

Análise de parâmetros bioquímicos para previsão precoce do acastanhamento interno de pera ‘Rocha’ do Oeste

Maria Leonor Santos Pintado

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica

Orientadora: Doutora Mariana da Silva Gomes Mota

Júri:

Presidente: Doutor Joaquim Miguel Rangel da Cunha Costa, Professor auxiliar do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Vogais: Doutora Alexandra Maria Fonseca Castelo Dias de Carvalho, Diretora do Departamento de Investigadora, Formação e Serviços do(a) Empresa IEQUALTECS;

Doutora Mariana da Silva Gomes Mota, Técnica Superior do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, orientadora;

Mestre Filipe Jorge Pereira da Silva, na qualidade de especialista do(a) CPF – Centro de Produção e Comercialização Hortofrutícola, Lda.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar a Deus, as graças necessárias para ter chegado até aqui, o meu percurso académico e todas as pessoas maravilhosas com quem me cruzei.

Em segundo lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora, a Professora Mariana Mota, que sempre me ajudou, incansavelmente, com exigência e compreensão ao mesmo tempo, num equilíbrio exemplar e construtor. Quero agradecer-lhe também toda a paciência e todos os ensinamentos que me transmitiu, quer sobre os temas utilizados para a elaboração desta tese, quer a nível pessoal, como exemplo de vida cívica e cristã.

Agradeço igualmente a toda a minha família, marido e amigos, mas especialmente à minha mãe, que me ajudaram incansavelmente, me apoiaram em tudo e me ajudaram a corrigir a tese.

Agradeço igualmente à empresa IEQUALTECS Lda., ao Centro de Produção e Comercialização Hortofrutícola (CPF) que forneceu o material vegetal, sem o qual não teria sido possível a realização deste estudo, ao projecto RMPPrA-PeRA, que financiou parcialmente esta tese, ao Programa Operacional Regional do Centro: CENTRO-010247-FEDER-010959, ao Portugal 2020, e à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (através da unidade de investigação LEAF).

Por último, agradecer à secção de Hortofruticultura e Viticultura do ISA, onde realizei todas as análises laboratoriais necessárias à elaboração desta tese, em especial à ajuda da D. Nídia, da Engenheira Luísa, e a todos aqueles que iam passando pelo laboratório, alegrando cada dia.

Um muito obrigada a todos!

Resumo

Neste trabalho foi estudada a evolução das características de qualidade e o aparecimento de acastanhamento interno em pera 'Rocha' ao longo do armazenamento em atmosfera controlada dinâmica: $-0,5^{\circ}\text{C}$, com humidade relativa entre 90 e 95%, 0,5 % de oxigénio e 0,5 % de dióxido de carbono (CO_2). Foram realizadas análises químicas, físicas e bioquímicas a lotes de 20 peras provenientes de três pomares da região Oeste (Bombarral, Mafra e Zambujeira), após 9 períodos de conservação (t_0 , t_{15-16} , t_{29-30} , t_{50-63} , t_{78-91} , $t_{107-120}$, $t_{141-154}$, $t_{162-175}$, $t_{212-225}$ dias), para 0 e 7 dias após a retirada da câmara.

Para cada pera foi medida a firmeza ($\text{kg}/0,5\text{cm}^2$), massa (g), teor de sólidos solúveis ($^{\circ}\text{Brix}$), acidez titulável (g/L), vitamina C (mg/L), teor de fenóis totais (mg/L) e atividade das enzimas polifenoloxidase (PPO) e álcool desidrogenase (ADH), bem como a incidência e severidade do acastanhamento interno. Foi posteriormente estudada a relação entre a incidência de acastanhamento interno e os restantes parâmetros, para diferentes períodos de conservação, tempos de prateleira e pomares.

Os resultados indicaram que os frutos à saída da câmara mantiveram os parâmetros praticamente inalterados dos 0 aos 225 dias de conservação. Contudo, depois de 7 dias fora de câmara, com o aumento do tempo de conservação o teor de sólidos solúveis, acidez titulável, PPO e ADH aumentaram e o teor de fenóis total diminuiu. No pomar de Mafra, 16% das frutas foram afetadas pelo acastanhamento interno enquanto que na Zambujeira e no Bombarral as incidências foram inferiores a 1%. Esta diferença está fortemente relacionada com a reduzida firmeza dos frutos de Mafra, que foram colhidos mais tarde do que os dos restantes pomares. Verificou-se ainda que a perda de firmeza, períodos de conservação prolongados, calibres maiores e menor teor de vitamina C se relacionam positivamente com a incidência do acastanhamento interno.

Palavras-chave

Pera 'Rocha', Acidentes fisiológicos, Atmosfera controlada, Firmeza, Tempo de conservação.

Abstract

In this work we studied the evolution of the 'Rocha' pear quality and the incidence of internal browning on fruits stored in a controlled dynamic atmosphere: $-0,5^{\circ}\text{C}$, with relative humidity between 90 and 95%, 0,5% of oxygen (O_2) and 0,5% carbon dioxide (CO_2). Chemical, physical and biochemical analyzes were performed on batches of 20 pears each, from three different orchards (Bombarral, Mafra and Zambujeira), after nine storage periods (t_0 , t_{15-16} , t_{29-30} , t_{50-63} , t_{78-91} , $t_{107-120}$, $t_{141-154}$, $t_{162-175}$, $t_{212-225}$ days), for 0 and 7 days after the removal from the storage chamber.

For each pear it was measured the firmness ($\text{kg}/0,5\text{cm}^2$), mass (g), soluble solids content ($^{\circ}\text{Brix}$), titratable acidity (g/L), vitamin C (mg/L), total content of phenols (mg/L) and activity of polyphenol oxidase (PPO) and alcohol dehydrogenase (ADH) enzymes as well as the incidence and severity of internal browning. It was subsequently studied the relation between the incidence of internal browning and the remaining parameters, for each conservation period, shelf time and orchards.

The results indicated that fruits with 0 days of shelf time maintained the parameters practically unchanged from 0 to 225 conservation days. However, after 7 days out of the chamber, with increasing conservation periods the soluble solids content, titratable acidity, PPO and ADH increased and the total phenol content decreased. In Mafra orchard 16% of the fruits were affected by internal browning, whereas in Zambujeira and Bombarral the incidences were less than 1%. This difference is strongly related to the reduced firmness of Mafra fruits, which were harvested later than those of the other orchards. It was also verified that loss of firmness, longer storage time, larger caliber of the fruits and less quantity of vitamin C relates positively with the incidence of internal browning

Keywords

'Rocha' pear, Physiological disorder, Controlled atmosphere, Firmness, Storage time.

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo	II
Abstract.....	III
Índice	IV
Índice de figuras	VII
Índice de tabelas	X
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	XIII
1. Introdução.....	1
2. A importância da pera a nível nacional e internacional.....	3
2.1 A produção de pera a nível mundial.....	3
2.2. A produção de pera em Portugal	5
2.2.1. A nível económico.....	5
2.2.2. A nível geográfico	7
2.2.3. A nível de cultivares – a pera ‘Rocha’	7
3. Qualidade da pera ‘Rocha’	8
3.1. Atributos de qualidade.....	8
3.1.1. Firmeza	8
3.1.2. Teor de sólidos solúveis	9
3.1.3. Acidez titulável	9
3.2. Defeitos que comprometem a qualidade.....	9
4. Fatores que afetam o acastanhamento interno	12
4.1. Fatores pré-colheita.....	12
4.2. Fatores pós- colheita	17
4.2.1. O armazenamento	17
4.2.2. O etileno.....	19
4.2.3. Outros fatores	21
5. Bases bioquímicas do acastanhamento interno	21
5.1. Polifenol oxidases.....	23
5.2. Perda de integridade das membranas	24
5.2.1. As espécies reativas de oxigénio	24
5.2.2. A acumulação de metabolitos da fermentação	25
5.2.2.1. Álcool desidrogenase	26
5.3. Vitamina C	27
5.4. A peroxidase.....	29

6. Métodos de previsão do acastanhamento interno	29
6.1. Biomarcadores para prever acastanhamento interno em pera 'Rocha' (método destrutivo)	30
6.2. Utilização de concentrações minerais para prever acastanhamento interno em pera 'Rocha' (método destrutivo).....	30
6.3. Aplicação de radiação eletromagnética de baixo comprimento de onda para a avaliação da qualidade de peras (método não-destrutivo).....	30
7. Material e Métodos	31
7.1. Material vegetal e datas de análise.....	31
7.2. Métodos analíticos.....	31
7.2.1 Determinação da firmeza.....	32
7.2.2 Acidez titulável.....	32
7.2.3 Teor de fenóis totais	32
7.2.4 Teor de sólidos solúveis	32
7.2.5 Vitamina C	32
7.2.6 Quantificação de proteína solúvel total.....	33
7.2.7 Determinação indirecta de actividade da PPO.....	33
7.2.8 Determinação indirecta de actividade da ADH.....	33
7.2.9 Acastanhamento interno.....	33
7.3. Análise de dados: métodos estatísticos para avaliar o efeito dos diferentes fatores	34
8. Resultados e Discussão.....	36
8.1. Gama dos parâmetros de qualidade e dos fatores que afetam o AI durante o armazenamento em regime de ACD	36
8.2. Efeito individualizado da 'Conservação' e da 'Data' para cada pomar sobre os parâmetros analisados.....	38
8.2.1. Conservação.....	38
8.2.2. Data.....	48
8.3. Efeitos conjugados (dois a dois) da 'Conservação', 'Data' e 'Pomar' sobre os parâmetros analisados.....	51
8.3.1. Interação 'Conservação' <i>versus</i> 'Data'	51
8.3.2. Interação 'Conservação' <i>versus</i> 'Pomar'	55
8.3.3. Interação 'Data' <i>versus</i> 'Pomar'	56
8.4. Efeitos conjugados da 'Conservação', 'Data' e 'Pomar' sobre os parâmetros analisados	58
8.4.1. Interação 'Conservação' <i>versus</i> 'Data' <i>versus</i> 'Pomar'	58
8.5. Monitorização do desenvolvimento de acastanhamento interno e quantificação da incidência e severidade do mesmo	62
8.5.1. Monitorização do desenvolvimento de acastanhamento interno	62

8.5.2. Quantificação da severidade do acastanhamento interno	64
8.6. Relação entre o acastanhamento interno e os parâmetros medidos	65
9. Conclusão.....	68
Referências Bibliográficas	70
ANEXOS.....	81
Anexo I - Procedimento experimental	81
Anexo II – Validação dos pressupostos necessários à realização do tratamento estatístico.....	85
Anexo III – Cálculo dos valores de F e de R^2 para o ajustamento linear das médias cada um dos parâmetros em relação à ‘Conservação’, com ‘Data’=7 e para cada um dos pomares.	87
Anexo IV – Resultados do teste de Tukey realizado à interação entre ‘Conservação’ e ‘Pomar’	88
Anexo V – Resultados do teste de Tukey realizado à interação entre ‘Conservação’, ‘Pomar’ e ‘Data’.....	90

Índice de figuras

Figura 1 – Principais produtores mundiais de pera em 2016. Adaptado de FAO (2017).	3
Figura 2 – Produção de pera na Europa, em 2014, discriminada pelos principais países produtores (FAO, 2014).	4
Figura 3 – Principais cultivares de pera utilizadas na Europa em 2016. Adaptado de WAPA, 2016 ...	4
Figura 4 – Principais cultivares de pera utilizadas nos Estados Unidos da América em 2016 (WAPA, 2016).	5
Figura 5 - Mapa das principais zonas produtoras de pera 'Rocha'. Fonte: [http://www.coopval.com/pt/produtos].	7
Figura 6 – Esquema representativo da degradação do amido (Hobson, 1994).	9
Figura 7 – Diferentes graus de incidência e severidade de escaldão superficial em pera 'Rocha'. A imagem da esquerda representa um fruto não afetado (sem incidência) e as imagens seguintes representam frutos progressivamente mais afetados (Carvalho, 2011).	10
Figura 8 - Diferentes graus de incidência e severidade de acastanhamento interno em pera 'Rocha'. A imagem da esquerda representa um fruto não afetado (sem incidência), e as imagens seguintes representam frutos progressivamente mais afetados.	10
Figura 9 – Diversos tipos de sintomatologias diferentes para o mesmo problema: acastanhamento interno. Fonte das fotografias 1 e 5: Sobreiro, 2016.	11
Figura 10 –Evolução da produção de etileno (linha azul escura) e da produção de CO ₂ (linha negra) para frutos não climatéricos (à esquerda) e climatéricos (à direita). Os frutos climatéricos apresentam um “pico” de produção de etileno e de CO ₂ (pico de respiração), contrariamente aos frutos não climatéricos (Kieber, 1998).	19
Figura 11 – Representação esquemática do modo de ação do etileno nas células. (Adaptado de Abeles <i>et al.</i> , 1992 e de Kieber, 1998)	20
Figura 12 – Esquema geral dos principais processos que conduzem ao desenvolvimento de AI: a oxidação de compostos fenólicos pela enzima PPO e a acumulação de metabolitos fermentativos tóxicos para as células (Veltman <i>et al.</i> , 2002).	22
Figura 13 – Esquema representativo das reações catalizadas pela PPO e mecanismo de ação do AA. Os monofenóis são hidrolisados a difenóis pela PPO (pela creolase) (1); depois, os o-difenóis são oxidados a o-quinonas pela PPO (pela catecolase) (2) e, por último, o ácido ascórbico reduz as o-quinonas novamente a o-difenóis (3), formando ácido dehidroascórbico (Deuchande, 2016).	23
Figura 14 – Esquema do funcionamento do sistema oxidativo do ácido ascórbico (Deuchande, 2016).	25
Figura 15 – Esquema representativo do processo de fermentação alcoólica que ocorre no interior das peras em condições de anaerobiose fomentadas pela atmosfera controlada.	26
Figura 16 – Esquema-resumo dos processos em que o AA está envolvido (Veltman, 2002; Ahmad <i>et al.</i> , 2010).	27

Figura 17 – Esquema das diferentes formas em que se pode encontrar o AA.	28
Figura 18 –Explicação da forma de obtenção da área total de cada pera, convertida em pixels pelo <i>software</i> GIMP (a vermelho).....	34
Figura 19 - Explicação da forma de obtenção da área afetada pelo acastanhamento interno em cada pera, convertida em pixels pelo <i>software</i> GIMP (a vermelho).	34
Figura 20 - Boxplots para os valores da firmeza, grau Brix e acidez titulável, para 'Data'=0 e 'Cons'=[0,225].....	36
Figura 21 - Boxplots para os valores da vitamina C, fenóis, PPO e ADH, para 'Data'=0 e 'Cons'=[0,225]	37
Figura 22 – Linhas de tendência das médias dos parâmetros analisados ao longo do período de conservação, para 'Data'=0 e 'Pomar'='Zam', 'Ma' e 'Bom' conjuntamente. Todos os parâmetros devem ser analisados em função do eixo principal (da esquerda), exceto os fenóis, que devem ser analisados a partir do eixo secundário.	39
Figura 23 - Linhas de tendência das médias dos parâmetros analisados ao longo do período de conservação, para 'Data'=0 e 'Pomar'='Zam', 'Ma' e 'Bom' conjuntamente. Todos os parâmetros devem ser analisados em função do eixo principal (da esquerda), exceto os fenóis, que devem ser analisados a partir do eixo secundário.	44
Figura 24 – Gráficos das linhas de tendência das médias dos parâmetros analisados ao longo do período de conservação, com base na interação entre 'Data' e 'Conservação', para 'Data'=(0,7), 'Cons']=[0,225[e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' conjuntamente (n=60).	52
Figura 25 – Gráficos relativos à evolução do teor de fenóis totais (esquerda) e da enzima PPO (direita) ao longo do tempo de 'Conservação'. Estes gráficos foram retirados do estudo de Deuchande (2016), com vista a comparar os resultados obtidos nesta tese com resultados de outro autor. Os pontos preenchidos a negro são os únicos que interessam como termo de comparação, porque são os que se referem ao estudo feito nas mesmas condições que este (ACD). Este estudo refere-se apenas à 'Data' 0. Fonte: Deuchande (2016).	54
Figura 26 – Gráficos das médias dos parâmetros analisados ao longo do período de conservação, com base na interação entre 'Pomar e 'Conservação', para 'Data'=(0,7 conjuntamente), 'Cons']=[0,225[e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' (n=1038)	56
Figura 27 - Linhas de tendência das médias dos parâmetros analisados ao longo do período de conservação, com base na interação entre 'Data' e 'Pomar', para 'Data'=(0,7), 'Cons']=[0,225[e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' separadamente (n=180)	57
Figura 28 – Gráficos <i>qqplot</i> para cada fator: (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respetivamente, a firmeza, Brix, AT, vitamina C, fenóis, PPO e ADH.	58
Figura 29 - Gráfico das linhas de tendência das médias das firmezas analisadas ao longo do período de conservação, com base na interação entre 'Data', 'Conservação' e 'Pomar', para 'Data'=(0,7), 'Cons']=[0,225[e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' separadamente (n=20).....	59
Figura 30 - Gráfico das linhas de tendência das médias dos TSS analisados ao longo do período de conservação, com base na interação entre 'Data', 'Conservação' e 'Pomar', para 'Data'=(0,7), 'Cons']=[0,225[e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' separadamente (n=20).....	59

Figura 31 - Gráfico das linhas de tendência das médias dos valores de acidez titulável analisados ao longo do período de conservação, com base na interação entre 'Data', 'Conservação' e 'Pomar', para 'Data'=(0,7), 'Cons'=[0,225[e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' separadamente (n=20).	60
Figura 32 - Gráfico das linhas de tendência das médias dos valores de vitamina C analisados ao longo do período de conservação, com base na interação entre 'Data', 'Conservação' e 'Pomar', para 'Data'=(0,7), 'Cons'=[0,225[e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' separadamente (n=20).	60
Figura 33 - Gráfico das linhas de tendência das médias dos valores de fenóis analisados ao longo do período de conservação, com base na interação entre 'Data', 'Conservação' e 'Pomar', para 'Data'=(0,7), 'Cons'=[0,225[e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' separadamente (n=20).	60
Figura 34 - Gráfico das linhas de tendência das médias dos valores da atividade da enzima PPO analisados ao longo do período de conservação, com base na interação entre 'Data', 'Conservação' e 'Pomar', para 'Data'=(0,7), 'Cons'=[0,225[e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' separadamente (n=20). ..	61
Figura 35 - Gráfico das linhas de tendência das médias dos valores da atividade da enzima ADH analisados ao longo do período de conservação, com base na interação entre 'Data', 'Conservação' e 'Pomar', para 'Data'=(0,7), 'Cons'=[0,225[e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' separadamente (n=20). ..	61
Figura 36 - Evolução do número de peras com acastanhamento interno ao longo do período de conservação, para o 'Pomar' do Bombarral, para as 'Datas' 0 e 7.	62
Figura 37 - Evolução do número de peras com acastanhamento interno ao longo do período de conservação, para o 'Pomar' de Mafra, para as 'Datas' 0 e 7.	62
Figura 38 - Evolução do número de peras com acastanhamento interno ao longo do período de conservação, para o 'Pomar' da Zambujeira, para as 'Datas' 0 e 7.	63
Figura 39 – Linhas de tendência da evolução da severidade do acastanhamento interno para cada pomar, ao longo do tempo de conservação e retas de regressão respetivas.	64

Índice de tabelas

Tabela 1 - <i>Ranking</i> dos quatro principais frutos produzidos em Portugal (GPP, 2017a).....	5
Tabela 2 – Balanço comercial internacional português de alguns frutos frescos e secos em 2015 (GPP, 2017a).....	6
Tabela 3 – Resumo da forma como o clima afeta a suscetibilidade ao acastanhamento interno	13
Tabela 4 - Resumo da forma como o tipo de solo e localização do pomar afeta a suscetibilidade ao acastanhamento interno	13
Tabela 5 - Resumo da forma como a adubação afeta a suscetibilidade ao acastanhamento interno.	14
Tabela 6 - Resumo da forma como as operações culturais e posicionamento dos frutos afetam a suscetibilidade ao acastanhamento interno	15
Tabela 7 - Resumo da forma como a data de colheita e grau de maturação dos frutos afetam a suscetibilidade ao acastanhamento interno	16
Tabela 8 - Relação entre os atributos de qualidade e o AI.....	16
Tabela 9 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre o tipo de conservação e os restantes parâmetros analisados, para 'Data'=0 e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' conjuntamente (n=60)	39
Tabela 10 - Valores de F e de R ² calculados para o ajustamento linear das médias de cada um dos parâmetros, com 'Data'=0 e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' conjuntamente (n=538).....	39
Tabela 11 – Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre o tipo de conservação e os restantes parâmetros analisados, para 'Data'=0 e 'Pomar' = Zam (n=20).....	41
Tabela 12 - Valores de F e de R ² calculados para o ajustamento linear das médias de cada um dos parâmetros, com 'Data'=0 e 'Pomar' = 'Zam' (n=180)	41
Tabela 13 – Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre o tipo de conservação e os restantes parâmetros analisados, para 'Data'=0 e 'Pomar' = Bom (n=20)	42
Tabela 14 - Valores de F e de R ² calculados para o ajustamento linear das médias de cada um dos parâmetros, com 'Data'=0 e 'Pomar' = 'Bom' (n=180)	42
Tabela 15 – Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre o tipo de conservação e os restantes parâmetros analisados, para 'Data'=0 e 'Pomar' = Ma (n=20).....	43
Tabela 16 - Valores de F e de R ² calculados para o ajustamento linear das médias de cada um dos parâmetros, com 'Data'=0 e 'Pomar' = 'Ma' (n=180).....	43
Tabela 17 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre o tipo de conservação e os restantes parâmetros analisados, para 'Data'=7 e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' conjuntamente (n=20)	44
Tabela 18 - Valores de F e de R ² calculados para o ajustamento linear das médias de cada um dos parâmetros, com 'Data'=7 e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' conjuntamente (n=498).....	44

Tabela 19 – Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre o tipo de conservação e os restantes parâmetros, para ‘Data’=7 e ‘Pomar’ = Zam (n=20).....	46
Tabela 20 – Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre o tipo de conservação e os restantes parâmetros, para ‘Data’=7 e ‘Pomar’ = Bom (n=20).....	46
Tabela 21 – Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre o tipo de conservação e os restantes parâmetros analisados, para ‘Data’=7 e ‘Pomar’ = Ma (n=20).....	46
Tabela 22 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre a duração do tempo de prateleira e os restantes parâmetros analisados (n=519).....	48
Tabela 23 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre a duração do tempo de prateleira e os restantes parâmetros analisados (n=340).....	49
Tabela 24 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre a duração do tempo de prateleira e os restantes parâmetros analisados (n=339).....	49
Tabela 25 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre a duração do tempo de prateleira e os restantes parâmetros analisados (n=359).....	49
Tabela 26 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre a interação tipo de conservação <i>versus</i> data e os restantes parâmetros analisados, para ‘Data’=(0,7) ‘Cons’=[0,225[e ‘Pomar’ = ‘Zam’, ‘Ma’ e ‘Bom’ conjuntamente (n=60).....	51
Tabela 27 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre a interação pomar <i>versus</i> data e os restantes parâmetros analisados, para ‘Data’=(0,7) conjuntamente, ‘Cons’=[0,225[e ‘Pomar’ = ‘Zam’, ‘Ma’ e ‘Bom’ conjuntamente (n=180). 57	
Tabela 28 – Severidade do acastanhamento interno, calculada com base nas médias das áreas afetadas por este problema, para cada fruto	64
Tabela 29 - Resultados dos testes de <i>Kruskal-Wallis</i> para cada parâmetro.....	65
Tabela 30 – Resultados dos testes realizados à normalidade de cada parâmetro.....	85
Tabela 31 - Resumo dos resultados dos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade das variâncias (teste de Brown–Forsythe) efetuados para validação dos pressupostos da ANOVA relativa à análise do fator conservação.....	86
Tabela 32 - Resumo dos resultados dos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade das variâncias (teste de Brown–Forsythe) efetuados para validação dos pressupostos da ANOVA relativa à análise do fator data	86
Tabela 33 - Resumo dos resultados dos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade das variâncias (teste de Brown–Forsythe) efetuados para validação dos pressupostos da ANOVA relativa à análise do fator pomar	86
Tabela 34 - Valores de F e de R ² calculados para o ajustamento linear das médias cada um dos parâmetros, com ‘Data’=7 e ‘Pomar’ = ‘Zam’ (n=160)	87
Tabela 35 - Valores de F e de R ² calculados para o ajustamento linear das médias de cada um dos parâmetros, com ‘Data’=7 e ‘Pomar’ = ‘Bom’ (n=159)	87

Tabela 36 - Valores de F e de R ² calculados para o ajustamento linear das médias de cada um dos parâmetros, com 'Data'=7 e 'Pomar' = 'Ma' (n=179).....	87
Tabela 37 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre a interação tipo de 'Conservação' versus 'Pomar' e 'Firmeza', 'Brix', 'AT' e 'VitC', para 'Data'=0, 'Cons'=[0,225[e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' separadamente (n=20).....	88
Tabela 38 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre a interação tipo de 'Conservação' versus 'Pomar' e 'Fenóis', 'PPO' e 'ADH', para 'Data'=0, 'Cons'=[0,225[e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' separadamente (n=20)	89
Tabela 39 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre a interação tipo de 'Conservação' versus 'Data' versus 'Pomar' e os parâmetros 'Firmeza', 'Brix' e 'AT', para 'Data'=(0,7), 'Cons'=[0,225[e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' separadamente (n=20)	90
Tabela 40 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre a interação tipo de 'Conservação' versus 'Data' versus 'Pomar' e os parâmetros 'Vitamina C' e 'Fenóis', para 'Data'=(0,7), 'Cons'=[0,225[e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' separadamente (n=20)	91
Tabela 41 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre a interação tipo de 'Conservação' versus 'Data' versus 'Pomar' e os parâmetros 'PPO' e 'ADH', para 'Data'=(0,7), 'Cons'=[0,225[e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' separadamente (n=20)	92

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

AA- Ácido ascórbico	GSSG - Glutaciona dissulfato
AC- Atmosfera controlada	HR – Humidade relativa
ACD- Atmosfera controlada dinâmica	M – Milhões
ADH –Álcool desidrogenase	1-MCP- 1- Metilciclopropeno
AF – Acidentes fisiológicos	Ma - Mafra
AI – Acastanhamento interno	Max – Máximo
AN – Atmosfera normal	MDHA – Monodesidroascorbato
ADH- Álcool Desidrogenase	MDHAR- Monodesidroascorbato redutase
APX - Ascorbato peroxidase	Med – Média
AsA - Ácido ascórbico na forma reduzida	Min - Mínimo
AT- Acidez titulável	MS – Matéria seca
ATP- Trifosfato de adenosina	NAD - Dinucleótido de nicotinamida e adenina
Bom - Bombarral	NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
CAT - Catalase	OD – Optical density
Cons – Conservação	PDC- Piruvato descarboxilase
CPF - Centro de Produção e Comercialização Hortofrutícola	POD –Peroxidase
DCPIP- 2,6-diclorofenolindofenol	PPO - Polifenoloxidase
DHA - Ácido desidroascórbico	RM - Ressonância magnética
DHAR- Desidroascorbato redutase	RMN - Ressonância magnética nuclear
DOP - Denominação de origem protegida	SOD –Superóxido dismutase
DPA- Difenilamina	T - Toneladas
ERO- Espécies reactivas de oxigénio	TSS- Teor de sólidos solúveis
ES – Escaldão superficial	Zam - Zambujeira
EUA - Estados Unidos da América	λ – Comprimento de onda
GR- Glutaciona redutase	

1. Introdução

A pera “Rocha” é um dos produtos frutícolas nacionais de maior relevância, quer em termos de área quer em termos de importância económica e exportadora. Contudo, a sua produção e conservação tem vindo a enfrentar alguns problemas, como é o caso do acastanhamento interno. A investigação deste tipo de problemas é muito importante, uma vez que o acastanhamento interno é um dos fatores que tem levado ao decréscimo do consumo de pêra ‘Rocha’ em Portugal nos últimos anos, em especial depois da proibição do uso de antioxidantes pós-colheita como a difenilamina (Sobreiro, 2016).

Dado que este é um problema interno, os consumidores não têm como detetar se os frutos estão afetados aquando do ato de compra, e a sua insatisfação pode levar à desfidelização do produto e conseqüente redução da procura. Para além desta redução da procura, o aparecimento de problemas ao longo da conservação (como o acastanhamento interno e a falta de firmeza) força por vezes a que a venda dos frutos seja efetuada a preços mais baixos ou a que estes sejam encaminhados para processamento a preços muito reduzidos. Estes fatores económicos tornam ainda mais premente a investigação sobre este tema.

Uma vez que a pera ‘Rocha’ praticamente só é produzida em Portugal, não há muitos estudos que possam fornecer dados científicos para uma melhor condução e tratamento pré e pós colheita, tornando-se indispensável o investimento nacional no conhecimento desta variedade. Esta cultura tem uma grande importância para o nosso país, não só em termos de produção (a pera ocupa o terceiro lugar em termos de produção frutícola), mas também em termos de área (12115 ha em 2015) e exportação (GPP, 2017b), o que reforça novamente a importância deste estudo. Um decréscimo significativo do consumo de pera ‘Rocha’ teria um grande impacto na economia agrícola do país.

Procurando contribuir para dar resposta a estes problemas, foram propostos três pontos sobre os quais esta tese irá incidir.

A primeira questão tem a ver com a forma como alguns parâmetros de qualidade (firmeza, teor de sólidos solúveis, Acidez titulável e alguns parâmetros bioquímicos (vitamina C, fenóis e as enzimas PPO e ADH) variam com o tempo de conservação, o tempo de prateleira, e com diferentes localizações e gestão de pomares.

A segunda questão tem a ver estritamente com o acastanhamento interno. Neste ponto, pretende-se monitorizar o desenvolvimento deste problema fisiológico, quantificar a incidência e severidade do mesmo (através da percentagem de área com o acidente nas fotografias dos frutos afetados) e averiguar se há algum dos parâmetros avaliados em laboratório (firmeza, massa de cada fruto, massa do resíduo do sumo, matéria seca do fruto e do sumo, teor de sólidos solúveis, acidez titulável, quantidade de vitamina C presente no sumo, teor total de fenóis, teor de proteína solúvel do sumo, e actividade das enzimas polifenoloxidase (PPO) e álcool desidrogenase (ADH) presentes no sumo) que se relacione com o aparecimento deste problema fisiológico.

Por último, o terceiro objetivo desta tese é fornecer os dados necessários para o desenvolvimento do projecto RMPPrA-PeRA (“Métodos de Ressonância Magnética para Previsão Precoce do Acastanhamento Interno de Pera ‘Rocha’ e Amadurecimento de Produtos Hortofrutícolas”), em parceria com a empresa IEQUALTECS Lda. Este projeto está agora no segundo ano, sendo que

no primeiro ano se desenvolveu igualmente uma tese com base no projeto. Será feita uma comparação de alguns dos resultados obtidos por Pereira (2017) com os resultados deste trabalho.

O principal foco deste projeto é o desenvolvimento de um método não destrutivo que permita detetar a priori os frutos que têm maior propensão a vir a ter acastanhamento interno. O objetivo desta tese é o suporte (ou não) do uso de ressonância magnética nuclear (RMN) unilateral para a previsão precoce do acastanhamento interno em pera 'Rocha' do Oeste. Este suporte será feito através do confronto entre os dados obtidos na análise de qualidade das peras (através da observação dos frutos e das análises laboratoriais acima discriminadas) e os parâmetros de relaxometria medidos através do uso de RMN unilateral, tentando encontrar alguma correlação entre os fenómenos de RMN unilateral, bioquímica e a incidência e severidade de acastanhamento interno. Caso se verifique eficaz, este método poderá ser utilizado em grande escala no sector de produção, e assim as peras mais susceptíveis de desenvolver problemas de acastanhamento interno seriam as primeiras a ser vendidas, de modo a evitar desperdícios alimentares e perdas económicas para as centrais.

2. A importância da pera a nível nacional e internacional

2.1 A produção de pera a nível mundial

O principal país produtor de pera do mundo é a China, com 70,8% da produção mundial (FAO, 2017). A Argentina e os Estados Unidos da América ocupam a segunda e a terceira posições no *ranking* mundial, respetivamente (FAO, 2014), como se pode ver na figura 1.

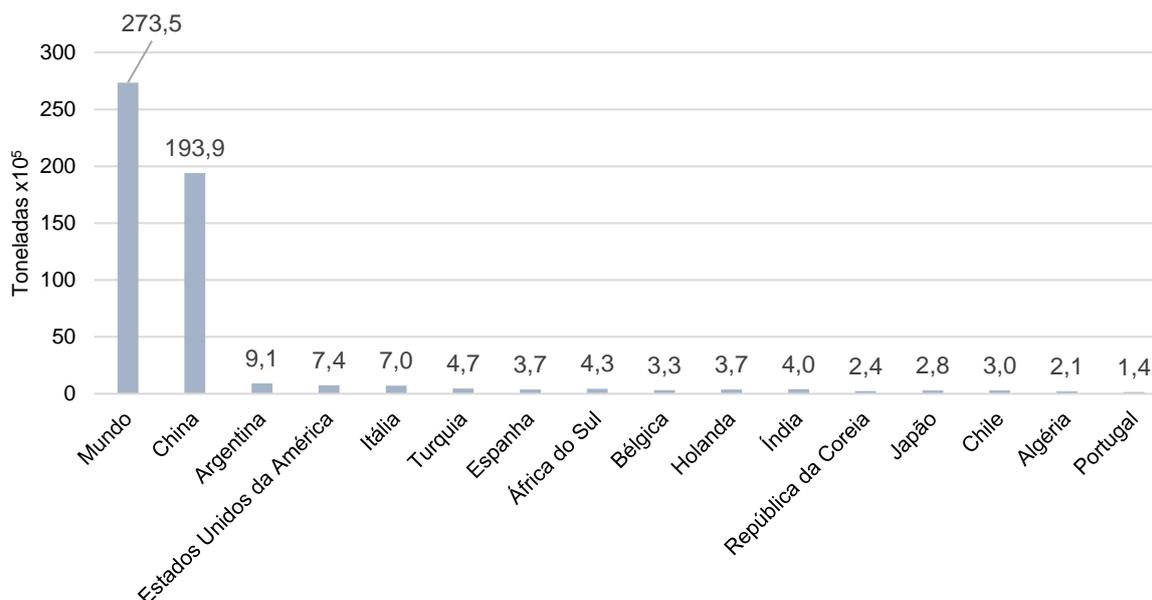


Figura 1 – Principais produtores mundiais de pera em 2016. Adaptado de FAO (2017).

Portugal, apesar da sua pequena dimensão, é o 15º maior produtor de pera a nível mundial (FAO, 2014) ocupando, portanto, uma posição de destaque no *ranking* internacional. A importância da produção nacional de pera é ainda realçada pelo facto de a maioria desta produção (67%) ser destinada a exportação (GPP, 2016). Portugal é o 8º maior exportador de pera do mundo (WAPA, 2014).

A Europa contribui com apenas cerca de 13% da produção mundial de pera, destacando-se Itália e Espanha como os principais produtores europeus (FAO, 2017), como se pode ver na figura 2. A produção nacional de pera corresponde apenas a cerca de 8% da produção europeia (FAO, 2014).

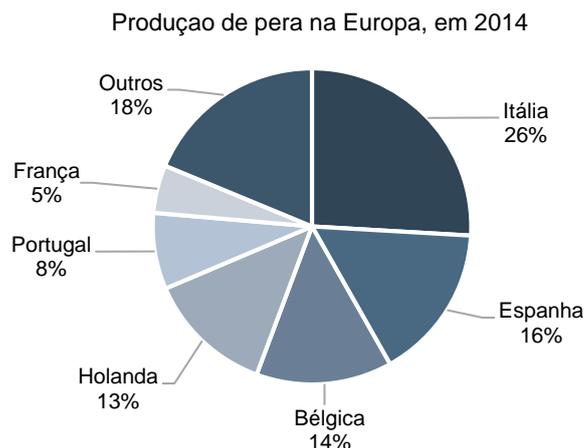


Figura 2 – Produção de pera na Europa, em 2014, discriminada pelos principais países produtores (FAO, 2014).

Tendo em conta a dimensão da produção nacional, e dado que 95% desta produção é da cultivar ‘Rocha’ (Marketing Agrícola, 2016), não é de estranhar o facto desta ser a 3ª cultivar mais produzida a nível europeu (WAPA, 2016) (Figura 3). As outras cultivares de pera utilizadas na Europa são a ‘Conférence’ com cerca de 60% da produção europeia, a ‘Abate Fetel’, com 20%, a ‘Rocha’ com 10%, e as variedades ‘Doyenne du Comice’, ‘Kaiser’, ‘Blanquilla’, ‘Alexandrina’ e outras variedades menos importantes com os restantes 10% (WAPA, 2016) (figura 3).

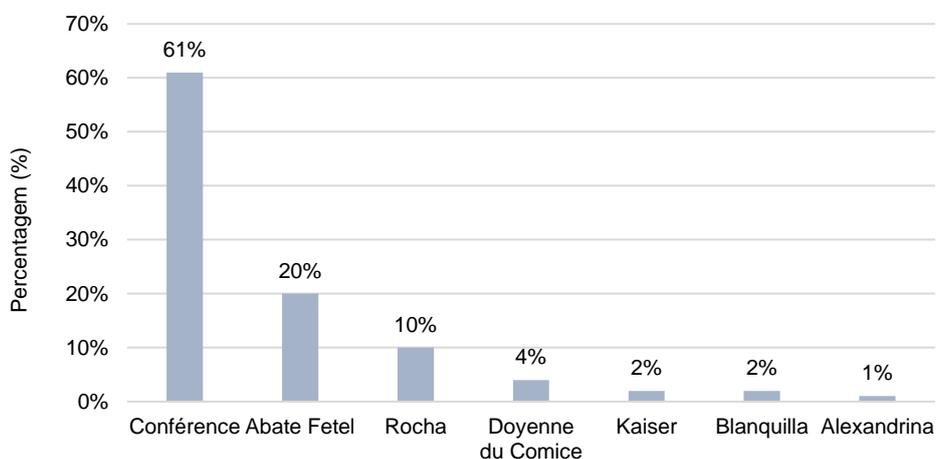


Figura 3 – Principais cultivares de pera utilizadas na Europa em 2016. Adaptado de WAPA, 2016

Os Estados Unidos da América são o único produtor relevante de pera a nível mundial para além da Europa em termos de cultivares *Pyrus communis*. As principais cultivares de utilizadas são a ‘Beurré d’Anjou’ com cerca de 53% da produção dos EUA, a ‘Beurré Bosc’, com 20%, a ‘Williams’ com 18%, e as variedades ‘Red Anjou’, ‘Comice’, ‘Forelle’, ‘Seckel’ e outras variedades menos importantes com os restantes 10% (Figura 4).

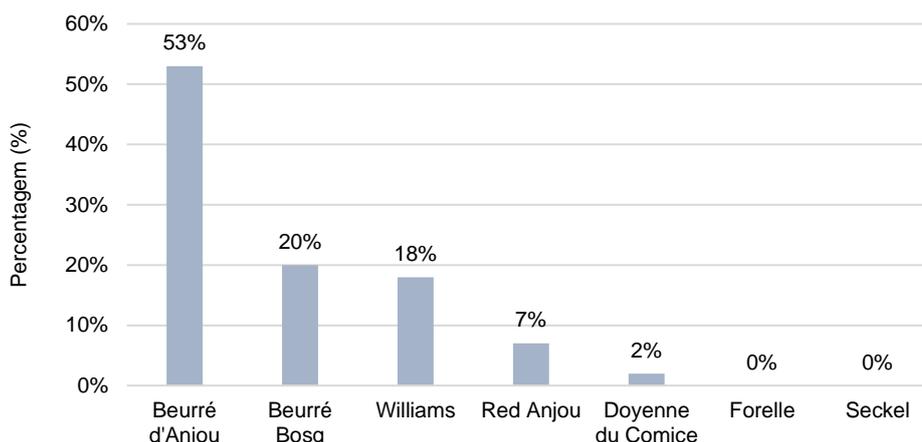


Figura 4 – Principais cultivares de pera utilizadas nos Estados Unidos da América em 2016 (WAPA, 2016).

Apesar da sua qualidade, as cultivares comuns na Europa e nos EUA são pouco apreciadas em Portugal, havendo uma clara preferência dos consumidores nacionais pela cultivar ‘Rocha’. As peras asiáticas, *Pyrus pyrifolia*, não têm constituído um obstáculo para a pera ‘Rocha’, uma vez que o seu sabor é muito diferente e não é apreciado na Europa.

2.2. A produção de pera em Portugal

2.2.1. A nível económico

Portugal tem-se vindo a destacar na produção frutícola pela sua qualidade, o que se deve às características climáticas do país, mas também ao crescente investimento na inovação e investigação na agricultura. Entre 2010 e 2015 a evolução do setor agrícola traduziu-se numa taxa média de crescimento anual de 3,3%, o que é bastante positivo (GPP, 2017a). Contudo, para manter ou melhorar este bom desempenho e crescer mais, tendo em conta a fortíssima concorrência de países vizinhos como Itália e Espanha, é essencial que Portugal invista ainda mais em conhecimento e inovação no setor agrícola, para as cultivares específicas portuguesas. Neste sentido, este trabalho irá debruçar-se sobre uma das principais culturas frutícolas portuguesas: a pera ‘Rocha’ (*Pyrus communis* L. ‘Rocha’).

De acordo com o Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral (GPP, 2017a), a produção de pera em Portugal ocupa o terceiro lugar a nível frutícola nacional, com uma produção de 141 186 toneladas (Tabela 1).

Tabela 1 - Ranking dos quatro principais frutos produzidos em Portugal (GPP, 2017a)

Posição	Tipo de fruto	Quantidade (t)
1º	Maçã	324 994
2º	Laranja	246 639
3º	Pera	141 186
4º	Melão	61 036

A pera possui também enorme relevância económica, uma vez que é o segundo fruto fresco para o qual o saldo comercial das transações apresenta o valor positivo mais elevado, com 73 875 milhares de euros, logo após a framboesa, com 78 942 milhares de euros (GPP, 2017a) (Tabela 2).

Tabela 2 – Balanço comercial internacional português de alguns frutos frescos e secos em 2015 (GPP, 2017a)

Comércio Internacional Português de Frutos Frescos e Secos (2015)					
Produto	Volume (t)		Valor (1000€)		Saldo comercial (1000€)
	Importações	Exportações	Importações	Exportações	
Maçã	45 984,5	43 996,7	32 880	26 816	-6 063
Pera	11 485,3	118 258,0	10 177	84 052	73 875
Laranja	88 936,7	126 469,5	52 205	85 069	32 863
Banana	146 322,7	7 456,1	87 271	4 628	-82 643
Framboesa	130,3	10 309,9	928	79 870	78 942
Mirtilo	376,7	529,6	2 191	3 519	1 327
Melão	47 090,4	8 121,9	26 942	5 219	-21 724
Castanha	1746,8	15480,4	2 964	30 671	27 707
Pinhão	137,5	940,7	2 039	9 789	7 750

As exportações aumentaram muito significativamente de 2000 a 2015 (de 14 M€ para 84M€), sendo o segundo produto frutícola nacional com maior valor de exportação, logo a seguir à laranja (GPP, 2017a).

Este forte cariz exportador da pera ‘Rocha’ está relacionado com algumas das características intrínsecas desta variedade, nomeadamente a sua ótima capacidade de conservação e a sua elevada resistência ao manuseamento e transporte (ANP, 1997). Os principais países de destino da exportação de pera ‘Rocha’ são o Brasil (36 %, 29 135 toneladas), Reino Unido (18%, 11 156 toneladas), França (14 %, 9 126 toneladas), Alemanha (6%) e Canadá (4%) (GPP, 2016; FLF, 2016). Além dos tradicionais mercados de destino da pera ‘Rocha’, têm surgido outros como Marrocos, Líbia, Emirados Árabes Unidos, Azerbaijão, Singapura, Cabo Verde, Gana, Nigéria e Sri Lanka (FLF, 2016).

2.2.2. A nível geográfico

A pera 'Rocha' produz-se principalmente nos concelhos de Cadaval, Bombarral, Torres Vedras, Caldas da Rainha, Alcobaça, Lourinhã, Óbidos e Mafra (Figura 5) possuindo já uma Denominação de Origem Protegida (DOP) (DRAP Centro, 2018).

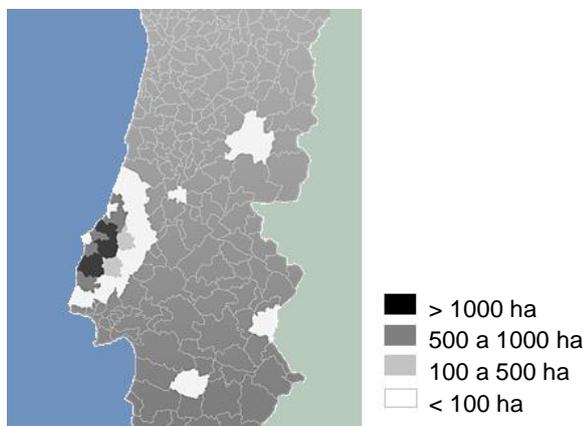


Figura 5 - Mapa das principais zonas produtoras de pera 'Rocha'. Fonte: [<http://www.coopval.com/pt/produtos>]. Acedido a 06.07.2018.

2.2.3. A nível de cultivares – a pera 'Rocha'

Em Portugal a diversidade de cultivares de pera é fortemente condicionada pelo reduzido número de horas de frio (necessário para a quebra da dormência dos gomos) que se faz sentir na generalidade do território nacional (IPMA, 2013).

Existem variedades regionais adaptadas a estas circunstâncias, mas o seu número é bastante reduzido e têm vindo a perder cada vez mais relevo quando comparadas com a pera 'Rocha' que representa 95% da produção nacional (Marketing Agrícola, 2016). Entre as cultivares regionais portuguesas, podem encontrar-se a 'Carapineira', a 'Pérola', a 'Dona Joaquina', a 'Pera de Santo António', a 'Água' ou 'Aguinha', a 'Bonita', a 'São Crispim', entre outras (INIAV, 2017). Contudo, características como a falta de produtividade ou períodos de conservação dos frutos muito curtos acabaram por ditar o abandono destas variedades, restringindo a produção nacional praticamente à cultivar 'Rocha' (INIAV, 2017; Franco *et al.*, 2008).

A pereira 'Rocha' pertence à família das *Rosaceae*, espécie *Pyrus communis* L. e os seus frutos têm um calibre médio de cerca de 60 a 65 mm, uma massa média de 130g, uma epiderme amarelo-verde claro e possuem sempre carepa (ANP, 1997). A polpa dos frutos é branca, macia-fundente, granulosa, doce, não ácida e sumarenta (ANP, 1997).

A época de colheita estende-se geralmente entre agosto e setembro, com maior destaque para a segunda semana de agosto (ANP, 1997).

3. Qualidade da pera 'Rocha'

3.1. Atributos de qualidade

Dentro dos atributos de qualidade da pera 'Rocha', incluem-se a firmeza, a acidez, o teor de sólidos solúveis, a cor, os compostos aromáticos, a ausência de defeitos ou imperfeições na epiderme e a existência de pedúnculo (Kader, 1999). Como para este estudo apenas foram analisadas a firmeza, acidez e teor de sólidos solúveis, apenas se fará uma abordagem mais pormenorizada a estes três parâmetros.

A firmeza, acidez e teor de sólidos solúveis estão diretamente relacionados com o amadurecimento dos frutos. Durante este processo ocorre a perda de firmeza (devido à ação de diversas enzimas que degradam as membranas celulares) (Siddiqui, 2018), dá-se a hidrólise do amido em açúcares mais simples (Siddiqui, 2018) e há o desaparecimento dos ácidos orgânicos que são utilizados na respiração celular (Kieber, 1998; Kingston, 1993).

3.1.1. Firmeza

A firmeza pode definir-se como a capacidade de resistência da polpa a uma força exercida sobre si (Zude *et al.*, 2006). A firmeza dos frutos diminui ao longo da maturação, pelo que a avaliação deste parâmetro é um bom método para a determinação do estado de maturação dos frutos (Reid, 2002), podendo utilizar-se inclusive para a determinação da data de colheita. Alexandre (2001), por exemplo, refere que a colheita da pera 'Rocha' se deve iniciar quando os valores de firmeza estiverem compreendidos entre 5,5 e 6,5 kg/cm².

Um dos principais parâmetros de qualidade distintivos da pera 'Rocha' é a sua elevada firmeza, que lhe confere uma ótima resistência ao manuseamento e transporte (ANP, 1997). É, portanto, essencial compreender quais os fatores que comprometem a perda de firmeza dos frutos, para poder agir no sentido de controlar este processo.

A perda de firmeza pode ocorrer por causa do amadurecimento na presença de etileno. O etileno provoca alterações no metabolismo das paredes celulares, tais como a hidrólise da estrutura das hemiceluloses (Fischer e Bennett, 1991). Esta degradação das paredes celulares ocorre em resposta à ação de diversas enzimas, tais como as glucanases, que provocam alterações nos polissacáridos das paredes celulares, fragilizando-as (Fischer e Bennett, 1991).

A avaliação da firmeza da pera 'Rocha' é geralmente feita com recurso a um penetrómetro (Avelar, *et al.*, 1995), contudo, é essencial que a velocidade com que se aplica a força no êmbolo seja reduzida, caso contrário podem induzir-se falsas leituras (Dobrzanski *et al.*, 2006).

3.1.2. Teor de sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis (TSS) aumenta ao longo do tempo de maturação. Isto acontece porque os frutos, mesmo após a colheita, continuam a ter atividade metabólica na forma de respiração (Hobson, 1994). Esse processo de respiração inicia-se com a degradação de polissacáridos complexos, como o amido, em hidratos de carbono mais simples, como a glucose. Depois, estes açúcares simples podem ser usados para a respiração aeróbia, produzindo energia, ou para o processo de fermentação (Hobson, 1994), como mostra o esquema da figura 6.

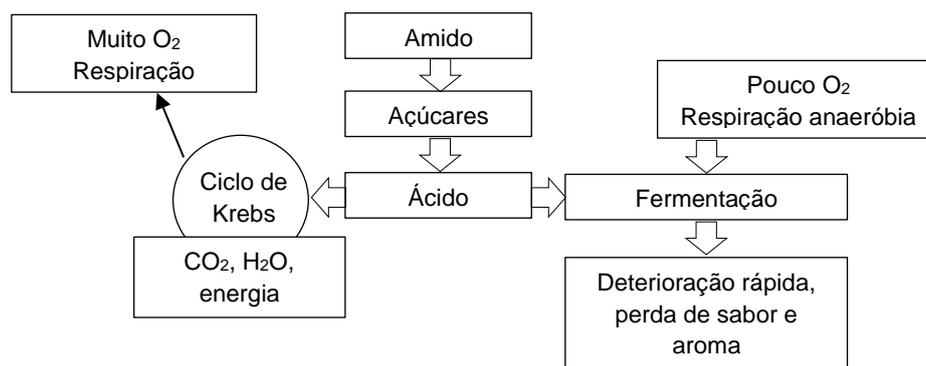


Figura 6 – Esquema representativo da degradação do amido (Hobson, 1994).

3.1.3. Acidez titulável

Uma vez que durante o processo de respiração também são usados ácidos para a produção de energia, é de esperar que, à medida que as pêras estão mais maduras (portanto, ao longo do tempo de conservação em câmara), a degradação dos ácidos vá ocorrendo e o seu teor diminua nos frutos (Hobson, 1994).

Segundo Alexandre (2001), a qualidade da pera 'Rocha' é tanto maior quanto maior for a quantidade de açúcares e de ácidos. O mesmo autor refere que, para assegurar essa qualidade, a acidez deverá apresentar valores até cerca de 2,2 gramas de ácido málico por litro de sumo.

3.2. Defeitos que comprometem a qualidade

Existem vários problemas que comprometem a qualidade da pera 'Rocha' e que geralmente afetam o seu valor comercial. Entre estes problemas destacam-se o excesso de carepa, a falta de pedúnculo e a ocorrência de acidentes fisiológicos tais como o acastanhamento interno e o escaldão superficial (Mitcham e Mitchell, 2002). Neste trabalho serão focados apenas os acidentes fisiológicos.

Acidentes fisiológicos

Nos últimos anos, com o desenvolvimento das tecnologias de frio, tornou-se possível consumir pera 'Rocha' até 10 meses após a colheita (Deuchande, 2016). Contudo, apesar de o armazenamento em câmaras frigoríficas de atmosfera controlada (o tipo de armazenamento de pera 'Rocha' mais comum em Portugal) permitir o aumento do tempo de conservação dos frutos, este também pode estar na origem do aparecimento de diversos acidentes fisiológicos (Thompson, 1998). Estes acidentes fisiológicos não estão diretamente associados à ação de microrganismos mas sim à exposição prolongada dos frutos às condições de armazenamento (Thompson, 1998).

No caso da pera 'Rocha', os acidentes fisiológicos que mais afetam os frutos são o escaldão superficial e o acastanhamento interno (Silva *et al.*, 2010).

O escaldão superficial está associado a níveis elevados de etileno durante a conservação em câmara (Thompson, 1998), ao armazenamento prolongado a temperaturas demasiado baixas (Gomes, 2015) e possivelmente a outros fatores menos relevantes, mas que também podem ter impacto no aparecimento deste problema (Thompson, 1998). O principal sintoma do escaldão superficial é o acastanhamento da hipoderme dos frutos (Thompson, 1998; Watkins *et al.*, 1995), como se pode ver na figura 7. Note-se que o escaldão superficial aqui referido não se trata do escaldão superficial solar, comumente designado do mesmo modo, mas sim do escaldão provocado pelo frio prolongado.

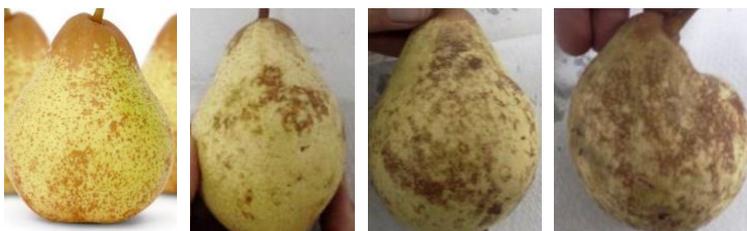


Figura 7 – Diferentes graus de incidência e severidade de escaldão superficial em pera 'Rocha'. A imagem da esquerda representa um fruto não afetado (sem incidência) e as imagens seguintes representam frutos progressivamente mais afetados (Carvalho, 2011).

O acastanhamento interno é um acidente fisiológico que está associado a concentrações de O₂ muito baixas, concentrações de CO₂ elevadas e frio prolongado (Thompson, 1998) e resulta na oxidação dos tecidos no interior dos frutos, conferindo-lhes um tom acastanhado. Na figura 8 é possível observar diferentes graus de incidência e severidade de acastanhamento interno em pera 'Rocha'.

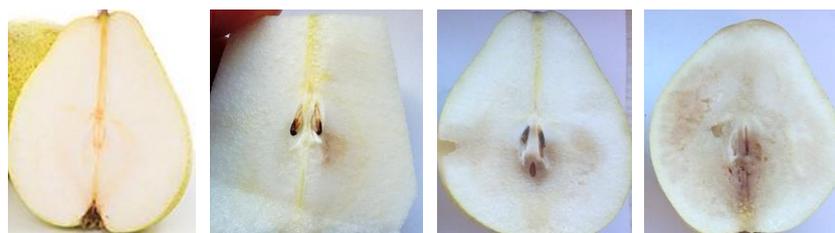


Figura 8 - Diferentes graus de incidência e severidade de acastanhamento interno em pera 'Rocha'. A imagem da esquerda representa um fruto não afetado (sem incidência), e as imagens seguintes representam frutos progressivamente mais afetados.

Apesar de o escaldão superficial e o acastanhamento interno terem uma importância semelhante no contexto nacional, neste trabalho será dada maior destaque ao acastanhamento interno, uma vez que é sobre este que se debruça esta tese.

O que é o acastanhamento interno

O acastanhamento interno é um acidente fisiológico pós-colheita que está identificado em Portugal há mais de vinte anos e cuja relevância tem vindo a aumentar (Sobreiro, 2016). É um acidente fisiológico causado pelo desequilíbrio entre os processos oxidativos e redutores devido aos gradientes metabólicos dos gases dentro do fruto. Assim, ocorre a acumulação de substâncias reativas de oxigênio que induzem a perda da integridade das membranas e a oxidação enzimática dos compostos fenólicos para polímeros acastanhados (Franck *et al.*, 2007).

Este problema desenvolve-se durante a conservação em frio, em atmosferas com baixas concentrações de O₂ e elevadas concentrações de CO₂ e consiste na oxidação, morte e acastanhamento de células dos tecidos internos dos frutos. A este problema podem estar associados vários fatores tais como a falta de agentes antioxidantes naturais (como os fenóis), concentrações gasosas em câmara frigorífica inadequadas e colheitas tardias (Sobreiro, 2016).

A nível visual, os sintomas são mais expressivos no centro do fruto, mas podem afetar uma maior área da polpa, consoante a severidade do problema (Sobreiro, 2016). A sintomatologia do acastanhamento interno inclui o acastanhamento radial ou assimétrico dos tecidos internos, manchas acastanhadas secas ou cavidades aleatoriamente dispersas na polpa (Franck *et al* 2007). Em português temos apenas a expressão “acastanhamento interno”. Contudo, em inglês, é feita uma separação muito mais promenorizada dos diversos tipos de acastanhamento interno conforme a sintomatologia (alguns exemplos de diferenças na sintomatologia do AI encontram-se representados na figura 9.



Figura 9 – Diversos tipos de sintomatologias diferentes para o mesmo problema: acastanhamento interno. Fonte das fotografias 1 e 5: Sobreiro, 2016.

Apesar de existirem muitas referências a acastanhamentos internos e sua sintomatologia, podem distinguir-se dois principais tipos: a decomposição interna (*core browning*) e o coração castanho (*brown heart*) (Gomes, 2017; Deuchande, 2016). Alguns estudos em peras ‘Conference’ sugerem que os acidentes fisiológicos relacionados com o CO₂, que parecem estar associados ao aparecimento de cavidades na zona carpelar e que se podem estender ao mesocarpo, diferem dos problemas relacionados com a senescência dos frutos, frequentemente associadas ao acastanhamento necrótico húmido da polpa (Larrigaudière *et al* 2004). Todavia, ambos os sintomas podem coexistir no mesmo fruto, e em ambas as circunstâncias as condições de hipoxia e dificuldades de difusão dos gases no interior dos frutos estão envolvidas no seu aparecimento (Lammertyn *et al* 2003). Deste modo, embora o acastanhamento interno possa ter vários sintomas diferentes, ainda é desconhecido se esses sintomas estão relacionados com o mesmo ou com distúrbios fisiológicos distintos (Franck *et al.*, 2007; Larrigaudière *et al.*, 2004).

O *brown heart* está associado a níveis elevados de CO₂ e conseqüente decréscimo do ácido ascórbico e acumulação de produtos resultantes da peroxidação lipídica. Esta acumulação conduz a um aumento da actividade da lipoxigenase (LOX), o que eleva a quantidade de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e provoca o aparecimento de acastanhamento interno (Larrigaudière *et al.*, 2004).

O *core browning*, por sua vez, está relacionado com o processo de senescência tendo, por isso, como fatores de risco frutos demasiado maduros e conservados em atmosfera normal (Larrigaudière *et al.*, 2001; Pintó *et al.*, 2001; Larrigaudière *et al.*, 2004)

Estes são dois problemas fisiológicos com diferentes etiologias (Larrigaudière *et al.*, 2004). Contudo, alguns autores colocam a hipótese de estes dois acidentes fisiológicos (o *core browning* e o *brown heart*) serem apenas diferentes estágios de desenvolvimento do mesmo acidente fisiológico (Deuchande, 2016). Ainda não existem estudos conclusivos que possam dar resposta a esta hipótese.

4. Fatores que afetam o acastanhamento interno

O grau de incidência e severidade do acastanhamento interno varia de acordo com um conjunto de fatores pré-colheita e pós-colheita (Gomes, 2015).

4.1. Fatores pré-colheita

Há muitos fatores pré-colheita que podem estar relacionados com o acastanhamento interno da pera, sendo muito difícil separar a ação de cada um deles (Ferguson *et al.*, 1999). De facto, a temperatura durante o desenvolvimento dos frutos, a ocorrência de chuvas, o solo, a aplicação de fertilizantes e corretivos, a rega, a cultivar, a data de colheita, o percurso do fruto até ao armazém e a posição do fruto na árvore podem estar relacionados com o aparecimento e severidade deste acidente fisiológico (Franck *et al.*, 2007; Ahvenainen, 1996; Streif *et al.*, 2003). Há ainda poucos estudos sobre a influência dos fatores pré-colheita em peras, sendo a maioria da bibliografia existente relativa à maçã

(Franck *et al.*, 2007; Ahvenainen, 1996). Contudo, os estudos existentes têm vários pontos em comum, o que contribui para uma análise mais sólida desta questão. Nas tabelas 3 a 7 encontram-se compilados os fatores pré-colheita que afetam o acastanhamento interno. Os principais atributos das peras que são afetados (direta ou indiretamente) por fatores pré-colheita com influência no aparecimento de acastanhamento interno são o tamanho do fruto, a quantidade de vitamina C, o teor de compostos fenólicos, e as propriedades de transporte de gases (Franck *et al.*, 2007; Hamauzu e Hanakawa, 2003).

Tabela 3 – Resumo da forma como o clima afeta a suscetibilidade ao acastanhamento interno

Cultivar	Estudo	Fonte
Pera 'Conference'	Peras 'Conference' produzidas em regiões quentes são menos suscetíveis ao AI do que as produzidas em zonas mais frias.	Zerbini, <i>et al.</i> , 2002; Franck, <i>et al.</i> , 2007; Hansen, <i>et al.</i> , 1962
Pera 'Conference'	As baixas temperaturas de verão durante o crescimento do fruto e a humidade relativa alta provocada pela elevada pluviosidade são condições que aumentam a sensibilidade dos frutos ao aparecimento do acastanhamento interno	Zerbini, <i>et al.</i> , 2002
Peras (<i>Pyrus communis</i> L.)	Quando durante a divisão celular se registam temperaturas anormais, estas condições podem levar a um incremento de células no fruto e posterior redução dos espaços intercelulares. Quando existem menos espaços intercelulares, há maior dificuldade na difusão dos gases, especialmente do CO ₂ , o que pode levar ao surgimento de AI.	Larrigaudière, <i>et al.</i> , 2017
Pera 'Rocha'	A maioria dos pomares de pera 'Rocha' está localizada em regiões com problemas de falta de frio no Inverno, o que provoca florações irregulares e estendidas no tempo. Apesar de os frutos serem colhidos de forma escalonada, este facto faz com que haja diferenças significativas ao nível do estado de maturação dos frutos, o que pode fazer com que os frutos mais maduros estejam mais propícios ao aparecimento de AI.	Alexandre, 2001

AI – Acastanhamento interno

Tabela 4 - Resumo da forma como o tipo de solo e localização do pomar afeta a suscetibilidade ao acastanhamento interno

Cultivar	Estudo	Fonte
Pera 'Rocha'	Frutos provenientes de solos de textura ligeira apresentam potencial de conservação inferior aos produzidos em solos francos, o que os pode tornar mais suscetíveis ao AI.	Almeida, 2017
Peras (<i>Pyrus communis</i> L.)	É um dado adquirido que a localização e gestão do pomar têm grande influência no aparecimento de acastanhamento interno, mas ainda se desconhecem muitas das causas exatas dessas relações.	Ferguson, <i>et al.</i> , 1999

AI – Acastanhamento interno

Tabela 5 - Resumo da forma como a adubação afeta a suscetibilidade ao acastanhamento interno

Substância	Cultivar	Estudo	Fonte
Boro	Pera 'Conference'	As peras tratadas com boro não exibiram AI após quatro meses, em comparação com as testemunhas que revelaram elevada incidência de AI. Os resultados tornam-se ainda mais significativos quando se combina boro com cálcio nas pulverizações.	Xuan, <i>et al.</i> , 2001 Xuan, <i>et al.</i> , 2003
	Todas as plantas	Os frutos tratados com boro respiraram com taxas mais baixas durante o armazenamento, mantêm durante mais tempo a integridade da parede celular e da membrana das células, o que contribui para reduzir a incidência de AI em peras.	Soares, <i>et al.</i> , 2003 Broadley, <i>et al.</i> , 2001
	Pera 'Conference'	Foi encontrada uma correlação entre o teor de boro e o aparecimento de AI em frutos com 6 meses de armazenamento. Contudo, o mesmo não aconteceu com outros nutrientes, como o K, Ca, Mg e P.	Streif, <i>et al.</i> , 2001
	Pera 'Rocha'	Situações de excesso de boro causam desordens fisiológicas, aceleram a maturação e originam AI.	Soares, <i>et al.</i> , 2003
Cálcio	Todas as plantas	O cálcio tem o papel essencial no metabolismo das paredes celulares, atuando como estabilizador de polissacáridos e como regulador da atividade enzimática e das propriedades iônicas da parede.	Soares, <i>et al.</i> , 2003 Hawkesford <i>et al.</i> , 2012
	Peras (<i>Pyrus communis</i> L.) e maçãs (<i>Malus domestica</i> Borkh)	A aplicação de cloreto de cálcio (CaCl ₂) melhora a qualidade de vida útil dos frutos, a aparência dos mesmos e ajuda a reduzir a incidência de AI.	Almeida, 2005 Rease, Drake, 2008;
	Diversas cultivares de pera (<i>Pyrus communis</i> L.)	Vários estudos (maioritariamente em maçã, mas o mesmo se pode aplicar à pera) apontam para a existência de uma relação entre a pulverização direta de sais de cálcio aos frutos (como por exemplo cloreto de cálcio) e o aumento da firmeza e redução da incidência e severidade dos acidentes pós-colheita.	Ferguson, <i>et al.</i> , 1999 Fallahi, <i>et al.</i> , 1997 Mendes, 2017 Sams, 1999
	Pera 'Conference'	Aplicações pré-colheita de cálcio contribuem para aumentar o teor de ácido ascórbico nos frutos (devido à manutenção da integridade da membrana), o que contribui para proteger os mesmos contra o AI.	Xuan, <i>et al.</i> , 2001
Azoto	Pera 'Rocha'	O aumento do teor de N desequilibra a razão azoto/cálcio (N/Ca), aumentando a taxa respiratória e a produção de etileno. Deste modo, quando o teor de N é muito elevado, diminuem os níveis de Ca, o que torna os frutos mais suscetíveis ao aparecimento de AI e à ocorrência de processos fermentativos no interior dos frutos. Aplicações de N perto da data de colheita são especialmente prejudiciais.	Soares, <i>et al.</i> , 2003; Xuan, <i>et al.</i> , 2001;
	Pera 'Rocha'	O excesso de N promove a ocorrência de acidentes fisiológicos durante a formação do fruto.	Quelhas dos Santos, 2015; Mendes, 2017
Potássio	Pera 'Rocha'	Frutos com excesso de potássio têm menor tempo de conservação devido ao aumento da taxa de respiração, tornando as peras mais sensíveis ao escaldão superficial e ao AI, à perda de firmeza e à perda de ácidos. Em pós colheita, relações de K/Ca elevadas podem levar ao aparecimento de AI.	Soares, <i>et al.</i> , 2003; Mendes, 2017

Tabela 5 - Resumo da forma como a adubação afeta a suscetibilidade ao acastanhamento interno (continuação)

Substância	Cultivar	Estudo	Fonte
K, P e relação K/Ca	Maças (<i>Malus domestica</i> Borkh)	Foram obtidas correlações significativas entre a incidência de AI e teores de potássio (K), fósforo (P) e também para a relação K/Ca.	Neuwald, <i>et al.</i> , 2014
Mg	Pera 'Conference'	Aplicações de magnésio reduzem a incidência de AI. A importância do magnésio deve-se à sua função estabilizadora das membranas	Xuan, <i>et al.</i> , 2001
Micro-nutrientes	Todas as plantas	Alguns micronutrientes podem ter influência no aparecimento de AI, como o ferro (Fe), manganês (Mn) e o cobre (Cu), que desempenham um papel crucial nos sistemas redox. O Mn e o Cu estão envolvidos também na desintoxicação de radicais superóxido	Broadley <i>et al.</i> , 2012.

AI – Acastanhamento interno

Tabela 6 - Resumo da forma como as operações culturais e posicionamento dos frutos afetam a suscetibilidade ao acastanhamento interno

Cultivar	Estudo	Fonte
Pera 'Bartlett'	Podas muito intensas demonstraram ser benéficas para a redução do AI.	Blanpied, 1990.
Peras (<i>Pyrus communis</i> L.)	Árvores de fraco vigor induzido por períodos de <i>stress</i> são mais suscetíveis ao aparecimento de AI. Regas fortes perto da data de colheita e tratamentos hormonais podem afetar o desenvolvimento normal do fruto e propiciar o AI.	Larrigaudière <i>et al.</i> , 2017
Pera 'Conference'	A posição dos frutos na árvore mostrou ter efeito no teor de ácido ascórbico, pois verificou-se que a concentração de deste ácido é assimetricamente distribuída dentro da pera, apresentando diferenças de concentração até 4 vezes entre o lado exposto sol e o lado da sombra.	Franck, <i>et al.</i> 2003
Pera 'Conference'; Peras 'Passe Crassane'	Frutos provenientes do topo das árvores (mais expostos ao sol e, portanto, com maior TSS) apresentaram maior suscetibilidade ao AI.	Franck, <i>et al.</i> 2003; Dobrzanski, <i>et al.</i> , 2006; Zerbini, 1997

AI – Acastanhamento interno

Tabela 7 - Resumo da forma como a data de colheita e grau de maturação dos frutos afetam a suscetibilidade ao acastanhamento interno

Cultivar	Estudo	Fonte
Pera 'Conference'	A taxa de perda de ácido ascórbico é mais elevada em frutos de colheita tardia, o que propicia o aparecimento de AI.	Zerbini <i>et al.</i> , 2002
Peras (<i>Pyrus communis</i> L.)	Os frutos colhidos tardiamente são muito mais suscetíveis ao AI do que os colhidos na data ideal. Este problema agrava-se especialmente para frutos de calibres elevados e com níveis de maturação avançados. De todos, a data de colheita é provavelmente o fator mais importante para o aparecimento de AI, excluindo o tempo de conservação (que não se pode alterar).	Lammertyn <i>et al.</i> , 2000 Larrigaudière <i>et al.</i> , 2017 Franck <i>et al.</i> , 2007
	Uma das técnicas recomendadas para atenuar este problema é o arrefecimento dos frutos imediatamente após a colheita. A aplicação de sistemas de pré-arrefecimento permite reduzir a taxa respiratória do fruto, a acumulação de CO ₂ na câmara e a incidência de AI.	Verlinden, <i>et al.</i> 2002
	Outro dos fatores com maior relevância para o aparecimento de AI é o grau de maturação dos frutos à colheita. Os frutos mais maduros têm menor capacidade antioxidante (ascorbato, glutatona, superóxido dismutase e catalase) e maior potencial para acumulação do radical superóxido (O ₂ ⁻) e de peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂), o que os torna mais sensíveis ao aparecimento de AI.	Ferguson <i>et al.</i> , 1999

AI – Acastanhamento interno

É a combinação e interação destes vários fatores pré-colheita que determina quais os frutos que serão mais susceptíveis ao acastanhamento interno, e não cada fator individualmente (Franck *et al.*, 2007; Ahvenainen, 1996; Salvador, 2015). Sabe-se, todavia, que a influência de cada um destes fatores para o aparecimento de AI é uma causa da sua ação no sistema antioxidante e na atividade metabólica dos frutos (Mendes, 2017).

Existe também uma relação indireta entre alguns atributos de qualidade e o acastanhamento internom (Tabela 8).

Tabela 8 - Relação entre os atributos de qualidade e o AI

Parâmetro	Cultivar	Estudo	Fonte
Calibre	Pera 'Rocha'	Em pera 'Rocha' o calibre foi referenciado como um fator que influencia o risco de acastanhamento interno, aumentando quando em frutos têm calibre superior a 75 mm. A má difusão do O ₂ no fruto pode ser a explicação para este fenómeno, porque quanto maior este for, maior a distância de difusão do O ₂ até ao centro do fruto.	Almeida, 2017;
Firmeza	Pera 'Rocha'	Se a pera 'Rocha' for conservada sem tratamentos pós-colheita (como DPA ou 1-MCP, por exemplo) o risco e severidade de AI aumenta quando os frutos são colhidos num estado de maturação avançada (com firmezas inferiores a 6 kg/cm ²).	Mendes, 2017

AI – Acastanhamento interno

4.2. Fatores pós- colheita

Apesar dos fatores pré-colheita, a incidência de acastanhamento interno pode ser bastante reduzida se forem tidos os devidos cuidados ao nível dos fatores pós-colheita (Franck *et al.*, 2007). Os principais fatores pós-colheita que influenciam o aparecimento de acastanhamento interno são o nível de maturação dos frutos à colheita, a duração do período de arrefecimento, as condições de armazenamento (principalmente as pressões parciais de CO₂ e O₂ e a temperatura) e a duração do período de conservação (Lammertyn *et al.*, 2000; Franck *et al.*, 2007; Verlinden *et al.*, 2002).

4.2.1. O armazenamento

Existem vários tipos de conservação distintos. Os mais comuns em Portugal são a atmosfera normal (AN) (20-21% de O₂, 0,03% de CO₂ e 78-79% de N₂ e um conjunto de outros gases vestigiais) (Yahia, 2009), a atmosfera controlada (AC) e a atmosfera controlada dinâmica (ACD) (Wills *et al.*, 2007). A principal diferença entre a AN e a ACD é que nesta última as concentrações de CO₂ e O₂ estão sempre a ser rigorosamente controladas e ajustadas e na AN não se altera a composição da atmosfera (Yahia, 2009). Na AC há uma alteração da constituição da atmosfera para concentrações mais baixas de O₂ e mais elevadas de CO₂. Na ACD também se induzem estas alterações, mas a monitorização destes gases é feita tendo por base o limite mínimo de O₂ para não ocorrer fermentação e o quociente da respiração, medidos ininterruptamente nos frutos e ajustando as concentrações atmosféricas segundo estes valores. Na AC a manutenção das concentrações dos gases não tem por base estes parâmetros, mas sim um valor fixo pré-determinado (Both, 2015).

Enquanto na AN os frutos apenas se conseguem conservar durante um período máximo de 5 meses, na ACD estes podem conservar-se até 10 meses (Almeida, 2017).

Uma vez que este estudo será desenvolvido em parceria com uma central fruteira do Oeste, na qual os frutos são conservados em ACD, será esta a forma de conservação sobre a qual se irão focar as linhas que se seguem.

Atmosfera controlada dinâmica (ACD)

A atmosfera controlada dinâmica (ACD) é uma tecnologia de frio que visa desacelerar o processo de maturação e senescência dos frutos, reduzindo o metabolismo dos mesmos através da regulação da temperatura, humidade relativa e concentrações de CO₂ e O₂ (Wills *et al.*, 2007). Este tipo de atmosfera denomina-se “controlada” porque a concentração dos gases é permanentemente monitorizada através de sensores de fluorescência de clorofila, do quociente respiratório e da produção de compostos voláteis, de modo a regular a concentração de gases dentro da câmara de acordo com o nível de *stress* em que o fruto se encontra (Almeida, 2015).

As principais vantagens da conservação em atmosfera controlada dinâmica são: a redução da taxa de respiração, a redução da produção de etileno (devido ao baixo teor de O₂) e da sua ação (devido ao alto teor de CO₂ e à temperatura baixa), prolongamento da vida útil dos frutos, manutenção da firmeza (devido ao efeito do CO₂ nas enzimas que atuam sobre as membranas celulares), elevada turgescência das células (ficando os frutos mais suculentos e crocantes) e a preservação dos atributos de qualidade (menor perda de acidez, açúcares e vitamina C, maior qualidade nutricional e sensorial, menor degradação da clorofila, maior retenção de cor; menos alterações fisiológicas e menos estragos causados por fungos) (Deuchande, 2016).

As recomendações para conservação de pera 'Rocha' em ACD são as seguintes: temperatura entre -1 e 0 °C, umidade relativa entre 93 e 95%, níveis de O₂ de 0,2 a 0,5 kPa e níveis de CO₂ <0,7 kPa (Almeida, 2017). Contudo, os valores ótimos exatos podem variar de acordo com fatores como o estado de maturação à colheita, as condições em que cresceram os frutos até à colheita, a presença de etileno na câmara, tratamentos pré-armazenamento, entre outros (Thompson, 1998).

A umidade relativa deve manter-se elevada para reduzir as perdas de água dos frutos. Contudo, valores acima de 95% de umidade relativa podem provocar condensação na câmara, levando a condições favoráveis ao desenvolvimento de fungos (Zagory e Kader, 1988; Almeida, 2017).

O aumento da concentração de CO₂ tem várias implicações. Uma das suas principais consequências é a indução do processo fermentativo por inibição da succinato desidrogenase (que é uma enzima envolvida no processo respiratório) (Knee, 1973). Outra consequência, apontada por diversos autores, é a redução dos valores do pH citoplasmático, o que influencia a atividade de muitas enzimas envolvidas no metabolismo respiratório, biossíntese de etileno e alterações de composição (Kader, 1995). Outros autores referem também que o aumento da concentração de CO₂ pode levar à acumulação de elementos tóxicos para as células (como o acetaldeído, etanol, acetato de etilo e / ou lactato) (Kader, 1995), à diminuição da atividade da ATP e PPI fosfofrutoquinase na via glicolítica (o que poderia explicar a redução da respiração) (Kerbel *et al*, 1988), e à diminuição da produção de etileno por inibição da atividade da ACC sintase e ACC oxidase. (Kader, 1995). Contudo, a maioria destes pontos interferem na respiração, conduzindo a perdas de energia significativas.

Por último, a diminuição da concentração de O₂ tem como principal consequência a redução da atividade metabólica, uma vez que muitas das reações metabólicas das células são oxidativas.

Se os valores da concentração de O₂ forem abaixo do limiar do ciclo do ácido tricarboxílico, este vai suspender a sua atividade, mas o processo glicolítico vai continuar, dando origem a acetaldeído e etanol que são tóxicos para as células quando acumulados (Thompson, 2016). Assim sendo, os níveis de O₂ não devem ser demasiado baixos, de forma a evitar a fermentação. Outra das consequências da redução da concentração de O₂, é a desejada diminuição da produção de etileno, por inibição de atividade da ACC oxidase (1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidase).

Contudo, apesar de todas as vantagens associadas à possibilidade de armazenamento prolongado em ACD, este tipo de tecnologia também apresenta alguns riscos, nomeadamente ao nível da perda de qualidade dos frutos e do aparecimento de acidentes fisiológicos como o escaldão

superficial e o acastanhamento interno (Wills *et al.*, 2007). Até 2013, estes problemas eram facilmente controlados através da utilização do antioxidante difenilamina (DPA). No entanto, em 2013 foi proibida a utilização deste produto, o que criou um enorme problema para as centrais de conservação. Posteriormente, começou a utilizar-se o 1-metilciclopropeno (denominado 1-MCP) que é um inibidor da ação do etileno, previne o escaldão superficial e retarda o amadurecimento (Almeida, 2017). No entanto, apesar deste produto ser tão eficaz como o DPA no combate ao escaldão superficial, no caso do acastanhamento interno apenas se demonstrou eficaz para períodos de armazenamento até 280 dias (Carvalho, 2011).

Deuchande (2016) realizou também um estudo no qual demonstrou que a eficácia da aplicação de 1-MCP depende do grau de maturação dos frutos à colheita e que, quando aplicado em frutos tardiamente colhidos, este induz uma maior incidência de acastanhamento interno. Este facto revela, mais uma vez, a necessidade de encontrar outras formas que não químicas de minimizar os danos provocados pelo acastanhamento interno, tal como por exemplo a seleção e organização dos lotes de peras por graus de propensão ao aparecimento de acastanhamento interno.

4.2.2. O etileno

O amadurecimento é controlado por uma hormona muito importante, o etileno, que no caso dos frutos climatéricos como a pera, apresenta um “pico” de produção (Kieber, 1998; Lurie e Paliyath, 2008; Thompson, 1998; Hiwasa *et al.*, 2003). Na figura 10 é possível observar a evolução da produção de etileno e de CO₂ em frutos climatéricos e não climatéricos.

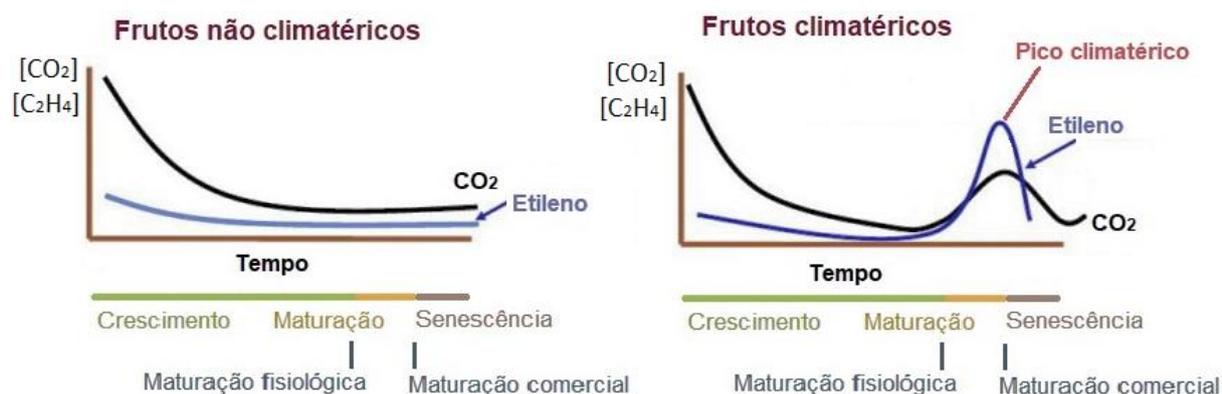


Figura 10 –Evolução da produção de etileno (linha azul escura) e da produção de CO₂ (linha negra) para frutos não climatéricos (à esquerda) e climatéricos (à direita). Os frutos climatéricos apresentam um “pico” de produção de etileno e de CO₂ (pico de respiração), contrariamente aos frutos não climatéricos (Kieber, 1998).

O etileno (C₂H₄) é uma molécula muito simples, mas que interfere em diversos processos bioquímicos. Provoca a abscisão de frutos, flores e folhas; aumenta a velocidade de degradação da clorofila, induz a síntese de compostos voláteis responsáveis pelo aroma dos frutos, mas principalmente

provoca o amadurecimento e senescência dos frutos (maioritariamente através da degradação das membranas, hidrólise do amido e utilização dos ácidos orgânicos para a respiração celular) (Reid, 2002 e Kieber, 1998).

No caso da pera, fruto climatérico, como se pretende manter os frutos muitos meses em câmara frigorífica, os efeitos do etileno são indesejáveis, porque se pretende que o fruto dure o máximo de tempo em câmara sem amadurecer e apenas amadureça fora da câmara, quando for para venda. Deste modo, foram sendo desenvolvidas diversas técnicas de inibição do etileno (Kader, 2003).

Atualmente, nas centrais fruteiras portuguesas, as formas mais comuns de inibição do etileno são a utilização de atmosferas com elevadas concentrações de CO₂ e baixas concentrações de O₂ e a utilização do 1- metilciclopropeno (1-MCP). As elevadas concentrações de CO₂ e reduzidas concentrações de O₂ retardam a maturação dos frutos de forma análoga, impedindo a ligação do etileno ao recetor (Burg e Burg, 1967). O 1-MCP atua no ponto 3 da figura 11, ligando-se ao receptor do etileno, impedindo assim que se inicie o processo de transdução e que os frutos amadureçam (Blankenship e Dole, 2003).

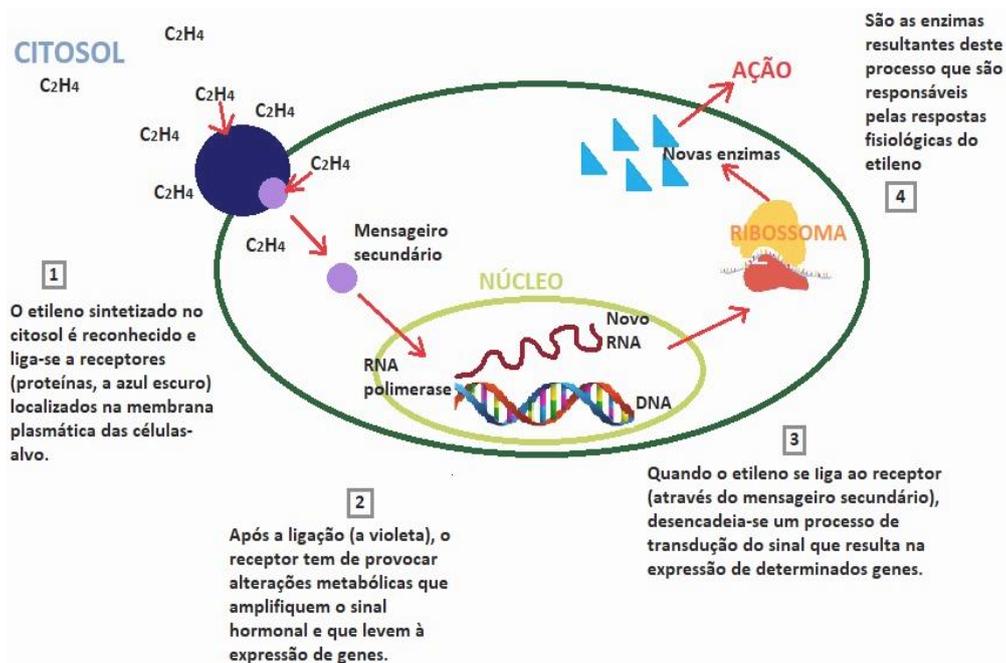


Figura 11 – Representação esquemática do modo de ação do etileno nas células. (Adaptado de Abeles *et al.*, 1992 e de Kieber, 1998)

O 1-MCP é eficaz durante um determinado período de tempo (variável com a espécie, cultivar, estado de maturação e temperatura de armazenamento) após o qual os efeitos do etileno começam a voltar a sentir-se (Blankenship e Dole, 2003).

É de notar que, a nível do acastanhamento interno, ainda não foi encontrada nenhuma relação consistente entre o aparecimento de AI e a utilização de 1-MCP. É também de realçar o facto do 1-MCP interferir em todos os parâmetros de qualidade: retarda o amolecimento (contribuindo para manter

a firmeza), reduz a taxa de respiração (reduzindo o consumo dos ácidos orgânicos) e reduz a produção de etileno (com repercursões positivas nos três parâmetros).

4.2.3. Outros fatores

Um manejo adequado nas centrais fruteiras também é um fator decisivo para evitar o aparecimento de acastanhamento interno, uma vez que os danos mecânicos que possam surgir durante o manejo dos frutos desde a colheita até ao armazenamento em central provocam um aumento da produção de etileno por parte das peras, aumentando assim a sua predisposição ao acastanhamento interno (Larrigaudière *et al.*, 2017).

Outro fator essencial a ter em conta durante o armazenamento é a manutenção da circulação de ar dentro da câmara, para evitar a formação de “bolsas de acumulação de CO₂”, que desencadeariam mais acastanhamento interno (Larrigaudière *et al.*, 2017)

5. Bases bioquímicas do acastanhamento interno

Existem alguns estudos que estabelecem a base bioquímica do acastanhamento interno para algumas cultivares de pera, mas há poucas informações sobre os mecanismos bioquímicos envolvidos no desenvolvimento deste fenómeno especificamente em pera "Rocha" (Deuchande, 2016).

Segundo Frank *et al.* (2007) o acastanhamento interno pode ter duas principais origens: a oxidação de compostos fenólicos e a acumulação de metabolitos fermentativos tóxicos para as células. No entanto, estes processos estão estritamente ligados (Figura 12).

No metabolismo aeróbio, produzem-se espécies reativas de oxigénio (ERO) que, em condições de *stress* (como a hipoxia que se faz sentir em atmosfera controlada) gera um “*stress oxidativo*” que pode causar danos na integridade das membranas (Mittler, 2002). Quando as membranas ficam fragilizadas, os compostos fenólicos (presentes numa situação normal dentro dos vacúolos) entram em contacto com o complexo de enzimas polifenoloxidase (PPO) (geralmente presentes dentro dos plastídeos ou na membrana dos cloroplastos). Como resultado deste contacto, a PPO hidrolisa os monofenóis a o-difenóis e depois oxida os o-difenóis a o-quinonas (Veltman, 2002). Este processo de oxidação dos o-difenóis a o-quinonas pode ser revertido pela ação do ácido ascórbico (AA), mas frequentemente as condições de hipoxia da atmosfera controlada fazem reduzir o teor de AA nas células, travando este processo de reversão. Por último, as o-quinonas são oxidadas a melaninas, que são as responsáveis pelo aspeto acastanhado que se vê nos frutos com AI (Veltman, 2002). Os ambientes de atmosfera controlada onde são armazenadas as peras podem também conduzir à indução de processos fermentativos devido à concentração elevada de CO₂ nesta atmosfera (Ke *et al.*, 1994). Quando estes processos originam uma acumulação excessiva de etanol e acetaldeído, estes compostos tornam-se tóxicos, conduzindo à perda de integridade das membranas. O processo que se desencadeia de seguida é semelhante ao descrito acima, culminando com a oxidação das o-quinonas a melaninas (Pintó *et al.*, 2001), que conferem o tom castanho característico do acastanhamento interno.

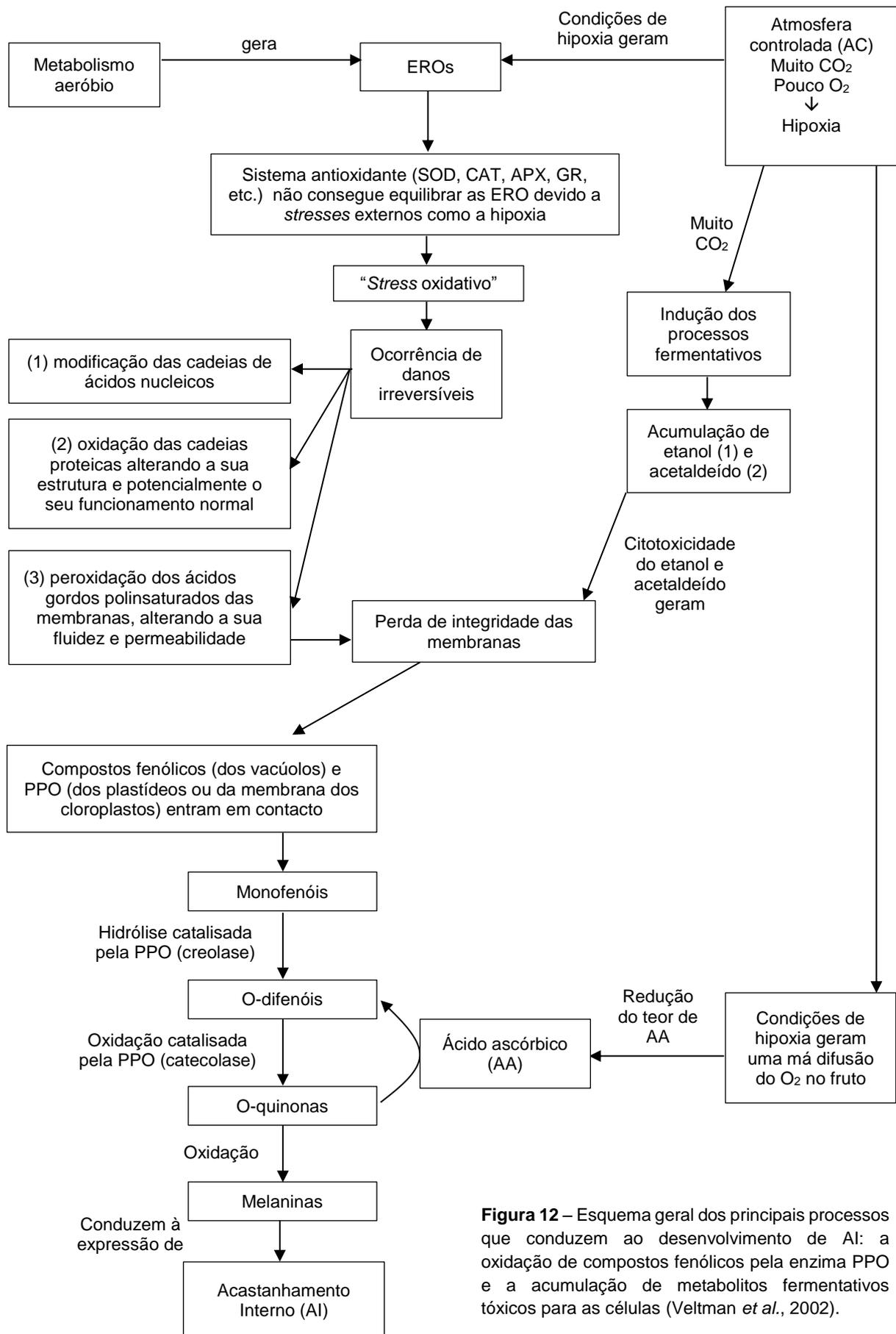


Figura 12 – Esquema geral dos principais processos que conduzem ao desenvolvimento de AI: a oxidação de compostos fenólicos pela enzima PPO e a acumulação de metabolitos fermentativos tóxicos para as células (Veltman *et al.*, 2002).

5.1. Polifenol oxidases

Polifenol oxidases (PPO) é o nome dado ao conjunto de enzimas envolvidas na oxidação de vários polifenóis. Dentro das polifenol oxidases, podem-se distinguir dois tipos de enzimas: as lacases e as tirocinases, que diferem na sua especificidade para os substratos (Vámos-Vigyázó, 1981), mas apenas as tirocinases estão envolvidas no processo de acastanhamento interno (Veltman, 2002). A lacase apenas oxida os orto e para-difenóis para formar a respetiva o-quinona (atividade da catecolase) (Veltman *et al.*, 1999a). A tirosinase, também conhecida por monofenol monoxigenase, é uma enzima que contém cobre na sua constituição e é responsável pelo escurecimento oxidativo dos tecidos, através da hidroxilação dos monofenóis a o-difenóis (atividade da creolase) e pela posterior oxidação dos o-difenóis a o-quinonas (atividade da catecolase). Esta, depois de oxidada e polimerizada, forma os compostos acastanhados a que chamamos melaninas (Veltman *et al.*, 1999a) (Figura 13). São estas melaninas as responsáveis por um dos principais sintomas do acastanhamento interno: o tom acastanhado dos tecidos internos dos frutos.

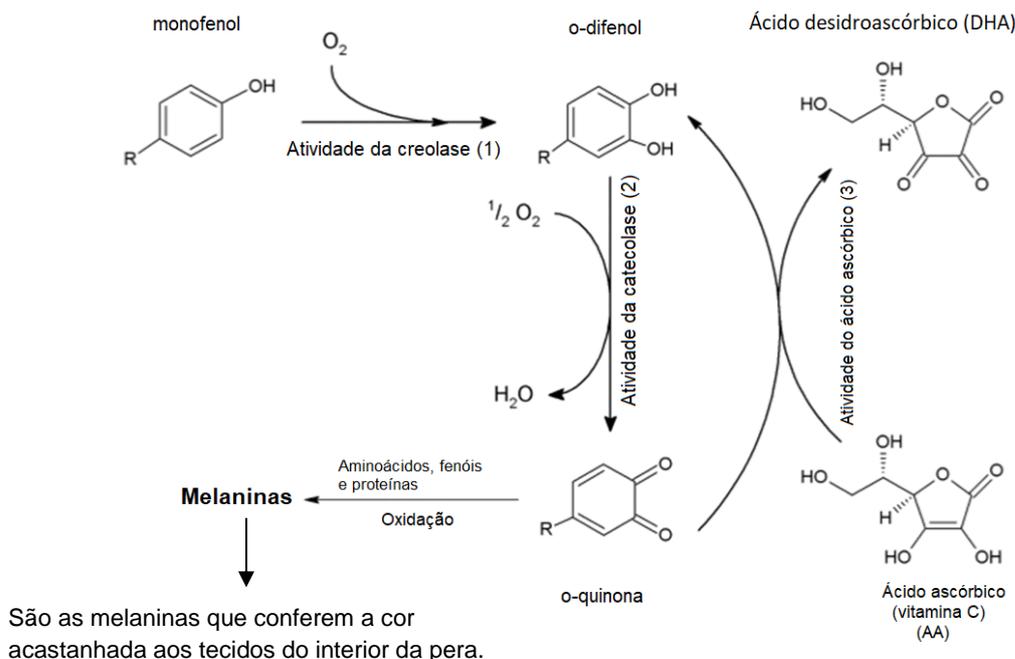


Figura 13 – Esquema representativo das reações catalizadas pela PPO e mecanismo de ação do AA. Os monofenóis são hidrolisados a difenóis pela PPO (pela creolase) (1); depois, os o-difenóis são oxidados a o-quinonas pela PPO (pela catecolase) (2) e, por último, o ácido ascórbico reduz as o-quinonas novamente a o-difenóis (3), formando ácido dehidroascórbico (Deuchande, 2016).

Apesar de a PPO ser crucial para o desenvolvimento de acastanhamento interno, Veltman e Larrigaudière (1999a) demonstraram que a PPO não é um fator exclusivo para o desenvolvimento deste fenómeno. Deste modo, conclui-se que na origem do aparecimento do acastanhamento interno estão todos os fatores que afetam a integridade das membranas intracelulares e não apenas a PPO (Deuchande, 2016).

5.2. Perda de integridade das membranas

Numa situação normal, a tirosinase e os substratos fenólicos estão em locais diferentes na célula. A tirosinase pode estar nos plastídios ou na membrana dos cloroplastos, enquanto os polifenóis apenas se podem encontrar nos vacúolos (Veltman, 2002). Existe uma membrana que envolve tanto os plastídios como os vacúolos, por isso o aparecimento de acastanhamento interno está primeiramente associado à perda de integridade das membranas intracelulares, que permite o contacto das enzimas oxidativas com os compostos fenólicos (Nicolas *et al.*, 1994).

Existem vários mecanismos que ocorrem durante o armazenamento em atmosfera controlada que conduzem à perda de integridade das membranas. De seguida abordam-se dois destes mecanismos, um deles relacionado com as espécies reativas de oxigénio (ERO) e o outro relacionado com a acumulação de metabolitos da fermentação.

5.2.1. As espécies reativas de oxigénio

As espécies reativas de oxigénio (EROs) são produzidas durante a respiração dos frutos e durante a fotossíntese e a sua formação aumenta em condições de *stress*. Estas ERO incluem por exemplo o radical superóxido (O_2^-), o anião hidroxilo reativo (OH) e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e causam, entre outros danos, a peroxidação lipídica e desnaturação de proteínas (Apel e Hirt, 2004), comprometendo a integridade das membranas (Nicolas *et al.*, 1994; Franck *et al.*, 2007). É o sistema antioxidante das células que as protege da produção excessiva de ERO (Veltman, 2002). Este sistema antioxidante inclui algumas enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a ascorbato peroxidase (APX), a glutatona redutase (GR), a peroxidase, entre outras. Estas previnem o início da oxidação e a deterioração dos tecidos, eliminando as ERO antes que estas comecem a reagir com os componentes celulares. Entre os antioxidantes não enzimáticos, destaca-se o ácido ascórbico, que possui a capacidade de extinguir as ERO diretamente (reagindo e removendo-as) ou indiretamente (doando eletrões para a APX) (Gill e Tuteja, 2010). A este conjunto de processos antioxidantes dá-se o nome de ciclo ascorbato-glutationa (Latowski *et al.*, 2010). Na figura 14 está representado o modo de ação deste sistema antioxidante.

Este sistema assume um papel fundamental para combater o acastanhamento interno. Frank *et al.*, (2007) afirmam que em condições em que o sistema antioxidante esteja debilitado e em que as células estejam sujeitas a um nível de *stress* oxidativo elevado, a probabilidade de os frutos apresentarem acastanhamento interno é muito elevada.

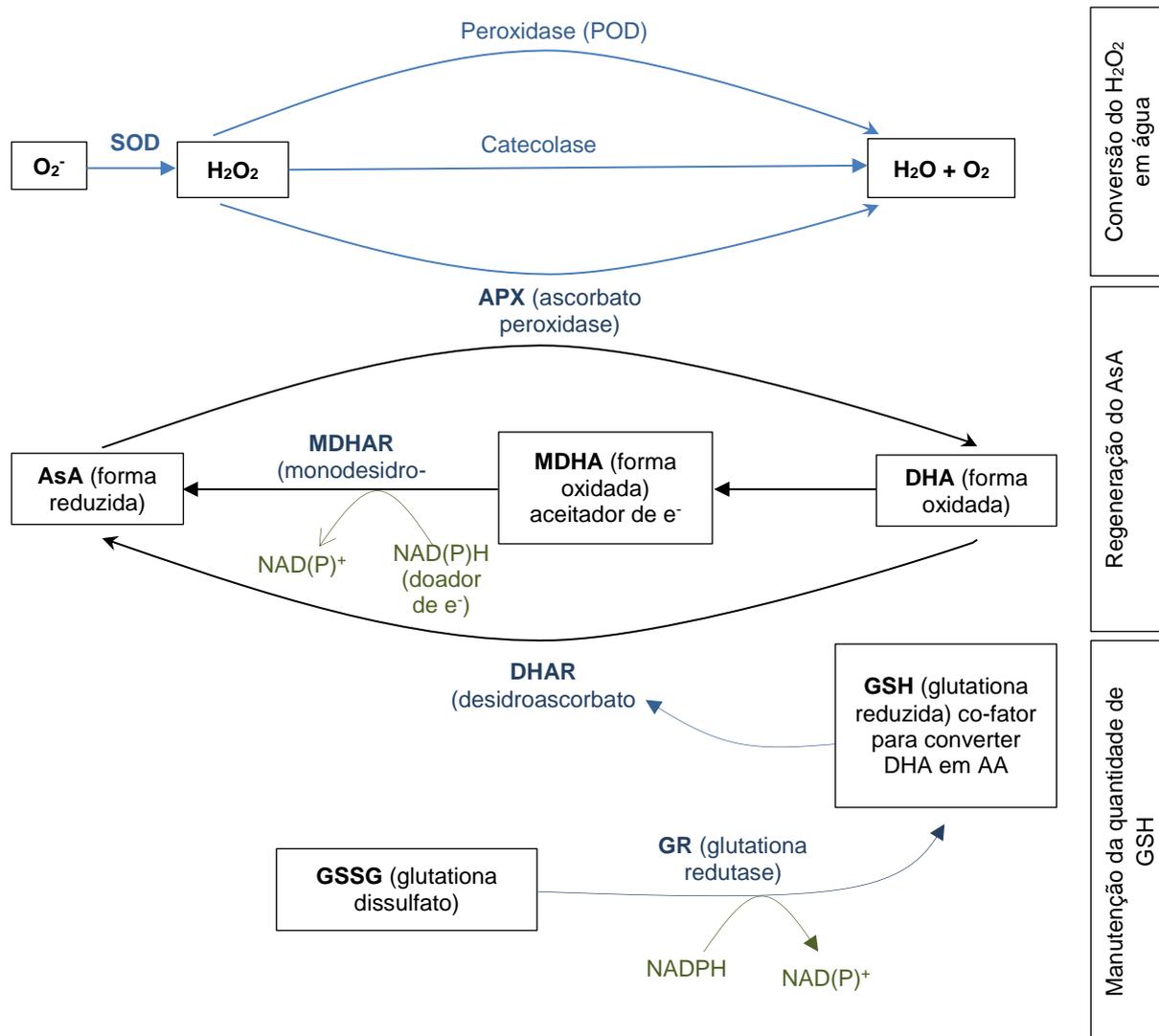


Figura 14 – Esquema do funcionamento do sistema oxidativo do ácido ascórbico (Deuchande, 2016).

5.2.2. A acumulação de metabolitos da fermentação

A conservação prolongada em atmosfera controlada em condições não perfeitamente adequadas (como por exemplo concentrações demasiado baixas de O_2 e muito altas de CO_2), pode gerar no interior das peras situações de hipoxia, que darão início à respiração anaeróbia e consequente fermentação e acumulação de metabolitos da fermentação, como o etanol e o acetaldeído (Deuchande, 2016). Quando estes se acumulam acima dos níveis toleráveis pelas células, tornam-se tóxicos, causando alterações nas membranas e consequente perda de integridade das mesmas (Ke *et al.*, 1994; Chervin *et al.* 1999; Chervin *et al.* 1996 e Kimmerer e MacDonald, 1987).

Esta perda de integridade das membranas leva ao desenvolvimento de acastanhamento interno, através do processo já explicado anteriormente, desencadeado pelo contacto entre as tirosinases e os compostos fenólicos (Veltman, 2002).

De facto, Pintó *et al.* (2001) mostraram no seu estudo em peras (cv 'Blanquilla') que a incidência de acastanhamento interno estava fortemente relacionada com a presença de metabolitos fermentativos. Os frutos que tinham este defeito revelaram ter quantidades de acetaldeído e etanol quase três vezes superiores aos frutos saudáveis. Segundo Deuchande *et al.* (2014), também existe uma relação positiva entre a incidência de acastanhamento interno e os elevados níveis de metabolitos de fermentação, como o etanol e acetaldeído em pêra 'Rocha'.

5.2.2.1. Álcool desidrogenase

A enzima álcool desidrogenase (ADH) é uma das enzimas envolvidas no processo fermentativo dos frutos. Deste modo, desde já se percebe que não é suposto a atividade da ADH ser muito elevada em frutos para consumo (Deuchande, 2016). Contudo, a ADH será um dos parâmetros a analisar em laboratório precisamente para aferir se os frutos sofreram processos fermentativos durante o armazenamento ou não.

O processo de fermentação pode ser dividido em duas reacções principais: uma primeira, em que ocorre a descarboxilização do piruvato em acetaldeído, pela acção da enzima piruvato descarboxilase (PDC), e uma segunda, em que ocorre a conversão reversível de acetaldeído em etanol. Esta segunda reacção é catalizada pela enzima álcool desidrogenase (ADH) e utiliza o NADH como substrato (Figura 15) (Chervin *et al.*, 1999).

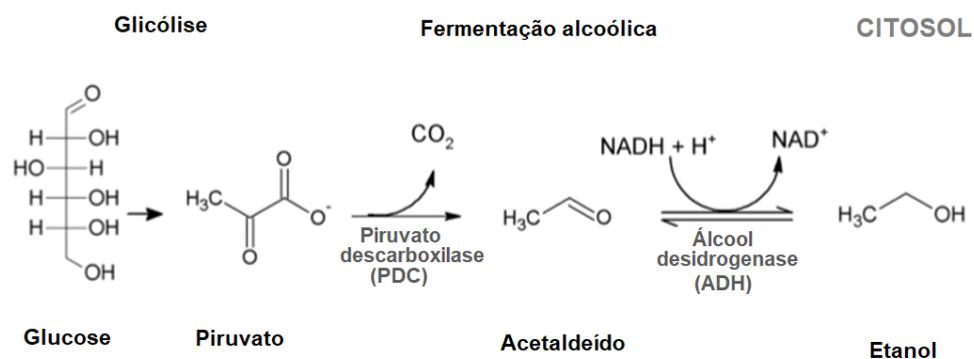


Figura 15 – Esquema representativo do processo de fermentação alcoólica que ocorre no interior das peras em condições de anaerobiose fomentadas pela atmosfera controlada.

Presume-se assim que o acondicionamento em atmosfera controlada pode, em certas condições, promover a fermentação de peras, sendo activadas nestas condições enzimas fermentativas como a álcool desidrogenase (ADH). Uma forma de avaliar a incidência de fermentação em frutos é medir a quantidade de ADH inicial e após sair da câmara, verificando se esta aumentou ou não. Segundo um estudo com peras 'Blanquilla', Pintó *et al.* (2001) verificaram que a actividade da ADH

aumentou consideravelmente nos frutos armazenados por longos períodos de tempo (6 meses) a 2% de O₂ e 5% de CO₂, sendo maior em frutos com acastanhamento interno.

5.3. Vitamina C

A vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico (AA), é uma vitamina presente em pequenas quantidades na pera, mas que tem uma grande relevância dada a sua função antioxidante (Ribeiro e Seravalli, 2007).

O AA está envolvido em diversos processos: atua na conversão de H₂O₂ em água, na desintoxicação das ERO (diretamente ou através do ciclo ascorbato-glutationa), na fotossíntese, no crescimento e desenvolvimento celular (Ahmad *et al.*, 2010) e na redução das o-quinonas novamente a o-difenóis (preveninco o AI) (figura 16).

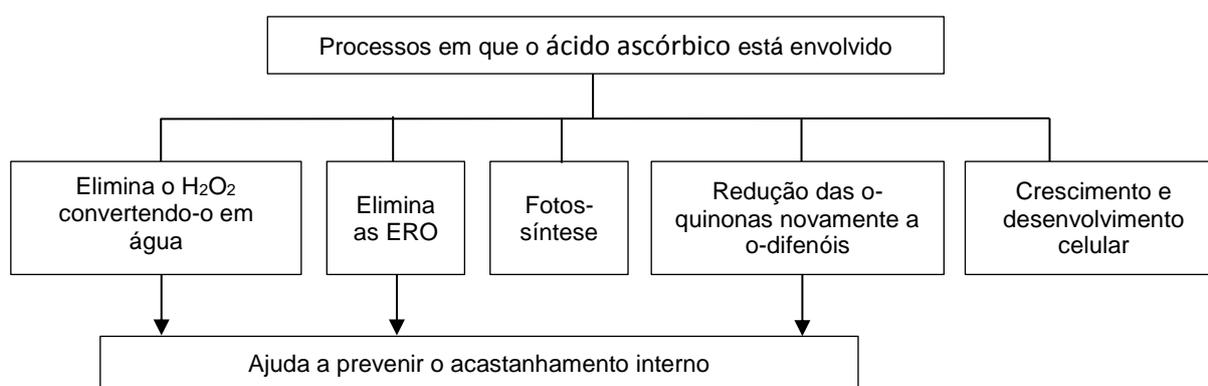


Figura 16 – Esquema-resumo dos processos em que o AA está envolvido (Veltman, 2002; Ahmad *et al.*, 2010).

Para o acastanhamento interno, o papel mais relevante do ácido ascórbico é o da redução das o-quinonas novamente a o-difenóis, explicado na figura 13 da página 23. O ácido ascórbico pode ser encontrado na sua forma reduzida (AsA) e nas suas duas formas oxidadas: monodesidroascorbato (MDHA) ou ácido desidroascórbico (DHA) (Ahmad *et al.*, 2010), como se pode ver na figura 14.

A relação DHA/AsA tem sido relatada como um dos fatores mais importantes para a resistência das plantas ao *stress* oxidativo (Waskiewicz *et al.*, 2014). Esta relação DHA/AsA compreende-se à luz do ciclo ascorbato-glutationa, representado na figura 14 página 25. A enzima MDHAR utiliza o monodesidroascorbato (MDHA) como aceitador de elétrons e o NAD(P)H como dador de elétrons para regenerar o AsA (Bhattacharjee, 2010). Da mesma forma, a enzima DHAR utiliza glutatona reduzida (GSH) como co-fator para converter DHA em AsA. A GSH pode limitar a capacidade da célula para regenerar AsA. Deste modo, para garantir a quantidade de GSH necessária, a glutatona redutase (GR) catalisa a redução de glutatona dissulfato (GSSG) a glutatona (GSH), usando NADPH como agente redutor na reação (figura 17). (Bhattacharjee, 2010; Kocsy *et al.*, 2001).

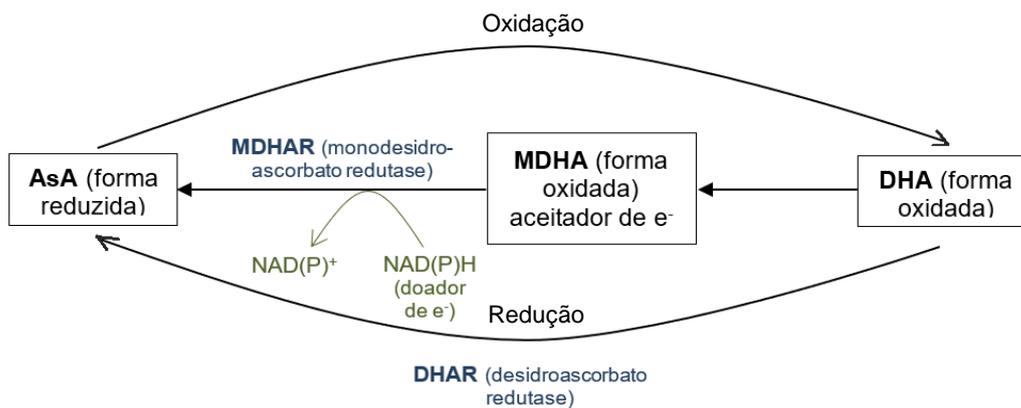


Figura 17 – Esquema das diferentes formas em que se pode encontrar o AA.

Contudo, a ação antioxidante do ácido ascórbico é finita. Ao longo do tempo de armazenamento e de maturação os níveis de ácido ascórbico vão diminuindo (Veltman *et al.*, 1999b e Zerbini *et al.*, 2002), o que pode comprometer o potencial antioxidante da fruta e espoletar o desenvolvimento de acastanhamento interno (Veltman, 2002). A quantidade de vitamina C nos frutos também pode ser afectada por factores como a perda de água, temperaturas altas, presença de oxigénio, enzimas oxidativas (Muhammad *et al.*, 2014) e produção de etileno (Saltveit, 1999). Segundo Davey *et al.* (2000), não existe uma relação direta entre o efeito da maturação e a evolução da quantidade de ácido ascórbico. Todavia, Silva *et al.* (2009), num estudo feito sobre pera ‘Rocha’, verificaram que houve uma diminuição do teor de AA ao longo de seis meses de conservação. Lee e Kader (2000) e Veltman *et al.* (2002) verificaram o mesmo para variedades diferentes.

Outro dos factores que também contribui para o decréscimo de ácido ascórbico nos frutos armazenados em atmosfera controlada é a falta de difusão de O₂ no interior dos frutos, resultado da ocorrência de condições de hipoxia (Lammertyn *et al.*, 2000).

Segundo Veltman *et al.*, (2002), com a monitorização dos níveis de ácido ascórbico é possível prever o desenvolvimento de acastanhamento interno em peras, uma vez que ocorre um aumento dos níveis de ácido ascórbico antes de aparecer acastanhamento interno. Assim, no momento em que se detetasse o aumento dos níveis de ácido ascórbico, poderia reduzir-se a concentração de CO₂ dentro da câmara, evitando o aparecimento desta desordem. Esta prática teria, contudo, a grande desvantagem de ser destrutiva, não permitindo a sua aplicação a grande escala a nível comercial. Apesar do ácido ascórbico ser um importante parâmetro para a previsão de acastanhamento interno, não é o único factor que explica o desenvolvimento deste acidente fisiológico, havendo sempre muitas interações e inúmeros factores a ter em conta (Gomes, 2017).

5.4. A peroxidase

Vários estudos afirmam que a peroxidase (POD) também está relacionada com o desenvolvimento de acastanhamento interno em peras, levando à oxidação de compostos fenólicos na presença de H_2O_2 (Tomás-Barberán e Espín, 2001). A POD coopera com a PPO para o desenvolvimento de acastanhamento interno, mas é dependente da atividade inicial da PPO que gera H_2O_2 via oxidação de compostos fenólicos (Tomás-Barberán e Espín, 2001). Richard-Forget e Gaillard (1997) também demonstraram que embora a POD de pera, só por si, não tenha atividade oxidativa, na presença de PPO, a POD aumenta a degradação dos compostos fenólicos. Todavia, até ao momento, o estudo da relação entre PPO e POD no desenvolvimento de acastanhamento interno em pera "Rocha" ainda não foi desenvolvido em profundidade (Deuchande, 2016).

6. Métodos de previsão do acastanhamento interno

O principal problema do acastanhamento interno prende-se com o facto de não ser possível distinguir as peras saudáveis das afetadas, uma vez que os sintomas são manifestados no interior dos frutos (Gomes, 2017). Por esta razão, para uma eventual análise dos sintomas, seria necessário aplicar um método destrutivo, o que torna a avaliação impraticável em termos empresariais. Este facto tem contribuído para a desvalorização económica do produto (Gomes, 2017).

As técnicas que continuam a ser mais praticadas para minimizar os prejuízos do acastanhamento interno são a utilização de 1-MCP e a utilização de tecnologias de atmosfera controlada diferida (Deuchande, 2016). A atmosfera controlada diferida é um método de armazenamento muito semelhante ao armazenamento em atmosfera controlada, apresentando apenas a diferença de se armazenar os frutos por um determinado período de tempo em frio normal, antes de estes serem transferidos para um ambiente de AC. A utilização desta estratégia de armazenamento demonstrou ser eficaz na redução do acastanhamento interno em peras 'Conference' (Saquet *et al.*, 2003). No caso da pera 'Rocha', os estudos realizados não têm sido conclusivos (Silva *et al.*, 2009; Carvalho, 2011), sendo necessária a realização de mais ensaios para se poder chegar a resultados conclusivos (Deuchande, 2016).

Até à data, ainda não existe nenhuma estratégia economicamente aceitável e escalável em termos comerciais que permita prever a ocorrência de acastanhamento interno em pera 'Rocha' (Deuchande, 2016). Porém, a nível laboratorial existem métodos não destrutivos para previsão do AI: a utilização de raios-X, ressonância magnética ou espectroscopia de reflexão infravermelho (Franck *et al.*, 2007; Gomes, 2015).

No entanto, encontram-se em desenvolvimento alguns estudos que visam encontrar um método para previsão do acastanhamento interno em peras.

6.1. Biomarcadores para prever acastanhamento interno em pera 'Rocha' (método destrutivo)

Deuchande *et al.* (2017b) realizaram um estudo em pera 'Rocha' com o objetivo de identificar marcadores biomoleculares que permitissem prever a ocorrência de acastanhamento interno após 45 ou 100 dias em atmosfera controlada. Os resultados mostraram que o melhor biomarcador era, entre a concentração de etanol, de acetaldeído, de PPO e de POD, a concentração de etanol nos frutos, da qual se obteve uma relação linear em que o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,91. Contudo, a grande desvantagem desta técnica é o facto de ser destrutiva.

6.2. Utilização de concentrações minerais para prever acastanhamento interno em pera 'Rocha' (método destrutivo)

Foi realizado um outro estudo, por Deuchande *et al.* (2017a), cujo objetivo era a identificação de marcadores minerais capazes de prever o AI em pera 'Rocha' e a criação de um modelo de previsão com base nestes mesmos marcadores. Foram medidas as concentrações de dez minerais diferentes à colheita, e aquele que mostrou ter uma melhor relação linear com o acastanhamento interno foi o cobre, com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,97. Contudo, o principal problema desta técnica é o mesmo da técnica descrita em 5.1.. Ambas implicam a destruição dos frutos.

6.3. Aplicação de radiação eletromagnética de baixo comprimento de onda para a avaliação da qualidade de peras (método não-destrutivo)

Apresenta-se um último estudo, levado a cabo por Suchanek *et al.* (2017), em que se pretendeu desenvolver um método não-destrutivo e económico para avaliar a ocorrência de acastanhamento interno peras da cv. 'Conference' armazenadas em atmosfera controlada dinâmica. Para tal, foi utilizada uma tecnologia de ressonância magnética (RM) de baixo comprimento de onda, muito semelhante à tecnologia utilizada na investigação dirigida pela IEQUALTECS Lda..

Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, tendo-se concluído que esta é uma técnica bastante fiável para identificar heterogeneidades na polpa dos frutos. Deste modo, torna-se possível identificar problemas como acastanhamento interno através desta técnica, de forma não destrutiva, económica, rápida e eficaz (Suchanek *et al.*, 2017).

7. Material e Métodos

7.1. Material vegetal e datas de análise

Para este ensaio foram utilizadas peras da cultivar 'Rocha' (*Pyrus communis* L. Rocha), provenientes de três pomares localizados em zonas distintas da região Oeste: Mafra, Bombarral e Zambujeira. Os dois primeiros pomares já constavam no ensaio do ano passado, enquanto o pomar da Zambujeira foi acrescentado apenas este ano. Os frutos foram colhidos na campanha de 2017 e foram armazenados numa central do grupo CPF, a $-0,5^{\circ}\text{C}$, 90 a 95% de humidade relativa, em condições de atmosfera controlada dinâmica (0,5 % de O_2 e 0,5 % de CO_2), sendo retiradas amostras da câmara periodicamente, o que permitiu uma análise dos parâmetros de qualidade ao longo do tempo de armazenamento.

Para cada pomar foram analisados lotes de 20 peras cada, em 2 datas diferentes: 0 e 7 (0 e 7 dias após serem retiradas da câmara) e para 9 diferentes tempos de conservação em ACD (dias): t_0 , t_{15-16} , t_{29-30} , t_{50-63} , t_{78-91} , $t_{107-120}$, $t_{141-154}$, $t_{162-175}$, $t_{212-225}$ dias. Estes tempos de conservação (dias) estão representados por dois números porque os pomares foram colhidos em dias diferentes. A colheita do Bombarral e Zambujeira foi realizada dia 8 de agosto de 2017 e a do pomar de Mafra foi dia 23 de agosto.

As análises foram realizadas individualmente a cada fruto, uma vez que os resultados seriam utilizados não só para este estudo mas também para testar a eficácia da RMN unilateral na previsão do acastanhamento interno a realizar pela empresa IQUALTECS Lda..

Entre as datas 0 e 7, as peras foram sujeitas à temperatura ambiente (cerca de 20°C), o que diferiu do que foi realizado no ano anterior no âmbito do mesmo projeto, em que os primeiros três tempos de conservação decorreram à temperatura de 9°C e os dois últimos foram mantidos à temperatura ambiente (aproximadamente 20°C).

7.2. Métodos analíticos

Para cada lote de frutos foram realizadas análises químicas, físicas e bioquímicas. Nas análises químicas determinou-se o teor de vitamina C (mg ácido ascórbico/L sumo), a acidez titulável (g de ácido málico/ L sumo) e o teor de fenóis totais (mg/L sumo). Em termos de análises físicas, foram determinados a massa de cada fruto (g), a firmeza ($\text{kg}/0,5\text{cm}^2$), o teor de sólidos solúveis ($^{\circ}\text{Brix}$) e a massa seca do sumo (%) e do fruto (%). A massa seca do fruto foi apenas determinada para algumas amostras dos lotes H e I, uma vez que apenas surgiu a necessidade e ideia de a quantificar nesta altura. Por fim, relativamente às análises bioquímicas, foram feitas medições das atividades de duas enzimas: a polifenol oxidase, PPO (OD/g MS resíduo seco do sumo) e a álcool desidrogenase, ADH (OD/mg de proteína solúvel do sumo). Determinou-se igualmente o teor de fenóis totais (quantidade de ácido gálico (mg/L)) e o teor de proteína solúvel no sumo (mg/L). O protocolo encontra-se descrito no ANEXO I.

7.2.1 Determinação da firmeza

A firmeza da polpa foi determinada recorrendo a um penetrómetro manual (FT-327) com sonda de prova de 0,5 cm de diâmetro.

7.2.2 Acidez titulável

Para a determinação da acidez titulável, foi feita uma titulação potenciométrica segundo a norma portuguesa NP-1421 (1977) com ligeiras alterações. Utilizaram-se 10 mL de sumo previamente filtrado, perfazendo 20 mL com água destilada. Esta solução de 20 mL foi depois titulada com hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1N, com auxílio do potenciómetro e eléctrodo (modelo pH 213) até se atingir o pH de 8,15. A acidez titulável é expressa pela concentração de ácido málico (g/L).

7.2.3 Teor de fenóis totais

Para a determinação do teor de fenóis totais, expressos em ácido gálico, utilizou-se o método de espectrofotometria descrito por Waterhouse (2002), fazendo-se uma diluição de 1:20 do sumo em água destilada, e posterior leitura directa no espectrofotómetro (modelo GeneQuant Pro) a um comprimento de onda de 280 nm. A concentração expressa em ácido gálico foi calculada com base numa curva de calibração previamente estabelecida no laboratório.

7.2.4 Teor de sólidos solúveis

Na determinação do teor de sólidos solúveis em graus Brix (g de sólidos solúveis por 100 g de amostra), utilizou-se o método de refractometria, através do refractómetro digital (modelo HI 96801).

7.2.5 Vitamina C

Para a medição da vitamina C utilizou-se o método volumétrico desenvolvido por Tillmans (1927) com a solução oxidante de 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) como titulante, utilizado por Oliveira *et al.* (2010), com algumas adaptações. Em todos os dias de ensaio foi feita uma titulação de padrão de ácido ascórbico. As amostras de sumo de pera foram apenas diluídas com água. Um dos problemas que surgiu nesta metodologia foi o facto das amostras de sumo de pera 'Rocha' apresentarem reduzidas quantidades de vitamina C, e deste modo utilizariam um baixo volume de DCPIP para uma titulação feita em bureta. Como tal, recorreu-se a uma metodologia alternativa em que em vez de buretas se utilizaram micropipetas (0 - 5000 μ L), avaliando-se a massa de DCPIP adicionada. Recorreu-se à densidade do DCPIP para os cálculos subsequentes.

7.2.6 Quantificação de proteína solúvel total

Para a determinação do teor de proteína total recorreu-se ao método de Bradford (1976), onde se utiliza o corante 'Coomassie Brilliant Blue G-250'. Adicionou-se 20 µL de sumo a 1000 µL de reagente de Bradford e procedeu-se à leitura das respectivas absorvâncias a 595 nm no espectrofotómetro (modelo GeneQuant Pro). Para quantificação final de proteína recorreu-se à curva de calibração que foi obtida utilizando-se como padrão a proteína de soro de albumina bovina (BSA) com as seguintes concentrações: 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 (mg mL⁻¹).

7.2.7 Determinação indirecta de actividade da PPO

A actividade da enzima polifenol oxidase (PPO) foi determinada indirectamente com base no método descrito por Ngadze *et al.* (2012) com algumas modificações nas quantidades. Utilizou-se 250 µL de sumo, 725 µL de tampão fosfato de sódio 0,05M (pH 6) e 250 µL de catecol 0,1M. Foram lidas as respectivas absorvâncias a 546 nm no espectrofotómetro (Shimadzu UV-1200) durante 90 minutos, para diferentes intervalos de tempo (0, 5, 12, 40, 60 e 90 minutos). A actividade foi avaliada indirectamente pelo aumento da absorvância ao longo do tempo, calculando-se a variação total de absorvância nos 90 minutos por mg de proteína.

7.2.8 Determinação indirecta de actividade da ADH

A actividade da enzima álcool desidrogenase (ADH) também foi determinada indirectamente pelo método de espectrofotometria com base no método descrito por Ke *et al.* (1994). A oxidação do NADH foi medida através da diminuição da absorvância a 340 nm usando o referido espectrofotómetro. Foram lidas absorvâncias durante 4 horas, com intervalos de 1 hora. A actividade da ADH foi avaliada indirectamente, pela descida da absorvância desde a medição inicial até ao menor valor, reportando também à quantidade de proteína.

7.2.9 Acastanhamento interno

A avaliação da incidência de acastanhamento interno foi feita visualmente, no momento do corte para extração do sumo, e foram feitas contagens do número de frutos afetados em cada lote.

Foi também avaliado o grau de severidade de acastanhamento. No laboratório, antes da análise destrutiva dos frutos, foram tiradas fotografias (RGB) a alguns dos frutos afetados. Mais tarde, com recurso ao *software* GIMP (gratuito, disponível em [<https://www.gimp.org/>]), foi calculada a percentagem (em termos de área) do fruto afetada. Para tal utilizou-se a 'Ferramenta de seleção livre' e, após ser selecionada a área, da pera total (Figura 18) ou da zona afetada (Figura 19), foi registado o número de pixels de cada uma. O resultado final, em percentagem, foi dado pela equação: [(Área do fruto afetada pelo AI) / (Área total do corte longitudinal do fruto)] x 100%.



Figura 18 –Explicação da forma de obtenção da área total de cada pera, convertida em pixéis pelo *software* GIMP (a vermelho).



Figura 19 - Explicação da forma de obtenção da área afetada pelo acastanhamento interno em cada pera, convertida em pixéis pelo *software* GIMP (a vermelho).

7.3. Análise de dados: métodos estatísticos para avaliar o efeito dos diferentes fatores

A caracterização dos atributos medidos foi realizada com recurso a ferramentas de estatística descritiva. Subsequentemente, foram realizadas análises de variância (ANOVA) para testar se os fatores em estudo ('Pomar', 'Data', 'Conservação') conduzem a resultados com diferenças significativas entre eles.

Os pressupostos necessários para a utilização de uma ANOVA são os seguintes: todas as variáveis têm de ser aleatórias e independentes, com distribuição normal e os erros aleatórios têm de ser também normais, de variância constante (homogeneidade das variâncias) e independentes (Iversen *et al.*, 1987).

A aleatoriedade e independência das amostras (o pressuposto mais importante de todos) e dos erros aleatórios foi conseguida recolhendo os frutos dos três pomares de forma aleatória.

Relativamente à normalidade, foram feitos testes de Shapiro-Wilk e nenhuma das variáveis demonstrou ter distribuição normal (ver anexo II) . Este problema poderia ter sido eventualmente contornado desde início aumentando o número de amostras por lote para 30. Contudo isto seria muito dificilmente realizável em termos laboratoriais. Deste modo, uma vez que todas as medições foram contínuas, pode assumir-se, segundo Norman (2010), que as 20 unidades das amostras foram

suficientes para minorar o problema do pressuposto da normalidade. Ponderou-se a realização de testes de Kruskal-Wallis (não paramétricos, para contornar o problema do pressuposto da normalidade) mas essa hipótese foi excluída porque este teste faz análises apenas a um factor, e assim perder-se-iam os efeitos de interacção.

Por último, relativamente à homogeneidade das variâncias, ponderou-se inicialmente fazer um teste de Bartlett. Contudo, uma vez que este teste é fortemente sensível à normalidade das observações (Box, 1953), e dado que não foi possível validar convenientemente o pressuposto da normalidade neste estudo, foi decidido usar um teste mais robusto a este problema. O teste escolhido foi o teste de Brown–Forsythe, que é uma modificação do teste de Levene, porque usa as medianas em vez das médias, de modo a ser mais robusto à violação dos pressupostos da normalidade (Glass e Hopkins, 1996). Como se pode ver no anexo II, a maioria dos dados não foram validados. Mais uma vez, isto seria previsível dado o tamanho reduzido das amostras (20 de cada lote). No entanto, este problema pode ser relativizado uma vez que todas as medições foram contínuas e que as violações ao pressuposto das variâncias homogéneas são em geral menos graves em delineamentos equilibrados, como é o caso (Glass *et al.*, 1972 e Harwell *et al.*, 1992). De facto, estes autores referem que em delineamentos equilibrados, mesmo havendo heterogeneidade da variância, há um ligeiro aumento da taxa de erro do tipo I, mas não muito relevante.

Para comparações de médias foram realizados testes de Tukey ($\alpha=0,05$).

Os pressupostos necessários para a utilização dos testes de Tukey são os mesmos da ANOVA (Tukey, 1991). A forma como eles foram cumpridos ou como foram assumidos como aceitáveis encontra-se acima descrita. Nos testes de Tukey também é conveniente que os delineamentos sejam equilibrados, ou que pelo menos o desequilíbrio não seja muito acentuado (Tukey, 1991). Este ponto foi igualmente cumprido.

Todo o trabalho de análise de dados foi realizado utilizando o programa estatístico 'Rproject v. 3.2.2' (<https://cran.r-project.org>).

8. Resultados e Discussão

8.1. Gama dos parâmetros de qualidade e dos fatores que afetam o AI durante o armazenamento em regime de ACD

A evolução dos parâmetros avaliados foi primeiramente caracterizada com recurso a ferramentas da estatística descritiva, nomeadamente *boxplots*, máximos, mínimos, médias e testes de *Tukey*. Este estudo foi feito utilizando dados de todos os tempos de conservação (desde os 0 aos 225 dias), para cada pomar. Foram utilizados dados apenas referentes à data zero (frutos analisados à saída da câmara), para que se pudessem observar as características dos frutos, antes destes alterarem a sua atividade de forma significativa. Os resultados apresentam-se nas figuras 20 e 21.

Figura 20 - Boxplots para os valores da firmeza, grau Brix e acidez titulável, para 'Data'=0 e 'Cons'=[0,225]

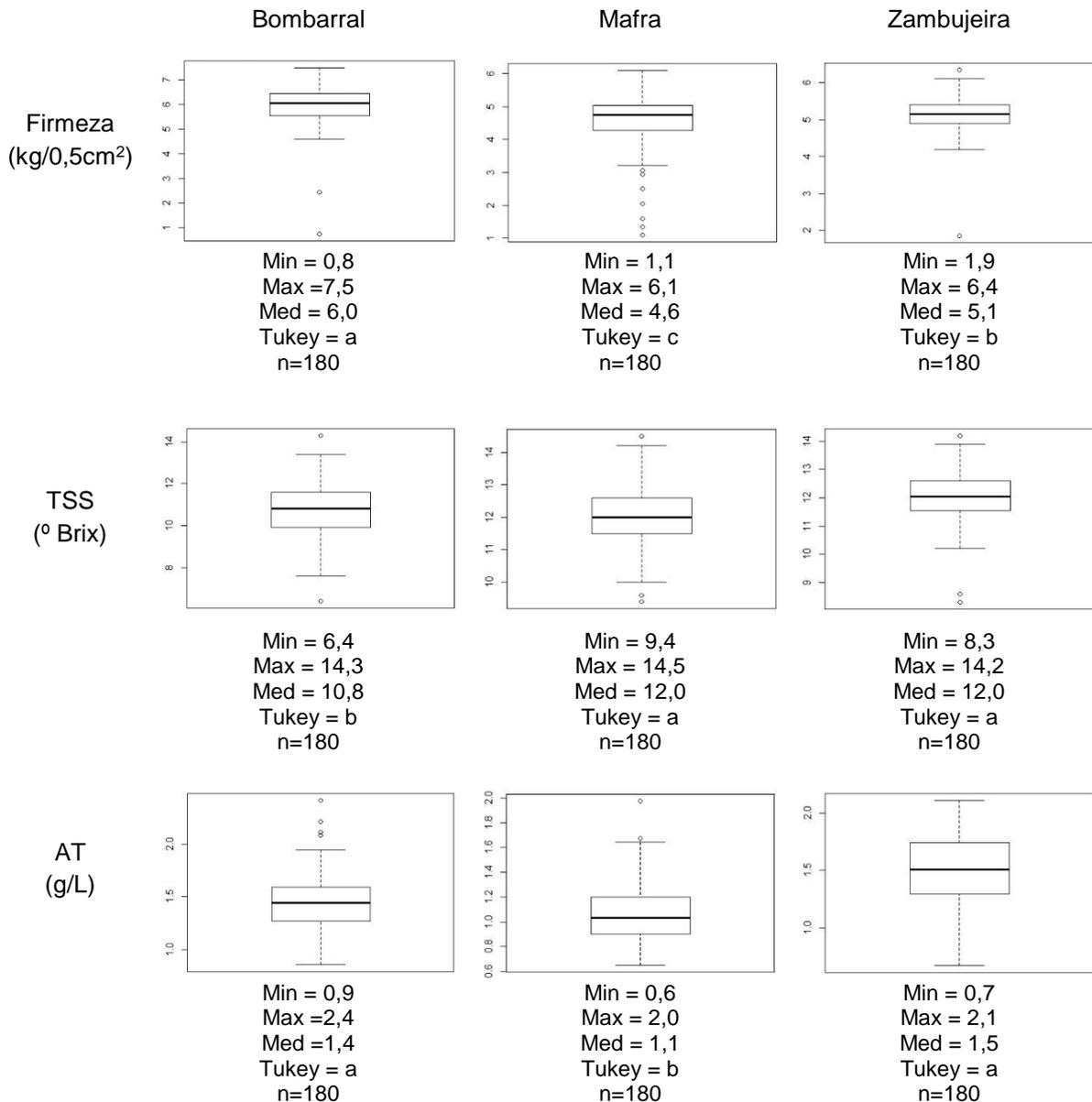
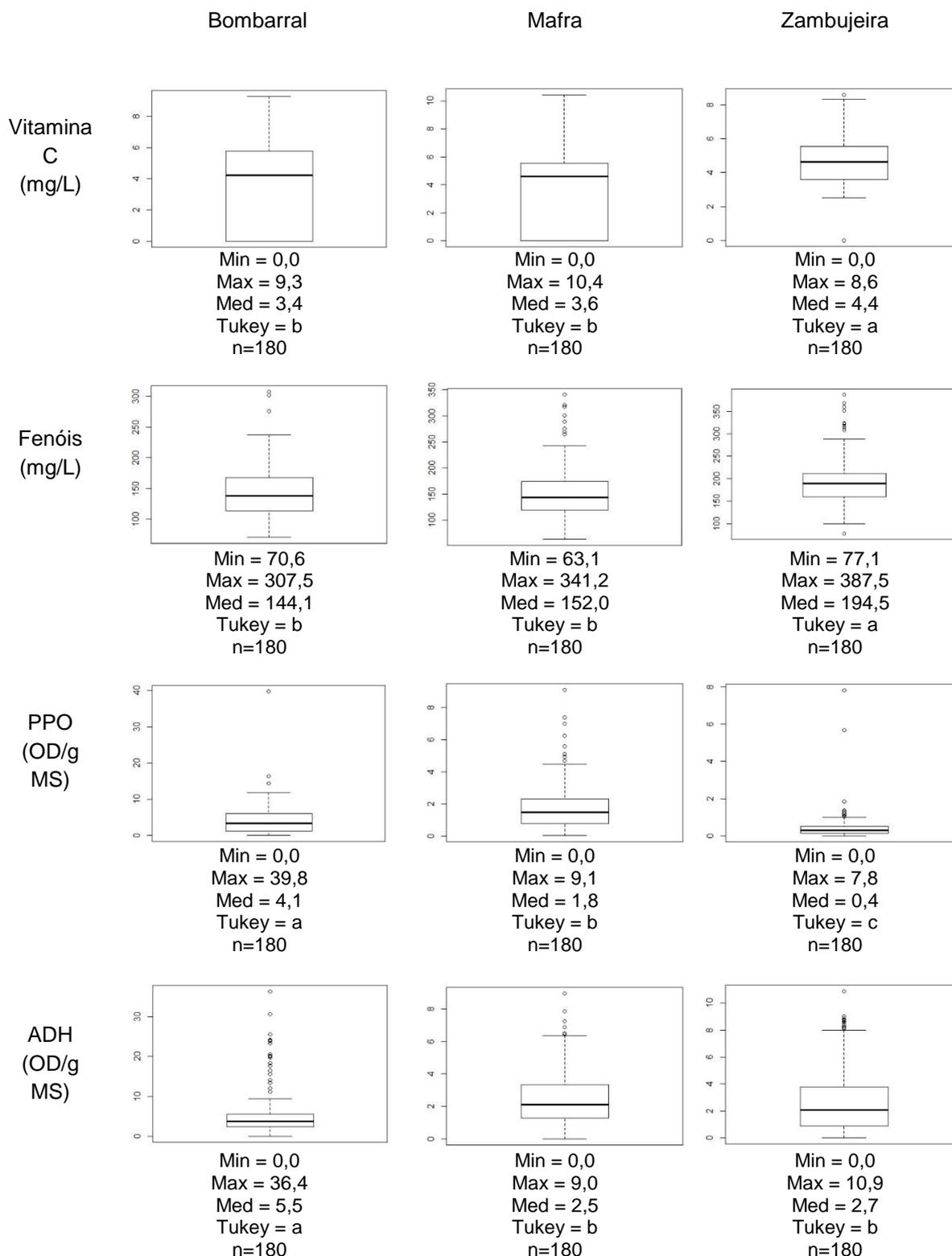


Figura 21 - Boxplots para os valores da vitamina C, fenóis, PPO e ADH, para 'Data'=0 e 'Cons'=[0,225]



Nota – Nos resultados dos testes de Tukey, médias seguidas pela mesma letra (dentro do mesmo parâmetro) não diferem entre si, ao nível de significância de 5%.

Deste estudo preliminar, podem tirar-se algumas conclusões. Em primeiro lugar, a firmeza das peras do Bombarral é significativamente superior às dos restantes pomares e a de Mafra é significativamente inferior. O TSS das peras do Bombarral é significativamente inferior às dos restantes pomares. Relativamente à AT, Mafra possui os frutos com uma acidez titulável menor. Estes resultados, conjugados com uma menor firmeza, apontam para que as peras de Mafra estivessem mais avançadas na maturação (Reid, 2002; Hobson, 1994), o que é natural uma vez que o pomar de Mafra foi colhido mais tarde do que os outros. Verificou-se também que os frutos do pomar da Zambujeira possuem significativamente mais vitamina C. O facto de ter os valores mais elevados de vitamina C sugere que este será provavelmente o pomar menos suscetível ao aparecimento de acastanhamento interno (Veltman *et al.*, 1999b). O facto de este ser o pomar no qual o valor dos fenóis é superior leva à mesma conclusão (Veltman, 2002). A PPO foi o único parâmetro no qual todos os pomares diferiram significativamente entre si. O pomar da Zambujeira é aquele em que se encontram peras com menor atividade desta enzima, seguido de Mafra e do Bombarral. Todos eles tiveram valores mínimos de PPO de 0 (OD/g MS resíduo seco do sumo), destacando-se o pomar do Bombarral com valores superiores desta enzima. Relativamente à ADH, o único pomar significativamente diferente foi novamente o do Bombarral, apresentando valores bastante mais elevados para a atividade desta enzima do que os restantes. Estas diferenças refletem-se numa média de valores de ADH medidos de cerca do dobro dos restantes para o Bombarral.

É também possível concluir, através destes dados, que a qualidade dos frutos de Mafra é inferior à dos restantes pomares, no que toca à firmeza e à AT.

De seguida, apresentam-se os resultados das análises estatísticas que relacionam os sete parâmetros estudados com os fatores que afetaram a sua evolução – tempo de ‘Conservação’ e ‘Data’ ou tempo de prateleira – globalmente e para cada pomar.

8.2. Efeito individualizado da ‘Conservação’ e da ‘Data’ para cada pomar sobre os parâmetros analisados

8.2.1. Conservação

Foi estudada a evolução dos parâmetros de qualidade e dos fatores que afetam o acastanhamento interno em relação à duração do período de conservação (‘Cons’). Para tal, utilizaram-se dados apenas da ‘Data’ zero, de modo a poder fazer-se a análise dos resultados sem interferência do fator ‘Data’. Foram feitas quatro análises distintas: primeiro uma relativa ao conjunto dos três pomares, e depois outras três, para cada um dos pomares individualmente. Para tal, foram realizadas análises ANOVA. Quando estas revelavam a existência de diferenças significativas, foram também feitos testes de Tukey ($\alpha=0,05$), para comparar a evolução das médias de cada parâmetro ao longo do tempo. Foram também calculados os valores de F e de R^2 para o ajustamento linear a cada um dos parâmetros. Os resultados apresentam-se de seguida, nas tabelas 9 e 10 e na figura 22.

8.2.1.1. Conjunto dos três pomares (Bombarral, Mafra e Zambujeira) para 'Data'=0

Tabela 9 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre o tipo de conservação e os restantes parâmetros analisados, para 'Data'=0 e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' conjuntamente (n=60)

Cons (dias)	Firmeza		Brix		AT		Vitamina C		Fenóis		PPOMS		ADHMS	
t ₀	4,83	b	11,75	abc	1,62	a	5,62	a	150,56	def	1,46	bc	1,10	d
t ₁₅₋₁₆	5,20	ab	12,05	a	1,57	ab	4,33	bc	168,48	bcd	2,29	abc	1,81	d
t ₂₉₋₃₀	5,12	ab	11,48	abc	1,41	bc	4,10	c	140,40	ef	2,45	abc	4,02	bc
t ₅₀₋₆₃	5,18	ab	11,57	abc	1,33	cd	4,22	bc	132,46	f	1,72	bc	2,07	cd
t ₇₈₋₉₁	5,57	a	11,39	abc	1,29	cde	1,28	d	182,57	abc	2,99	ab	3,05	bcd
t ₁₀₇₋₁₂₀	5,24	ab	11,20	c	1,34	cd	0,01	e	203,90	a	1,14	c	4,73	b
t ₁₄₁₋₁₅₄	5,38	a	11,36	bc	1,12	f	5,18	ab	142,67	def	1,84	bc	2,79	bcd
t ₁₆₂₋₁₇₅	5,39	a	11,91	ab	1,19	def	4,28	bc	161,68	cde	1,74	bc	8,50	a
t ₂₁₂₋₂₂₅	5,20	ab	11,65	abc	1,16	ef	5,71	a	189,03	ab	3,57	a	4,07	bc

Nota - Foram comparadas a médias para diferentes tempos de conservação. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (n=60 peras).

Tabela 10 - Valores de F e de R² calculados para o ajustamento linear das médias de cada um dos parâmetros, com 'Data'=0 e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' conjuntamente (n=538)

	Firmeza	Brix	AT	Vitamina C	Fenóis	PPOMS	ADHMS
F de significância (n = 538)	0,10	0,54	2,57x10 ⁻⁴	0,91	0,30	0,44	0,05
R ² regressão (n = 538)	0,34	0,06	0,87	0,00	0,15	0,09	0,45

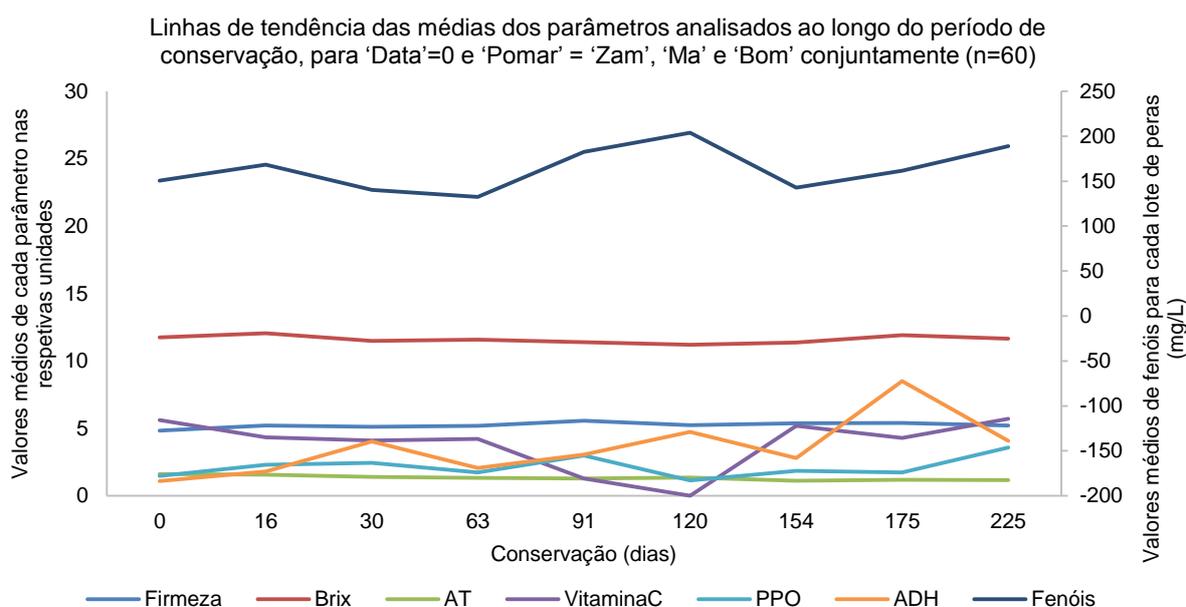


Figura 22 – Linhas de tendência das médias dos parâmetros analisados ao longo do período de conservação, para 'Data'=0 e 'Pomar'= 'Zam', 'Ma' e 'Bom' conjuntamente. Todos os parâmetros devem ser analisados em função do eixo principal (da esquerda), exceto os fenóis, que devem ser analisados a partir do eixo secundário.

Através da análise da tabela 9 pode-se ver como as peras evoluíram ao longo do tempo de conservação, quer através das médias dos valores medidos, quer através das letras que resultaram da realização dos testes de Tukey.

Parece não haver uma evolução significativa dos parâmetros ao longo do tempo, excepto para a AT. Para testar a veracidade desta afirmação, foi ajustado um modelo linear à evolução de cada parâmetro ao longo do tempo e os resultados foram apresentados na tabela 10.

De facto, os dados corroboraram a tese de que apenas a AT variou de forma linear. Tal como se pode ver na tabela 12 a maioria dos valores da estatística de F não são significativos, dado que são todos iguais ou superiores a 0,05, excepto o da AT. Isto significa que não é adequado explicar a evolução de cada um destes parâmetros com uma regressão linear, porque estes não variam linearmente em função do tempo de conservação, estando dependente de outros fatores que não estão a ser considerados. Por esta razão, na figura 22 foram usadas linhas de tendência e não retas de regressão.

Os valores de R^2 da tabela 10 mostram que o único valor aceitável é o da AT, na qual a reta de regressão do modelo linear aplicada explica cerca de 87% da variabilidade dos valores. Daqui se conclui que a AT diminui com o decorrer do tempo de conservação, o que está em linha de conta com a existência de alguma atividade respiratória dentro da câmara.

Relativamente à ADH, o valor de F está no limite da significância (0,05) e o R^2 é menor (0,45). Dado que o valor de F é tão próximo do valor limite (0,05), pode-se considerar que há um aumento da ADH ao longo do período de conservação, mas este aumento não é praticamente significativo, o que se confirma pelo valor de R^2 , que é de apenas 0,45.

Por último, no que respeita aos restantes parâmetros, constatou-se que de facto não ocorreu praticamente nenhuma evolução. Isto reflete o facto de estarmos a analisar peras da 'data 0', que saíram há muito pouco tempo da câmara, onde estavam com muito baixa atividade metabólica. Pereira (2017) obteve resultados muito semelhantes. Parece, contudo, haver uma ligeira inclinação positiva das linhas de tendência da firmeza e da ADH.

Por último, é de salvaguardar o facto de que as grandes oscilações que se podem ver ao nível da vitamina C e dos fenóis se devem muito provavelmente à variabilidade interna das amostras, e não a uma evolução díspar por natureza.

Segue-se o estudo pomar a pomar.

8.2.1.2. Pomar da Zambujeira ('Data'=0)

Começando pela Zambujeira, e utilizando novamente apenas dados da 'Data' zero, e testes de Tukey ($\alpha=0,05$), obtiveram-se os resultados apresentados na tabela 11. Foram também calculados os valores de F e de R^2 para o ajustamento linear a cada um dos parâmetros (tabela 12).

Tabela 11 – Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre o tipo de conservação e os restantes parâmetros analisados, para ‘Data’=0 e ‘Pomar’ = Zam (n=20)

Cons (dias)	Firmeza		Brix		AT		Vitamina C		Fenóis		PPO		ADH	
t ₀	4,95	abc	11,93	ab	1,79	a	4,43	de	169,10	cd	0,11	a	1,10	de
t ₁₅₋₁₆	4,60	c	12,52	a	1,76	a	3,18	f	193,98	bcd	0,82	a	0,40	e
t ₂₉₋₃₀	5,20	ab	12,31	ab	1,63	ab	4,73	cd	186,91	bcd	0,29	a	4,43	b
t ₅₀₋₆₃	5,28	ab	12,04	ab	1,58	ab	5,12	c	167,96	cd	0,60	a	1,06	de
t ₇₈₋₉₁	5,32	a	12,21	ab	1,51	bc	3,84	e	218,48	ab	0,51	a	1,95	cd
t ₁₀₇₋₁₂₀	5,29	ab	11,53	b	1,40	bcd	0,01	g	204,34	bc	0,44	a	8,06	a
t ₁₄₁₋₁₅₄	5,29	ab	11,54	b	1,31	cd	5,05	cd	150,75	d	0,56	a	1,91	cd
t ₁₆₂₋₁₇₅	5,30	ab	12,07	ab	1,27	d	7,10	a	198,15	bc	0,39	a	2,90	c
t ₂₁₂₋₂₂₅	4,89	bc	12,14	ab	1,27	d	6,26	b	260,41	a	0,25	a	2,91	c

Nota - Foram comparadas a médias para diferentes tempos de conservação. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (n=20 peras).

Tabela 12 - Valores de F e de R² calculados para o ajustamento linear das médias de cada um dos parâmetros, com ‘Data’=0 e ‘Pomar’ = ‘Zam’ (n=180)

	Firmeza	Brix	AT	Vitamina C	Fenóis	PPO	ADH
F de significância (n = 180)	0,31	0,27	0,00	0,40	0,27	0,88	0,41
R ² regressão (n = 180)	0,15	0,17	0,98	0,10	0,17	0,00	0,10

As tabelas 11 e 12 revelam que as tendências evolutivas de cada parâmetro em relação ao período de conservação são bastante semelhantes no estudo para todos os pomares conjuntamente e para o pomar da Zambujeira individualmente. Não ocorreu praticamente nenhuma evolução para a maioria dos parâmetros a não ser para a AT e registaram-se grandes oscilações ao longo do tempo. Isto reflete novamente o facto de terem sido analisadas peras da ‘Data 0’, que saíram há muito pouco tempo da câmara e o facto de cada amostra contar apenas 20 peras (o que explica a elevada variabilidade interna das mesmas). Novamente, o único modelo linear que pode ser aplicado é o da AT, com um valor de F muito reduzido. A reta de regressão da AT em função do tempo de conservação explica 98% da variabilidade da AT.

8.2.1.3. Pomar do Bombarral (‘Data’=0)

De seguida apresenta-se o estudo do pomar do Bombarral em função da conservação. Para este estudo foram igualmente utilizados dados apenas da ‘Data’ zero. Foram realizados testes de Tukey ($\alpha=0,05$) e ajustamentos lineares, obtendo-se os resultados apresentados nas tabelas 13 e 14.

Tabela 13 – Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre o tipo de conservação e os restantes parâmetros analisados, para 'Data'=0 e 'Pomar' = Bom (n=20)

Cons (dias)	Firmeza	Brix	AT	Vitamina C	Fenóis	PPO	ADH
t ₀	5,49 c	11,38 a	1,74 a	7,11 a	164,14 abc	1,59 d	0,98 e
t ₁₅₋₁₆	5,90 bc	11,30 a	1,68 ab	4,41 cd	146,11 bcd	4,64 bcd	1,55 de
t ₂₉₋₃₀	5,50 c	10,82 ab	1,54 bc	0,01 e	114,69 de	5,27 bc	6,92 b
t ₅₀₋₆₃	6,07 abc	10,63 ab	1,34 de	4,17 d	113,27 de	2,98 bcd	3,86 cd
t ₇₈₋₉₁	6,69 a	9,93 b	1,45 cd	0,01 e	182,57 a	6,01 ab	4,18 c
t ₁₀₇₋₁₂₀	5,88 bc	9,93 b	1,38 cde	0,01 e	172,52 ab	2,63 bcd	4,21 c
t ₁₄₁₋₁₅₄	5,95 bc	10,79 ab	1,21 e	4,94 c	106,21 e	2,88 bcd	3,52 cd
t ₁₆₂₋₁₇₅	6,30 ab	11,48 a	1,29 de	5,73 b	158,23 abc	2,40 cd	20,49 a
t ₂₁₂₋₂₂₅	6,18 abc	10,49 ab	1,32 de	5,99 b	139,38 cd	8,87 a	3,97 c

Nota - Foram comparadas a médias para diferentes tempos de conservação. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (n=20 peras).

Tabela 14 - Valores de F e de R² calculados para o ajustamento linear das médias de cada um dos parâmetros, com 'Data'=0 e 'Pomar' = 'Bom' (n=180)

	Firmeza	Brix	AT	Vitamina C	Fenóis	PPO	ADH
F de significância (n = 180)	0,12	0,51	0,00	0,76	0,97	0,51	0,17
R ² regressão (n = 180)	0,31	0,06	0,77	0,01	0,00	0,07	0,25

As tabelas 13 e 14 revelam que nenhum dos parâmetros evolui de forma consistente e que o modelo linear não é aplicável, excepto para a AT. As oscilações registadas devem-se novamente à variabilidade interna das amostras. A firmeza em média aumentou, o que vai contra o esperado, mas isto deve-se à baixa atividade das peras durante o armazenamento e à variabilidade interna das amostras. O facto de as peras terem tão baixa atividade durante o armazenamento reflete a qualidade do mesmo.

8.2.1.4. Pomar de Mafra ('Data'=0)

Por último, foi estudado o pomar de Mafra ao longo do tempo de conservação. Foram igualmente utilizados dados apenas da 'Data' zero, testes de Tukey ($\alpha=0,05$) e regressões lineares, obtendo-se os resultados apresentados nas tabelas 15 e 16.

Tabela 15 – Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre o tipo de conservação e os restantes parâmetros analisados, para ‘Data’=0 e ‘Pomar’ = Ma (n=20)

Cons (dias)	Firmeza		Brix		AT		Vitamina C		Fenóis		PPO		ADH	
t ₀	4,04	c	11,95	ab	1,32	a	5,32	b	118,43	cd	2,66	a	1,24	de
t ₁₅₋₁₆	5,11	a	12,33	a	1,26	ab	5,41	b	165,34	b	1,41	ab	3,50	b
t ₂₉₋₃₀	4,65	abc	11,32	b	1,05	cd	7,57	a	119,60	cd	1,80	a	0,72	e
t ₅₀₋₆₃	4,21	bc	12,05	ab	1,09	bc	3,37	c	116,16	d	1,58	ab	1,29	de
t ₇₈₋₉₁	4,70	abc	12,04	ab	0,91	de	0,01	d	146,66	bc	2,43	a	3,01	bc
t ₁₀₇₋₁₂₀	4,55	abc	12,16	ab	1,23	ab	0,00	d	234,83	a	0,34	b	1,93	d
t ₁₄₁₋₁₅₄	4,91	ab	11,76	ab	0,87	e	5,53	b	171,05	b	2,08	a	2,95	bc
t ₁₆₂₋₁₇₅	4,56	abc	12,20	a	0,97	cde	0,00	d	128,66	cd	2,42	a	2,11	cd
t ₂₁₂₋₂₂₅	4,54	abc	12,31	a	0,90	de	4,90	b	167,31	b	1,60	ab	5,33	a

Nota - Foram comparadas as médias para diferentes tempos de conservação. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (n=20 peras).

Tabela 16 - Valores de F e de R² calculados para o ajustamento linear das médias de cada um dos parâmetros, com ‘Data’=0 e ‘Pomar’ = ‘Ma’ (n=180)

	Firmeza	Brix	AT	Vitamina C	Fenóis	PPO	ADH
F de significância (n = 180)	0,64	0,43	0,03	0,25	0,31	0,81	0,14
R ² regressão (n = 180)	0,03	0,09	0,53	0,18	0,15	0,01	0,28

Os resultados obtidos para Mafra são em tudo semelhantes aos dos pomares anteriormente estudados e aos três pomares analisados conjuntamente. O facto de a conservação explicar tão parcamente a evolução dos parâmetros de qualidade e bioquímicos ao longo do tempo permite concluir que esta foi bem feita e que a evolução está muito mais dependente de outros fatores, que poderão ser a ‘Data’, por exemplo, traduzindo o tempo de prateleira.

8.2.1.5. Conjunto dos três pomares (Bombarral, Mafra e Zambujeira) para ‘Data’=7

Com vista a compreender a importância do fator ‘Data’ para a evolução da qualidade da pera foi novamente estudada a evolução dos parâmetros de qualidade e bioquímicos em relação à duração do período de conservação (‘Cons’), mas desta vez para ‘Data’=7, ou seja, utilizando peras com uma semana de prateleira a T~20°C. Esta análise foi feita primeiro para o conjunto dos três pomares e depois para cada pomar individualmente, sendo utilizados testes de Tukey ($\alpha=0,05$) para comparar a evolução das médias de cada parâmetro ao longo do tempo. Os resultados apresentam-se nas tabelas 17 e 18 e figura 23.

Tabela 17 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre o tipo de conservação e os restantes parâmetros analisados, para 'Data'=7 e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' conjuntamente (n=20)

Cons (dias)	Firmeza	Brix	AT	Vitamina C	Fenóis	PPO	ADH
t ₀	2,08 b	12,47 ab	1,16 b	4,11 e	140,19 bc	3,43 cde	0,84 d
t ₁₅₋₁₆	4,16 a	12,35 ab	1,44 a	4,34 e	172,71 a	2,43 e	3,35 bcd
t ₂₉₋₃₀	3,85 a	11,79 b	1,37 ab	5,96 ab	174,68 a	3,16 de	11,08 a
t ₅₀₋₆₃	1,58 bc	12,15 ab	1,42 a	6,14 a	139,29 c	6,52 ab	4,32 bc
t ₇₈₋₉₁	0,81 d	12,48 a	1,43 a	5,60 abc	127,93 c	7,67 a	1,27 d
t ₁₀₇₋₁₂₀	0,84 d	12,58 a	1,45 a	4,93 cde	134,39 c	6,63 ab	2,32 cd
t ₁₄₁₋₁₅₄	0,90 cd	12,18 ab	1,32 ab	5,31 bcd	126,17 c	5,22 bc	2,85 bcd
t ₁₆₂₋₁₇₅	0,62 d	12,60 a	1,37 ab	5,13 cd	146,71 bc	4,26 cd	4,63 b
t ₂₁₂₋₂₂₅	0,68 d	12,40 ab	1,32 ab	4,66 de	165,72 ab	7,46 a	3,57 bc

Nota - Foram comparadas a médias para diferentes tempos de conservação. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (n=20 peras).

Tabela 18 - Valores de F e de R² calculados para o ajustamento linear das médias de cada um dos parâmetros, com 'Data'=7 e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' conjuntamente (n=498)

	Firmeza	Brix	AT	Vitamina C	Fenóis	PPO	ADH
F de significância (n = 498)	0,01	0,36	0,70	0,81	0,51	0,11	0,78
R ² regressão (n = 498)	0,61	0,12	0,02	0,01	0,06	0,32	0,01

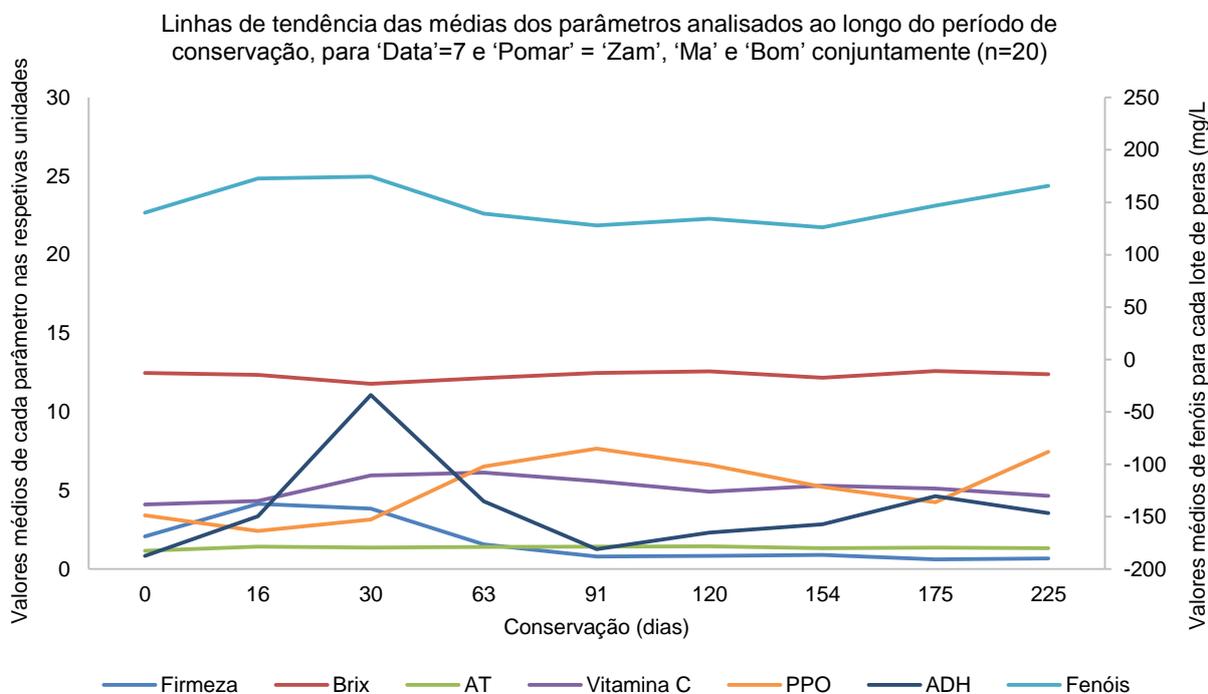


Figura 23 - Linhas de tendência das médias dos parâmetros analisados ao longo do período de conservação, para 'Data'=0 e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' conjuntamente. Todos os parâmetros devem ser analisados em função do eixo principal (da esquerda), exceto os fenóis, que devem ser analisados a partir do eixo secundário.

Através das tabelas 17 e 18 e figura 23, pode verificar-se que as peras evoluem muito claramente após uma semana fora da câmara à temperatura ambiente, mostrando-se uma grande diferença em relação à saída da câmara. A evolução da PPO, vitamina C e firmeza mostrou ser muito mais forte para a 'Data' 7 do que para a 'Data' 0, fruto de uma semana de atividade metabólica normal dos frutos. Isto demonstra, mais uma vez, que a conservação funcionou bem, porque durante o período em câmara a atividade metabólica era quase nula mas ao regressar à temperatura e condições normais atmosféricas, houve um aumento muito significativo do dinamismo celular. Eventualmente, isto irá notar-se na análise do fator 'Data', podendo eventualmente validar-se estatisticamente esta afirmação.

A tabela 18 mostra-nos que o modelo linear apenas se pode aplicar para a firmeza. Este modelo explica cerca de 61% da variabilidade das observações da firmeza dos frutos ao longo do tempo. Como se pode observar na figura 23, há uma redução forte das firmezas observadas aproximadamente a partir dos 30 dias em câmara, mas a redução da firmeza é sempre consistente, tal como seria de esperar, porque começa a haver a degradação das paredes celulares (Fischer e Bennett, 1991). Os restantes parâmetros não podem ser linearizados, mas podem analisar-se as linhas de tendência traçadas a partir das médias de cada ensaio. O Brix mantém-se praticamente constante. Deveria aumentar, mas tal não acontece de forma significativa provavelmente devido à variabilidade amostral ($n_{\text{ensaio}} = 20$, apenas). O mesmo acontece para a AT, varia muito pouco e de forma pouco consistente ($R^2=0,02$), contrariamente ao que aconteceu no mesmo estudo para 'Data'=0. A vitamina C também se mantém relativamente estável, apesar de na figura 23 ser possível distinguir dois momentos distintos: dos 0 aos 30 dias de conservação em que ocorre um aumento mais forte, e dos 30 dias até ao final, em que parece haver uma estagnação e decréscimo da vitamina com o tempo. Os fenóis diminuem claramente, como se pode ver na linha de tendência, mas essa redução não é linearizável ($F \ll 0,05$ e $R^2 = 0,06$), porque também parece haver uma acentuação da perda de fenóis a partir dos 30 dias, aproximadamente. A PPO aumenta, mas com muitas oscilações, e a ADH mantém-se muito estável. Contudo, ambos os parâmetros oscilam, não sendo novamente possível linearizar a sua evolução. A estabilidade da ADH é o desejável, pois significa que não ocorreram fenómenos de fermentação dentro dos frutos. Relativamente à PPO, o seu aumento pode dever-se principalmente à perda de integridade das membranas, e a sua diminuição à sua utilização nos processos de oxidação-redução que conduzem ao acastanhamento interno (de Deuchande, 2016). Contudo, isto é apenas uma possibilidade. Estas oscilações podem dever-se igualmente à variabilidade amostral.

De seguida apresenta-se o mesmo estudo, feito pomar-a-pomar. Uma vez que todos os pomares se comportam de forma semelhante, far-se-á apenas um comentário geral sobre os três no final da apresentação de todos os gráficos.

8.2.1.6. Pomar da Zambujeira ('Data'=7)

Tabela 19 – Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre o tipo de conservação e os restantes parâmetros, para 'Data'=7 e 'Pomar' = Zam (n=20)

Cons (dias)	Firmeza		Brix		AT		Vitamina C		Fenóis		PPO		ADH	
t ₀														
t ₁₅₋₁₆	5,11	a	12,32	bc	1,62	ab	4,00	c	186,81	ab	0,41	d	2,69	b
t ₂₉₋₃₀	4,47	a	12,43	bc	1,58	ab	8,06	a	210,87	a	0,66	d	12,63	a
t ₅₀₋₆₃	3,09	b	12,95	ab	1,73	a	7,84	a	183,42	ab	1,40	cd	2,98	b
t ₇₈₋₉₁	0,91	c	13,19	a	1,67	ab	4,36	c	157,28	b	4,10	ab	0,54	c
t ₁₀₇₋₁₂₀	0,84	c	12,17	c	1,58	ab	5,61	b	151,82	b	5,08	a	2,49	b
t ₁₄₁₋₁₅₄	0,99	c	12,62	abc	1,54	ab	6,04	b	158,88	b	2,74	bc	3,12	b
t ₁₆₂₋₁₇₅	0,96	c	12,86	ab	1,46	b	5,80	b	152,92	b	3,00	b	2,15	b
t ₂₁₂₋₂₂₅	0,78	c	13,18	a	1,45	b	4,10	c	161,00	b	4,03	ab	3,17	b

8.2.1.7. Pomar de Bombarral ('Data'=7)

Tabela 20 – Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre o tipo de conservação e os restantes parâmetros, para 'Data'=7 e 'Pomar' = Bom (n=20)

Cons (dias)	Firmeza		Brix		AT		Vitamina C		Fenóis		PPO		ADH	
t ₀														
t ₁₅₋₁₆	5,29	b	11,68	bc	1,53	ab	4,07	e	160,72	ab	4,17	c	3,21	bcd
t ₂₉₋₃₀	5,86	a	11,01	c	1,43	ab	5,79	ab	185,74	a	4,55	c	4,58	bcd
t ₅₀₋₆₃	0,61	cd	11,13	c	1,43	ab	5,09	bcd	118,05	c	8,76	ab	6,30	ab
t ₇₈₋₉₁	0,73	cd	11,52	bc	1,52	ab	6,29	a	96,46	c	11,41	a	2,49	cd
t ₁₀₇₋₁₂₀	0,82	cd	12,62	a	1,60	a	3,29	f	111,45	c	7,65	b	2,07	d
t ₁₄₁₋₁₅₄	0,88	c	11,63	bc	1,25	c	4,35	de	149,50	b	6,26	bc	2,72	bcd
t ₁₆₂₋₁₇₅	0,26	d	11,99	ab	1,57	ab	4,78	cde	168,91	ab	5,97	bc	9,89	a
t ₂₁₂₋₂₂₅	0,57	cd	11,31	bc	1,42	bc	5,27	bc	166,26	ab	11,10	a	5,91	bc

8.2.1.8. Pomar de Mafra ('Data'=7)

Tabela 21 – Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre o tipo de conservação e os restantes parâmetros analisados, para 'Data'=7 e 'Pomar' = Ma (n=20)

Cons (dias)	Firmeza		Brix		AT		Vitamina C		Fenóis		PPO		ADH	
t ₀														
t ₁₅₋₁₆	2,08	a	12,47	ab	1,16	a	4,11	de	140,19	b	3,43	c	0,84	bc
t ₂₉₋₃₀	2,09	a	13,07	a	1,18	a	4,95	bc	170,60	a	2,71	c	4,15	b
t ₅₀₋₆₃	1,21	ab	11,94	b	1,11	a	4,04	e	127,43	bc	4,25	c	16,05	a
t ₇₈₋₉₁	1,03	ab	12,37	ab	1,12	a	5,49	ab	116,41	c	9,39	a	3,68	bc
t ₁₀₇₋₁₂₀	0,78	b	12,73	a	1,10	a	6,14	a	130,05	bc	7,49	ab	0,76	c
t ₁₄₁₋₁₅₄	0,86	b	12,95	a	1,17	a	5,89	a	139,90	b	7,15	b	2,42	bc
t ₁₆₂₋₁₇₅	0,83	b	12,30	ab	1,16	a	5,55	ab	70,12	d	6,65	b	2,70	bc
t ₂₁₂₋₂₂₅	0,63	b	12,92	a	1,09	a	4,79	cd	119,40	bc	3,90	c	2,11	bc
t ₂₁₂₋₂₂₅	0,70	b	12,73	a	1,10	a	4,61	cde	169,90	a	7,24	b	1,65	bc

Para os três casos, foram comparadas as médias ao longo do tempo de 'Conservação'. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (n=20 peras).

As análises dos valores de F e R^2 foram realizadas (ver tabelas 37 a 39 do anexo III). Nenhum dos valores de R^2 foi igual ou superior a 80%, pelo que se concluiu que não se pode ajustar o modelo linear com sucesso a nenhum dos parâmetros, de nenhum dos pomares, para a análise da 'Conservação', quando 'Data' = 7.

Através da análise das tabelas 19 a 21, verificou-se que em todos os pomares a firmeza diminuiu com o tempo, o que seria de esperar. O Brix teve uma evolução menos homogénea entre os pomares, oscilando bastante nos pomares de Mafra e Bombarral, sem nenhuma tendência consistente excepto no pomar da Zambujeira, em que sobe ligeiramente. Contudo, em nenhum dos casos se pode aplicar o modelo linear com sucesso.

A AT teve um desenvolvimento diferente em cada pomar. No caso da Zambujeira, decresceu com o tempo e apresentou um R^2 de cerca de 0,54, o que demonstra que há realmente uma tendência decrescente significativa. No caso do Bombarral, oscilou muito, sem apresentar qualquer tendência. Por último, no pomar de Mafra, a AT manteve-se completamente estagnada, não havendo quaisquer diferenças significativas entre períodos de conservação.

A vitamina C oscilou muito em todos os pomares, não apresentando nenhuma tendência consistente. Este parâmetro deveria diminuir ao longo do tempo (Veltman *et al.*, 1999b e Zerbini *et al.*, 2002), contudo essa redução não foi visível em nenhum dos pomares. Este facto pode estar relacionado com erros laboratoriais associados à subjetividade do método de determinação do teor de vitamina C (método colorimétrico), à variabilidade interna das amostras ou a outro facto que promova a não degradação da vitamina C nas células dos frutos. Para evitar a subjetividade inerente a este método colorimétrico, deveria ter-se escolhido uma banda cor-de-rosa que servisse de comparação entre as amostras para diferentes dias.

Relativamente aos fenóis, registaram-se muitas oscilações nos pomares do Bombarral e Mafra, não sendo possível aplicar o modelo linear. Pelo contrário, para o pomar da Zambujeira, os fenóis diminuíram consistentemente ao longo do tempo, e o modelo linear aplicado explica cerca de 64% da variabilidade deste parâmetro. Isto é natural, dado que com a degradação das membranas os fenóis saem dos vacúolos e vão sendo utilizados ou degradados (Nicolas *et al.*, 1994).

A enzima PPO aumenta, tal como esperado, nos pomares da Zambujeira e Bombarral. O pomar de Mafra apresenta muitas oscilações, mas parece haver também uma ligeira tendência crescente. A ADH oscilou muito ao longo do tempo, não sendo aplicável o modelo linear em nenhum dos casos. Contudo, ocorreram dois picos curiosos: um para o período t_{15-16} dias no pomar da Zambujeira, e outro para o período t_{29-30} dias, no pomar de Mafra. Estes picos foram muito elevados e não parece haver nenhuma explicação clara para os mesmos, estando estes provavelmente associados a algum erro laboratorial ou à variabilidade das amostras.

Concluindo, relativamente ao factor 'Conservação' no geral, pode dizer-se que este não teve um impacto muito relevante na evolução dos parâmetros de qualidade e bioquímicos das peras. Neste sentido, a conservação foi bem feita, uma vez que peras com diferentes períodos de conservação

apresentaram parâmetros muito semelhantes. Durante a conservação a atividade metabólica das peras estava praticamente reduzida a zero, que é o que se pretende da conservação.

8.2.2. Data

De seguida, foi feito o mesmo estudo em relação à duração do período prateleira ('Data'). Esta análise foi sempre feita para todas as conservações em conjunto, uma vez que se viu anteriormente que o factor conservação não teve um grande impacto da evolução dos parâmetros de qualidade e bioquímicos das peras. Primeiro foi feita a análise com todos os pomares juntos. Os resultados apresentam-se na tabela 22.

8.2.2.1. Análise para o conjunto dos três pomares

Tabela 22 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre a duração do tempo de prateleira e os restantes parâmetros analisados (n=519)

Data	Firmeza	Brix	AT	VitC	Fenóis	PPO	ADH
0	5,23 a	11,60 b	1,34 b	3,86 b	163,53 a	2,13 b	3,57 a
7	1,70 b	12,32 a	1,38 a	5,22 a	148,14 b	5,34 a	4,05 a

Nota - Foram comparadas as médias para diferentes tempos de conservação. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (n=519 peras).

Através da análise da tabela 22, pode-se concluir que o fator 'Data', ou seja, o tempo de prateleira à temperatura ambiente, tem um forte impacto na evolução dos parâmetros de qualidade e bioquímicos das peras.

A Firmeza diminuiu drasticamente, como seria de esperar. Também Pereira (2017) concluiu que a firmeza diminuía significativamente com o aumento do tempo de prateleira. O Brix aumentou, como também seria de prever. A AT aumentou marginalmente, mas de forma significativa. Pereira (2017) concluiu que TSS e AT médios não se alteravam significativamente com o tempo de prateleira.

A vitamina C aumentou, o que não deveria acontecer, porque está comprovado que esta vitamina se degrada com o tempo, a partir do momento em que os frutos são colhidos da árvore (Deuchande, 2016). Contudo, sabe-se também que antes de ocorrer o acastanhamento interno, a quantidade de vitamina C presente nos frutos pode aumentar ligeiramente, numa tentativa do fruto de balancear as reações de oxidação-redução (Frankk C, *et al*, 2003). Os mesmos autores referem que, no entanto, a vitamina C tende a diminuir ao longo do tempo, o que não está de acordo com os dados obtidos neste estudo (tabela 22). Esta diferença pode dever-se ao facto de a análise da vitamina C utilizada neste estudo ser uma análise colorimétrica, e portanto muito subjetiva. Os fenóis diminuíram, possivelmente porque foram sendo consumidos nos fenómenos de oxidação responsáveis pelo acastanhamento interno, entre outros (Deuchande, 2016). Por último, a atividade da enzima PPO aumentou de forma significativa, novamente devido à maior atividade das peras na 'Data' 7 do que na 'Data' 0, mas provavelmente também devido aos fenómenos de oxidação. A ADH manteve-se

significativamente igual entre as duas datas, o que vai se encontro ao esperado, pois não devem ocorrer fenómenos de fermentação durante a conservação em câmara, nem no exterior (condições de aerobiose).

Pomar da Zambujeira

Seguidamente, foi feita a mesma análise para cada pomar individualmente. Os resultados apresentam-se nas tabelas 23 a 25. Será feito um comentário geral sobre cada pomar apenas no final da exposição das três tabelas.

O primeiro pomar estudado foi o da Zambujeira.

Tabela 23 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre a duração do tempo de prateleira e os restantes parâmetros analisados (n=340)

Data	Firmeza	Brix	AT	VitC	Fenóis	PPO	ADH
0	5,12 a	12,03 b	1,50 b	4,41 b	194,45 a	0,44 b	2,75 b
7	2,14 b	12,71 a	1,58 a	5,73 a	170,37 b	2,68 a	3,72 a

Nota - Foram comparadas a médias para diferentes tempos de conservação. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (n=340 peras).

Pomar do Bombarral

Tabela 24 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre a duração do tempo de prateleira e os restantes parâmetros analisados (n=339)

Data	Firmeza	Brix	AT	VitC	Fenóis	PPO	ADH
0	6,00 a	10,75 b	1,44 a	3,60 b	144,12 a	4,14 b	5,52 a
7	1,89 b	11,61 a	1,47 a	4,87 a	144,48 a	7,49 a	4,61 a

Nota - Foram comparadas a médias para diferentes tempos de conservação. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (n=339 peras).

Pomar de Mafra

Tabela 25 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre a duração do tempo de prateleira e os restantes parâmetros analisados (n=359)

Data	Firmeza	Brix	AT	VitC	Fenóis	PPO	ADH
0	4,59 a	12,01 b	1,07 b	3,57 b	152,00 a	1,81 b	2,45 b
7	1,13 b	12,61 a	1,13 a	5,07 a	131,51 b	5,82 a	3,83 a

Nota - Foram comparadas a médias para diferentes tempos de conservação. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (n=359 peras).

A partir destas três tabelas podem retirar-se algumas ilações. Em primeiro lugar, a firmeza decresce em todos os casos de forma semelhante e o Brix aumenta ligeiramente também em todos os pomares. A AT aumenta em todos os casos, contrariamente ao que seria teoricamente esperado dado o aumento da taxa respiratória que ocorre com o aumento da temperatura. Contudo este aumento é muito ligeiro. Relativamente à vitamina C, registou-se um aumento muito semelhante em todos os pomares. Isto vai contra aquilo que seria de esperar teoricamente, mas é provavelmente uma resposta ao facto de haver mais atividade da parte da pera e eventualmente em resposta a fenómenos de oxidação no interior dos frutos (Frankk C, *et al*, 2003). Os fenóis mantêm-se muito estáveis, com uma diminuição muito ligeira nos pomares da Zambujeira e Mafra. Não diminuem no pomar do Bombarral. É também de notar o facto de o pomar de Mafra ser aquele que atinge valores mais baixos de fenóis e o da Zambujeira ser aquele que apresenta valores mais elevados, para o mesmo parâmetro. A PPO aumentou bastante porque aumentou a atividade metabólica. Todavia, nos pomares do Bombarral e Mafra este aumento foi mais pronunciado, provavelmente devido ao facto deste dois pomares serem os que apresentaram (de longe) mais ocorrências de acastanhamento interno, como se irá ver adiante. A ADH deveria manter-se inalterada, mas aumentou ligeiramente na Zambujeira e Mafra, diminuindo no Bombarral.

De seguida apresentam-se três estudos sobre as interações entre os fatores analisados. O primeiro será sobre a interação 'Conservação' - 'Data', o segundo sobre 'Conservação'-'Pomar', e o terceiro sobre a interação 'Data'-'Pomar'.

8.3. Efeitos conjugados (dois a dois) da ‘Conservação’, ‘Data’ e ‘Pomar’ sobre os parâmetros analisados

8.3.1. Interação ‘Conservação’ versus ‘Data’

De seguida, apresenta-se o estudo da evolução dos parâmetros de qualidade e bioquímicos, feito com base na interação entre os fatores ‘Conservação’ e ‘Data’. Para tal, foram utilizados dados de todas as Conservações (dos 0 aos 225 dias), de ambas as datas (0 e 7) e de todos os pomares (Bombarral, Mafra e Zambujeira). Os pomares foram analisados conjuntamente. Os resultados apresentam-se na tabela 26 e figura 24.

Tabela 26 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre a interação tipo de conservação versus data e os restantes parâmetros analisados, para ‘Data’=(0,7) ‘Cons’=]0,225[e ‘Pomar’ = ‘Zam’, ‘Ma’ e ‘Bom’ conjuntamente (n=60)

		Cons (dias)	Firmeza	Brix	AT	VitC	Fenóis	PPO	ADH						
Data = 0	t ₀	4,83	bc	11,75	cdefg	1,62	a	5,62	abc	150,56	cdefgh	1,46	f	1,10	h
	t ₁₅₋₁₆	5,20	ab	12,05	abcde	1,57	ab	4,33	def	168,48	bcde	2,29	ef	1,81	fgh
	t ₂₉₋₃₀	5,12	ab	11,48	defg	1,41	bc	4,10	f	140,40	fgh	2,45	def	4,02	cdef
	t ₅₀₋₆₃	5,18	ab	11,57	cdefg	1,33	cd	4,22	ef	132,46	h	1,72	ef	2,07	efgh
	t ₇₈₋₉₁	5,57	a	11,39	efg	1,29	cde	1,28	g	182,57	ab	2,99	def	3,05	cdefgh
	t ₁₀₇₋₁₂₀	5,24	ab	11,20	g	1,34	cd	0,01	h	203,90	a	1,14	f	4,73	c
	t ₁₄₁₋₁₅₄	5,38	ab	11,36	fg	1,12	e	5,18	abcde	142,67	efgh	1,84	ef	2,79	cdefgh
	t ₁₆₂₋₁₇₅	5,39	ab	11,91	bcdef	1,19	de	4,28	ef	161,68	bcdefg	1,74	ef	8,50	b
	t ₂₁₂₋₂₂₅	5,20	ab	11,65	cdefg	1,16	de	5,71	ab	189,03	ab	3,57	cde	4,07	cdef
Data = 7	t ₀	2,08	e	12,47	abc	1,16	de	4,11	ef	140,19	fgh	3,43	cdef	0,84	h
	t ₁₅₋₁₆	4,16	cd	12,35	abc	1,44	abc	4,34	def	172,71	bcd	2,43	def	3,35	cdefgh
	t ₂₉₋₃₀	3,85	d	11,79	cdefg	1,37	c	5,96	a	174,68	bc	3,16	def	11,08	a
	t ₅₀₋₆₃	1,58	ef	12,15	abcd	1,42	bc	6,14	a	139,29	fgh	6,52	ab	4,32	cde
	t ₇₈₋₉₁	0,81	g	12,48	ab	1,43	bc	5,60	abc	127,93	h	7,67	a	1,27	gh
	t ₁₀₇₋₁₂₀	0,84	g	12,58	ab	1,45	abc	4,93	bcdef	134,39	gh	6,63	ab	2,32	defgh
	t ₁₄₁₋₁₅₄	0,90	fg	12,18	abc	1,32	cd	5,31	abcd	126,17	h	5,22	bc	2,85	cdefgh
	t ₁₆₂₋₁₇₅	0,62	g	12,60	a	1,37	c	5,13	abcde	146,71	defgh	4,26	cd	4,63	cd
	t ₂₁₂₋₂₂₅	0,68	g	12,40	abc	1,32	cd	4,66	cdef	165,72	bcdef	7,46	a	3,57	cdefg

Nota - Foram comparadas as médias para diferentes tempos de conservação. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (n=60 peras).

De seguida, traçaram-se as linhas de tendência para cada um dos parâmetros, em função da 'Conservação' e com 'Data'= 0 (azul) e 7 (vermelho). Os resultados apresentam-se abaixo.

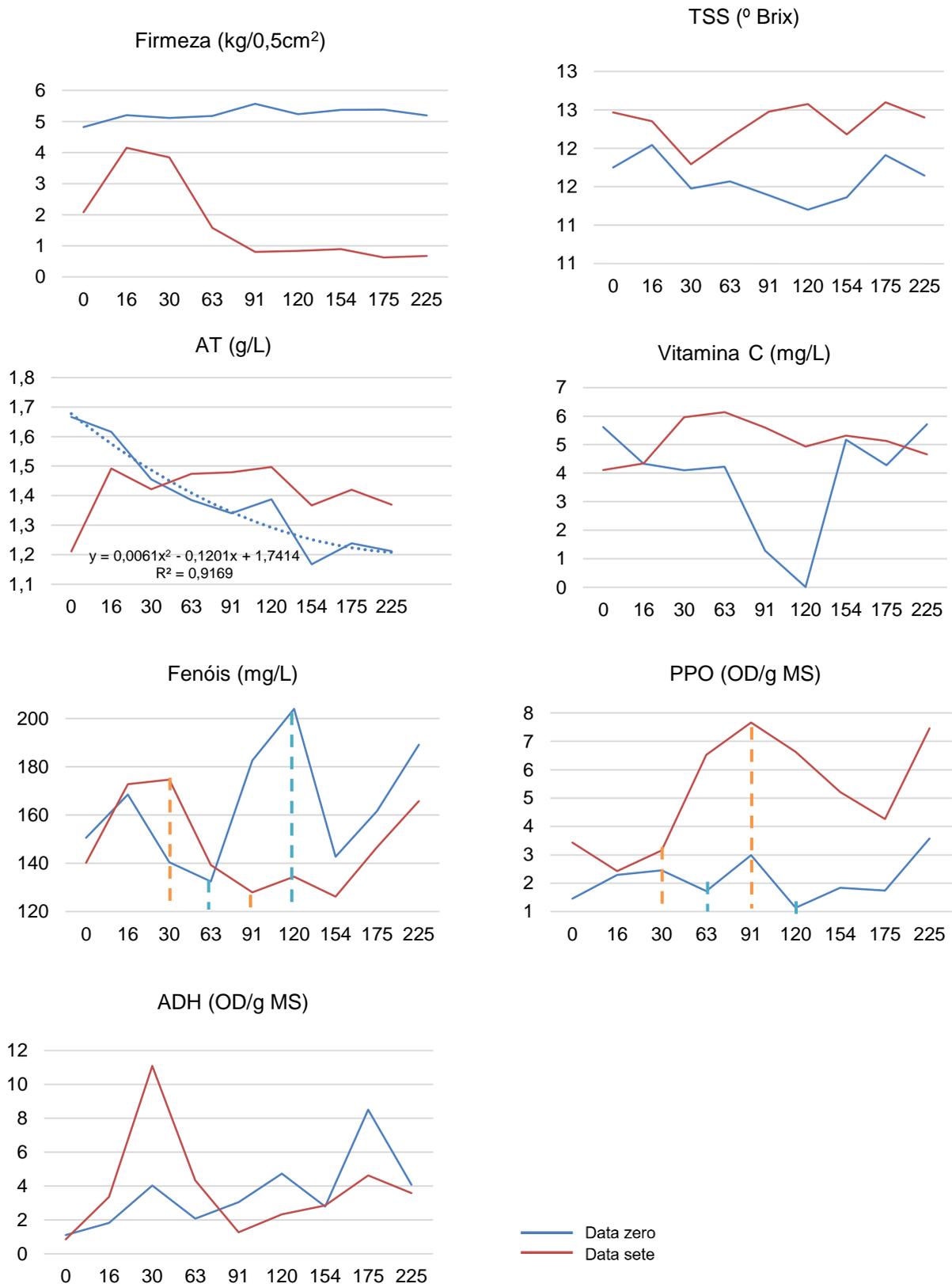


Figura 24 – Gráficos das linhas de tendência das médias dos parâmetros analisados ao longo do período de conservação, com base na interação entre 'Data' e 'Conservação', para 'Data'=(0,7), 'Cons'=[0,225[e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' conjuntamente (n=60).

Relativamente à figura 24, podem salientar-se alguns aspetos. A firmeza mantém-se relativamente estável para a 'Data' 0, mas para a 'Data' 7 diminui de forma drástica sensivelmente a partir dos 30 dias de conservação. O Brix mantém-se muito estável para ambas as datas, aumentando muito ligeiramente, o que está de acordo com as tabelas 22 a 25 (sobre 'Data').

A AT oscila um pouco na 'Data' 0, mas vai diminuindo residualmente. Não se compreende porque é que a AT aumenta entre os 0 e os 16 dias, para 7 dias de prateleira. Este resultado pode estar relacionado com o facto de no início do trabalho laboratorial a aluna não estar habituado a fazer as titulações, e poderem ter ocorrido erros laboratoriais. Verifica-se que é vantajoso trabalhar os dados em função da interação entre dois fatores, porque deste modo é possível ver como a AT diminui ao longo do tempo, e quando se fez a análise só em função de 'Data' a AT parecia aumentar [tabelas 22 a 25 (sobre 'Data')].

A vitamina C oscila de forma muito irregular. Não é possível através dos valores obtidos afirmar que existe uma tendência crescente ou decrescente significativa da vitamina C ao longo do tempo de conservação, mas pode afirmar-se que para a 'Data' 0 a vitamina C parece diminuir até aos 120 dias e depois aumenta a partir daí, sempre com algumas oscilações; e que para a 'Data' 7 a vitamina C aumenta até aos 63 dias aproximadamente, e a partir desse ponto começa a decrescer, com tendência a estabilizar. Os dados relativos aos 91 e 120 dias de conservação (para 'Data'=0) devem ser olhados com um espírito crítico, uma vez que a vitamina C não deveria decrescer tanto. Este decréscimo pode estar associado a uma solução de DCPIP mais concentrada utilizada para estas remessas ou ao facto de este ser um teste colorimétrico, e por isso, muito subjetivo e dependente da sensibilidade do operador. Comparando os resultados obtidos neste estudo com os obtidos por Deuchande (2016), verifica-se que a vitamina C evoluiu de forma diferente, porque no referido estudo, esta vitamina decresce sempre, havendo um decréscimo mais acentuado a partir dos 45 dias de 'Conservação'. Este facto corrobora a explicação dada acima acerca da possibilidade de ocorrência de erros laboratoriais associados à subjetividade do método de determinação da vitamina C.

Os fenóis oscilam de forma bastante irregular, mas parece haver um padrão aparte da variabilidade interna de cada amostra que se reproduziu: há algum mimetismo entre as 'Datas' 0 e 7 e verifica-se um aumento muito interessante entre os 91 e os 120 dias. Em ambos os casos os fenóis aumentam aproximadamente até aos 16 dias, depois decrescem até aos 63 dias, para depois aumentarem (ligeiramente no caso da 'Data' 7 e fortemente para a 'Data' 0) até aos 120 dias, diminuirão até aos 154 dias e aumentarem até ao último período medido, os 225 dias. Deuchande (2016) realizou um estudo muito semelhante e obteve resultados muito semelhantes aos apresentados neste trabalho. Como se pode verificar na figura 24, no gráfico da esquerda, também aqui os fenóis diminuem entre os 0 e os 40 dias (esta é uma comparação apenas entre 'Data' = 0, porque Deuchande (2016) não estudou o comportamento dos fenóis para 'Data' = 7), apresentam um pico perto dos 120 dias e decrescem dos 120 dias até aos 160 dias (a escala é diferente, mas neste estudo também ocorre este decréscimo entre os 120 e 160 dias). O decréscimo inicial dos fenóis pode estar associado à utilização destes como substrato de oxidação para a PPO (Veltman et al., 1999a) e o posterior aumento, pode eventualmente relacionar-se com a reciclagem de vitamina C. O subsequente aumento da

vitamina C irá depois permitir a proteção dos fenóis, contribuindo para o seu aumento. Esta teoria não foi comprovada por nenhum estudo científico, mas é uma hipótese possível.

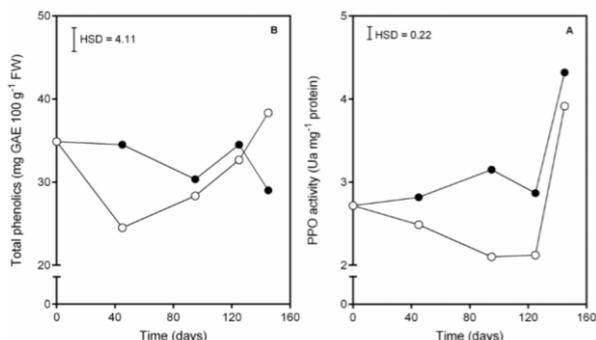


Figura 25 – Gráficos relativos à evolução do teor de fenóis totais (esquerda) e da enzima PPO (direita) ao longo do tempo de ‘Conservação’. Estes gráficos foram retirados do estudo de Deuchande (2016), com vista a comparar os resultados obtidos nesta tese com resultados de outro autor. Os pontos preenchidos a negro são os únicos que interessam como termo de comparação, porque são os que se referem ao estudo feito nas mesmas condições que este (ACD). Este estudo refere-se apenas à ‘Data’ 0. Fonte: Deuchande (2016).

A atividade da enzima PPO oscila bastante, dentro de valores elevados, para a ‘Data’ 7 e oscila dentro de valores mais baixos para a ‘Data’ 0. O aumento muito significativo desta enzima entre ‘Datas’ deve-se ao aumento da atividade das peras após a saída da câmara. É de notar o paralelo que existe novamente entre a evolução da atividade da PPO ao longo do tempo neste estudo e no de Deuchande (2016). Em ambos os casos (comparando sempre apenas ‘Data’ = 0), existe um pico para os 90 dias aproximadamente, um decréscimo até aos 120 dias e um aumento contínuo a partir desse ponto (ver figuras 22 e 23). Pode observar-se igualmente, com o auxílio dos tracejados a azul claro e laranja da figura 22 nos gráficos dos fenóis e PPO, que quando a atividade da PPO aumenta, os fenóis diminuem, e vice-versa, para a ‘Data’=7. O mesmo não se verifica para ‘Data’=0 porque as peras tinham saído há muito pouco tempo da câmara, e provavelmente ainda não possuíam atividade suficiente para apresentar diferenças relevantes.

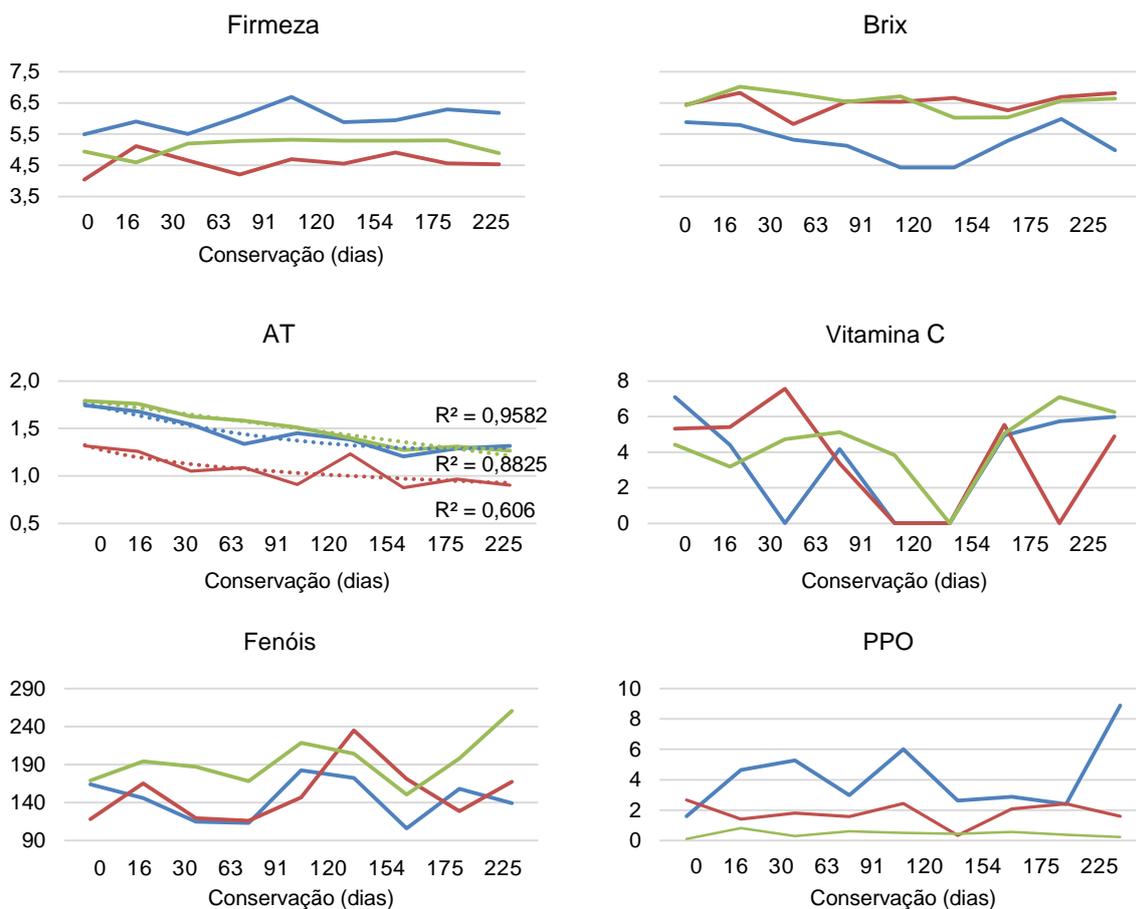
Por último, a enzima ADH, que deveria manter a sua atividade aproximadamente constante, oscila de forma significativa entre as ‘Datas’ e entre as ‘Conservações’. Contudo, estas variações são muito irregulares. Não é possível afirmar claramente que a atividade da ADH cresce ou decresce com o tempo; contudo, para ‘Data’= 0, a linha de tendência parece evidenciar um ligeiro aumento da ADH ao longo da ‘Conservação’. Como já foi referido, durante o armazenamento em ACD, a respiração deixa de ser aeróbia para ser predominantemente anaeróbia, devido à falta de oxigénio (Chervin *et al.*, 1996; Kimmerer e MacDonald, 1987). Com base neste facto, Deuchande *et al.* (2012) desenvolveu um estudo em pera ‘Rocha’ e ‘Blanquilla’ onde conclui que a fermentação (portanto, valores elevados de ADH) pode ser um factor subjacente ao acastanhamento interno. Esta relação é fruto dos metabolitos tóxicos que se formam durante a fermentação e cuja acumulação pode afetar a fluidez e difusividade dos gases no interior dos frutos, danificando assim as membranas (Chervin *et al.*, 1996; Kimmerer e MacDonald, 1987). O acastanhamento interno poderá ocorrer como consequência do contacto entre PPO e fenóis,

originado pela perda de integridade das membranas. No ponto 8.6. irá fazer-se um paralelo entre estes dados da ADH e as ocorrências de acastanhamento interno verificadas para cada pomar.

8.3.2. Interação ‘Conservação’ versus ‘Pomar’

Apresenta-se agora o estudo da evolução dos parâmetros de qualidade e bioquímicos feito com base na interação entre os fatores ‘Conservação’ e ‘Pomar’. Para tal, foram utilizados dados de todas as Conservações (dos 0 aos 225 dias), de todos os pomares (Bombarral, Maфра e Zambujeira), mas apenas da ‘Data’ 0. Utilizam-se dados apenas relativos à ‘Data’ 0 para se poder verificar quais são os pomares cujos frutos possuem maior qualidade à saída da câmara para tempos de ‘Conservação’ elevados. Os resultados apresentam-se nas tabelas 37 e 38 do anexo IV.

Com base nas tabelas 37 e 38, construiu-se a figura 26, que facilita a interpretação dos resultados.



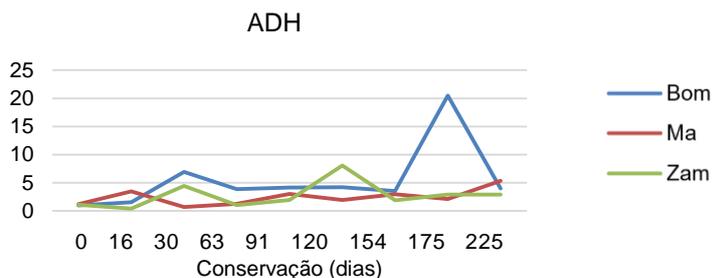


Figura 26 – Gráficos das médias dos parâmetros analisados ao longo do período de conservação, com base na interação entre ‘Pomar e ‘Conservação’, para ‘Data’=(0,7 conjuntamente), ‘Cons’=[0,225[e ‘Pomar’ = ‘Zam’, ‘Ma’ e ‘Bom’ (n=1038)

Este estudo permite saber quais os pomares que possuem os frutos que mantêm melhor qualidade ao longo do tempo de conservação. Em termos de firmeza, um dos parâmetros mais importantes para a manutenção da qualidade dos frutos, o pomar melhor para tempos de ‘Conservação’ prolongados é o da Zambujeira, e o pior é o de Mafra. Uma central fruteira pode, ao olhar para estes dados, decidir, por exemplo, vender primeiro todos os frutos do pomar de Mafra, depois os do Bombarral, e deixar para último os da Zambujeira.

Relativamente ao TSS, o pomar que sofreu um maior decréscimo com o tempo de ‘Conservação’ foi o pomar do Bombarral. Os dois restantes não apresentaram diferenças significativas.

O pomar que perdeu mais acidez com o decorrer do tempo foi o de Mafra. Estes dados são consistentes com o facto de este ter sido também o pomar que perdeu mais firmeza, apontando para que tenha sido aquele onde houve maior taxa de respiração, ou seja, aquele que mais degradação sofreu.

A vitamina C e a ADH não mostraram nenhum padrão de comportamento significativo. Pelo contrário, os fenóis e a PPO demonstraram. O pomar no qual os fenóis se mantiveram mais elevados foi o da Zambujeira, o que poderá relacionar-se com o facto de este ter sido um dos que apresentou menos acastanhamento interno (ver ponto 8.5.) e o pomar que manteve valores de PPO mais elevados foi o do Bombarral.

Por último, é de referir que foi possível ajustar um modelo para calcular a evolução da AT ao longo do tempo de ‘Conservação’, para ‘Data’=0 e para os pomares da Zambujeira ($R^2=96\%$) e do Bombarral ($R^2=88\%$). A equação relativa ao pomar da Zambujeira é: $[y = -0,0721x + 1,8623]$ e a do pomar do Bombarral é: $[y = 0,0101x^2 - 0,1589x + 1,915]$. Com estes modelos, é possível estimar qual a AT de uma pera de determinado pomar, após um dado período de ‘Conservação’ em câmara ACD.

8.3.3. Interação ‘Data’ versus ‘Pomar’

De seguida, apresenta-se o estudo da evolução dos parâmetros de qualidade e bioquímicos, com base na interação entre os fatores ‘Pomar e ‘Data’. Para tal, foram utilizados dados de todas as Conservações (dos 0 aos 225 dias), de ambas as datas (0 e 7 separadamente) e de todos os pomares (Bombarral, Mafra e Zambujeira). Os pomares foram analisados também separadamente. Os resultados apresentam-se na tabela 27 e figura 27.

Tabela 27 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre a interação pomar *versus* data e os restantes parâmetros analisados, para 'Data'=(0,7) conjuntamente, 'Cons'=[0,225] e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' conjuntamente (n=180)

	Pomar	Firmeza	Brix	AT	VitC	Fenóis	PPO	ADH
Data=0	Bom	6,00 a	10,75 d	1,44 b	3,60 d	144,12 cd	4,14 c	5,52 a
	Ma	4,59 c	12,01 b	1,07 c	3,57 d	152,00 c	1,81 d	2,45 d
	Zam	5,12 b	12,03 b	1,50 b	4,41 c	194,45 a	0,44 e	2,75 cd
Data=7	Bom	1,89 d	11,61 c	1,47 b	4,87 bc	144,48 cd	7,49 a	4,61 ab
	Ma	1,13 e	12,61 a	1,13 c	5,07 b	131,51 d	5,82 b	3,83 bc
	Zam	2,14 d	12,71 a	1,58 a	5,73 a	170,37 b	2,68 d	3,72 bcd

Nota - Foram comparadas as médias ao longo do tempo (de cada coluna). Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, com $\alpha = 5\%$ (n=180 peras).

Para o caso da interação 'Data' versus 'Pomar', não faz sentido calcular os valores de F e de R^2 para o ajustamento linear das médias de cada um dos parâmetros, uma vez que apenas haveriam dois pontos para cada ajustamento, o que originaria uma recta, com $R^2=1$, o que não faria sentido. Deste modo, omitiu-se esta parte e apresentam-se de seguida, na figura 27, as linhas de tendência das médias dos parâmetros analisados, para que se torne mais perceptível qual a evolução dos parâmetros em função da 'Data', para cada 'Pomar'.

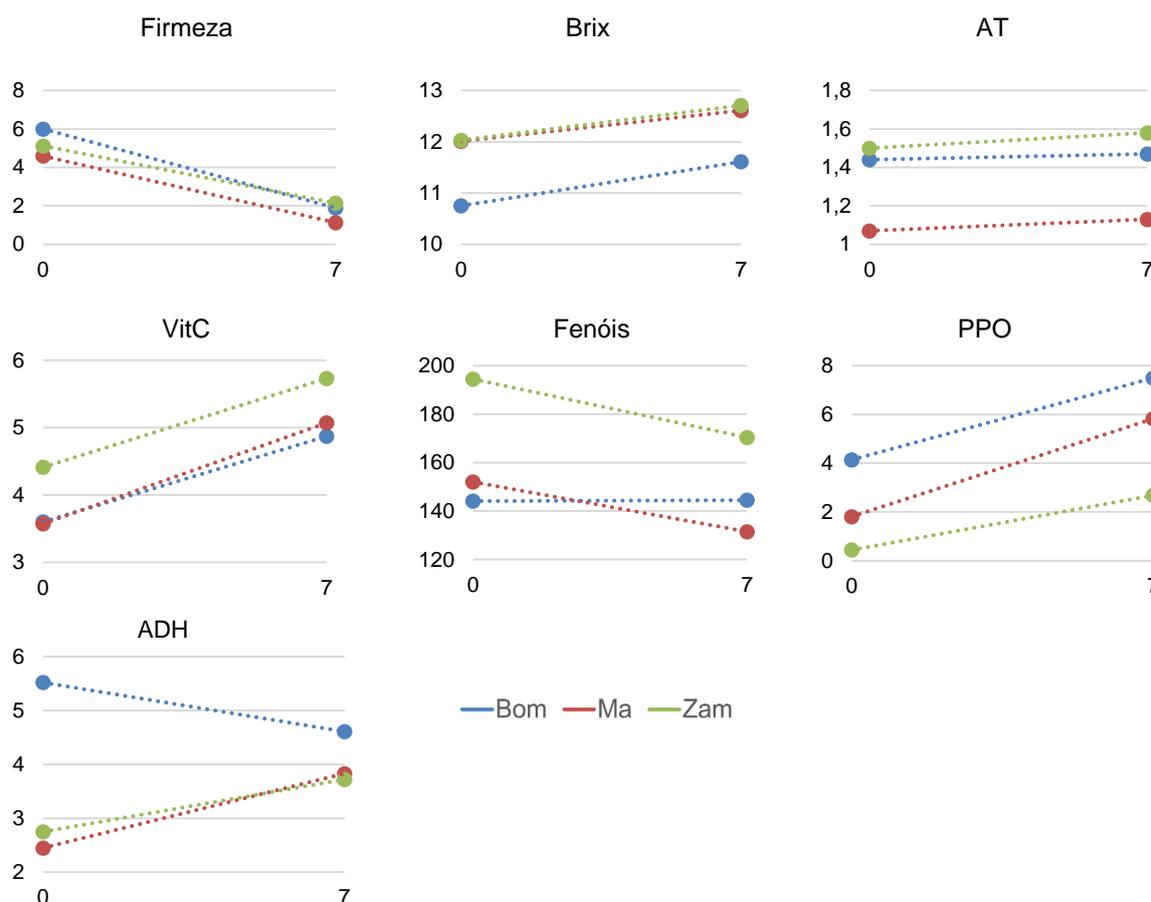


Figura 27 - Linhas de tendência das médias dos parâmetros analisados ao longo do período de conservação, com base na interação entre 'Data' e 'Pomar', para 'Data'=(0,7), 'Cons'=[0,225] e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' separadamente (n=180)

Através da análise da análise da tabela 27 e figura 27, pode-se concluir que existem algumas tendências estatisticamente significativas para a evolução dos parâmetros analisados, entre os 0 e os 7 dias de prateleira. Considera-se estatisticamente significativo que as firmezas diminuam entre a 'Data' 0 e 7 se, para cada pomar, as letras respeitantes à 'Data' 0 e 7 forem diferentes (tabela 27). As tendências reveladas foram a diminuição da firmeza, o aumento do TSS, vitamina C e atividade da PPO, a diminuição da atividade da ADH para o pomar do Bombarral e aumento para os dois outros pomares, a manutenção da AT em todos os casos menos para a Zambujeira, em que se registou um aumento, e a manutenção dos fenóis para o Bombarral, e diminuição para a Zambujeira e Mafra. A situação menos expectável é o aumento da AT para o pomar da Zambujeira, porque esta deveria diminuir com o tempo para todos os casos (Hobson, 1994).

8.4. Efeitos conjugados da 'Conservação', 'Data' e 'Pomar' sobre os parâmetros analisados

8.4.1. Interação 'Conservação' versus 'Data' versus 'Pomar'

Por último, apresenta-se o estudo da evolução dos parâmetros de qualidade e bioquímicos, com base na interação entre todos os fatores: 'Conservação', 'Data' e 'Pomar'. Para tal, foram utilizados dados de todas as Conservações (dos 0 aos 225 dias), de ambas as datas (0 e 7) e de todos os pomares (Bombarral, Mafra e Zambujeira) e foi testado o pressuposto da homogeneidade das variâncias, através de gráficos *qqplot*. Os resultados apresentam-se na figura 28.

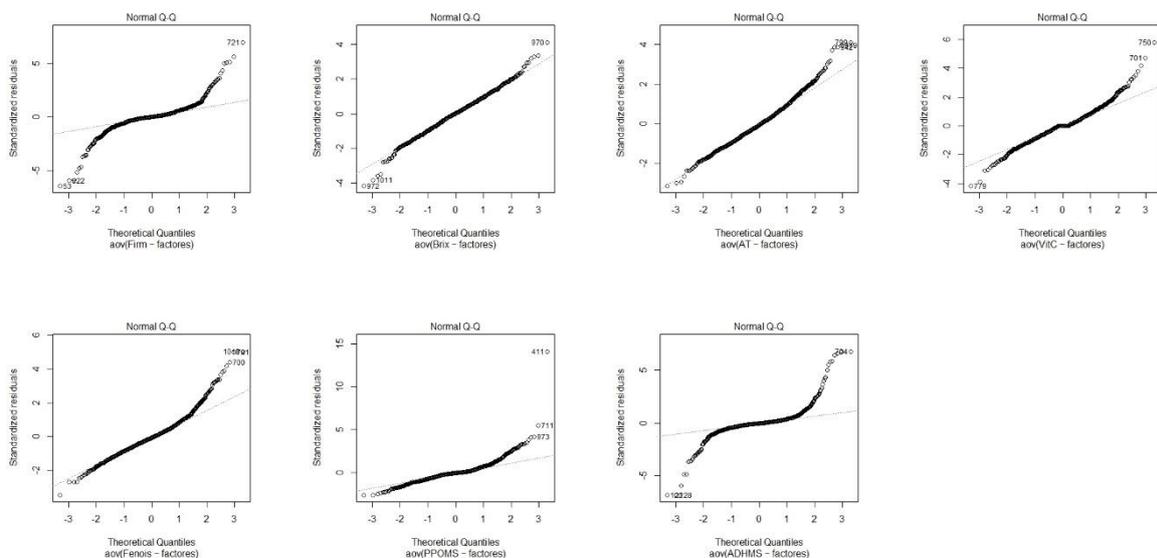


Figura 28 – Gráficos *qqplot* para cada fator: (da esquerda para a direita e de cima para baixo, respetivamente, a firmeza, Brix, AT, vitamina C, fenóis, PPO e ADH.

Esta análise faz-se através da observação de cada gráfico: caso os pontos estejam sobre a “reta da normalidade”, valida-se o pressuposto, caso haja desvios relevantes, não se pode validar. Na figura 28 pode observar-se como em todos os gráficos há muitos pontos que não seguem a reta da normalidade, pelo que não se pode validar o pressuposto da homogeneidade das variâncias. Contudo, dado o interesse desta análise, e o facto de autores como Glass *et al.*, 1972 e Harwell *et al.*, 1992 defenderem a validade de estudos em que há heterogeneidade de variâncias (ver página 35), esta análise a três fatores será feita. É essencial ter em consideração as limitações deste estudo, mas a sua importância para analisar a evolução dos parâmetros em termos teóricos e a inexistência de um método não-paramétrico que me permita fazer a análise das variâncias a três fatores impele à sua realização. Os resultados dos testes de Tukey a três fatores apresentam-se nas tabelas 43 a 45 do anexo V. Foram também traçados os gráficos relativos a esta informação, para facilitar a interpretação. Os resultados apresentam-se nas figuras 29 a 35

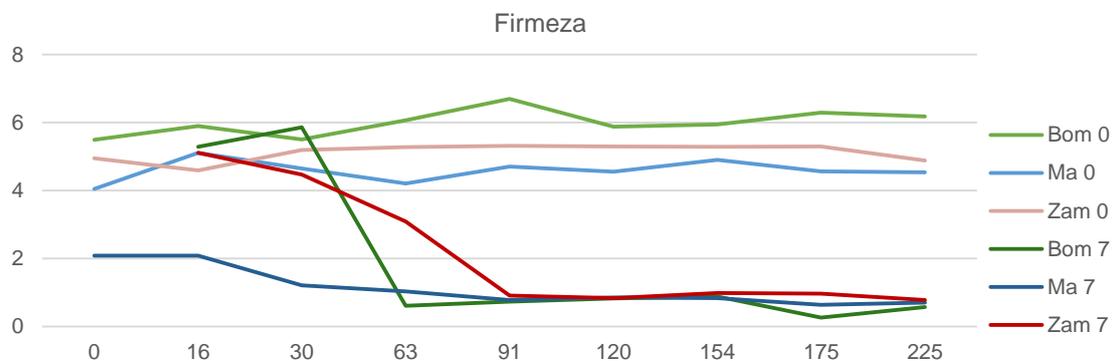


Figura 29 - Gráfico das linhas de tendência das médias das firmezas analisadas ao longo do período de conservação, com base na interação entre 'Data', 'Conservação' e 'Pomar', para 'Data'=(0,7), 'Cons'=[0,225[e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' separadamente (n=20).

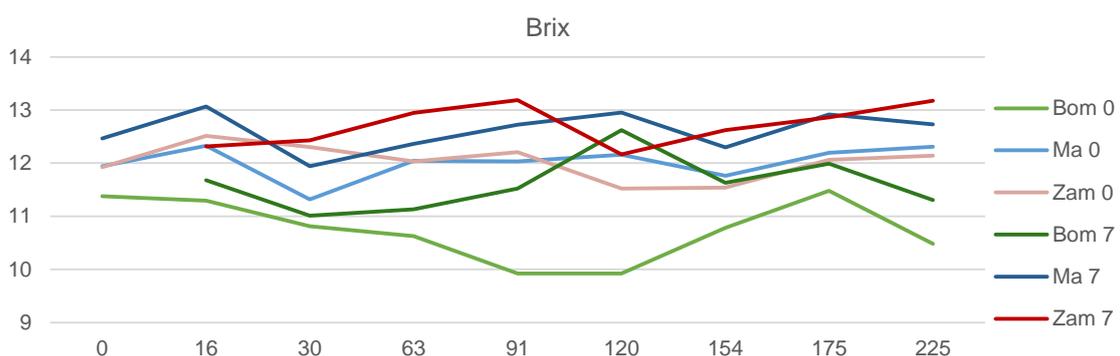


Figura 30 - Gráfico das linhas de tendência das médias dos TSS analisados ao longo do período de conservação, com base na interação entre 'Data', 'Conservação' e 'Pomar', para 'Data'=(0,7), 'Cons'=[0,225[e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' separadamente (n=20).

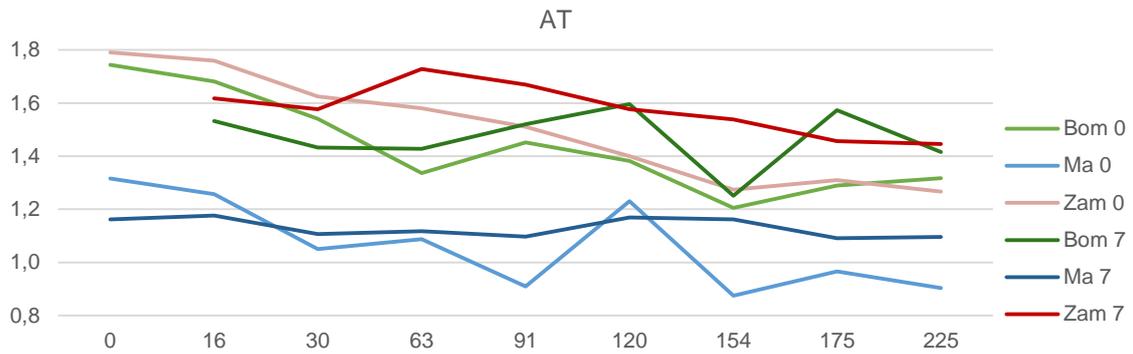


Figura 31 - Gráfico das linhas de tendência das médias dos valores de acidez titulável analisados ao longo do período de conservação, com base na interação entre 'Data', 'Conservação' e 'Pomar', para 'Data'=(0,7), 'Cons'=[0,225[e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' separadamente (n=20).

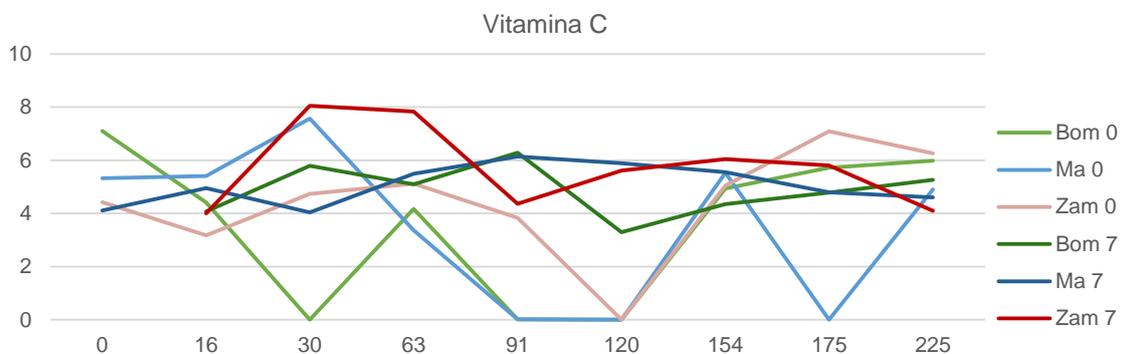


Figura 32 - Gráfico das linhas de tendência das médias dos valores de vitamina C analisados ao longo do período de conservação, com base na interação entre 'Data', 'Conservação' e 'Pomar', para 'Data'=(0,7), 'Cons'=[0,225[e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' separadamente (n=20).

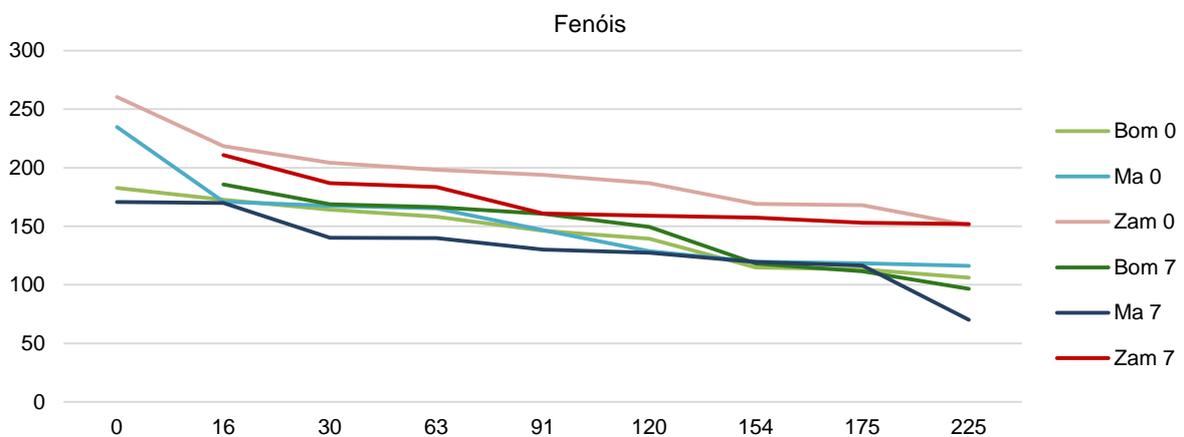


Figura 33 - Gráfico das linhas de tendência das médias dos valores de fenóis analisados ao longo do período de conservação, com base na interação entre 'Data', 'Conservação' e 'Pomar', para 'Data'=(0,7), 'Cons'=[0,225[e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' separadamente (n=20).

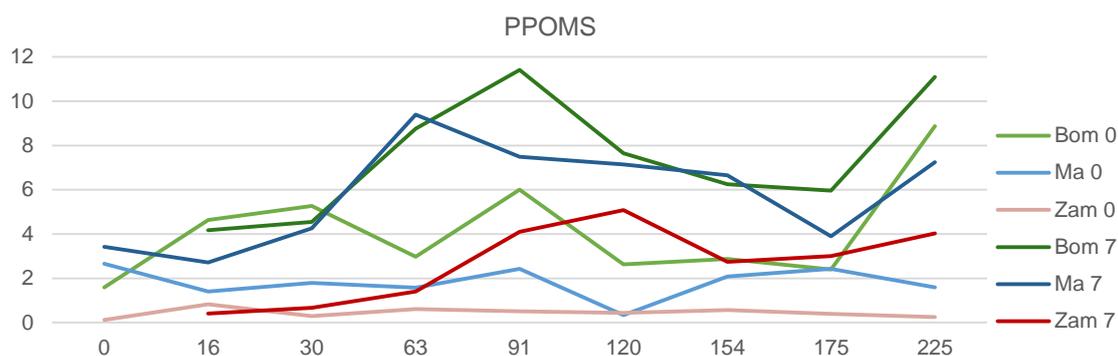


Figura 34 - Gráfico das linhas de tendência das médias dos valores da atividade da enzima PPO analisados ao longo do período de conservação, com base na interação entre 'Data', 'Conservação' e 'Pomar', para 'Data'=(0,7), 'Cons'=[0,225[e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' separadamente (n=20).

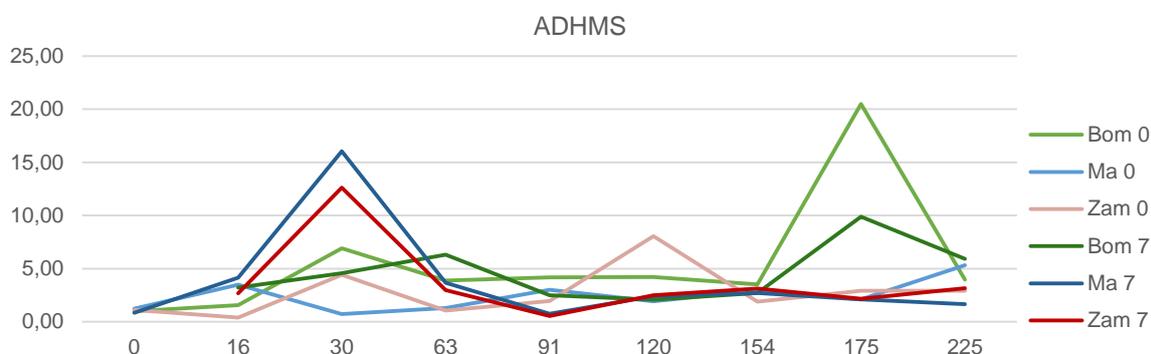


Figura 35 - Gráfico das linhas de tendência das médias dos valores da atividade da enzima ADH analisados ao longo do período de conservação, com base na interação entre 'Data', 'Conservação' e 'Pomar', para 'Data'=(0,7), 'Cons'=[0,225[e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' separadamente (n=20).

Esta análise a três fatores permite tirar, entre outras, conclusões acerca de qual é o 'Pomar' com melhor desempenho, tendo em conta períodos de 'Conservação' elevados, após 7 dias de prateleira ('Data'). O pomar com melhor desempenho para 'Conservações' prolongadas e tempos de prateleira ('Datas') elevados é, para todas as situações, o pomar da Zambujeira, excepto para a vitamina C que é o pomar do Bombarral. A atividade da PPO não foi analisada porque o facto desta ter um valor maior ou menor não está diretamente associado à qualidade dos frutos. Este é um parâmetro mais complexo, para o qual não faz sentido fazer esta análise. Também não se fez a análise da atividade da ADH porque importa mais a evolução da mesma do que o seu valor final e porque este parâmetro e a PPO não são valorizados pelo consumidor (ao contrário dos parâmetros relacionados com a textura e sabor – firmeza, TSS e AT – ou com a qualidade ou saúde – fenóis e vitamina C).

É de notar que, relativamente aos fenóis, o pomar da Zambujeira apresenta valores claramente superiores para ambas as 'Datas' e que o pomar de Mafra apresenta os valores mais baixos, especialmente para a 'Data' 7.

Como se verá no ponto 8.5., alguns parâmetros parecem estar relacionados com o número de peras afetadas pelo acastanhamento interno. Isto acontece para os parâmetros da firmeza e da ADH.

No caso da firmeza, parece haver uma relação para 'Zam7': é quando a firmeza dos frutos começa a decrescer baixo de determinado nível que começa a aparecer acastanhamento interno. No caso da ADH, parece existir uma relação para 'Zam7' e para 'Ma7': em ambos os casos, começa a aparecer acastanhamento interno pouco tempo (dias) depois de terem hipoteticamente ocorrido fenómenos de fermentação. Isto vai de encontro ao estudo de Deuchande (2016), onde se concluiu que a fermentação poderia ser um factor subjacente ao acastanhamento interno. Apesar da aparente solidez desta relação, é importante voltar a realçar, as limitações estatísticas deste estudo.

8.5. Monitorização do desenvolvimento de acastanhamento interno e quantificação da incidência e severidade do mesmo

8.5.1. Monitorização do desenvolvimento de acastanhamento interno

De seguida, foi estudada a evolução do aparecimento de acastanhamento interno ao longo do tempo de conservação, para cada pomar e para as 'Datas' 0 e 7, em termos numéricos. Os resultados apresentam-se nas figuras 36 a 38.

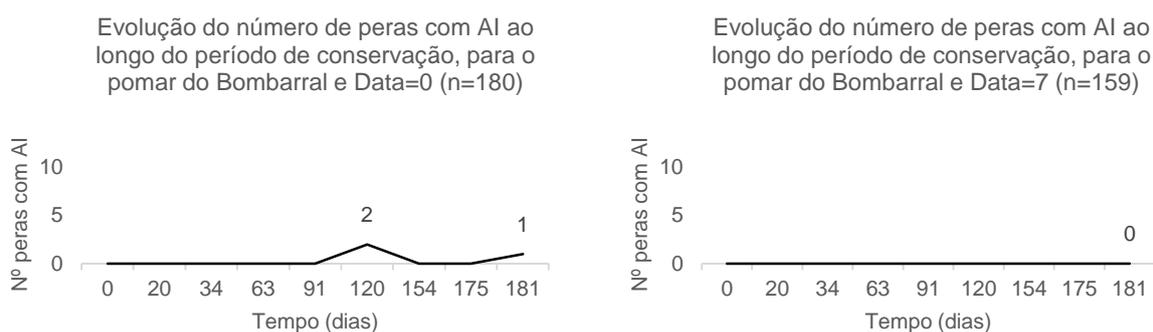


Figura 36 - Evolução do número de peras com acastanhamento interno ao longo do período de conservação, para o 'Pomar' do Bombarral, para as 'Datas' 0 e 7.

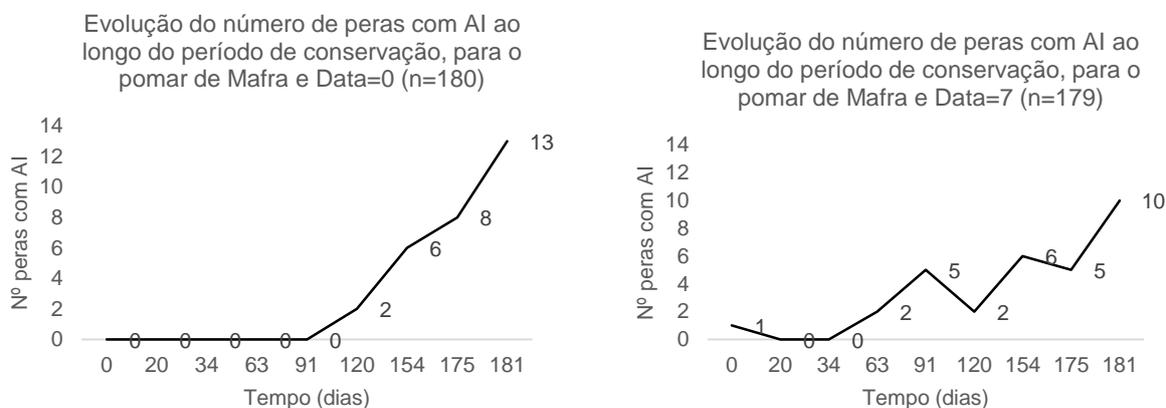


Figura 37 - Evolução do número de peras com acastanhamento interno ao longo do período de conservação, para o 'Pomar' de Mafra, para as 'Datas' 0 e 7.

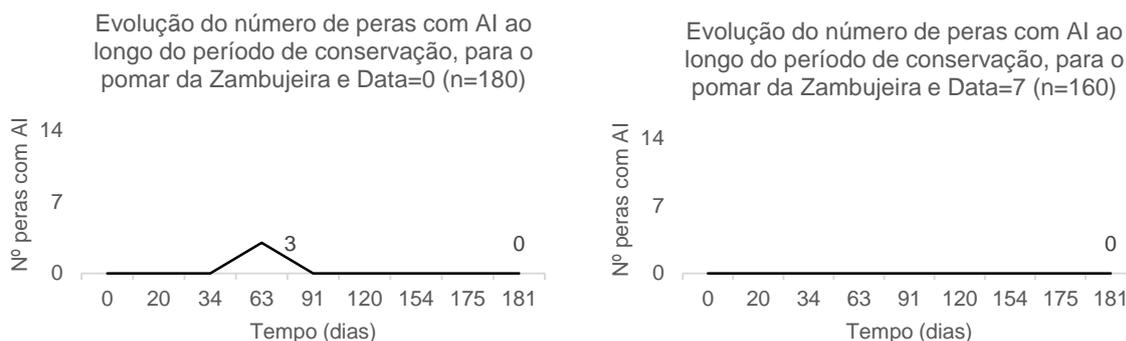


Figura 38 - Evolução do número de peras com acastanhamento interno ao longo do período de conservação, para o 'Pomar' da Zambujeira, para as 'Datas' 0 e 7.

Estes gráficos revelam, em primeiro lugar, que o acastanhamento interno apareceu quase exclusivamente no pomar de Mafra. O pomar da Zambujeira teve apenas três peras com acastanhamento interno, todas elas com 63 dias de conservação e para a 'Data' 0, e o pomar do Bombarral teve também apenas três peras com acastanhamento interno, duas para os 120 dias e uma para os 225 dias, ambas da 'Data' 0. O facto de terem sido encontradas estas seis peras nestas 'Datas' e dias de 'Conservação' específicos não são, contudo muito relevantes, uma vez que a amostragem era pequena (20 peras de cada lote), o que torna a variabilidade amostral relevante.

Relativamente ao pomar de Mafra não se verifica o mesmo. Uma vez que neste caso foram encontradas várias peras com acastanhamento interno, já é possível fazer uma análise do número de peras afetadas por lote. Pode constatar-se que o número de peras afetadas pelo acastanhamento interno começou a aumentar a partir dos 90 dias (3 meses), aproximadamente. A partir daí continuou a evoluir de forma crescente para a 'Data' 0 e 7, mas para a 'Data' 7 este apresentou muitas oscilações. Estas oscilações têm a ver com a variabilidade interna de cada amostra. Uma vez que existem evidências que a 'Conservação' foi bem feita, o acastanhamento interno deveria aumentar muito ligeiramente ou manter-se ao longo do tempo. Contudo, as peras não estão completamente inativas, possuem atividade metabólica residual, razão pela qual a percentagem de AI vai aumentando ao longo do tempo.

No gráfico da figura 37, relativa a Mafra, é possível ver como o número de peras afetadas pelo AI aumenta gradualmente com o tempo. O número de frutos afetados pelo acastanhamento interno após 225 dias de 'Conservação' para a 'Data' 0 é de 29 peras, e para a 'Data' 7 é de 27 peras. Para o pomar de Mafra, a percentagem de frutos afetados pelo AI ao longo de 225 dias de 'Conservação' é dada por:

$$\left(\frac{29 + 27}{180 + 179} \right) \times 100\% = 16\%$$

Isto significa que, em cada 100 peras do pomar de Mafra, 16 foram afetadas pelo AI, de acordo com esta amostragem.

8.5.2. Quantificação da severidade do acastanhamento interno

Foi estudada a evolução da severidade do acastanhamento interno para cada ‘Pomar’ ao longo do tempo de ‘Conservação’ e para cada ‘Data’. Os resultados apresentam-se na tabela 28 e figura 39.

Tabela 28 – Severidade do acastanhamento interno, calculada com base nas médias das áreas afetadas por este problema, para cada fruto

Conservação	Bombarral				Mafra				Zambujeira			
	0	n	7	n	0	n	7	n	0	n	7	n
t ₀							2%	1				
t ₁₅₋₁₆												
t ₂₉₋₃₀												
t ₅₀₋₆₃							5%	1	5%	3		
t ₇₈₋₉₁							3%	3				
t ₁₀₇₋₁₂₀	9%	2			1%	1	7%	2				
t ₁₄₁₋₁₅₄					6%	3	4%	2				
t ₁₆₂₋₁₇₅					3%	2	11%	2				
t ₂₁₂₋₂₂₅	2%	1			6%	3	6%	3				

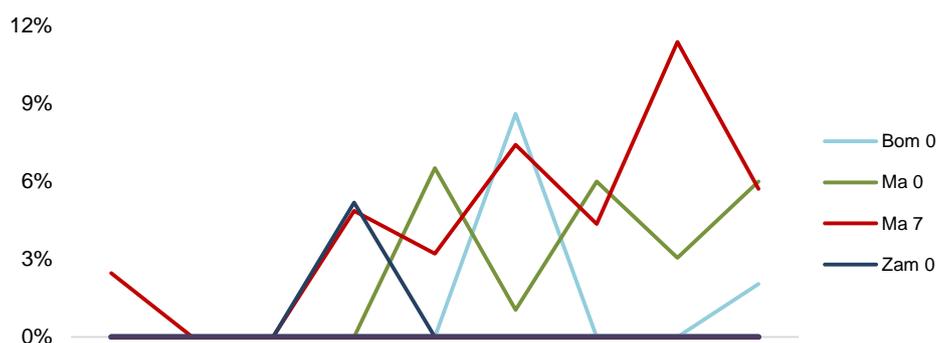


Figura 39 – Linhas de tendência da evolução da severidade do acastanhamento interno para cada pomar, ao longo do tempo de conservação e retas de regressão respetivas.

Um dos objetivos da construção da tabela 28 foi tornar o acastanhamento interno uma variável contínua. Este deixou de ser representado por ‘0’ (pera não afetada) ou ‘1’ (pera afetada) para tomar valores contínuos, de áreas. Esta transformação permitiu a realização de testes estatísticos ao AI em função de outros fatores, como se verá no ponto 8.6. deste trabalho.

O segundo objetivo da construção da tabela 28 e figura 39 era verificar se existiria alguma tendência evolutiva do número de peras afetadas pelo acastanhamento interno ao longo do tempo de ‘Conservação’. Para os pomares do Bombarral e Zambujeira, foi impossível tirar quaisquer conclusões, dado o reduzido número de peras afetadas. No caso do pomar de Mafra, para a ‘Data’ 0 também não foi possível tirar conclusões sólidas, dadas as oscilações verificadas. Apenas para a ‘Data’ 7 do pomar de Mafra parece haver uma tendência ligeiramente crescente da severidade (área afetada) do acastanhamento interno com o tempo de ‘Conservação’. Isto pode significar que a severidade do acastanhamento interno aumenta na ‘Conservação’, revelando-se com o tempo de prateleira. Não se pode esquecer, no entanto, que esta análise não é estatística, é meramente visual.

8.6. Relação entre o acastanhamento interno e os parâmetros medidos

Foi estudada a existência de relações entre o aparecimento de acastanhamento interno e os sete parâmetros medidos (firmeza, Brix, AT, fenóis, vitamina C, atividade da PPO e atividade da ADH), os diferentes pomares ('Pomar'), os tempos de prateleira ('Data') e os períodos de conservação ('Conservação').

Uma vez que o número de peras com acastanhamento interno se verificou muito menor do que o número de peras sem acastanhamento interno (delineamento desequilibrado), não se cumpriu o pressuposto da normalidade, e por isso foi necessário utilizar um método não paramétrico para este estudo. O método escolhido foi o método de *Kruskal-Wallis* (Kruskal e Wallis, 1952).

Os pressupostos necessários para a aplicação deste teste são: 1) todas as amostras são aleatórias e independente e 2) a variável dependente é contínua. O primeiro pressuposto verifica-se pela forma como as amostras foram recolhidas e tratadas em laboratório. O segundo pressuposto não se verifica para a ocorrência ou não de acastanhamento interno, pois este apenas assume os valores 0 (sem AI) e 1 (com AI). Deste modo, foram utilizadas as médias das áreas afetadas pelo acastanhamento interno em cada lote de peras (ver tabela 28 página 64) e os valores de "1" foram substituídos pela média do respetivo lote. Deste modo, o acastanhamento interno passou a assumir valores contínuos. Os resultados relativos à realização dos testes de *Kruskal-Wallis* apresentam-se na tabela 29.

Tabela 29 - Resultados dos testes de *Kruskal-Wallis* para cada parâmetro

Teste de <i>Kruskal-Wallis</i>	P-value	Conclusão
AI ~ Pomar	$2,2 \times 10^{-16}$	Fortemente relacionados
AI ~ Data	0,4967	Não se relacionam significativamente
AI ~ Cons	$3,2 \times 10^{-13}$	Fortemente relacionados
AI ~ Massa do fruto	$9,1 \times 10^{-13}$	Fortemente relacionados
AI ~ Firmeza	$6,6 \times 10^{-4}$	Fortemente relacionados
AI ~ Brix	0,1407	Não se relacionam significativamente
AI ~ AT	$1,3 \times 10^{-14}$	Fortemente relacionados
AI ~ Vitamina C	0,02468	Ligeira relação
AI ~ Fenóis	0,3395	Não se relacionam significativamente
AI ~ PPO	0,7641	Não se relacionam significativamente
AI ~ ADH	0,2087	Não se relacionam significativamente

Nota - Quando o p-value é menor do que 0,05, significa que existe uma diferença significativa no respetivo parâmetro, em pelo menos um dos lotes.

Os resultados da tabela 29 revelaram que os fatores ou parâmetros que estão relacionados com a incidência e severidade do acastanhamento interno são o 'Pomar', o tempo de 'Conservação', o 'Massa do fruto', a 'Firmeza', a 'Acidez titulável' e a 'Vitamina C'. Estes parâmetros podem ser agrupados em quatro grupos de causalidade: o grupo da 'perda de firmeza', o grupo do 'tempo de conservação elevado', o grupo dos 'calibres elevados' e o grupo da 'ação protetora da vitamina C'.

O grupo da 'perda de firmeza' inclui os fatores 'Pomar' e 'Firmeza', uma vez que a principal diferença revelada entre pomares foi a discrepância de firmezas e número de peras afetadas pelo

acastanhamento interno, entre Mafra e os restantes pomares. A relação que existe entre a 'Firmeza' (e, pela mesma razão, entre 'Pomar') e o acastanhamento interno tem a ver com a perda de integridade das membranas, que leva ao contacto entre fenóis e PPO, provocando a acumulação de melaninas e o aparecimento de acastanhamento interno (Veltman, 2002). As diferenças reveladas entre pomares podem ter a ver com diversos fatores, tais como o solo (Almeida, 2017), a localização do pomar (Ferguson *et al.*, 1999), adubações de potássio, fósforo, cálcio, boro, azoto, magnésio, etc (Neuwald, *et al.*, 2014, Broadley *et al.*, 2012 e Xuan, *et al.*, 2001). Nas tabelas 3 a 8 podem encontrar-se muitas das razões que levam os pomares a comportar-se de forma diferente em relação ao acastanhamento interno. Um dos principais fatores que pode ter contribuído para as diferenças encontradas entre 'Pomares', é a data de colheita. Zerbini *et al.* (2002) concluíram que a taxa de perda de AA em peras é mais elevada em frutos de colheita tardia, o que propicia o aparecimento de acastanhamento interno. O pomar de Mafra foi colhido a 23 de agosto, enquanto o do Bombarral foi colhido dia 8 de agosto e o da Zambujeira dia 10. Deste modo, o fator data de colheita, pode estar implicitamente expresso no 'Pomar'.

O grupo do 'tempo de conservação elevado' inclui os fatores 'Conservação' e 'AT'. A AT inclui-se neste grupo de causalidade porque a sua relação com o acastanhamento interno não se deve diretamente ao teor em ácidos das peras, mas sim ao facto de a AT ser um parâmetro fortemente relacionado com a 'Conservação'. A relação do acastanhamento interno com a 'AT' deve-se ao facto de, neste estudo, a 'AT' acabar por funcionar como um preditor da 'Conservação'. A razão pela qual este problema fisiológico aumenta para tempos de 'Conservação' elevados tem a ver com o facto dos frutos estarem muito tempo numa atmosfera pobre em O₂ e rica em CO₂, e este ambiente anaeróbio poder desencadear fenómenos de fermentação nos quais se acumulam metabolitos tóxicos, que afetam a integridade das membranas e propiciam o aparecimento de AI (Nicolas *et al.*, 1994 e Deuchande, 2016). O facto de a 'ADH' ter relevado não ter uma relação significativa com o acastanhamento interno no teste de *kruskal-wallis*, não significa necessariamente que o referido acima sobre a acumulação de metabolitos fermentativos não seja válido, porque valores elevados de 'ADH' apenas se irão converter numa maior percentagem de acastanhamento interno alguns dias depois, pelo que o valor do p-value apresentado acima para a 'ADH' pode não significar que os metabolitos fermentativos não tenham influência no aparecimento de acastanhamento interno (Pintó *et al.*, 2001 e Deuchande, 2014). O mesmo se verifica para os 'Fenóis' e 'PPO'.

O grupo dos 'calibres elevados' inclui apenas o fator 'Massa do fruto', que é um preditor do calibre de um fruto. A relação deste fator com o acastanhamento interno prende-se com o facto de, para frutos de maior calibre, haver menor difusividade dos gases no interior da polpa, o que pode gerar metabolitos fermentativos que afetam as membranas, favorecendo o aparecimento do problema (Chervin *et al.*, 1996; Kimmerer e MacDonald, 1987).

Por último, o grupo da 'ação protetora da vitamina C'. Este grupo também inclui apenas um fator, a 'Vitamina C'. A sua relação com o acastanhamento interno tem a ver com o facto de, quanto mais 'Vitamina C' tiver um fruto, mais poder antioxidante haverá para reduzir as o-quinonas novamente a o-difenóis, evitando a formação posterior de melaninas e o aparecimento de acastanhamento interno

(Waskiewicz *et al.*, 2014, Bhattacharjee, 2010 e Kocsy *et al.*, 2001). No caso do 'Brix' e 'Data', não existe realmente relação significativa, ao nível de significância de 0,05.

Pereira (2017) não verificou a existência de nenhuma relação entre os parâmetros bioquímicos analisados e o aparecimento de acastanhamento interno. Contudo, esta diferença é natural, dado o número muito reduzido de peras com acastanhamento interno analisadas por esta autora.

9. Conclusão

Esta tese procurou responder essencialmente a três questões. A primeira, relacionada com a forma como alguns parâmetros de qualidade (firmeza, TSS e AT) e alguns parâmetros bioquímicos (vitamina C, fenóis e as atividades das enzimas PPO e ADH) variam com o tempo de conservação, o tempo de prateleira, e com diferentes localizações e gestão de pomares. Foi possível concluir que a 'Conservação' em câmara foi corretamente executada, uma vez que os frutos mantiveram quase todos os parâmetros praticamente inalterados dos 0 aos 225 dias. Contudo, após sete dias de prateleira à temperatura ambiente, a resposta dos frutos com mais tempo de câmara mostrou ser mais vincada em relação aos frutos à saída da câmara. Isto aconteceu para todos os fatores, mas especialmente para a firmeza do pomar de Mafra, a partir aproximadamente dos 30 dias de conservação. Também foram visíveis algumas tendências com o aumento do tempo de 'Conservação' e para 7 dias de prateleira, nomeadamente ao nível do TSS que aumentou, os fenóis que diminuíram e a AT, e atividades da PPO e ADH que aumentaram. A vitamina C, dentro de muitas oscilações, também pareceu aumentar, mas não foi dado muito relevo a esta análise porque o método de obtenção dos dados é um método colorimétrico, e portanto subjetivo. O facto do estudo ter sido feito com apenas 20 peras de cada lote dificultou muito as análises estatísticas, porque na maioria dos casos não foi possível validar os pressupostos necessários à realização dos testes estatísticos. Tiraram-se conclusões acerca dos pomares com melhor desempenho agronómico e qualitativo, tendo em conta períodos de 'Conservação' elevados, após 7 dias de prateleira ('Data'). O melhor pomar foi o da Zambujeira. Esta conclusão é uma das mais importantes que se pode tirar deste estudo, porque os agricultores, as centrais fruteiras e as empresas de retalho pretendem alargar ao máximo o período de venda de pera 'Rocha', ao longo do máximo tempo possível de prateleira, mantendo a boa qualidade dos frutos.

Na segunda questão, pretendia-se monitorizar o desenvolvimento e quantificar a incidência e severidade do acastanhamento interno e relacioná-lo com os parâmetros avaliados em laboratório. Quanto à incidência deste problema, verificou-se que os pomares Bombarral e Zambujeira apenas tiveram 3 frutos afetados cada um, em todos os lotes. Contrariamente, no pomar de Mafra houve 56 frutos encontrados com acastanhamento interno, para todos os lotes, o que significa que 16% dos frutos de Mafra foram afetados por este problema, de acordo com a amostra recolhida. Esta diferença está fortemente relacionada com a reduzida firmeza dos frutos de Mafra, que foram colhidos mais tarde do que os dos restantes pomares. Verificou-se ainda que não houve nenhum aumento claro da severidade do acastanhamento interno ao longo do período de 'Conservação', mas aparentemente o tempo de prateleira contribui para aumentar a área afetada por este problema fisiológico. No entanto, estes dados têm uma validade limitada, porque não foram corroborados por nenhum teste estatístico, e porque não foram tiradas fotografias a todas as peras afetadas, mas apenas a uma amostra reduzida, que foi usada para quantificar o grau de severidade do acastanhamento. Sugere-se também que o acastanhamento interno está fortemente relacionado com a perda de firmeza dos frutos, com os diferentes pomares, com o tempo de conservação, com o calibre dos frutos e com a ação da vitamina C.

Por último, o terceiro objetivo desta tese consistia em fornecer os dados necessários para o desenvolvimento do projecto RMPPrA-PeRA. Caberá agora às entidades respetivas articular os resultados obtidos neste trabalho com os resultados da RMN, por forma a estabelecer alguma relação fundamentada.

Por último, propõem-se algumas sugestões para as investigações que vierem a desenvolver-se no futuro sobre esta matéria. Seria interessante estudar mais aprofundadamente a severidade do acastanhamento interno ao longo do período de prateleira, procurando encontrar um modelo matemático para o mesmo. Seria igualmente interessante investigar o momento exato em que se dá o início dos processos de oxidação responsáveis por este problema pós-colheita e concluir acerca de quanto tempo é necessário, em média, desde o momento em que se começa a evidenciar a perda de firmeza (parâmetro destrutivo mas facilmente mensurável) e o momento em que se torna visível a olho nu o acastanhamento dos frutos. Por último, sugere-se como investigação futura a procura de quais os valores de firmeza a partir dos quais o AI tem determinada probabilidade de se evidenciar. Esta investigação seria muito interessante porque permitiria, com base numa amostra, decidir através da firmeza quais os lotes de pera que tinham menor probabilidade de revelar AI (e, por isso, que se poderiam conservar durante mais tempo) e quais os que as centrais deveriam vender primeiro.

Referências Bibliográficas

- Abeles F B, Morgan PW, Saltveit ME, 1992. *Ethylene In Plant Biology*. Second Edition. San Diego, EUA: Academic Press.
- Ahmad P, *et al.*, 2010. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology* **30**, 161–175.
- Ahvenainen R, 1996. New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology* **7**, 180-187.
- Alexandre J, 2001. Colheita da pera 'Rocha'. Em: Alexandre J, Silva A, Soares J, (Eds.). O Livro da pera 'Rocha'. Associação Nacional de Produtores de Pera 'Rocha'.
- Avelar M L, Rizzolo A, Lombardi D, Erbini P, 1995. Modificações de Carácter Fisiológico e Qualitativo em Pera "Rocha" Conservada em Atmosfera Controlada. *Revista Frutas & Legumes* **24**, 27-30.
- Almeida D, 2005. Managing calcium in the soil-plant-fruit system. Em: Dris R (ed.). *Crops: Growth, Quality and Biotechnology*. Helsinki, Finland: WFL Publisher, 448-459.
- Almeida D, 2015. Pós-colheita de pera Rocha em contexto de alteração tecnológica. Disponível em: [http://rrn.dgadr.pt/pei/iniciativa_more.asp?search_fd0=49]. Acedido a 18.06.2018.
- Almeida D, 2017. Novas recomendações para o armazenamento prolongado de pera 'Rocha' produzida na região Oeste de Portugal. Atas Portuguesas de Horticultura. Disponível em: [https://www.isa.ulisboa.pt/files/fl/pub/articles/2017-07/Almeida_Recomendacoes_armazenamento_pera_Rocha_Congresso_Iberico_Ciencias_Horticolas.pdf]. Acedido a 15.06.2018.
- ANP, 1997. Pera 'Rocha' do Oeste DOP. Disponível em: [<https://tradicional.dgadr.gov.pt/pt/cat/frutos-frescos/686-pera-rocha-do-oeste-dop>]. Acedido a 08.06.2018.
- Apel K, Hirt H, 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 373–399.
- Bhattacharjee S, 2010. Sites of Generation and physicochemical basis of formation of ROS in plants. Em: Gupta S D (Ed.). *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. CRC Press, 1–30.
- Blankenship S M, Dole J M, 2003. 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biology and Technology* **28**, 1-25.
- Blanpied G D, 1990. Controlled atmosphere storage of apples and pears. Em: Calderon M, Barkai-Golan R (Eds.). *Food Preservation by Modified Atmospheres*. Boca Raton, EUA: CRC Press, 265-296.

Both V, 2015. Atmosfera controlada dinâmica monitorada pelo quociente respiratório: efeito do manejo do etileno, temperatura e níveis de CO₂ sobre compostos voláteis e conservação de maçãs. Santa Maria, Brasil: Universidade Federal de Santa Maria, tese de Doutorado.

Box G E, 1953. Non-normality and tests on variances. *Biometrika* 40 (3/4), 318-335.

Broadley M, Brown P, Cakmak I, Rengel Z, Zhao F, 2012. Function of nutrients: micronutrients. Marschner P (Ed.). *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Terceira edição. Oxford, Reino Unido: Academic Press, 191-248.

Burg S P, Burg E A, 1967. Molecular requirements for the biological activity of ethylene. *Plant Physiology* 42, 144-152.

Carvalho A R, 2011. Aplicação de smartfresh™ em pêra 'Rocha' - eficácia de concentrações e modalidades de armazenamento na qualidade e na incidência de escaldão superficial e acastanhamento interno. Lisboa, Portugal: Instituto Superior de Agronomia (Universidade de Lisboa), tese de Mestrado.

Chervin C, Speirs J, Truett J, 1999. Alcohol dehydrogenase expression and the production of alcohols during pear fruit ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124, 71–75.

Chervin C, Brady C J, Patterson B D, e Faragher J D, 1996. Could studies on cell responses to low oxygen levels provide improved options for fruit storage and disinfestation. *Postharvest Biology and Technology* 7, 289–299.

Davey M, Montagu M, Inzé D, Sanmartin M, Kanellis A, Smirnoff N, Benzie I, Strain J, Favell D, Fletcher J, 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 825–860.

Deuchande T M, 2016. *Internal Browning Disorders of 'Rocha' Pear During Long-Term Storage*. Porto, Portugal: Universidade Católica Portuguesa do Porto, tese de doutoramento.

Deuchande T M, Carvalho S, Guterres U, Fidalgo F, Isidoro N, Larrigaudière C, Vasconcelos M, 2012. Internal browning disorders during storage of "Rocha" pear: effects of harvest maturity and CO₂ partial pressure. Em: Recasens I, Graell J e Echeverría G (Eds.). *Avances en Poscosecha de Frutas y Hortalizas*. Lérida, Espanha: Edicions de la Universitat de Lleida, 583–588.

Deuchande T M, Carvalho S, Larrigaudière C, Fidalgo F, Guterres U, Isidoro N, Vasconcelos M, 2014. Atmosfera controlada dinâmica na prevenção do acastanhamento interno em pera 'Rocha': eficácia dos sensores de etanol e de fluorescência de clorofilas. *Actas Portuguesas da Horticultura* 23, 345-352.

Deuchande T, Carvalho S, Larrigaudière C, Vasconcelos M W, 2017a. Mineral concentrations at harvest as novel markers to predict internal browning disorders in 'Rocha' pear during storage under high CO₂. *Scientia Horticulturae* **220**, 102-106.

Deuchande T, Larrigaudière C, Guterres U, Carvalho S, Vasconcelos M W, 2017b. Biochemical markers to predict internal browning disorders in 'Rocha' pear during storage under high CO₂. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **97**(11), 3603-3612.

DRAP Centro, 2018. Pera 'Rocha' do Oeste DOP. Disponível em: [http://ptqc.drappc.min-agricultura.pt/documentos/pera_rocha_oeste.htm]. Acedido a 06.07.2018.

Dobrzanski B, Rabcewicz J, Rybczyński R, 2006. Handling of apple - Transport techniques and efficiency vibration, damage and bruising texture, firmness and quality. Disponível em: [http://www.ipan.lublin.pl/wp-content/uploads/2017/03/mat_coe27.pdf]. Acedido a 19.07.2018.

Empresa de Desenvolvimento e Infra-estruturas do Alqueva (EDIA), 2017. Anuário Agrícola de Alqueva. Disponível em: [http://regante.edia.pt/SiteAssets/Lists/LibraryList/AllItems/Anuario_Agricola_Alqueva_2017.pdf]. Acedido a 04.07.2018.

Fallahi E, Conway W S, Hickey K D, Sams C E, 1997. The role of calcium and nitrogen in postharvest quality and disease resistance of apples. *HortScience* **32**, 831-835.

FAO, 2014. Crops. Disponível em: [<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>]. Acedido a 17.06.2018.

FAO, 2017. Crops. Disponível em: [<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>]. Acedido a 04.07.2018.

Ferguson I, Volt R, Woolf A, 1999. Preharvest factors affecting physiological disorders of fruit. *Postharvest Biology and Technology* **15**, 255-262.

Fischer R L, Bennett A B, 1991. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Plant Physiology* **42**, 675-703.

FLF (Revista Flores, Frutas e Legumes), 2016. Produtores de pêra Rocha querem chegar aos 100 milhões de euros de exportações em 2019. Disponível em: [<http://www.flfrevista.pt/2018/01/produtores-de-pera-rocha-querem-chegar-aos-100-milhoes-de-euros-de-exportacoes-em-2019/>]. Acedido a 19.07.2018.

Franck C, Baetens M, Lammertyn J, Scheerlinck N, Nicolaï B M, 2003. Ascorbic acid mapping to study core breakdown. *Postharvest Biology Technology* **30**, 133-142.

Franck C, Lammertyn J, Ho Q T, Verlinden B, Nicolaï B M, 2007. Browning disorders in pear fruit. *Postharvest Biology and Technology* **43**, 1-13.

Franco J, Melo F, Guilherme R, Neves N, Curado F, 2008. Peras portuguesas, ou tidas como tal, com perspectivas de aceitação pelo consumidor. Em: Simões O, Lopes A, Ferreira J (Eds.). *Variedades Regionais e Agricultura Biológica, Desafios para Peras e Maças Portuguesas*. Coimbra, Portugal: Tipografia Beira Alta, 148-154.

Gill S S, Tuteja N, 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 909–930.

Glass G, Hopkins K, 1996. *Statistical Methods in Education and Psychology*. Needham Heights, EUA: Allyn & Bacon.

Glass G V, Peckham P D, Sanders J R, 1972. Consequences of failure to meet assumptions underlying the fixed effects analyses of variance and covariance. *Review of Educational Research* **42**(3), 237-288.

Gomes G D, 2015. *Acastanhamento Interno Durante o Armazenamento da Pera 'Rocha': Impacto do Baixo O₂ e Alto CO₂ no Metabolismo e Estratégias de Controlo*. Porto, Portugal: Universidade Católica Portuguesa e Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, tese de mestrado.

Gomes R C, 2017. *Previsão do estado de maturação, qualidade e relação do potencial de conservação com o índice de maturação medido com o 'DA-meter' em pera 'Rocha'*. Lisboa, Portugal: Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, tese de mestrado.

GPP, 2016. Ficha de internacionalização pera 'Rocha'. Disponível em: [<http://www.gpp.pt/images/gam/1/fi/PeraFI.pdf>]. Acedido a 04.07.2018.

GPP, 2017a. Informação de mercados. Disponível em: [http://www.gpp.pt/images/GPP/O_que_disponibilizamos/Publicacoes/Periodicos/Produtos_Animais_2.pdf]. Acedido a 11.06.2018.

GPP, 2017b. Preços de Produtos Agrícolas. Disponível em: [<http://www.gpp.pt/index.php/sima/precos-de-produtos-agricolas>]. Acedido a 07.04.2018.

GPP, 2018. Preços de Produtos Agrícolas. Disponível em: [<http://www.gpp.pt/index.php/sima/precos-de-produtos-agricolas>]. Acedido a 07.04.2018.

Hamauzu Y, Hanakawa T, 2003. Relation of highly polymerised procyanidin to the potential browning susceptibility in pear fruits. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **72**, 415- 421.

Hansen E, Mellenthin W M, 1962. Factors influencing susceptibility of pears to carbon dioxide injury. *Procedures of American Society for Horticultural Science* **80**, 146-153.

Harwell M R, Rubinstein E N, Hayes W S, Olds C C, 1992. Summarizing Monte Carlo results in methodological research: The one-and two-factor fixed effects ANOVA cases. *Journal of educational statistics* **17**(4), 315-339.

Hawkesford M, Horst W, Kichey T, Lambers H, Schjoerring J, Møller I S, White P, 2012. Functions of macronutrients. Em: Marschner P (Ed.). *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Terceira edição. Oxford, Reino Unido: Academic Press,135–189.

Hiwasa K, Kinugasa Y, Amano S, Hashimoto A, Nakano R, Inaba A K Y, 2003. Ethylene is required for both the initiation and progression of softening in pear (*Pyrus communis* L.) fruit. *Journal Of Experimental Botany* **54**, 771–779.

Hobson G, 1994. Postharvest physiology. Em: Arntzen C J, Ritter E M (Eds.). *Encyclopedia of agricultural Science*. Terceira edição. Nova Iorque, E.U.A.: Academic Press, 407-418.

INIAV, 2017. As variedades regionais de pereiras. Disponível em: [http://www.inia.pt/fotos/editor2/as_variedades_regionais_de_pereiras.pdf]. Acedido a 18.07.2018.

IPMA, 2013. Boletim metereológico para a agricultura. Disponível em: [https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20130919/ZjyrUtrlvEShXPbUgXdL/agr_20130301_20130331_bag_3d_co_pt.pdf]. Acedido a 24.11.2018.

Iversen G R, Wildt A R, Norpoth H, Norpoth H P, 1987. *Analysis of Variance*. Segunda edição. Thousand Oaks, EUA: Sage Publications.

Kader A A, 1995. Regulation of fruit physiology by controlled/modified atmospheres. *Acta Horticulturae* **398**, 59-70.

Kader A A, 1999. Fruit maturity, ripening, and quality relationships. *Acta Horticulturae* **485**, 203-208.

Kader A A, 2003. A perspective on postharvest horticulture (1978-2003). *HortScience* **38**, 1004-1008.

Ke D, Yahia E, Mateos M, Kader A A, 1994. Ethanolic fermentation of ‘Bartlett’ pears as influenced by ripening stage and atmospheric composition. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **119** 976–982.

Kerbel E L, Kader A A, Romani R J, 1988. Effects of elevated CO₂ concentrations on glycolysis in intact “Bartlett” pear fruit. *Plant physiology* **86**, 1205–1209.

Kieber J, 1998. Ethylene. Taiz L, Zeiger E (Eds.). *Plant Physiology*. Segunda edição. Massachusetts, E.U.A.: Sinauer Associates, 656-659.

Kimmerer T W, MacDonald R C, 1987. Acetaldehyde and ethanol biosynthesis in leaves of plants. *Plant Physiology* **84**, 1204–1209.

Kingston C M, 1993. Maturity indices for apple and pear. *Horticultural Reviews* **13**, 407–432.

Knee M, 1973. Effects of controlled atmosphere storage on respiratory metabolism in apple fruit tissue. *Journal of Science of Food and Agriculture* **24**, 1289–1298.

Kocsy G, Tóth B, Berzy T, Szalai G, Jednákovits A e Galiba G, 2001. Glutathione-reductase activity and chilling tolerance are induced by a hydroxylamine derivative Brx-156 in maize and soybean. *Plant Science* **160**, 943–950.

Kruskal W H e Wallis W A, 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, **47**(260), 583-621.

Lammertyn J, Aerts M, Verlinden B E, Schotsmans W, Nicolai B M, 2000. Logistic regression analysis of factors influencing core breakdown in 'Conference' pears. *Postharvest Biology and Technology* **20**, 25-37.

Lammertyn J, Dresselaers T, Van Hecke P, Jancsó P, Wevers M e Nicolai B M, 2003. MRI and X-ray CT study of spatial distribution of core breakdown in "Conference" pears. *Magnetic Resonance Imaging* **21**, 805–815.

Larrigaudière C, Lentheric I, Pintó E, e Vendrell M, 2001. Short-term effects of air and controlled atmosphere storage on antioxidant metabolism in conference pears. *Journal of Plant Physiology* **158**, 1015–1022.

Larrigaudiere C, Lentheric I, Puy J e Pinto E, 2004. Biochemical characterisation of core browning and brown heart disorders in pear by multivariate analysis. *Postharvest Biology and Technology* **31**, 29–39.

Larrigaudière C, Balenciaga C, Giné-Bordonaba J, Usall i Rodié J, 2017. El corazón pardo en pera: Conocimientos actuales y sistemas de prevención. Artículo técnico de IRTA. Lleida, España. Disponível em: [https://issuu.com/horticulturaposcosecha/docs/el_coraz__n_pardo_en_pera._balencia]. Acedido a 06.08.2018.

Latowski D, Surówka E, Strzalka K, 2010. Regulatory Role of Components of Ascorbate-Glutathione Pathway of Ascorbate–Glutathione Pathway. Em: Anjum, *et al.* (Eds). Londres, Reino Unido: Springer.

Lee S, Kader A, 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology* **20**, 207- 220.

Lurie S, Paliyath G, 2008. Enhancing postharvest shelf life and quality in horticultural commodities using 1-MCP technology. Em: Paliyath G, *et al.*, (Eds.) *Postharvest Biology and Technology of Fruits, Vegetables, and Flowers*. Primeira edição. Singapura, Singapura: Wiley-Blackwell, 139-154.

Macheix J J, Fleuriet A, Billot J, 1990. *Fruit Phenolics*. Em: Boca Raton, US: CRC Press.

Marketing Agrícola, 2016. Produção e comercialização de pera. Disponível em: [<http://marketingagricola.pt/producao-e-comercializacao-de-pera/>]. Acedido a 20.07.2018.

Mendes R D, 2017. Pools de nutrientes em pomares e sua relação com a incidência de acastanhamentos internos em pera 'Rocha'. Lisboa, Portugal: Instituto Superior de Agronomia, Tese de Mestrado.

Mitcham E J, Mitchell F G, 2002. Postharvest handling systems: pome fruits. Em: Kader A A (Ed.). *Postharvest Technology Of Horticultural Crops*. Terceira edição. Oakland, EUA: University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, 339-342.

Mittler R, 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Plant Science* **7**, 405 - 410.

Muhammad I, Ashiru S, Ibrahim I, Kanoma A I, Sani I, Garba S, 2014. Effect of Ripening Stage on Vitamin C Content in Selected Fruits. *International Journal of Agriculture, Forestry and Fisheries* **2(3)**, 60-65.

Neuwald D, Sestari I, Kitemann D, Streif J, Weber A e Brackmann A, 2014. Can mineral analysis be used as a tool to predict "Braeburn" browning disorders (BBD) in apple in commercial controlled atmosphere (CA) storage in Central Europe? *Erwerbs-Obstbau* **56**, 35–41.

Ngadze E, Icishahayo D, Coutinho T A, Van der Waals J, 2012. Role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid, and total soluble phenols in resistance of potatoes to soft rot. *Plant Disease* **96**, 186-192.

Nicolas J J, Richard-Forget F C, Goupy P M, Amiot M J e Aubert S Y, 1994. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **34**, 109–157.

Norman G, 2010. Likert scales, levels of measurement and the "laws" of statistics. *Advances in Health Sciences Education* **15**, 625-632.

Norma Portuguesa Definitiva (NP- 1421). 1977. Géneros Alimentícios derivados de frutos e produtos hortícolas: determinação da acidez.

Peppelenbos H W, Oosterhaven J, 1998. A theoretical approach on the role of fermentation in harvested plant products. *Acta Horticulturae* **464**, 381–386.

Pereira C, 2017. *Monitorização da Conservação de Pera 'Rocha': Avaliação de Características de Qualidade*. Lisboa, Portugal: Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa. Tese de Mestrado. Disponível em: [<https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/15118/1/DissertacaoCristianaPereira20804EAI.pdf>]. Acedido a 12.01.2018.

Pintó E, Lentheric I, Vendrell M e Larrigaudière C, 2001. Role of fermentative and antioxidant metabolisms in the induction of core browning in controlled-atmosphere stored pears. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**, 364–370.

Quelhas dos Santos J, 2015. *Fertilização – Fundamentos Agroambientais da Utilização dos Adubos e Corretivos*. Porto, Portugal: Publindústria Edições Técnicas, 537.

Rease J, Drake S, 2008. Effects of preharvest calcium sprays on apple and pear quality. *Journal of Plant Nutrition* **16**, 1807-2259.

Reid M S, 2002. Ethylene in postharvest technology. Em: Kader AA (Ed.). *Postharvest Technology Of Horticultural Crops*. Terceira edição. Oakland, EUA: University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, 157-158.

Ribeiro E P, Seravalli E, 2007. *Química de Alimentos*. Segunda edição. São Paulo, Brasil: Instituto Mauá de Tecnologia.

Richard-Forget F , Gaillard F , 1997. Oxidation of Chlorogenic Acid, Catechins, and 4-Methylcatechol in Model Solutions by Combinations of Pear (*Pyrus communis* Cv. 'Williams') Polyphenol Oxidase and Peroxidase: A Possible Involvement of Peroxidase in Enzymatic Browning. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **45**, 2472–2476.

Salvador A S, 2015. *Influência do Local de Produção de Pera 'Rocha', Armazenada em Atmosfera Controlada, na Incidência a Desordens de Escurecimento Interno e na Aptidão para Consumo em Fresco e Processado*. Lisboa, Portugal: Instituto Superior de Agronomia (Universidade de Lisboa), tese de mestrado.

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

Sams C, 1999. Preharvest factors affecting postharvest texture. *Postharvest Biology and Technology* **15**, 249-254.

Saquet A A, Streif J, Bangerth F, 2003. Energy metabolism and membrane lipid alterations in relation to brown heart development in 'Conference' pears during delayed controlled atmosphere storage. *Postharvest Biology and Technology* **30**, 123-132.

Siddiqui M W, 2018. *Preharvest Modulation of Postharvest Fruit and Vegetable Quality*. Primeira edição. San Diego, EUA: AcademicPress.

Silva F, Gomes M, Fidalgo F, Almeida D, 2009. Influência da atmosfera controlada diferida na actividade antioxidante e acastanhamentos internos da pêra 'Rocha'. *Actas Portuguesas da Horticultura* **1**, 198 - 205.

- Silva F, Gomes M H, Fidalgo F, Rodrigues J A, Almeida D, 2010. Antioxidant properties and fruit quality during long-term storage of 'Rocha' pear: effects of maturity and storage conditions. *Journal of Food Quality* **33**, 1-129.
- Soares J, Silva A, Marques H, 2003. Nutrição da pereira 'Rocha'. Associação Nacional de Produtores de Pera Rocha (Eds.). O Livro da Pera Rocha – Volume Segundo. Cadaval, Portugal: ANP, 129-171.
- Sobreiro J, 2016. Sobre a doença do acastanhamento interno de frutos. *Frutas, Legumes e Flores* **173**, 26-27.
- Streif J, Saquet A A, Xuan H, 2003. Ca-related disorders of apples and pears. *Acta Horticulturae* **600**, 223-230.
- Streif J, Xuan H, Saquet A A, Rabus C, 2001. CA-storage related disorders in "Conference" pears. *Acta Horticulturae* **553**, 635, 638.
- Suchanek M, Kordulska M, Olejniczak Z, Figiel H, Turek K, 2017. Application of low-field MRI for quality assessment of 'Conference' pears stored under controlled atmosphere conditions. *Postharvest Biology and Technology* **124**, 100-106.
- Tillmans J, 1927. Über die Bestimmung der elektrischen Reduktions-Oxydations-Potentiale und ihre Anwendung in der Lebensmittelchemie. *Zeitschrift für Untersuchung der Lebensmittel* **54**, 33-43.
- Thompson A K, 1998. *Controlled Atmosphere Storage of Fruits and Vegetables*. Bedford, Reino Unido: Cab International, 3-5; 193-196.
- Thompson A, 2016. *Fruit and Vegetables Storage: Hypobaric, Hyperbaric and Controlled Atmosphere*. Primeira edição. Huddersfield, Reino Unido: Springer briefs in food, health, and nutrition.
- Tomás-Barberán F, Espín J C, 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**, 853–876.
- Tukey J W, 1991. The philosophy of multiple comparisons. *Statistical Science* **6**, 100-116.
- Vámos-Vigyázó L, 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **15**, 49–127.
- Veltman R H, Larrigaudière C, Wichers H, Van Schaik A, Van der Plas L, Oosterhaven J, 1999a. PPO activity and polyphenol content are not limiting factors during brown core development in pears (*Pyrus communis* L. cv. 'Conference'). *Journal of Plant Physiology* **154**, 697–702.
- Veltman R H, Sanders M G, Persijn S, Pempelenbos H, Oosterhaven J, 1999b. Decreased ascorbic acid levels and brown core development in pears (*Pyrus communis* L. cv. Conference). *Physiologia Plantarum* **107**, 39 - 45.

- Veltman R H, 2002. *On the origin of internal browning in pears (Pyrus communis L. cv 'Conference')*. Wageningen, Alemanha: Universidade de Wageningen, tese de doutoramento.
- Verlinden B E, de Jager A, Lammertyn J, Schotsmans W, Nicolai B M, 2002. Effect of harvest and delayed controlled atmosphere storage conditions on core breakdown incidence in Conference pears. *Biosystems Engineering* **83**, 339-347.
- Waskiewicz A, Beszterda O, Golinski P, 2014. Non enzymatic antioxidants in plants. Em: Ahmad P (Ed.). *Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling*. Srinagar, India: Academic Press, 201–234.
- Waterhouse A L, 2002. Determination of Total Phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. I1.1.1. - I1.1.
- Watkins C B, 2006. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnology Advances* **24**, 389-409.
- Watkins CB, Bramlage W J e Cregoe B A, 1995. Superficial Scald of 'Granny Smith' Apples is Expressed as a Typical Chilling Injury. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **120**, 88-94.
- Wills R B, McGlasson W B, Graham D, Joyce D C, 2007. *Postharvest: an Introduction to the Physiology and Handling of Fruit, Vegetables and Ornamentals*. Quinta edição. Sydney, Australia: Cabi Publishing.
- World Apple and Pear Association (WAPA), 2014. Apple and Pear Exports by country and year (2003-2014). Disponível em: [http://www.wapa-association.org/asp/page_1.asp?doc_id=446]. Acedido a 06.07.2018.
- Xuan H, Streif J, Pfeffer H, Dannel F, Römheld H, Bangerth F, 2001. Effect of pre-harvest boron application on the incidence of CA-storage related disorders in 'Conference' pears. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **76**, 133-137.
- Xuan H, Streif J, Saquet A A, Bangerth F, 2003. Boron application affects respiration and energy status of "Conference" pears during CA-storage. *Acta Horticulturae* **628**, 167–174.
- Yahia E M, 2009. *Modified and Controlled Atmospheres for the Storage, Transportation, and Packaging of Horticultural Commodities*. Boca Raton, EUA: CRC Press.
- Zagory D, Kader A, 1988. Modified atmosphere packaging of fresh produce. *Food Technology* **42**, 72.
- Zerbini P E, Rizzolo A, Brambilla A, Grassi M, 2002. 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* **82**, 1007-1013.

Zude M, Herold B, Roger J M, Bellon-Maurel V e Landahl S, 2006. Non-destructive tests on the prediction of apple fruit flesh firmness and soluble solids content on tree and in shelf life. *Journal of Food Engineering* **77**, 254-260.

ANEXOS

Anexo I - Procedimento experimental

Para cada lote de 20 peras (20 peras do pomar do Bombarral, 20 de Mafra e 20 da Zambujeira), em que cada pera representa uma amostra, foram feitas as seguintes análises:

A. Determinação da firmeza

1. Com auxílio de uma “faca” ou “raspador” retirar a epiderme da pera, de dois lados opostos, na região equatorial da pera; 2. Encostar o penetrómetro (FT-327) perpendicularmente à pera e pressioná-lo firmemente até que o pericarpo seja perfurado. Quando a ponta de prova perfura a pera até ao traço, faz-se a leitura da firmeza (kg/0,5 cm²).

B. Preparação do sumo

1. Pesar cada fruto. 2. Cortar o fruto (procurando usar maioritariamente a zona central da pera, onde há maior probabilidade de ocorrer AI e tritirá-lo na liquidificadora até obter um sumo. 3. Colocar cada amostra num tubo de prolipropileno identificado (com capacidade máxima de 50 mL) e colocar em gelo à medida que se processam as amostras. No final, colocar cada lote devidamente identificado numa arca congeladora a -20°C.

C. Centrifugação

1. Calibração dos tubos com uma balança digital e um intervalo de erro de cerca de 1 a 5 mg para se poderem colocar tubos de massas semelhantes em pontos diametralmente opostos da centrífuga (Hermle Z 383 K). 2. Depois, seleccionar a velocidade de 9000 rpm, raio = 0,6 e temperatura de 4°C e deixar as amostras centrifugar durante 10 minutos. 3. Por último, decantar o sumo (eliminando a polpa) para um novo tubo de ensaio previamente identificado e datado. 4. Colocar cada amostra em gelo.

D. Determinação do Teor de Sólidos Solúveis

1. Calibrar o refractómetro (modelo HI 96801) com água destilada (amostra branco). 2. Com uma micropipeta retirar cerca de 200µL do sumo clarificado, e colocar uma pequena quantidade sobre a célula do refractómetro. 3. Fazer a leitura (°Brix) e apontar. 4. No fim de cada medição limpa-se a célula com água destilada e papel para secar.

E. Determinação da vitamina C

1. Colocar em goblés de 10 mL, 500 µL de sumo da amostra a analisar, e, 1500 µL de água destilada, perfazendo um volume total de 2000 µL de solução. 2. Pesar o conjunto do goblé + sumo diluído e apontar. 3. Adicionar gotas da solução de DCPIP com uma micropipeta ao sumo diluído, até que este mude de cor, para um tom muito suave de rosa (quando atinge o ponto de equivalência). Este ano o ponto de viragem foi considerado mais cedo do que no ano anterior, com vista a tornar mais rigorosa esta medição que é subjetiva. 4. Pesar novamente o conjunto (goblé + solução com DCPIP). 5.

Determinação, por subtração, da massa de DCPIP adicionada. 6. De seguida é feita uma solução padrão: coloca-se num goblé de 10 mL, 20 µL de uma solução padrão de Vitamina C (14,5 mg/mL) e 1980 µL de água destilada, perfazendo um volume total de 2000 µL (diluição de 1:100); Pesar o conjunto goblé + padrão de ácido ascórbico. Adiciona-se DCPIP até se atingir o ponto de equivalência, em que a solução incolor passa a azul; Pesar novamente o conjunto (goblé + ácido ascórbico com água e DCPIP). 7. Por subtração, determina-se assim a massa de DCPIP necessária para titular o padrão de ácido ascórbico.

Solução Padrão de Vitamina C

1. Pesar 29 mg de ácido ascórbico (em pó); 2. Diluí-lo em 2 mL de água destilada. 3. Congelar a solução padrão.

Solução 2,6- diclorofenolindofenol (DCPIP)

1. Pesar 29 mg de 2,6- diclorofenolindofenol (DCPIP) e diluir em 20 mL de água destilada. 2. De seguida, fazer uma diluição de 1:10 (10 mL da solução DCPIP e 90 mL de água esterilizada). 3. Colocar num frasco de 100 mL devidamente identificado a solução final de DCPIP.

F. Determinação do teor de fenóis

1. Colocar em cada cuvete de metacrilato 150 µL de sumo da amostra a analisar e 2850 µL de água destilada (diluição de 1:20), perfazendo um volume total de 3000 µL de solução. 2. Preparação do ensaio em branco: colocar 3000 µL de água destilada numa cuvete de metacrilato. 3. Efectuar a leitura no espectrofotómetro (modelo GeneQuant Pro) da absorvância: primeiro do ensaio em branco e depois a leitura para cada amostra, no comprimento de onda de 280 nm. 4. A concentração de fenóis totais expressa em equivalentes de ácido gálico foi determinada com recurso a uma recta de regressão previamente estabelecida no laboratório, cuja equação é $y = 0,0401x - 0,0545$, onde x é a concentração de ácido gálico (mg/L) e y a absorvância a 280 nm ($R^2 = 0,9975$).

G. Determinação da acidez titulável

1. Calibrar o potenciómetro com o eléctrodo (modelo pH 213), para dois valores de pH (4 e 7) utilizando as soluções de calibração de pH 7 e pH 4. Colocar a sonda de temperatura e o eléctrodo num goblé com água destilada; 2. Colocar a solução de NaOH 0,1N na bureta de 25 mL. Anotar o volume inicial; 3. Num goblé diluir 10 mL de sumo da amostra a analisar com 10 mL de água destilada, perfazendo um volume total de 20 mL (diluição de 1:2). 4. Titulação da amostra com a solução de NaOH 0,1N, até que a solução atinja um pH entre 8,10 e 8,20. Anota-se o volume final de NaOH gasto e calcula-se o teor de ácidos expressos em equivalentes de ácido málico pela equação $y = 0,67x$, em que y é a concentração de ácido málico (expressa em g/L de sumo) e x o volume total de titulante adicionado.

Solução de NaOH 0,1N

1. Colocar uma ampola de NaOH (em pó) num balão volumétrico de 1000 mL, perfazendo os 1000 mL com água esterilizada, obtendo uma solução de NaOH 0,1 N. 2. Tapar o balão volumétrico e agitar; 3. Colocar a solução num frasco de 1L devidamente identificado e armazenar em ambiente refrigerado (4-8°C).

H. Quantificação de Proteína – Método de Bradford

1. Centrifugar previamente os tubos de sumo a 9000 rpm durante 10 a 12 minutos, a 4°C; 2. Pipetar para cada tubo *ependorf* 20 µL de sumo, identificar os tubos com o respectivo número da amostra; 3. Adicionar a cada tubo *ependorf* 1000 µL de solução de Bradford e agitar; 4. Identificar a cuvete para cada tubo e colocar a respectiva reacção; 5. Preparar as diluições para obter a curva padrão para quantificação de proteína: preparar 7 diluições de 20 µL com diferentes concentrações (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 mg.mL⁻¹) a partir de uma solução stock de BSA de concentração 1,4 mg.mL⁻¹; 6. Colocar cada solução numa cuvete, sendo a primeira o branco (0 mg/mL BSA); 7. Proceder à leitura da absorvância a 595 nm no espectrofotómetro (modelo GeneQuant Pro), começando pelo branco, depois as soluções da curva padrão e por fim as amostras.

Solução de Bradford

1. Pesar 100 mg de Coomassie e colocar num balão de Erlenmeyer de 1000 mL; 2. Com uma proveta juntar 50 mL de etanol a 95% e agitar durante 10 min até dissolver; 3. Na hotte adicionar 100 mL de ácido fosfórico a 85% e 800 mL de água destilada; 4. Com um funil passar a solução para um balão volumétrico de 1000 mL e perfazer com água destilada; 5. Filtrar a solução com papel de filtro para um frasco de 1000 mL; 6. Colocar papel de alumínio à volta e identificar frasco; 7. Armazenar em meio refrigerado (4-8°C).

I. Determinação indirecta da actividade da Polifenoloxidase (PPO)

1. Transferir 250 µL de sumo, 725 µL de tampão de fosfato de sódio (pH=6) 0,05 M e 250 µL de catecol 0,1 M para o respectivo tubo *ependorf* identificado; 2. Preparar 2 ensaios em branco, substituindo o sumo por água; 3. Agitar a solução no tubo *ependorf* e colocar em cuvete; 4. Medir a absorvância a 546 nm para diferentes tempos: 0, 5, 10, 17, 40, 60 e 90 minutos, no espectrofotómetro (modelo UV-1200), à temperatura ambiente.

Solução de Catecol 0,1 M (Para cada 30 amostras) (preparação em fresco)

1. Pesar 119 mg de catecol na balança de precisão e juntar 10,82 mL de água destilada com uma micropipeta num tubo de vidro; 2. Agitar até dissolver o catecol.

Solução de Fosfato de Sódio 1M

1. Tarar um goblé de 100 mL e pesar 11,998 g de NaH₂PO₄ com a ajuda de uma espátula, colocar 50 mL de água destilada com uma proveta e agitar; 2. Colocar no agitador magnético com o íman, durante uns minutos até dissolver; 3. Colocar a solução num balão volumétrico

de 100 mL e perfazer os 100 mL com água destilada. Tapar e agitar; 4. Coloca-se a solução num frasco identificado e com data; 5. Repetir o procedimento para fazer uma solução de Na_2HPO_4 mas utilizado 14,2 g de Na_2HPO_4 ; 6. Num novo frasco de 100 mL, juntar 87,7 mL da solução preparada de NaH_2PO_4 e 12,3 mL da solução de Na_2HPO_4 , com provetas, até obter 100 mL de tampão fosfato de pH 6. Identificar o frasco com "Tampão Fosfato Sódio 1M"; 7. Num balão de *Erlenmeyer* de 500 mL colocar 25 mL de tampão fosfato 1M, e perfazer com água destilada (diluição 1:20). Agitar para misturar; 8. Num frasco de 500 mL previamente esterilizado no autoclave, colocar a nova solução de tampão fosfato 0,05 M pH 6.

J. Determinação indirecta da álcool desidrogenase (ADH)

1. Em *ependorfs* de 1 mL previamente identificados colocar com micropipetas: 800 μL de MES 100 mM (pH 6,5), 50 μL de NADH 1,6 mM, 50 μL de acetaldeído 80 mM e 100 μL de sumo; 2. Fazer o mesmo procedimento para preparar 2 amostras branco, substituindo a quantidade de sumo por água destilada; 3. Agitar os *ependorfs* com as soluções; 4. Colocar 1 mL de cada solução anterior em cuvete de metacrilato e 2 mL de água destilada (diluição de 1:3); 5. Proceder à leitura da absorvância a 340 nm no espectrofotómetro (Shimadzu UV1200) com intervalos de 1h entre cada leitura, durante 4 horas, à temperatura ambiente verificando-se a diminuição da absorvância devido à oxidação do NADH.

MES solução tampão pH=6,5 0,1M

1. Pesar e colocar 21,722 g de base ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NNaO}_4\text{S}$) num balão volumétrico de 100 mL e perfazer com água destilada até 100 mL. Agitar e colocar num frasco de 100 mL identificado; 2. Pesar e colocar 21,3255 g de ácido ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}\cdot\text{xH}_2\text{O}$) noutra balão volumétrico e perfazer até 100 mL com água destilada. Agitar e colocar num frasco de 100 mL; 3. Retirar para um balão volumétrico de 500 mL, 13,45 mL de solução ácido, 36,55 mL de solução base. Perfazer até 500 mL com água destilada; 4. Esterilizar o frasco com a solução de MES de 500 mL no autoclave; 5. Filtrar a solução com uma membrana com 0,2 μm , com a ajuda de uma seringa, para o frasco esterilizado; 6. Colocar o frasco em meio refrigerado.

Solução de NADH 1,6 mM

1. Dissolver 113,50 mg de NADH em 10 mL de NaOH 0,01 N e diluir com 90 mL de água esterilizada; 2. Colocar a solução de NADH num frasco de 100 mL em meio refrigerado.

Solução de acetaldeído 80 mM

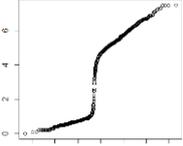
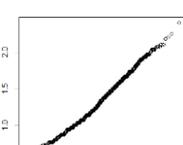
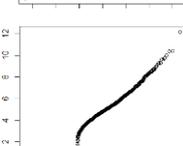
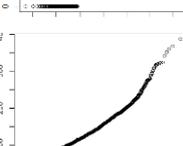
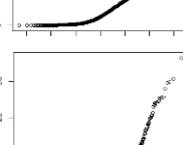
1. Num tubo colocar 1710,3 μL de água destilada e 89,7 μL de uma solução de acetaldeído a 98%, perfazendo um volume de 1800 μL ; 2. Fazer uma diluição de 1:10, e agitar; 3. Manter refrigerado.

Anexo II – Validação dos pressupostos necessários à realização do tratamento estatístico

II.I. Validação do pressuposto da normalidade das variáveis

Os testes utilizados para validar o pressuposto da normalidade das variáveis foram os testes de Shapiro-Wilk e gráficos *qqplot*. A normalidade é validada num teste de Shapiro-Wilk quando o p-value é maior do que 0,05, e é validada num gráfico *qqplot* quando este assume a forma de uma reta. De seguida apresentam-se os resultados obtidos após a realização destes testes e as respetivas conclusões, para cada parâmetro.

Tabela 30 – Resultados dos testes realizados à normalidade de cada parâmetro

Parâmetro	P-value do teste de Shapiro-Wilk	<i>qqplot</i>	Conclusão
Firmeza	$2,2 \times 10^{-16}$		Rejeita-se a hipótese da normalidade
Teor de sólidos solúveis (TSS)	$6,96 \times 10^{-11}$		Rejeita-se a hipótese da normalidade
Acidez titulável (AT)	$1,28 \times 10^{-5}$		Rejeita-se a hipótese da normalidade
Vitamina C	$2,2 \times 10^{-16}$		Rejeita-se a hipótese da normalidade
Fenóis totais	$2,2 \times 10^{-16}$		Rejeita-se a hipótese da normalidade
PPO	$2,2 \times 10^{-16}$		Rejeita-se a hipótese da normalidade
ADH	$2,2 \times 10^{-16}$		Rejeita-se a hipótese da normalidade

Nota – Esta tabela foi construída com recurso ao software R; o valor de α utilizado para o teste de Shapiro-Wilk foi de 0,05.

Tabela 31 - Resumo dos resultados dos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade das variâncias (teste de Brown–Forsythe) efetuados para validação dos pressupostos da ANOVA relativa à análise do fator conservação

	Validação da normalidade	Conclusão	Validação da homogeneidade das variâncias	Conclusão
	p-value		p-value	
Firmeza	2,2E-16	Não validado	2,20E-16	Não validado
Brix	7,0E-11	Não validado	4,18E-05	Não validado
AT	1,3E-05	Não validado	2,84E-02	Não validado
Vitamina C	2,2E-16	Não validado	2,20E-16	Não validado
Fenóis	2,2E-16	Não validado	2,34E-03	Não validado
PPO	2,2E-16	Não validado	2,20E-16	Não validado
ADH	2,2E-16	Não validado	2,20E-16	Não validado

Tabela 32 - Resumo dos resultados dos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade das variâncias (teste de Brown–Forsythe) efetuados para validação dos pressupostos da ANOVA relativa à análise do fator data

	Validação da normalidade	Conclusão	Validação da homogeneidade das variâncias	Conclusão
	p-value		p-value	
Firmeza	2,20E-16	Não validado	1,90E-07	Não validado
Brix	6,96E-11	Não validado	4,29E-03	Não validado
AT	1,28E-05	Não validado	1,17E-04	Não validado
Vitamina C	2,20E-16	Não validado	2,20E-16	Não validado
Fenóis	2,20E-16	Não validado	3,61E-04	Não validado
PPO	2,20E-16	Não validado	6,44E-01	Não validado
ADH	2,20E-16	Não validado	5,57E-01	Validado

Tabela 33 - Resumo dos resultados dos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade das variâncias (teste de Brown–Forsythe) efetuados para validação dos pressupostos da ANOVA relativa à análise do fator pomar

	Validação da normalidade	Conclusão	Validação da homogeneidade das variâncias	Conclusão
	p-value		p-value	
Firmeza	2,20E-16	Não validado	2,13E-05	Não validado
Brix	6,96E-11	Não validado	9,70E-06	Não validado
AT	1,28E-05	Não validado	6,84E-10	Não validado
Vitamina C	2,20E-16	Não validado	9,12E-02	Validado
Fenóis	2,20E-16	Não validado	2,96E-02	Não validado
PPO	2,20E-16	Não validado	2,20E-16	Não validado
ADH	2,20E-16	Não validado	1,59E-03	Não validado

Anexo III – Cálculo dos valores de F e de R² para o ajustamento linear das médias cada um dos parâmetros em relação à ‘Conservação’, com ‘Data’=7 e para cada um dos pomares.

Tabela 34 - Valores de F e de R² calculados para o ajustamento linear das médias cada um dos parâmetros, com ‘Data’=7 e ‘Pomar’ = ‘Zam’ (n=160)

	Firmeza	Brix	AT	Vitamina C	Fenóis	PPO	ADH
F de significância (n = 538)	0,00	0,31	0,04	0,50	0,02	0,05	0,31
R ² regressão (n = 538)	0,78	0,17	0,54	0,08	0,64	0,50	0,17

Tabela 35 - Valores de F e de R² calculados para o ajustamento linear das médias de cada um dos parâmetros, com ‘Data’=7 e ‘Pomar’ = ‘Bom’ (n=159)

	Firmeza	Brix	AT	Vitamina C	Fenóis	PPO	ADH
F de significância (n = 159)	0,02	0,40	0,74	0,77	0,92	0,32	0,38
R ² regressão (n = 159)	0,60	0,12	0,02	0,01	0,00	0,16	0,13

Tabela 36 - Valores de F e de R² calculados para o ajustamento linear das médias de cada um dos parâmetros, com ‘Data’=7 e ‘Pomar’ = ‘Ma’ (n=179)

	Firmeza	Brix	AT	Vitamina C	Fenóis	PPO	ADH
F de significância (n = 179)	0,00	0,50	0,27	0,40	0,52	0,30	0,36
R ² regressão (n = 179)	0,73	0,07	0,17	0,10	0,06	0,15	0,12

Anexo IV – Resultados do teste de Tukey realizado à interação entre ‘Conservação’ e ‘Pomar’

Tabela 37 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre a interação tipo de ‘Conservação’ versus ‘Pomar’ e ‘Firmeza’, ‘Brix’, ‘AT’ e ‘VitC’, para ‘Data’=0, ‘Cons’=]0,225[e ‘Pomar’ = ‘Zam’, ‘Ma’ e ‘Bom’ separadamente (n=20)

Firmeza				Brix				AT				Vitamina C			
Bom	E	6,69	a	Zam	B	12,52	a	Zam	A	1,79	a	Ma	C	7,57	a
Bom	H	6,30	ab	Ma	B	12,33	ab	Zam	B	1,76	ab	Bom	A	7,11	ab
Bom	I	6,18	abc	Ma	I	12,31	ab	Bom	A	1,74	abc	Zam	H	7,10	ab
Bom	D	6,07	abc	Zam	C	12,31	ab	Bom	B	1,68	abcd	Zam	I	6,26	bc
Bom	G	5,95	bcd	Zam	E	12,21	ab	Zam	C	1,63	abcde	Bom	I	5,99	cd
Bom	B	5,90	bcd	Ma	H	12,20	ab	Zam	D	1,58	abcdef	Bom	H	5,73	cde
Bom	F	5,88	bcd	Ma	F	12,16	ab	Bom	C	1,54	bcdefg	Ma	G	5,53	cdef
Bom	C	5,50	cdef	Zam	I	12,14	ab	Zam	E	1,51	cdefgh	Ma	B	5,41	cdef
Bom	A	5,49	cdef	Zam	H	12,07	ab	Bom	E	1,45	defghi	Ma	A	5,32	def
Zam	E	5,32	defg	Ma	D	12,05	ab	Zam	F	1,40	efghij	Zam	D	5,12	efg
Zam	H	5,30	defgh	Ma	E	12,04	ab	Bom	F	1,38	fghij	Zam	G	5,05	efg
Zam	F	5,29	defghi	Zam	D	12,04	ab	Bom	D	1,34	ghij	Bom	G	4,94	efgh
Zam	G	5,29	defghi	Ma	A	11,95	ab	Bom	I	1,32	ghijk	Ma	I	4,90	efgh
Zam	D	5,28	defghi	Zam	A	11,93	abc	Ma	A	1,32	ghijk	Zam	C	4,73	fgh
Zam	C	5,20	efghij	Ma	G	11,76	abcd	Zam	H	1,31	ghijk	Zam	A	4,43	ghi
Ma	B	5,11	fghij	Zam	G	11,54	abcde	Bom	H	1,29	hijk	Bom	B	4,41	ghi
Zam	A	4,95	fghijk	Zam	F	11,53	abcde	Zam	G	1,27	ijkl	Bom	D	4,17	hij
Ma	G	4,91	fghijk	Bom	H	11,48	abcde	Zam	I	1,27	ijkl	Zam	E	3,84	ijk
Zam	I	4,89	fghijk	Bom	A	11,38	bcde	Ma	B	1,26	ijkl	Ma	D	3,37	jk
Ma	E	4,70	ghijkl	Ma	C	11,32	bcde	Ma	F	1,23	ijkl	Zam	B	3,18	k
Ma	C	4,65	ghijkl	Bom	B	11,30	bcde	Bom	G	1,21	jkl	Bom	E	0,01	l
Zam	B	4,60	ghijkl	Bom	C	10,82	cdef	Ma	D	1,09	klm	Ma	E	0,01	l
Ma	H	4,56	hijkl	Bom	G	10,79	def	Ma	C	1,05	lm	Zam	F	0,01	l
Ma	F	4,55	ijkl	Bom	D	10,63	ef	Ma	H	0,97	m	Bom	F	0,01	l
Ma	I	4,54	jkl	Bom	I	10,49	ef	Ma	E	0,91	m	Bom	C	0,01	l
Ma	D	4,21	kl	Bom	F	9,93	f	Ma	I	0,90	m	Ma	H	0,00	l
Ma	A	4,04	l	Bom	E	9,93	f	Ma	G	0,87	m	Ma	F	0,00	l

Nota - Foram comparadas médias de diferentes tempos de ‘Conservação’. As letras A, B, C, D, E, F, G, H, I correspondem às datas de conservação, respetivamente: t_0 , t_{15-16} , t_{29-30} , t_{50-63} , t_{78-91} , $t_{107-120}$, $t_{141-154}$, $t_{162-175}$, $t_{212-225}$. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (n=20 peras).

Tabela 38 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre a interação tipo de 'Conservação' versus 'Pomar' e 'Fenóis', 'PPO e 'ADH, para 'Data'=0, 'Cons'=[0,225] e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' separadamente (n=20)

Fenóis				PPOMS				ADHMS			
Zam	I	260,41	a	Bom	I	8,87	a	Bom	H	20,49	a
Ma	F	234,83	ab	Bom	E	6,01	b	Zam	F	8,06	b
Zam	E	218,48	abc	Bom	C	5,27	bc	Bom	C	6,92	bc
Zam	F	204,34	bcd	Bom	B	4,64	bcd	Ma	I	5,33	cd
Zam	H	198,15	bcde	Bom	D	2,98	cde	Zam	C	4,43	de
Zam	B	193,98	bcde	Bom	G	2,88	cdef	Bom	F	4,21	de
Zam	C	186,91	cdef	Ma	A	2,66	cdefg	Bom	E	4,18	de
Bom	E	182,57	cdef	Bom	F	2,63	cdefg	Bom	I	3,97	def
Bom	F	172,52	defg	Ma	E	2,43	defg	Bom	D	3,86	defg
Ma	G	171,05	defgh	Ma	H	2,42	defg	Bom	G	3,52	defg
Zam	A	169,10	defgh	Bom	H	2,40	defg	Ma	B	3,50	defgh
Zam	D	167,96	defgh	Ma	G	2,08	defg	Ma	E	3,01	efghi
Ma	I	167,31	defgh	Ma	C	1,80	efg	Ma	G	2,95	efghi
Ma	B	165,34	defgh	Ma	I	1,60	efg	Zam	I	2,91	efghij
Bom	A	164,14	defgh	Bom	A	1,59	efg	Zam	H	2,90	efghij
Bom	H	158,23	efghi	Ma	D	1,58	efg	Ma	H	2,11	fghijk
Zam	G	150,75	fghij	Ma	B	1,41	efg	Zam	E	1,95	ghijk
Ma	E	146,66	fghijk	Zam	B	0,82	efg	Ma	F	1,93	ghijk
Bom	B	146,11	fghijk	Zam	D	0,60	efg	Zam	G	1,91	ghijk
Bom	I	139,38	ghijk	Zam	G	0,56	efg	Bom	B	1,55	hijk
Ma	H	128,66	hijk	Zam	E	0,51	efg	Ma	D	1,29	ijk
Ma	C	119,60	ijk	Zam	F	0,44	efg	Ma	A	1,24	ijk
Ma	A	118,43	ijk	Zam	H	0,39	efg	Zam	A	1,10	ijk
Ma	D	116,16	ijk	Ma	F	0,34	efg	Zam	D	1,06	ijk
Bom	C	114,69	jk	Zam	C	0,29	fg	Bom	A	0,98	jk
Bom	D	113,27	jk	Zam	I	0,25	fg	Ma	C	0,72	k
Bom	G	106,21	k	Zam	A	0,11	g	Zam	B	0,40	k

Nota - Foram comparadas médias de diferentes tempos de 'Conservação'. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (n=20 peras). As letras A, B, C, D, E, F, G, H, I correspondem às datas de conservação, respetivamente: t₀, t₁₅₋₁₆, t₂₉₋₃₀, t₅₀₋₆₃, t₇₈₋₉₁, t₁₀₇₋₁₂₀, t₁₄₁₋₁₅₄, t₁₆₂₋₁₇₅, t₂₁₂₋₂₂₅.

Anexo V – Resultados do teste de Tukey realizado à interação entre ‘Conservação’, ‘Pomar’ e ‘Data’

Tabela 39 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre a interação tipo de ‘Conservação’ versus ‘Data’ versus ‘Pomar’ e os parâmetros ‘Firmeza’, ‘Brix’ e ‘AT’, para ‘Data’=(0,7), ‘Cons’=[0,225] e ‘Pomar’ = ‘Zam’, ‘Ma’ e ‘Bom’ separadamente (n=20)

Firmeza			Brix			AT		
zero.Bom.E	6,69	a	sete.Zam.E	13,19	a	zero.Zam.A	1,79	a
zero.Bom.H	6,30	ab	sete.Zam.I	13,18	a	zero.Zam.B	1,76	ab
zero.Bom.I	6,18	abc	sete.Ma.B	13,07	ab	zero.Bom.A	1,74	abc
zero.Bom.D	6,07	abcd	sete.Ma.F	12,95	abc	sete.Zam.D	1,73	abc
zero.Bom.G	5,95	abcde	sete.Zam.D	12,95	abc	zero.Bom.B	1,68	abcd
zero.Bom.B	5,90	abcdef	sete.Ma.H	12,92	abc	sete.Zam.E	1,67	abcde
zero.Bom.F	5,88	abcdef	sete.Zam.H	12,86	abcd	zero.Zam.C	1,63	abcdef
sete.Bom.C	5,86	abcdefg	sete.Ma.I	12,73	abcde	sete.Zam.B	1,62	abcdef
zero.Bom.C	5,50	bcdefgh	sete.Ma.E	12,73	abcde	sete.Bom.F	1,60	abcdef
zero.Bom.A	5,49	bcdefghi	sete.Bom.F	12,62	abcdef	zero.Zam.D	1,58	bcdefg
zero.Zam.E	5,32	cdefghij	sete.Zam.G	12,62	abcdef	sete.Zam.F	1,58	bcdefg
zero.Zam.H	5,30	cdefghij	zero.Zam.B	12,52	bcdefg	sete.Zam.C	1,58	bcdefg
zero.Zam.F	5,29	cdefghij	sete.Ma.A	12,47	bcdefgh	sete.Bom.H	1,57	bcdefg
sete.Bom.B	5,29	cdefghij	sete.Zam.C	12,43	bcdefgh	zero.Bom.C	1,54	bcdefgh
zero.Zam.G	5,29	cdefghij	sete.Ma.D	12,37	bcdefghi	sete.Zam.G	1,54	bcdefgh
zero.Zam.D	5,28	cdefghij	zero.Ma.B	12,33	bcdefghi	sete.Bom.B	1,53	bcdefghi
zero.Zam.C	5,20	defghij	sete.Zam.B	12,32	bcdefghi	sete.Bom.E	1,52	bcdefghij
zero.Ma.B	5,11	efghijk	zero.Ma.I	12,31	bcdefghi	zero.Zam.E	1,51	cdefghijk
sete.Zam.B	5,11	efghijk	zero.Zam.C	12,31	bcdefghi	sete.Zam.H	1,46	defghijkl
zero.Zam.A	4,95	fghijkl	sete.Ma.G	12,30	bcdefghi	zero.Bom.E	1,45	defghijklm
zero.Ma.G	4,91	ghijkl	zero.Zam.E	12,21	bcdefghij	sete.Zam.I	1,45	defghijklm
zero.Zam.I	4,89	hijkl	zero.Ma.H	12,20	bcdefghij	sete.Bom.C	1,43	efghijklm
zero.Ma.E	4,70	hijkl	sete.Zam.F	12,17	bcdefghij	sete.Bom.D	1,43	efghijklm
zero.Ma.C	4,65	hijkl	zero.Ma.F	12,16	bcdefghij	sete.Bom.I	1,42	fghijklmn
zero.Zam.B	4,60	hijkl	zero.Zam.I	12,14	bcdefghij	zero.Zam.F	1,40	fghijklmno
zero.Ma.H	4,56	hijkl	zero.Zam.H	12,07	bcdefghijk	zero.Bom.F	1,38	fghijklmno
zero.Ma.F	4,55	hijkl	zero.Ma.D	12,05	bcdefghijk	zero.Bom.D	1,34	ghijklmnop
zero.Ma.I	4,54	ijkl	zero.Ma.E	12,04	bcdefghijk	zero.Bom.I	1,32	hijklmnopq
sete.Zam.C	4,47	jkl	zero.Zam.D	12,04	bcdefghijk	zero.Ma.A	1,32	hijklmnopq
zero.Ma.D	4,21	kl	sete.Bom.H	11,99	bcdefghijk	zero.Zam.H	1,31	hijklmnopq
zero.Ma.A	4,04	lm	zero.Ma.A	11,95	cdefghijk	zero.Bom.H	1,29	ijklmnopqr
sete.Zam.D	3,09	m	sete.Ma.C	11,94	cdefghijk	zero.Zam.G	1,27	jklmnopqr
sete.Ma.B	2,09	n	zero.Zam.A	11,93	cdefghijk	zero.Zam.I	1,27	klmnopqr
sete.Ma.A	2,08	n	zero.Ma.G	11,76	defghijkl	zero.Ma.B	1,26	lmnopqr
sete.Ma.C	1,21	no	sete.Bom.B	11,68	efghijklm	sete.Bom.G	1,25	lmnopqr
sete.Ma.D	1,03	o	sete.Bom.G	11,63	efghijklm	zero.Ma.F	1,23	lmnopqr
sete.Zam.G	0,99	o	zero.Zam.G	11,54	fghijklmn	zero.Bom.G	1,21	mnopqrs
sete.Zam.H	0,96	o	zero.Zam.F	11,53	fghijklmn	sete.Ma.B	1,18	nopqrs
sete.Zam.E	0,91	o	sete.Bom.E	11,52	fghijklmn	sete.Ma.F	1,17	nopqrs
sete.Bom.G	0,88	o	zero.Bom.H	11,48	ghijklmn	sete.Ma.G	1,16	opqrs
sete.Ma.F	0,86	o	zero.Bom.A	11,38	hijklmn	sete.Ma.A	1,16	opqrs
sete.Zam.F	0,84	o	zero.Ma.C	11,32	ijklmn	sete.Ma.D	1,12	pqrst
sete.Ma.G	0,83	o	sete.Bom.I	11,31	ijklmn	sete.Ma.C	1,11	pqrst
sete.Bom.F	0,82	o	zero.Bom.B	11,30	ijklmn	sete.Ma.E	1,10	pqrst
sete.Ma.E	0,78	o	sete.Bom.D	11,13	jklmn	sete.Ma.I	1,10	pqrst
sete.Zam.I	0,78	o	sete.Bom.C	11,01	klmno	sete.Ma.H	1,09	pqrst
sete.Bom.E	0,73	o	zero.Bom.C	10,82	lmno	zero.Ma.D	1,09	qrst
sete.Ma.I	0,70	o	zero.Bom.G	10,79	lmno	zero.Ma.C	1,05	rst
sete.Ma.H	0,63	o	zero.Bom.D	10,63	mno	zero.Ma.H	0,97	st
sete.Bom.D	0,61	o	zero.Bom.I	10,49	no	zero.Ma.E	0,91	t
sete.Bom.I	0,57	o	zero.Bom.F	9,93	o	zero.Ma.I	0,90	t
sete.Bom.H	0,26	o	zero.Bom.E	9,93	o	zero.Ma.G	0,87	t

Nota - Foram comparadas médias de diferentes tempos de ‘Conservação’. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (n=20 peras). As letras A, B, C, D, E, F, G, H, I correspondem às datas de conservação, respetivamente: t₀, t₁₅₋₁₆, t₂₉₋₃₀, t₅₀₋₆₃, t₇₈₋₉₁, t₁₀₇₋₁₂₀, t₁₄₁₋₁₅₄, t₁₆₂₋₁₇₅, t₂₁₂₋₂₂₅.

Tabela 40 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre a interação tipo de 'Conservação' versus 'Data' versus 'Pomar' e os parâmetros 'Vitamina C' e 'Fenóis', para 'Data'=(0,7), 'Cons'=[0,225] e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' separadamente (n=20)

Vitamina C			Fenóis		
sete.Zam.C	8,06	a	zero.Zam.I	260,41	a
sete.Zam.D	7,84	a	zero.Ma.F	234,83	ab
zero.Ma.C	7,57	a	zero.Zam.E	218,48	abc
zero.Bom.A	7,11	ab	sete.Zam.C	210,87	bcd
zero.Zam.H	7,10	ab	zero.Zam.F	204,34	bcde
sete.Bom.E	6,29	bc	zero.Zam.H	198,15	bcdef
zero.Zam.I	6,26	bc	zero.Zam.B	193,98	bcdefg
sete.Ma.E	6,14	bcd	zero.Zam.C	186,91	cdefgh
sete.Zam.G	6,04	cde	sete.Zam.B	186,81	cdefgh
zero.Bom.I	5,99	cdef	sete.Bom.C	185,74	cdefgh
sete.Ma.F	5,89	cdefg	sete.Zam.D	183,42	cdefgh
sete.Zam.H	5,80	cdefgh	zero.Bom.E	182,57	cdefghi
sete.Bom.C	5,79	cdefgh	zero.Bom.F	172,52	defghij
zero.Bom.H	5,73	cdefghi	zero.Ma.G	171,05	defghijk
sete.Zam.F	5,61	cdefghij	sete.Ma.B	170,60	defghijk
sete.Ma.G	5,55	cdefghijk	sete.Ma.I	169,90	defghijkl
zero.Ma.G	5,53	cdefghijk	zero.Zam.A	169,10	defghijkl
sete.Ma.D	5,49	cdefghijk	sete.Bom.H	168,91	defghijkl
zero.Ma.B	5,41	cdefghijkl	zero.Zam.D	167,96	efghijkl
zero.Ma.A	5,32	cdefghijklm	zero.Ma.I	167,31	efghijkl
sete.Bom.I	5,27	defghijklm	sete.Bom.I	166,26	efghijkl
zero.Zam.D	5,12	efghijklmn	zero.Ma.B	165,34	efghijkl
sete.Bom.D	5,09	efghijklmno	zero.Bom.A	164,14	efghijkl
zero.Zam.G	5,05	fghijklmnop	sete.Zam.I	161,00	fghijklm
sete.Ma.B	4,95	ghijklmnopq	sete.Bom.B	160,72	fghijklmn
zero.Bom.G	4,94	ghijklmnopq	sete.Zam.G	158,88	fghijklmno
zero.Ma.I	4,90	hijklmnopq	zero.Bom.H	158,23	fghijklmnop
sete.Ma.H	4,79	ijklmnopqr	sete.Zam.E	157,28	fghijklmnop
sete.Bom.H	4,78	ijklmnopqr	sete.Zam.H	152,92	ghijklmnopq
zero.Zam.C	4,73	jklmnopqr	sete.Zam.F	151,82	ghijklmnopq
sete.Ma.I	4,61	klmnopqr	zero.Zam.G	150,75	hijklmnopq
zero.Zam.A	4,43	lmnopqr	sete.Bom.G	149,50	hijklmnopq
zero.Bom.B	4,41	mnopqr	zero.Ma.E	146,66	hijklmnopqr
sete.Zam.E	4,36	mnopqr	zero.Bom.B	146,11	hijklmnopqr
sete.Bom.G	4,35	mnopqrs	sete.Ma.A	140,19	ijklmnopqr
zero.Bom.D	4,17	nopqrst	sete.Ma.F	139,90	jklmnopqr
sete.Ma.A	4,11	opqrstu	zero.Bom.I	139,38	jklmnopqr
sete.Zam.I	4,10	pqrstu	sete.Ma.E	130,05	jklmnopqrs
sete.Bom.B	4,07	pqrstu	zero.Ma.H	128,66	klmnopqrs
sete.Ma.C	4,04	qrstu	sete.Ma.C	127,43	lmnopqrs
sete.Zam.B	4,00	qrstu	zero.Ma.C	119,60	mnopqrs
zero.Zam.E	3,84	rstu	sete.Ma.H	119,40	mnopqrs
zero.Ma.D	3,37	stu	zero.Ma.A	118,43	nopqrs
sete.Bom.F	3,29	tu	sete.Bom.D	118,05	opqrs
zero.Zam.B	3,18	u	sete.Ma.D	116,41	opqrs
zero.Bom.E	0,01	v	zero.Ma.D	116,16	pqrs
zero.Ma.E	0,01	v	zero.Bom.C	114,69	qrs
zero.Zam.F	0,01	v	zero.Bom.D	113,27	qrs
zero.Bom.F	0,01	v	sete.Bom.F	111,45	qrst
zero.Bom.C	0,01	v	zero.Bom.G	106,21	rst
zero.Ma.H	0,00	v	sete.Bom.E	96,46	st
zero.Ma.F	0,00	v	sete.Ma.G	70,12	t

Nota - Foram comparadas médias de diferentes tempos de 'Conservação'. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (n=20 peras). As letras A, B, C, D, E, F, G, H, I correspondem às datas de conservação, respetivamente: t₀, t₁₅₋₁₆, t₂₉₋₃₀, t₅₀₋₆₃, t₇₈₋₉₁, t₁₀₇₋₁₂₀, t₁₄₁₋₁₅₄, t₁₆₂₋₁₇₅, t₂₁₂₋₂₂₅.

Tabela 41 - Valores das médias e grupos de significância obtidos após a realização dos testes de Tukey para a relação entre a interação tipo de 'Conservação' versus 'Data' versus 'Pomar' e os parâmetros 'PPO' e 'ADH', para 'Data'=(0,7), 'Cons'=[0,225] e 'Pomar' = 'Zam', 'Ma' e 'Bom' separadamente (n=20)

	PPO		ADH		
sete.Bom.E	11,41	a	zero.Bom.H	20,49	a
sete.Bom.I	11,10	a	sete.Ma.C	16,05	b
sete.Ma.D	9,39	ab	sete.Zam.C	12,63	c
zero.Bom.I	8,87	abc	sete.Bom.H	9,89	cd
sete.Bom.D	8,76	abcd	zero.Zam.F	8,06	de
sete.Bom.F	7,65	bcde	zero.Bom.C	6,92	def
sete.Ma.E	7,49	bcdef	sete.Bom.D	6,30	efg
sete.Ma.I	7,24	bcdefg	sete.Bom.I	5,91	efgh
sete.Ma.F	7,15	bcdefg	zero.Ma.I	5,33	efghi
sete.Ma.G	6,65	bcdefgh	sete.Bom.C	4,58	fghij
sete.Bom.G	6,26	cdefghi	zero.Zam.C	4,43	fghij
zero.Bom.E	6,01	defghi	zero.Bom.F	4,21	fghijk
sete.Bom.H	5,97	defghi	zero.Bom.E	4,18	fghijk
zero.Bom.C	5,27	efghij	sete.Ma.B	4,15	fghijkl
sete.Zam.F	5,08	efghijk	zero.Bom.I	3,97	fghijklm
zero.Bom.B	4,64	fghijkl	zero.Bom.D	3,86	ghijklmn
sete.Bom.C	4,55	ghijkl	sete.Ma.D	3,68	ghijklmno
sete.Ma.C	4,25	hijklm	zero.Bom.G	3,52	ghijklmnop
sete.Bom.B	4,17	hijklm	zero.Ma.B	3,50	ghijklmnop
sete.Zam.E	4,10	hijklm	sete.Bom.B	3,21	hijklmnopq
sete.Zam.I	4,03	hijklm	sete.Zam.I	3,17	hijklmnopq
sete.Ma.H	3,90	hijklm	sete.Zam.G	3,12	hijklmnopq
sete.Ma.A	3,43	ijklmn	zero.Ma.E	3,01	hijklmnopq
sete.Zam.H	3,00	jklmno	sete.Zam.D	2,98	hijklmnopq
zero.Bom.D	2,98	jklmno	zero.Ma.G	2,95	hijklmnopq
zero.Bom.G	2,88	jklmnop	zero.Zam.I	2,91	hijklmnopq
sete.Zam.G	2,74	jklmnop	zero.Zam.H	2,90	hijklmnopq
sete.Ma.B	2,71	jklmnop	sete.Bom.G	2,72	ijklmnopq
zero.Ma.A	2,66	jklmnop	sete.Ma.G	2,70	ijklmnopq
zero.Bom.F	2,63	jklmnop	sete.Zam.B	2,69	ijklmnopq
zero.Ma.E	2,43	jklmnop	sete.Bom.E	2,49	ijklmnopq
zero.Ma.H	2,42	jklmnop	sete.Zam.F	2,49	ijklmnopq
zero.Bom.H	2,40	klmnop	sete.Ma.F	2,42	ijklmnopq
zero.Ma.G	2,08	lmnop	sete.Zam.H	2,15	jklmnopq
zero.Ma.C	1,80	lmnop	sete.Ma.H	2,11	jklmnopq
zero.Ma.I	1,60	mnop	zero.Ma.H	2,11	jklmnopq
zero.Bom.A	1,59	mnop	sete.Bom.F	2,07	jklmnopq
zero.Ma.D	1,58	mnop	zero.Zam.E	1,95	jklmnopq
zero.Ma.B	1,41	mnop	zero.Ma.F	1,93	jklmnopq
sete.Zam.D	1,40	mnop	zero.Zam.G	1,91	jklmnopq
zero.Zam.B	0,82	nop	sete.Ma.I	1,65	jklmnopq
sete.Zam.C	0,66	nop	zero.Bom.B	1,55	jklmnopq
zero.Zam.D	0,60	nop	zero.Ma.D	1,29	klmnopq
zero.Zam.G	0,56	nop	zero.Ma.A	1,24	klmnopq
zero.Zam.E	0,51	op	zero.Zam.A	1,10	lmnopq
zero.Zam.F	0,44	op	zero.Zam.D	1,06	mnopq
sete.Zam.B	0,41	op	zero.Bom.A	0,98	mnopq
zero.Zam.H	0,39	op	sete.Ma.A	0,84	nopq
zero.Ma.F	0,34	op	sete.Ma.E	0,76	opq
zero.Zam.C	0,29	op	zero.Ma.C	0,72	opq
zero.Zam.I	0,25	op	sete.Zam.E	0,54	pq
zero.Zam.A	0,11	p	zero.Zam.B	0,40	q

Nota - Foram comparadas médias de diferentes tempos de 'Conservação'. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (n=20 peras). As letras A, B, C, D, E, F, G, H, I correspondem às datas de conservação, respetivamente: t₀, t₁₅₋₁₆, t₂₉₋₃₀, t₅₀₋₆₃, t₇₈₋₉₁, t₁₀₇₋₁₂₀, t₁₄₁₋₁₅₄, t₁₆₂₋₁₇₅, t₂₁₂₋₂₂₅.