

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

SIDIANE COLTRO

**EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO E DO ÁCIDO SALICÍLICO NA
ATIVIDADE DE POLIFENOLOXIDASE, PEROXIDASE E FENILALANINA
AMÔNIA-LIASE, NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E NA
INCIDÊNCIA DE PATÓGENOS EM MORANGOS DURANTE O
ARMAZENAMENTO**

Marechal Cândido Rondon

2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

SIDIANE COLTRO

**EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO E DO ÁCIDO SALICÍLICO NA
ATIVIDADE DE POLIFENOLOXIDASE, PEROXIDASE E FENILALANINA
AMÔNIA-LIASE, NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E NA
INCIDÊNCIA DE PATÓGENOS EM MORANGOS DURANTE O
ARMAZENAMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós Graduação em Agronomia – Nível
Mestrado como requisito de obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Costa
Braga

Marechal Cândido Rondon

2012

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus pela força, discernimento e serenidade que me destes para conclusão deste trabalho. Em especial à minha família, Dinor, Marina, Sonia, Solange e ao meu noivo João Paulo, pela compreensão e incentivo que me proporcionaram.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pela vida, pela sabedoria, saúde e pela oportunidade que me destes, essencialmente pelo conforto espiritual, transmitindo-me a segurança necessária para enfrentar meu caminho e seguir em frente, e ter concedido mais está etapa em minha vida.

À meus pais Dinor Coltro e Marina Laura Lubian Coltro, pela vida, educação, apoio e incentivo, permitindo que eu sempre fizesse com dedicação aquilo que amo.

Às minhas irmãs Sonia e Solange que sempre me incentivaram nesta caminhada, e aos meus sobrinhos que me fortaleceram com alegria.

Ao meu noivo, companheiro João Paulo, pela compreensão quando ausente, apoio e auxílio nas horas de decisão;

Ao Professor Dr. Gilberto Costa Braga, pela orientação para conclusão deste trabalho;

Ao Professor Dr. Neuton Tavares Escocard de Oliveira e Dr^a Glaucia Cristina Moreira pelo auxílio e co-orientação deste trabalho;

À Doutoranda Cristiane Claudia Meinerz e ao Professor Dr. Gilmar Franzener pelo auxílio nas análises experimentais, pela boa vontade e colaboração;

À professora Adriana Maria De Grandi por providenciar o material de estudo;

Ao professor Dr. José Renato Stangarlin e Dr. Odair José Kuhn pela contribuição para conclusão deste trabalho e paciência.

Às colegas Viviane Marcela Cellant, Laline Broetto, Fabiane Karine Barp, Jessica Ariane Vorpapel, Maria Cristina Copelo Rotilli e João Alexandre Lopes Dranski pela ajuda e apoio em momentos de precisão;

À CAPES – Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, pela concessão de bolsa auxílio;

À todos de forma geral que contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigada!

RESUMO

Efeito do tratamento térmico e do ácido salicílico na atividade de polifenoloxidase, peroxidase e fenilalanina amônia-liase, nas características físico-químicas e na incidência de patógenos em morangos durante o armazenamento.

O morango é um fruto que apresenta alta perecibilidade e, são bastante suscetíveis a danos físicos e ataque de fungos. O uso de fungicidas químicos tem sido o principal método para reduzir as doenças pós-colheita. Nesse sentido, métodos alternativos livres de produtos químicos devem ser utilizados em pós-colheita para manter a qualidade, prolongar a vida útil e diminuir a incidência de fungos. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do tratamento térmico pós-colheita e do ácido salicílico na resposta do morango relacionada à atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase, aos conteúdos de fenóis totais, antocianinas e ácido ascórbico e à incidência de patógenos durante o armazenamento dos frutos. Este estudo foi dividido em dois experimentos. No primeiro experimento, morangos cultivar Dover, foram tratados termicamente em estufa a 45°C por 3 horas e armazenados a 5 °C por 1, 7 e 14 dias e analisados. Após esses períodos, os frutos foram retirados da refrigeração e transferidos para ambiente a 20 °C por 2 dias para serem analisados novamente. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2x6), com 12 tratamentos e quatro repetições com 10 morangos por bandeja. No segundo experimento, morangos cultivar Dover foram tratados termicamente em estufa com circulação forçada de ar com 45°C por 3 horas e depois imergidos em solução de ácido salicílico 2,0 mMol L⁻¹ por 5 minutos, depois foram armazenados sob refrigeração (5°C) e após 1, 7 e 14 dias foram transferidos para ambiente a 20 °C por 2 dias para então serem analisados. O delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (4x3), com 12 tratamentos e quatro repetições. Foram avaliados a atividade de polifenoloxidase, peroxidase, fenilalanina amônia-liase, incidência de fungos, fenóis totais, antocianinas, ácido ascórbico, pH, acidez titulável, sólidos solúveis e perda de massa. Foi constatado que, o metabolismo pós-colheita de morangos cv. Dover foi modificado pela aplicação de tratamento térmico, pois os resultados mostraram que a atividade de polifenoloxidase, peroxidase e fenilalanina amônia-liase e os teores de ácido ascórbico, fenóis totais e antocianinas e a incidência de fungos foram inferiores em morangos tratados termicamente. O tratamento térmico resultou em maior acidez titulável, maior teor de sólidos solúveis e menor perda de massa. O tratamento térmico não proporcionou, segundo a incidência de fungos e a perda de massa, aumento da vida útil dos morangos, ficando limitado aos sete dias de armazenamento refrigerado. Entretanto, a adição de ácido salicílico ao tratamento térmico, se mostrou menos efetivo que os demais tratamentos para a maioria das variáveis analisadas, indicando ser desvantajoso. Porém, o choque térmico isolado mostrou-se mais efetivo em reduzir a atividade de peroxidase, apresentou atividade inferior de polifenoloxidase comparado ao controle aos 7+2 dias e não diferiu dos demais tratamentos aos 14+2 dias, se mostrou efetivo em manter níveis elevados de compostos fenólicos, antocianinas e ácido ascórbico até 7+2 dias.

Palavras-chave: (*Fragaria x ananassa* Duch), atividade enzimática, pós-colheita, vida útil, refrigeração.

ABSTRACT

Effect of heat treatment and salicylic acid on polyphenoloxidase, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activity, physical-chemistry characteristics and incidence of pathogens in strawberries during storage.

The strawberry is a fruit that is highly perishable and are very susceptible to physical damage and fungal attack. The use of fungicides has been the primary method for reducing post-harvest diseases. Accordingly, alternative methods free of chemicals must be used in post-harvest to maintain the quality and prolong the life reduce the incidence of fungi. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of heat treatment and post-harvest salicylic acid in the response of strawberry-related activities of the enzymes polyphenol oxidase and peroxidase, the contents of total phenols, anthocyanins and ascorbic acid and the incidence of pathogens during storage of fruits. This study was divided into two experiments. In the first experiment, Dover strawberries were treated thermally in an oven at 45°C for 3 hours and stored at 5°C for 1, 7 and 14 days and analyzed. After these periods, the fruit were removed and transferred to the cooling environment at 20°C for 2 days to be analyzed again. We used a completely randomized in factorial scheme (2x6), with 12 treatments and four replicates of 10 berries per tray. In the second experiment, strawberries Dover were heat treated in an oven with forced air at 45°C for 3 hours and after immersed in a solution of salicylic acid 2.0 mM L⁻¹ for 5 minutes; then they were stored under refrigeration (5°C) and after 1,7 and 14 days and transferred to a room at 20°C for 2 days and the be analyzed. The design was completely randomized in factorial scheme (4x3), with 12 treatments and four replications. Were evaluated the activity of polyphenoloxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia-lyase, the incidence of fungi, total phenols, anthocyanins, ascorbic acid, pH, titratable acidity, soluble solid and weight loss. It was found that the metabolism postharvest Dover cv. strawberry has been modified by application of heat treatment, because the results showed that the activity of polyphenoloxidase, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase and ascorbic acid, total phenols and anthocyanins, and the incidence of fungi were lower in heat-treated strawberries. The heat treatment resulted in higher acidity, higher soluble solids and lower mass loss. The heat treatment is not provided, according to the incidence of fungi and weight loss, increased shelf life of strawberries, being limited to seven days of storage. However, the addition of salicylic acid to heat treatment was less effective than other treatments for most variables, indicating that it is disadvantageous. However, heat shock alone was more effective in reducing the activity of peroxidase, polyphenoloxidase showed lower activity compared to the control at 7 +2 days and did not differ from other treatments at 14 +2 days, was effective in maintaining high levels phenolic compounds, anthocyanins and ascorbic acid up to 7 +2 days.

Key-words: (*Fragaria x ananassa* Duch), enzymatic activity, post-harvest, shelf life, refrigeration.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Atividade de polifenoloxidase e peroxidase observada nos morangos tratados termicamente após armazenagem a 5 °C por 1, 7 e 14 dias e após 1, 7 e 14 dias a 5 °C + 2 dias a 20 °C.....23
- Figura 2.** Atividade de fenilalanina amônia-liase observada nos morangos tratados termicamente após armazenagem a 5 °C por 1, 7 e 14 dias e após 1, 7 e 14 dias a 5 °C + 2 dias a 20 °C.....24
- Figura 3.** Incidência de fungos observado nos morangos tratados termicamente após armazenagem a 5 °C por 1, 7 e 14 dias e após 1, 7 e 14 dias a 5 °C + 2 dias a 20 °C.....26
- Figura 4.** Ácido ascórbico observado nos morangos tratados termicamente após armazenagem a 5 °C por 1, 7 e 14 dias e após 1, 7 e 14 dias a 5 °C + 2 dias a 20 °C.....27
- Figura 5.** Compostos fenólicos observado nos morangos tratados termicamente após armazenagem a 5 °C por 1, 7 e 14 dias e após 1, 7 e 14 dias a 5 °C + 2 dias a 20 °C.....28
- Figura 6.** Antocianina observada nos morangos tratados termicamente após armazenagem a 5 °C por 1, 7 e 14 dias e após 1, 7 e 14 dias a 5 °C + 2 dias a 20 °C.....29
- Figura 7.** pH e acidez titulável observado nos morangos tratados termicamente após armazenagem a 5 °C por 1, 7 e 14 dias e após 1, 7 e 14 dias a 5 °C + 2 dias a 20 °C.....30
- Figura 8.** Sólidos solúveis observado nos morangos tratados termicamente após armazenagem a 5 °C por 1, 7 e 14 dias e após 1, 7 e 14 dias a 5 °C + 2 dias a 20 °C.....31
- Figura 9.** Perda de massa observada nos morangos tratados termicamente após armazenagem a 5 °C por 1, 7 e 14 dias e após 1, 7 e 14 dias a 5 °C + 2 dias a 20 °C.....32
- Figura 10.** Incidência de fungos em morangos cv. Dover conforme os tratamentos e a armazenagem a 1, 7 e 14 dias a 5°C mais 2 dias a 20°C.....44
- Figura 11.** Perda de massa em morangos cv. Dover conforme os tratamentos e a armazenagem a 1, 7 e 14 dias a 5°C mais 2 dias a 20°C.....49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividade de Peroxidase e Polifenoloxidase em morangos cv. Dover conforme os tratamentos e a armazenagem a 1, 7 e 14 dias a 5°C mais 2 dias a 20°C.....	42
Tabela 2: Fenóis totais em morangos cv. Dover conforme os tratamentos e a armazenagem a 1, 7 e 14 dias a 5°C mais 2 dias a 20°C.....	45
Tabela 3: Antocianinas em morangos cv. Dover conforme os tratamentos e a armazenagem a 1, 7 e 14 dias a 5°C mais 2 dias a 20°C.....	46
Tabela 4: Ácido ascórbico em morangos cv. Dover conforme os tratamentos e a armazenagem a 1, 7 e 14 dias a 5°C mais 2 dias a 20°C.....	48

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 CAPÍTULO 1: Efeito do tratamento térmico pós-colheita na atividade de polifenoxidase, peroxidase e fenilalanina amônia-liase, nas características físico-químicas e na incidência de patógenos em morangos durante o armazenamento	14
2.1 Introdução	16
2.2 Material e Métodos.....	17
2.2.1 Amostra Experimental.....	17
2.2.2 Tratamento térmico, armazenamento e amostragem.....	17
2.2.3 Determinação da atividade de POD, PFO e FAL.....	18
2.2.3.1 Obtenção dos extratos enzimáticos.....	18
2.2.3.2 Atividade de Peroxidases (POD).....	18
2.2.3.3 Atividade de Polifenoxidase (PFO).....	19
2.2.3.4 Atividade de Fenilalanina amônia-liase (FAL)	19
2.2.4 Incidência de fungos.....	20
2.2.5 Ácido ascórbico	20
2.2.6 Compostos fenólicos totais.....	20
2.2.7 Antocianinas	20
2.2.8 Avaliação físico-química.....	21
2.3 Delineamento estatístico e análise dos resultados.....	21
2.4 Resultados e Discussão	22
2.4.1 Atividade de Polifenoxidase (PFO) e Peroxidase (POD).....	22
2.4.2 Atividade de Fenilalanina amônia-liase (FAL)	23
2.4.3 Incidência de fungos.....	25
2.4.4 Ácido Ascórbico (AA)	26
2.4.5 Compostos fenólicos totais	27
2.4.6 Antocianinas	28
2.4.7 Características Físico-químicas	29
2.5 Conclusão	32
3 CAPÍTULO 2: Efeito do tratamento térmico combinado ao ácido salicílico na atividade enzimática e na incidência de fungos em morangos.....	33
3.1 Introdução	35
3.2 Materiais e Métodos	36
3.2.1 Amostra experimental.....	36
3.2.2 Ensaio experimental	37
3.2.3 Determinação da atividade de POD e PFO	37
3.2.3.1 Obtenção dos extratos enzimáticos.....	37
3.2.3.2 Atividade de Peroxidases (POD).....	38
3.2.3.3 Atividade de Polifenoxidase (PFO).....	38
3.2.4 Incidência de fungos.....	39
3.2.5 Ácido ascórbico	39
3.2.6 Compostos fenólicos totais.....	39
3.2.7 Antocianinas	40
3.2.8 Variação de massa	40

3.2	Análise estatística	40
3.4	Resultados e Discussão	41
3.4.1	Atividade de Peroxidase (POD) e Polifenoloxidase (PFO).....	41
3.4.2	Incidência de fungos	43
3.4.3	Compostos fenólicos	44
3.4.4	Antocianinas	45
3.4.5	Ácido ascórbico	47
3.4.6	Variação de massa	48
3.5	Conclusão	49
	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) é uma planta de clima temperado, originária da América do Norte e do Chile e firmou-se como espécie economicamente expressiva nas regiões de clima frio do Brasil (SANTOS e MEDEIROS, 2003). Pertence a família Rosaceae, do gênero *Fragaria*, é resultante do cruzamento entre as espécies americanas *Fragaria chiloensis* e *Fragaria virginiana*, conhecida como *Fragaria x ananassa* Duch., que permite maior amplitude de adaptação e qualidade das cultivares comerciais (OLIVEIRA e SANTOS, 2003). O morango é boa fonte de vitamina C, antocianinas e compostos fenólicos que apresentam importante valor nutricional por atuarem como antioxidantes (CORDENUNSI, 2002; SHIN, LIU e NOCK, 2007; QUINATO, DEGÁSPARI e VILELA, 2007). Entretanto, após a colheita, apresenta-se como um fruto altamente perecível, são suscetíveis a danos físicos e ataque de fungos e, conseqüentemente, às reações de deterioração da cor, textura, sabor e composição nutricional durante o armazenamento, transporte e processamento (SANTOS e MEDEIROS, 2003).

O morango é o principal representante do grupo das pequenas frutas, em termos de área plantada, e está amplamente distribuído por diversos países do mundo, em regiões de clima temperado a subtropical (FILHO, ANTUNES e PÁDUA, 2007). Os maiores produtores mundiais são, em ordem decrescente, Estados Unidos, Turquia, Espanha e México (FAO, 2010). O Brasil apesar de não ficar entre os principais produtores mundiais apresenta área produtiva de pelo menos 3.500 ha plantados em todo o território. Apesar de não existirem dados oficiais acerca da área plantada e da produtividade, é cultivado principalmente nos Estados do Sul e do Sudeste, com destaque para Minas Gerais (maior produtor), São Paulo, Rio Grande do Sul e Espírito Santo (FILHO, ANTUNES e PÁDUA, 2007).

O morango é um pseudofruto originário do desenvolvimento do receptáculo da inflorescência, onde os verdadeiros frutos são os aquênios superficiais. Tem padrão respiratório não-climatérico, e apresenta vida-útil pós-colheita muito curta (menor que uma semana) devido as alterações que podem comprometer o seu valor comercial (FLORES-CASTILLANO, 2003; CHITARRA e CHITARRA, 2005; SANTOS, 2005).

Os produtos vegetais sofrem uma série de estresse quando colhidos. Devido a modificações no seu meio, o metabolismo é modificado, embora continue a funcionar. A ocorrência de um estresse oxidativo moderado, freqüentemente é acompanhada do aumento da atividade das enzimas antioxidantes de defesas, mas a produção de uma grande quantidade

de radicais livres pode causar danos e morte celular (ANDERSON, 1996). O sistema enzimático antioxidante é um conjunto de várias enzimas protetoras, eficientes na remoção de radicais livres. O sistema protetor endógeno pode ser enzimático (superóxido-dismutase, catalase, glutatona-peroxidase, entre outras) ou não-enzimático (vitamina E, vitamina C, ácido lipóico, carotenóides, flavonóides, entre outros) (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

Durante o armazenamento do morango, o estresse oxidativo pode levar ao escurecimento do pericarpo, o que reduz seu valor comercial. O escurecimento pós-colheita das frutas e produtos hortícolas é atribuído principalmente à oxidação de compostos fenólicos mediada por polifenoloxidase (PFO) e peroxidase (POD), à quinonas, que se polimerizam para produzir pigmentos escuros (melanina), oxidam também ácido ascórbico e degradam antocianinas. Fenilalanina amônia-liase (FAL), polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) são enzimas envolvidas na oxidação de fenóis e correlacionadas com mecanismos de defesa vegetal (LIMA et al., 2002; CHITARRA e CHITARRA, 2005; ZHANG, ZHANG e HUA, 2008).

As mais graves doenças pós-colheita de morangos são causadas por *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* e *Penicillium* sp. (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2003), e a conservação sob baixa temperatura não suprime o desenvolvimento dos mesmos. Após alguns segundos da ocorrência de qualquer ferimento no fruto ocorrem mudanças na estrutura das membranas, conduzindo à mistura de enzimas e substratos, aumentando a atividade respiratória e a produção de proteínas, levando a ativação de algumas enzimas como polifenoloxidase e peroxidase, que apresentam numerosas funções fisiológicas quando a planta ativa sistemas de auto defesa em resposta a estresse sofrido, bem como também aumenta a atividade da FAL na planta, que é a enzima chave na síntese de compostos fenólicos (CHITARRA e CHITARRA, 2005). O uso de fungicidas químicos tem sido o principal método para reduzir as doenças pós-colheita, entretanto, os consumidores têm se preocupado com os resíduos nos alimentos. Isto aumenta a necessidade de encontrar métodos alternativos para o controle de doenças pós-colheita e extensão da vida útil de prateleira (HERNÁNDEZ-MUÑOZ et al., 2008).

Nesse sentido, tem-se buscado alternativas de técnicas de armazenagem para manter a aparência, a qualidade nutricional e aumentar vida útil. Por isso, o tratamento térmico tem sido utilizado em tecnologia pós-colheita de frutas para a desinfestação de insetos, controle de patógenos e modificação da resposta das frutas a outros estresses (LURIE, 1998). Em morangos, o tratamento a 45°C por 3 horas promove redução da perda de massa fresca e da presença de patógenos (VICENTE et al., 2002) e reduz a atividade da fenilalanina amônia-liase (CIVELLO et al., 1997).

A combinação de métodos de conservação em pós-colheita pode mostrar efeito aditivo ao aumentar a eficiência de controle das podridões e prolongar a vida pós-colheita dos frutos. Muitas substâncias, como o ácido salicílico têm sido estudadas em aplicação isolada ou em combinação com outras técnicas de preservação pós-colheita (ZHANG et al., 2010; SHAFIEE, TAGHAVI e BABALAR, 2010; SRIVASTAVA e DWIVEDI, 2000). O ácido salicílico (AS) é um componente importante na via de transdução de sinal, induzindo respostas de defesa e, em frutos a aplicação exógena em concentrações não tóxicas, e em combinação com outros métodos, pode aumentar a resistência a patógenos (BABALAR et al., 2007; ZHANG et al., 2010). Os morangos também apresentam menor perda de peso e deterioração e maior firmeza quando tratados com AS em combinação com outro método (SHAFIEE, TAGHAVI e BABALAR, 2010).

Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do tratamento térmico pós-colheita e da aplicação de ácido salicílico na resposta do morango relacionada à atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase, peroxidase e polifenoloxidase, aos conteúdos de fenóis totais, antocianinas e ácido ascórbico, nas características físico-químicas e à incidência de patógenos durante o armazenamento dos frutos.

2 CAPÍTULO I: Efeito do tratamento térmico pós-colheita na atividade de polifenoloxidase, peroxidase e fenilalanina amônia-liase, nas características físico-químicas e na incidência de patógenos em morangos durante o armazenamento

RESUMO

O morango apresenta vida útil curta em pós-colheita, pois, apresenta elevada fragilidade e grande suscetibilidade ao ataque de agentes patogênicos, e o tratamento térmico pode ser um método alternativo e não químico trazendo benefícios na qualidade e na vida útil dos frutos. Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do tratamento térmico pós-colheita na resposta do morango relacionada à atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase, peroxidase e polifenoloxidase, aos conteúdos de fenóis totais, antocianinas e ácido ascórbico, nas características físico-químicas e à incidência de patógenos durante o armazenamento dos frutos. Morangos cultivar Dover foram tratados termicamente (45°C por 3 h) em estufa com circulação forçada de ar e armazenados a 5 °C por 1, 7 e 14 dias e analisados. Após esses períodos, os frutos foram retirados da refrigeração e transferidos para ambiente a 20 °C por 2 dias para serem analisados novamente. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2x6), com 12 tratamentos e quatro repetições com 10 morangos por unidade experimental, totalizando 480 frutos. O tratamento térmico reduziu a perda de massa com 9,83% do valor inicial, em comparação ao controle com redução de 10,73%. As atividades de polifenoloxidase, peroxidase e fenilalanina amônia-liase reduziram para morangos tratados termicamente, revelando efeito benéfico à integridade das paredes celulares. A incidência de fungos foi menor com tratamento térmico (22,50%) em comparação ao controle com 50% aos 14 dias a 5°C+ 2 dias a 20°C. O tratamento térmico reduziu os teores de ácido ascórbico, fenóis totais e antocianinas. O conteúdo de ácido ascórbico para morangos tratados termicamente aos 14 dias sob refrigeração foi de 39,73 mg 100 g⁻¹ comparado ao controle com 51,36 mg 100 g⁻¹. O tratamento térmico aumentou o teor de acidez titulável e sólidos solúveis, o teor de sólidos solúveis para o controle foi de 4,25°Brix contra 5,31°Brix para tratados termicamente aos 14 dias sob refrigeração. Em geral, o tratamento térmico seguido de armazenamento refrigerado melhora a aparência do morango ao longo do período de armazenamento, porém, resulta na perda de qualidade nutricional.

Palavras-chave: (*Fragaria x ananassa* Duch), atividade enzimática, pós-colheita, refrigeração.

Effect of postharvest heat treatment on the activity of polyphenoloxidase, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase, the physico-chemical characteristics and the incidence of pathogens in strawberries during storage

ABSTRACT

The strawberry has short shelf life in post-harvest, therefore, show high fragility and high susceptibility to attack by pathogens, and heat treatment may be an alternative non-chemical and bringing benefits in the quality and shelf life of fruits. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of heat treatment on postharvest strawberry response related to the activity of enzymes phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenoloxidase, the contents of total phenols, anthocyanins and ascorbic acid, on the physical-chemical and the incidence of pathogens during storage of fruit. Strawberries Dover were heat treated (45° C for 3 h) in an oven with forced air circulation and stored at 5° C for 1, 7 and 14 days. After these periods, the fruit were removed and transferred to the cooling environment at 20° C for 2 days to be analyzed again. We used a completely randomized in factorial scheme (2x6), with 12 treatments and four replicates of 10 berries per experimental unit, total of 480 fruits. The heat treatment reduced the mass loss, to 9,83% from baseline, compared to the control with a reduction of 10,73%. The activities of polyphenoloxidase, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase reduced to strawberry treated, revealing the beneficial effect the integrity of cell walls. The lower incidence of fungi was heat treated (22,50%) compared to control 50% to 14 days at 5°C for 2 days at + 20°C. The heat treatment decreased the concentration of ascorbic acid, total phenols and anthocyanins. The amount of ascorbic acid treated strawberries for 14 days under refrigeration was 39,73 mg 100 g⁻¹ compared to a control with 51,36 mg 100 g⁻¹. The heat treatment increased the titratable acidity and soluble solids, soluble solids content for the control was 4,25°Brix against 5,31°Brix heat-treated for 14 days under refrigeration. In general, the heat treatment followed by refrigerated storage strawberry appearance improves over the period of storage, however, results in loss of nutritional value.

Key-words: (*Fragaria x ananassa* Duch), enzymatic activity, post-harvest, cooling.

2.1. Introdução

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) apresenta elevado metabolismo fisiológico e padrão respiratório não-climatérico, caracterizando frutos extremamente perecíveis. Além disso, a elevada fragilidade e grande suscetibilidade ao ataque de agentes patogênicos condicionam o morango a uma vida útil curta, geralmente menor do que uma semana sob refrigeração (CHITARRA e CHITARRA, 2005). O uso de fungicidas químicos tem sido o principal método para reduzir as doenças pós-colheita, transferindo ao morango uma imagem negativa junto ao consumidor, que têm se preocupado cada vez mais com resíduos químicos nos alimentos (HERNÁNDEZ-MUÑOZ et al., 2008).

Durante o armazenamento do morango, o estresse oxidativo pode levar ao escurecimento do pericarpo, o que reduz seu valor comercial. O escurecimento pós-colheita das frutas e produtos hortícolas é atribuído principalmente à oxidação de compostos fenólicos mediada por polifenoloxidase (PFO), convertendo-os a quinonas, que se polimerizam para formação de melaninas (pigmentos escuros). A oxidação de fenóis resulta também da atividade de peroxidase (POD), que está relacionada, por exemplo, no desenvolvimento de aromas estranhos durante o armazenamento (LIMA et al., 2002; TORALLES et al., 2004; CHITARRA e CHITARRA, 2005).

A enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) é precursora de uma grande variedade de compostos fenólicos que realizam várias funções essenciais na planta, além de converter a fenilalanina em substratos fenólicos livres (CHITARRA e CHITARRA, 2005), tais como ácido clorogênico e ácido cafeico, os quais são utilizados como substratos para as reações de escurecimento via PFOs (NGUYEN, KETSA e VAN DOORN, 2003). Com base na possível relação causal entre a atividade da FAL e o escurecimento enzimático via PFOs, o uso de tratamentos pós-colheita com efeito de inibição da atividade da FAL pode ser uma alternativa para a prevenção do escurecimento enzimático em frutas armazenadas. Civello et al. (1997) estudando a resposta de morangos submetidos ao tratamento térmico (48°C por 3h) observaram que houve redução da FAL em morangos tratados em comparação ao controle.

Tratamentos térmicos têm sido utilizados em tecnologia pós-colheita de frutas para a desinfestação de insetos, controle de patógenos e modificação de respostas fisiológicas de frutas a outros estresses, através de mudanças na expressão gênica e na síntese protéica (LURIE, 1998). O estresse térmico pode induzir o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), que atuam como sinais e mensageiros secundários para a ativação de respostas de estresse e de vias de defesa (VICENTE et al., 2006; ERKAN, WANG e WANG, 2008). A

principal resposta a esse aumento no acúmulo de ROS é a produção de enzimas antioxidantes (inativadoras de radicais de oxigênio-ROS) como superóxido dismutase (SOD), peroxidases (POD) e catalase (CAT) (MITTLER et al., 2004), que tem a função de manter o nível intracelular de ROS sob controle rígido, uma vez que o acúmulo maior produz danos e morte de células (DEL RÍO et al., 1998), acelerando as reações de senescência do fruto, entre elas as oxidações via PFOs. No caso de morangos, o tratamento a 45°C por 3 horas em estufa pode reduzir a perda de massa fresca e presença de patógenos, trazendo benefícios na qualidade e na vida útil dos frutos (VICENTE et al., 2002; VICENTE et al., 2006).

Pouco se sabe ainda a respeito do escurecimento enzimático e da atividade da FAL em morangos submetidos ao tratamento térmico pós-colheita. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito do tratamento térmico pós-colheita na resposta do morango relacionada à atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase, peroxidase e polifenoloxidase, aos conteúdos de fenóis totais, antocianinas e ácido ascórbico, nas características físico-químicas e à incidência de patógenos durante o armazenamento dos frutos.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Amostra experimental

Foram utilizados 480 morangos cultivar Dover, cultivados em sistema orgânico e adquiridos de produtor comercial local. Após colhidos, os frutos foram transportados ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Unioeste, Campus de Marechal Cândido Rondon, PR, onde foi conduzido o experimento. Os frutos foram selecionados para serem utilizados aqueles com 75% da cor vermelha superficial, tamanho e cor uniformes e livres de danos físicos e infecções fúngicas.

2.2.2. Tratamento térmico, armazenamento e amostragem

Os frutos foram distribuídos em grupos de 10, colocados em bandejas de isopor em camada única e coberto com um filme de PVC, constituindo as unidades experimentais. Em seguida, foram tratados termicamente em estufa de ar a 45 °C por 3 h. Depois dos tratamentos,

os frutos embalados foram transferidos para uma câmara a $5\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ com 90-95% de UR e um grupo de unidades experimentais foi imediatamente amostrado para análises após intervalos de 1, 7 e 14 dias de armazenagem. Os correspondentes controles, não tratados termicamente, foram diretamente armazenados a 5 °C para serem também amostrados a 1, 7 e 14 dias. Em ambos os casos (morangos tratados e controle) outro grupo de unidades experimentais, após os intervalos de armazenagem de 1, 7 e 14 dias, foi retirado da refrigeração e transferido para outro ambiente a aproximadamente 20 °C por 2 dias com 60-65% de UR, após os quais tiveram os morangos também amostrados para análises.

Os morangos amostrados foram analisados imediatamente (análises físico-químicas) após os períodos, conforme os tratamentos e controle, ou cortados em quatro pedaços, reunidos e armazenados sob congelamento a -18 °C até as demais análises. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.2.3. Determinação da atividade de POD, PFO e FAL

2.2.3.1. Obtenção dos extratos enzimáticos

Amostras de morango (5 g) foram homogeneizadas em 3 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) (tampão de extração) em almofariz de porcelana previamente resfriado e acrescentado 0,02 g de polivinil pirrolidona (PVP) durante a maceração. O homogeneizado foi centrifugado à 14.500 rpm durante 20 min. O sobrenadante obtido, considerado como a fração contendo as proteínas solúveis, foi armazenado a -18 °C para posteriores análises bioquímicas (LUSSO e PASCHOLATI, 1999).

2.2.3.2 Atividade de Peroxidases (POD)

A atividade de peroxidases foi determinada a 30 °C , através do método espectrofotométrico direto (HAMMERSCHMIDT et al., 1982). A mistura da solução consistiu de 1 mL do substrato para enzima (306 μL de peróxido de hidrogênio p.a., 12,5 mL de guaiacol puro 2% alcoólico e 87,5 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0)) e 0,2 mL de preparação enzimática do morango. A reação foi seguida em espectrofotômetro modelo TU - 1880 Double Beam UV-VIS Spectrophotometer, a 470 nm, pelo período de 2 min, com as medidas de densidade óptica tomadas a cada 15 seg, iniciando logo após a adição da

preparação enzimática ao substrato. A atividade foi determinada pela variação ocorrida entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear, e expressa em variação (Δ = delta) de unidade de absorvância $\text{abs min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de peso fresco⁻¹.

2.2.3.3 Atividade de Polifenoloxidase (PFO)

A atividade das polifenoloxidases (PFO) foi determinada de acordo com metodologia de Duangmal e Apeten (1999), adaptada por Kuhn (2007). O ensaio constituiu em mensurar a oxidação do catecol convertido em quinona, reação esta mediada pela enzima polifenoloxidase. O substrato foi composto por catecol, na concentração de 20 mM com 0,1101 g dissolvido em 50 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8), formando uma solução de catecol 0,02 M. A reação se desenvolveu misturando-se 900 μL de substrato e 100 μL da preparação enzimática. A temperatura da reação foi de 30 °C e as leituras em espectrofotômetro modelo TU - 1880 Double Beam UV-VIS Spectrophotometer, a 420 nm, foram realizadas de forma direta por um período de 1 min. O diferencial entre o aumento constante da leitura da absorvância foi utilizado para a determinação da atividade. A atividade foi determinada pela variação ocorrida entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear, e expressa em Δ de $\text{abs min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de peso fresco⁻¹.

2.2.3.4 Atividade de Fenilalanina amônia-liase (FAL)

A atividade de fenilalanina amônia-liase foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Umesha (2006), na qual 50 μL da preparação enzimática foram acrescidos de 450 μL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8) e 500 μL de uma solução de L-fenilalanina 0,05 M (825,9 mg diluído em 100 mL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8)). Incubou-se essa mistura a 40°C durante 2 h. Ao final desse período adicionou-se 60 μL de HCl 5 M para cessar a reação, seguindo-se de leitura em espectrofotômetro modelo TU - 1880 Double Beam UV-VIS Spectrophotometer, a 290 nm. A atividade de fenilalanina amônia-liase consistiu da diferença entre a absorvância da mistura contendo amostra e do controle (50 μL de extrato protéico, 900 μL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH8,8) e 60 μL de HCl 5 M), a qual foi plotada em curva padrão para ácido trans-cinâmico ($y = 0,0095x + 0,0255$, onde y é a absorvância a 290 nm e x a concentração de ác. trans-cinâmico (μg)) e expressa em mg de ácido trans-cinâmico $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{gpf}^{-1}$.

2.2.4 Incidência de fungos

Os morangos foram avaliados visualmente quanto a presença ou ausência de fungos nos dias de análise, foram considerados a presença de fungos os morangos que apresentavam micélio fúngico ocupando 5% do fruto, e os resultados expressos em porcentagem de morangos infectados segundo metodologia de Hernández-Muñoz et al. (2006). A identificação dos fungos foi feita por microscopia segundo Franco e Landgraf (1996).

2.2.5 Ácido ascórbico

O teor de vitamina C foi determinado por titulação com 2,6-dicloro-fenol-indofenol (DCFI), de acordo com Benassi e Antunes (1988). Em um béquer foi adicionado 10 mL da solução padrão seguido da adição de 50 mL de ácido oxálico a 1% e homogeneizado, este serve para calibração. Em seguida, foi homogeneizado 2 gramas da amostra de morango e 50 mL de ácido oxálico a 1%. Após essas etapas, foi realizada titulação com solução padrão de DCFI. E os resultados foram expressos em mg 100g⁻¹ de ácido ascórbico.

2.2.6 Compostos fenólicos totais

A determinação do teor de fenólicos totais foi realizada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999). As amostras (1 g) foram extraídas em metanol, seguido de homogeneização e filtração. Depois, 100 µL do extrato diluído foram misturados com 2,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (FC), deixando reagir por 3 minutos. Depois foi adicionado 0,25 mL de solução de carbonato de sódio 7,5%. As amostras ficaram 5 min em banho-maria à temperatura de 50°C, e em seguida foi medido através da leitura da absorbância em espectrofotômetro modelo TU - 1880 Double Beam UV-VIS Spectrophotometer, no comprimento de onda de 760 nm. A leitura linear da curva padrão foi empregada com solução de ácido gálico para realização de quantificação dos fenóis, e os resultados foram expressos em mg equ. ác. gálico g⁻¹.

2.2.7 Antocianinas

A determinação do conteúdo de antocianina foi feita através de metodologia descrita por Sims e Gamon (2002). As amostras (1 g) foram extraídas em 3 mL de solução (80 mL de

acetona e 20 mL de tampão Tris-HCl 0,025 M), e filtradas. Realizou-se leitura direta do sobrenadante em espectrofotômetro modelo TU - 1880 Double Beam UV-VIS Spectrophotometer, a 537 nm. Os resultados obtidos expressos em mg antocianinas totais gpf^{-1} .

2.2.8 Avaliação físico-química

- *Sólidos solúveis (SS)*

Foi determinado segundo a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2005), cujos resultados foram expressos em °Brix, por meio de um refratômetro digital de bancada tipo Abbe WYA modelo: 2WA-J.

- *Acidez titulável (AT)*

Foi determinada segundo a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2005), mediante titulação de 5 g da amostra diluída em 45 mL de água destilada, acrescida de 3 gotas de fenolftaleína alcoólica 1%, utilizando-se solução de NaOH a 0,1N para titulação e os resultados expressos em g ácido cítrico 100 g^{-1} .

- *Potencial hidrogeniônico*

Os níveis de potencial hidrogeniônico (pH) foram determinados segundo a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2005), com auxílio de um potenciômetro digital, modelo AD 1000 pH/mV/ Temperature Bench Meter.

- *Variação de massa*

Foi obtida por pesagens nos intervalos de observações durante a armazenagem, através de balança semi-analítica, os resultados forma expressos em porcentagem, estimados a partir das diferenças de massa das unidades experimentais entre o momento da instalação do experimento e o dia de cada avaliação.

2.3 Delineamento Estatístico e Análise dos Resultados

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2×6 e quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos pela combinação do tratamento térmico

e do controle com as seis condições de armazenamento (refrigeração por 1, 7 e 14 dias e refrigeração por 1, 7 e 14 dias mais 2 dias a 20 °C).

Os efeitos de tratamento térmico, condição de armazenamento e de interação foram verificados por Análise de Variância (ANOVA). A comparação entre tratamentos térmicos foi avaliada pelo teste F (Fisher) da ANOVA inicial. O nível de significância de 7% foi adotado em todos os procedimentos. Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa SAEG 9.1 (UFV, 2007).

2.4 Resultados e Discussão

2.4.1 Atividade de Polifenoloxidase (PFO) e Peroxidase (POD)

De acordo com a Figura 1, não ocorreu efeito significativo do tratamento térmico sobre a atividade de PFO durante o armazenamento dos morangos a 5 °C, quando comparado com o tratamento controle, verificado nos três períodos de avaliação, sugerindo que a baixa temperatura causou inibição da resposta do fruto ao estresse fisiológico provocado pelo aquecimento. Porém, quando os morangos foram transferidos para o ambiente a 20 °C por dois dias, o tratamento térmico proporcionou menor atividade de PFO, comparado ao controle, na avaliação do primeiro dia de armazenagem, não ocorrendo tal efeito nos demais períodos de avaliação, revelando o efeito benéfico do tratamento térmico no início do armazenamento. Isso mostra que provavelmente, no início do armazenamento, o estresse térmico aplicado tenha mantido sob controle a integridade das paredes celulares, impedindo o aumento do nível de compostos fenólicos livres e, conseqüentemente, o aumento da atividade de PFO por reações de oxidação.

Com relação a POD (Figura 1), foi verificado menor atividade nos morangos tratados termicamente apenas aos 14 dias de armazenamento refrigerado, comparado ao controle. Embora possa ser induzida com o aumento de ROS devido a estresses oxidativos, como fenóis sendo oxidado por PFOs, esse resultado não teve relação a atividade de PFO no mesmo período, cujo resultados não apresentaram diferenças significativas. Para os morangos submetidos a mais dois dias em ambiente a 20 °C, aos sete dias de armazenamento houve atividade significativamente menor de POD e aos 14 dias a atividade foi maior para os frutos tratados termicamente, comparado ao controle, ou seja, com elevação da atividade de POD

nos morangos tratados termicamente e diminuição nos morangos não tratados do sétimo para décimo quarto dia de armazenamento.

O aumento da atividade de POD está relacionado com o aumento no acúmulo de peróxidos (ROS) e de ácidos fenólicos livres resultantes de estresses oxidativos abióticos como devido ao calor, ou bióticos, como devido ao desenvolvimento de patógenos (HIRAGA, et al., 2001). Isso implica em supor que os morangos tratados termicamente tiveram sua senescência atrasada, pois apresentaram pico de atividade de POD posterior aos morangos não tratados. De acordo com Vicente et al. (2006), o menor incremento da atividade de POD encontrado em frutos tratados termicamente pode indicar que esses frutos sofreram menos danos fisiológicos do que frutos não tratados. Uma redução similar da atividade de POD, com a redução da PFO e FAL, foi encontrada em alface após a aplicação do tratamento térmico, reduzindo assim o escurecimento enzimático (LOAIZA-VELARDE et al., 1997).

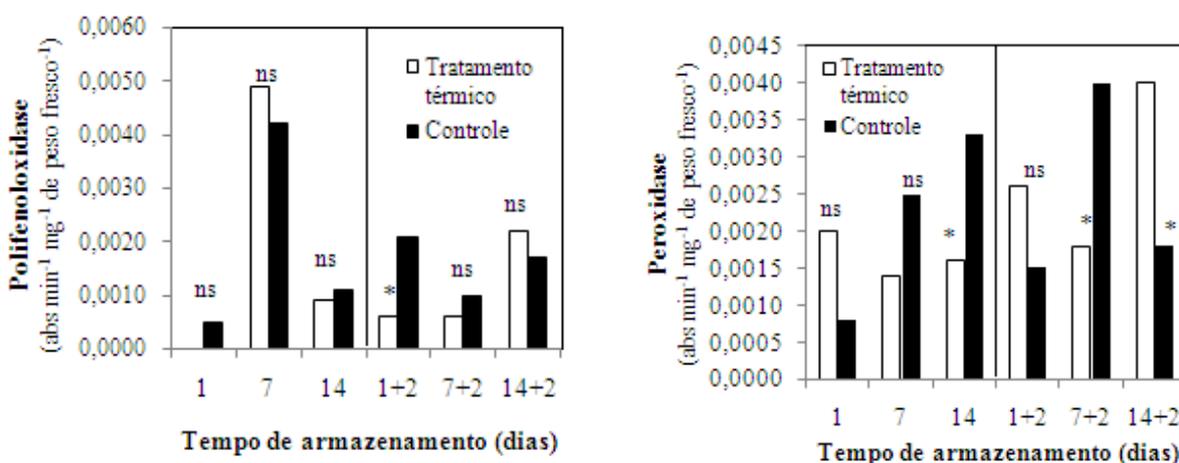


Figura 1. Atividade de polifenoloxidase e peroxidase observada nos morangos tratados termicamente após armazenagem a 5 °C por 1, 7 e 14 dias e após 1, 7 e 14 dias a 5 °C + 2 dias a 20 °C. *Médias alocadas nas colunas diferem entre si pelo teste F ao nível de 7% de probabilidade. ^{ns} Não significativo (P>0,07).

2.4.2 Atividade de Fenilalanina amônia-liase (FAL)

De acordo com a Figura 2, a atividade da fenilalanina amônia-liase foi inferior em frutos tratados termicamente aos 14 dias de armazenamento refrigerado e após 2 dias quando transferidos à condição ambiente. Sendo assim, o estresse térmico promoveu efeito benéfico em morangos, com a redução dos processos de senescência dos frutos e manutenção da integridade da parede celular, pois, a atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) converte a

fenilalanina em substratos fenólicos livres para a ação de PFOs, o aumento da atividade da FAL é indicativo de condições de estresse nos tecidos vegetais (CHITARRA e CHITARRA, 2005). Condição de estresses nos tecidos vegetais desencadeia a transcrição do RNA mensageiro que codifica a FAL, aumentando sua quantidade na planta, o que, estimula a síntese de compostos fenólicos. A atividade da FAL aumenta com o amadurecimento do morango (CIVELLO et al., 1997).

As enzimas FAL, PFO e POD participam no escurecimento dos tecidos de morango, principalmente ao final do período de conservação, possivelmente com os efeitos do processo de senescência dos morangos. Uma alta taxa da atividade enzimática implica em maior potencial de deterioração das características sensoriais do tecido vegetal, afetando atributos de qualidade e reduzindo a vida útil pós-colheita (COSTA, 2009).

Segundo Civello et al. (1997), morangos tratados a 48°C por 3 horas foram mais eficientes na redução da FAL que 42°C por 3 horas em morangos cv. Selva. Entretanto, frutos tratados apresentaram menor atividade quando comparado a frutos sem tratamento, esta diferença foi pronunciada em tratamentos com 48°C, resultando em atraso da perda de consistência de morangos, pois, interrompeu e diminuiu a síntese normal de proteínas.

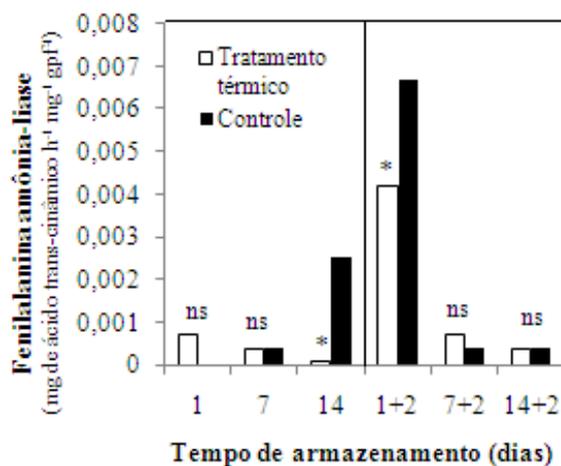


Figura 2. Atividade de fenilalanina amônia-liase observada nos morangos tratados termicamente após armazenagem a 5 °C por 1, 7 e 14 dias e após 1, 7 e 14 dias a 5 °C + 2 dias a 20 °C. *Médias alocadas nas colunas diferem entre si pelo teste F ao nível de 7% de probabilidade. ^{ns} Não significativo (P>0,07).

2.4.3 Incidência de fungos

Os fungos *Rhizopus stolonifer* e *Penicillium* sp. foram identificados no presente trabalho. De acordo com a Figura 3, a incidência de fungos foi menor em frutos tratados termicamente em ambas as condições de armazenagem, porém o efeito do tratamento térmico foi mais evidente quando os morangos foram armazenados apenas sob refrigeração, quando aos 14 dias de armazenagem a incidência de patógenos foi bem inferior ao controle. Já quando transferidos para temperatura ambiente (20 °C) aos 7 dias já se observava a diferença entre estes, com menor incidência de fungos em morangos com tratamento térmico até o último período. Isso sugere que o estresse térmico (45 °C, 3h) promovido nos morangos desenvolveu um efeito protetor significativo contra ataque de fungos. Segundo Vicente et al. (2002) e Vicente et al. (2003) morangos tratados termicamente e armazenados a 0 °C até 7 dias não demonstraram presença de fungos, a presença foi observada quando os frutos foram transferidos para 20°C. Deve-se considerar ainda o relato de Lurie (1998) quando citou que tratamentos com ar quente tem efeito direto também sobre o controle de fungos, porque os esporos de fungos e infecções latentes estão na superfície ou nas primeiras camadas de células de frutas ou legumes.

O estresse térmico além de reduzir a incidência de fungos contribuiu para retardar processos de senescência nos tecidos. A redução da incidência de fungos em morangos tratados termicamente aos 14 dias sob refrigeração, e aos 7 e 14 dias sob refrigeração + 2 dias a temperatura de 20°C, não foi seguida pelo aumento da atividade da FAL e POD aos 14 dias sob refrigeração, e aos 7 dias refrigerado + 2 dias à 20 °C pela POD. Visto que, sob qualquer injúria que danifica as células, as enzimas e substratos podem entrar em contato, levando à rápida oxidação de fenóis (CHAZARRA et al., 2001) e ao desenvolvimento da senescência nos tecidos. Em tecidos inoculados com microrganismos há aumento na atividade de fenilalanina amônia-liase e a expressão de peroxidase e polifenoloxidase também está relacionado com a ocorrência de infecção por patógenos (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

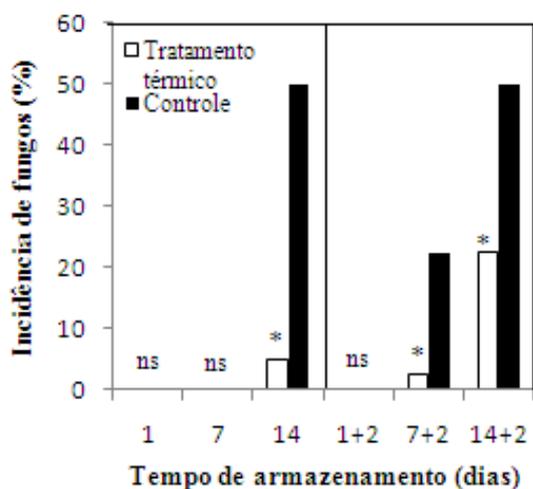


Figura 3. Incidência de fungos observado nos morangos tratados termicamente após armazenagem a 5 °C por 1, 7 e 14 dias e após 1, 7 e 14 dias a 5 °C + 2 dias a 20 °C. *Médias alocadas nas colunas diferem entre si pelo teste F ao nível de 7% de probabilidade. ^{ns} Não significativo ($P>0,07$).

2.4.4 Ácido Ascórbico (AA)

De acordo com a Figura 4, diferenças significativas foram observadas somente aos 14 dias de armazenamento. Em ambas as condições de armazenamento, morangos tratados termicamente apresentaram conteúdo de ácido ascórbico inferior ao controle, comprovando o efeito deletério do calor sobre esse componente em frutos armazenados. Em estudos com tomate Chang et al. (2006) constataram que com a utilizando ar frio e ar quente, baixas temperaturas provocam menor queda do teor de ácido ascórbico, observando que o tratamento a altas temperaturas levaram a enorme diminuição no seu teor. Os mesmos autores concluíram que o aquecimento acelerou a oxidação de ácido ascórbico, diminuindo sua quantidade nos frutos avaliados. O tratamento térmico causa completa degradação do ácido ascórbico em suco recém-preparado de morango (SADILOVA et al., 2009).

O conteúdo de ácido ascórbico resultante do presente trabalho em morangos tratados termicamente aos 14 dias em ambas as condições de armazenamento, não apresentou relação com a atividade de FAL e POD aos 14 dias sob refrigeração em morangos tratados termicamente, que também diminuíram. Visto que, a atividade de POD e PFO relaciona-se com modificações nos atributos sensoriais (escurecimento, sabores estranhos) e no valor nutritivo e antioxidante (oxidam ácido ascórbico) dos produtos hortícolas (CHITARRA e CHITARRA, 2005; ZHANG, ZHANG e HUO, 2008).

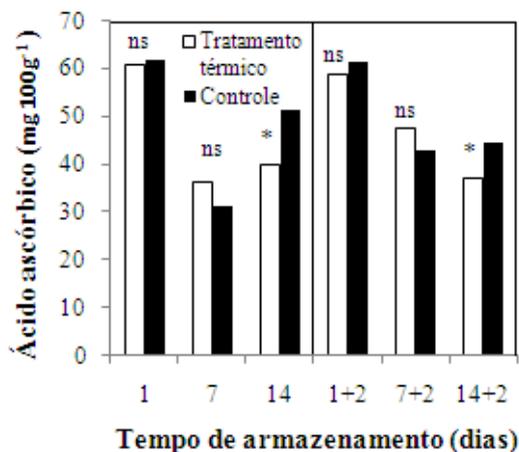


Figura 4. Ácido ascórbico observado nos morangos tratados termicamente após armazenagem a 5 °C por 1, 7 e 14 dias e após 1, 7 e 14 dias a 5 °C + 2 dias a 20 °C. *Médias alocadas nas colunas diferem entre si pelo teste F ao nível de 7% de probabilidade. ^{ns} Não significativo (P>0,07).

2.4.5 Compostos fenólicos totais

Conforme a Figura 5, verificou-se que morangos tratados termicamente apresentam maior conteúdo de fenóis totais apenas no primeiro período de armazenagem, comparado ao controle. Tanto sob refrigeração, como após os subsequente dois dias após refrigeração, os morangos tratados com calor apresentaram menor conteúdo de fenóis totais em relação ao controle. A menor concentração de compostos fenólicos em morangos tratados termicamente e aos 14 dias de refrigeração, pode ser uma resposta decorrente da menor atividade de FAL (Figura 2) e, conseqüentemente, menor atividade de PFOs e PODs, o que de fato ocorreu apenas para POD aos 14 dias sob refrigeração e aos 7 dias de refrigeração mais dois dias a 20 °C (Figura 1). Isso leva a considerar que houve manutenção da qualidade dos frutos tratados com calor, cujos processos oxidativos que levam à senescência foram retardados.

De modo geral, o estresse causado por condições ambientais adversas, influência de enzimas vegetais específicas quanto por luz e calor, entre outros, acarretam modificações no metabolismo fenólico, por meio de oxidações de compostos preexistentes, ocasionando o escurecimento e perda do valor nutricional do fruto (QUINATO, DEGÁSPARI e VILELA, 2007). Entretanto, os compostos fenólicos têm participação na cor, na vida de prateleira e na ação do produto como alimento funcional, como antioxidante. A concentração de compostos fenólicos está correlacionada com a atividade antioxidante e, pode ser utilizada para o

acompanhamento da perda de qualidade do produto na fase pós-colheita (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

A atividade antioxidante protege o organismo humano contra importantes patologias, ocasionados por agentes oxidativos, como poluição ambiental, substâncias químicas, estresse entre outros. Já que o organismo humano não produz essas substâncias protetoras, é necessário adquirí-las por meio da alimentação (VOLP et al., 2008). O morango é uma fonte importante de fenólicos (COSTA, 2009).

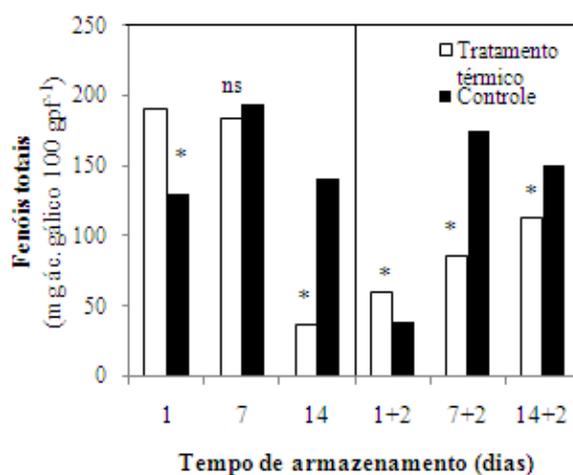


Figura 5. Compostos fenólicos totais observado nos morangos tratados termicamente após armazenagem a 5 °C por 1, 7 e 14 dias e após 1, 7 e 14 dias a 5 °C + 2 dias a 20 °C. *Médias alocadas nas colunas diferem entre si pelo teste F ao nível de 7% de probabilidade. ^{ns} Não significativo (P>0,07).

2.4.6 Antocianinas

O teor de antocianinas no morango é importante para avaliar o estágio de amadurecimento dos pseudofrutos (CORDENUNSI, NASCIMENTO e LAJOLO, 2005), sendo a pelargonidina-3-glicosídeo a principal antocianina, juntamente com a cianidina-3-glicosídeo e a pelargonidina-3-rutinosídeo, estas últimas em menor quantidade (ZHENG et al., 2007; SILVA et al., 2007). Os flavonóides constituem a maior classe de compostos fenólicos nos vegetais e o grupo mais comum dos flavonóides pigmentados consiste das antocianinas, as quais são as responsáveis pela maioria das cores vermelha, rosa, roxa e azul observada nos vegetais (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Conforme verificado na Figura 6, morangos tratados termicamente apresentaram menor conteúdo de antocianinas no primeiro e aos 14 dias de armazenamento, em ambas as condições de temperatura. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos de Civello et al.

(1997) e Vicente et al. (2002), que observaram em morangos tratados termicamente redução no teor de antocianinas seguido pela redução da FAL, concluindo também que há efeito degradativo do tratamento térmico no acúmulo de antocianina.

As antocianinas são compostos instáveis e sofrem descoloração por ação de sistemas enzimáticos sendo também degradadas pelo oxigênio. A sua coloração pode sofrer escurecimento indesejável, decorrente de muitos fatores durante o processamento ou armazenamento. O principal emprego biológico atribuído às antocianinas é a atividade antioxidante. Em polpas de frutas que não os contêm como o abacaxi, a graviola, o cupuaçu e o maracujá, apresentam valores menores de atividade antioxidante (KUSKOSKI et al., 2006).

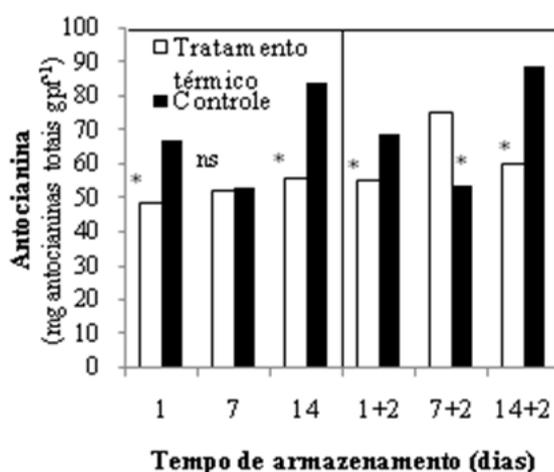


Figura 6. Antocianina observada nos morangos tratados termicamente após armazenagem a 5 °C por 1, 7 e 14 dias e após 1, 7 e 14 dias a 5 °C + 2 dias a 20 °C. *Médias alocadas nas colunas diferem entre si pelo teste F ao nível de 7% de probabilidade. ^{ns} Não significativo (P>0,07).

2.4.7 Características Físico-químicas

De acordo com a Figura 7, constatou-se que os morangos tratados termicamente (45 °C, 3h) apresentaram pH inferior ao controle aos 14 dias sob refrigeração e aos 7 dias quando transferidos à temperatura ambiente, o contrário aconteceu ao primeiro dia a 5 °C. O pH nos morangos tratados termicamente variaram entre 3,38 a 3,50, valores que ficaram abaixo da média 3,6 e 4,1 de diferentes cultivares encontradas por Cordenunsi, Nascimento e Lajolo (2003). A acidez titulável foi superior em morangos tratados (45 °C por 3h) aos 14 dias a 5 °C+2 dias a 20°C comparado aos frutos sem tratamento térmico, visto que não houve diferença significativa durante o período de armazenamento com 5°C. Uma possível

explicação é que o tratamento térmico reduz a taxa respiratória em morangos (VICENTE et al., 2006) indicando uma redução de danos nos tecidos e menos ácidos orgânicos usados como substrato nesse processo. Hernández-Muñoz et al. (2006) observaram que a menor acidez titulável em morangos é devido a utilização de ácidos orgânicos na respiração, ou nas reações enzimáticas.

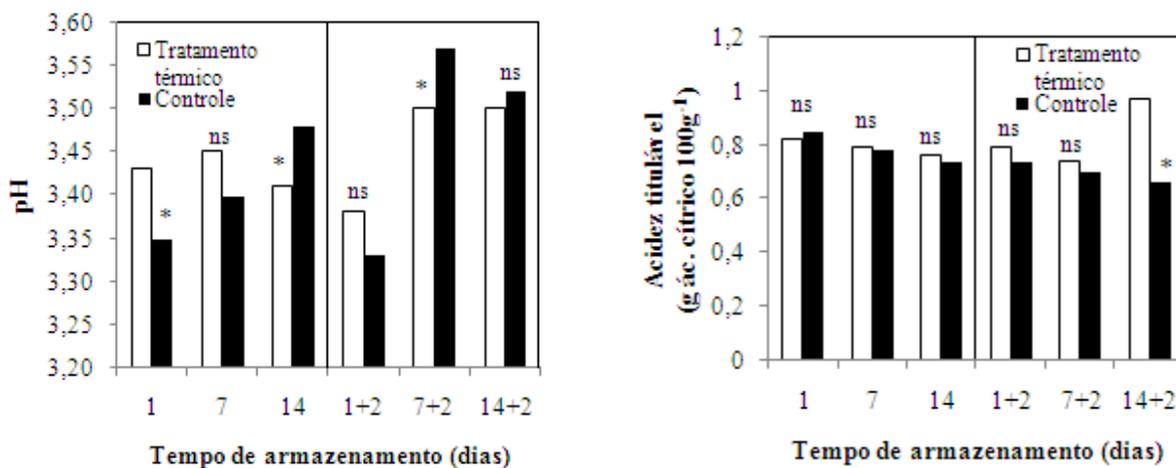


Figura 7. pH e acidez titulável observado nos morangos tratados termicamente após armazenagem a 5 °C por 1, 7 e 14 dias e após 1, 7 e 14 dias a 5 °C + 2 dias a 20 °C. *Médias alocadas nas colunas diferem entre si pelo teste F ao nível de 7% de probabilidade. ^{ns} Não significativo ($P>0,07$).

Morangos submetidos ao tratamento térmico e armazenados por 7 e 14 dias sob 5°C apresentaram maior teor de sólidos solúveis comparado ao controle, o mesmo ocorreu com morangos armazenados por 14 dias com mais 2 dias a 20°C (Figura 8). Resultado semelhante foi encontrado por Garcia, Aguilera e Albi (1995) que ao trabalharem com imersão de morangos em água a 45°C por 15 min, constataram que aumenta o teor de sólidos solúveis.

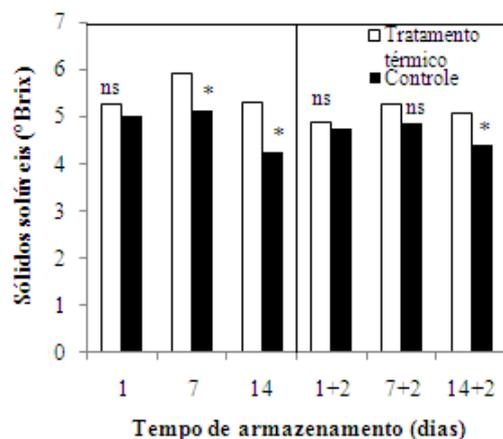


Figura 8. Sólidos solúveis observado nos morangos tratados termicamente após armazenagem a 5 °C por 1, 7 e 14 dias e após 1, 7 e 14 dias a 5 °C + 2 dias a 20 °C. *Médias alocadas nas colunas diferem entre si pelo teste F ao nível de 7% de probabilidade. ^{ns} Não significativo (P>0,07).

De acordo com a Figura 9, praticamente não houve efeito do tratamento térmico sobre a perda de massa dos morangos armazenados. Perda de massa significativamente menor foi verificada nos morangos tratados termicamente, quando esses foram transferidos para outro ambiente a 20 °C aos 14 dias de armazenamento refrigerado. Resultado semelhante foi encontrado por Vicente et al. (2002), quando observaram que a menor perda de massa estava em morangos tratados termicamente (45°C, 3h) comparado ao controle, quando armazenados à temperatura de 20 °C. Segundo Flores-Cantillano (2003), o limite comercial aceitável para perda de massa do morango após a colheita é de 6 % de seu peso. Entretanto, no presente trabalho os tratamentos apresentaram valores superiores a 6 % aos 14 dias em ambas as condições de armazenagem sendo este tempo, portanto, inadequado comercialmente para os morangos mesmo quando tratados termicamente.

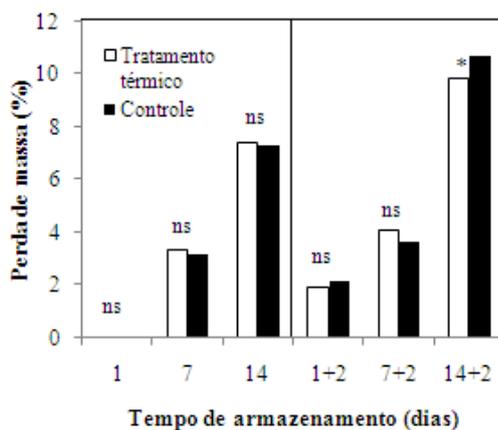


Figura 9. Perda de massa observado nos morangos tratados termicamente após armazenagem a 5 °C por 1, 7 e 14 dias e após 1, 7 e 14 dias a 5 °C + 2 dias a 20 °C. *Médias alocadas nas colunas diferem entre si pelo teste F ao nível de 7% de probabilidade. ^{ns} Não significativo (P>0,07).

2.5 Conclusão

O metabolismo pós-colheita de morangos cv. Dover foi modificado pela aplicação de tratamento térmico. A atividade de polifenoloxidase, peroxidase, fenilalanina amônia-liase e o teor de ácido ascórbico, fenóis totais, antocianinas e incidência de fungos foram inferiores em morangos tratados termicamente. O tratamento térmico resultou em maior acidez titulável, maior teor de sólidos solúveis e menor perda de massa. O tratamento térmico não proporcionou, segundo a incidência de fungos e a perda de massa, aumento da vida útil dos morangos, ficando limitado aos sete dias de armazenamento refrigerado.

3 CAPÍTULO II: Efeito do tratamento térmico combinado ao ácido salicílico na atividade enzimática e na incidência de fungos em morangos

RESUMO

A combinação de métodos em pós-colheita pode mostrar efeito aditivo ao aumentar a eficiência de controle das podridões e prolongar a vida pós-colheita de frutos. Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do tratamento térmico pós-colheita em combinação com o ácido salicílico na resposta fisiológica e microbiológica do morango armazenado. Como parâmetros de resposta fisiológica as atividades das enzimas polifenoloxidase e peroxidase, os conteúdos de fenóis totais, antocianinas, ácido ascórbico e a incidência de patógenos foram avaliadas. Foram utilizados morangos cultivar Dover, cultivados em sistema orgânico. O delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (4x3), comparando as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os morangos foram submetidos aos tratamentos de choque térmico ($45\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ por 3 h em estufa), aplicação de ácido salicílico (imersão por cinco minutos em solução aquosa a 2,0 mM), combinação de choque térmico com ácido salicílico e o controle. Depois dos tratamentos, os frutos embalados foram armazenados em uma câmara a $5\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ e após os intervalos de armazenagem de 1, 7 e 14 dias, as unidades experimentais foram retiradas da refrigeração e transferidas para outro ambiente a aproximadamente 20 °C por 2 dias para então serem analisadas. A combinação do choque térmico com ácido salicílico se mostrou menos efetivo que os demais tratamentos para a maioria das variáveis analisadas, indicando ser desvantajoso. Porém, o choque térmico isolado mostrou-se mais efetivo em reduzir a atividade de peroxidase, apresentou atividade inferior de polifenoloxidase comparado ao controle aos 7+2 dias e não diferiu dos demais tratamentos aos 14+2 dias, se mostrou efetivo em manter níveis elevados de compostos fenólicos, antocianinas e ácido ascórbico até 7+2 dias.

Palavras-chave: (*Fragaria x ananassa* Duch), atividade enzimática, pós-colheita, vida útil.

Effect of heat treatment combined with salicylic acid on the enzyme activity and the incidence of pathogens in strawberries

ABSTRACT

The combination of post-harvest methods may show additive effect to increase the efficiency of control of rot and prolong the postharvest life of fruits. The objective of this research was to evaluate the effect of postharvest heat treatment in combination with salicylic acid in the response physiological and microbiological stored strawberry. As parameters of physiological response activities of the enzymes polyphenoloxidase and peroxidase, the contents of total phenols, anthocyanins, ascorbic acid and incidence pathogens were evaluated. Dover were used strawberries, grown in an organic system. The design was completely randomized in factorial scheme (4x3), comparing the means by Tukey test at 5% probability. The strawberries were subjected to heat shock treatments ($45^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ for 3 h in an oven), application of salicylic acid (immersion for five minutes in aqueous solution at 2.0 mM), heat shock combination with salicylic acid and control. After the treatments, fruit packed were stored in a chamber at $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ and after intervals of storage of 1, 7 and 14 days, the experimental units were removed from refrigeration and transferred to another environment at approximately 20°C for 2 days then be analyzed for. The combination of thermal shock with salicylic acid was less effective than other treatments for most variables, indicating that it is disadvantageous. However, heat shock alone was more effective in reducing the activity of peroxidase, polyphenoloxidase showed lower activity compared to the control at 7 +2 days and did not differ from other treatments at 14 +2 days, was effective in maintaining high levels phenolic compounds, anthocyanins and ascorbic acid to 7 +2 days.

Key-words: (*Fragaria x ananassa* Duch), enzymatic activity, post-harvest life.

3.1 Introdução

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) é um fruto que apresenta elevada perecibilidade pós-colheita devido a sua típica fragilidade e alta atividade metabólica. Tal característica é agravada, entre outros fatores, pela alta suscetibilidade a podridões, principalmente causada por *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* e *Penicillium* sp. (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2003), fazendo com que o morango tenha vida útil pós-colheita muito curta, com alterações que depreciam o seu valor comercial e nutricional (SANTOS e MEDEIROS, 2003; CHITARRA e CHITARRA, 2005). A principal forma de controle das doenças pós-colheita é o uso de fungicidas químicos (HERNÁNDEZ-MUÑOZ et al., 2008), entretanto, atenção especial tem sido dada para o risco do uso indevido de produtos químicos no manejo pós-colheita de morangos devido a crescente demanda do consumidor por produtos saudáveis. Desta forma, estudos sobre a aplicação de tratamentos pós-colheita alternativos, juntamente com o armazenamento refrigerado são necessários.

O tratamento térmico é uma alternativa promissora para substituir ou para reduzir o uso de tratamentos químicos durante o armazenamento de frutas e hortaliças e tem sido utilizado para o controle de doenças fúngicas em pós-colheita (PATRAS et al., 2009). Um moderado estresse no fruto, causado pelo tratamento térmico, mobiliza as respostas de defesa antioxidantes, produzindo alterações no metabolismo do morango induzindo a produção de enzimas antioxidantes (inativadoras de radicais de oxigênio), mantendo sob controle intracelular os níveis de radicais de oxigênio, que são danosos às células (VICENTE et al., 2006). É possível aplicar um moderado tratamento térmico em morangos com temperaturas não-letais (45°C por 3 horas com ar) resultando em uma redução de degradação por fungos, aumentando o período de armazenamento do fruto (VICENTE et al., 2002). O efeito do tratamento térmico na deterioração fúngica pode ser devido a uma combinação de inativação direta do patógeno e indução de resistência no fruto (LURIE, 1998; VICENTE et al., 2003).

As enzimas fenilalanina amônia-liase, polifenoloxidase e peroxidase apresentam numerosas funções fisiológicas quando a planta ativa sistemas de auto-defesa em resposta a estresse sofrido (CHITARRA e CHITARRA, 2005; ZHANG, ZHANG e HUO, 2008). Polifenoloxidase e peroxidase causam oxidação de compostos fenólicos ou reagem com aminoácidos e proteínas, ou ainda oxidam ácido ascórbico e degradam antocianinas (LÓPEZ-SERRANO e ROS BARCELÓ, 1995; CHITARRA e CHITARRA, 2005). A fenilalanina amônia-liase é uma enzima chave na biossíntese da maioria dos compostos fenólicos

envolvidos em várias funções essenciais na planta, como um precursor de vários metabólitos secundários e como substratos fenólicos livres para a ação de PFO's (CHITARRA e CHITARRA, 2005; GERASIMOVA, PRIDVOROVA e OZERETSKORSKAYA, 2005).

Substâncias, como o ácido salicílico, têm sido estudadas em aplicação isolada ou em combinação com outras técnicas de preservação pós-colheita na busca de efeitos positivos na conservação de frutos (SRIVASTAVA e DWIVEDI, 2000; SHAFIEE et al., 2010; ZHANG et al., 2010). O ácido salicílico (AS) é um composto fenólico natural simples, presente em muitas plantas e é um componente importante na via de transdução de sinal, induzindo respostas de defesa (ZHANG et al., 2010). Em morangos, a aplicação exógena em concentrações não tóxicas e em combinação com outros métodos, pode aumentar a sua resistência contra patógenos (BABALAR et al., 2007; ZHANG et al., 2010).

A maioria dos relatos científicos publicados tem demonstrado a eficácia do choque térmico e da aplicação de AS na extensão de vida útil de morangos, porém a aplicação combinada das duas técnicas em morangos ainda não foi testada, merecendo estudos sobre seus efeitos na resposta a estresses oxidativos e no controle do desenvolvimento de fungos durante o armazenamento do fruto.

Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito do tratamento térmico pós-colheita em combinação com o ácido salicílico na resposta fisiológica e microbiológica do morango armazenado. Como parâmetros de resposta fisiológica as atividades das enzimas polifenoloxidase e peroxidase, os conteúdos de fenóis totais, antocianinas, ácido ascórbico e a incidência de patógenos foram avaliadas.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Amostra experimental

Foram utilizados 480 morangos Dover cultivados em sistema orgânico por produtor da região do município de Marechal Cândido Rondon, PR. Os frutos foram colhidos em julho/2011 com 75% da cor vermelha superficial. Frutos de tamanho e cor uniformes, sem manchas externas e sadios foram selecionados e transportados ao Laboratório de Tecnologia

de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Unioeste, Campus de Marechal Cândido Rondon, PR, onde foi conduzido o experimento.

3.2.2. Ensaio experimental

Os frutos foram distribuídos em grupos de 10, colocados em bandejas de isopor em camada única e coberto com um filme de PVC, constituindo as unidades experimentais. Assim acondicionados, os morangos foram submetidos aos tratamentos de choque térmico ($45\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ por 3 h em estufa), aplicação de ácido salicílico (imersão por cinco minutos em solução aquosa a 2,0 mM) e combinação de choque térmico com ácido salicílico. Depois dos tratamentos, os frutos embalados foram armazenados em uma câmara a $5\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ com 90-95% de UR. O correspondente grupo controle, de morangos não tratados, foram diretamente armazenados a $5\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Em ambos os casos (morangos tratados e controle) e após os intervalos de armazenagem de 1, 7 e 14 dias, as unidades experimentais foram retiradas da refrigeração e transferidas para outro ambiente a aproximadamente 20 °C por 2 dias com 60-65% de UR, quando então os morangos foram amostrados para análises.

Depois de amostrados, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenada a -24 °C para posteriores análises. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.3 Determinação da atividade de POD e PFO

3.2.3.1 Obtenção dos extratos enzimáticos

Amostras de morango (5 g) foram homogeneizadas em 3 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) (tampão de extração) em almofariz de porcelana previamente resfriado e acrescentado 0,02 g de polivinil pirrolidona (PVP) durante a maceração. O homogeneizado foi centrifugado à 14.500 rpm durante 20 min. O sobrenadante obtido, considerado como a

fração contendo as proteínas solúveis, foi armazenado a -18°C para posteriores análises bioquímicas (LUSSO e PASCHOLATI, 1999).

3.2.3.2 Atividade de Peroxidases (POD)

A atividade de peroxidases foi determinada a 30°C , através do método espectrofotométrico direto (HAMMERSCHMIDT et al., 1982). A mistura da solução consistiu de 1 mL do substrato para enzima (306 μL de peróxido de hidrogênio p.a., 12,5 mL de guaiacol puro 2% alcoólico e 87,5 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0)) e 0,2 mL de preparação enzimática do morango. A reação foi seguida em espectrofotômetro modelo TU - 1880 Double Beam UV-VIS Spectrophotometer, a 470 nm, pelo período de 2 min, com as medidas de densidade óptica tomadas a cada 15 seg, iniciando logo após a adição da preparação enzimática ao substrato. A atividade foi determinada pela variação ocorrida entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear, e expressa em variação (Δ = delta) de unidade de absorvância $\text{abs min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de peso fresco⁻¹.

3.2.3.3 Atividade de Polifenoloxidase (PFO)

A atividade das polifenoloxidases (PFO) foi determinada de acordo com metodologia de Duangmal e Apeten (1999), adaptada por Kuhn (2007). O ensaio constituiu em mensurar a oxidação do catecol convertido em quinona, reação esta mediada pela enzima polifenoloxidase. O substrato foi composto por catecol, na concentração de 20 mM com 0,1101 g dissolvido em 50 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8), formando uma solução de catecol 0,02 M. A reação se desenvolveu misturando-se 900 μL de substrato e 100 μL da preparação enzimática. A temperatura da reação foi de 30°C e as leituras em espectrofotômetro modelo TU - 1880 Double Beam UV-VIS Spectrophotometer, a 420 nm, foram realizadas de forma direta por um período de 1 min. O diferencial entre o aumento constante da leitura da absorvância foi utilizado para a determinação da atividade. A atividade foi determinada pela variação ocorrida entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear, e expressa em Δ de $\text{abs min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de peso fresco⁻¹.

3.2.4 Incidência de fungos

Os morangos foram avaliados visualmente quanto a presença ou ausência de fungos nos dias de análise. Foram considerados a presença de fungos os morangos que apresentavam micélio fúngico ocupando 5% do fruto, e os resultados expressos em porcentagem de morangos infectados segundo metodologia de Hernández-Muñoz et al. (2006). A identificação dos fungos foi feita por microscopia segundo Franco e Landgraf (1996).

3.2.5 Ácido ascórbico

O teor de vitamina C foi determinado por titulação com 2,6-dicloro-fenol-indofenol (DCFI), de acordo com Benassi e Antunes (1988). Em um béquer foi adicionado 10 mL da solução padrão seguido da adição de 50 mL de ácido oxálico a 1% e homogeneizado, este serve para calibração. Em seguida, foi homogeneizado 2 gramas da amostra de morango e 50 mL de ácido oxálico a 1%. Após essas etapas, foi realizada titulação com solução padrão de DCFI. E os resultados foram expressos em $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ de ácido ascórbico.

3.2.6 Compostos fenólicos totais

A determinação do teor de fenólicos totais foi realizada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999). As amostras (1 g) foram extraídas em metanol, seguido de homogeneização e filtração. Depois, 100 μL do extrato diluído foram misturados com 2,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (FC), deixando reagir por 3 minutos. Depois foi adicionado 0,25 mL de solução de carbonato de sódio 7,5%. As amostras ficaram 5 min em banho-maria à temperatura de 50°C, e em seguida foi medido através da leitura da absorbância em espectrofotômetro modelo TU - 1880 Double Beam UV-VIS Spectrophotometer, no comprimento de onda de 760 nm. A leitura linear da curva padrão foi empregada com solução de ácido gálico para realização de quantificação dos fenóis, e os resultados foram expressos em $\text{mg equ. } \acute{\text{a}}\text{c. gálico } \text{g}^{-1}$.

3.2.7 Antocianinas

A determinação do conteúdo de antocianina foi feita através de metodologia descrita por Sims e Gamon (2002). As amostras (1 g) foram extraídas em 3 mL de solução (80 mL de acetona e 20 mL de tampão Tris-HCl 0,025 M), e filtradas. Realizou-se leitura direta do sobrenadante em espectrofotômetro modelo TU-1880 Double Beam UV-VIS Spectrophotometer, a 537nm. Os resultados obtidos expressos em mg antocianinas totais gpf^{-1} .

3.2.8 Variação de massa

Foi obtida por pesagens nos intervalos de observações durante a armazenagem, através de balança semi-analítica, os resultados forma expressos em porcentagem, estimados a partir das diferenças de massa das unidades experimentais entre o momento da instalação do experimento e o dia de cada avaliação.

3.3 Análise Estatística

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x3 e quatro repetições. O total de tratamentos foi constituído pela combinação dos tratamentos choque térmico, ácido salicílico, choque térmico x ácido salicílico e controle com as três condições de armazenamento (refrigeração por 1, 7 e 14 dias mais 2 dias a 20 °C).

Os efeitos de tratamento, condição de armazenamento e interação foram verificados por Análise de Variância (ANOVA) e teste F. A comparação entre tratamentos foi avaliada pelo teste de Tukey. O nível de significância de 5% foi adotado em todos os procedimentos. Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o programa SAEG 9.1 (UFV, 2007).

3.4 Resultados e Discussão

3.4.1 Atividade de Peroxidase (POD) e Polifenoloxidase (PFO)

De acordo com os resultados da Tabela 1, constatou-se que o choque térmico, o ácido salicílico e a combinação ácido salicílico + choque térmico se mostraram efetivos em diminuir a atividade de peroxidase (POD) no primeiro período de armazenagem, pois apresentaram valores significativamente inferiores ao controle neste período. No entanto, aos 7 dias de armazenagem refrigerada, o choque térmico e o ácido salicílico isolados se mostraram mais efetivos em diminuir a atividade de POD, cujos valores foram significativamente inferiores ao controle e ao tratamento combinado de choque térmico mais ácido salicílico. No entanto, o choque térmico isolado se mostrou mais efetivo que os demais tratamentos no último período de armazenagem, quando os morangos tratados apresentaram atividade de POD significativamente inferior ao controle e aos demais tratamentos. A combinação de ácido salicílico + choque térmico se mostrou menos efetivo que os demais tratamentos, sobretudo aos 7 e 14 dias de armazenagem, indicando ser desvantajoso o seu uso. Entretanto, a atividade de peroxidase (POD) aumentou em função do tempo de armazenagem para todos os tratamentos, pois, esta enzima apresenta numerosas funções fisiológicas quando a planta ativa sistemas de auto defesa em resposta a estresses sofridos. Em adição, a atividade de POD está relacionada com a ocorrência de estresses como infecções por patógenos, e sua atividade aumenta quando uma gama de compostos oriundos do metabolismo torna-se suscetível a sua ação (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

O efeito inibidor do choque térmico e do ácido salicílico sobre a atividade de POD nos morangos frente ao controle, pode ser um indício de que houve inibição de estresses oxidativos durante o armazenamento, especialmente para o choque térmico isolado, cujos morangos tratados não apresentaram aumento significativo na atividade de POD no último período de armazenagem (Tabela 1).

Vicente et al. (2006) também verificaram menor incremento da atividade de POD em morangos tratados termicamente (45°C por 3 h), indicando que esses frutos sofreram menos danos fisiológicos do que frutos não tratados. Outros autores também encontraram inibição da atividade de POD com o tratamento térmico em alface (LOAIZA-VELARDE et al.,1997) e

em goiaba (ZANATTA et al.,2006) e com a aplicação de AS em bananas (SRIVASTAVA e DWIVEDI,2000).

As mudanças na atividade de POD refletem duas condições do fruto: resultante de eventos geneticamente programados do metabolismo normal do órgão como a maturação, ou resultante de estresses causados por condições ambientais desfavoráveis (CHITARRA e CHITARRA, 2005). Em ambos os casos, a elevação na atividade de POD é normal e se explica pela sua função metabólica de proteger os tecidos vegetais contra os efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio produzido durante o metabolismo celular (CASTRO et al., 2005). O choque térmico é uma condição fisiologicamente desfavorável ao morango que conduz à elevação dos níveis de espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, responsáveis por danos a célula (BURNETTE, 1977).

Tabela 1: Atividade de Peroxidase e Polifenoloxidase em morangos cv. Dover conforme os tratamentos e a armazenagem a 1, 7 e 14 dias a 5°C mais 2 dias a 20°C.

Tratamentos	Peroxidase (Δ abs min ⁻¹ mg ⁻¹ de peso fresco)			Polifenoloxidase (Δ abs min ⁻¹ mg ⁻¹ de peso fresco)		
	Armazenamento (dias)			Armazenamento (dias)		
	1+2	7+2	14+2	1+2	7+2	14+2
Controle	0,0022 aB	0,0030 aAB	0,0035 aA	0,0016 bcB	0,0032 aA	0,0012 aB
Choque térmico-CT	0,0003 bB	0,0017 bA	0,0019 bA	0,0040 aA	0,0013 bB	0,0020 aB
Ácido salicílico-AS	0,0003 bB	0,0010 bB	0,0043 aA	0,0012 cA	0,0016 bA	0,0017 aA
CT+AS	0,0008 bB	0,0034 aA	0,0042 aA	0,0026 bA	0,0015 bB	0,0015 aB
CV (%)	43,12	45,33	30,27	36,13	29,97	28,88

*Médias seguidas pela mesma letra em maiúsculo na linha e minúsculo na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (p < 0,05).

Efeito inibidor de PFO não foi constatado para nenhum dos tratamentos no primeiro período de armazenagem do morango (Tabela 1) e, ao contrário do que se esperava, o choque térmico causou aumento significativo da atividade de PFO neste período, sugerindo que o choque térmico tenha estressado fisiologicamente os morangos, causando mudanças na expressão gênica e na síntese protéica (LURIE, 1998). No entanto, aos 7 dias de armazenagem todos os tratamentos foram eficientes em manter a atividade de PFO significativamente inferior ao controle. Diferenças significativas não foram encontradas entre os tratamentos e o controle no último período de armazenagem.

3.4.2 Incidência de fungos

Conforme mostrado na Figura 10, os morangos apresentaram aumento significativo de incidência de fungos em função do período de armazenagem para todos os tratamentos, sendo este um resultado esperado para o tratamento controle devido a alta suscetibilidade do fruto ao ataque de fungos. Uma das principais causas de perda da qualidade comercial de morangos é o surgimento de fungos (SHIN, LIU e NOCK, 2007). Erkan, Wang e Wang (2008) tiveram resultado semelhante, verificando que até os cinco primeiros dias de armazenamento os frutos não apresentaram infecção visível, entretanto, apresentaram aumento na incidência de fungos com o decorrer do período de armazenamento chegando a 89,98% aos 20 dias a 10°C. Hernández-Muñoz et al. (2006) também observaram que morangos apresentavam mais sinais de infecções fúngicas ao longo do período de armazenamento a 20°C, principalmente após 4 dias de armazenagem. Morangos cultivar Oso Grande armazenados em câmara fria a 0 °C +/- 2 °C, mantiveram-se íntegros até o 8º dia, a partir do 10º dia detectou-se a presença de doenças causadas principalmente por *Botrytis cinerea* (VIEITES et al., 2006). Segundo Reddy et al. (2000) o aumento de podridões em morango está associado a temperatura e tempo de armazenamento.

Não houve efeito significativo dos tratamentos na incidência de fungos nos morangos (Figura 10). Esse resultado difere de Shafiee et al. (2010) em estudos com morangos tratados com AS em combinação com outro método, que apresentam menor deterioração, apresentando redução na incidência e no diâmetro das lesões de *Rhizopus*. Segundo Vicente et al. (2002) e Vicente et al. (2003) morangos tratados termicamente e armazenados a 0 °C até 7 dias não demonstraram presença de fungos, a presença foi observada quando os frutos foram transferidos para 20°C.

Independente dos tratamentos, os fungos identificados nos morangos durante o armazenamento foram *Rhizopus nigricans* e *Penicillium* sp.

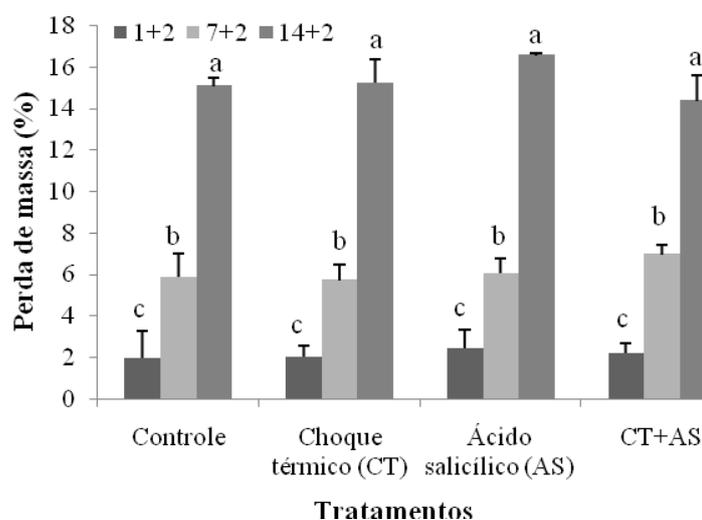


Figura 10. Incidência de fungos em morangos cv. Dover conforme os tratamentos e a armazenagem a 1, 7 e 14 dias a 5°C mais 2 dias a 20°C. *Barras seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

3.4.3 Compostos fenólicos

De acordo com os resultados da Tabela 2, constatou-se que o ácido salicílico e a combinação ácido salicílico + choque térmico promoveram redução na concentração de compostos fenólicos no primeiro período de armazenagem, pois apresentaram valores significativamente inferiores ao controle e ao choque térmico neste período. No entanto, aos 7 dias de armazenagem, apenas os morangos tratados com ácido salicílico + choque térmico mostraram concentração de compostos fenólicos inferior ao controle. Entretanto, no último período de armazenagem, o choque térmico isolado e a combinação de ácido salicílico + choque térmico se mostraram menos efetivos que os demais tratamentos. Ainda na Tabela 2, os compostos fenólicos em morangos tratados com choque térmico diminuíram em função do período de armazenamento, já morangos tratados com ácido salicílico apresentaram aumento aos 14 dias, e a combinação entre ácido salicílico + choque térmico apresentou redução aos 7 dias e aumento aos 14 dias. Segundo Saltveit (2000), a exposição do órgão vegetal ao choque térmico, induz a síntese de um conjunto único de proteínas chamadas de ‘proteínas de choque térmico’, e que a síntese dessas proteínas é acompanhada por uma inibição geral da síntese de proteínas normais da rota de fenilpropanóides e, conseqüentemente, inibição do acúmulo de compostos fenólicos. No entanto, tal efeito inibitório não foi verificado nos morangos após tratamento com choque térmico no primeiro e segundo período de armazenamento refrigerado.

Acréscimos no conteúdo de fenólicos totais foi verificado por Vicente et al. (2003), em morangos não tratados com choque térmico (45°C, 3h). O conteúdo de fenólicos totais é modificado devido a ocorrência de estresse causado por condições ambientais adversas e por influência de enzimas vegetais específicas, como polifenoloxidase, sofre modificações por meio de reações de oxidações, ocasionando o escurecimento e perda do valor nutricional do fruto (QUINATO, DEGÁSPARI e VILELA, 2007).

Tabela 2: Fenóis totais em morangos cv. Dover conforme os tratamentos e a armazenagem a 1, 7 e 14 dias a 5°C mais 2 dias a 20°C.

Tratamentos	Fenóis totais (mg ác. gálico 100 gpf ⁻¹)		
	Armazenamento (dias)		
	1+2	7+2	14+2
Controle	378,73 aA	307,63 aC	358,20 bB
Choque térmico-CT	377,59 aA	320,44 aB	221,73 dC
Ácido salicílico-AS	342,96 bB	308,07 aC	375,64 aA
CT+AS	305,42 cA	284,44 bB	314,47 cA
CV(%)	7,94	6,91	8,35

*Médias seguidas pela mesma letra em maiúsculo na linha e minúsculo na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (p < 0,05).

3.4.4 Antocianinas

De acordo com a Tabela 3, o choque térmico e a combinação ácido salicílico + choque térmico causaram aumentos na concentração de antocianinas no primeiro período de armazenagem, pois apresentaram valores significativamente superiores ao controle e o ácido salicílico neste período. No entanto, aos 7 dias de armazenagem, morangos tratados com choque térmico, ácido salicílico e a combinação ácido salicílico + choque térmico mostraram aumentos na concentração de antocianinas, cujos valores foram significativamente superiores ao controle. Esses resultados sugerem que o choque térmico e o ácido salicílico podem ter interferido no metabolismo secundário de síntese de antocianinas dos morangos. Entretanto, o ácido salicílico e a combinação ácido salicílico + choque térmico apresentaram-se mais efetivos que os demais tratamentos no último período de armazenagem, quando os morangos apresentaram concentração de antocianinas superior ao controle e choque térmico. Sendo assim, os tratamentos variaram a concentração nos períodos de armazenamento, mas no geral aumentaram os teores em comparação ao controle. Ainda referente a Tabela 3, o teor de

antocianinas aumentou ao longo do período de armazenamento para todos os tratamentos, exceto para morangos tratados termicamente houve um decréscimo aos 14 dias, e na combinação de choque térmico + ácido salicílico o teor aos 14 dias não diferiu do primeiro e do sétimo dia de armazenamento.

As antocianinas são importantes para avaliação da maturidade dos morangos, contribui para a aparência, são responsáveis pela maioria das cores vermelho, rosa, roxa e azul e é um dos parâmetros importantes avaliados pelo consumidor e apresenta propriedades antioxidantes, que inibem e reduzem as lesões causadas pelos radicais livres nas células (TAIZ e ZEIGER, 2004; CORDENUNSI, NASCIMENTO e LAJOLO, 2005). Morangos contêm altos níveis de compostos antioxidantes, dentre estes as antocianinas, que fornecem proteção contra interferências prejudiciais dos radicais livres (ZHENG et al., 2007). A principal antocianina presente no morango é pelargonidina- 3-glicosídeo, e o nível mais elevado de antocianinas foi detectado na cultivar Dover, seguido por Oso Grande e Campineiro (CORDENUNSI, NASCIMENTO e LAJOLO, 2005).

A combinação do choque térmico + ácido salicílico apresentou efeito benéfico para a concentração de antocianinas, pois, em todos os períodos apresentou elevada concentração em comparação aos demais, o aumento da síntese de antocianinas nos morangos indica que estes, apresentavam melhor aparência, e maior proteção contra interferências prejudiciais dos radicais livres.

Civello et al. (1997) e Vicente et al. (2002) encontraram redução no teor de antocianinas em morangos tratados termicamente e concluíram que choque térmico causa efeito no acúmulo de antocianinas.

Tabela 3: Antocianinas em morangos cv. Dover conforme os tratamentos e a armazenagem a 1, 7 e 14 dias a 5°C mais 2 dias a 20°C.

Tratamentos	Antocianinas (mg antocianinas totais 100 gpf ⁻¹)		
	Armazenamento (dias)		
	1+2	7+2	14+2
Controle	75,06 bB	83,28 bA	83,05 bA
Choque térmico-CT	86,26 aB	97,48 aA	83,56 bB
Ácido salicílico-AS	77,52 bB	94,98 aA	97,56 aA
CT+AS	90,49 aB	96,24 aA	94,77 aAB
CV(%)	8,29	6,75	8,14

*Médias seguidas pela mesma letra em maiúsculo na linha e minúsculo na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (p < 0,05).

3.4.5 Ácido ascórbico

Na Tabela 4, no primeiro período de armazenagem não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto ao teor de ácido ascórbico, aos 7 dias de armazenagem constatou-se que o choque térmico e a combinação ácido salicílico + choque térmico se mostraram efetivos em aumentar a concentração de ácido ascórbico, pois apresentaram valores superiores ao controle e ácido salicílico. No entanto, aos 14 dias morangos tratados com ácido salicílico apresentavam o maior teor de ácido ascórbico comparado ao controle. Entretanto, durante o período de armazenamento o tratamento térmico diminuiu o teor de ácido ascórbico e o ácido salicílico aumentou o teor aos 14 dias, e a combinação dos tratamentos aumentou aos 7 dias e manteve-se aos 14 dias de armazenamento.

A vitamina C, como também é conhecido o ácido ascórbico é um dos antioxidantes mais abundantes presentes no morango (VICENTE et al., 2006). A vitamina C age como um varredor de radicais livres que atacam carboidratos, proteínas, enzimas e DNA, causando oxidação e alterações que podem gerar lesão celular, além de ser antioxidante protetor (CHITARRA e CHITARRA, 2005). O ácido ascórbico tem sido considerado um importante componente nutricional do morango e seu declínio pode estar associado à perda de qualidade (SHIN, LIU e NOCK, 2007).

Portanto, a combinação ácido salicílico + choque térmico, assim como o choque térmico, ocasionaram efeito benéfico sobre este componente nutricional, que promoveram concentração elevada aos 7 dias e aos 14 dias superior ao controle.

Segundo Shafiee et al.(2010) o maior teor de ácido ascórbico foi observado em morangos tratados com a interação de ácido salicílico, cálcio e água quente a 45°C por imersão dos frutos. Resultado semelhante foi encontrado por Vicente et al. (2006), em que morangos tratados termicamente (45°C por 3 h) apresentaram níveis mais elevados de ácido ascórbico do que os controles, após 7 dias, mas não após 14 dias. O conteúdo inicial de ácido ascórbico observado no presente trabalho variou entre 48,15 e 53,30 mg 100 g⁻¹ de fruto fresco, valores semelhantes ao encontrado por Cordenunsi et al. (2005) com a cultivar Dover, onde o conteúdo inicial variou entre 40 a 60 mg 100 g⁻¹ de fruto fresco.

Tabela 4: Ácido ascórbico em morangos cv. Dover conforme os tratamentos e a armazenagem a 1, 7 e 14 dias a 5°C mais 2 dias a 20°C.

Tratamentos	Ácido ascórbico (mg 100 g ⁻¹)		
	Armazenamento (dias)		
	1+2	7+2	14+2
Controle	48,67 aA	53,28 bA	50,20 cA
Choque térmico-CT	50,69 aB	60,45 aA	54,30 bcB
Ácido salicílico-AS	54,30 aB	50,72 bB	68,13 aA
CT+AS	48,15 aB	60,45 aA	58,40 bA
CV(%)	6,78	10,00	13,62

*Médias seguidas pela mesma letra em maiúsculo na linha e minúsculo na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

3.4.6 Variação de massa

A perda de massa dos morangos (Figura 11) aumentou significativamente em função do período de armazenamento para todos os tratamentos, no entanto, não houve influência significativa dos tratamentos sobre a perda de massa. Este resultado pode estar relacionado com a incidência de fungos que também aumentou em função do período de armazenamento, o que pode ter levado a aceleração dos processos degradativos relacionados à senescência, com conseqüente aumento do conteúdo de água e maior perda por evaporação (CHITARRA e CHITARRA, 2005; CORDENUNSI et al., 2002). Resultado semelhante foi encontrado por Shin, Liu e Nock (2007), quando morangos apresentaram maior perda de massa ao longo do período de armazenamento.

Estes resultados diferem dos encontrados por Vicente et al. (2002), quando observaram que morangos tratados termicamente (45°C, 3h) apresentaram redução na perda de massa quando armazenados à temperatura de 20 °C. Os resultados diferem também dos encontrados por Shafiee et al. (2010) em que morangos apresentaram menor perda de peso quando tratados com AS em combinação com outro método.

No presente trabalho, a perda de massa fresca variou em torno de 6% até 7 dias a 5°C com mais 2 dias a 20°C, limite aceitável para a comercialização de morangos, contribuindo no sentido de minimizar os efeitos indesejáveis à aparência, como enrugamento. A perda de massa acima de 10% é suficiente para comprometer a aparência do morango, conferindo epiderme enrugada e sem brilho, podendo ser rejeitado pelo consumidor (FLORES-CANTILLANO, 2003; HERNANDÉZ-MUÑOZ et al., 2006).

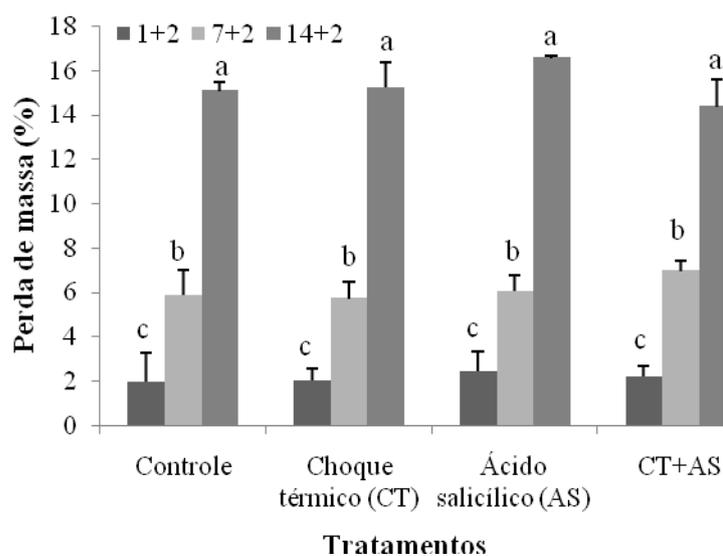


Figura 11. Perda de massa em morangos cv. Dover conforme os tratamentos e a armazenagem a 1, 7 e 14 dias a 5°C mais 2 dias a 20°C. *Barras seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

3.5 Conclusão

A combinação do choque térmico com ácido salicílico se mostrou menos efetivo que os demais tratamentos para a maioria das variáveis analisadas, indicando ser desvantajoso. Porém, o choque térmico isolado mostrou-se mais efetivo em reduzir a atividade de peroxidase, apresentou atividade inferior de polifenoloxidase comparado ao controle aos 7+2 dias e não diferiu dos demais tratamentos aos 14+2 dias, se mostrou efetivo em manter níveis elevados de compostos fenólicos, antocianinas e ácido ascórbico até 7+2 dias.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v.350, n.1, p.103-108, 1996.
- BABALAR, M.; ASGHARI, M.; TALAEI, A.; KHOSROSHAHI, A. Effect of pre-and postharvest salicylic acid treatment on ethylene production, fungal decay and overall quality of selva strawberry fruit. **Food Chemistry**, 105, p. 449–453, 2007.
- BAUTISTA-BANÕS, S.; GARCÍA-DOMÍNGUEZ E.; BARRERA-NECHA, L.L.; REYES-CHILPA R.; WILSON, C.L. Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts of huamuchil (*Pithecellobium dulce*): action against *Botrytris cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.29, p. 81-92, 2003.
- BENASSI, M.T.; ANTUNES, A.J. A comparison of meta-phosphoric and oxalic acids as extractant solutions for the determination of vitamin C in selected vegetables. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.34, p.507-513, 1988.
- BURNETTE, F.S. Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: a review. **Journal of Food Science**, v.2, n.1, p.1-6, 1977.
- CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; PERES, L.E.P. **Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática**. Piracicaba: Ceres, 2005. 650p.
- CHANG, C.; LIN, H.; CHANG, C.; LIU, Y. Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p.478-485, 2006.
- CHAZARRA, S.; GARCÍA-CARMONA, F.; CABANES, J. Evidence for a tetrameric form of Iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L) polyphenol oxidase: purification and characterization. **Food Chemistry**, v.49, p. 4870-4875, 2001.
- CHITARRA, M. I.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: UFLA, 2005.
- CIVELLO, P.M.; Martínez, G.A.; CHAVES, A.R.; AÑÓN, M.C. Heat Treatments Delay Ripening and Postharvest Decay of Strawberry Fruit. **Food Chemistry**, v. 45, p.4589-4594, 1997.
- CORDENUNSI, Beatriz R. Influence of Cultivar on Quality Parameters and Chemical Composition of Strawberry Fruits Grown in Brazil. **Food Chemistry**, v.50, p. 2581-2586, 2002.

CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O.; LAJOLO, F. M. Physico-chemical changes related to quality of five strawberry fruit cultivars during cool-storage. **Food Chemistry**, 83, 167–173, 2003.

CORDENUNSI, B. R. GENOVESE, M.I.; NASCIMENTO, J.R.O.; HASSIMOTTO, N.M.A.; SANTOS, R.J.S.; LAJOLO, F.M. Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. **Food Chemistry**, São Paulo-SP, n.91, p. 113-121, 2005.

COSTA, F.B. **Fisiologia e conservação de cultivares de morangos inteiros e minimamente processados**. Viçosa, 2009. 126f. Tese (Doctor Scientiae) - Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, UFV.

DEL RÍO, L.A.; PASTORI, G.M.; PALMA, J.M.; SANDALIO, L.M.; SEVILLA, F.; CORPAS, F.J.; ÉNEZ, A. J.; LÓPEZ-HUERTAS, E.; HERNÁNDEZ, J.A. The Activated Oxygen Role of Peroxisomes in Senescence. **Plant Physiology**. 116, p. 1195–1200, 1998.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R.K.O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, London, v.64, p.351-359, 1999.

ERKAN, M.; WANG, S. Y.; WANG, C. Y. Effect of UV treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity and decay in strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, p. 163–171, 2008.

FILHO, J. D.; ANTUNES, L. E. C.; PÁDUA, J. G. Cultivares. In: **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.28, n. 236, p. 20-23, 2007.

FLORES-CASTILLANO, R. F. Morango: produção. Embrapa Clima Temperado (Pelotas, RS). **Embrapa Informação Tecnológica**, Brasília, Frutas do Brasil, v. 40, p. 68-74, 2003.

FOOD and Agriculture Organization (FAO). 2010. Disponível em <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> Acesso em 15 nov. 2011.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, p.182, 1996.

GARCIA, José M.; AGUILERA, Cayetano; ALBI, Miguel A. Postharvest Heat Treatment on Spanish Strawberry (*Fragaria x ananassa* Cv. Tudla). **Food Chemistry**, v.43, p.1489-1492, 1995.

GERASIMOVA, N. G.; PRIDVOROVA, S. M. E OZERETSKOVSKAYA, O. L. Role of L-Phenylalanine Ammonia Lyase in the Induced Resistance and Susceptibility of Potato Plants. **Applied Biochemistry and Microbiology**, vol. 41, n°. 1, p. 103–105, 2005.

HAMMERSCHMIDT, T.R. et al. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v.20, p.73-82, 1982.

HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; ALMENAR, E.; OCIO, M.J.; GAVARA, R. Effect of calcium dips and chitosan coatings on postharvest life of strawberries (*Fragaria x ananassa*). **Postharvest Biology and Technology**, v.39, p.247–253, 2006.

HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. ALMENAR, E.; DEL VALLE, V.; VELEZ, D. GAVARA, R.. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria ananassa*) quality during refrigerated storage. **Food Chemistry**, Santiago-Chile, v.110, p. 428–435, 2008.

HIRAGA, S.; SASAKI, K. ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large Family of Class III Plant Peroxidases. **Plant Cell Physiol** v.42, p. 462-468, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. São Paulo: IAL, v.1, 3 ed., p.53, 2005.

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. 2007. Tese (Doutorado em Agronomia). ESALQ, São Paulo.

KUSKOSKI, Eugenia M. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1283-1287, 2006.

LÓPEZ-SERRANO, M. e ROS BARCELÓ, A. Peroxidase in unripe and processing-ripe strawberries. **Food Chemistry**, v.52, p.157-160, 1995.

LIMA, M.A.C.; ALVES, R.E.; ASSIS, J.S. de; FILGUEIRAS, H.A.C.; COSTA, J.T.A. Aparência, compostos fenólicos e enzimas oxidativas em uva “Itália” sob influência do cálcio e do armazenamento refrigerado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.1, p.039-043, 2002.

LOAIZA-VELARDE, J.G. TOMÁS-BARBERÁ, F.A.; SALTVEIT, M.E. Effect of intensity and duration of heat shock treatments on wound-induced phenolic metabolism in Iceberg lettuce. **Journal American Society for Horticultural Science**. 122, 1997.

LURIE, S. Postharvest heat treatments. **Postharvest Biology and Technology**, v.14, p.257–269, 1998.

LUSSO, M. F. G.; PASCHOLATI, S. F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathological**, v. 25. p. 244-249, 1999.

MAZARO, Sergio M.; DESCHAMPS, C.; MIO, L.L.M.; BIASI, L.A.; GOUVEA, A.; SAUTTER, C.K. Comportamento pós-colheita de frutos de morangueiro após a aplicação pré-colheita de quitosana e acibenzolar-smetil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 1, p. 185-190, 2008.

MITTLER, R., VANDERAUWERA, S., GOLLERY, M., VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**. v.9, n.10, p.490–498, 2004.

NGUYEN, T. B. T.; KETSA, S.; VAN DOORN, W. G. Relationship between browning and the activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage, **Postharvest Biology and Technology**, v.30, p.187–193, 2003.

OLIVEIRA, M.A.C. e SANTOS, A.M. Morango: produção. Embrapa Clima Temperado (Pelotas, RS)-Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 16, Frutas do Brasil; 40, 2003.

PATRAS, A.; BRUNTON, N.P.; DA PIEVE, S.; BUTLER, F. Effect of thermal and high pressure processing on antioxidant activity and instrumental colour of tomato and carrot purées. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.10, p.16–22, 2009.

QUINATO, E. E.; DEGÁSPARI, C. H.; VILELA, R. M. Aspectos nutricionais e funcionais do morango. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.8, n.1, 2007.

REDDY, B.M.V. BELKACEMI, K.; CORCUFF, R.; CASTAIGNE, F.; ARUL, J. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.20, p.39–51, 2000.

SALTVEIT, M.E. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. **Postharvest Biology and Technology**, v.21, p.61-69, 2000.

SADILOVA, E. STINTZING, F.C.; KAMMERER, D.R.; REINHOLD CARLE, R. Matrix dependent impact of sugar and ascorbic acid addition on color and anthocyanin stability of black carrot, elderberry and strawberry single strength and from concentrate juices upon thermal treatment. **Food Research Internat.**, v.42, p.1023–1033, 2009.

SANTOS, A. M.; MEDEIROS, A. R. M. Morango: produção. Embrapa Clima Temperado (Pelotas, RS)-Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, Frutas do Brasil; 40, p. 81, 2003.

SANTOS, C. G. **Análise de divergência genética e Fingerprint em cultivares de morangueiro** (*Fragaria x ananassa* Duch). Lavras, 2005. 57 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras.

SHAFIEE, M.; TAGHAVI, T. S. e BABALAR M. Addition of salicylic acid to nutrient solution combined with postharvest treatments (hot water, salicylic acid, and calcium dipping) improved postharvest fruit quality of strawberry. **Scientia Horticulturae**, v.124, p.40–45, 2010.

SHIN, Y.; LIU, R. H.; NOCK, J. F. Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, p.349–357, 2007.

SILVA, F.L.; ESCRIBANO-BAILÓN, M.T.; ALONSO, J.J.P.; RIVAS-GONZALO, J.C.; SANTOS-BUELGA, C. Anthocyanin pigments in strawberry. **LWT**, Bragança-Portugal, n.40, p.374-382, 2007.

SIMS, D.A.; GAMON, J.A. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. **Remote Sensing of Environment**, v.81, p. 337–354, 2002.

SINGLETON, V.L. et al. R.M. **Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent**. *Oxidants and Antioxidants, Part A*, v.299, p.152–178, 1999.

SRIVASTAVA, M. K. & DWIVEDI, U.N. Delayed ripening of banana fruit by salicylic acid. **Plant Science**, v.158, p.87–96, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. Ed. Porto Alegre: Artmed. p. 317-327., 2004

TORALLES, R. P.; VENDRUSCOLO, J.L.; HAAS, L. I. R.; FERRI, N.L.; DEL PINO, F.A. B.; ANTUNES, P.L. Caracterização parcial do escurecimento enzimático pela polifenoloxidase em pêssegos das cv. granada, jade, esmeralda e maciel. **Revista brasileira de Agrociência**, v. 10, n. 1, p. 241-244, 2004.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, v.34, n.1, p.68-71, 2006.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA – UFV. **SAEG 9.1: Sistema para Análises Estatísticas**. Viçosa, MG: Fundação Arthur Bernardes, 2007. (CD-ROM).

VICENTE, A. R. MARTÍNEZ, G.A.; CIVELLO, P.M.; CHAVES, A.R. Quality of heat-treated strawberry fruit during refrigerated storage. **Postharvest Biology and Technology**, 25, p.59–71, 2002.

VICENTE, A.R.; MARTÍNEZ, G.A.; CHAVES, A.R.; CIVELLO, P.M. Influence of self-produced CO₂ on postharvest life of heat-treated strawberries. **Postharvest Biology and Technology**, 27, p.265–275, 2003.

VICENTE, A. R.; MARTÍNEZ, G.A.; CHAVES, A.R.; CIVELLO, P.M. Effect of heat treatment on strawberry fruit damage and oxidative metabolism during storage. **Postharvest Biology and Technology**, 40, 116–122, 2006.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I.R.T.; BARRA, K.; STRINGUETA, P.C. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira Nutrição Clínica**, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Artigo de Revisão, v.28, p.141-149, 2008.

ZANATTA, C. L.; ZOTARELLI, M. F.; CLEMENTE, E. Peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em polpa de goiaba (*Psidium guajava* R.). **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, 26(3): 705-708, 2006

ZHANG, S.; ZHANG, F. e HUA, B. Enhancement of Phenylalanine Ammonia Lyase, Polyphenoloxidase, and Peroxidase in Cucumber Seedlings by *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) Infestation. **Agricultural Sciences in China**, v.7, n.1, p.82-87, 2008.

ZHANG, H.; MA, L.; TURNER, M.; XU, H.; ZHENG, X.; DONG, Y.; JIANG, S. Salicylic acid enhances biocontrol efficacy of *Rhodotorula glutinis* against postharvest *Rhizopus* rot of strawberries and the possible mechanisms involved. **Food Chemistry**, v.122, p.577–583, 2010.

ZHENG, YONGHUA; WANGB, S.Y.; WANGA, C.Y.; ZHENG, W. Changes in strawberry phenolics, anthocyanins, and antioxidant capacity in response to high oxygen treatments. **LWT** v.40, p.49–57, 2007.