um anel de 12 átomos, tendo diâmetros de 0,65 e 0,70 nm, e um outro anel, de dimensões mais reduzidas, constituído por 8 átomos, tendo diâmetro que oscila entre os 0.26 e 0.57 nm (**Figura 15**). A sua forma estrutural é [Na<sub>8</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>24</sub>] [Al<sub>8</sub>Si<sub>40</sub>O<sub>96</sub>] e tem rácios Si/Al comuns entre 5 e 20. [88], [93]

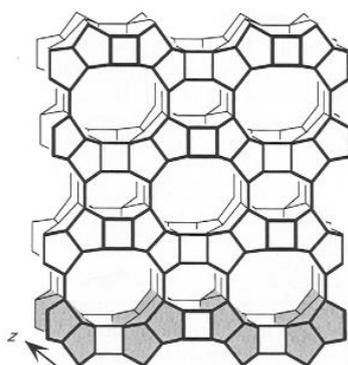


Figura 15 - Estrutura de uma mordenite. Retirado de [89].

O zeólito **5-A** é um zeólito do tipo A, com o código de estrutura cristalina LTA. Esta estrutura cúbica ( $a \approx 1.19$  nm) contém um canal constituído por um anel de 8 átomos, tendo diâmetro de 0,41 nm (**Figura 16**). A sua forma estrutural é  $[\text{Na}_{12}(\text{H}_2\text{O})_{27}]_8[\text{Al}_{12}\text{Si}_{12}\text{O}_{48}]$  e tem rácios Si/Al comuns entre 1 e 3. Por ser uma das estruturas mais abertas, com uma densidade de 12,9 átomos de Si ou Al por  $1000 \text{ \AA}^3$ , é frequentemente utilizado para remover a humidade nos trabalhos laboratoriais, entre vidros em janelas duplas, e para trocas iónicas em detergentes. Para além destas aplicações, os zeólitos do tipo A são também usados em membranas para a desidratação de etanol. [82], [88], [89], [93]

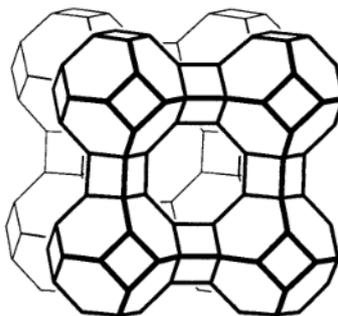


Figura 16 - Estrutura cristalina do tipo LTA.

Num estudo de Gong *et al.* [104], foi determinado que o zeólito 5-A tem uma capacidade de adsorção de butanona menor do que o zeólito 13X. Neste estudo, o zeólito 5-A revelou uma capacidade de adsorção maior para compostos aromáticos, como o etilbenzeno.

A capacidade de adsorção de etileno é potenciada se o zeólito contiver na sua estrutura  $\text{Ag}^+$ , devido à sua interação forte com a dupla ligação na molécula de etileno [99]. Num estudo da equipa de Cisneros [105], foi verificado, pela introdução de prata na estrutura zeolítica do adsorvente 5-A, uma capacidade de adsorção de etileno superior em cerca de 17 vezes face ao zeólito sem modificação. Verificou-se também que a modificação Ag-5-A teria uma melhor capacidade de adsorção de etileno

do que utilizando modificações de outros zeólitos referidos anteriormente, nomeadamente Ag-Y e Ag-MOR, sob a forma de Ag-5A>Ag-MOR>Ag-Y.

Da mesma forma, a presença de prata na estrutura do zeólito, juntamente com um óxido de um metal de transição, potencia a adsorção de outros compostos voláteis, para além do etileno. A presença de humidade elevada não favorece a adsorção de compostos voláteis devido à possível adsorção de água, inibindo a possível adsorção de outros compostos. [99]

### 3. Metodologia Experimental

#### 3.1. Amostras

As peras *Rocha* utilizadas neste trabalho experimental são referentes ao final do período de armazenamento da campanha de 2020-2021 (colheita em agosto de 2020), e ao início do armazenamento da campanha de 2021/2022 (colheita em agosto de 2021). As peras, nas duas campanhas, são provenientes de três pomares da zona Oeste.

Para as análises com vista à caracterização físico-química dos frutos, foram utilizadas três amostras de 20 frutos, correspondendo a cada um dos três pomares.

Os frutos foram armazenados nas câmaras de conservação à escala piloto, no RochaCenter. No decorrer deste trabalho experimental, foram analisados os compostos voláteis produzidos pelas peras presentes nas câmaras 7 (AC+1-MCP), 8 (ULO), 9 (AN) e 10 (AC) (**Tabela I**), relativas à colheita de 2020-2021, e às câmaras 6 (AC+1-MCP), 7 (ULO), 8 (AN) e 9 (AC) (**Tabela II**) na colheita de 2021-2022.

Tabela I - Condições de armazenamento das diferentes câmaras relativas à colheita de 2020-2021.

Variáveis	Câmaras			
	7	8	9	10
T (°C)	-0,50	-0,50	-0,50	-0,50
O <sub>2</sub> (%)	4,00	0,50	20,80	2,50
CO <sub>2</sub> (%)	0,50	0,50	0,03	0,50
1-MCP (ppb)	312,00	-	-	-

Tabela II - Condições de armazenamento das diferentes câmaras relativas à colheita de 2021-2022.

Variáveis	Câmaras			
	6	7	8	9
T (°C)	-0,50	-0,50	-0,50	-0,50
O <sub>2</sub> (%)	4,00	0,50	20,80	2,50
CO <sub>2</sub> (%)	0,50	0,50	0,03	0,50
1-MCP (ppb)	312,00	-	-	-

É relevante referir que, devido ao protocolo de aplicação do *SmartFresh*<sup>TM</sup> (nome comercial do 1-MCP), existe a necessidade das câmaras onde foi aplicado o tratamento permanecerem, após a aplicação que é feita até sete dias após a colheita, 60 dias em atmosfera normal. Assim, durante o período de análise à campanha de 2021-2022, a câmara 6 esteve sob as mesmas condições atmosféricas que a câmara 8, excetuando a aplicação de 1-MCP.

### 3.2. Caracterização físico-química dos frutos

A pera *Rocha* pode ser caracterizada ao longo do tempo através de avaliações da firmeza da polpa, da cor da epiderme, do índice refratométrico, da acidez total e, na altura da colheita, pela taxa de regressão de amido e pelo índice de Streiff. [11], [12]

A firmeza da polpa é uma medida do estado de maturação do fruto, avaliada utilizando um penetrómetro em dois pontos diametralmente opostos na zona equatorial do fruto, numa zona da pera onde foi retirada a epiderme. Os resultados, expressos em  $\text{kg}/0.5 \text{ cm}^2$ , refletem a firmeza da polpa e dependem da data de colheita, das condições atmosféricas do ano e dos tratamentos utilizados. [11], [12]

A avaliação da taxa de regressão do amido (TRA) baseia-se no facto de que, ao longo da maturação fisiológica, o amido dos frutos é transformado em açúcar, sendo por isso uma outra medida para avaliar o seu estado de maturação. Este teste é feito emergindo os frutos, cortados horizontalmente, numa solução de iodo e posteriormente comparada com uma tabela previamente elaborada (**Figura 17**). [11], [12]

A caracterização físico-química básica dos frutos é completada com a análise da acidez volátil total, através de titulação, e do índice refratométrico (IR), que mede a quantidade de açúcares presentes no fruto utilizando um refratómetro. [11], [12]

O índice de Streiff é um parâmetro que tem em conta vários outros parâmetros descritos anteriormente, sendo o quociente entre a firmeza da polpa e o produto da taxa de regressão do amido pelo valor dado pelo índice refratométrico. [11], [12]

Avaliações do calibre e da massa do fruto também são realizadas, com recurso a um paquímetro e a uma balança semi-analítica. [11], [12]



Figura 17 - Peras *Rocha*, RochaCenter.

### 3.3. Equipamento e Reagentes

Para a amostragem dos compostos voláteis produzidos pelos frutos nas diferentes câmaras de conservação, foram utilizados quatro tipos de zeólitos na forma sódica: 5-A (Sigma Aldrich), Mordenite CBV10-A (Zeolyst), NaY (Grace Davidson) e NaY (UOP) (**Tabela III**).

Tabela III - Características dos zeólitos utilizados (informação proveniente do IST).

Zeólito	Estrutura	Si/Al
NaY GD	FAU	2,80
NaY UOP	FAU	3,60
CBV 10-A	MOR	7,00
5-A	LTA	-

Com o intuito de elaborar retas de calibração para os diferentes compostos, utilizaram-se os seguintes reagentes: acetaldeído (99% *PS*, Panreac Sintesis), acetato de etilo (95%, Fisher Scientific), acetato de n-butilo (95%), 1-butanol (99,5%, Merck), etanol (99,8%, *puriss p.a.*, Riedel-de Haën), etileno (4% v/v em nitrogénio, Air Liquide e 100 ppm em nitrogénio, Rivoira) e nitrogénio (Rivoira). Foi ainda utilizado material e reagentes correntes de laboratório, como balões volumétricos, exsiccadores, pipetas, balanças analíticas e semi-analíticas (*Fisherbrand Analytical Series*), água destilada, etanol e acetona.

A análise das amostras foi realizada com recurso a um cromatógrafo gasoso (TRACE 1300 GC, ThermoFisher Scientific), acoplado a um espectrómetro de massa (ISQ QD Single Quadrupole MS, ThermoFisher Scientific) e a um detetor por ionização de chama. A coluna cromatográfica utilizada, para a deteção por MS, foi uma TRACEGOLD TG-WAXMS (ThermoFisher Scientific), com fase estacionária polar constituída por polietilenoglicol, de 60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,5 µm de grossura. Para a deteção por FID, foi utilizada uma coluna TRACEPLOT TG-BOND (ThermoFischer Scientific), com fase estacionária polar de alumina, de 30 m de comprimento, 0,53 mm de diâmetro interno e 10 µm de grossura. O *software* utilizado para a definição dos parâmetros e para processamento de dados foi o Thermo Xcalibur, v3.1, da ThermoFisher Scientific. O gás de arraste utilizado em GC-MS foi o hélio (Air Liquide), sendo também utilizados para GC-FID, além do hélio, nitrogénio (Air Liquide), hidrogénio (Air Liquide) e ar reconstituído (20% de oxigénio em nitrogénio, 99% de pureza, Air Liquide). Para a desorção dos compostos foram utilizados *vials* de vidro de 10 mL e septos 18-MS-C-ST3HT, de 3,1 mm de espessura, comercializado pela Fisher.

A caracterização dos frutos foi realizada recorrendo a um penetrómetro (Turoni, Fruit Pressure Tester, model FT327) e a um refratómetro digital (Pocket refratometer, Atago, S7101033).

### 3.4. Procedimento Experimental

Os vários adsorventes foram colocados em caixas de Petri separadas, com massas entre 0,5g e 1g. Semanalmente, estes recipientes foram colocados nas diferentes câmaras de conservação, de forma a sujeitar os vários tipos de adsorventes às diferentes condições de armazenamento, substituindo os da semana transata. Relativamente à campanha de 2020/2021, esta amostragem foi realizada em 8 semanas consecutivas, iniciando-se a 30 de março e terminando em 18 de maio. Já para a campanha de 2021/2022, foram retiradas amostras durante cinco semanas, com início a 19 de agosto e terminando a 16 de setembro.

Foram otimizados os métodos de análise. O método de análise por GC-MS foi otimizado tendo como base um trabalho realizado no RochaCenter, [18]. Em relação ao método de análise por GC-FID, foi realizada uma otimização ao procedimento descrito em [20].

Tendo os métodos de análise otimizados, foram elaboradas as retas de calibração para a quantificação de compostos voláteis, nomeadamente o acetaldeído, o acetato de etilo, o acetato de n-butilo, o 1-butanol, o etanol e o etileno. No caso dos compostos líquidos, para cada um deles foi realizada uma primeira diluição de uma *solução padrão*, utilizando água destilada, constituindo-se a *solução-mãe*. A partir desta solução foram elaborados diferentes calibradores a serem utilizados, com diferentes fatores de diluição. Relativamente ao etileno, foi medido o volume de uma ampola de recolha de gases pela pesagem do volume de água destilada que perfazia a ampola na totalidade. De seguida, a ampola foi repleta com nitrogénio, gasoso, abrindo-a depois rapidamente, de forma a libertar o excesso de nitrogénio, sem haver contaminação pelo gás exterior, e o interior ficar a uma pressão atmosférica. Foram então injetados diferentes volumes de etileno na ampola, de forma a constituir os diferentes calibradores. Importa realçar que as concentrações dos calibradores foram escolhidas com base num trabalho realizado anteriormente no RochaCenter, realizado com os mesmos equipamentos (nomeadamente o GC-MS e todos os seus constituintes) e com as mesmas amostras (mesmas peras, nas mesmas condições de armazenamento). [18]

Para simular o período de *shelf-life*, foram colocadas em dois exsiccadores, à temperatura ambiente do laboratório (cerca de 23 °C) durante uma semana, 10 peras provenientes de uma câmara de conservação em atmosfera ULO (oito meses) + AN (três semanas) e 10 peras armazenadas em condições de AN. Foram ainda colocadas num exsiccador, à temperatura ambiente do laboratório, peras e bananas compradas numa superfície comercial próxima ao RochaCenter, com o intuito de realizar análises de teste sem destruir as amostras retiradas das câmaras.

O método de análise de amostras consistiu em colocar uma dada quantidade de adsorvente num *vial* de 10 mL, selado com um septo e com uma tampa de alumínio. Após desorção, foi recolhido uma dada quantidade do gás no *headspace* do *vial*, injetando posteriormente no GC.

### 3.5. Cálculo da Incerteza dos Calibradores

De forma a calcular a incerteza dos resultados, primeiramente é necessário determinar a incerteza associada à preparação dos *calibradores*. Estas soluções foram preparadas por diluição volumétrica de uma solução inicial, denominada doravante de *solução padrão*, formando a *solução-mãe* (**Equação 1**). A partir desta solução, foram feitas várias diluições, com fatores de diluição diferentes, dando origem aos *calibradores* (**Equação 3**).

$$C_{SM} = C_{SP} \times F_d \quad \text{Equação 1}$$

sendo  $C_{SM}$  a concentração da *solução-mãe*,  $C_{SP}$  a concentração da *solução padrão* e  $F_d$  o fator de diluição, dado pela **Equação 2**.

$$F_d = \frac{V_{SP}}{V_{SM}} \quad \text{Equação 2}$$

sendo  $V_{SM}$  o volume total da *solução-mãe* e  $V_{SP}$  o volume utilizado de *solução padrão* para a diluição.

$$C_c = \frac{C_{SM}}{F_{d_c}} \quad \text{Equação 3}$$

sendo  $C_c$  a concentração do *calibrador* e  $F_{d_c}$  o fator de diluição utilizado para preparar o calibrador, dado pela **Equação 4**.

$$F_{d_c} = \frac{V_{SM}}{V_c} \quad \text{Equação 4}$$

sendo  $V_c$  o volume total do *calibrador*.

Para calcular a incerteza combinada, aplica-se a lei de propagação de incertezas, desde que as grandezas sejam independentes. Ou seja, para uma equação de trabalho  $y = f(a, b, c)$ , a incerteza combinada, na forma relativa, será dada pela **Equação 5**.

$$u_{yc} = \sqrt{\left(\frac{\partial y}{\partial a}\right)_{b,c}^2 (u_a)^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial b}\right)_{a,c}^2 (u_b)^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial c}\right)_{a,b}^2 (u_c)^2} \quad \text{Equação 5}$$

Assim, para uma equação do tipo  $y = \frac{p}{q \cdot r}$ , a incerteza combinada será dada na forma de incerteza relativa, pela **Equação 6**.

$$u_{yc} = y \times \sqrt{\left(\frac{u_p}{p}\right)^2 + \left(\frac{u_q}{q}\right)^2 + \left(\frac{u_r}{r}\right)^2} \quad \text{Equação 6}$$

sendo  $p$ ,  $q$  e  $r$  diferentes fontes de incerteza.

Desta forma, e aplicando a **Equação 1** à **Equação 6**, a incerteza associada à concentração da *solução-mãe*,  $u_{C_{SM}}$ , é dada pela **Equação 7**.

$$u_{C_{SM}} = C_{SM} \times \sqrt{\left(\frac{u_{C_{SP}}}{C_{SP}}\right)^2 + \left(\frac{u_{F_d}}{F_d}\right)^2} \quad \text{Equação 7}$$

Se aplicarmos o mesmo raciocínio à **Equação 2**, obtém-se a **Equação 8**.

$$u_{C_{SM}} = C_{SM} \times \sqrt{\left(\frac{u_{C_{SP}}}{C_{SP}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{SP}}}{V_{SP}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{SM}}}{V_{SM}}\right)^2} \quad \text{Equação 8}$$

A incerteza associada a uma medição de volume,  $u_V$ , pode ser calculada pela combinação da incerteza associada à calibração do balão ou da pipeta,  $u^{calibração}$ , e à repetibilidade do mesmo,  $u^{repetibilidade}$  (**Equação 9**).

$$u_m = \sqrt{(u^{calibração})^2 + (u^{repetibilidade})^2 + (u^{temperatura})^2} \quad \text{Equação 9}$$

A incerteza associada à diferença de temperatura pode ser desprezada se não houver variações superiores a 4°C no laboratório aquando da atividade experimental, por ser minoritária em relação às outras duas.

A incerteza associada à calibração do instrumento de medida é obtida pelo quociente entre a tolerância do mesmo, fornecida pelo fabricante, e a raiz quadrada de 3, como enunciado na **Equação 10**.

$$u^{calibração} = \frac{\text{tolerância}}{\sqrt{3}} \quad \text{Equação 10}$$

A incerteza associada à repetibilidade é estimada pelo desvio-padrão de uma medição, num determinado número de ensaios, e varia com o operador, sendo dada pela **Equação 11**.

$$u^{repetibilidade} = s \quad \text{Equação 11}$$

Uma vez que as *soluções padrão* utilizadas não obtinham nenhuma informação relativamente à incerteza associada, foi assumido que a incerteza associada à pureza seria calculada assumindo uma distribuição retangular em vez da normal, de forma a maximizar o erro. Assim, vem a **Equação 12**,

$$u^{pureza} = \frac{100 - (\text{Pureza} \times 100)}{\sqrt{3}} \quad \text{Equação 12}$$

A incerteza expandida,  $U_y$ , obtém-se multiplicando a incerteza combinada,  $u_{yc}$ , por um fator de cobertura ou expansão,  $k$ , que geralmente é de 2 ou 3 para garantir um nível de confiança de 95% ou de 99%, respetivamente. A **Equação 13** exemplifica a sua determinação.

$$U_y = u_{yc} \cdot k$$

Equação 13

Devido à escassez de dados disponíveis, nomeadamente de incertezas associadas à calibração de instrumentos, não foi possível determinar as incertezas associadas à preparação dos calibradores e às concentrações finais de etileno. No entanto, a incerteza associada às restantes calibrações foi possível e realizada.

### 3.6. Validação estatística do método analítico

O método analítico foi considerado válido se cumprisse três características: teria de ser linear (apresentando, se possível, um coeficiente de linearidade próximo da unidade), homoscedástico e se as diferentes respostas aos diferentes calibradores não contivessem nenhum *outlier*. A linearidade foi testada com o teste *ANOVA lack-of-fit* (teste *F*) com um intervalo de confiança de 99%. Neste teste, é obtido um valor  $F_{calc}$ , dado pelo quociente entre os desvios—padrão obtidos nos valores mais altos da regressão *ANOVA* pelo mais baixo, pressupondo a normalidade de variâncias entre os sinais. Este valor é então comparado com o valor de  $F_{critico}$ , que depende do número total de medições e do nível de confiança desejado. A homoscedasticidade de variâncias é confirmada pelo teste de Lavene, que tem a vantagem de ser robusto à não-normalidade de sinais, ao contrário do teste *F*. O teste de Grubbs compara o valor de  $G_{calc}$ , obtido através do quociente entre o valor absoluto da subtração do valor suspeito e a média dos valores e o desvio padrão, com um valor tabelado  $G_{critico}$ , que depende do número total de medições e do nível de confiança desejado. Estes dois testes foram feitos com recurso à folha de cálculo de Microsoft Excel disponível em [106].

### 3.7. Cálculo da Incerteza dos Resultados

De modo a calcular a incerteza dos resultados, é necessário não só calcular a incerteza dos calibradores (secção 6.1.), mas também calcular a incerteza associada à interpolação do sinal instrumental, pela reta de calibração.

A quantificação da incerteza associada a uma interpolação,  $u_{int}$ , é estimada pela **Equação 14**.

$$u_{int} = \frac{s_y}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y}_a - \bar{y})^2}{b^2 \times \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Equação 14}$$

onde  $s_y$  corresponde ao desvio-padrão residual da curva de calibração,  $b$  ao declive da reta de calibração,  $N$  ao número de respostas instrumentais à análise dos calibradores,  $n$  ao número de respostas instrumentais à análise da amostra,  $\bar{y}_a$  ao valor médio das  $n$  respostas,  $\bar{y}$  ao valor médio das  $N$  respostas,  $x_i$  à concentração de cada um dos calibradores e  $\bar{x}$  ao valor médio da concentração dos calibradores.

A incerteza associada à concentração obtida pela interpolação,  $u_{C_{int}}$ , é então expressa através da **Equação 15**.

$$u_{C_{int}} = C_{int} \cdot \sqrt{\left(\frac{u_{int}}{C_{int}}\right)^2 + \left(\frac{u_{sm}}{C_{sm}}\right)^2} \quad \text{Equação 15}$$

onde  $C_{int}$  corresponde à concentração estimada pela interpolação e  $C_{sm}$  e  $u_{sm}$  à concentração e à incerteza da “solução-mãe” dos calibradores, respetivamente.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Caracterização físico-química dos frutos

Em ambas as campanhas, as peras dos três pomares foram caracterizadas à colheita aquando da chegada ao RochaCenter e antes de serem colocadas em frio. Por se ter recolhido o ar da atmosfera, os resultados são uma média dos três pomares, sendo desprezada a variabilidade inter-pomar (**Tabela IV**). No caso da campanha de 2020/2021, é apresentada a caracterização das peras sete dias depois da abertura das câmaras, em maio de 2020. Nesta data, foram também realizadas análises para averiguar a possível incidência de ES e AI (**Tabela V**).

Tabela IV – Valores médios de firmeza, de IR, de índice de Streiff e da TRA dos três pomares e respetivo desvio padrão, à chegada ao RochaCenter, nas duas colheitas.

Data	Firmeza (kg/0,5 cm <sup>2</sup> )	IR (%)	TRA	Índice de Streiff
ago/20	4,99 ± 0,50	11,64 ± 1,17	7,78 ± 1,24	0,06 ± 0,01
ago/21	6,32 ± 0,69	11,60 ± 1,11	6,65 ± 0,99	0,08 ± 0,01

Tabela V – Valores médios de firmeza, de IR e respetivo desvio padrão e valores de incidência de ES das peras dos três pomares, armazenadas em cada câmara, no final do período de armazenamento e no de *shelf-life*, em maio de 2021.

Câmara	Firmeza (kg/0,5 cm <sup>2</sup> )		IR (%)		Incidência ES (%)			
	Dia 0	Dia 7	Dia 0	Dia 7	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3
7	4,64 ± 0,45	4,65 ± 0,44	11,23 ± 1,06	12,59 ± 0,81	-	-	-	-
8	4,75 ± 0,38	1,16 ± 0,35	12,02 ± 1,21	13,32 ± 0,95	-	-	-	-
9	4,36 ± 0,35	2,28 ± 0,53	10,59 ± 1,16	11,67 ± 1,26	32,5	20	20	27,5
10	4,52 ± 0,42	1,65 ± 0,50	11,05 ± 1,24	13,07 ± 1,54	-	-	-	-

A firmeza da polpa é um valor que vai diminuindo com o tempo, à medida que os frutos amadurecem. Os valores de referência utilizados para a pera *Rocha*, à colheita, situam-se entre os 5,1 e os 6,4 kg/0,5cm<sup>2</sup> [107]. Assim, pode-se concluir que os frutos resultantes da campanha de 2020/2021 apresentavam uma firmeza média inferior ao valor mínimo descrito, e que os frutos resultantes da campanha de 2021/2022 apresentavam um menor estado de maturação, no limite da gama descrita. Este fator poderá ser determinante na análise dos compostos voláteis, uma vez que em determinadas peras se verifica que a produção de compostos voláteis é potenciada por colheitas tardias. Em frutos com maior estado de maturação, o número de recetores de etileno é maior e por isso a produção deste composto poderá ser maior também, mesmo utilizando 1-MCP. [38]

Em relação ao IR, os valores obtidos nas duas colheitas estão dentro dos valores médios de referência à colheita [6], e não são divergentes. Em verões com temperaturas mais elevadas e sem excesso de rega ou chuva, as peras apresentam mais açúcares, sendo que cerca de 80% da matéria seca dos frutos são açúcares.

O amido, ao longo do período de maturação da pera *Rocha*, transforma-se em açúcar através de reações de hidrólise. Aconselha-se que, à colheita, os frutos apresentem TRA entre 5 e 7, sendo que frutos com TRA inferiores a 4 dificilmente amadurecerão e que com TRA superiores a 8 terão de entrar no circuito comercial o mais cedo possível. [6], [107] Os valores de TRA obtidos para a campanha de 2021/2022 são inferiores à gama anteriormente referida, sustentando a tese de que os frutos desta colheita se encontravam, à colheita, num estado de maturação mais inicial comparativamente à campanha de 2020/2021.

O Índice de Streiff compreende a ponderação de três bons testes, sendo eles a firmeza da polpa, o IR e a TRA, cujos valores de referência à colheita se encontram entre 0,07 e 0,09 [6], [107]. Verifica-se que os frutos da campanha de 2020/2021 obtinham valores do Índice inferiores a este intervalo, confirmando o maior estado de maturação desta colheita.

Pela análise da **Tabela V**, verifica-se que os frutos à saída da câmara não apresentavam uma firmeza relativamente diferente face à medida à chegada dos frutos ao RochaCenter, aquando do seu início de conservação, mantendo esta característica após dez meses de conservação. No entanto, no durante o período *shelf-life*, a firmeza diminuiu, tal como confirmado por Galvis-Sánchez *et al* [108]. No final do período de *shelf-life*, os frutos da câmara 9, condicionados a condições de AN, apresentavam uma maior firmeza face aos frutos armazenados em AC (câmaras 8 e 10), resultado também verificado por Galvis-Sánchez *et al* [108]. Já os frutos armazenados na câmara onde foi aplicado 1-MCP (câmara 7), apresentavam uma maior firmeza em relação aos frutos armazenados nas restantes câmaras. Também Saquet *et al*. [9], num estudo com pera *Rocha*, observou que o tratamento com 1-MCP preveniu a redução de firmeza. Como referido anteriormente, o etileno é conhecido pela “hormona do amadurecimento”, sendo responsável por induzir os processos de senescência. As peras armazenadas em AC, ao passarem para condições *shelf-life*, tiveram um aumento metabólico motivado pelo aumento do teor de oxigénio e pelo aumento da temperatura, tendo como consequência uma maior produção de etileno. Já as peras unicamente armazenadas em AN, o aumento metabólico foi apenas potenciado pelo aumento de temperatura. Também em [109] verifica-se que, em peras *Rocha* armazenadas durante mais de oito meses, houve maior produção de etileno em período *shelf-life* em frutos armazenados em atmosferas ULO face a AC. Assim, torna-se natural que as peras armazenadas em AC tenham uma maior produção de etileno face às peras armazenadas em AN, em período *shelf-life* e que, conseqüentemente, apresentem uma menor firmeza.

Em [25], [109] foi observado que o valor de IR aumentou durante o período de *shelf-life* e que não houve divergências de valores entre frutos armazenados em atmosferas com 3 kPa e 0,5 kPa de O<sub>2</sub>. De facto, pela **Tabela V**, pode-se constatar que os frutos armazenados nas câmaras 8 e 10 (AC de 0,5 e 2,5% de O<sub>2</sub>, respetivamente) não obtiveram valores de IR divergentes. Verificou-se que os frutos armazenados em AN exibem valores menores de IR, também observado em [110].

Como se referiu anteriormente, o ES é um problema fisiológico que ocorre nos frutos após um período prolongado de armazenamento em AN a temperaturas baixas. Confirmando esta afirmação, verificou-se a incidência de ES apenas em fruta armazenada em condições AN. Cerca de 50% dos frutos analisados apresentavam ES moderado e severo. Não foi detetado incidência de AI.

## 4.2. Otimização do método cromatográfico

O método de análise por GC-FID foi baseado num procedimento descrito em [20], modificando apenas o tempo de cada patamar de temperatura, uma vez que se verificou um desdobramento do pico (Figura 18, Tabela VI).

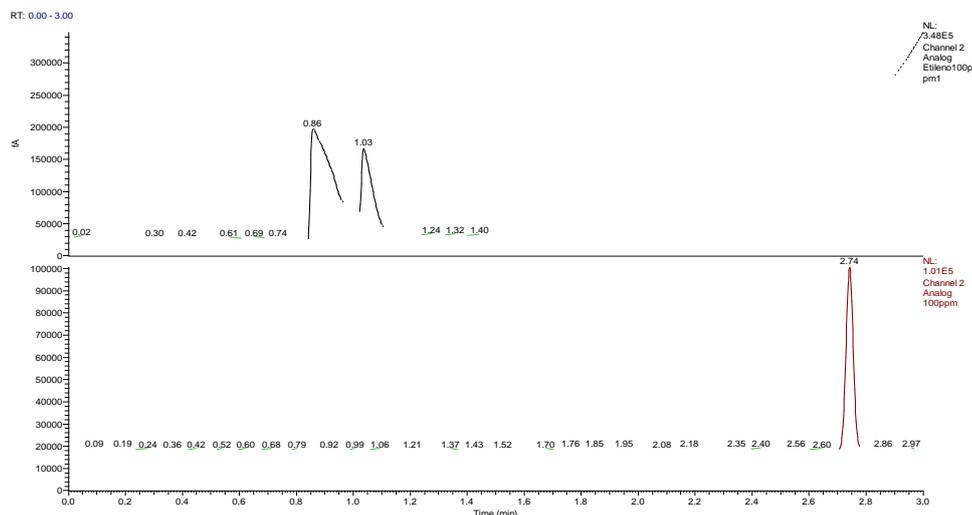


Figura 18 – Otimização do método de análise por GC-FID. Cromatograma da análise ao etileno, de concentração de 100 ppm, segundo descrito por [20] (em cima). Cromatograma da análise ao etileno, da mesma concentração, com otimização feita.

Tabela VI – Condições dos parâmetros instrumentais para análise dos compostos voláteis por GC-FID.

T Injetor (°C)	Modo	Razão <i>Split</i>	Caudal (ml/min)	T Detetor (°C)	Rampa de Temperatura	Caudais do Detetor (ml/min)
200	<i>Split</i>	13	4	250	50 °C durante 2 min. Aumento para 200 °C, a 10 °C/min, estabilizando durante 3 min.	Ar: 350; Hidrogénio: 35; Azoto: 45

O método de análise por GC-MS utilizado num anterior trabalho realizado no RochaCenter [18] foi adotado, com ligeiras modificações. Aquando da tentativa de elaborar a reta de calibração do 1-hexanol, verificou-se que os valores da área do respetivo pico tinham um elevado grau de dispersão. Nas análises seguintes, em que não tinha sido injetado 1-hexanol, o equipamento detetava grandes quantidades deste composto, sendo que, inclusivamente, identificou-se vários picos cromatográficos correspondentes a este composto (Figura 19). Por este facto, verificou-se que a temperatura do injetor,

descrita pelo método anteriormente realizado, era inferior à temperatura de ebulição do 1-hexanol. Assim, procedeu-se à alteração da temperatura do injetor para uma temperatura superior.

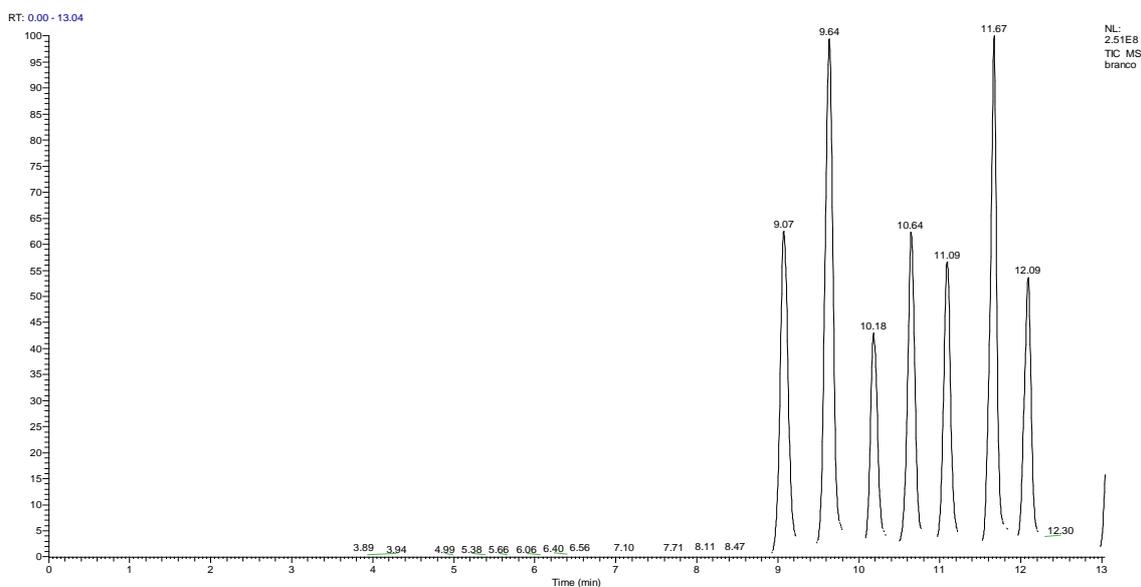


Figura 19 – Cromatograma. Todos os picos foram identificados como sendo devidos a 1-hexanol.

Primeiramente, uma vez que a temperatura de ebulição do composto menos volátil em estudo é o acetato de hexilo, e seguindo as boas normas do uso de uma temperatura do injetor 50 °C superior à temperatura de ebulição do componente menos volátil em estudo, definiu-se uma temperatura de 220 °C. No entanto, ao observar os cromatograma gerados, verificou-se uma não-linearidade da linha de base do cromatograma, evidenciando um possível *bleeding* da coluna. Este fenómeno é caracterizado pela deformação do material da fase estacionária, presente na coluna, que é eluído e posteriormente detetado no MS. De forma a evitar este sangramento da coluna, é recomendado o uso de uma temperatura até 20 °C abaixo da temperatura máxima da coluna, que no caso é de 250 °C. Para confirmar esta possibilidade, foi elaborado um teste para verificar se havia alguma fuga que pudesse estar a comprometer a análise. Este teste consiste na passagem de um papel, previamente molhado com acetona, na parte exterior do injetor, da válvula de ventilação do MS e nas porcas presentes nas extremidades da coluna do GC. Foram também trocados o septo e o *liner* do injetor. Fez-se uma nova análise, sem a injeção de nenhum composto, e verificou-se que o problema se mantinha (**Figura 20**).

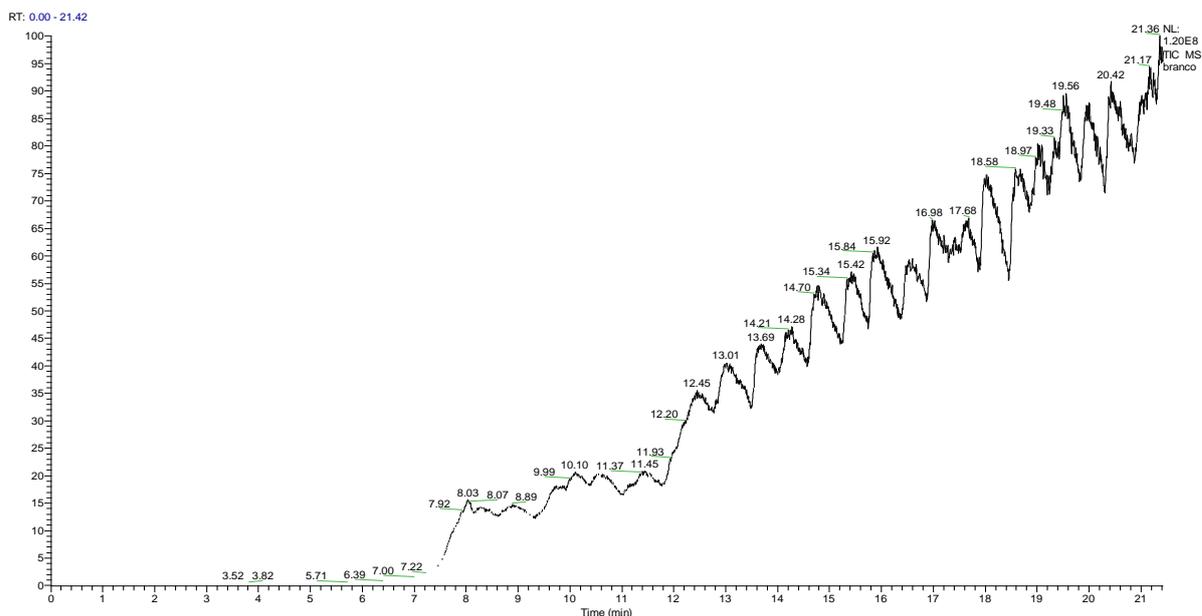


Figura 20 – Cromatograma evidenciando possível bleeding da coluna.

Constatando que não havia alteração na linha de base, considerou-se que seria causada pelo fenômeno de *bleeding*. Redefiniu-se a temperatura do injetor para 200 °C e posteriormente para 180 °C, verificando-se uma maior estabilização da linha de base (**Figura 21**).

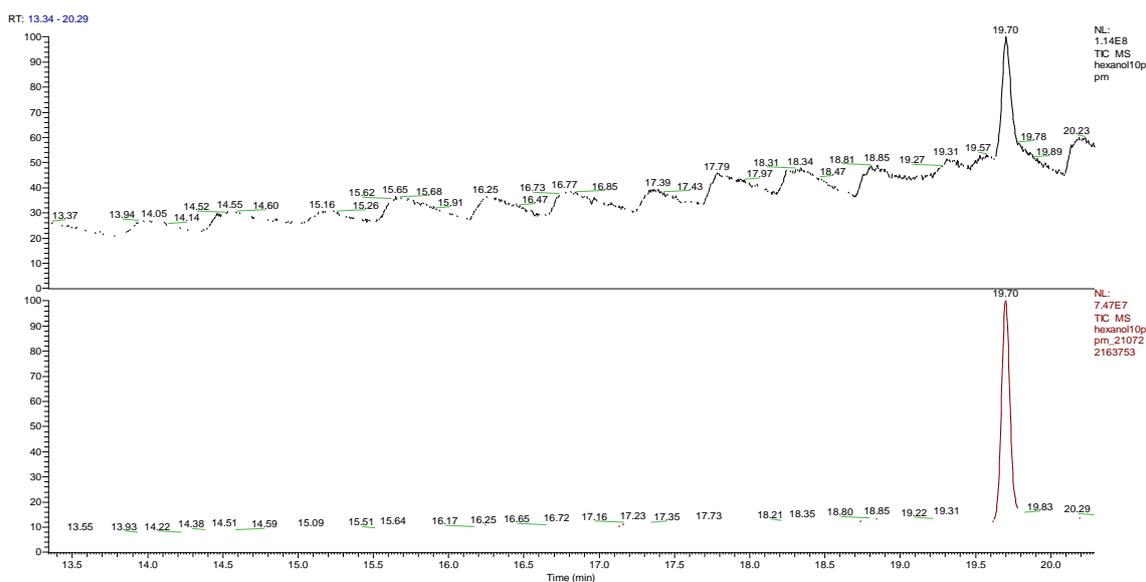


Figura 21 – Comparação de diferentes cromatogramas a análises à mesma concentração de 1-hexanol. O cromatograma com temperatura do injetor de 200 °C (em cima) apresenta uma linha de base com maior ruído do que utilizando uma temperatura do injetor de 180 °C (em baixo).

Assim, o método foi considerado otimizado face às condições instrumentais existentes e foi aplicado para todas as amostras recolhidas (**Tabela VII, VIII**).

Tabela VII – Condições dos parâmetros de GC para análise dos compostos voláteis por GC-MS.

T injetor (°C)	Modo	Razão <i>Split</i>	Caudal (ml/min)	Rampa de Tempertura
180	<i>Split</i>	33,3	1	30 °C durante 4,5 min. Aumento para 100 °C, a 20 °C/min, estabilizando durante 1 min. Aumento de 2 °C/min para 150 °C, estabilizando durante 2 min.

Tabela VIII – Condições dos parâmetros de MS para análise dos compostos voláteis por GC-MS.

T interface (°C)	T fonte iões (°C)	Tempo (min)	<i>m/z</i>
180	180	3,5	33-150

### 4.3. Otimização da desorção dos compostos

Foram realizados ensaios de termogravimetria aos zeólitos utilizados neste trabalho. Estes adsorventes foram primeiramente colocados num exsiccador com peras durante o período de uma semana. De seguida, uma pequena quantidade destes adsorventes foi transportada para o Instituto Superior Técnico, no sentido de realizar as análises de termogravimetria, utilizando um equipamento TG/DSC SETARAM \_SetSys. A perda de massa dos zeólitos será devida à desorção dos compostos que estavam adsorvidos. Assim, foram recolhidos dados de forma a elaborar uma representação gráfica da perda de massa e do fluxo de calor em função da temperatura (**Figura 22**).

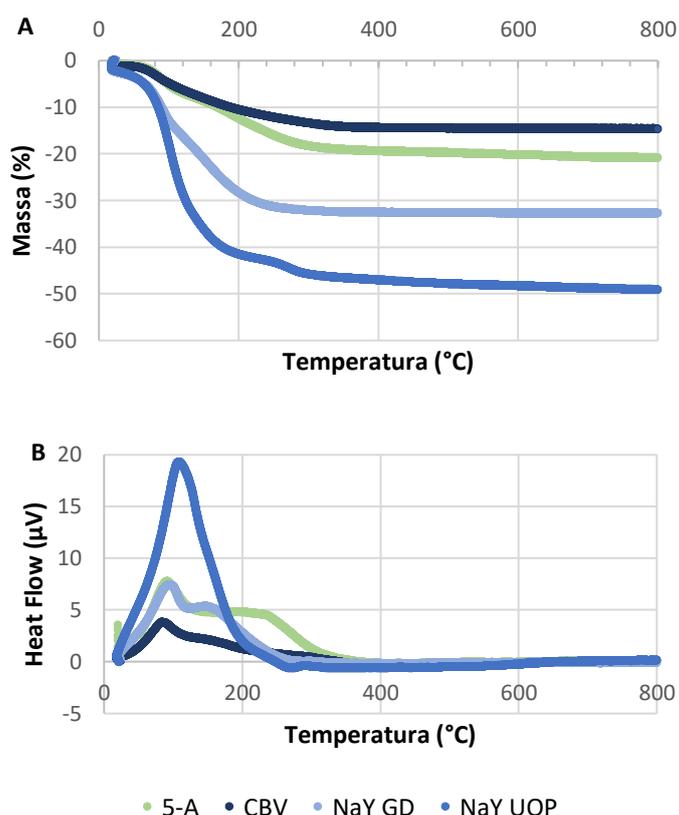


Figura 22 – Representação gráfica dos dados recolhidos na análise por termogravimetria.

Pela análise dos dados recolhidos na análise por termogravimetria, podemos concluir, pelo gráfico A, que existe uma perda de massa, na ordem dos 10%, a cerca de 100 °C, considerando-se que se deve à evaporação da água. A presença de humidade elevada não favorece a adsorção de compostos voláteis devido à possível adsorção de água, inibindo a possível adsorção de outros compostos [99]. Esta perda da massa é acompanhada pela existência de um pico endotérmico típico para a desorção, no gráfico B. É também possível constatar que, em qualquer zeólito, a desorção dos compostos adsorvidos é praticamente concluída a 300 °C, não havendo alterações de maior relevo na massa destes compostos após alcançada esta temperatura. Ao observar com mais atenção os dados

referentes a cada zeólito, é possível verificar que o NaY UOP tem uma maior percentagem de perda de massa do que os restantes, e que o zeólito 5-A necessita de uma maior temperatura para concluir a desorção dos compostos.

Assim, foi realizada uma experiência para determinar quais as melhores condições de temperatura e de tempo dentro da estufa para a desorção dos compostos em estudo. Foram colocados 9 exemplares de peras da variante *Conference* (devido à inexistência de peras *Rocha* na altura do ano a que esta experiência foi feita) em dois exsiccadores, juntamente com os quatro tipos de zeólitos. Com base na temperatura de ebulição do composto menos volátil em estudo, foi definida uma temperatura de 190 °C para uma abordagem inicial, apesar da desorção ser feita a temperaturas superiores segundo alguns artigos ([60], [61], [111]), e foi definido um tempo de 5 minutos. Observou-se que houve uma explosão do septo, considerando-se que a pressão e a temperatura não eram adequadas ao funcionamento do mesmo. Não obstante, os zeólitos foram colocados na estufa durante 10 minutos a 130 °C e a 5 e 3 minutos a 170 °C. A estas temperaturas não se verificou a explosão anterior. No entanto, verificou-se naturalmente que os compostos menos voláteis, nomeadamente o acetato de hexilo e o 1-hexanol, estavam em menor quantidade quando aplicada uma temperatura inferior à sua temperatura de ebulição. Verificou-se também que todos os compostos apresentavam concentrações mais elevadas no ensaio a 170 °C, durante 5 minutos, do que os restantes ensaios, o que leva a concluir que a desorção não estaria concluída nestas condições. Verificou-se ainda a existência de um patamar da linha de base, próximo ao valor de tempo de retenção do etanol, o que poderá ser devido a uma saturação deste composto. Este fator, aliado às explosões dos septos (18-ST101, *Fisher*), indicaram que a quantidade de zeólitos colocada dentro dos *vials* deveria ser menor.

Com a compra de novos septos (18-MS-3HT, *Fisher*), cujas características comerciais indicam uma temperatura máxima de 250 °C e uma maior espessura, permitem que os zeólitos dentro dos *vials* ficassem expostos na estufa a uma temperatura superior aos ensaios anteriores, 200 °C.

Inicialmente foi testado o zeólito 5-A. Foram colocados aproximadamente 500 mg deste zeólito num *vial*, colocado numa estufa a 200 °C durante 10, 15 e 20 minutos, inserindo-se 1 mL da amostra gasosa após a desorção no GC-MS (**Figura 23**). Nestas análises, observou-se uma saturação de etanol, não permitindo um pico correto. Observou-se também que o pico com um tempo de retenção próximo dos 19 minutos, correspondente ao 1-hexanol, ficou mais definido quanto maior foi o tempo de desorção. Assim, considera-se que a desorção deste composto ainda não estava concluída, necessitando de um maior tempo ou temperatura de desorção.

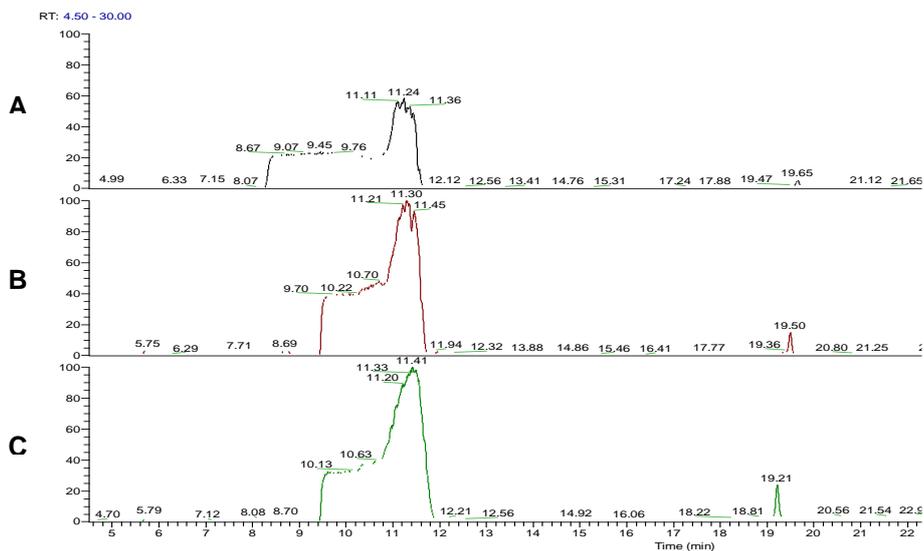


Figura 23 – Testes de desorção dos compostos voláteis do zeólito 5-A, utilizando 500 mg deste adsorvente num *vial*, colocado numa estufa a 200 °C durante 10 minutos (A), 15 minutos (B) e 20 minutos (C). Injeção de 1 mL do *head space* no GC-MS. Peras *Conference*.

Considerou-se, de seguida, que se poderia reduzir a quantidade de amostra gasosa inserida no GC-MS. Assim, repetiram-se as condições de desorção anteriores, para tempos de 10 e 20 minutos injetando-se no GC-MS, no entanto, metade do valor anterior. Observou-se uma melhoria, não completa, face à injeção com 1 mL (Figura 24).

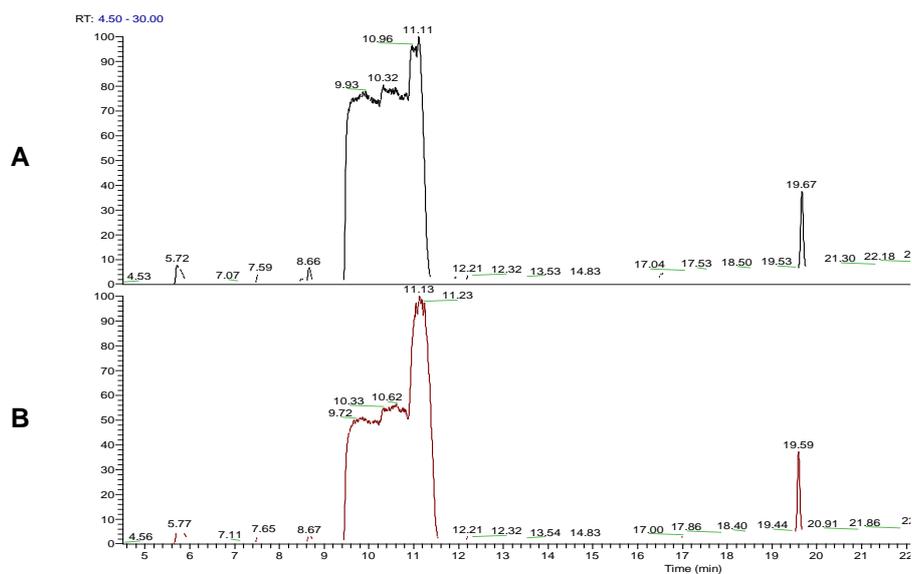


Figura 24 – Testes de desorção dos compostos voláteis do zeólito 5-A, utilizando 500 mg deste adsorvente num *vial*, colocado numa estufa a 200 °C durante 10 minutos (A) e 20 minutos (B). Injeção de 0,5 mL do *headspace* no GC-MS. Peras *Conference*.

De seguida, foi utilizado o zeólito NaY UOP, que nos ensaios de termogravimetria revelou ser o adsorvente com maior perda de massa. Inicialmente foi colocado aproximadamente 250 mg deste zeólito num *vial*, colocado numa estufa a 200 °C durante 20 minutos, e injetou-se 1 mL, 0,5 mL e 0,2 mL do *head space* (**Figura 25**). A saturação do etanol voltou a existir, quando injetados 1 e 0,5 mL, apresentando melhorias significativas quando injetados 0,2 mL. Quando injetados 0,2 mL, verificou-se uma melhor definição de quase todos os picos. No entanto, o composto responsável pelo pico ao tempo de retenção de 25 minutos não foi detetado, ao contrário dos cromatogramas anteriores. Esta sequência de acontecimentos levou a considerar a colocação de menor quantidade de zeólito no *vial* e um maior tempo ou temperatura de desorção.

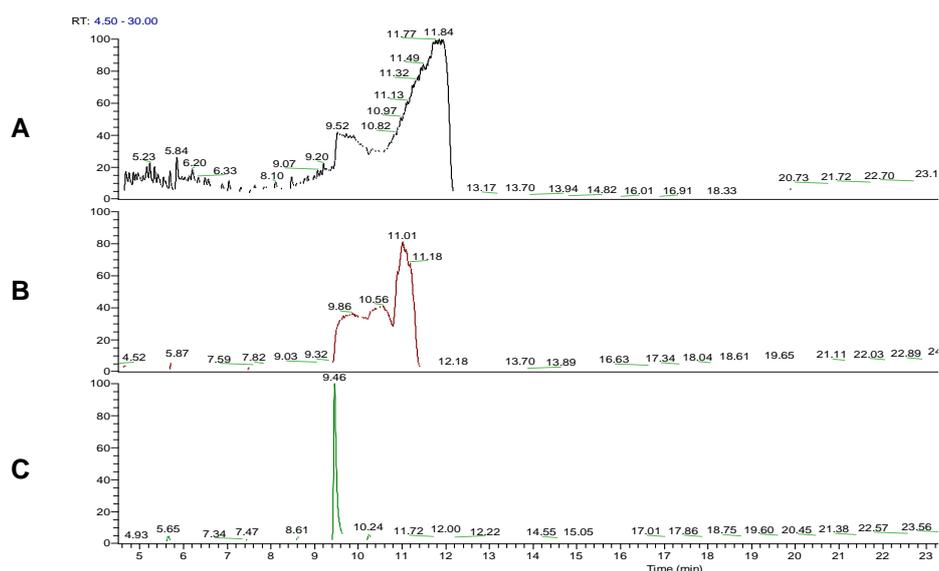


Figura 25 – Testes de desorção dos compostos voláteis do zeólito NaY UOP, utilizando 250 mg deste adsorvente num *vial*, colocado numa estufa a 200 °C durante 20 minutos. Injeção de 1 mL (A), 0,5 mL (B) e 0,2 mL (C) do *headspace* no GC-MS. Peras *Conference*.

Com base nas conclusões anteriores, foi colocada uma quantidade de zeólito NaY UOP de 100 mg durante 30 minutos na estufa, a 200 °C, injetando-se no GC-MS 1 mL do *head space* (**Figura 26**).

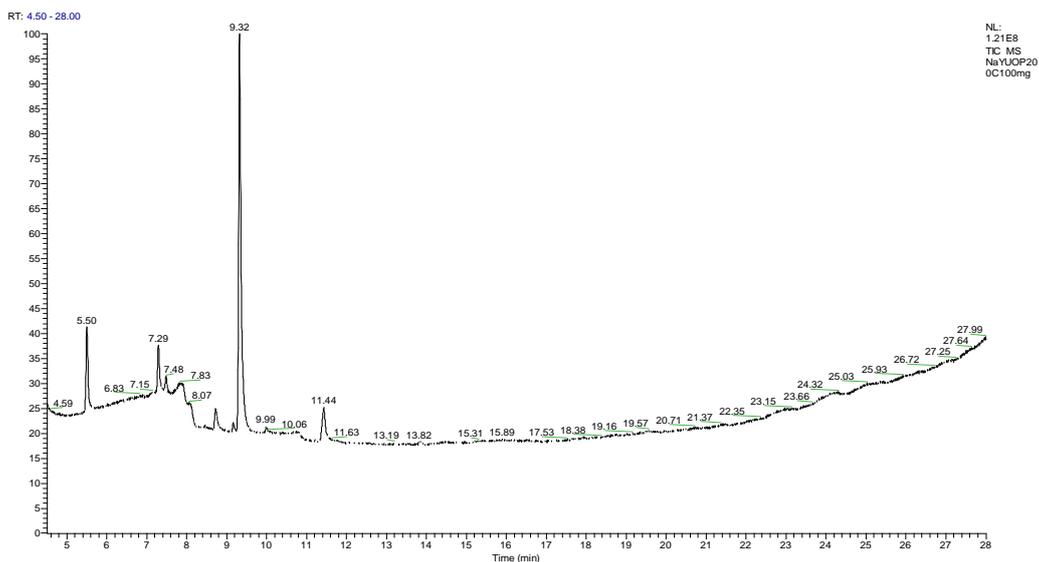


Figura 26- Teste de desorção de compostos voláteis do zeólito NaY UOP, tuilizando 100 mg deste adsorvente num *vial*, colocado numa estufa a 200 °C durante 20 minutos. Injeção de 1 ml do *headspace* no GC-MS. Peras *Conference*.

Os picos do cromatograma ficaram ainda mais bem definidos, aumentando também a intensidade.

Infelizmente, a quantidade de zeólito NaY UOP não foi suficiente para continuar o estudo de desorção. Assim, colocaram-se os restantes zeólitos na estufa, também a 200 °C, durante 30, 40 e 90 minutos, sendo que, no caso do zeólito NaY GD, foram ainda testados tempos de desorção de 60 e 120 minutos.

Deste estudo não se pode concluir qual as melhores condições de desorção dos compostos em estudo, uma vez que, nas condições enunciadas, só se conseguiu detetar dois dos cinco constituintes voláteis objetos de quantificação no presente estudo (por GC-MS), podendo este facto ser devido à amostra ser de uma variedade diferente de pera. No entanto, foi possível concluir que, após cerca de 1 hora de desorção, a concentração dos compostos diminui, podendo este facto ser devido a uma danificação, reatividade ou fuga dos compostos. Assim, não será relevante realizar a desorção dos compostos com duração superior a 1 hora, nas condições descritas, na continuação da otimização das condições de desorção.

Desta forma, utilizou-se amostras de compostos voláteis concentrados em zeólitos, produzidas em peras *Rocha* armazenadas em atmosferas ULO + AN, sujeitas a condições de *shelf-life*. Primeiramente realizou-se a desorção de 100 mg de zeólitos a uma temperatura de 200 °C durante 30 minutos. No final da desorção, deparou-se com o facto de que o septo do *vial* onde estava colocado o zeólito NaY UOP estava submetido a uma pressão demasiado elevada, criada pelos componentes voláteis. Assim, reduziu-se a quantidade de zeólitos para metade, 50 mg, e nas mesmas condições procedeu-se à desorção dos compostos durante períodos de 45 e 60 minutos (**Figura 27**).

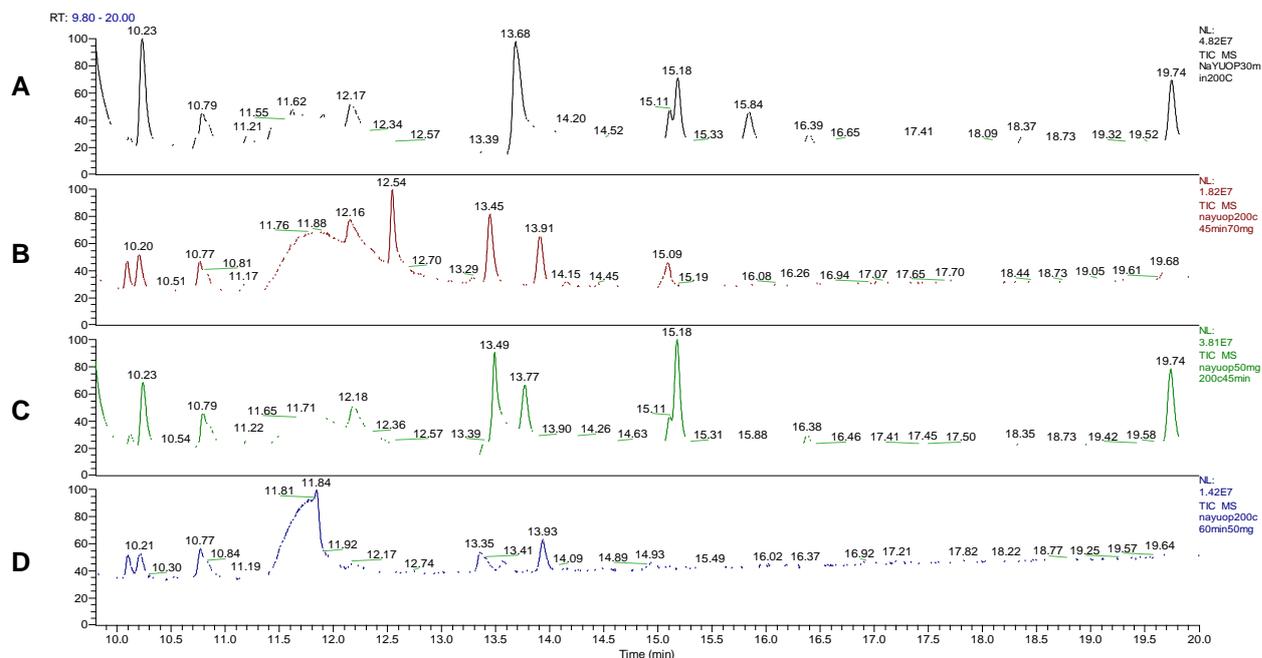


Figura 27 – Pormenor de cromatogramas de análises de compostos voláteis em diferentes condições de desorção, para tempos de retenção superiores a 9,80 e inferiores a 20,00 min e temperatura de 200 °C. As condições foram: **A** – 100 mg durante 30 min; **B** – 70 mg durante 45 minutos; **C** – 50 mg durante 45 minutos; **D** – 50 mg durante 60 min. Peras Rocha, GC-MS.

Tendo como objeto de análise os cromatogramas referentes às diferentes condições de desorção anteriormente descritas e visualizadas na **Figura 27**, usando o zeólito NaY UOP, é possível constatar que os picos correspondentes ao 1-hexanol ( $TR \approx 19,70$  min), apesar de detetados nas condições **B** e **D**, apresentam uma intensidade relativa em muito inferior aos cromatogramas relativos às outras duas condições de desorção. É também possível observar que os picos presentes no cromatograma **C** encontram-se mais bem definidos do que os picos do cromatograma **A**. Assim, como o objetivo deste estudo é otimizar as condições de desorção que originem cromatogramas com picos mais bem definidos, sem que haja a perda de deteção de compostos, foi determinado que as condições **C** seriam as utilizadas no decorrer do trabalho para amostras recolhidas no exsicador (**Tabela IX**).

Tabela IX – Condições de desorção para zeólitos expostos no exsicador.

T (°C)	t (min)	massa de zeólito (g)
200	45	50

Com recurso a uma amostra real retirada das câmaras de conservação, foram otimizadas as condições para a desorção dos compostos voláteis para este tipo de amostragem. Foi utilizada uma

amostra do zeólito NaY UOP, colocado na câmara 7 no dia 6 de abril de 2020, onde se variou a quantidade de zeólito colocada num *vial*, durante 45 minutos a 200 °C (**Figura 28**).

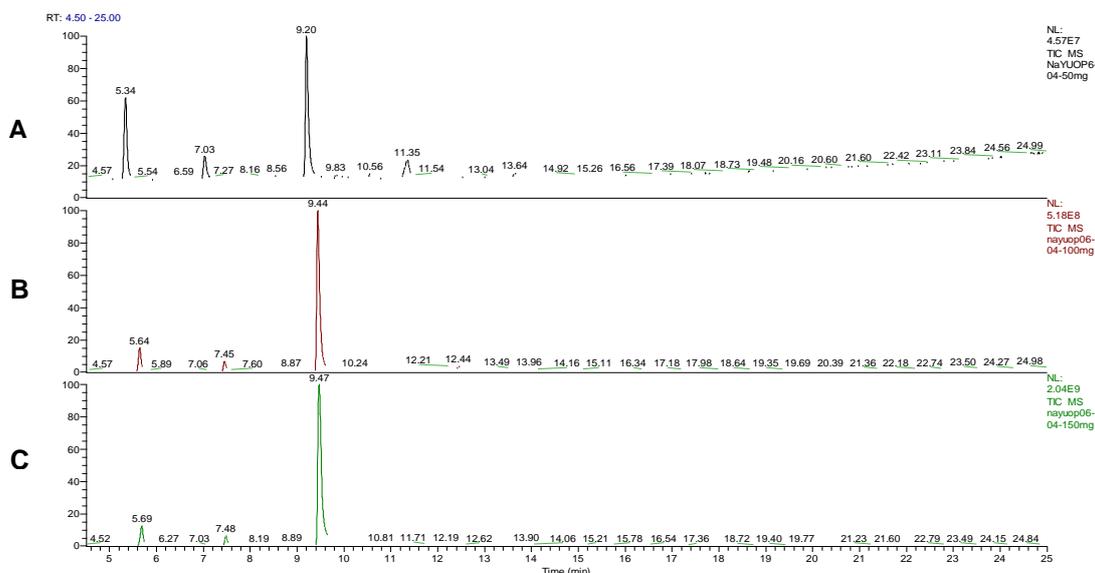


Figura 28 – Testes de desorção dos compostos voláteis do zeólito NaY UOP, colocado num *vial* a 200 °C durante 45 minutos numa quantidade de 50 mg (A), 100 mg (B) e 150 mg (C). Injeção de 1 mL do *headspace* no GC-MS. Peras Rocha, GC-MS.

Constatou-se que, quanto maior foi a quantidade de zeólito colocada no *vial*, maior foi a concentração de cada composto. Observou-se também que, utilizando apenas 50 mg, a área do pico correspondente ao etanol (TR≈9,40 min) foi inferior aos restantes, sendo que também a sua abundância relativamente ao acetaldeído (TR≈5,60 min) foi bastante díspar quando comparado com as segundas e terceiras condições de desorção. Como o 1-butanol (TR≈13,50 min) foi detetado com maior resolução utilizando 100 mg de zeólito, foi utilizada esta quantidade para a desorção dos compostos voláteis retidos nas amostras recolhidas nas câmaras (**Tabela X**).

Tabela X – Condições de desorção para zeólitos expostos nas câmaras.

T (°C)	t (min)	massa de zeólito (g)
200	45	100

#### 4.4. Retas de Calibração

Foram realizadas as retas de calibração para a quantificação de acetaldeído, acetato de etilo, acetato de n-butilo, 1-butanol, etanol e etileno. Os calibradores foram injetados seis vezes e lida a sua resposta. Foi estudada a linearidade destas respostas e foram feitas curvas de calibração.

Toma-se como exemplo a validação da reta de calibração para a obtenção de acetato de etilo. As respostas instrumentais aos diferentes calibradores foram introduzidas na folha de cálculo presente em [106] (Tabela XI).

Tabela XI – Respostas instrumentais a cada calibrador de acetato de etilo.

Concentração dos calibradores (ppm)	Áreas dos picos em diferentes réplicas						Valor usado na Regressão
	1	2	3	4	5	6	
<b>0,10 ± 0,01</b>	4,70E+05	3,59E+05	5,81E+05	6,56E+05	9,68E+05	6,15E+05	<b>6,27E+05</b>
<b>0,30 ± 0,01</b>	1,38E+06	1,25E+06	1,39E+06	1,28E+06	1,11E+06	1,32E+06	<b>1,21E+06</b>
<b>0,50 ± 0,02</b>	1,89E+06	1,84E+06	1,79E+06	1,69E+06	1,83E+06	1,67E+06	<b>1,79E+06</b>
<b>0,70 ± 0,02</b>	1,97E+06	2,29E+06	1,98E+06	2,16E+06	2,10E+06	2,07E+06	<b>2,37E+06</b>
<b>1,00 ± 0,03</b>	3,33E+06	3,45E+06	3,54E+06	3,41E+06	3,54E+06	3,25E+06	<b>3,24E+06</b>
<b>1,50 ± 0,04</b>	4,52E+06	4,70E+06	4,43E+06	4,48E+06	4,94E+06	4,26E+06	<b>4,70E+06</b>
<b>2,00 ± 0,05</b>	6,50E+06	6,17E+06	5,75E+06	6,16E+06	6,54E+06	6,24E+06	<b>6,15E+06</b>
<b>3,00 ± 0,08</b>	9,57E+06	9,42E+06	9,44E+06	8,30E+06	1,00E+07	9,15E+06	<b>9,06E+06</b>
<b>5,00 ± 0,13</b>	1,50E+07	1,49E+07	1,50E+07	1,46E+07	1,46E+07	1,44E+07	<b>1,49E+07</b>

Primeiramente foi analisada a possível presença de *outliers*. Calculou-se  $G_{calc}$  para os valores limites das áreas obtidas para cada calibrador (Tabela XII).

Tabela XII – Resultados do teste de Grubbs para a identificação de *outliers* nos valores limite de área para cada calibrador.

Concentração dos calibradores (ppm)	$G_{calc}$	
	Área Menor	Área Maior
<b>0,10 ± 0,01</b>	1,74	1,21
<b>0,30 ± 0,01</b>	0,95	1,73
<b>0,50 ± 0,02</b>	1,20	1,35
<b>0,70 ± 0,02</b>	1,64	1,04
<b>1,00 ± 0,03</b>	1,05	1,45
<b>1,50 ± 0,04</b>	1,64	1,25
<b>2,00 ± 0,05</b>	1,09	1,67
<b>3,00 ± 0,08</b>	1,20	1,78
<b>5,00 ± 0,13</b>	1,17	1,29

Como nenhum dos valores de  $G_{calc}$  é superior ao valor de  $G_{critico}$  (para seis repetições,  $G_{critico} = 1,94$ , com um intervalo de confiança de 99%), considera-se que não existem *outliers* a este nível de significância.

De seguida foi realizado o teste de linearidade ANOVA *lack-of-fit* (teste  $F$ ), cujo resultado de  $F_{calc}$  foi de 2,80. Como o valor de  $F_{calc}$  é inferior ao valor de  $F_{critico}$  (para seis repetições,  $F_{critico} = 3,07$ , com um intervalo de confiança de 99%), considera-se que uma regressão linear se adequa à resposta instrumental.

O teste de homogeneidade de variâncias foi também realizado, tendo sido obtido um valor de  $W_{calc}$  de 2,49. Como o valor de  $W_{calc}$  é inferior ao valor de  $W_{critico}$  (para seis repetições,  $W_{critico} = 4,94$  com um intervalo de confiança de 99%), considera-se que os sinais são homoscedásticos, ou seja, que as suas variâncias são estatisticamente equivalentes.

A reta de calibração foi então obtida recorrendo a uma regressão linear ANOVA, que minimiza a distância entre a linha ajustada e todos os valores de resposta instrumental aos calibradores (**Figura 29**).

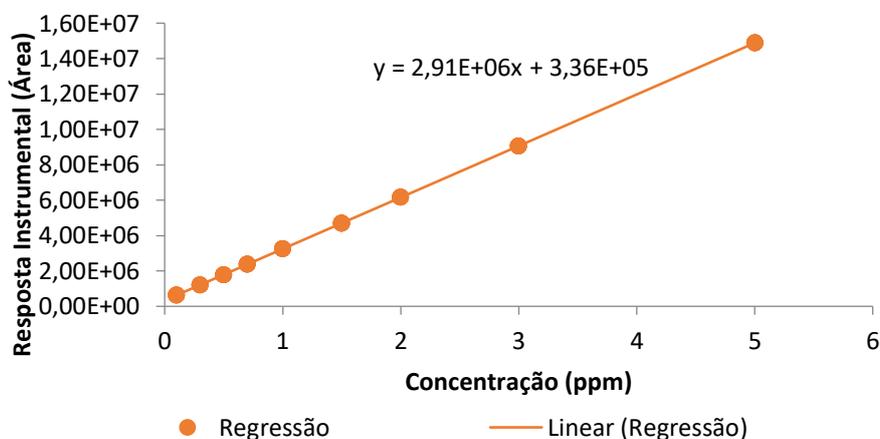


Figura 29 – Regressão linear obtida para as respostas instrumentais em função das concentrações dos calibradores de acetato de etilo.

Uma vez que os valores das respostas instrumentais obtiveram aprovação nos testes estatísticos feitos, e que a regressão na gama de trabalho se revelou linear, considera-se que o método é adequado para a determinação da concentração de acetato de etilo nas amostras.

A validação dos restantes métodos de determinação foi realizada de forma análoga ao anteriormente descrito. Uma vez que todos os métodos analíticos foram aprovados, consideram-se válidos para a determinação do composto volátil respetivo. As retas de calibração estão disponíveis no **Anexo II**.

#### 4.5. Shelf-life

De forma a simular o período em *shelf-life*, foram analisados dois conjuntos de 10 peras, cada um colocado em exsicadores individuais durante uma semana, a uma temperatura de laboratório de cerca de 23 °C. Um destes conjuntos continha peras que estiveram em condições AN desde a colheita e, no outro conjunto, exemplares que permaneceram, a partir da colheita, oito meses em condições ULO e três semanas em condições AN. Primeiramente, foi analisado o ar de cada um dos exsicadores. A análise ao ar do exsicador com peras armazenadas em atmosfera ULO + AN originou um cromatograma com uma linha de base que não estabilizou e, por isso, não foi possível detetar nenhum composto.

Por sua vez, o ar do exsicador contendo peras que foram armazenadas em AN foi analisado diretamente, sem recorrer a zeólitos, tendo sido possível identificar sete compostos (**Tabela XIII**), sendo o etanol o que apresenta uma maior abundância relativa.

Tabela XIII – Compostos voláteis detetados na análise ao ar de um exsicador por GC-MS, contendo peras *Rocha* previamente armazenadas em AN, em condições *shelf-life*, durante uma semana a cerca de 23 °C.

TR	Nome	Prob	Área	Área (%)	Altura	Altura (%)
5,69	Acetaldeído	85,50	2,62E+06	0,44	7,07E+05	0,28
6,87	Octano	28,30	4,23E+05	0,07	1,38E+05	0,05
7,71	Acetato de Metilo	89,60	1,76E+06	0,30	7,02E+05	0,27
8,68	Acetato de Etilo	94,40	1,22E+08	20,62	5,32E+07	20,79
9,50	Etanol	89,30	4,58E+08	77,49	1,99E+08	77,67
12,03	Acetato de Butilo	82,30	1,85E+06	0,31	7,95E+05	0,31
13,43	1-Butanol	54,80	4,52E+06	0,76	1,60E+06	0,63

Nesta análise, e apesar de serem detetados um maior número de compostos pertencentes à família dos ésteres (três compostos), os álcoois foram a família de compostos orgânicos mais abundante, sendo motivada em grande parte pela abundância de etanol, representando cerca de 77% da abundância relativa total (**Figura 30**). Apesar de no trabalho anterior [18] também terem sido detetados uma maior quantidade de álcoois (ca. 43%), seguida de ésteres (ca. 33%), no trabalho de Fonseca *et al.* [16] com peras *Rocha* armazenadas em AC (-0,5 °C, 0,5% O<sub>2</sub>, 0,4% CO<sub>2</sub>), colocadas em *shelf-life* a 25 °C, foi detetado uma maior quantidade de terpenos (72%), seguida dos ésteres (23%), álcoois (4%), acetaldeídos (0,6%) e cetonas (0,3%). Os ésteres, que favorecem aromas frutados e florados, têm sido recorrentemente descritos como a família de compostos mais abundante em várias variedades de pera, e em particular nos períodos de *shelf-life*, em que se dá o amadurecimento dos frutos [37], [61], [62], [112]. Note-se, no entanto, que análises aos compostos voláteis produzidos pelas diferentes variedades de pera em diferentes períodos do armazenamento e conservação dos frutos originam resultados diferentes.

A abundância de etanol pode ser potenciada por condições *shelf-life*, tal como verificado por Chervin *et al.* [53], e pelo já longo período de conservação, tendo os processos de senescência associados.

Este facto também pode estar relacionado com a possibilidade de o oxigénio dentro do exsicador ter diminuído ao longo do período de análise e pelo aumento do teor em dióxido de carbono, que favorece a transição de uma respiração aeróbia para uma anaeróbia. De facto, no trabalho de Gomes *et al.* [40], foi referido que as concentrações de etanol e de acetato de etilo aumentavam devido ao stress causado pela falta de oxigénio. O acetato de etilo está frequentemente associado a um estado de maturação excessivo e/ou a um metabolismo anaeróbio [39]. Saquet *et al.* [49] verificou ainda que a produção de etanol era muito baixa à colheita, tendo aumentado drasticamente ao longo dos meses seguintes de conservação e ainda mais durante período *shelf-life*, acompanhando o processo de amadurecimento e senescência dos frutos.

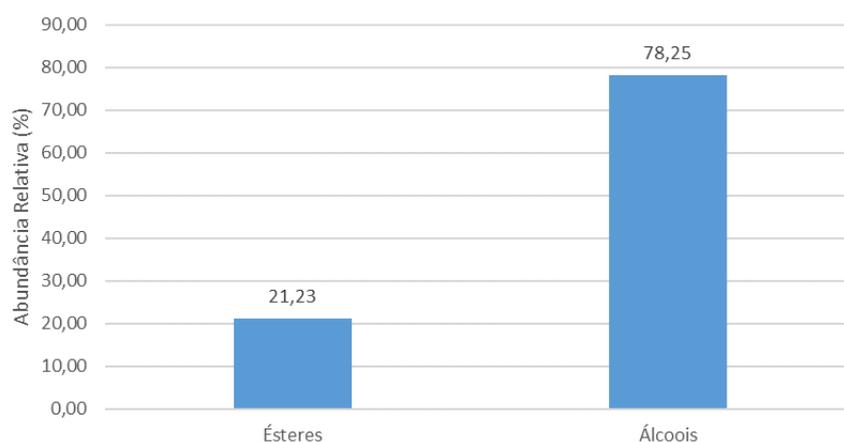


Figura 30 - Abundância relativa das várias famílias de compostos detetados por análise ao ar de um exsicador por GC-MS, contendo peras *Rocha* previamente armazenadas em AN, em condições *shelf-life*, durante uma semana a cerca de 23 °C.

Dos compostos detetados, foi possível quantificar cinco, a partir das retas de calibração preparadas (Tabela XIV).

Tabela XIV – Quantificação dos compostos presentes no ar de um exsicador, contendo peras *Rocha* previamente armazenadas em AN, em condições *shelf-life*, durante uma semana a cerca de 23 °C. Incerteza expandida com  $k=2$ . O (\*) indica uma quantificação com recurso à extrapolação da gama de trabalho, baseada na linearidade da reta de calibração.

Composto	Concentração (ppm)
Acetaldeído	$5,54 \pm 4,77$
Acetato de Etilo	$41,83 \pm 1,90$ *
Etanol	$705,90 \pm 124,50$
Acetato de Butilo	$0,33 \pm 0,20$
1-Butanol	$1,74 \pm 0,69$

Confirma-se que a concentração de etanol obtida é a mais elevada de todos os compostos, e que o terceiro composto mais abundante (acetaldeído) tem como precursor o etanol. Este facto confirma que,

mesmo em atmosferas com alto teor de oxigênio (no caso, peras armazenadas por longos períodos em AN e também no período *shelf-life*) existe produção de metabolitos fermentativos. Estes metabolitos podem também ser produzidos pelas condições do próprio exsiccador, uma vez que está isolado e poderá ter havido uma escassez de oxigênio durante a semana de *shelf-life*.

Num exsiccador com peras *Rocha* previamente armazenadas em ULO + AN, foram colocados zeólitos (NaY UOP, NaY GD, CBV e 5-A) durante o período de uma semana. Quando o exsiccador foi aberto, os zeólitos foram colocados em *vials* tapados num frigorífico, a uma temperatura de cerca de 2 °C para evitar a desorção de compostos até ao momento de análise.

Após desorção, os compostos voláteis obtidos a partir dos zeólitos NaY UOP (**Tabela XV**), NaY GD (**Tabela XVI**), CBV (**Tabela XVII**) e 5-A (**Tabela XVIII**) foram analisados.

Tabela XV – Compostos voláteis identificados na análise ao ar de um exsiccador por GC-MS, contendo peras *Rocha* previamente armazenadas em ULO + AN, em condições *shelf-life*, durante uma semana, a cerca de 23 °C. Zeólito NaY UOP.

TR	Nome	Prob	Área	Área (%)	Altura	Altura (%)
5,65	Acetaldeído	83,50	8,21E+08	3,06	2,08E+08	5,47
7,00	Propanal	35,30	2,02E+07	0,08	5,35E+06	0,14
7,45	Acetona	89,80	6,18E+08	2,31	1,57E+08	4,13
8,44	Butanal	84,10	7,71E+06	0,03	3,03E+06	0,08
8,53	Metacroleína	53,50	4,31E+06	0,02	2,23E+06	0,06
8,60	Acetato de Etilo	92,40	4,58E+06	0,02	2,29E+06	0,06
8,87	2-Butanona	65,40	1,21E+08	0,45	2,40E+07	0,63
9,29	Álcool Isopropílico	43,80	4,57E+07	0,17	1,51E+07	0,40
9,45	Etanol	59,90	2,46E+10	91,78	3,26E+09	85,67
10,12	Nitrato de Etilo	45,70	6,78E+06	0,03	2,77E+06	0,07
10,23	2-Pentanona	64,80	7,33E+07	0,27	1,81E+07	0,48
10,79	Trimetilsilanol	83,70	6,69E+07	0,25	1,01E+07	0,27
11,21	1-Propanol	92,10	1,92E+07	0,07	3,38E+06	0,09
13,49	Ácido (E) 3-(2-amino-1H-imidazol-5-il)prop-2-enóico	19,60	9,37E+07	0,35	2,43E+07	0,64
13,77	Nitrometano	82,10	5,41E+07	0,20	1,36E+07	0,36
14,26	2-Heptanona	11,90	5,98E+06	0,02	1,35E+06	0,04
15,18	Álcool Isoamílico	64,50	1,33E+08	0,50	2,93E+07	0,77
16,38	1-Pentanol	29,90	1,12E+07	0,04	3,17E+06	0,08
18,35	Isohexanol	28,10	6,52E+06	0,02	1,53E+06	0,04
19,74	1-Hexanol	49,00	8,94E+07	0,33	2,09E+07	0,55

Tabela XVI – Compostos voláteis identificados na análise ao ar de um exsicador, por GC-MS, contendo peras *Rocha* previamente armazenadas em ULO + AN, em condições *shelf-life*, durante uma semana, a cerca de 23 °C. Zeólito NaY GD.

TR	Nome	Prob	Área	Área (%)	Altura	Altura (%)
5,64	Acetaldeído	80,70	1,64E+07	5,43	3,84E+06	5,22
7,44	Acetona	84,00	1,09E+07	3,61	3,18E+06	4,33
8,86	2-Butanona	58,30	3,35E+06	1,11	9,94E+05	1,35
9,28	Álcool Isopropílico	19,10	1,79E+06	0,59	6,43E+05	0,87
9,44	Etanol	90,70	2,55E+08	84,37	6,16E+07	83,79
10,79	Trimetilsilanol	80,10	1,22E+07	4,04	2,72E+06	3,70
19,64	1-Hexanol	17,80	2,61E+06	0,86	5,40E+05	0,73

Tabela XVII – Compostos voláteis identificados na análise ao ar de um exsicador, por GC-MS, contendo peras *Rocha* previamente armazenadas em ULO + AN, em condições *shelf-life*, durante uma semana, a cerca de 23 °C. Zeólito CBV.

TR	Nome	Prob	Área	Área (%)	Altura	Altura (%)
5,62	Acetaldeído	80,00	2,88E+07	12,45	6,83E+06	13,07
7,42	Acetona	81,20	8,23E+06	3,56	2,30E+06	4,40
7,87	Octeno	16,00	1,20E+06	0,52	5,10E+05	0,98
9,42	Etanol	91,80	1,82E+08	78,70	4,00E+07	76,52
10,77	Trimetilsilanol	55,20	5,70E+06	2,46	1,45E+06	2,77
13,34	1-Butanol	23,90	2,91E+06	1,26	6,21E+05	1,19
19,64	1-Hexanol	11,40	2,43E+06	1,05	5,64E+05	1,08

Tabela XVIII – Compostos voláteis identificados na análise ao ar de um exsicador, por GC-MS, contendo peras *Rocha* previamente armazenadas em ULO + AN, em condições *shelf-life*, durante uma semana, a cerca de 23 °C. Zeólito 5-A.

TR	Nome	Prob	Área	Área (%)	Altura	Altura (%)
5,61	Acetaldeído	70,00	1,74E+07	12,75	4,88E+06	14,60
7,42	Acetona	88,30	8,84E+06	6,48	2,95E+06	8,82
8,41	Butanal	67,30	1,06E+06	0,78	5,42E+05	1,62
8,85	2-Butanona	69,20	1,24E+06	0,91	5,06E+05	1,51
9,42	Etanol	91,10	1,02E+08	74,72	2,31E+07	69,10
10,22	3-Metilbutanal	44,40	3,16E+06	2,31	7,51E+05	2,25
10,77	Trimetilsilanol	56,30	2,81E+06	2,06	7,03E+05	2,10

Relativamente aos compostos voláteis adsorvidos pelos zeólitos, verificou-se que, utilizando o NaY UOP, foram detetados 20 compostos (**Tabela XV**), enquanto os zeólitos NaY GD, CBV e 5-A detetaram, cada um, sete compostos (**Tabelas XVI-XVIII**). Em todas as análises foram detetados o acetaldeído, a acetona, o etanol e o trimetilsilanol. Para além destes compostos, o butanal foi detetado com os zeólitos NaY UOP e 5-A, a 2-butanona foi detetada nos zeólitos NaY UOP, NaY GD e 5-A, o álcool isopropílico no NaY UOP e NaY GD e o 1-hexanol nos zeólitos NaY UOP, NaY GD e CBV.

Em qualquer uma destas análises, os álcoois foram a família de compostos maioritários, sendo que o etanol é o composto responsável, dada a sua elevada abundância em todas as amostras (**Figura 31**). Esta abundância elevada pode ser explicada pela maturação já longa da pera *Rocha*, mas também pela possível fermentação alcoólica iniciada dentro do exsicador, motivada pela possível condição de

hipoxia, uma vez que o recipiente esteve fechado durante uma semana. O acetaldeído foi, em todas as análises, o segundo composto mais abundante.

A única análise onde se detetou ésteres foi utilizando o NaY UOP, mas mesmo assim a sua abundância relativa é bastante baixa face aos outros compostos. Este resultado contraria a conclusão do estudo de Gomes *et al.* [40], que refere que os ésteres, especialmente os acetatos, foram a família de compostos mais abundante nas suas análises com pera *Rocha* cortada e embalada em bolsas. O 1-butanol, caracterizado por um aroma metálico [16], também foi detetado apenas recorrendo à concentração pelo zeólito CBV, estando relatado que este álcool aumenta com o amadurecimento [39]. O acetato de butilo, composto maioritário em vários estudos com pera *Rocha* [16], [18], [40] e caracterizado por um aroma adocicado [16], [39], não foi detetado em nenhuma das análises anteriores.

Em todas as análises onde se utilizou a técnica de concentração dos compostos voláteis através de zeólitos e sua consecutiva desorção, foi detetado o composto trimetilsilanol. Atendendo às suas características, considera-se que é originado pela deformação do silicone do septo, causada pela exposição a temperaturas altas.

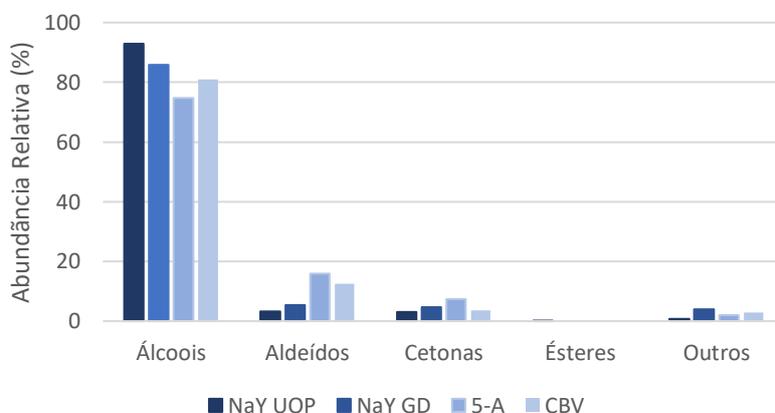


Figura 31 – Abundância relativa das várias famílias de compostos detetados por análise ao ar de um exsicador, contendo peras *Rocha* previamente armazenadas em ULO +AN, em condições *shelf-life*, durante uma semana a cerca de 23 °C, recorrendo aos diferentes zeólitos.

Foi possível realizar quantificações a três compostos voláteis identificados nas anteriores análises, recorrendo às retas de calibração anteriormente preparadas (**Tabela XIX**).

Tabela XIX – Quantificação dos compostos resultantes da desorção de zeólitos NaY GD, CBV e 5-A, expostos a um exsicador, contendo peras *Rocha* previamente armazenadas em ULO + AN, em condições *shelf-life*, durante uma semana a cerca de 23 °C. Incerteza expandida com  $k=2$ . O (\*) indica uma quantificação com recurso à extrapolação da gama de trabalho, baseada na linearidade da reta de calibração.

Composto	Concentração (ppm)			
	NaY UOP	NaY GD	CBV	5-A
Acetaldeído	2013,34 ± 39,70 *	39,34 ± 4,76	69,77 ± 4,83	41,80 ± 4,76
Etanol	37841,63 ± 2556,79 *	393,65 ± 127,91	281,36 ± 129,99	158,30 ± 132,76
Acetato de Etilo	1,46 ± 0,20	-	-	-
1-Butanol	-	-	1,11 ± 0,70	-

Não é possível realizar uma comparação direta entre os resultados obtidos pela análise ao ar do exsicador e os obtidos pela desorção dos zeólitos, dado que as peras foram armazenadas em condições diferentes. Pela análise à **Tabela XIX**, é também possível observar que o zeólito NaY UOP, sujeito às mesmas condições que os outros zeólitos, foi o adsorvente que obteve uma maior concentração dos analitos quantificados. Verifica-se também que a quantificação de compostos concentrados pelos restantes zeólitos, apesar de divergente, foi situada na mesma ordem de grandeza. Este facto poderá ser devido a uma maior afinidade do zeólito NaY UOP aos compostos nas condições estudadas, cuja confirmação deverá ser realizada recorrendo a uma maior repetibilidade de ensaios. No entanto, é possível constatar que, tal como Kim *et al.* [101] observou, os zeólitos NaY tiveram melhores capacidades de adsorção de etanol do que a mordenite CBV, nas mesmas condições. Verifica-se assim que os valores obtidos pela quantificação de etanol seguem uma ordem crescente de 5-A < CBV < NaY GD < NaY UOP e que os de acetaldeído seguem a ordem crescente de NaY GD < 5-A < CBV < NaY UOP. Esta afirmação está sujeita à confirmação por um maior número de ensaios. Estes ensaios podem permitir a seleção de zeólitos para a sua inserção em dispositivos a construir e a ser utilizados na otimização de atmosferas das câmaras de conservação.

Relativamente às análises por GC-FID para a determinação da concentração de etileno no ar do exsicador, foi determinado que as peras armazenadas em condições ULO + AN revelaram uma maior concentração do que as que foram armazenadas apenas em condições AN (**Tabela XX**). De facto, Saquet e Almeida [20], num trabalho com pera *Rocha* em *shelf-life*, em que colocaram 4 exemplares de peras num recipiente durante 2 horas, observaram que a taxa de produção de etileno era maior nos primeiros dias, diminuindo depois. Verificaram que as peras conservadas em condições ULO tinham uma maior taxa de produção de etileno, havendo uma quebra de cerca de 42% seis dias depois, face ao valor mais alto. Já a taxa de produção de etileno em peras armazenadas em atmosferas AN apresentou um pico, também ao terceiro dia e mais reduzido face às peras armazenadas em ULO. Este aumento inicial é devido ao facto de que as frutas estavam sujeitas a atmosferas que reduzem drasticamente o seu metabolismo, sendo que, quando são colocadas à temperatura e aos níveis de oxigénio ambientes, a sua resposta metabólica é potenciada. As peras armazenadas em atmosfera ULO, ao passarem para uma AN, tiveram um aumento metabólico motivado pelo aumento do teor de oxigénio, e quando desta atmosfera passaram para condições *shelf-life*, houve um novo aumento,

potenciado pelo aumento de temperatura. Já as peras unicamente armazenadas em AN, o aumento metabólico foi apenas potenciado pelo aumento de temperatura. Também em [109] verifica-se que, em peras *Rocha* armazenadas durante mais de oito meses, houve maior produção de etileno em período *shelf-life* em frutos armazenados em atmosferas ULO face a AC. Assim, torna-se natural que as peras armazenadas em ULO + AN tenham uma maior produção de etileno em *shelf-life* face às peras unicamente armazenadas em AN, nas mesmas condições.

Tabela XX - Quantificação de etileno por análise ao ar de dois exsiccadores, contendo peras *Rocha* previamente armazenadas em AN e em ULO + AN, em condições *shelf-life*, durante uma semana a cerca de 23 °C.

Atmosfera de Conservação	Concentração (ppm)
AN	111,72
ULO + AN	239,11

## 4.6. Campanha de 2020/2021

### 4.6.1. Análises por GC-MS

Em relação à análise da atmosfera da câmara 7 relativa à campanha de 2020/2021, foram recolhidas três amostras, duas no dia 06/04 com dois zeólitos (CBV e 5-A) e uma a 13/04 com o zeólito NaY UOP. Em ambos os casos, os zeólitos foram colocados na câmara sete dias antes (30/03 e 06/04, respetivamente).

Quanto aos compostos voláteis libertados pela desorção dos zeólitos CBV e 5-A, verificou-se que, para o primeiro, foram detetados 15 compostos (**Tabela XXI**) e, para o segundo, 16 compostos (**Tabela XXII**).

Tabela XXI - Compostos voláteis identificados por GC-MS, resultantes da desorção de zeólito CBV, exposto durante uma semana na câmara 7 (06/04/2021).

TR	Nome	Prob	Área	Área (%)	Altura	Altura (%)
5,67	Acetaldeído	84,30	1,40E+08	4,52	3,44E+07	4,66
7,00	Propanal	49,80	2,10E+06	0,07	6,11E+05	0,08
7,47	Acetona	91,20	1,02E+08	3,29	2,84E+07	3,85
8,44	Butanal	37,50	2,32E+06	0,07	8,58E+05	0,12
8,54	Metacroleína	31,90	7,32E+05	0,02	3,09E+05	0,04
8,60	Acetato de Etilo	84,70	1,19E+06	0,04	5,66E+05	0,08
8,88	(5E,9E) - 6,10-Dimetildodeca-5,9-dien-2-ona	62,10	1,86E+07	0,60	4,52E+06	0,61
9,29	Álcool Isopropílico	58,20	1,12E+07	0,36	4,01E+06	0,54
9,45	Etanol	91,00	2,75E+09	88,81	6,46E+08	87,53
10,23	2-Pentanona	56,30	8,58E+06	0,28	2,51E+06	0,34
10,79	Trimetilsilanol	76,80	4,76E+06	0,15	1,88E+06	0,25
11,87	Acetato de Butilo	34,70	1,72E+06	0,06	8,52E+05	0,12
13,48	1-Butanol	66,50	3,62E+07	1,17	8,93E+06	1,21
13,94	Nitrometano	86,40	1,33E+07	0,43	3,40E+06	0,46
19,75	1-Hexanol	14,80	3,87E+06	0,13	8,68E+05	0,12

Tabela XXII - Compostos voláteis identificados por GC-MS, resultantes da desorção de zeólito 5-A, exposto durante uma semana na câmara 7 (06/04/2021).

TR	Nome	Prob	Área	Área (%)	Altura	Altura (%)
5,37	Hexano	23,20	4,59E+06	0,19	1,15E+06	0,19
5,64	Acetaldeído	83,30	2,14E+08	8,96	5,35E+07	8,88
6,98	Propanal	46,70	7,01E+06	0,29	1,89E+06	0,31
7,44	Acetona	92,20	1,28E+08	5,35	3,65E+07	6,05
8,42	Butanal	77,20	6,19E+06	0,26	2,31E+06	0,38
8,52	Metacroleína	47,30	1,66E+06	0,07	7,64E+05	0,13
8,86	2-Butanona	77,40	1,82E+07	0,76	5,40E+06	0,89
9,12	3-Metilbutanal	56,10	3,54E+06	0,15	1,13E+06	0,19
9,27	Álcool Isopropílico	30,70	8,74E+06	0,37	2,84E+06	0,47
9,43	Etanol	91,10	1,81E+09	75,54	4,80E+08	79,61
10,22	2-Pentanona	60,50	1,46E+07	0,61	4,07E+06	0,68
10,78	Trimetilsilanol	82,10	4,21E+06	0,18	1,80E+06	0,30
13,45	2-Butanol	60,90	1,52E+08	6,37	6,01E+06	1,00
13,94	Nitrometano	85,20	1,53E+07	0,64	4,34E+06	0,72
14,98	2-Heptanona	32,00	3,98E+06	0,17	6,67E+05	0,11
19,75	1-Hexanol	14,00	2,56E+06	0,11	5,38E+05	0,09

Onze compostos comuns foram detetados na desorção dos zeólitos testados, sendo em ambos os casos o etanol e o acetaldeído os voláteis com maior abundância relativa. No caso do zeólito CBV, a acetona e o 1-butanol são os voláteis com abundâncias relativas ainda superior a 1%. Relativamente ao zeólito 5-A tem-se também, por ordem de abundância, o 2-butanol e a acetona, respetivamente. O hexano, a 2-butanona, o 3-metilbutanal, o 2-butanal e a 2-heptanona foram detetados também detetados quando empregado o zeólito 5-A, enquanto que o acetato de etilo, a (5E,9E)-6,10-dimetildodeca-5,9-dien-2-ona, o acetato de butilo e o 1-butanol foram apenas detetados com o zeólito CBV.

Da análise dos resultados, verifica-se que o grupo de compostos mais abundante é o dos álcoois, seguido do dos aldeídos (**Figura 32**). Resultados semelhantes foram obtidos por Deuchande *et al.* [34], que referem que o abaixamento dos teores de oxigénio na atmosfera de armazenamento da pera *Rocha* aumenta de forma drástica as concentrações de etanol e acetaldeído, uma vez que são produtos da metabolização anaeróbia. No entanto, em frutos onde foi aplicado 1-MCP, esperar-se-ia uma menor produção de metabolitos fermentativos, dado que os recetores de etileno seriam bloqueados, prevenindo assim os processos fisiológicos de amadurecimento [52]. Em trabalhos com kiwis, por exemplo, observou-se que a aplicação de 1-MCP reduziu a produção de acetaldeído e de etanol, inibindo a atividade das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase [113]. No entanto, deve-se considerar o longo período de conservação das peras em condições de AC, que origina uma maior produção de metabolitos fermentativos.

Apesar de ambos os zeólitos estarem presentes na mesma atmosfera, durante o mesmo período de tempo, a sua capacidade de adsorção é diferente para os diferentes compostos. A utilização de diferentes zeólitos pode condicionar a caracterização de uma mesma atmosfera.

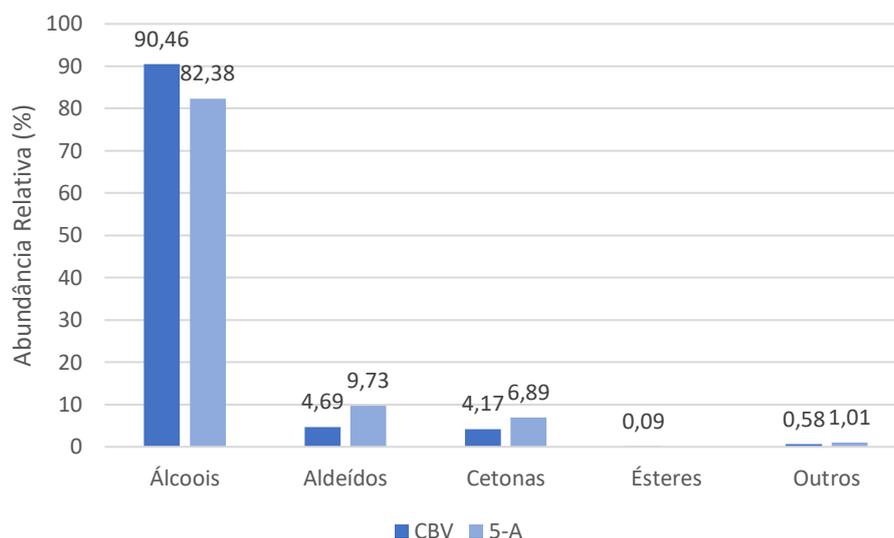


Figura 32 - Abundância relativa das várias famílias de compostos detetados resultantes da desorção de zeólito CBV e 5-A, expostos durante uma semana na câmara 7 (06/04/2021).

Através das retas de calibração preparadas, foi feita a quantificação de alguns dos compostos voláteis mais detetados (**Tabela XXIII**).

Tabela XXIII - Quantificação dos compostos resultantes da desorção de zeólito CBV e 5-A, exposto durante uma semana na câmara 7 (06/04/2021). Incerteza expandida com  $k=2$ . O (\*) indica uma quantificação com recurso à extrapolação da gama de trabalho, baseada na linearidade da reta de calibração.

Composto	Concentração (ppm)	
	CBV	5-A
Acetaldeído	342,87 ± 7,89 *	524,25 ± 10,97 *
Acetato de Etilo	0,29 ± 0,21	-
Etanol	4235,83 ± 265,08 *	2778,10 ± 182,53 *
Acetato de Butilo	0,30 ± 0,20	-
1-Butanol	14,28 ± 0,85 *	-

Foi também possível realizar uma análise à mesma câmara, recorrendo ao zeólito NaY UOP, referentes à semana iniciada no dia 06/04 (**Tabela XXIV**). Nesta análise foram detetados 12 compostos, menos do que nas análises anteriormente referidas.

Tabela XXIV - Compostos voláteis identificados por GC-MS, resultantes da desorção de zeólito NaY UOP, exposto durante uma semana na câmara 7 (13/04/2021).

TR	Nome	Prob	Área	Área (%)	Altura	Altura (%)
5,64	Acetaldeído	84,80	2,84E+08	11,03	7,45E+07	11,76
7,45	Acetona	90,80	1,10E+08	4,27	3,18E+07	5,02
7,98	2-Propenal	86,60	1,97E+06	0,08	6,63E+05	0,10
8,44	Butanal	33,10	1,52E+06	0,06	6,65E+05	0,11
8,52	Metacroleína	69,40	1,78E+06	0,07	7,97E+05	0,13
8,87	2-Butanona	40,10	1,59E+07	0,62	4,13E+06	0,65
9,29	Álcool Isopropílico	65,40	4,65E+06	0,18	1,64E+06	0,26
9,44	Etanol	90,70	2,11E+09	81,89	5,07E+08	80,08
10,24	2-Pentanona	69,00	5,64E+06	0,22	1,82E+06	0,29
10,79	Trimetilsilanol	74,30	2,16E+06	0,08	9,07E+05	0,14
13,49	1-Butanol	54,70	1,92E+07	0,74	4,28E+06	0,68
13,96	Nitrometano	90,80	1,97E+07	0,77	4,94E+06	0,78

Nesta análise, novamente, os metabolitos fermentativos foram os que obtiveram uma maior abundância relativa, especialmente o etanol. A sua elevada concentração fez com que os álcoois fossem a família de compostos mais abundante na amostra, seguido dos aldeídos e das cetonas. Nenhum éster foi detetado (**Figura 33**). A não deteção de ésteres (**Figuras 32 e 33**) pode ser causada pela aplicação de 1-MCP, tendo sido já descrito que este antagonista reduz a produção desta família de compostos [38], [61], [67]. Dos compostos detetados, apenas o 2-propenal não foi detetado nas análises com os anteriores zeólitos. Comparando os resultados dos dois compostos maioritários, comuns às análises com os três zeólitos, observa-se que houve um aumento da abundância relativa do acetaldeído quando utilizado o zeólito NaY UOP. Na análise recorrendo a este adsorvente, o etanol teve uma abundância relativa com valores intermédios face às análises com os anteriores zeólitos, sendo o CBV o que teve uma maior abundância deste composto.

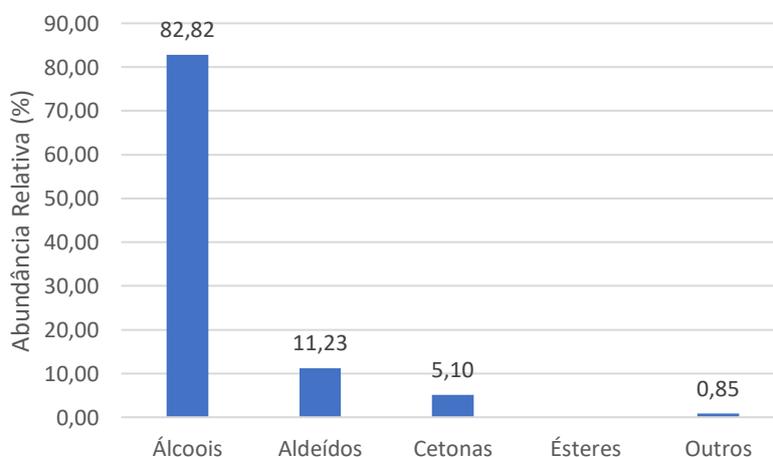


Figura 33 - Abundância relativa das várias famílias de compostos detetados resultantes da desorção de zeólito NaY UOP, exposto durante uma semana na câmara 7 (13/04/2021).

Foi também possível quantificar alguns dos compostos (**Tabela XXV**). Apesar das amostragens anteriores não serem referentes ao mesmo espaço temporal que esta amostragem, considera-se que a diferença de produção não alterou substancialmente de uma semana para a outra, uma vez que as condições de armazenamento e os frutos foram os mesmos. Observa-se então que com CBV se detetou maior concentração de etanol e de 1-butanol, e que com o zeólito NaY UOP foi detetada maior concentração de acetaldeído.

Tabela XXV - Quantificação dos compostos resultantes da desorção de zeólito NaY UOP, exposto durante uma semana na câmara 7 (13/04/2021). Incerteza expandida com  $k=2$ . O (\*) indica uma quantificação com recurso à extrapolação da gama de trabalho, baseada na linearidade da reta de calibração.

Composto	Concentração (ppm)
Acetaldeído	695,34 ± 14,11 *
Etanol	3243,60 ± 207,24 *
1-Butanol	7,54 ± 0,69 *

Nas análises realizadas por GC-MS às atmosferas das câmaras de conservação, foi concluído que o composto que as peras produzem em maior quantidade é o etanol, seguido do acetaldeído. Este facto é devido ao longo período de conservação a que as peras foram sujeitas, não obstante da aplicação de 1-MCP. Devido ao reduzido número de ensaios, não foi possível estabelecer relações entre as características físico-químicas dos frutos e os compostos voláteis produzidos ao longo do tempo. De igual forma, não foi possível estabelecer comparações entre compostos voláteis produzidos por frutos em atmosferas de conservação diferentes.

Apesar de os zeólitos terem estado sujeitos às mesmas condições, e apesar de terem sido observadas abundâncias relativas relacionáveis, as concentrações obtidas são muito diferentes entre análises, o que leva a questionar a caracterização das atmosferas por este método. No entanto, admitindo variabilidade entre ensaios (e ainda mais por se tratarem de amostras provenientes de organismos vivos), esta afirmação não pode ser confirmada neste estudo, uma vez que cada amostra só foi analisada uma única vez e não foi continuada ao longo do período de armazenamento e conservação da pera *Rocha*.

#### 4.6.2. Análises por GC-FID

A detecção de etileno é normalmente realizada através de GC-FID, uma vez que a detecção por GC-MS é difícil, dado que a massa nominal deste composto coincide com a do nitrogénio ( $m/z$  28) [56]. Desta forma, e através do método otimizado de análises por GC-FID, assim como o método de concentração de voláteis e sua posterior desorção, foi possível analisar a evolução da concentração de etileno em cada câmara ao longo de um certo período de conservação. A câmara 7 (4,0% O<sub>2</sub> + 1-MCP) foi analisada semanalmente desde 3 de março até 11 de maio, sendo que as restantes câmaras foram analisadas desde 4 de maio até 11 de maio (**Figura 34**).

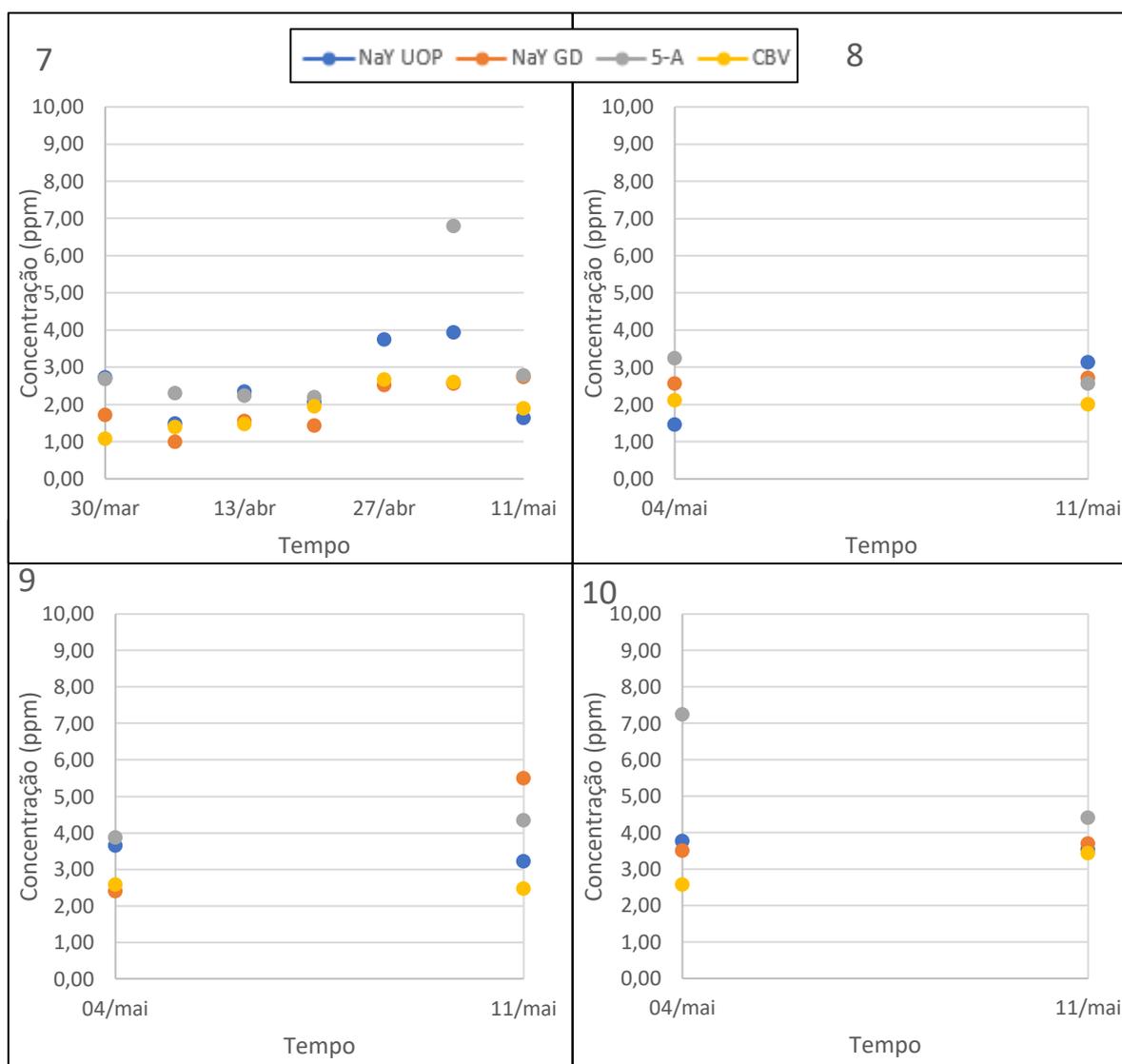


Figura 34 - Evolução da concentração de etileno ao longo do tempo em diferentes câmaras, utilizando diferentes zeólitos. Colheita de 2020/2021. GC-FID.

A primeira conclusão que se obtém pela observação da **Figura 33** é que, em todas as câmaras, geralmente todos os valores estão presentes na gama dos ppm [57] e, apesar de obtidos recorrendo a

adsorventes diferentes, seguem o mesmo padrão ao longo do tempo. Verificam-se ainda alguns pontos que se distanciam do padrão seguido pelos dos outros zeólitos, podendo estes ser devido a algum erro experimental ou *outlier*. Para uma maior consistência dos resultados, cada amostra deveria ter sido repetida. Convém referir ainda que, pelas condições de funcionamento das câmaras, existe por vezes uma remoção de algum componente maioritário da atmosfera que tenha ultrapassado o limite programado. Estas remoções de compostos, como o oxigénio ou o dióxido de carbono, fazem com que o etileno e outros compostos voláteis também sejam removidos da atmosfera do interior da câmara de conservação. Esta remoção pode provocar oscilações nas concentrações de etileno obtidas. Da mesma forma, uma abertura mais prolongada das câmaras poderá resultar na saída de etileno.

Relativamente à relação entre os valores obtidos de concentração de etileno e as atmosferas de conservação a que os frutos foram sujeitos, verifica-se que a produção deste composto é maior em câmaras com maior teor de oxigénio. Avaliando o mesmo período temporal (de 4 a 11 de maio), observa-se que os frutos armazenados nas câmaras 9 e 10, com condições AN e AC (21% e 2,5% de O<sub>2</sub>, respetivamente) libertaram maiores concentrações de etileno face às câmaras 7 e 8, sujeitas a condições de aplicação de 1-MCP e ULO (4% e 0,5%, respetivamente). A câmara 7, tendo um nível de oxigénio superior ao da câmara 10, registou, no entanto, níveis de produção de etileno inferiores. Este facto é devido à aplicação de 1-MCP ao início do período de conservação, confirmando a ação deste produto de aplicação pós-colheita na inibição e bloqueio dos recetores de etileno [38].

Os quatro tipos de adsorventes foram utilizados neste estudo. Observa-se que o zeólito CBV concentrou uma menor quantidade de etileno quando comparado com os valores obtidos utilizando outros zeólitos, em todas as câmaras. Notou-se também que, na câmara 7, os valores obtidos através dos zeólitos NaY UOP e 5-A foram semelhantes entre eles e superiores aos demais.

#### 4.7. Campanha de 2021/2022

Na campanha de 2021/2022, não foi possível proceder à análise dos compostos por GC-MS, tendo sido realizada apenas a quantificação de etileno, através da técnica de GC-FID. Foi possível analisar a evolução da concentração de etileno nas quatro câmaras de conservação estudadas, desde 19 de agosto a 16 de setembro, perfazendo um total de cinco semanas (**Figura 35**).

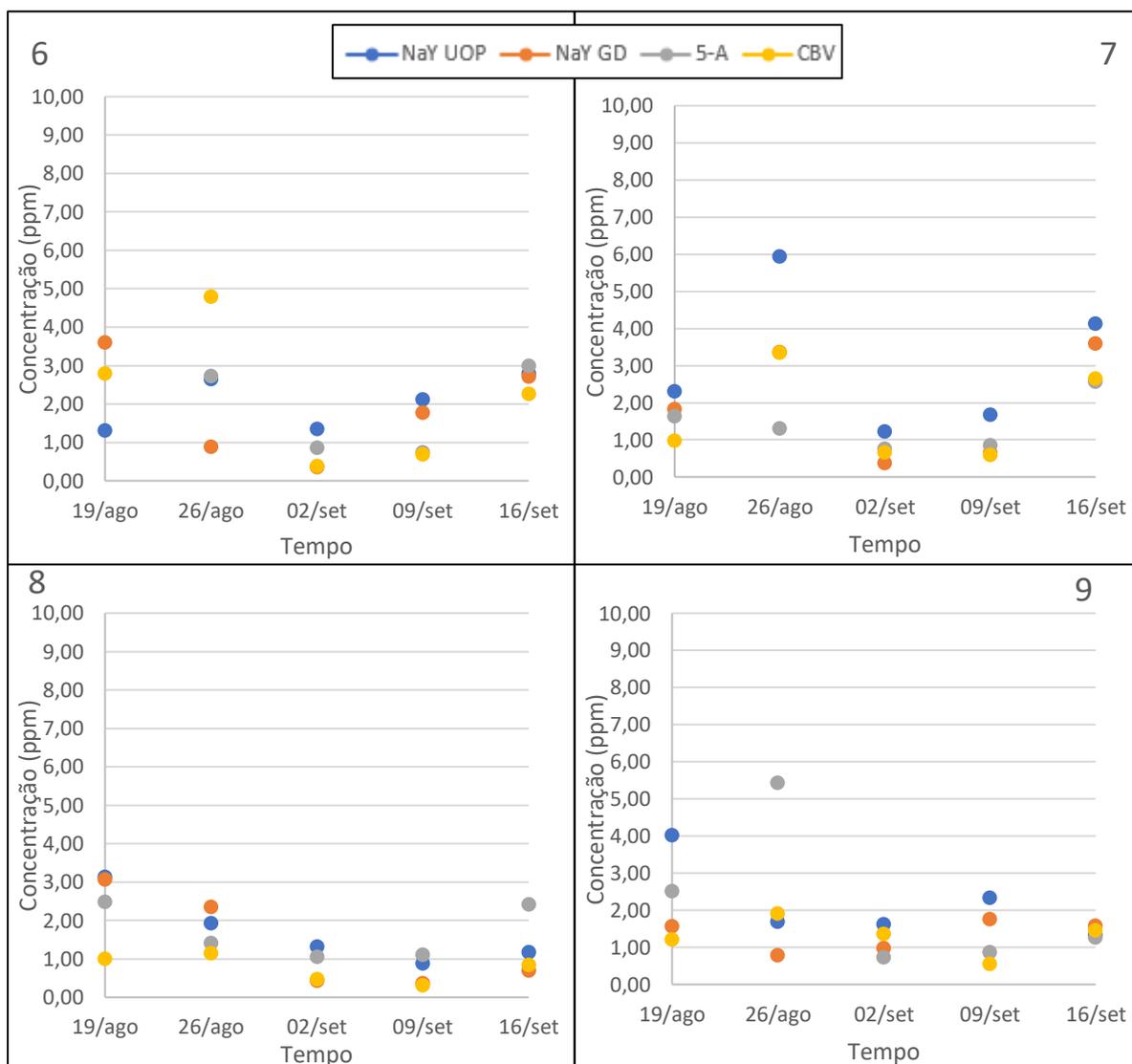


Figura 35 - Evolução da concentração de etileno ao longo do tempo em diferentes câmaras, utilizando diferentes zeólitos. Colheita de 2021/2022. GC-FID.

Ao observar a figura, é notório, mais uma vez, que os valores obtidos através da concentração pelos quatro tipos de adsorventes geralmente seguem o mesmo padrão ao longo do período de análise. Observa-se a existência de alguns valores mais altos do que os restantes, podendo ser devidos a erros experimentais, sendo que seria necessário ter sido realizado uma maior repetibilidade de ensaios. É

relevante referir que, durante a amostragem iniciada no dia 2 de setembro, houve a existência de um mal funcionamento do sistema controlador da atmosfera das câmaras, tendo sido registado uma atividade fora do normal. Estes eventos podem ser a explicação de, em todas as câmaras, a concentração de etileno tenha sido bastante reduzida nas amostragens iniciadas a dia 2 e 9 de setembro.

Ao comparar a **Figura 34** com a **Figura 35**, é possível constatar que as concentrações de etileno obtidas na campanha de 2021/2022 são inferiores às obtidas na campanha 2020/2021, uma vez que as frutas, no período de análise, se encontravam em períodos distintos da conservação (**Figura 36**). A pera, ao ser colocada na câmara de conservação, estabiliza o processo de maturação, sendo semelhante, nestes termos, a frutas não-climáticas. No entanto, este processo vai evoluindo e, por isso, observa-se que os valores da concentração de etileno aumentam ao longo do tempo, aumentando com o estado de maturação dos frutos [38], [114]. Verifica-se ainda que as câmaras 8 e 9, que contêm atmosferas com teores mais altos de oxigênio, revelaram uma menor concentração de etileno do que a câmara 7, com menor teor de oxigênio. Comparando a câmara 6 e 8, cujas condições de atmosfera apenas divergem na aplicação de 1-MCP, observa-se que os resultados obtidos revelam que a produção de etileno é maior em frutos onde foi aplicado este antagonista. Estes resultados são, por tudo o que foi anteriormente referido, contraditórios. Desta forma, e uma vez que cada resultado obtido não foi sustentado por repetições, e dado que houve uma maior oscilação no sistema controlador das atmosferas das câmaras, não se poderá retirar ilações destes resultados, relativamente à produção de etileno.

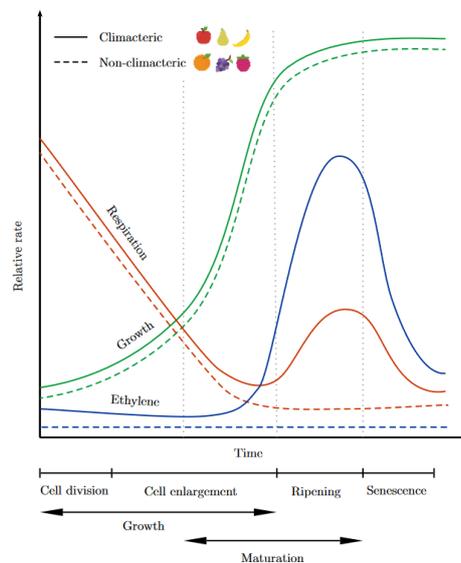


Figura 36 - Relação entre estado fisiológico com a produção de etileno, taxa de respiração e crescimento em frutas climáticas e não climáticas. Retirado de [115].

É possível constatar, no entanto, que o zeólito NaY UOP é, por norma, o adsorvente que mais etileno concentrou. O zeólito CBV confirmou que não será uma boa escolha para a remoção de etileno das câmaras, uma vez que, salvo algumas exceções, é o adsorvente que menos concentra este composto.

## 5. Conclusão e Perspetivas Futuras

O objetivo principal deste trabalho foi a caracterização de diferentes atmosferas utilizadas na conservação de peras sujeitas a longo armazenamento (cerca de dez meses). A técnica de cromatografia gasosa foi utilizada para identificar e quantificar os compostos voláteis produzidos pelos frutos durante a sua permanência na câmara frigorífica, e nas atmosferas instaladas. Estes resultados, idealmente, poderiam ser relacionados com as características físico-químicas e fisiológicas determinadas nos frutos após a conservação e permitir a criação de um modelo de previsão de abertura das câmaras antes do aparecimento dos problemas fisiológicos.

A avaliação inicial da evolução da produção de compostos voláteis foi realizada em testes que simulam o período *shelf-life* das peras, em temperatura ambiente e recipiente fechado/exsicador.

Nas restantes análises, foram utilizadas peras *Rocha* provenientes das colheitas de agosto de 2020 e de agosto de 2021, armazenadas em quatro diferentes atmosferas. À chegada ao RochaCenter, foi verificado que as peras provenientes da campanha de 2020/2021 tinham um estado de maturação mais elevado do que as peras da campanha de 2021/2022. Esta afirmação está sustentada pelos valores de firmeza da polpa e o índice de Streiff, que foram inferiores ao valor mínimo de referência, tendo também sido concluído que os valores de IR das duas colheitas estão dentro dos valores padrão e ainda que os valores da taxa de regressão de amido (TRA) médios da colheita de 2021 se situavam abaixo do intervalo de referência. No final do período de conservação da colheita de 2020 (maio de 2021) e após sete dias em período *shelf-life*, foi verificada uma redução da firmeza, especialmente em frutos armazenados em atmosferas com *ultra-low oxygen* (ULO) e atmosfera controlada (AC) (2,5% de O<sub>2</sub>). A aplicação de 1-MCP impediu o amadurecimento nas peras após a colheita dos frutos e a consequente redução de firmeza. Os valores do índice refratométrico (IR) aumentaram durante o período de *shelf-life* e não se observaram diferenças em relação aos valores obtidos para frutos conservados em câmaras de AC e ULO. Em câmaras com atmosfera normal (AN), o valor de IR foi menor. Observou-se incidência de escaldão superficial apenas em fruta armazenada em condições AN, não se tendo verificado acastanhamentos internos em nenhuma câmara.

Uma vez que a concentração de compostos voláteis presentes na atmosfera das câmaras é muito reduzida (ppm ou ppb), a injeção direta de amostras no cromatógrafo gasoso não permitia uma identificação desses compostos, pelo que foi necessário recorrer à alternativa de utilizar adsorventes – zeólitos – para a extração e concentração dos voláteis. Assim, os zeólitos utilizados (NaY, da UOP e da GD, 5-A da Sigma Aldrich e CBV 10-A da Zeolyst) foram expostos semanalmente e repetitivamente às atmosferas de diferentes câmaras de conservação.

Dada a utilização de zeólitos, verificou-se a necessidade de desenvolver e otimizar um procedimento para a desorção dos compostos adsorvidos. Concluiu-se que os melhores resultados foram obtidos quando os adsorventes foram colocados durante 45 minutos numa estufa aquecida a 200 °C. Atendendo ao volume a analisar, para zeólitos expostos ao ar de exsicadores, foi verificado que a

quantidade a colocar em *vials* de 10 mL seria de 50 mg enquanto que, para os zeólitos expostos às atmosferas das câmaras, a quantidade seria de 100 mg.

A deteção e quantificação de compostos voláteis no cromatógrafo gasoso foi realizada recorrendo a um detetor MS e, no caso do etileno, a um detetor FID.

Com recurso a amostras padrão de alguns dos possíveis compostos voláteis libertados pelos frutos, foram efetuadas calibrações de seis voláteis que, em trabalhos anteriores, tinham uma abundância relativa elevada. As correlações obtidas foram analisadas relativamente à linearidade, à homoscedasticidade de variâncias e à possível existência de *outliers* por vários testes estatísticos, todos com intervalos de confiança de 99%. Verificou-se que todas as retas se revelaram adequadas à resposta instrumental e, por isso, à quantificação da concentração do respetivo composto volátil. Foram também determinadas as incertezas associadas a cada quantificação, exceto para as quantificações de etileno e respetivas retas de calibração.

Nas análises realizadas por GC-MS aos voláteis produzidos pelas peras *Rocha* no período *shelf-life* e nas atmosferas das câmaras de conservação, foram detetados 29 compostos, dos quais oito são pertencentes ao grupo dos álcoois, seis aos aldeídos, cinco às cetonas e três aos ésteres, entre outros. A família de compostos mais abundante foi a dos álcoois com uma abundância relativa superior a 70% em qualquer das situações analisadas. Foi também concluído que o composto que as peras produzem em maior quantidade é o etanol, seguido do acetaldeído. Este facto é devido ao longo período de conservação a que as peras foram sujeitas e, pelas condições de hipoxia originadas no decurso do período *shelf-life*. Devido ao reduzido número de ensaios, não foi possível estabelecer relações entre as características físico-químicas dos frutos e os compostos voláteis produzidos ao longo do tempo, bem como estabelecer comparações entre compostos voláteis produzidos por peras armazenadas em diferentes atmosferas de conservação.

Relativamente às análises por GC-FID para a determinação da concentração de etileno no ar do exsicador (período *shelf-life*), foi determinado que as peras armazenadas em condições ULO + AN revelavam uma maior concentração do que as que foram armazenadas apenas em condições AN. As peras armazenadas em atmosfera ULO, ao passarem para uma AN, tiveram um aumento metabólico motivado pelo aumento do teor de oxigénio, e quando desta atmosfera passaram para condições *shelf-life*, houve um novo aumento, potenciado pelo aumento de temperatura. Já as peras unicamente armazenadas em AN, o aumento metabólico foi apenas potenciado pelo aumento de temperatura. Assim, torna-se natural que as peras armazenadas em ULO + AN tenham uma maior produção de etileno face às peras unicamente armazenadas em AN, nas mesmas condições.

Foi realizada uma monitoração da concentração de etileno em diferentes câmaras ao longo do período de conservação. As concentrações de etileno obtidas nas peras da colheita de 2021 são inferiores às obtidas na colheita 2020, uma vez que as frutas, no período de análise, se encontravam em estados de conservação diferentes. As análises foram realizadas no final da conservação da colheita de 2020 (de março a maio de 2021) e no início da conservação da colheita de 2021 (agosto e setembro de 2021).

Relativamente a estas análises, foi possível constatar que o zeólito NaY UOP é, por norma, o adsorvente que mais etileno concentrou. Obteve-se também a conclusão de que o zeólito CBV não será uma boa escolha para a remoção de etileno das câmaras, uma vez que, salvo algumas exceções, é o adsorvente que menos concentra este composto.

Como primeira perspetiva para trabalhos futuros, seria necessário realizar ensaios análogos com maior repetibilidade e, se possível, realizá-los ao longo de todo o período de conservação.

Será necessário testar a aplicação de outros adsorventes com maior afinidade aos compostos voláteis produzidos. Após um estudo mais alargado utilizando a técnica usada neste trabalho, com maior repetibilidade de ensaios, será mais facilmente concluído qual será o melhor adsorvente a ser empregue e estabelecer relações entre os compostos produzidos e o estado fisiológico das peras. No seguimento, poderá ser interessante comparar a evolução da produção de compostos voláteis por peras colhidas em diferentes estados de maturação e, novamente, estabelecer relações entre a caracterização físico-química dos frutos e os compostos voláteis por eles produzidos. Contudo, a utilização destes adsorventes poderá ser interessante em filtros ou fotorreatores para a otimização da atmosfera de conservação, constituindo-se como uma alternativa a algumas metodologias utilizadas, estando até sendo executados noutros estudos no âmbito do projeto Nano4Fresh – Nanomaterials for an environmentally friendly and sustainable handling of perishable products, (PRIMA/0016/2019).

Em estudos posteriores, é aconselhável que se utilize outra técnica ou que se otimize a recolha de voláteis. A metodologia utilizada é bastante suscetível a fugas, e limitada pelas condições dos próprios equipamentos, como os septos, que não foram desenhados para esta aplicação. Da mesma forma, deverá ser melhorada a forma como os adsorventes são aplicados. Durante este trabalho, as câmaras foram semanalmente abertas para introduzir e remover zeólitos, o que não favorece a monitorização dos compostos voláteis ao longo do tempo, dada a troca gasosa com o exterior da câmara que se verifica nestes momentos. Seria importante a implementação de um sistema que permitisse a passagem do ar da atmosfera da câmara por um dispositivo composto pelos adsorventes, e que o fluxo de ar a passar por esse dispositivo pudesse ser controlado, aquando da remoção dos adsorventes. Caso este sistema não seja possível de implementar, poderá ser interessante retirar alguns exemplares de peras no dia em que se pretenda realizar análises, e colocá-los num recipiente fechado, como um exsiccador, e analisar a atmosfera interior, uma vez que para este cenário, como se comprovou, não haverá necessidade de utilizar adsorventes, podendo ser analisada por injeção direta no cromatógrafo. Poderá também ser interessante a implementação de um sistema de *HS-SPME*, dada a sua versatilidade e facilidade de utilização.

## 6. Bibliografia

- [1] ANP - Associação Nacional de Produtores de Pera Rocha, “Pera Rocha.” <http://www.perarocha.pt> (accessed Feb. 28, 2021).
- [2] D. Almeida, “Novas recomendações para o armazenamento prolongado de pera ‘ Rocha ’ produzida na região Oeste de Portugal,” *Pre-print da comunicação apresentada ao VIII Congresso Ibérico de Ciências Hortícolas, Coimbra, Portugal, 7 a 10 de junho de 2017*, pp. 1–8, 2017, [Online]. Available: [https://www.isa.ulisboa.pt/files/fl/pub/articles/2017-07/Almeida\\_Recomendacoes\\_armazenamento\\_pera\\_Rocha\\_Congresso\\_Iberico\\_Ciencias\\_Hortícolas.pdf](https://www.isa.ulisboa.pt/files/fl/pub/articles/2017-07/Almeida_Recomendacoes_armazenamento_pera_Rocha_Congresso_Iberico_Ciencias_Hortícolas.pdf).
- [3] S. I. Pedro *et al.*, “Physicochemical fingerprint of ‘Pera Rocha do Oeste’. A PDO pear native from Portugal,” *Foods*, vol. 9, no. 9, pp. 1–16, 2020, doi: 10.3390/foods9091209.
- [4] DRAP, “Produtos Tradicionais de Qualidade na Região Centro - Pera Rocha do Oeste - DOP.” <https://www.ptqc.drappc.gov.pt/> (accessed Feb. 28, 2021).
- [5] ANP - Associação Nacional de Produtores de Pera Rocha, “Caderno de Especificações da Pera Rocha do Oeste - Denominação de Origem,” 1997.
- [6] J. Alexandre, A. Silva, and J. Soares, *O Livro da Pera Rocha - Volume 1*, Associação. Cadaval, 2001.
- [7] “Républica Portuguesa - XXII Governo,” *Ministra da Agricultura na abertura oficial da campanha da pera Rocha*, 2020. <https://www.portugal.gov.pt/pt/gc22/comunicacao/noticia?i=ministra-da-agricultura-na-abertura-oficial-da-campanha-da-pera-rocha> (accessed Oct. 17, 2020).
- [8] H. Shiota, “Changes in the volatile composition of La France pear during maturation,” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 52, no. 3, pp. 421–429, 1990, doi: 10.1002/jsfa.2740520315.
- [9] A. A. Saquet and D. P. F. Almeida, “Ripening physiology and biochemistry of ‘Rocha’ pear as affected by ethylene inhibition,” *Postharvest Biology and Technology*, vol. 125, pp. 161–167, 2017, doi: 10.1016/j.postharvbio.2016.11.008.
- [10] DGADR, “Produtos Tradicionais Portugueses - Pera Rocha do Oeste.” <https://www.tradicional.dgadr.gov.pt/pt/cat/frutos-frescos/686-pera-rocha-do-oeste-dop> (accessed Aug. 23, 2021).
- [11] A. C. Rodrigues, “Pêra Rocha - Colheita e conservação,” *Cadernos Rurais AVAPI*, vol. 5, Feb. 2005.
- [12] A. A. Saquet, “Storage of pears,” *Scientia Horticulturae*, vol. 246, no. March 2018, pp. 1009–1016, 2019, doi: 10.1016/j.scienta.2018.11.091.

- [13] M. L. Avelar, "Principais aspectos associados à conservação frigorífica da Pera Rocha," *Agroforum*, vol. 15, pp. 37–40, 2001.
- [14] C. Larrigaudière, V. Lindo-garcía, D. Ubach, and J. Giné-bordonaba, "1-Methylcyclopropene and extreme ULO inhibit superficial scald in a different way highlighting the physiological basis of this disorder in pear," *Scientia Horticulturae*, vol. 250, no. February, pp. 148–153, 2019.
- [15] S. Zhou, Y. Cheng, and J. Guan, "The molecular basis of superficial scald development related to ethylene perception and  $\alpha$ -farnesene metabolism in 'Wujiuxiang' pear," *Scientia Horticulturae*, vol. 216, pp. 76–82, 2017, doi: 10.1016/j.scienta.2016.12.025.
- [16] A. M. A. Fonseca *et al.*, "The impact of plant-based coatings in 'ROCHA' pear preservation during cold storage: A metabolomic approach," *Foods*, vol. 9, no. 9, 2020, doi: 10.3390/foods9091299.
- [17] N. Isidoro, "Evolução do  $\alpha$ -farneseno e dos trienos conjugados e sua relação com a incidência de escaldão superficial em pera Rocha - Efeitos da data de colheita, da atmosfera controlada, da difenilamina e do 1-metilciclopropeno," Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2005.
- [18] R. Barbosa, "Avaliação dos Compostos Orgânicos Voláteis associados à Maturação da Pera Rocha," Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, 2020.
- [19] "Conservação da pera Rocha: Novas recomendações," *Agrozapp Community*, 2017. <https://www.agrozapp.pt/artigos/Técnicos/conservaco-da-pera-rocha-novas-recomendaces> (accessed Feb. 23, 2021).
- [20] A. Saquet and D. Almeida, "Internal disorders of 'Rocha' pear affected by oxygen partial pressure and inhibition of ethylene action," *Postharvest Biology and Technology*, vol. 128, pp. 54–62, 2017, doi: 10.1016/j.postharvbio.2017.02.005.
- [21] R. Pedreschi *et al.*, "Metabolic profiling of 'Conference' pears under low oxygen stress," *Postharvest Biology and Technology*, vol. 51, no. 2, pp. 123–130, 2009, doi: 10.1016/j.postharvbio.2008.05.019.
- [22] Q. T. Ho, P. Verboven, B. E. Verlinden, A. Schenk, and B. M. Nicolai, "Controlled atmosphere storage may lead to local ATP deficiency in apple," *Postharvest Biology and Technology*, vol. 78, pp. 103–112, 2013, doi: 10.1016/j.postharvbio.2012.12.014.
- [23] N. Isidoro, A. Silva, C. Rasteiro, L. Silva, J. Sobreiro, and D. Almeida, "Nova metodologia para a regulação da atmosfera controlada no armazenamento prolongado de pêra 'Rocha,'" Cadaval, 2007.
- [24] S. Bodbodak and M. Moshfeghifar, 2 - *Advances in controlled atmosphere storage of fruits and vegetables*. Elsevier Inc., 2016.
- [25] M. S. de Martin, C. A. Steffens, C. V. T. do Amarante, A. Brackmann, M. F. Rodrigues, and C. Soethe, "'Rocha' pears stored under controlled atmosphere with ultra-low and low O<sub>2</sub> associated

- with different CO<sub>2</sub> levels,” *Revista Brasileira de Fruticultura*, vol. 39, no. 5, 2017, doi: 10.1590/0100-29452017143.
- [26] N. Isidoro, “Especial ‘ Oeste Agrícola ’: Pós-Colheita da Pera Rocha - Situação atual de longo Armazenamento,” *Área Oeste*, p. 21, Mar. 2016.
- [27] C. Franck, J. Lammertyn, Q. Tri, P. Verboven, B. Verlinden, and B. M. Nicola, “Browning disorders in pear fruit,” *Postharvest Biology and Technology*, vol. 43, pp. 1–13, 2007, doi: 10.1016/j.postharvbio.2006.08.008.
- [28] C. Larrigaudière, I. Lentheric, J. Puy, and E. Pintó, “Biochemical characterisation of core browning and brown heart disorders in pear by multivariate analysis,” *Postharvest Biology and Technology*, vol. 31, pp. 29–39, 2004, doi: 10.1016/S0925-5214(03)00132-7.
- [29] I. Lentheric, J. Graell, and C. Larrigaudiere, “Effects of CO<sub>2</sub> pretreatment on oxidative metabolism and core- browning incidence in controlled atmosphere stored pears,” *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, vol. 0316, no. June, 2016, doi: 10.1080/14620316.2003.11511603.
- [30] R. H. Veltman, M. G. Sanders, S. T. Persijn, H. W. Peppelenbos, and J. Oosterhaven, “Decreased ascorbic acid levels and brown core development in pears ( *Pyrus communis* L . cv . Conference ),” *Physiologia Plantarum*, vol. 107, pp. 39–45, 1999.
- [31] C. Larrigaudiere, E. Pintó, I. Lentheric, and M. Vendrell, “Involvement of oxidative processes in the development of core browning in controlled-atmosphere stored pears,” *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, vol. 76, no. 2, pp. 157–162, 2001, doi: 10.1080/14620316.2001.11511343.
- [32] P. E. Zerbini, A. Rizzolo, A. Brambilla, P. Cambiaghi, and M. Grassi, “Loss of ascorbic acid during storage of Conference pears in relation to the appearance of brown heart,” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 82, no. 9, pp. 1007–1013, 2002, doi: 10.1002/jsfa.1147.
- [33] T. Deuchande *et al.*, “Dynamic controlled atmosphere for prevention of internal browning disorders in ‘Rocha’ pear,” *LWT - Food Science and Technology*, vol. 65, pp. 725–730, 2016, doi: 10.1016/j.lwt.2015.08.075.
- [34] T. Deuchande, S. M. P. Carvalho, J. Giné-Bordonaba, M. W. Vasconcelos, and C. Larrigaudière, “Transcriptional and biochemical regulation of internal browning disorder in ‘Rocha’ pear as affected by O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> concentrations,” *Postharvest Biology and Technology*, vol. 132, no. May, pp. 15–22, 2017, doi: 10.1016/j.postharvbio.2017.05.011.
- [35] J. Contreiras and M. G. Barreiro, *Fisiologia e bioquímica da respiração das plantas superiores*. Fundação Calouste Gulbenkian, 1992.
- [36] I. Lara, R. M. Miró, T. Fuentes, G. Sayez, J. Graell, and M. L. López, “Biosynthesis of volatile aroma compounds in pear fruit stored under long-term controlled-atmosphere conditions,”

- Postharvest Biology and Technology*, vol. 29, no. 1, pp. 29–39, 2003, doi: 10.1016/S0925-5214(02)00230-2.
- [37] L. Torregrosa, G. Echeverria, J. Illa, and 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 Biology and Technology*, vol. 170, no. April, 2020, doi: 10.1016/j.postharvbio.2020.111322.
- [38] M. V. Hendges, D. A. Neuwald, C. A. Steffens, R. Vidrih, E. Zlatić, and 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 Biology and Technology*, vol. 146, no. August, pp. 18–25, 2018, doi: 10.1016/j.postharvbio.2018.08.006.
- [39] E. Zlatić *et al.*, “Comparative analysis of aroma compounds in ‘Bartlett’ pear in relation to harvest date, storage conditions, and shelf-life,” *Postharvest Biology and Technology*, vol. 117, pp. 71–80, 2016, doi: 10.1016/j.postharvbio.2016.02.004.
- [40] M. H. Gomes, R. M. Beaudry, and D. P. F. Almeida, “Volatile profile of fresh-cut ‘Rocha’ pear under various temperatures and oxygen levels,” *Acta Horticulturae*, vol. 1209, pp. 247–250, 2018, doi: 10.17660/ActaHortic.2018.1209.35.
- [41] X. Li, X. Li, T. Wang, and W. Gao, “Nutritional Composition of Pear Cultivars ( *Pyrus* spp .),” in *Nutritional Composition of Fruit Cultivars*, Elsevier Inc., 2016, pp. 573–608.
- [42] J. Song and F. Bangerth, “Production and Development of Volatile Aroma Compounds of Apple Fruits At Different Times of Maturity,” *Acta Horticulturae*, no. 368. pp. 150–159, 1994, doi: 10.17660/actahortic.1994.368.16.
- [43] J. Berg, J. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemistry*, 8th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2015.
- [44] M. C. Dzialo, R. Park, J. Steensels, B. Lievens, and K. J. Verstrepen, “Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast,” *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 41, no. June, pp. S95–S128, 2017, doi: 10.1093/femsre/fux031.
- [45] J. Song and C. F. Forney, “Flavour volatile production and regulation in fruit,” *Canadian Journal of Plant Science*, vol. 88, no. 3, pp. 537–550, 2008, doi: 10.4141/CJPS07170.
- [46] D. Nelson and M. Cox, *Princípios de Bioquímica de Lehninger*, 6th ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- [47] Q. T. Ho, P. Verboven, A. Ambaw, B. E. Verlinden, and B. M. Nicolai, “Transport properties of fermentation metabolites inside ‘Conference’ pear fruit,” *Postharvest Biology and Technology*, vol. 117, pp. 38–48, 2016, doi: 10.1016/j.postharvbio.2016.01.008.
- [48] Ke Dangyang, L. Zhou, and A. A. Kader, “Mode of oxygen and carbon dioxide action on

- strawberry ester biosynthesis," *Journal of the American Society for Horticultural Science*, vol. 119, no. 5, pp. 971–975, 1994, doi: 10.21273/jashs.119.5.971.
- [49] A. A. Saquet and J. Streif, "Fermentative metabolism in 'Conference' pears under various storage conditions," *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, vol. 81, no. 5, pp. 910–914, 2006, doi: 10.1080/14620316.2006.11512158.
- [50] G. D. Gomes, "Acastanhamento interno durante o armazenamento da pera ' Rocha ': Impacto do baixo O<sub>2</sub> e alto CO<sub>2</sub> no metabolismo e estratégias de controlo," Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2015.
- [51] E. Pesis, "The role of the anaerobic metabolites, acetaldehyde and ethanol, in fruit ripening, enhancement of fruit quality and fruit deterioration," *Postharvest Biology and Technology*, vol. 37, no. 1, pp. 1–19, 2005, doi: 10.1016/j.postharvbio.2005.03.001.
- [52] G. D. Nanos, R. J. Romani, and A. A. Kader, "Metabolic and Other Responses of 'Bartlett' Pear Fruit and Suspension-cultured 'Passe Crassane' Pear Fruit Cells Held in 0.25% O<sub>2</sub>," *Journal of the American Society for Horticultural Science*, vol. 117, no. 6, pp. 934–940, Nov. 1992, doi: 10.21273/JASHS.117.6.934.
- [53] C. Chervin, J. K. Truett, and J. Speirs, "Alcohol dehydrogenase expression and alcohol production during pear ripening," *Journal of the American Society for Horticultural Science*, vol. 124, no. 1, pp. 71–75, 1999, doi: 10.21273/jashs.124.1.71.
- [54] M. Faruh, R. M. Rivero, A. Sadka, and E. Blumwald, "Ethylene regulation of sugar metabolism in climacteric and non-climacteric plums," *Postharvest Biology and Technology*, vol. 139, no. October 2017, pp. 20–30, 2018, doi: 10.1016/j.postharvbio.2018.01.012.
- [55] N. Pathak, O. J. Caleb, M. Geyer, W. B. Herppich, C. Rauh, and P. V. Mahajan, "Photocatalytic and Photochemical Oxidation of Ethylene: Potential for Storage of Fresh Produce—a Review," *Food and Bioprocess Technology*, vol. 10, no. 6, pp. 982–1001, 2017, doi: 10.1007/s11947-017-1889-0.
- [56] L. Pereira, M. Pujol, J. Garcia-Mas, and M. A. Phillips, "Non-invasive ethylene quantification in attached fruit headspace at 1 ppb by gas chromatography – mass spectrometry," *The Plant Journal*, vol. 91, no. 1, pp. 172–183, 2017, doi: 10.1111/tbj.13545.
- [57] M. E. Saltveit, "Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables," *Postharvest Biology and Technology*, vol. 15, no. 3, pp. 279–292, 1999, doi: 10.1016/S0925-5214(98)00091-X.
- [58] C. I. Mata, B. Van de Poel, M. L. A. T. M. Hertog, D. Tran, and B. M. Nicolai, "Transcription analysis of the ethylene receptor and CTR genes in tomato: The effects of on and off-vine ripening and 1-MCP," *Postharvest Biology and Technology*, vol. 140, no. February, pp. 67–75, 2018, doi: 10.1016/j.postharvbio.2018.02.014.
- [59] A. Saquet and D. Almeida, "Energy metabolism and fruit quality of ' Rocha ' pear as affected by

- oxygen partial pressures and 1-methylcyclopropene,” pp. 2006–2011, 2016.
- [60] V. Lindo-García, C. Larrigaudière, G. Echeverría, H. Murayama, Y. Soria, and J. Giné-Bordonaba, “New insights on the ripening pattern of ‘Blanquilla’ pears: A comparison between on- and off-tree ripened fruit,” *Postharvest Biology and Technology*, vol. 150, no. January, pp. 112–121, 2019, doi: 10.1016/j.postharvbio.2018.12.013.
- [61] G. Li, H. Jia, J. Li, H. Li, and Y. Teng, “Effects of 1-MCP on volatile production and transcription of ester biosynthesis related genes under cold storage in ‘Ruanerli’ pear fruit (*Pyrus ussuriensis* Maxim.),” *Postharvest Biology and Technology*, vol. 111, pp. 168–174, 2016, doi: 10.1016/j.postharvbio.2015.08.011.
- [62] C. Wang *et al.*, “Analysis of volatile compounds in pears by HS-SPME-GC×GC-TOFMS,” *Molecules*, vol. 24, no. 9, 2019, doi: 10.3390/molecules24091795.
- [63] Y. Liu *et al.*, “Sensory quality evaluation of korla pear from different orchards and analysis of their primary and volatile metabolites,” *Molecules*, vol. 25, no. 23, 2020, doi: 10.3390/molecules25235567.
- [64] G. Li, H. Jia, J. Li, Q. Wang, M. Zhang, and Y. Teng, “Emission of volatile esters and transcription of ethylene- and aroma-related genes during ripening of ‘Pingxiangli’ pear fruit (*Pyrus ussuriensis* Maxim.),” *Scientia Horticulturae*, vol. 170, pp. 17–23, 2014, doi: 10.1016/j.scienta.2014.03.004.
- [65] M. A. M. El Hadi, F. J. Zhang, F. F. Wu, C. H. Zhou, and J. Tao, “Advances in fruit aroma volatile research,” *Molecules*, vol. 18, no. 7, pp. 8200–8229, 2013, doi: 10.3390/molecules18078200.
- [66] W. Schwab, R. Davidovich-Rikanati, and E. Lewinsohn, “Biosynthesis of plant-derived flavor compounds,” *Plant Journal*, vol. 54, no. 4, pp. 712–732, 2008, doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03446.x.
- [67] L. P. Zhang, Y. X. Shen, Q. Z. Bu, and S. J. Ji, “Effects of 1-methylcyclopropene on the metabolic pathways of aroma-related compounds in Nanguo pear,” *Journal of Food Processing and Preservation*, vol. 38, no. 4, pp. 1749–1758, 2014, doi: 10.1111/jfpp.12138.
- [68] A. J. L. de O. Pombeiro, *Técnicas e Operações Unitárias em Química Laboratorial*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1983.
- [69] J. Weiss, *Handbook of Ion Chromatography*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016.
- [70] IUPAC, A. D. McNaught, and A. D. Wilkinson, *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. Research Triangle Park, NC: IUPAC, 2009.
- [71] D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, 5th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1998.
- [72] D. Skoog, D. West, F. Holler, and S. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9th ed.

Belmont: Brooks/Cole, 2014.

- [73] K. Dettmer-Wilde *et al.*, *Practical Gas Chromatography: A Comprehensive Reference*. 2014.
- [74] D. Harris and C. Lucy, *Quantitative Chemical Analysis*, 9th editio. New York: W. H. Freeman & Company, 2016.
- [75] H.-J. Hübschmann, *Handbook of GC-MS - Fundamentals and Applications*, 3rd ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015.
- [76] C. Housecroft and E. Constable, *Chemistry - An introduction to Organic, Inorganic and Physical Chemistry*, 4th ed. Harlow, England: Pearson Education Limited, 2010.
- [77] J. Watson and O. Sparkman, *Introduction to Mass Spectrometry: instrumentation, applications and strategies for data interpretation*, Fourth edi. John Wiley & Sons, Ltd, 2007.
- [78] A. Nongonierma, P. Cayot, J. L. Le Quéré, M. Springett, and A. Voilley, "Mechanisms of extraction of aroma compounds from foods, using adsorbents. Effect of various parameters," *Food Reviews International*, vol. 22, no. 1, pp. 51–94, 2006, doi: 10.1080/87559120500379951.
- [79] C. Liu *et al.*, "Determination of Volatile Profiles inside Apple Fruit Storage Facilities Using MonoTrap™ Monolithic Silica Adsorbent and GC–MS," *Horticultural Plant Journal*, 2020, doi: 10.1016/j.hpj.2020.12.003.
- [80] C. Martínez and A. Corma, "Zeolites," *Comprehensive Inorganic Chemistry II (Second Edition): From Elements to Applications*, vol. 5, pp. 103–131, 2013, doi: 10.1016/B978-0-08-097774-4.00506-4.
- [81] G. Busca, *Zeolites and Other Structurally Microporous Solids as Acid–Base Materials*, vol. 1. 2014.
- [82] E. Drioli and L. Giorno, *Encyclopedia of Membranes*. Springer Reference, 2016.
- [83] C. J. Rhodes, "Properties and applications of zeolites," *Science Progress*, vol. 93, no. 3, pp. 223–284, 2010, doi: 10.3184/003685010X12800828155007.
- [84] H. K. Beyer, "Dealumination techniques for Zeolites," *Molecular Sieves*, vol. 3, pp. 203–255, 2002, doi: 10.1007/3-540-69750-0.
- [85] N. E. R. Zimmermann and M. Haranczyk, "History and Utility of Zeolite Framework-Type Discovery from a Data-Science Perspective," *Crystal Growth and Design*, vol. 16, no. 6, pp. 3043–3048, 2016, doi: 10.1021/acs.cgd.6b00272.
- [86] M. Moshoeshe, M. Silas Nadiye-Tabbiruka, and V. Obuseng, "A Review of the Chemistry, Structure, Properties and Applications of Zeolites," *American Journal of Materials Science*, vol. 2017, no. 5, pp. 196–221, 2017, doi: 10.5923/j.materials.20170705.12.
- [87] K. Sadowska *et al.*, "Desilication of highly siliceous zeolite ZSM-5 with NaOH and

- NaOH/tetrabutylamine hydroxide," *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 168, pp. 195–205, 2013, doi: 10.1016/j.micromeso.2012.09.033.
- [88] L. B. McCusker, D. H. Olson, and C. Baerlocher, *Atlas of Zeolite Framework Types*, 6th ed. Elsevier, 2007.
- [89] L. B. McCusker and C. Baerlocher, "Zeolite structures," *Studies in Surface Science and Catalysis*, vol. 137, pp. 37–67, 2001, doi: 10.1016/s0167-2991(01)80244-5.
- [90] E. Cataldo *et al.*, "Application of zeolites in agriculture and other potential uses: A review," *Agronomy*, vol. 11, no. 8, pp. 1–14, 2021, doi: 10.3390/agronomy11081547.
- [91] International Zeolite Association - Structure Commission, "Framework Type Codes," *Framework Type Codes*, 2021. <http://www.iza-structure.org/> (accessed Oct. 06, 2021).
- [92] W. Lutz, "Zeolite Y: Synthesis, modification, and properties - A case revisited," *Advances in Materials Science and Engineering*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/724248.
- [93] H. Bekkum, E. M. Flanigen, and J. C. Jansen, *Studies in Surface Science and Catalysis, vol. 58 - Introduction to Zeolite Science and Practice*, 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 1991.
- [94] L. Y. D.A.Young, "Hydrocarbon conversion process and catalyst comprising a crystalline alumino-silicate leached with sodium hydroxide," US3326797A, 1967.
- [95] J. C. Groen, L. A. A. Peffer, J. A. Moulijn, and J. Pérez-Ramírez, "Mesoporosity development in ZSM-5 zeolite upon optimized desilication conditions in alkaline medium," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 241, no. 1–3, pp. 53–58, 2004, doi: 10.1016/j.colsurfa.2004.04.012.
- [96] M. Ogura, S. Y. Shinomiya, J. Tateno, Y. Nara, E. Kikuchi, and M. Matsukata, "Formation of uniform mesopores in ZSM-5 zeolite through treatment in alkaline solution," *Chemistry Letters*, no. 8, pp. 882–883, 2000, doi: 10.1246/cl.2000.882.
- [97] X. S. Zhao, Q. Ma, and G. Q. Lu, "VOC removal: Comparison of MCM-41 with hydrophobic zeolites and activated carbon," *Energy and Fuels*, vol. 12, no. 6, pp. 1051–1054, 1998, doi: 10.1021/ef980113s.
- [98] N. Patdhanagul, T. Srithanratana, K. Rangsiwatananon, and S. Hengrasmee, "Ethylene adsorption on cationic surfactant modified zeolite NaY," *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 131, no. 1–3, pp. 97–102, 2010, doi: 10.1016/j.micromeso.2009.12.008.
- [99] S. K. P. Veerapandian, N. De Geyter, J. M. Giraudon, J. F. Lamonier, and R. Morent, "The use of zeolites for VOCs abatement by combining non-thermal plasma, adsorption, and/or catalysis: A review," *Catalysts*, vol. 9, no. 1, 2019, doi: 10.3390/catal9010098.
- [100] N. Sue-aok, T. Srithanratana, K. Rangsiwatananon, and S. Hengrasmee, "Study of ethylene adsorption on zeolite NaY modified with group I metal ions," *Applied Surface Science*, vol. 256,

- no. 12, pp. 3997–4002, 2010, doi: 10.1016/j.apsusc.2010.01.065.
- [101] K. J. Kim and H. G. Ahn, “The effect of pore structure of zeolite on the adsorption of VOCs and their desorption properties by microwave heating,” *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 152, pp. 78–83, 2012, doi: 10.1016/j.micromeso.2011.11.051.
- [102] Y. Lv *et al.*, “Hydrophobic design of adsorbent for VOC removal in humid environment and quick regeneration by microwave,” *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 294, no. November, p. 109869, 2020, doi: 10.1016/j.micromeso.2019.109869.
- [103] E. P. Hessou, H. Jabraoui, M. T. A. K. Houngouè, J. B. Mensah, M. Pastore, and M. Badawi, “A first principle evaluation of the adsorption mechanism and stability of volatile organic compounds into NaY zeolite,” *Zeitschrift fur Kristallographie - Crystalline Materials*, vol. 234, no. 7–8, pp. 469–482, 2019, doi: 10.1515/zkri-2019-0003.
- [104] H. Gong, S. Zhou, Z. Chen, and L. Chen, “Effect of volatile organic compounds on carbon dioxide adsorption performance via pressure swing adsorption for landfill gas upgrading,” *Renewable Energy*, vol. 135, pp. 811–818, 2019, doi: 10.1016/j.renene.2018.12.068.
- [105] L. Cisneros, F. Gao, and A. Corma, “Silver nanocluster in zeolites. ADSORPTION of ETHYLENE traces for fruit preservation,” *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 283, no. March, pp. 25–30, 2019, doi: 10.1016/j.micromeso.2019.03.032.
- [106] R. B. Silva, “Spreadsheet for designing valid least-squares calibrations : A tutorial,” *Talanta*, vol. 148, pp. 177–190, 2016, doi: 10.1016/j.talanta.2015.10.072.
- [107] Frutas Legumes e Flores, INIAV IP (Estação Nacional de Fruticultura Vieira Natividade), and COTR, “Manual de Boas Práticas de Fruticultura, 3º Fascículo - A Pereira ‘Rocha,’” *Frutas, Legumes e Flores*, pp. 1–9, 2020.
- [108] A. C. Galvis-Sánchez, S. C. Fonseca, A. M. M. B. Morais, and F. X. Malcata, “Sensorial and physicochemical quality responses of pears (cv Rocha) to long-term storage under controlled atmospheres,” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 84, no. 13, pp. 1646–1656, 2004, doi: 10.1002/jsfa.1798.
- [109] A. A. Saquet, J. Streif, and D. P. F. Almeida, “Responses of ‘ Rocha ’ pear to delayed controlled atmosphere storage depend on oxygen partial pressure,” *Scientia Horticulturae*, vol. 222, no. February, pp. 17–21, 2017, doi: 10.1016/j.scienta.2017.05.006.
- [110] M. S. de Martin, C. A. Steffens, C. V. T. do Amarante, A. Brackmann, and W. L. Junior, “Qualidade De Peras ‘ Rocha ’ Armazenadas em Atmosfera Controlada,” *Revista Brasileira de Fruticultura*, vol. 37, pp. 73–82, 2015.
- [111] L. C. Ji, H. W. Ji, Q. Wang, H. Deng, and S. H. Xiao, “Changes in the volatile compounds and chemical and physical properties of Kuerle fragrant pear (*Pyrus serotina* Reld) during storage,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 23, pp. 8842–8847, 2006, doi:

10.1021/jf061089g.

- [112] G. Li, H. Jia, R. Wu, and Y. Teng, "Changes in volatile organic compound composition during the ripening of 'Nanguoli' pears (*Pyrus ussuriensis* Maxim) harvested at different growing locations," *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, vol. 88, no. 5, pp. 563–570, 2013, doi: 10.1080/14620316.2013.11513007.
- [113] M. Ali *et al.*, "1-MCP Regulates Ethanol Fermentation and GABA Shunt Pathway Involved in Kiwifruit Quality During Postharvest Storage," *Horticultural Plant Journal*, vol. 7, no. 1, pp. 23–30, 2021, doi: 10.1016/j.hpj.2020.12.006.
- [114] V. Paul, R. Pandey, and G. C. Srivastava, "The fading distinctions between classical patterns of ripening in climacteric and non-climacteric fruit and the ubiquity of ethylene-An overview," *Journal of Food Science and Technology*, vol. 49, no. 1, pp. 1–21, 2012, doi: 10.1007/s13197-011-0293-4.
- [115] J. Valente, R. Almeida, and L. Kooistra, "A comprehensive study of the potential application of flying ethylene-sensitive sensors for ripeness detection in apple orchards," *Sensors (Switzerland)*, vol. 19, no. 2, 2019, doi: 10.3390/s19020372.
- [116] C. Bugaud and P. Alter, "Volatile and non-volatile compounds as odour and aroma predictors in dessert banana (*Musa* spp.)," *Postharvest Biology and Technology*, vol. 112, pp. 14–23, 2016, doi: 10.1016/j.postharvbio.2015.10.003.
- [117] S. D. T. Maduwanthi and R. A. U. J. Marapana, "Comparative Study on Aroma Volatiles, Organic Acids, and Sugars of Ambul Banana (*Musa acuminata*, AAB) Treated with Induced Ripening Agents," *Journal of Food Quality*, vol. 2019, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1155/2019/7653154.
- [118] X. Zhu, Q. Li, J. Li, J. Luo, W. Chen, and X. Li, "Comparative study of volatile compounds in the fruit of two banana cultivars at different ripening stages," *Molecules*, vol. 23, no. 10, 2018, doi: 10.3390/molecules23102456.
- [119] R. Tressl and W. G. Jennings, "Production of Volatile Compounds in the Ripening Banana," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 20, no. 2, pp. 189–192, 1972, doi: 10.1021/jf60180a026.

## Anexo I – Análises Prévias

Foram realizadas análises prévias a uma atmosfera de um exsiccador, que conteve peras e bananas durante uma semana, com uma temperatura do laboratório de cerca de 23 °C. A remoção de uma amostra da atmosfera foi feita através da injeção de uma seringa, adaptada para o uso de gases, num tubo de silicone ligado à atmosfera interior do exsiccador através de uma válvula, e encerrado na outra extremidade. Convém referir que, por serem análises prévias, as condições operacionais do GC-MS e de desorção dos compostos voláteis ainda não estavam otimizadas e, por isso, deve-se dar a devida importância aos resultados obtidos.

### Peras e Bananas

Primeiramente, foi realizada uma análise ao ar de um exsiccador, contendo peras e bananas. Nesta análise foi possível identificar 29 compostos voláteis (**Tabela XXVI**).

Tabela XXVI – Compostos detetados por análise ao ar de um exsiccador, por GC-MS, contendo peras e bananas, em condições *shelf-life*, durante uma semana a cerca de 23 °C.

TR	Nome	Prob	Área	Área (%)	Altura	Altura (%)
4,60	Hexano	70,60	2,30E+07	2,01	4,84E+06	0,99
5,73	Acetaldeído	76,40	7,91E+06	0,69	1,91E+06	0,39
7,55	Acetona	90,10	5,40E+07	4,71	1,83E+07	3,73
8,72	Acetato de Etilo	94,40	1,52E+08	13,22	6,61E+07	13,49
8,99	2-Butanona	78,90	4,21E+06	0,37	1,66E+06	0,34
9,53	Etanol	90,56	1,67E+08	14,53	7,22E+07	14,74
10,25	Acetato de Propilo	55,00	1,78E+06	0,15	7,32E+05	0,15
10,37	2-Pentanona	89,80	5,24E+07	4,57	2,42E+07	4,94
10,91	Acetato de Isobutilo	88,50	1,52E+08	13,26	7,37E+07	15,05
11,35	Butanoato de Butilo	85,90	7,53E+06	0,66	3,59E+06	0,73
11,95	3-Metilbutanoato de Etilo	39,00	2,89E+06	0,25	9,76E+05	0,20
12,03	Acetato de 2-Pentanol	83,10	1,52E+08	13,27	6,91E+07	14,11
12,29	Isobutanol	75,60	3,94E+07	3,44	1,74E+07	3,55
12,38	3-Metilpropanoato de 2-Metilpropilo	46,50	7,10E+06	0,62	2,61E+06	0,53
12,85	2-Pentanol	57,50	1,66E+07	1,45	7,63E+06	1,56
13,11	Acetato Isoamílico	90,10	1,43E+08	12,45	6,28E+07	12,81
13,46	1-Butanol	20,10	6,82E+06	0,59	2,31E+06	0,47
13,92	Butanoato de 2-Metilpropilo	71,20	3,44E+07	3,00	1,43E+07	2,93
14,11	Acetato de 1-Metilpropilo	16,70	1,71E+06	0,15	7,39E+05	0,15
14,33	2-Metilbutanoato de 1-Metilpropilo	33,30	7,26E+05	0,06	4,24E+05	0,09
14,68	3-Metilbutanoato de 2-Metilpropilo	65,20	4,21E+06	0,37	1,88E+06	0,38
14,77	Propanoato de 3-Metilbutilo	28,10	4,60E+06	0,40	1,81E+06	0,37
15,02	Álcool Isoamílico	56,80	5,76E+07	5,02	2,12E+07	4,32
15,26	Butanoato de 1-Metilbutilo	78,50	1,13E+07	0,99	4,24E+06	0,86
16,25	6-metil heptan-2-ona	59,30	3,08E+06	0,27	1,09E+06	0,22
16,33	Pentanoato de Butilo	44,40	1,54E+06	0,13	7,33E+05	0,15
16,70	Acetato de 1-Metilhexilo	32,80	3,36E+06	0,29	1,07E+06	0,22
16,87	2-Metilpropanoato de 3-Metilbutilo	62,10	2,76E+07	2,40	9,76E+06	1,99
17,76	3-Metilbutanoato de 3-Metilbutilo	25,80	7,83E+06	0,68	2,70E+06	0,55

Como resultado desta análise, os ésteres foram a família de compostos mais abundante, sendo que ainda se detetaram álcoois, cetonas, hidrocarbonetos e aldeídos (**Figura 37**). O composto mais abundante foi o etanol, que pode ser explicado pela maturação já longa da pera *Rocha* e pelas bananas, mas também pela possível fermentação alcoólica iniciada dentro do exsicador, motivada pela possível escassez de oxigénio, uma vez que o recipiente esteve fechado durante uma semana. Alguns dos compostos maioritários desta análise, como o acetato de isobutilo, o acetato de 1-metilbutilo e o acetato isoamílico, já foram documentados como sendo maioritários face aos compostos voláteis produzidos por bananas, de várias variedades. [116]–[119]

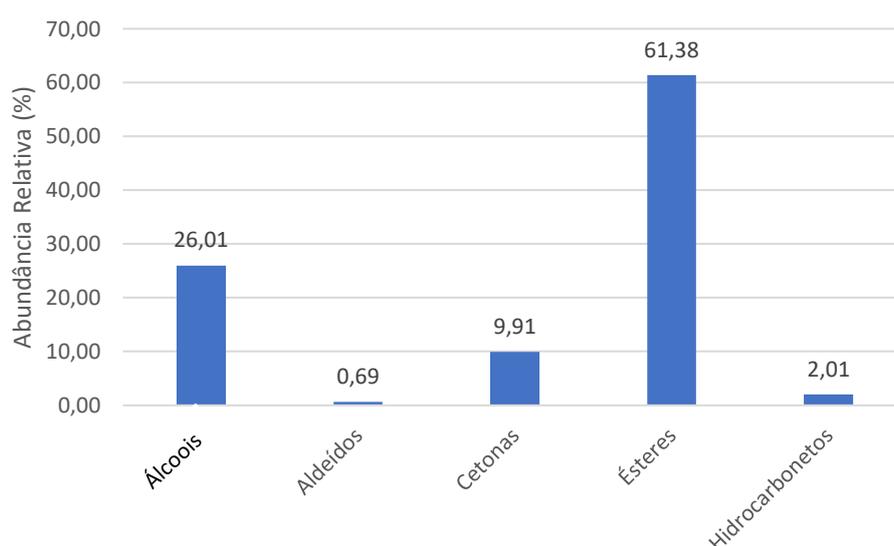


Figura 37 – Abundância relativa das várias famílias de compostos detetados por análise ao ar de um exsicador, contendo peras e bananas, em condições *shelf-life*, durante uma semana a cerca de 23 °C.

### Peras *Conference*

Ao longo do processo de otimização do método de desorção, foram analisadas peras *Conference*, colocadas em exsicadores, nas mesmas condições *shelf-life* (uma semana, a 23 °C). Estas análises foram feitas com recurso a várias condições de desorção. Cerca de 100 mg do zeólito NaY UOP foram sujeitas a uma desorção durante 30 min a 200 °C. Nesta análise, foi possível identificar cinco compostos (**Tabela XXVII**).

Tabela XXVII – Compostos voláteis identificados na análise ao ar de um exsicador, por GC-MS, contendo peras *Conference*, em condições *shelf-life*, durante uma semana, a cerca de 23 °C. Desorção de 100 mg de zeólito NaY UOP, durante 30 min a 200 °C.

TR	Nome	Prob	Área	Área (%)	Altura	Altura (%)
5,50	Acetaldeído	83,40	6,57E+07	12,17	2,01E+07	14,59
7,29	Acetona	82,50	3,85E+07	7,13	1,11E+07	8,06
7,48	Acetato de Metilo	73,50	1,22E+07	2,26	8,88E+06	6,44
9,32	Etanol	91,00	4,17E+08	77,23	9,59E+07	69,60
9,99	Nitrato de Etilo	55,40	6,57E+06	1,22	1,81E+06	1,31

Dos compostos detetados, foi possível quantificar cinco, a partir das retas de calibração preparadas (Tabela XXVIII).

Tabela XXVIII – Quantificação dos compostos presentes no ar de um exsicador, contendo peras *Conference*, em condições *shelf-life*, durante uma semana a cerca de 23 °C. Desorção de 100 mg de zeólito NaY UOP, durante 30 min a 200 °C. Incerteza expandida com  $k=2$ . O (\*) indica uma quantificação com recurso à extrapolação da gama de trabalho, baseada na linearidade da reta de calibração.

Composto	Concentração (ppm)
Acetaldeído	160,29 ± 5,45 *
Etanol	642,84 ± 136,63

Mais uma vez, pelo facto de existir uma concentração elevada de metabolitos provenientes da fermentação alcoólica, é possível que as peras *Conference* se encontrassem num estado de maturação mais elevado ou que o teor de oxigénio dentro do exsicador estivesse reduzido, propiciando uma respiração anaeróbia.

Foram também analisados os compostos voláteis provenientes da desorção dos zeólitos NaY GD (Tabela XXIX), CBV (Tabela XXX) e 5-A (Tabela XXXI). Todas as desorções foram efetuadas recorrendo a 100 mg de cada zeólito, a 200 °C, e durante 45 minutos.

Tabela XXIX – Compostos voláteis identificados na análise ao ar de um exsicador, por GC-MS, contendo peras *Conference*, em condições *shelf-life*, durante uma semana, a cerca de 23 °C. Desorção de 100 mg de zeólito NaY GD, durante 45 min a 200 °C.

TR	Nome	Prob	Área	Área (%)	Altura	Altura (%)
5,66	Acetaldeído	78,40	4,84E+07	3,74	1,29E+07	3,96
7,45	Acetona	90,40	4,44E+07	3,43	1,33E+07	4,08
8,43	Butanal	60,30	1,76E+06	0,14	7,96E+05	0,24
8,52	Metacroleína	69,00	2,80E+06	0,22	1,03E+06	0,32
8,82	Metanol	17,00	5,51E+07	4,26	1,12E+07	3,44
9,27	Álcool Isopropílico	63,90	1,96E+07	1,51	6,67E+06	2,05
9,43	Etanol	93,90	1,08E+09	83,44	2,69E+08	82,55
10,78	Trimetilsilanol	69,30	1,09E+07	0,84	3,42E+06	1,05
13,45	1-Butanol	48,10	1,72E+07	1,33	4,29E+06	1,32
15,08	1-Pentanol	35,80	7,18E+06	0,55	1,58E+06	0,48
19,69	1-Hexanol	31,90	7,07E+06	0,55	1,69E+06	0,52

Tabela XXX – Compostos voláteis identificados na análise ao ar de um exsiccador, por GC-MS, contendo peras *Conference*, em condições *shelf-life*, durante uma semana, a cerca de 23 °C. Desorção de 100 mg de zeólito CBV, durante 45 min a 200 °C.

TR	Nome	Prob	Área	Área (%)	Altura	Altura (%)
5,54	Acetaldeído	81,80	7,47E+07	15,47	1,68E+07	14,02
7,32	Acetona	75,50	1,22E+07	2,53	3,64E+06	3,04
7,52	Acetato de Metilo	10,70	9,90E+06	2,05	2,48E+06	2,07
8,49	Acetato de Etilo	89,60	3,50E+06	0,73	1,54E+06	1,28
8,63	2-Metilfurano	45,70	3,44E+06	0,71	1,11E+06	0,93
9,33	Etanol	92,80	3,79E+08	78,51	9,43E+07	78,67

Tabela XXXI – Compostos voláteis identificados na análise ao ar de um exsiccador, por GC-MS, contendo peras *Conference*, em condições *shelf-life*, durante uma semana, a cerca de 23 °C. Desorção de 100 mg de zeólito 5-A, durante 45 min a 200 °C.

TR	Nome	Prob	Área	Área (%)	Altura	Altura (%)
4,50	<i>n</i> -Hexano	16,70	1,10E+07	2,88	2,66E+06	2,75
5,64	Acetaldeído	81,00	4,91E+07	12,86	1,09E+07	11,26
6,98	Propanal	21,10	2,84E+06	0,74	8,65E+05	0,89
7,44	Acetona	85,10	8,01E+07	20,97	2,24E+07	23,14
8,29	2-Metilfurano	48,60	8,25E+06	2,16	1,37E+06	1,42
8,42	Butanal	79,00	4,02E+06	1,05	1,63E+06	1,68
8,85	2-Butanona	47,10	2,97E+06	0,78	3,15E+06	3,25
9,11	3-Metilbutanal	51,80	2,81E+06	0,74	1,12E+06	1,16
9,26	Álcool Isopropílico	43,30	1,09E+07	2,85	3,40E+06	3,51
9,42	Etanol	88,80	1,77E+08	46,34	4,05E+07	41,84
9,71	5-Metil Hexanal	23,70	3,40E+06	0,89	1,19E+06	1,23
10,22	2-Pentanona	32,10	1,13E+07	2,96	2,69E+06	2,78
12,18	2-Hexanona	14,60	6,42E+06	1,68	1,63E+06	1,68
13,57	<i>p</i> -Xileno	34,60	4,15E+06	1,09	1,29E+06	1,33
16,11	6-Metil-2-Heptanona	63,90	3,32E+06	0,87	9,07E+05	0,94
19,66	1-Hexanol	21,50	4,35E+06	1,14	1,09E+06	1,13

Verifica-se que o zeólito 5-A foi o adsorvente que concentrou um maior número de compostos, não tendo, no entanto, detetado qualquer éster. É importante notar que, todas as comparações realizadas nesta análise a peras *Conference* devem ter em conta que a análise recorrendo ao zeólito NaY UOP não estava otimizada, e por isso não foi realizada nas mesmas condições de desorção que os outros adsorventes. No entanto, é possível avaliar a abundância relativa de cada família de compostos nas análises recorrendo aos diferentes tipos de zeólitos (**Figura 38**). Em todas as análises, os compostos maioritários foram os álcoois, sendo que no zeólito onde foram detetados mais componentes voláteis (5-A) a abundância relativa desta família foi mais reduzida. No entanto, pode-se constatar também que este zeólito tem uma aparente melhor afinidade para a adsorção de aldeídos e cetonas do que os restantes zeólitos, quando sujeitos às mesmas condições.

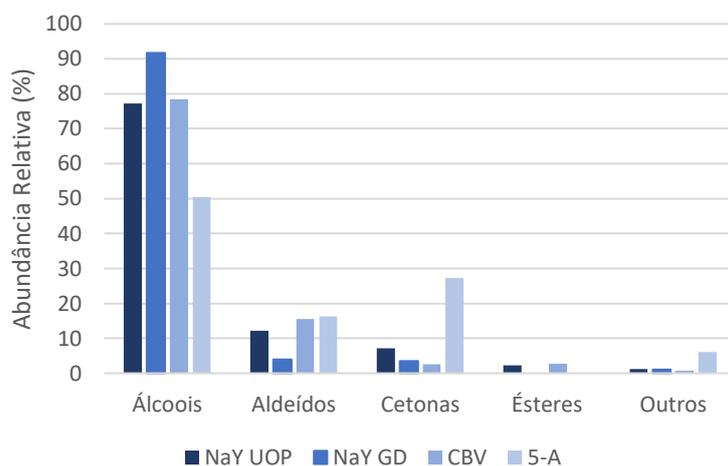


Figura 38 - Abundância relativa das várias famílias de compostos detetados por análise ao ar de um exsicador, contendo peras *Conference*, em condições *shelf-life*, durante uma semana a cerca de 23 °C.

Os analitos estudados foram quantificados (**Tabela XXXII**). Observa-se que o etanol foi detetado em maior quantidade quando concentrado no zeólito NaY GD. Verifica-se também que o etanol é detetado crescentemente sob a forma 5-A < CBV < NaY UOP. Já a concentração de acetaldeído obtida evoluiu sob a forma NaY GD < 5-A < CBV.

Tabela XXXII – Quantificação dos compostos resultantes da desorção de zeólitos NaY GD, CBV e 5-A, expostos a um exsicador, contendo peras *Conference*, em condições *shelf-life*, durante uma semana a cerca de 23 °C. Desorção de 100 mg de zeólito, durante 30 min a 200 °C. Incerteza expandida com  $k=2$ . O (\*) indica uma quantificação com recurso à extrapolação da gama de trabalho, baseada na linearidade da reta de calibração.

Composto	Concentração (ppm)		
	NaY GD	CBV	5-A
Acetaldeído	117,85 ± 5,09	182,38 ± 5,68 *	119,57 ± 5,10
Etanol	1662,68 ± 136,97	584,38 ± 125,40	273,66 ± 130,16
1-Butanol	6,76 ± 0,68	-	-
Acetato de Etilo	-	1,09 ± 0,23	-

## Anexo II – Retas de calibração

### Acetaldeído

Tabela XXXIII - Respostas instrumentais de GC-MS a cada calibrador de acetaldeído, e respetiva incerteza expandida ( $k=2$ ).

Concentração dos calibradores (ppm)	Áreas dos picos em diferentes réplicas						Valor usado na Regressão
	1	2	3	4	5	6	
<b>2,00±0,06</b>	1,20E+06	1,20E+06	1,06E+06	1,01E+06	1,54E+06	1,16E+06	<b>1,18E+06</b>
<b>5,00±0,11</b>	1,84E+06	1,52E+06	1,37E+06	2,05E+06	2,04E+06	2,64E+06	<b>2,40E+06</b>
<b>10,00±0,25</b>	4,01E+06	4,21E+06	4,29E+06	5,00E+06	4,07E+06	3,99E+06	<b>4,44E+06</b>
<b>15,00±0,37</b>	7,83E+06	6,07E+06	6,67E+06	7,15E+06	7,28E+06	7,39E+06	<b>6,48E+06</b>
<b>30,00±0,74</b>	1,23E+07	1,22E+07	1,16E+07	1,29E+07	1,19E+07	1,17E+07	<b>1,26E+07</b>
<b>50,00±1,19</b>	2,17E+07	2,04E+07	2,21E+07	2,09E+07	2,24E+07	2,01E+07	<b>2,07E+07</b>
<b>80,00±1,90</b>	3,33E+07	3,48E+07	3,31E+07	3,17E+07	3,34E+07	3,48E+07	<b>3,30E+07</b>
<b>99,00±1,99</b>	4,00E+07	4,08E+07	3,98E+07	3,89E+07	4,06E+07	4,26E+07	<b>4,07E+07</b>
<b>130,00±2,48</b>	5,31E+07	5,57E+07	5,10E+07	5,41E+07	5,21E+07	5,26E+07	<b>5,34E+07</b>

Tabela XXXIV - Testes de linearidade ANOVA Lack-of-fit e de homoscedasticidade da reta de calibração do acetaldeído.

**ANOVA Lack-of-fit ►**

Confidence level of the ANOVA Lack-of-fit test:	<b>99%</b>
---	------------

Variance related to lack-of-fit of the regression model ( $MS_{LOF}$ ): **1,345E+12**  
Variance related to "pure error" ( $MS_{PE}$ ): **8,443E+11**  
 $F =$  **1,5931983**  
 $F_{tab} =$  **3,0657706**

**Conclusion:**  
**The least square regression line fits the instrumental response**  
Validated RBS 12/2014

**Homoscedasticity Levene's test ►**

Confidence level (95 or 99%) for the homoscedasticity test:	<b>99%</b>
---	------------

Calculated  $W$  value,  $W$ : **2,838974**      Critical F value,  $F_{crit}$  (99%) (one-tailed): **2,9353405**  
 $W$ : **2,838974**       $F_{crit}$  (99%): **2,9353405**      [ $F_{crit}(one;p-1;\Sigma o-p;99\%)=F_{crit}(8;45;99\%)$ ]

**Conclusion:** **Signals are homoscedastic (i.e. have statistically equivalent variances)**  
Validated RBS 5/2015

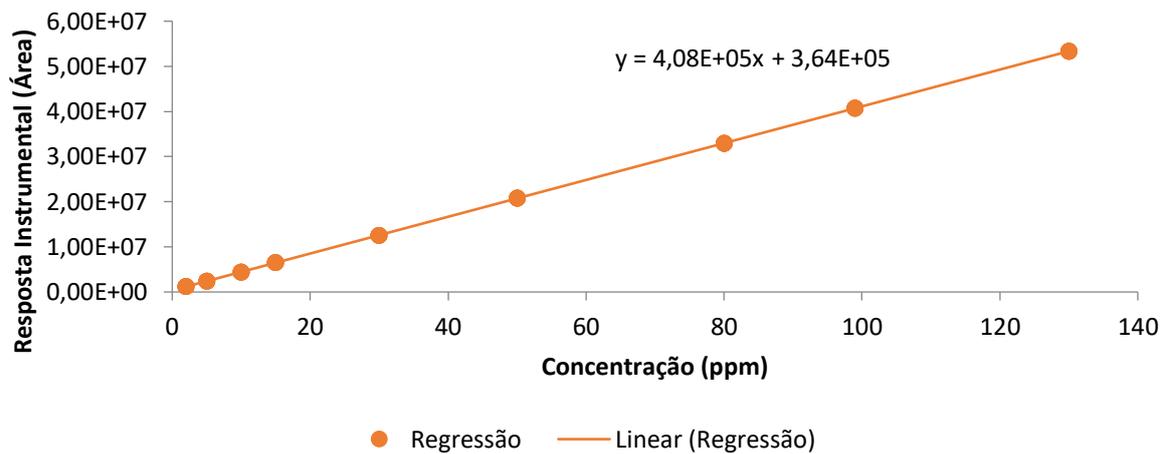


Figura 39 - Representação gráfica da reta de calibração do acetaldeído e respetiva equação.  $R^2=0,9972$ .

## Acetato de Etilo

Tabela XXXV - Respostas instrumentais de GC-MS a cada calibrador de acetato de etilo, e respectiva incerteza expandida ( $k=2$ ).

Concentração dos calibradores (ppm)	Áreas dos picos em diferentes réplicas						Valor usado na Regressão
	1	2	3	4	5	6	
0,10 ± 0,01	4,70E+05	3,59E+05	5,81E+05	6,56E+05	9,68E+05	6,15E+05	6,27E+05
0,30 ± 0,01	1,38E+06	1,25E+06	1,39E+06	1,28E+06	1,11E+06	1,32E+06	1,21E+06
0,50 ± 0,02	1,89E+06	1,84E+06	1,79E+06	1,69E+06	1,83E+06	1,67E+06	1,79E+06
0,70 ± 0,02	1,97E+06	2,29E+06	1,98E+06	2,16E+06	2,10E+06	2,07E+06	2,37E+06
1,00 ± 0,03	3,33E+06	3,45E+06	3,54E+06	3,41E+06	3,54E+06	3,25E+06	3,24E+06
1,50 ± 0,04	4,52E+06	4,70E+06	4,43E+06	4,48E+06	4,94E+06	4,26E+06	4,70E+06
2,00 ± 0,05	6,50E+06	6,17E+06	5,75E+06	6,16E+06	6,54E+06	6,24E+06	6,15E+06
3,00 ± 0,08	9,57E+06	9,42E+06	9,44E+06	8,30E+06	1,00E+07	9,15E+06	9,06E+06
5,00 ± 0,13	1,50E+07	1,49E+07	1,50E+07	1,46E+07	1,46E+07	1,44E+07	1,49E+07

Tabela XXXVI - Testes de linearidade ANOVA Lack-of-fit e de homoscedasticidade da reta de calibração do acetato de etilo.

**ANOVA Lack-of-fit ►**

Confidence level of the ANOVA Lack-of-fit test: **99%**

Variance related to lack-of-fit of the regression model ( $MS_{LOF}$ ): **1,92E+11**  
 Variance related to "pure error" ( $MS_{PE}$ ): **6,86E+10**  
 $F = 2,799355$   
 $F_{tab} = 3,065771$

**Conclusion:**  
**The least square regression line fits the instrumental response**  
 Validated RBS 12/2014

**Homoscedasticity Levene's test ►**

Confidence level (95 or 99%) for the homoscedasticity test: **99%**

Calculated  $W$  value,  $W$ : **2,493247**      Critical  $F$  value,  $F_{crit}$  (99%) (one-tailed): **2,935341**  
 [Fcrit(one;p-1;Σo-p;99%)=Fcrit(8;45;99%)]

**Conclusion:** **Signals are homoscedastic (i.e. have statistically equivalent variances)**  
 Validated RBS 5/2015

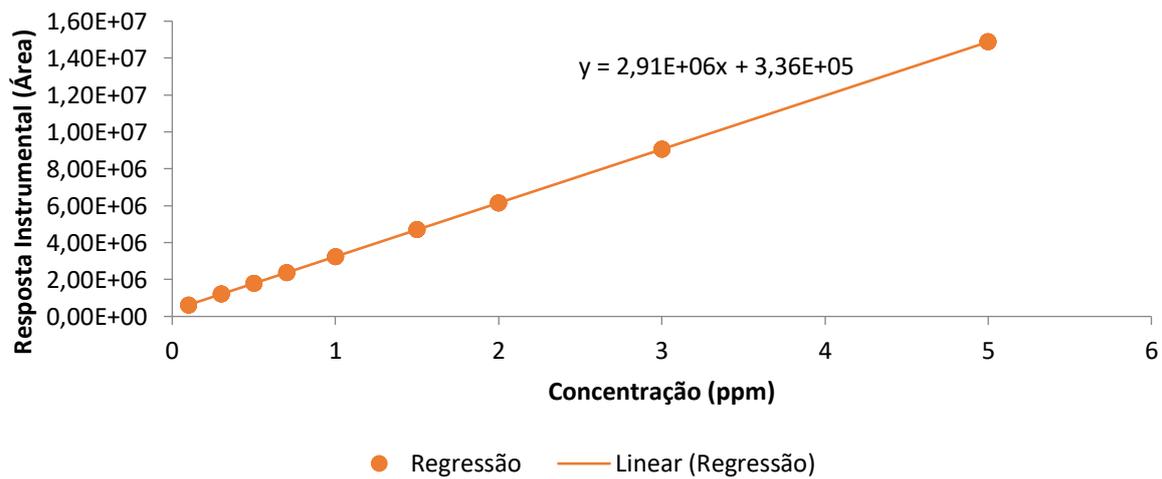


Figura 40 - Representação gráfica da reta de calibração do acetato de etilo e respetiva equação.  $R^2=0,9957$ .

## Acetato de *n*-Butilo

Tabela XXXVII - Respostas instrumentais de GC-MS a cada calibrador de acetato de *n*-butilo, e respetiva incerteza expandida ( $k=2$ ).

Concentração dos calibradores (ppm)	Áreas dos picos em diferentes réplicas						Valor usado na Regressão
	1	2	3	4	5	6	
<b>0,20 ± 0,01</b>	1,12E+06	1,87E+06	1,03E+06	1,26E+06	1,37E+06	1,18E+06	<b>1,24E+06</b>
<b>0,30 ± 0,01</b>	2,05E+06	1,57E+06	1,47E+06	1,70E+06	1,70E+06	1,76E+06	<b>1,70E+06</b>
<b>0,50 ± 0,02</b>	2,18E+06	2,39E+06	2,65E+06	3,00E+06	2,23E+06	2,95E+06	<b>2,63E+06</b>
<b>0,70 ± 0,02</b>	3,35E+06	3,49E+06	3,56E+06	3,72E+06	3,62E+06	3,15E+06	<b>3,55E+06</b>
<b>1,00 ± 0,03</b>	4,99E+06	4,97E+06	5,15E+06	4,52E+06	5,63E+06	4,90E+06	<b>4,94E+06</b>
<b>1,50 ± 0,04</b>	7,55E+06	7,21E+06	7,95E+06	7,16E+06	7,35E+06	7,30E+06	<b>7,25E+06</b>
<b>2,00 ± 0,05</b>	8,99E+06	8,80E+06	9,49E+06	1,01E+07	9,05E+06	8,64E+06	<b>9,56E+06</b>
<b>2,50 ± 0,07</b>	1,23E+07	1,26E+07	1,18E+07	1,12E+07	1,16E+07	1,29E+07	<b>1,19E+07</b>
<b>3,00 ± 0,07</b>	1,46E+07	1,42E+07	1,33E+07	1,35E+07	1,46E+07	1,49E+07	<b>1,42E+07</b>

Tabela XXXVIII - Testes de linearidade ANOVA Lack-of-fit e de homoscedasticidade da reta de calibração do acetato de *n*-butilo.

**ANOVA Lack-of-fit ►**

<b>Confidence level of the ANOVA Lack-of-fit test:</b>	<b>99%</b>
Variance related to lack-of-fit of the regression model ( $MS_{LOF}$ ):	2,006E+11
Variance related to "pure error" ( $MS_{PE}$ ):	1,771E+11
$F =$	1,1326023
$F_{tab} =$	3,0657706

**Conclusion:**  
The least square regression line fits the instrumental response  
Validated RBS 12/2014

**Homoscedasticity Levene's test ►**

<b>Confidence level (95 or 99%) for the homoscedasticity test:</b>	<b>99%</b>
Calculated $W$ value, $W$ :	Critical $F$ value, $F_{crit}$ (99%) (one-tailed):
$W$ : <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">2,853502</span>	$F_{crit}$ (99%): <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">2,9353405</span> <span style="float: right; font-size: small;">[<math>F_{crit}(one;p-1;\Sigma o-p;99\%)=F_{crit}(8;45;99\%)</math>]</span>

**Conclusion:** Signals are homoscedastic (i.e. have statistically equivalent variances)  
Validated RBS 5/2015

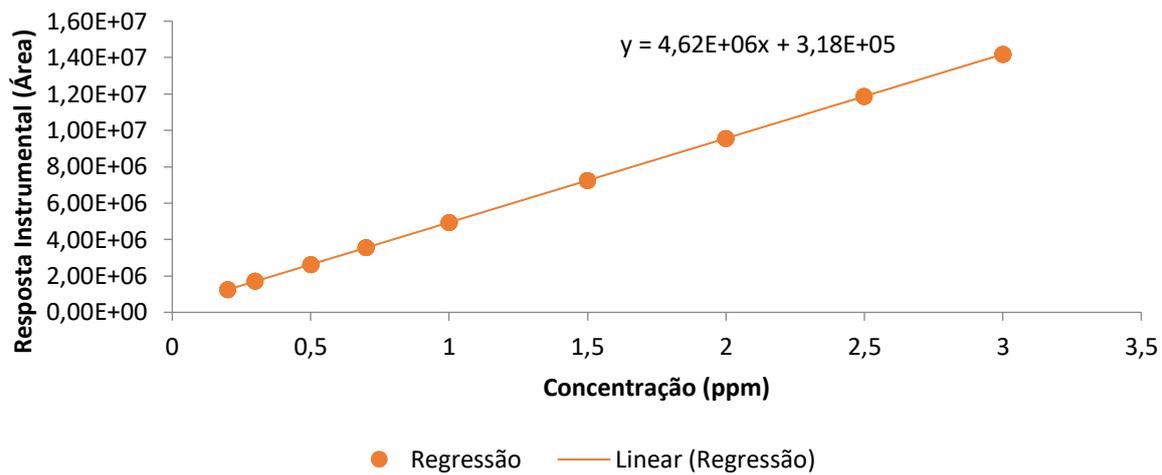


Figura 41 - Representação gráfica da reta de calibração do acetato de *n*-butilo e respetiva equação.  $R^2=0,9911$ .

# 1-Butanol

Tabela XXXIX - Respostas instrumentais de GC-MS a cada calibrador de 1-butanol, e respetiva incerteza expandida ( $k=2$ ).

Concentração dos calibradores (ppm)	Áreas dos picos em diferentes réplicas						Valor usado na Regressão
	1	2	3	4	5	6	
0,30 ± 0,01	8,84E+05	6,18E+05	8,11E+05	8,34E+05	7,95E+05	8,02E+05	8,71E+05
0,50 ± 0,02	1,56E+06	1,68E+06	1,74E+06	1,82E+06	1,43E+06	1,56E+06	1,38E+06
1,00 ± 0,03	2,61E+06	2,04E+06	2,29E+06	2,27E+06	2,04E+06	2,57E+06	2,64E+06
3,00 ± 0,08	9,37E+06	7,85E+06	6,53E+06	9,04E+06	7,67E+06	7,85E+06	7,69E+06
5,00 ± 0,13	1,21E+07	1,44E+07	1,33E+07	1,22E+07	1,36E+07	1,32E+07	1,27E+07
7,00 ± 0,18	1,66E+07	1,67E+07	1,90E+07	1,73E+07	1,59E+07	1,77E+07	1,78E+07
10,00 ± 0,25	2,50E+07	2,48E+07	2,65E+07	2,52E+07	2,40E+07	2,46E+07	2,54E+07
13,00 ± 0,32	3,31E+07	3,13E+07	3,35E+07	3,45E+07	3,45E+07	3,33E+07	3,30E+07

Tabela XL - Testes de linearidade ANOVA Lack-of-fit e de homoscedasticidade da reta de calibração do 1-butanol.

**ANOVA Lack-of-fit** ▶

Confidence level of the ANOVA Lack-of-fit test: **99%**

Variance related to lack-of-fit of the regression model ( $MS_{LOF}$ ): 1,12E+12  
 Variance related to "pure error" ( $MS_{PE}$ ): 6,37E+11  
 $F = 1,754104$   
 $F_{tab} = 3,291012$

**Conclusion:**  
 The least square regression line fits the instrumental response  
 Validated RBS 12/2014

**Homoscedasticity Levene's test** ▶

Confidence level (95 or 99%) for the homoscedasticity test: **99%**

Calculated  $W$  value,  $W$ : **2,647776**      Critical F value,  $F_{crit}$  (99%) (one-tailed): **3,123757**      [ $F_{crit}(one;p-1;\Sigma o-p;99\%)=F_{crit}(8;45;99\%)$ ]

**Conclusion:** **Signals are homoscedastic (i.e. have statistically equivalent variances)**  
 Validated RBS 5/2015

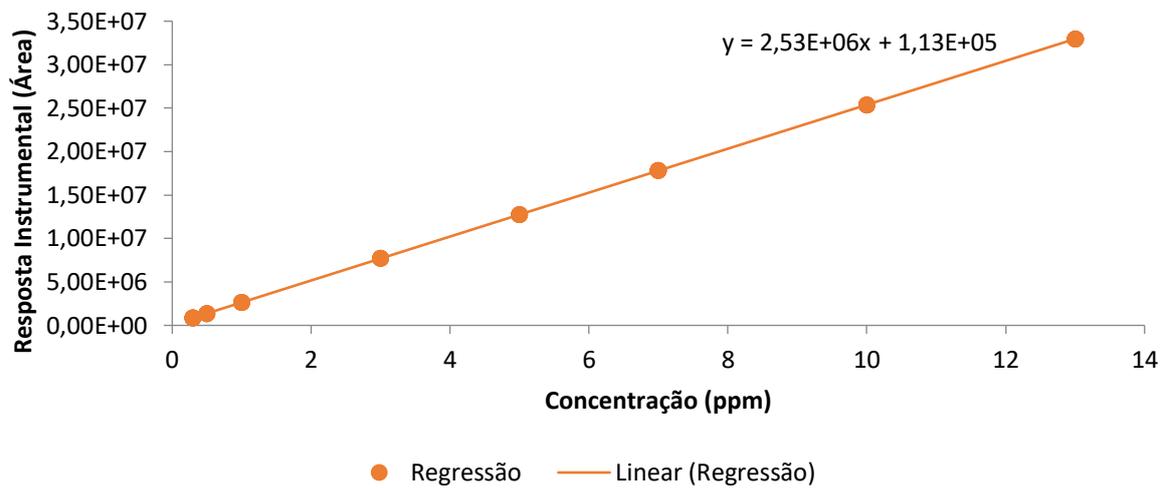


Figura 42 - Representação gráfica da reta de calibração do 1-butanol e respetiva equação.  $R^2=0,9946$ .

## Etanol

Tabela XLI - Respostas instrumentais de GC-MS a cada calibrador de etanol, e respetiva incerteza expandida ( $k=2$ ).

Concentração dos calibradores (ppm)	Áreas dos picos em diferentes réplicas						Valor usado na Regressão
	1	2	3	4	5	6	
50,00 ± 1,38	2,94E+07	2,42E+07	2,39E+07	2,63E+07	2,34E+07	2,84E+07	3,16E+07
200,00 ± 5,52	1,55E+08	1,14E+08	1,38E+08	1,38E+08	8,91E+07	1,31E+08	1,29E+08
400,00 ± 54,18	2,52E+08	2,29E+08	3,02E+08	2,38E+08	2,69E+08	2,78E+08	2,59E+08
700,00 ± 55,70	5,11E+08	4,16E+08	4,89E+08	5,11E+08	4,97E+08	4,61E+08	4,54E+08
1100,00 ± 58,88	6,99E+08	6,92E+08	6,65E+08	6,94E+08	6,49E+08	7,11E+08	7,14E+08
1600,00 ± 64,41	1,04E+09	1,03E+09	1,04E+09	1,01E+09	9,90E+08	1,16E+09	1,04E+09
2000,00 ± 35,14	1,38E+09	1,29E+09	1,28E+09	1,36E+09	1,21E+09	1,28E+09	1,30E+09

Tabela XLII - Teste de linearidade ANOVA Lack-of-fit da reta de calibração do etanol.

**ANOVA Lack-of-fit** ▶

Confidence level of the ANOVA Lack-of-fit test:	99%
---	-----

Variance related to lack-of-fit of the regression model ( $MS_{LOF}$ ): 1,983E+15  
 Variance related to "pure error" ( $MS_{PE}$ ): 1,523E+15  
 $F =$  1,3020268  
 $F_{tab} =$  3,5919136

**Conclusion:**  
The least square regression line fits the instrumental response  
Validated RBS 12/2014

**Homoscedasticity Levene's test** ▶

Confidence level (95 or 99%) for the homoscedasticity test:	99%
---	-----

Calculated  $W$  value,  $W$ : 2,37699      Critical F value,  $F_{crit}$  (99%) (one-tailed):  
 $F_{crit}$  (99%): 3,3679345      [ $F_{crit}(one;p-1;\Sigma\alpha-p;99\%)=F_{crit}(8;45;99\%)$ ]

**Conclusion:** Signals are homoscedastic (i.e. have statistically equivalent variances)  
Validated RBS 5/2015

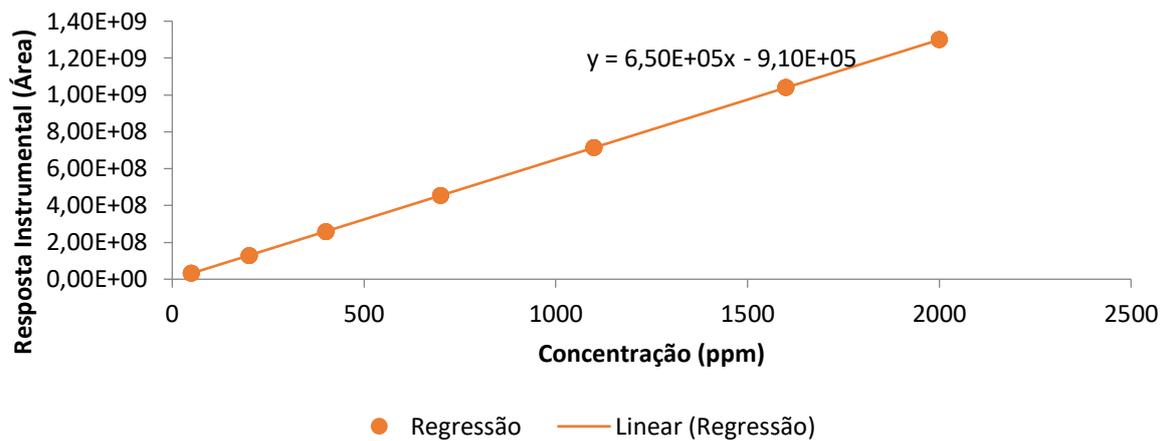


Figura 43 - Representação gráfica da reta de calibração do etanol e respetiva equação.  $R^2=0,9923$ .



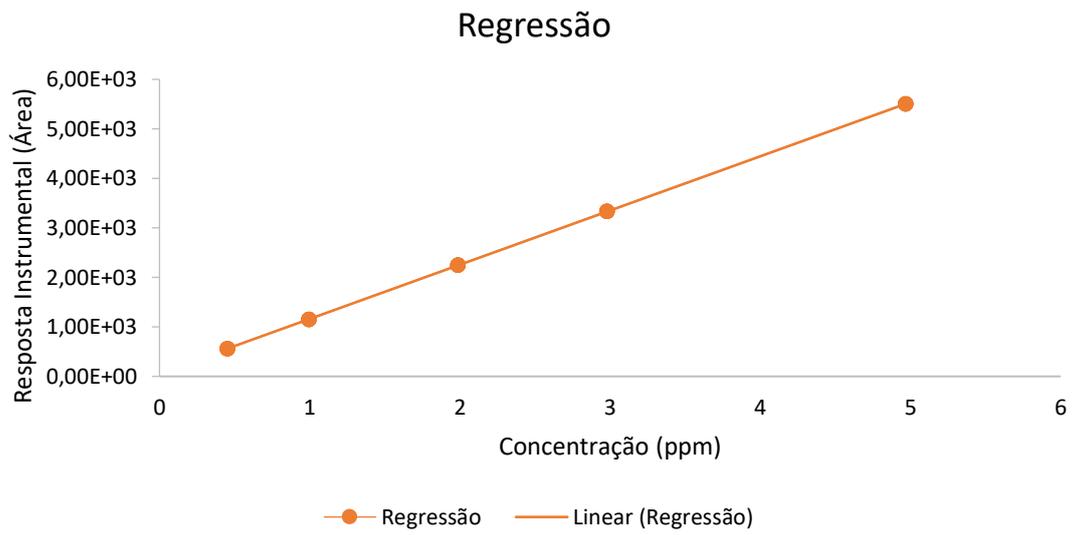


Figura 44 - Representação gráfica da reta de calibração do etileno e respetiva equação.  $R^2=0,9964$ .