

RUI FILIPE INÁCIO ANTÃO

**Aplicação de Nanoemulsões na Conservação de
Pera ‘Rocha’**



2019

RUI FILIPE INÁCIO ANTÃO

**Aplicação de Nanoemulsões na Conservação de
Pera ‘Rocha’**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em:

Hortofruticultura

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Maria Dulce Carlos Antunes

Doutora Custódia Maria Luís Gago



2019

Aplicação de Nanoemulsões na Conservação de Pera ‘Rocha’

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

(Rui Filipe Inácio Antão)

Copyright:

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar às minhas orientadoras Professora Maria Dulce Carlos Antunes e Doutora Custódia Maria Luís Gago por toda a ajuda na elaboração do trabalho prático e escrito, pela clareza da informação transmitida e pela disponibilidade demonstrada.

À Doutora Adriana Cavaco Guerreiro e ao Mestre Cristino Dores, pela grande contribuição na execução do trabalho prático.

À Mestre Rosa Pires, pela cedência de alguma bibliografia essencial para a elaboração deste trabalho.

Finalmente, os meus pais, pelo seu amor, amizade e incentivo permanente para terminar este grau académico.

Muito obrigado!

Resumo

A pera 'Rocha' é uma cultivar portuguesa de pera com características organolépticas únicas, destacando-se também pela sua capacidade de conservação. Esta variedade tem tendência ao aparecimento de desordens fisiológicas após armazenamento prolongado no frio, como o escaldão superficial. Após a proibição da difenilamina, o 1-metilciclopropeno (1-MCP) tem sido utilizado na conservação de pera 'Rocha' para prevenção do escaldão superficial do armazenamento, mas tem apresentado desvantagens, nomeadamente na progressão do amadurecimento dos frutos. Nanoemulsões contendo óleos essenciais têm revelado eficácia na conservação de produtos minimamente processados e outros, pela sua ação antimicrobiana e antioxidante e poderão ser usadas como alternativa ao 1-MCP. Neste trabalho foram testados 4 tratamentos com nanoemulsões contendo alginato e óleos essenciais citral (CI) e erva-príncipe (EP) em pera 'Rocha' armazenada a 0 °C durante 6 meses, e foram efetuadas análises qualitativas aos frutos no momento da aplicação, 2, 4 e 6 meses após armazenamento, assim como após 7 dias em condições de prateleira (22 °C). O controlo consistiu em frutos sem tratamento. Foram analisados a cor, firmeza, teor de sólidos solúveis, acidez titulável, perda de peso, extravasamento eletrolítico, escaldão superficial, acastanhamento interno, evolução microbiana e realizado um painel de provadores. Os tratamentos EP 1,25% e EP 2,5% obtiveram os resultados mais favoráveis quanto à evolução da maturação e prevenção do escaldão superficial, e as peras com o tratamento EP 1,25% tiveram a melhor aceitação geral nas provas organolépticas. Estes tratamentos exibiram melhorias na conservação de pera 'Rocha' no frio e podem servir de base em ensaios futuros para encontrar uma alternativa à utilização do 1-MCP nesta cultivar.

Palavras-chave: pera, nanoemulsões, óleos essenciais, conservação, escaldão superficial

Abstract

'Rocha' pear is a portuguese pear cultivar with unique organoleptic characteristics, also standing out for its storage capacity. This variety tends to develop physiological disorders after prolonged cold storage such as superficial scalding. 1-Methylcyclopropene (1-MCP) has been used in the preservation of 'Rocha' pear to prevent superficial scald, but has disadvantages, particularly in the resuming of fruit ripening. Nanoemulsions enriched with essential oils have been shown to be effective in fresh and fresh-cut products conservation for their antimicrobial and antioxidant action and may be used as an alternative to 1-MCP. In this work 4 formulations of alginate-based nanoemulsions enriched with essential oils (citral and lemongrass) were tested. 'Rocha' pears were dipped in these nanoemulsions and stored at 0 °C for 6 months. Qualitative analyses were performed at 2, 4 and 6 months after cold storage and after 7 days at 22 °C. Control consisted of uncoated fruits. Fruit colour, firmness, soluble solids content, titratable acidity, weight loss, electrolytic leakage, superficial scald, internal browning, microbiology and taste panel were analysed. EP 1.25% and EP 2.5% formulations had the most favourable results in the ripening evolution and superficial scald prevention, and pears coated with the EP 1.25% formulation had the best overall acceptance in organoleptic tests. These treatments have shown improvements in cold storage of 'Rocha' pear and may serve as a base for future studies to find an alternative to using 1-MCP in this cultivar.

Keywords: pear; nanoemulsions; essential oils, cold storage, superficial scald

Índice geral

1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica.....	2
2.1. A pera ‘Rocha’	2
2.1.1. Aspetos económicos	3
2.1.2. Colheita e pós-colheita da pera ‘Rocha’	4
2.2. Desordens fisiológicas da pera ‘Rocha’	6
2.2.1. Escaldão superficial.....	6
2.3. 1-Metilciclopropeno no controlo de desordens fisiológicas do armazenamento ..	7
2.4. Nanoemulsões baseadas em óleos essenciais.....	8
2.5. Justificação e objetivos	10
3. Materiais e métodos	11
3.1. Químicos	11
3.2. Procedimentos	11
3.2.1. Preparação das nanoemulsões.....	11
3.2.2. Caracterização físico-química.....	12
3.2.3. Material vegetal.....	13
3.2.4. Aplicação das nanoemulsões	13
3.2.5. Tiragens	13
3.2.6. Parâmetros analisados	14
3.2.6.1. Desordens fisiológicas	14
3.2.6.2. Cor da epiderme.....	14
3.2.6.3. Firmeza.....	15
3.2.6.4. Teor de sólidos solúveis (TSS).....	15
3.2.6.5. Acidez titulável.....	16
3.2.6.6. Extravasamento eletrolítico.....	16
3.2.6.7. Contagem de microrganismos	17
3.2.6.8. Perda de peso	17
3.2.6.9. Avaliação sensorial	18
3.2.6.10. Análise estatística	18
4. Resultados e Discussão	18
4.1. Nanoemulsões	18
4.1.1. Tamanho das gotículas, polidispersidade e potencial zeta	18
4.1.2. Microestrutura.....	20
4.2. Parâmetros de qualidade dos frutos	22

4.2.1. Desordens fisiológicas.....	22
4.2.2. Cor da epiderme	24
4.2.3. Firmeza	26
4.2.4. Teor de sólidos solúveis	28
4.2.5. Acidez titulável	29
4.2.6. Extravasamento eletrolítico	30
4.2.7. Contagem de microrganismos	31
4.2.8. Perda de peso	33
4.2.9. Avaliação sensorial	35
5. Conclusão	36
Bibliografia.....	37
Anexo	41

Índice de tabelas

Tabela 1 - Efeitos da colheita precoce ou tardia em Pomóideas (DGADR, 2012).	5
Tabela 2 – Condições de atmosfera controlada para a pera ‘Rocha’ produzida na região Oeste armazenada à temperatura de -1 a 0°C (Fonte: Almeida, 2017).	6
Tabela 3 – Nanoemulsões aplicadas nas peras.	12
Tabela 4 – Tamanho das gotículas (nm), índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta (mV) das nanoemulsões contendo alginato de sódio, citral e óleo essencial de erva-príncipe (<i>Cymbopogon citratus</i>).	19
Tabela 5 – Tamanhos médios das gotículas das nanoemulsões (nm), obtidos ao microscópio eletrônico de transmissão e com recurso ao difratômetro de laser.	21

Índice de figuras

Figura 1 – Distribuição da cultura de pera 'Rocha' em Portugal Continental (Fonte: ANP, 2016).....	2
Figura 2 – Imagem de pera 'Rocha' (Fonte: Luís Vicente, S.A., 2016).....	3
Figura 3 – Área (ha) e produção (ton) de pera 'Rocha' em Portugal (Fonte: GPP, 2016).	4
Figura 4 – Sistema de cores CIELab (Fonte: Sappi, 2013).....	15
Figura 5 – Imagens ao microscópio eletrónico de transmissão (MET) das nanoemulsões. A (CI 1%), B (CI 2%), C (EP 1,25%) e D (EP 2,5%).	20
Figura 6 – Incidência de escaldão superficial (%) em pera 'Rocha' revestidas com citral 1% (CI 1%) e 2% (CI 2%), óleo essencial de erva-príncipe 1,25% (EP 1.25%) e 2,5% (EP 2.5%) e Controlo (frutos como vêm do campo), ao longo do armazenamento a 0°C (A) e após os subsequentes 7 dias shelf-life (B).....	23
Figura 7 – Incidência de acastanhamento interno (%) em pera 'Rocha' revestidas com citral 1% (CI 1%) e 2% (CI 2%), óleo essencial de erva-príncipe 1,25% (EP 1.25%) e 2,5% (EP 2.5%) e Controlo (frutos como vêm do campo), ao longo do armazenamento a 0°C (A) e após os subsequentes 7 dias shelf-life (B).....	24
Figura 8 – Luminosidade (L*) da casca de pera 'Rocha' revestidas com citral 1% (CI 1%) e 2% (CI 2%), óleo essencial de erva-príncipe 1,25% (EP 1.25%) e 2,5% (EP 2.5%) e Controlo (frutos como vêm do campo), ao longo do armazenamento a 0°C (A) e após os subsequentes 7 dias shelf-life (B).....	25
Figura 9 – Tonalidade (Hue) da casca de pera 'Rocha' revestidas com citral 1% (CI 1%) e 2% (CI 2%), óleo essencial de erva-príncipe 1,25% (EP 1.25%) e 2,5% (EP 2.5%) e Controlo (frutos como vêm do campo), ao longo do armazenamento a 0°C (A) e após os subsequentes 7 dias shelf-life (B).....	26
Figura 10 – Firmeza (N) da polpa em pera 'Rocha' revestidas com citral 1% (CI 1%) e 2% (CI 2%), óleo essencial de erva-príncipe 1,25% (EP 1.25%) e 2,5% (EP 2.5%) e Controlo (frutos como vêm do campo), ao longo do armazenamento a 0°C (A) e após os subsequentes 7 dias shelf-life (B).....	27
Figura 11 – Teor de sólidos solúveis (°Brix) em pera 'Rocha' revestidas com citral 1% (CI 1%) e 2% (CI 2%), óleo essencial de erva-príncipe 1,25% (EP 1.25%) e 2,5% (EP 2.5%) e Controlo (frutos como vêm do campo), ao longo do armazenamento a 0°C (A) e após os subsequentes 7 dias shelf-life (B).....	29

Figura 12 – Acidez titulável (g ácido málico/mL) em pera ‘Rocha’ revestidas com citral 1% (CI 1%) e 2% (CI 2%), óleo essencial de erva-príncipe 1,25% (EP 1.25%) e 2,5% (EP 2.5%) e Controlo (frutos como vêm do campo), ao longo do armazenamento a 0°C (A) e após os subsequentes 7 dias shelf-life (B).....	30
Figura 13 – Extravasamento eletrolítico (%) em pera ‘Rocha’ revestidas com citral 1% (CI 1%) e 2% (CI 2%), óleo essencial de erva-príncipe 1,25% (EP 1.25%) e 2,5% (EP 2.5%) e Controlo (frutos como vêm do campo), ao longo do armazenamento a 0°C (A) e após os subsequentes 7 dias shelf-life (B).....	31
Figura 14 – Contagem de microrganismos mesófilos (logUFC/g) em pera ‘Rocha’ revestidas com citral 1% (CI 1%) e 2% (CI 2%), óleo essencial de erva-príncipe 1,25% (EP 1.25%) e 2,5% (EP 2.5%) e Controlo (frutos como vêm do campo), ao longo do armazenamento a 0°C (A) e após os subsequentes 7 dias shelf-life (B).	32
Figura 15 – Contagem de fungos e leveduras (logUFC/g) em pera ‘Rocha’ revestidas com citral 1% (CI 1%) e 2% (CI 2%), óleo essencial de erva-príncipe 1,25% (EP 1.25%) e 2,5% (EP 2.5%) e Controlo (frutos como vêm do campo), ao longo do armazenamento a 0°C (A) e após os subsequentes 7 dias shelf-life (B).	33
Figura 16 – Perda de peso (%) em pera ‘Rocha’ revestidas com citral 1% (CI 1%) e 2% (CI 2%), óleo essencial de erva-príncipe 1,25% (EP 1.25%) e 2,5% (EP 2.5%) e Controlo (frutos como vêm do campo), ao longo do armazenamento a 0°C (A) e após os subsequentes 7 dias shelf-life (B).	34
Figura 17 – Avaliação sensorial de pera ‘Rocha’ revestidas com citral 1% (CI 1%) e 2% (CI 2%), óleo essencial de erva-príncipe 1,25% (EP 1.25%) e 2,5% (EP 2.5%) e Controlo (frutos como vêm do campo), após 6 meses de armazenamento a 0°C mais 7 dias de shelf-life. Os valores representam a média de 15 repetições.....	35

1. Introdução

A pera 'Rocha' é um produto de Denominação de Origem Protegida (DOP) e engloba uma área geográfica, região do Oeste, cuja produção apresenta características únicas de qualidade (Soares et al., 2003).

A pera 'Rocha' é uma variedade com elevada resistência ao manuseamento e ao transporte, podendo conservar-se em câmaras frigoríficas de atmosfera normal, entre 4-5 meses, ou por mais tempo em câmaras frigoríficas de atmosfera controlada. Outro aspeto é a longevidade do produto até ao consumo, depois de embaladas e colocadas à temperatura ambiente estão boas para consumo durante 5 a 8 dias, por vezes durante mais tempo (ANPR, 2009).

No entanto, durante o armazenamento no frio é suscetível a desordens fisiológicas. O escaldão superficial é uma desordem fisiológica que ocorre em peras armazenadas no frio por um longo período. Consiste no aparecimento de manchas escuras e irregulares na epiderme da pera, essa aparência do fruto prejudica na sua comercialização. O 1-metilciclopropeno (1-MCP) tem-se mostrado eficaz na prevenção do escaldão superficial e outras desordens em pera armazenada no frio (Hui et al., 2011), mas a sua utilização provoca problemas na textura da polpa do fruto (Saquet et al., 2016).

A utilização de nanoemulsões edíveis, como um método de dispersão de ingredientes ativos lipofílicos em meio aquoso, é um método emergente e com potencial para o desenvolvimento de novos produtos alimentares (Salvia-Trujillo et al, 2015). Nanoemulsões que incorporam óleos essenciais têm revelado eficácia como antimicrobianas (Acevedo-Fani, 2015) e antioxidantes (Donsì, 2011) em produtos minimamente processados e bebidas (Salvia-Trujillo et al., 2013).

Sendo o escaldão superficial relacionado com processos oxidativos, estas nanoemulsões poderão ser benéficas na redução desta desordem fisiológica.

A polpa caracteriza-se pela cor branca, macia crocante (na maturação comercial) ou macia fundente (na maturação fisiológica). É granulosa, doce e muita sumarenta com cheiro agradável (Alexandre et al., 2001).



Figura 2 – Imagem de pera ‘Rocha’ (Fonte: Luís Vicente, S.A., 2016).

2.1.1. Aspetos económicos

A pera ‘Rocha’ é um fruto transacionável no mercado internacional há mais de uma década. As exportações têm aumentado consideravelmente, tendo passado de 14 milhões de euros para 87 milhões de euros, de 2000 a 2015, sendo o saldo comercial positivo (76 milhões de euros em 2015). O principal destino das exportações de pera ‘Rocha’ é a União Europeia (GPP, 2016).

Em 2005 Portugal produziu cerca de 130 000 toneladas de pera ‘Rocha’, aumentando a produção para 210 000 toneladas em 2015. Este aumento deriva da intensificação de novos pomares, já que a área de produção se manteve sensivelmente constante (GPP, 2016).

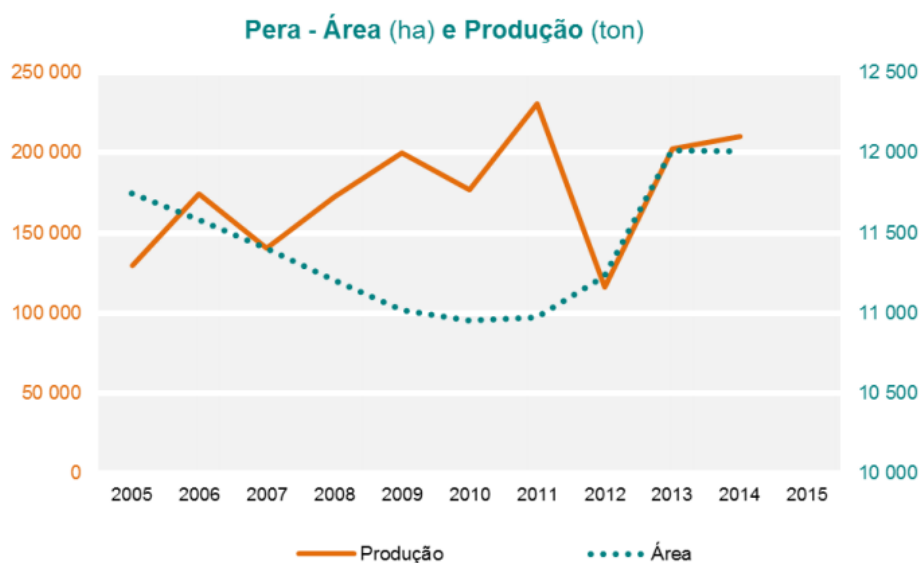


Figura 3 – Área (ha) e produção (ton) de pera ‘Rocha’ em Portugal (Fonte: GPP, 2016).

2.1.2. Colheita e pós-colheita da pera ‘Rocha’

A colheita dos frutos é uma operação que deve ser efetuada na época própria de cada cultivar, devido à influência que pode exercer na qualidade e poder de conservação dos frutos. Estes são colhidos num estado de maturação que permita obedecer às exigências de qualidade comercial (DGADR, 2012).

A antecipação da colheita pode desvalorizar a qualidade dos frutos, nomeadamente pela menor coloração da epiderme, propriedades organolépticas inferiores, maior perda de peso durante a conservação, suscetibilidade ao “bitter pit”, escaldão superficial e acastanhamento interno (DGADR, 2012).

A colheita tardia, embora possa favorecer algumas das características dos frutos, como a coloração e qualidades organolépticas, conduz, se efetuada de forma generalizada, a maiores perdas de consistência dos frutos durante a conservação, período de conservação mais curto, maior sensibilidade às manipulações, maior vulnerabilidade aos escaldões de senescência e maior sensibilidade à ação do dióxido de carbono. Em geral, as peras são sensíveis às desordens fisiológicas das baixas temperaturas (DGADR, 2012).

A tabela 1 resume os efeitos da época de colheita no desenvolvimento de alterações fisiológicas na pera ‘Rocha’.

Tabela 1 - Efeitos da colheita precoce ou tardia em Pomóideas (DGADR, 2012).

Alteração fisiológica	Colheita	
	Precoce	Tardia
escaldão comum	+	
“bitter pit”	+	
vitescência		+
coração castanho “CO2 injury”		+
acastanhamento interno		+
engelamento da epiderme	+	
escaldão mole		+
“Jonathan spot”		+

+ - maior sensibilidade.

Para que a pera ‘Rocha’ chegue ao consumidor na sua melhor qualidade é preciso que a colheita seja realizada em condições ótimas, de forma a atingir o melhor sabor e aroma no consumidor. A colheita é a primeira fase de seleção no processo da qualidade. Tradicionalmente, na região Oeste, a colheita das peras é feita a partir da segunda semana de agosto. A decisão da data de colheita é um aspeto fundamental no processo de conservação (Alexandre et al., 2001). Colheitas precoces ou tardias, deficientemente executadas, originam frutos de menor qualidade.

Segundo o Caderno de Especificações da Pera ‘Rocha’, para a determinação da data ótima de colheita recorrem-se aos seguintes parâmetros (ANPR, 2009):

- Firmeza da polpa entre 53,9 e 63,7 N
- Índice refratométrico entre 11 e 13 °Brix
- Acidez entre 2-3 g/L de ácido málico
- Nº de dias após plena floração – 135 a 140 dias
- Cor das sementes

Uma das grandes qualidades da pera ‘Rocha’ é a sua excelente capacidade de conservação (ANPR, 2009): em atmosfera normal conserva-se cerca de cinco meses à temperatura de 0 °C; em atmosfera controlada é possível prolongar a conservação para sete a oito meses (a 0 °C) (Alexandre et al., 2001).

A atmosfera controlada não só diminui o risco de escaldão superficial como permite o controlo dos acastanhamentos internos. Inversamente poderão surgir as cavernas carpelares (Alexandre et al., 2001).

Recentemente, Almeida (2017) apresentou uma tabela de condições ótimas de armazenamento adaptadas à pera ‘Rocha’ (Tabela 2).

Tabela 2 – Condições de atmosfera controlada para a pera ‘Rocha’ produzida na região Oeste armazenada à temperatura de -1 a 0 °C (Fonte: Almeida, 2017).

Critério	Oxigénio	Dióxido de carbono
Intervalo	0,2 a 3,0 kPa	≤0,7 kPa
Ótimo técnico	0,2 a 0,5 kPa	0,5 kPa
Benefícios	Redução da taxa de respiração, produção de etileno, alteração de cor, manutenção da firmeza	Retenção da cor e firmeza
Potencial de benefício	Elevado	Ligeiro
Níveis indutores de danos	<0,1 kPa	≥1 kPa
Sintomas de danos	<i>Flavours</i> de fermentação	<i>Flavours</i> de fermentação; acidentes fisiológicos internos
Potencial de danos	Moderado	Elevado

2.2. Desordens fisiológicas da pera ‘Rocha’

2.2.1. Escaldão superficial

O escaldão superficial é uma desordem fisiológica do armazenamento que afeta peras e maçãs. Esta desordem desenvolve-se durante o armazenamento em frio e intensifica-se após os frutos estarem sujeitos a temperaturas de mercado (Whitaker, 2013). Em pera ‘Rocha’ esta desordem surge normalmente após quatro meses de armazenamento no frio (Isidoro et al., 2006). Os sintomas do escaldão superficial são o aparecimento de manchas castanhas ou pretas na pele, devido à necrose de algumas camadas de células hipodérmicas. A suscetibilidade ao escaldão superficial varia com a

cultivar, com as condições climáticas durante a produção, o estado de maturação a colheita e com as condições de armazenamento (Whitaker, 2013).

O sesquiterpeno (E,E)- α -farneseno acumula-se em quantidades relativamente grandes na pele de peras e maçãs (cutícula, epiderme e hipoderme), durante o armazenamento no frio. A oxidação do α -farneseno origina trienóis conjugados, que são bastante reativos, e que vão perturbar as membranas das células da pele dos frutos e causar o seu acastanhamento e necrose, devido à ação da polifenoloxidase (Isidoro et al., 2006).

2.3. 1-Metilciclopropeno no controlo de desordens fisiológicas do armazenamento

A utilização de difenilamina (DPA) tem sido um método de prevenção do escaldão superficial em peras e maçãs, devido à sua ação antioxidante (Drzyzga, 2003). Até 2013 a pera ‘Rocha’ foi conservada com a aplicação do fungicida imazalil para reduzir o desenvolvimento de podridões e de difenilamina (DPA) para controlar o acastanhamento interno e o escaldão superficial. Contudo, a partir desse ano o uso do DPA foi proibido na União Europeia e obrigou à utilização de alternativas para a conservação deste fruto (Almeida et al., 2015).

O 1-metilciclopropeno (1-MCP) é um cicloalceno bloqueador da ação do etileno, responsável pela maturação e senescência dos produtos hortofrutícolas. O 1-MCP é bastante utilizado para a manutenção da qualidade dos produtos hortofrutícolas e para aumentar o seu período de armazenamento, pela sua eficácia e por ser não-tóxico (Xiaoyang et al., 2015). Muitos estudos mostraram que o 1-MCP não apenas mantém a qualidade dos produtos em pós-colheita, mas como pode prevenir desordens fisiológicas eficazmente durante o armazenamento e em vida de prateleira de maçãs e de algumas cultivares europeias de pera (Hui et al., 2011). O 1-MCP previne o escaldão superficial através da redução da síntese de α -farneseno (Almeida et al., 2015).

Embora o 1-MCP seja eficaz na conservação de pera ‘Rocha’ e na prevenção de desordens fisiológicas, o 1-MCP poderá provocar um atraso do amadurecimento dos frutos quando retirados da câmara de conservação e colocados a 20 °C (Alpalhão et al., 2009). Este atraso da maturação resulta numa textura da polpa mal classificada em provas organoléticas. O efeito do 1-MCP associado às condições de atmosfera controlada

mantém-se durante a vida de prateleira, provocando um atraso na maturação devido à incapacidade da pera ‘Rocha’ retomar a produção de etileno quando submetido a este tratamento (Saquet et al., 2016).

2.4. Nanoemulsões baseadas em óleos essenciais

As películas edíveis têm sido propostas como uma solução para aumentar a qualidade e a segurança de produtos alimentares. Esta tecnologia protege os produtos alimentares da desidratação e funciona como uma barreira aos gases do exterior. Além disso, é possível a incorporação de compostos nestas películas como agentes antimicrobianos, antioxidantes, entre outros (Acevedo-Fani et al., 2015).

O alginato de sódio é um polissacárido isolado de algas marinhas, usado na indústria alimentar como espessante, e que também possui propriedades favoráveis à formação de películas (Acevedo-Fani et al., 2015).

Os óleos essenciais são óleos aromáticos extraídos de plantas, e são normalmente utilizados como aromatizantes em produtos alimentares (Acevedo-Fani et al., 2015). As suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas contra vários microrganismos patogénicos têm sido demonstradas em vários ensaios (Donsì et al., 2011). No entanto, a incorporação de óleos essenciais em películas edíveis está limitada, principalmente porque concentrações eficazes no controlo de microrganismos são suficientemente altas para causar alterações organoléticas que diminuem a aceitação dos produtos pelo consumidor. A baixa solubilidade em água dos óleos essenciais é outro fator da sua limitação de aplicação (Acevedo-Fani et al., 2015). Para minimizar o impacto nas características organoléticas dos produtos alimentares nos quais os óleos essenciais estão aplicados, estes necessitam de ser protegidos da interação com outros compostos e do stress ambiental durante o armazenamento (Li, et al., 2016).

As nanoemulsões são emulsões cuja dimensão das gotículas varia entre 20 e 200 nm (Li et al., 2016). Atualmente esta tecnologia é usada em fitofármacos, na cosmética, em produtos farmacêuticos (Lu et al., 2017) e está a ser usada cada vez mais na encapsulação, proteção e libertação de ingredientes lipofílicos em produtos alimentares líquidos ou hortofrutícolas minimamente processados. A pequena dimensão das gotículas permite o melhoramento das propriedades físico-químicas, da estabilidade da emulsão,

da melhoria da atividade antimicrobiana através do aumento da superfície de contato por unidade de massa (Acevedo-Fani et al., 2015), pela intensificação da biodisponibilidade das substâncias ativas e do seu transporte através de membranas biológicas (Salvia-Trujillo et al., 2015). O aumento da superfície de contato permite a utilização de menores doses de substâncias ativas em comparação com as emulsões convencionais. Outros autores verificaram uma atividade antimicrobiana alta em nanoemulsões com óleos essenciais (Acevedo-Fani et al., 2015).

A natureza hidrofóbica dos óleos essenciais induz perturbações ao nível da membrana citoplasmática, como a alteração do fluxo de elétrons, transporte ativo e promovem a coagulação de produtos intracelulares, causando o colapso das células dos microrganismos (Salvia-Trujillo et al., 2015).

O citral (3,7-dimetil-2, 6-octadienal) é um monoterpene que ocorre naturalmente em plantas e nos frutos cítricos. Possui atividade antifúngica e bactericida, inseticida, desodorizante, entre outras. O citral é suscetível à degradação por oxidação, que resulta na perda da atividade antimicrobiana em condições de armazenamento normais. É também insolúvel em água a pH neutro. As nanoemulsões são uma tecnologia eficaz para a microencapsulação, solubilização e proteção deste composto (Lu et al., 2017).

Cymbopogon citratus, de nome comum erva-príncipe ou “lemongrass”, em inglês, é uma planta que tem sido cultivada com fins medicinais em vários países. É caracterizada por um aroma intenso a limão devido à alta concentração de citral (75%) no seu óleo essencial. O óleo essencial da erva-príncipe tem atividade antimicrobiana contra fungos, leveduras e bactérias Gram(+) e Gram(-) (Riquelme et al., 2017).

2.5. Justificação e objetivos

As peras são frutos climatéricos, nos quais as principais modificações resultantes da maturação são reguladas pela produção interna de etileno e pelo aumento da taxa respiratória. Durante o amadurecimento são verificadas nos frutos alterações na firmeza da polpa, na cor, na acidez, no teor de açúcares e na produção de aromas (Alpalhão et al., 2009). Até 2013, a prevenção do aparecimento da desordem fisiológica de frio, escaldão superficial, durante a conservação da pera ‘Rocha’ em Portugal, fazia-se com recurso à difenilamina (DPA), que foi proibida na União Europeia a partir desse ano (Almeida et al., 2015). Atualmente a conservação da pera ‘Rocha’ faz-se através da utilização de 1-metilciclopropeno (1-MCP), que é eficaz na prevenção desta desordem fisiológica, mas que causa problemas de amadurecimento e, conseqüentemente, da textura da polpa, nomeadamente na manutenção de valores de firmeza muito elevados.

O objetivo deste trabalho é testar a eficácia de nanoemulsões baseadas em óleos essenciais na conservação de pera ‘Rocha’ a 0 °C em atmosfera normal, nomeadamente na prevenção do aparecimento do escaldão superficial e de doenças pós-colheita, sem comprometer as características organolépticas típicas do fruto no momento do seu consumo. Espera-se que a ação antioxidante dos óleos essenciais previna o escaldão superficial, que é provocado pela oxidação do α -farneseno; que a natureza antimicrobiana dos óleos essenciais reduza a incidência de doenças pós-colheita, e que a película formada crie uma barreira semipermeável aos gases e reduza a produção e efeito do etileno.

3. Materiais e métodos

3.1. Químicos

As nanoemulsões usadas consistiram em soluções de alginato de sódio e diferentes concentrações de dois óleos essenciais – citral e óleo essencial de erva-príncipe – encapsulados à escala nano. A água utilizada para a elaboração destas nanoemulsões foi obtida num sistema de filtração Millipore Milli-Q (Merck, Darmstadt, Germany). Foi usado alginato de sódio (Sigma-Aldrich, Germany). Os óleos essenciais utilizados na preparação das nanoemulsões foram o citral (ACROS Organics Citral 95% mixture of cis and trans), e óleo essencial de erva-príncipe (*Cymbopogon citratus*) (Oils4life aromatherapy Lemongrass Cymbopogon Schoenanthus Oil). Como emulsionante usou-se polisorbato 80 (Tween 80, Fisher Bioreagents BP338-500). Como indutor de reticulação polimérica usou-se cloreto de cálcio (PRS Panreac Calcium Chloride anhydrous powder purissimum) e ácido ascórbico (F L-Ascorbic acid) como antioxidante.

Na execução da microbiologia usaram-se os meios de cultura Plate Count Agar (PCA) para bactérias e o Dicloran Rose-Bengal Cloranfenicol Agar (Biokar, Paris, França) para fungos e leveduras. Utilizou-se soluto de Ringer (Biokar, Paris, França) para diluir as amostras.

3.2. Procedimentos

3.2.1. Preparação das nanoemulsões

As nanoemulsões foram preparadas dissolvendo alginato de sódio em água ultrapura, previamente aquecida a 70 °C em placas de aquecimento (VELP Scientifica), com agitação contínua até a solução ficar homogénea e sem partículas em suspensão. Após o alginato de sódio arrefecer até à temperatura ambiente, incorporaram-se os óleos essenciais citral, óleo essencial de erva-príncipe (*Cymbopogon citratus*), e polisorbato 80 como emulsionante, na proporção óleo/surfactante de 1:3. Essa incorporação dos óleos foi feita usando um “thermomix” (Vorwerk & Co. KG, Wuppertal, Germany) e fazendo 6 séries de homogeneização das emulsões, com a duração de 1 min e na velocidade 9, sem exceder os 37 °C. Depois, a emulsão foi homogeneizada com um T-18 Ultraturrax (IKA, Staufen, Germany) durante 1 min a 11,000 rpm. As concentrações de cada componente das nanoemulsões estão descritas na tabela 3:

Tabela 3 – Nanoemulsões aplicadas nas peras.

Número do tratamento	Código da nanoemulsão	Substância	Concentração do(s) óleo(s) essencial(is) (g/100g)	Tween 80 (g/100g)	Alginato de sódio (g/100g)
1	CI 1%	Citral	1,00	3,00	2,00
2	CI 2%	Citral	2,00	6,00	2,00
3	EP 1,25%	Erva-príncipe	1,25	3,75	2,00
4	EP 2,5%	Erva-príncipe	2,50	7,50	2,00
5	Controlo	-	-	-	-

A composição e concentrações das nanoemulsões são baseadas num trabalho realizado por Gago et al. (2019). As concentrações dos óleos essenciais são superiores à concentração mínima inibitória (MIC), pois contou-se com uma libertação lenta dos mesmos devido ao seu encapsulamento, e por ser um ensaio de longa duração, poderia haver alguma perda por volatilização ao longo do tempo.

3.2.2. Caracterização físico-química

As dimensões das gotículas, o índice de polidispersidade e o diâmetro médio das gotículas grosseiras foram medidos usando um difractómetro de laser (Nano-ZS Zetasizer, Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.) funcionando a 633 nm, 25 °C e equipado com um detetor de retroespalhamento (173°).

As dimensões das gotículas e a sua forma foram observadas diretamente através de microscopia eletrónica de coloração negativa. As nanoemulsões foram diluídas usando água ultrapura com um fator de diluição de 1:10, e adsorvidas durante 1 minuto em redes de cobre/paládio revestidas com carbono. Depois, as redes foram lavadas três vezes, flutuando com a face para baixo durante um minuto. As amostras foram negativamente coradas colocando-as com a face para baixo durante 1 minuto numa gota de molibdato de amónio a 2% (p/p) a pH 6,5. As redes foram observadas num microscópio eletrónico de transmissão Morgagni 268D TEM (FEI Company, Netherlands) com uma câmara CCD Mega-View (Olympus).

3.2.3. Material vegetal

Neste ensaio foram utilizadas peras *Pyrus communis* L. cv. ‘Rocha’ provenientes de um único pomar, situado no Bombarral (distrito de Leiria), e colhidas num estado de maturação semelhante e apropriado para armazenamento em câmara frigorífica, e transportadas no mesmo dia para a Universidade do Algarve (Faro, Portugal). As peras foram selecionadas de modo a que a amostra fosse homogénea em termos de calibre e que não apresentasse sintomas de doenças ou danos mecânicos visíveis.

3.2.4. Aplicação das nanoemulsões

Com a nanoemulsão dentro de um recipiente plástico, as peras foram mergulhadas durante 2 minutos, sendo ligeiramente agitadas para garantir a total cobertura dos frutos pelo tratamento. Após este procedimento, as peras foram colocadas numa solução de cloreto de cálcio (1%) e ácido ascórbico (1%) durante 1 minuto, para induzir a formação de reticulação polimérica (“crosslinking”) e fixar a nanoemulsão à epiderme. Depois foi retirado o excesso de emulsão através da utilização de um utensílio de cozinha para escorrer salada. Seguidamente, os frutos foram colocados em caixas de polipropileno abertas, contendo cada caixa 18 peras, e após a aplicação das nanoemulsões, as caixas foram identificadas com o respetivo tratamento e colocadas em câmara frigorífica a 0 °C, com humidade relativa do ar de 90-95% e concentrações atmosféricas normais de oxigénio e dióxido de carbono.

3.2.5. Tiragens

Após a aplicação das nanoemulsões fez-se uma tiragem de cada tratamento e procedeu-se à análise dos diversos parâmetros descritos nas próximas alíneas. As tiragens consistiram em retirar 12 frutos de 3 caixas diferentes (repetições) de cada tratamento da câmara frigorífica e analisaram-se 6 peras de cada uma das repetições no próprio dia, e deixou-se o mesmo número de frutos à temperatura de cerca de 21 °C durante 7 dias, para simular tempo e condições de prateleira (“shelf-life”). Foram feitas tiragens no dia da aplicação das nanoemulsões, 2, 4 e 6 meses depois, e após os respetivos 7 dias de

prateleira. Assim, cada tratamento teve 18 frutos analisados, organizado por 3 réplicas de 6 peras cada, aos 0 dias e aos 7 dias após a saída da câmara.

3.2.6. Parâmetros analisados

3.6.2.1. Desordens fisiológicas

A incidência de desordens fisiológicas, como o escaldão superficial e o acastanhamento interno, foi verificada através de avaliação visual, efetuada por vários elementos da equipa do laboratório e como descrito em (Gago et al., 2015). Os resultados foram expressos em percentagem do número total de frutos.

3.2.6.2. Cor da epiderme

A cor da epiderme dos frutos foi determinada com recurso a colorimetria. Foi usado um colorímetro Minolta Meter CR-300 para medir a luminosidade, a cor e a saturação através da escala CIEL*a*b*. Esta escala de classificação contém uma variável para a luminosidade (L*) e duas variáveis para a cor (a* e b*). Num modelo tridimensional (figura 4), o eixo cromático a* varia entre o verde (-a*) e o vermelho (+a*), o eixo cromático b* varia entre o azul (-b*) e o amarelo (+b*). O eixo da luminosidade, representada por (L*) varia entre 0 (negro) e 100 (branco) (Sappi, 2013).

No início de cada série de medições, o colorímetro foi calibrado numa superfície branca com um padrão pré-definido (Y = 93.0; x = 0.3133; y = 0.3193).

As leituras foram efetuadas em três pontos na zona equatorial de cada fruto e registados os valores de L*, a* e b*, com base nesses valores, foi calculado o croma ou saturação da cor (C*) e a tonalidade (h°), com base nas fórmulas:

$$Hue (h^{\circ}) = SE (a^* > 0; \arctan(b^*/a^*) \times \frac{180}{3,1416}; \arctan(b^* a^*) \times \frac{180}{3,1416} + 180$$

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

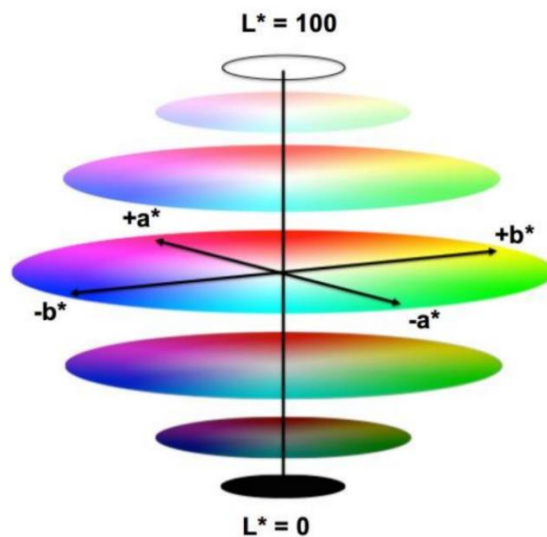


Figura 4 – Sistema de cores CIELab (Fonte: Sappi, 2013).

3.2.6.3. Firmeza

A resistência e dureza da polpa das peras foi determinada através de ensaios de firmeza. Para efetuar estes testes, utilizou-se um penetrómetro Chatillon TCD200 com um Digital Force Gauge DFIS 50 (John Chatillon & Sons, Inc., USA) e um êmbolo de 8 mm de diâmetro, que perfurou o fruto até aos 7 mm de profundidade. A penetração do êmbolo foi efetuada em dois pontos opostos de cada pera, na zona equatorial do fruto. Nesses locais a casca da pera foi previamente removida.

A firmeza do fruto foi expressa em Newton (N) e consistiu na média dos dois valores obtidos em cada fruto.

3.2.6.4. Teor de sólidos solúveis (TSS)

O °Brix é uma unidade que representa o teor de sólidos solúveis numa solução. O °Brix dos frutos foi medido através do refratómetro digital PR1 ATAGO Co LTD (Japan).

A polpa das peras foi moída e filtrada, obtendo-se um sumo sem polpa e representativo de todo o fruto. O sumo usado para a determinação do TSS não foi sujeito a nenhuma diluição.

3.2.6.5. Acidez titulável

A acidez dos frutos é resultante dos ácidos orgânicos presentes nos mesmos. Para determinar a concentração de ácidos orgânicos nas peras, recorreu-se à titulação. Foi utilizado um titulador automático Titroline (R) 6000, SI Analytics GmbH, Germany. Como titulante usou-se NaOH com concentração de 0,1 N e as amostras tituladas foram retiradas do mesmo sumo obtido para determinação do TSS, mas sujeitas a uma diluição de 1:2 em água destilada. Os resultados foram expressos em gramas de ácido málico por mL de solução titulada (g ácido málico/mL).

3.2.6.6. Extravasamento eletrolítico

Quando uma célula morre e a integridade da membrana celular se perde, ocorre derramamento de eletrólitos para fora da célula. O extravasamento eletrolítico, ou, em inglês, *electrolytic leakage*, permite quantificar a morte de células através da medição da condutividade elétrica da água que contém os tecidos. Esta técnica tem sido usada para quantificar a morte celular derivada de stress biótico, abiótico, de frio e calor, entre outros (Hatsugai et al. 2018). Neste ensaio, este método permitiu analisar a integridade celular dos tecidos ao longo do tempo.

O extravasamento de eletrólitos foi avaliado como descrito por Antunes e Sfakiotakis (2008) com modificações. Para cada tratamento foram usadas duas amostras, compostas por 5 discos de pele de pera com 18 mm de diâmetro, de 5 frutos diferentes. Os discos de pele de pera foram lavados com água desionizada para eliminar a presença de iões extravazados na superfície do corte e colocados em 20 mL de água desionizada. Depois de uma incubação a 22-25 °C durante 6 horas, a condutividade elétrica da suspensão foi medida com recurso a um condutivímetro Orion 011007 (Thermo Scientific Orion Star™, Beverly, USA). Depois as suspensões foram colocadas num autoclave a 120 °C durante 20 minutos e deixadas arrefecer até a temperatura ambiente. A condutividade elétrica foi medida novamente e considerada o extravasamento eletrolítico total. A percentagem de condutividade medida antes e depois da amostra ser fervida foi considerada como o rácio (x100) das medições de condutividade antes e depois de se terem aquecido as amostras.

3.2.6.7. Contagem de microrganismos

Foram efetuadas contagens de microrganismos para cada tratamento. Estes procedimentos consistiram na contagem de bactérias aeróbias mesofílicas, psicofílicas, de fungos e leveduras. A contagem de mesófilos e psicrofílos foi feita de acordo com a norma portuguesa NP-4405 (2002), usando como meio o Plate Count Agar (PCA). A contagem de fungos e bactérias foi efetuada de acordo com a norma ISO 21527-2 (2008), usando como meio o Dicloran Rose-Bengal Cloranfenicol Agar (Biokar, Paris, França).

Transferiram-se 10 gramas de cada amostra para 90 mL de água peptonada (Oxoid) e foram homogeneizados. Foram preparadas diluições decimais usando o mesmo solvente. A temperatura de incubação das leveduras e fungos foi de 25 ± 1 °C durante 48-72 h, para as bactérias aeróbias mesófilas foi de 30 ± 1 °C durante 24-72h e de $6,5 \pm 1$ °C durante 5 a 10 dias para bactérias psicofílicas. Estes ensaios foram realizados em triplicado. Os resultados foram expressos como Log₁₀ CFU (Colony Forming Unit) por grama de peso fresco.

3.2.6.8. Perda de peso

O ensaio de perda de peso mede a perda de água dos frutos por transpiração ao longo do tempo. Três caixas com 18 frutos de cada tratamento foram pesadas antes da colocação em câmara frigorífica e pesadas novamente nos dias das tiragens de frutos para proceder às análises. As caixas foram pesadas após serem retiradas da câmara frigorífica (dia 0) e após o tempo de prateleira (dia 7).

Os resultados da perda de peso foram apresentados em percentagem, e calculados através da fórmula:

$$\text{Perda de peso (\%)} = \frac{\text{Peso}_{\text{inicial}} - \text{Peso}_{\text{final}}}{\text{Peso}_{\text{inicial}}} \times 100$$

3.6.2.9. Avaliação sensorial

Foi efetuada uma prova organolética com 15 provadores semi-treinados com base numa escala de 7 pontos (1 = desgosto bastante; 2 = desgosto; 3 = desgosto ligeiramente; 4 = não gosto nem desgosto; 5 = gosto ligeiramente; 6 = gosto; 7 = gosto muito) para caracterizar os seguintes parâmetros: aparência do fruto, aparência da polpa, aroma, doçura, textura, sabor e aceitação geral. O painel de provadores consistiu em estudantes e colaboradores da faculdade, que foram treinados desde o início do ensaio para se familiarizarem com as características do fruto e com os preceitos das provas. Todos os parâmetros foram analisados após 6 meses de armazenamento no frio e após 7 dias de tempo de prateleira. A prova organolética foi realizada num laboratório destinado a testes sensoriais, equipado com compartimentos individuais para provas.

3.6.2.10. Análise estatística

A análise estatística foi efetuada com recurso ao software SPSS 24.0 (IBM, Inc.). Foi efetuada uma “Two-way analysis of variance (ANOVA)” utilizando os tratamentos e o tempo de armazenamento como fatores. Usou-se o teste de Duncan (multiple-range) ($P < 0.05$) para comparação das médias.

4. Resultados e Discussão

4.1. Nanoemulsões

4.1.1. Tamanho das gotículas, polidispersidade e potencial zeta

Existem várias opiniões sobre o intervalo de tamanhos das gotículas de uma emulsão, para que se considere dentro da escala “nano”. Otoni et al., (2016) consideram que uma emulsão se enquadra na escala “nano” se as gotículas possuírem uma dimensão inferior a 500 nm. Li et al., (2016) e Harwansh et al., (2019) referem-se à nanoemulsão como uma emulsão com gotículas com dimensões entre 20 e 200 nm.

A polidispersidade é um fator importante e a ter em conta em sistemas coloidais, já que os seus constituintes (gotículas de óleos essenciais) nunca são idênticos, tanto em tamanho, como em forma. As interações decorrentes da polidispersidade podem ter uma

influência considerável na estabilidade da emulsão e nas suas propriedades mecânicas, podendo originar processos de agregação ou percolação (Wensink, 2019).

Quanto mais elevado é o índice de polidispersidade, mais heterogêneo é o tamanho das gotículas (Shrivastava, 2018). Índices de polidispersidade inferiores a 0,3 indicam uma uniformidade no tamanho das gotículas (Ishaka et al., 2014) (Gündel et al., 2019).

Tabela 4 – Tamanho das gotículas (nm), índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta (mV) das nanoemulsões contendo alginato de sódio, citral e óleo essencial de erva-príncipe (*Cymbopogon citratus*).

Nanoemulsão	Tamanho médio das gotículas (nm)	Índice de polidispersidade	Potencial zeta (mV)
CI 1%	42,15±19,78 bc	0,36±0,05 a	-52,84±5,51 c
CI 2%	26,04±9,41 c	0,31±0,07 ab	-37,79±14,78 b
EP 1,25%	82,81±68,05 a	0,36±0,07 a	-28,29±18,51 ab
EP 2,5%	68,28±37,83 ab	0,26±0,08 b	-23,10±11,31 a

a,b,c Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes em $p < 0,05$. Os valores mostrados correspondem às médias \pm desvio padrão.

Todas as formulações obtidas tiveram uma encapsulação com dimensões dentro do intervalo considerado “nano”. Houve diferenças no tamanho das gotículas entre os tratamentos, em particular nos tratamentos contendo óleo essencial de erva-príncipe. Estes apresentam aproximadamente o dobro do tamanho das gotículas dos tratamentos contendo citral. Os tratamentos com as concentrações mais altas de óleos essenciais (CI 2% e EP 2,5%) apresentaram gotículas de menor dimensão que as restantes. Os tratamentos CI 2% e EP 2,5% apresentam uniformidade no tamanho das gotículas possuindo índices de polidispersidade de 0,31 e 0,26, respetivamente. As nanoemulsões CI 1% e EP 1,25% formaram gotículas com dimensões mais heterogêneas, com um índice de polidispersidade ligeiramente superior, de 0,36.

O potencial zeta é o potencial elétrico entre a superfície das gotículas e o meio líquido, e pode ser utilizado como um indicador da estabilidade da emulsão. Valores de potencial zeta maiores que 30 mV e menores que -30 mV são indicadores de estabilidade das emulsões diminuindo a ocorrência de fenómenos de agregação (Krstic et al., 2018).

Na tabela 4 estão apresentados os valores (em mV) do potencial zeta das nanoemulsões. Estes valores são negativos e vão de -52,84 (CI 1%) a -23,10 (EP 2,5%).

O tratamento CI 2% apresentou um potencial zeta de -37,79 mV e o tratamento EP 1,25% teve um resultado de -23,10 mV, sugerindo que as nanoemulsões contendo (unicamente) citral seriam mais estáveis, pois as suas gotículas possuem um potencial zeta mais negativo e conseqüentemente, uma maior resistência à coalescência. Segundo Artiga-Artigas et al. (2017), a carga elétrica negativa das gotículas deve-se ao facto do agente emulsionante Tween 80 ter um baixo peso molecular, de ser não iónico e de revestir rapidamente as gotículas recém-formadas durante o processo de emulsão.

4.1.2. Microestrutura

A estrutura das gotículas de cada tratamento foi examinada por microscopia eletrónica de transmissão (MET), e observaram-se diferenças em relação à forma e disposição das mesmas.

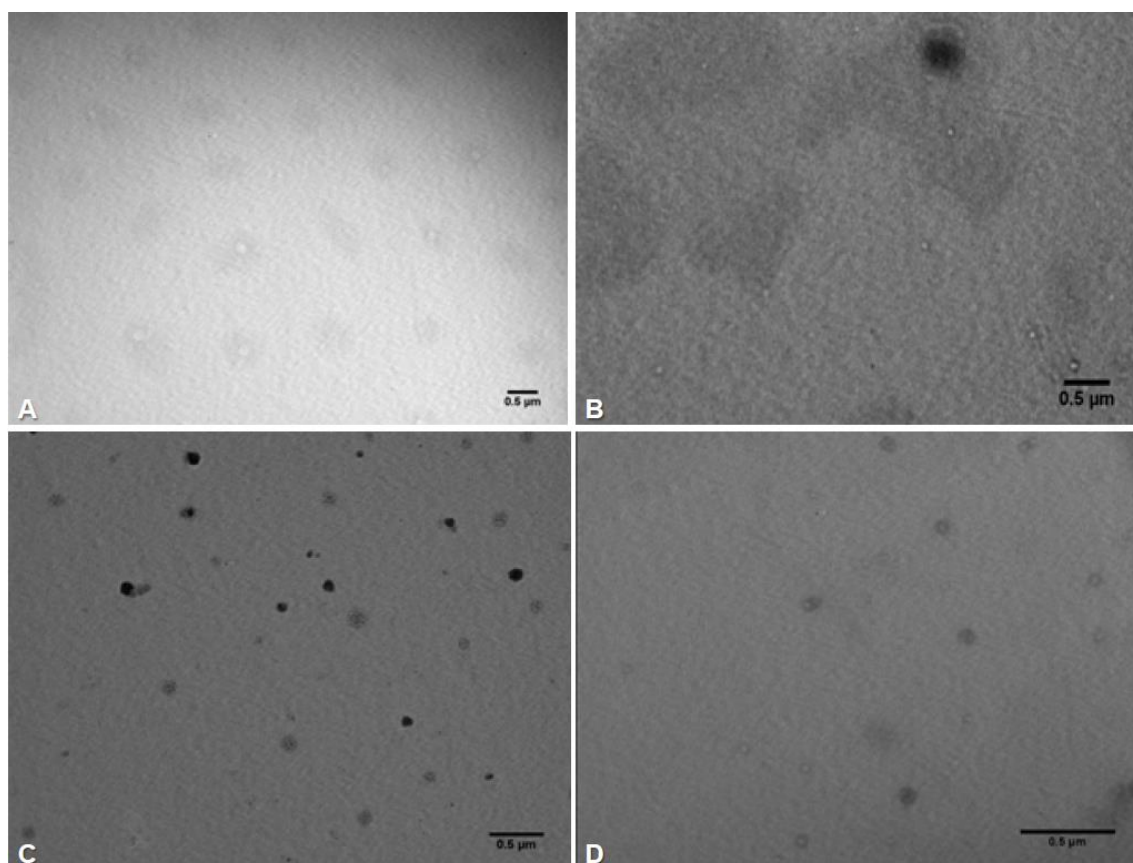


Figura 5 – Imagens ao microscópio eletrónico de transmissão (MET) das nanoemulsões. A (CI 1%), B (CI 2%), C (EP 1,25%) e D (EP 2,5%).

Tabela 5 – Tamanhos médios das gotículas das nanoemulsões (nm), obtidos ao microscópio eletrônico de transmissão e com recurso ao difratômetro de laser.

Nanoemulsão	Tamanho médio das gotículas (nm) (MET)	Tamanho médio das gotículas (nm) (Espalhamento dinâmico de luz)
CI 1%	111,8 ± 95	42,15 ± 19,78
CI 2%	96,5 ± 33,6	26,04 ± 9,41
EP 1,25%	87,96 ± 31,87	82,81 ± 68,05
EP 2,5%	60,43 ± 30,04	68,28 ± 37,83

As imagens obtidas ao microscópio eletrônico de transmissão (MET) permitiram estudar as dimensões das gotículas, observando-se tamanhos médios de 111,8 ± 95 nm no tratamento CI 1% (figura 5A) e 96,5 ± 33,6 nm (figura 5B). Existe uma discrepância nas dimensões das gotículas nas medições efetuadas ao microscópio eletrônico comparativamente às medições efetuadas através do difratômetro de laser, por espalhamento dinâmico de luz (EDL), verificando-se no tratamento CI 1% dimensões médias de 111,8 ± 95 nm (MET) contra 42,15 ± 19,78 nm (EDL), e 96,5 ± 33,6 nm (MET) contra 26,04 ± 9,41 nm (EDL) para o tratamento CI 2%. Esta disparidade das dimensões observadas pode ser explicada pela diferença dos mecanismos de medição de cada método. De acordo com Eaton et al. (2017), o método de medição EDL (difratômetro de laser) é sensível à dispersão e agregação das partículas em solução. A avaliação da dimensão das nanopartículas é efetuada com base na determinação da frequência do seu movimento, tratando-se de um método indireto, e que é bastante dependente do índice de refração da amostra. Desta forma, esperam-se resultados díspares em relação a métodos de microscopia eletrónica, em que a análise da morfologia das partículas é feita diretamente. Ambas as técnicas permitem obter dados importantes, o EDL possibilita uma análise da dinâmica e da estabilidade das nanopartículas, enquanto que o MET, além da observação direta da dimensão das nanopartículas, permite a obtenção de detalhes sobre a sua forma.

Nos tratamentos EP 1,25% (figura 5C) e EP 2,5% (figura 5D) verificaram-se resultados semelhantes da dimensão das gotículas para cada método de medição. Na nanoemulsão EP 1,25% verificou-se um tamanho médio das partículas de 87,96 ± 31,87

nm segundo o MET e $82,81 \pm 68,05$ nm segundo o difratômetro de laser. No tratamento EP 2,5% obteve-se uma dimensão média das partículas de $60,43 \pm 30,04$ nm segundo o MET e de $68,28 \pm 37,83$ nm segundo o difratômetro de laser.

4.2. Parâmetros de qualidade dos frutos

4.2.1. Desordens fisiológicas

As peras tratadas com nanoemulsões contendo óleo essencial de erva-príncipe não apresentaram sintomas de escaldão superficial após o armazenamento em câmara frigorífica. Estes sintomas surgiram após o tempo de prateleira depois de 6 meses no frio em peras dos grupos controle, CI 1% e CI 2%, com incidência de 2,8%, 5,6% e 13,9%, respetivamente. De acordo com estes resultados, o citral e o óleo essencial de erva-príncipe parecem ter efeitos opostos na ocorrência do escaldão superficial em pera ‘Rocha’, em que o citral o promove e o óleo essencial de erva-príncipe o previne. Sabe-se que o composto 6-metylhept-5-en-2-one, que está presente na composição do óleo essencial de erva-príncipe tem sido associado ao desenvolvimento do escaldão superficial (Lurie e Watkins, 2012). A conversão de 6-metylhept-5-en-2-one (MHO-one) em 6-methyl-5-hepten-2-ol (MHO-ol) em maçã ‘Granny Smith’ sob stress por baixo nível de O_2 pode explicar o desenvolvimento reduzido do escaldão superficial, e a proporção destes compostos pode servir de indicador da sua intensidade (Pesis et al., 2010). O MHO-ol foi produzido a partir da MHO-one, provavelmente pela enzima álcool desidrogenase (ADH). Além disso, foi demonstrado por Chervin et al. (1999) e Saquet e Streif, (2008) que a atividade desta enzima aumenta com o stress por baixo O_2 em peras e maçãs. Segundo Lima et al. (2010), Medeiros et al. (2012) e Rojas-Graü et al. (2008), a aplicação de películas em frutos pode modificar a sua atmosfera interna, como resultado do aumento da resistência às trocas gasosas e redução da taxa respiratória. Como tal, é provável que as peras tratadas com películas contendo óleo essencial de erva-príncipe tenham induzido a conversão da MHO-one em MHO-ol, promovendo uma menor ocorrência do escaldão superficial.

O controle foi o primeiro grupo a apresentar acastanhamento interno, aos 4 meses em câmara frigorífica, mantendo-se a percentagem de frutos afetados no decorrer do ensaio. Após 6 meses de armazenamento no frio, os frutos com maior incidência de acastanhamento interno foram os frutos tratados com o tratamento CI 2%, seguido do CI

1% e EP 2,5%, que apresentaram valores semelhantes. As peras com o tratamento EP 1,25% não apresentaram sintomas de acastanhamento interno, assim como de escaldão superficial.

Embora níveis baixos de oxigênio em armazenamento contribuam para a prevenção do escaldão superficial, níveis demasiado baixos de oxigênio combinados com concentrações altas de dióxido de carbono podem induzir o aparecimento de acastanhamento interno (Deuchande et al., 2016). Os frutos onde foram aplicadas películas com maior concentração de citral (CI 2% e EP 2,5%) foram os que tiveram maior incidência de acastanhamento interno, sugerindo que este composto poderá ser responsável pelo desenvolvimento desta desordem fisiológica.

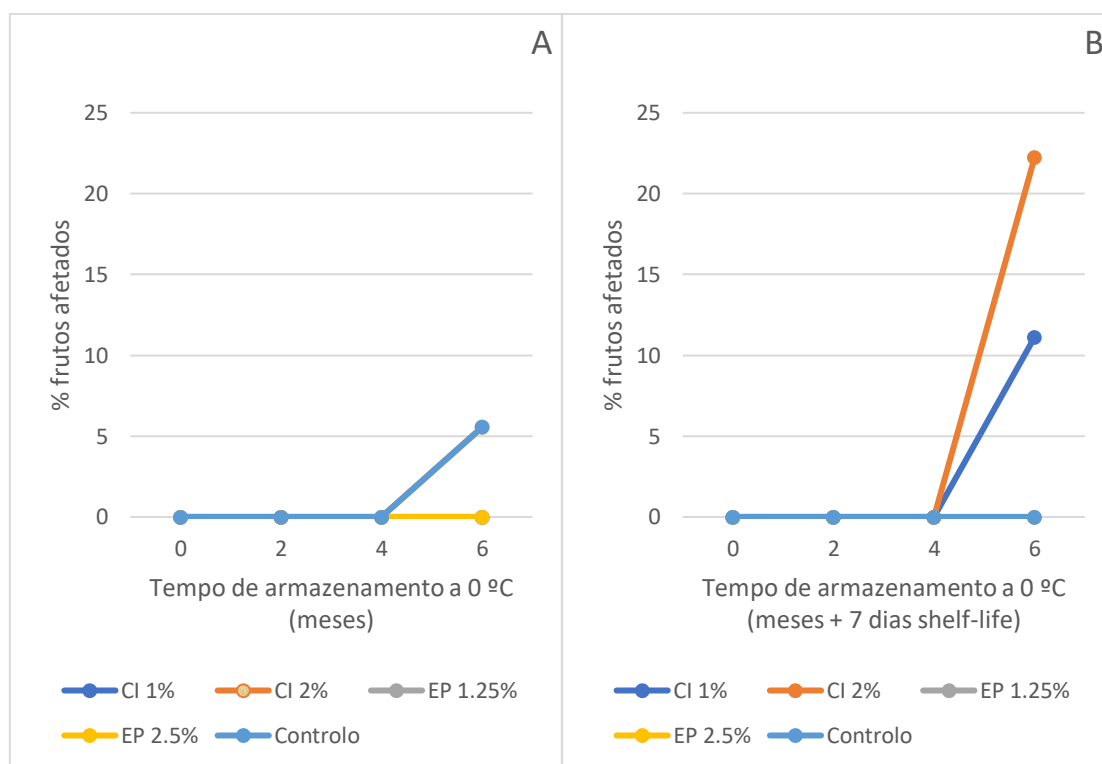


Figura 6 – Incidência de escaldão superficial (%) em pera ‘Rocha’ revestidas com citral 1% (CI 1%) e 2% (CI 2%), óleo essencial de erva-príncipe 1,25% (EP 1.25%) e 2,5% (EP 2.5%) e Controlo (frutos sem tratamento), ao longo do armazenamento a 0 °C (A) e após os subsequentes 7 dias shelf-life (B).

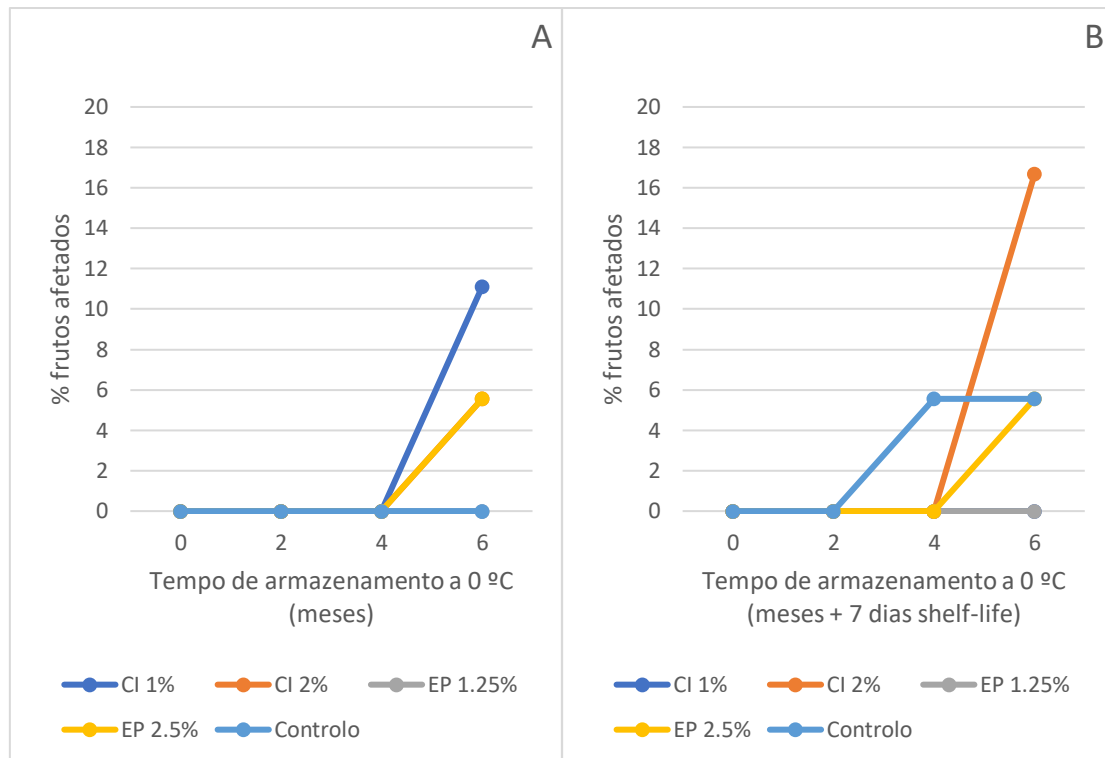


Figura 7 – Incidência de acastanhamento interno (%) em pera ‘Rocha’ revestidas com citral 1% (CI 1%) e 2% (CI 2%), óleo essencial de erva-príncipe 1,25% (EP 1.25%) e 2,5% (EP 2.5%) e Controlo (frutos sem tratamento), ao longo do armazenamento a 0 °C (A) e após os subsequentes 7 dias shelf-life (B).

4.2.2. Cor da epiderme

Após a aplicação das nanoemulsões nas peras, os valores de luminosidade (L^*) e tonalidade (Hue) não apresentaram variações significativas entre as peras tratadas e o controlo, indicando que os tratamentos não afetaram a cor da epiderme dos frutos. Uma das vantagens da aplicação de nanoemulsões relativamente às emulsões convencionais é a sua transparência (Uluata et al., 2016).

Tanto nos frutos tratados com as nanoemulsões como no controlo, observou-se um aumento de luminosidade (L^*) e um decréscimo da tonalidade (Hue), durante o armazenamento em câmara frigorífica. Esta evolução da coloração é característica do processo de maturação da pera ‘Rocha’ (Gago et al., 2015).

Até aos 4 meses de armazenamento no frio, as peras não tratadas (controlo) apresentaram valores mais altos de luminosidade (L^*) e mais baixos de tonalidade (Hue) do que as peras tratadas, indicando uma maturação mais rápida. Aos 6 meses, todos os

tratamentos exibiram uma coloração semelhante. Nas tiragens respectivas ao tempo de prateleira (Dias 7), os resultados foram semelhantes.

Em pera ‘Rocha’, a degradação da clorofila é o fator principal da perda da cor verde da epiderme (Gago et al., 2015). Estes resultados mostram que as nanoemulsões testadas atrasam a degradação da clorofila tanto em armazenamento no frio a longo prazo, como em prateleira à temperatura ambiente, sugerindo um abrandamento do processo de maturação.

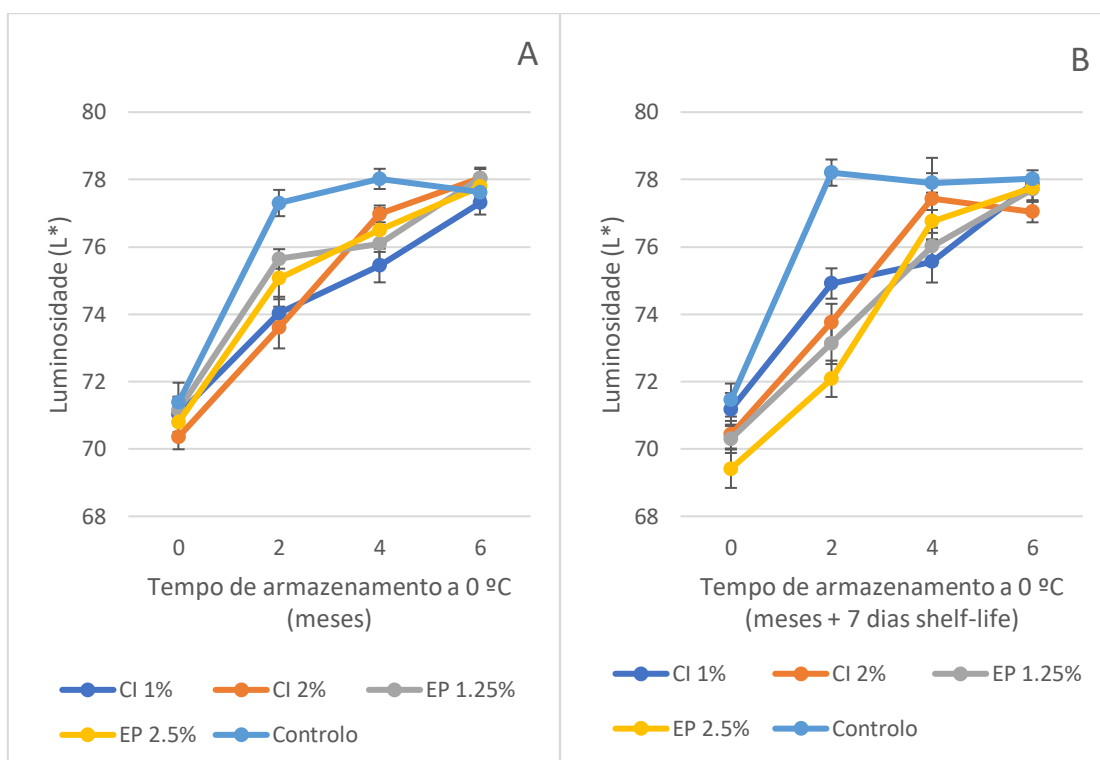


Figura 8 – Luminosidade (L*) da casca de pera ‘Rocha’ revestidas com citral 1% (CI 1%) e 2% (CI 2%), óleo essencial de erva-príncipe 1,25% (EP 1.25%) e 2,5% (EP 2.5%) e Controlo (frutos sem tratamento), ao longo do armazenamento a 0°C (A) e após os subsequentes 7 dias shelf-life (B).

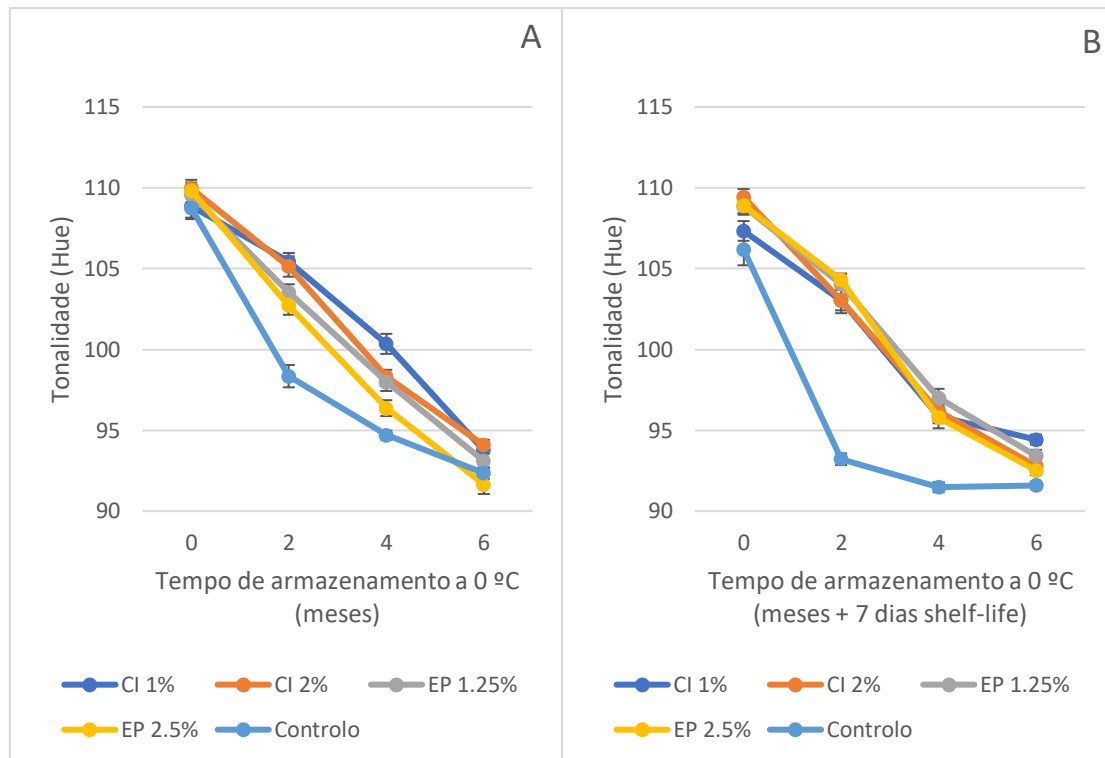


Figura 9 – Tonalidade (Hue) da casca de pera ‘Rocha’ revestidas com citral 1% (CI 1%) e 2% (CI 2%), óleo essencial de erva-príncipe 1,25% (EP 1.25%) e 2,5% (EP 2.5%) e Controlo (frutos sem tratamento), ao longo do armazenamento a 0°C (A) e após os subsequentes 7 dias shelf-life (B).

4.2.3. Firmeza

Em todos os grupos a firmeza decresceu ao longo do tempo, tanto depois de armazenamento no frio como após o tempo de prateleira (figuras 10 e 11). As peras não tratadas com as nanoemulsões (controlo) tiveram uma perda de firmeza mais acentuada. Os frutos tratados com as nanoemulsões com menor concentração de óleos essenciais - CI 1% e EP 1,25% - apresentaram uma maior manutenção da firmeza ao longo do tempo quando em câmara frigorífica. Após o tempo de prateleira, os frutos dos tratamentos CI 1% e CI 2% e controlo tiveram uma maior perda de firmeza, apresentando os tratamentos EP 1,25% e EP 2,5% os valores mais altos no final do ensaio. Em termos de adequação para consumo, os frutos tratados com as nanoemulsões contendo óleo essencial de erva-príncipe exibiram valores de firmeza apropriados (<24 N) (Guerra et al., 2012), enquanto que o controlo e os frutos tratados com nanoemulsões contendo citral valores de firmeza demasiado baixos.

A diminuição da firmeza dos frutos durante a maturação é geralmente atribuída à degradação da parede celular e à perda de pressão de turgescência devido à transpiração (Khin et al., 2007). A perda de firmeza da polpa das peras ao longo do tempo foi reduzida pelas películas aplicadas, porém a incorporação de óleos essenciais nas mesmas pode ter reduzido a sua capacidade de reter a humidade dos frutos, e assim, haver ainda perda de firmeza. Contudo, durante o procedimento de aplicação das nanoemulsões nas peras, a imersão na solução de cloreto de cálcio e consequente presença deste composto no fruto pode ter influenciado os valores de firmeza. Olivas et al., (2007) sugerem que, em maçã fatiada, a capacidade do cálcio em manter a textura das fatias de maçã é superior às películas de alginato pelo seu efeito de barreira à saída de humidade, uma vez que em maçã a perda de firmeza é atribuída maioritariamente à degradação da parede celular e em menor escala à redução da pressão de turgescência. Apesar dos tratamentos apresentarem diferentes resultados e isso demonstre efeitos distintos das várias formulações, é provável que a causa principal da conservação da firmeza ao longo do tempo tenha sido a imersão dos frutos numa solução de cloreto de cálcio para indução de reticulação polimérica (Rojas-Grau et al., 2008).

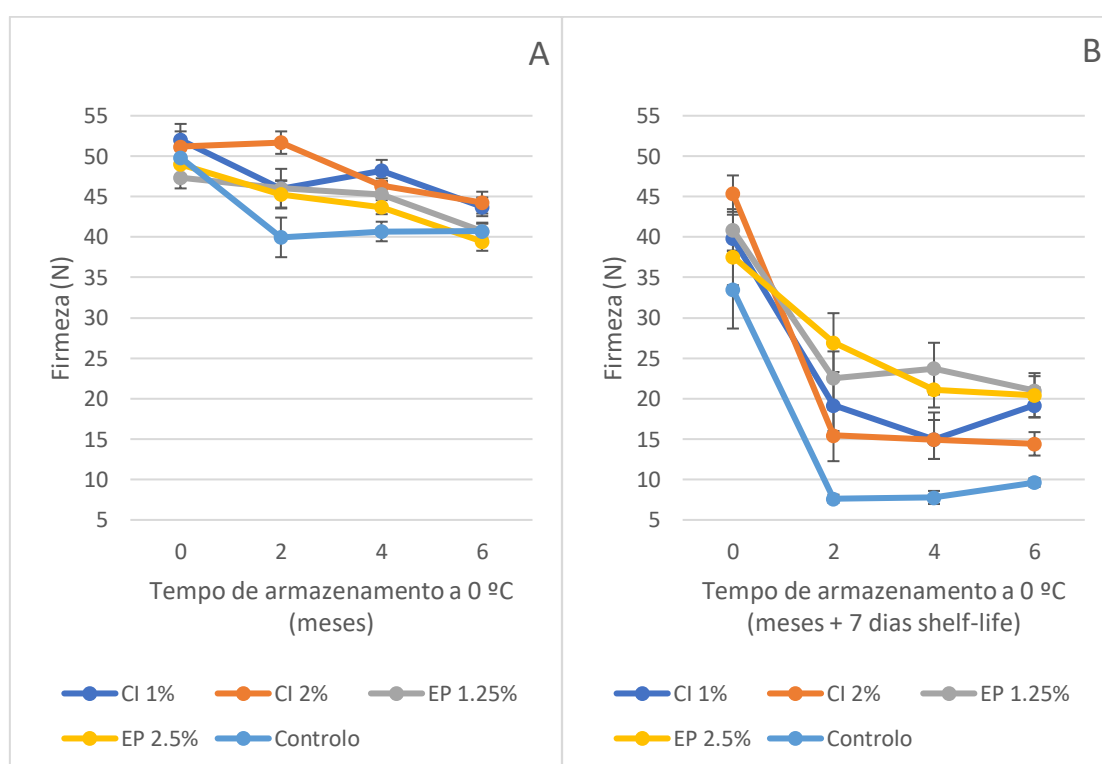


Figura 10 – Firmeza (N) da polpa em pera ‘Rocha’ revestidas com citral 1% (CI 1%) e 2% (CI 2%), óleo essencial de erva-príncipe 1,25% (EP 1.25%) e 2,5% (EP 2.5%) e Controlo (frutos sem tratamento), ao longo do armazenamento a 0°C (A) e após os subsequentes 7 dias shelf-life (B).

4.2.4. Teor de sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis após a aplicação das nanoemulsões nas peras esteve compreendido entre 12,23% e 12,97%, tendo-se verificado um aumento principalmente nos dois primeiros meses de armazenamento no frio, tanto em peras tratadas com as películas, como em peras não tratadas, para valores entre 13,43% e 14,30%. Este aumento do teor de sólidos solúveis deve-se à degradação do amido em açúcares mais simples e solúveis, que ocorre no fruto nos primeiros períodos de armazenamento. Após esse período, as peras tratadas com as películas contendo óleo essencial de erva-príncipe e as peras não tratadas apresentaram um teor de sólidos solúveis superior aos outros tratamentos, mas no final do período de armazenamento em câmara frigorífica todos os tratamentos exibiram valores semelhantes. Foram obtidos resultados semelhantes por Medeiros et al. (2012) num ensaio em que foram utilizadas películas de polissacarídeo/proteína em pera 'Rocha' fatiada armazenada no frio. Nos primeiros 28 dias, os valores do teor de sólidos solúveis das peras tratadas mantiveram-se abaixo dos valores das peras sem tratamento, contudo, ao fim de 45 dias, as diferenças entre as peras com e sem películas não foram significativas.

Depois do tempo de prateleira após a aplicação das nanoemulsões (0 meses, 7 dias), o teor de sólidos solúveis das peras aumentou em todos os grupos. Nos tempos de prateleira correspondentes aos 2, 4 e 6 meses de armazenamento no frio, todos os frutos mantiveram o teor de sólidos solúveis à exceção dos frutos com o tratamento CI 2%, que diminuiu no último tempo de prateleira, correspondente à última tiragem das peras da câmara frigorífica (6 meses, 7 dias).

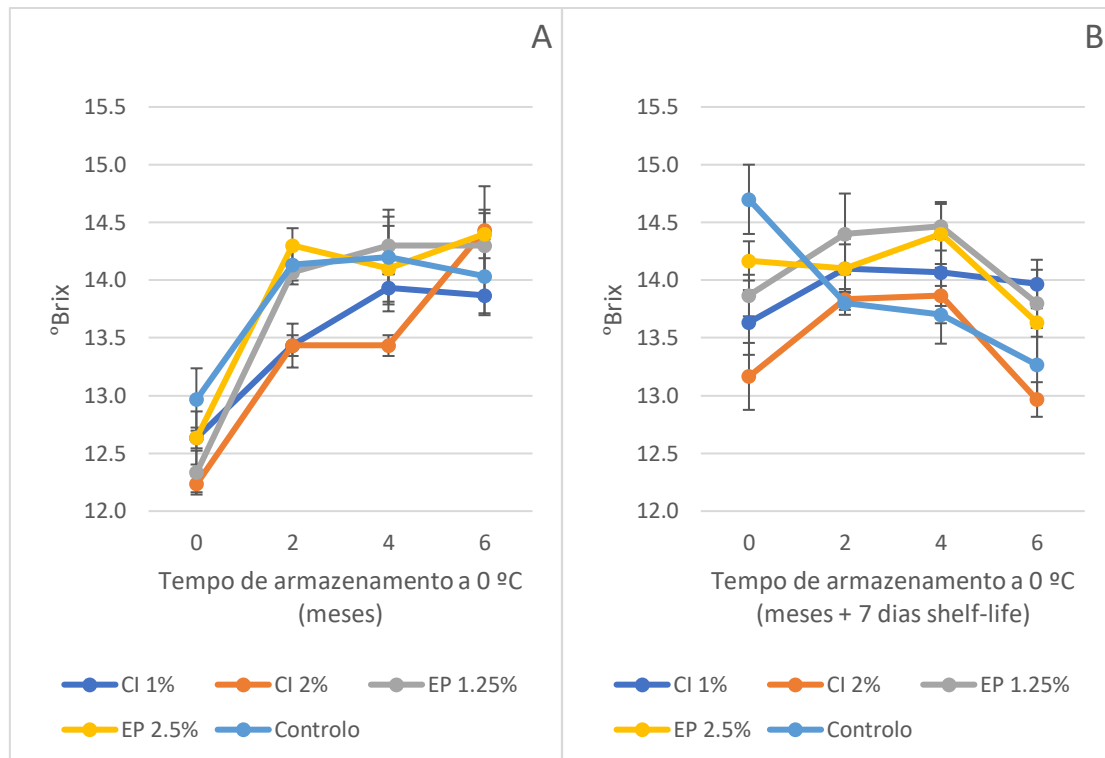


Figura 11 – Teor de sólidos solúveis (°Brix) em pera ‘Rocha’ revestidas com citral 1% (CI 1%) e 2% (CI 2%), óleo essencial de erva-príncipe 1,25% (EP 1.25%) e 2,5% (EP 2.5%) e Controlo (frutos sem tratamento), ao longo do armazenamento a 0 °C (A) e após os subsequentes 7 dias shelf-life (B).

4.2.5. Acidez titulável

No primeiro período de prateleira (0 meses, 7 dias) e na tiragem de câmara frigorífica após 2 meses de armazenamento a acidez titulável diminuiu consideravelmente em todos os grupos com nanoemulsões e no controlo. Após esse tempo, observou-se um pequeno decréscimo da acidez titulável em todos os tratamentos. A diminuição da acidez titulável durante a maturação em armazenamento no frio foi referida por Galvis-Sánchez et al. (2004).

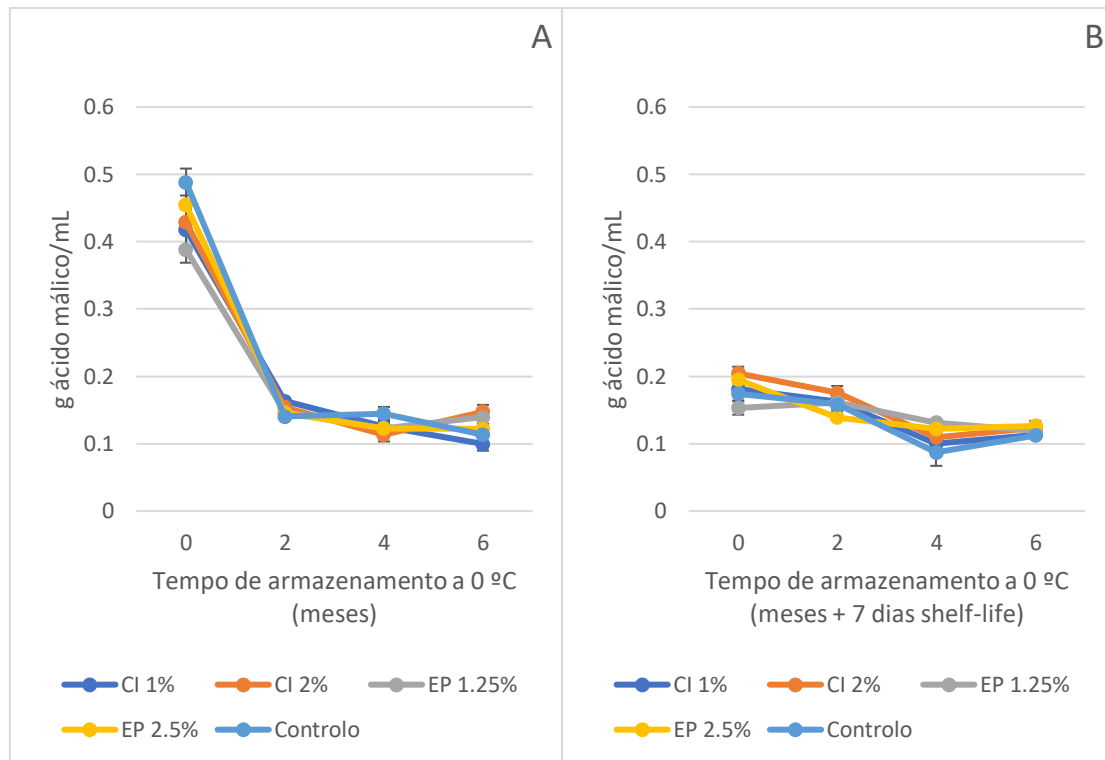


Figura 12 – Acidez titulável (g ácido málico/mL) em pera ‘Rocha’ revestidas com citral 1% (CI 1%) e 2% (CI 2%), óleo essencial de erva-príncipe 1,25% (EP 1.25%) e 2,5% (EP 2.5%) e Controlo (frutos sem tratamento), ao longo do armazenamento a 0 °C (A) e após os subsequentes 7 dias shelf-life (B).

4.2.6. Extravasamento eletrolítico

Os valores do extravasamento eletrolítico (*electrolytic leakage*) foram semelhantes em todos os grupos de peras após a aplicação dos tratamentos. Após 2 meses de armazenamento no frio o extravasamento eletrolítico baixou, provavelmente devido a uma reorganização da membrana celular, num processo de aclimação às baixas temperaturas (Larrigaudière et al., 2004). Após os 2 meses de armazenamento em câmara frigorífica, o extravasamento eletrolítico subiu em todos os grupos de peras, com e sem película, sendo esta subida mais acentuada no controlo, com um máximo de 59,83%, depois de 6 meses de armazenamento no frio. Os frutos tratados com as nanoemulsões apresentaram extravasamentos eletrolíticos entre 43,51% (EP 1,25%) e 52,72% (CI 1%). A diferença entre os frutos tratados e não tratados com as películas sugere uma maior manutenção das estruturas membranares das células e menor permeabilidade nos frutos tratados. Em relação aos frutos em tempo de prateleira, os resultados foram semelhantes

aos referidos anteriormente, tendo o controlo sido também o grupo com maior extravasamento eletrolítico, em três das quatro medições efetuadas.

Foram obtidos resultados semelhantes num ensaio em manga (Khaliq et al., 2017) e em frutos de jujuba (Xing et al., 2015), porém com recurso a películas contendo compostos diferentes, quitosano e quitosano mais óleo essencial de canela, respetivamente. Os resultados foram atribuídos ao efeito protetor do quitosano e à atividade antioxidante do óleo essencial de canela.

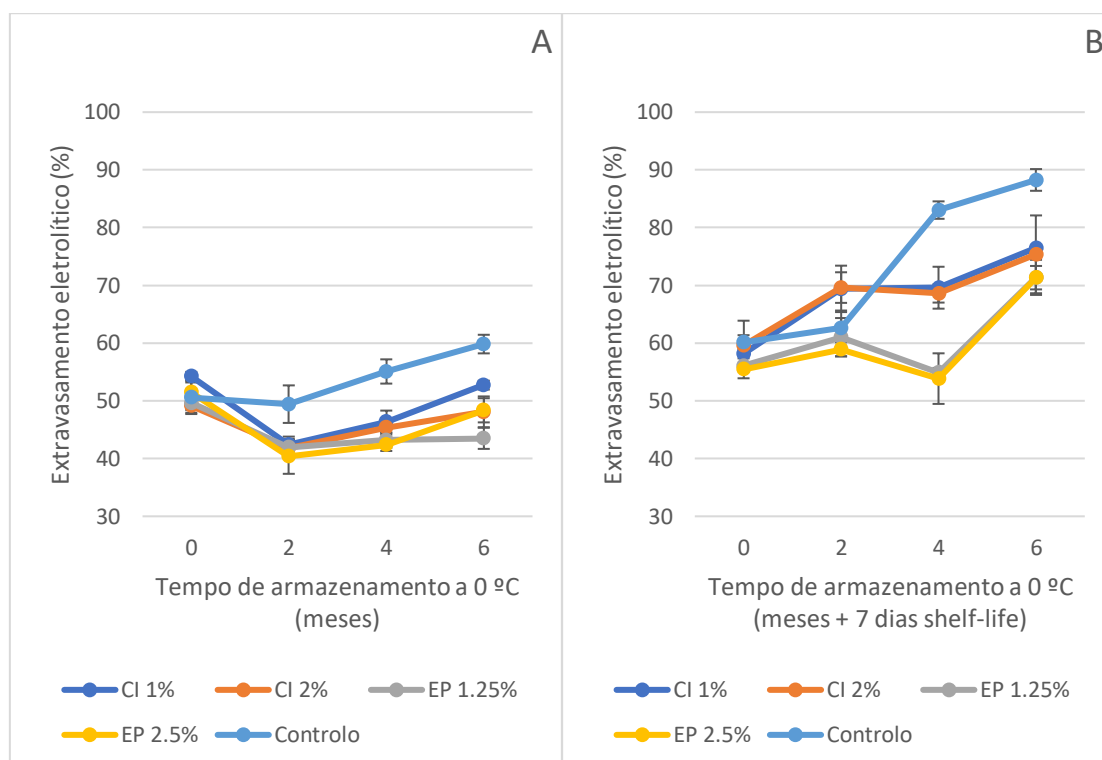


Figura 13 – Extravasamento eletrolítico (%) em pera ‘Rocha’ revestidas com citral 1% (CI 1%) e 2% (CI 2%), óleo essencial de erva-príncipe 1,25% (EP 1.25%) e 2,5% (EP 2.5%) e Controlo (frutos sem tratamento), ao longo do armazenamento a 0 °C (A) e após os subsequentes 7 dias shelf-life (B).

4.2.7. Contagem de microrganismos

As nanoemulsões contendo óleo essencial de erva-príncipe foram bastante eficazes na redução de microrganismos mesofílicos no primeiro tempo de prateleira (7 dias após a aplicação das películas). Contudo, este resultado não se observou no seguimento do ensaio. O tratamento CI 2% foi o mais eficiente na redução de mesófilos, até aos 4 meses, em condições de armazenamento no frio. A nanoemulsão EP 1,25% foi a que mais

reduziu os microrganismos mesófilos depois tempo de prateleira após 6 meses em câmara frigorífica. Relativamente aos fungos e leveduras, o controlo foi o grupo que apresentou uma maior quantidade após a aplicação das películas e 7 dias depois. O maior efeito antimicrobiano das nanoemulsões contra fungos e leveduras verificou-se nos tempos de prateleira, correspondentes aos 0 e 2 meses de armazenamento no frio, principalmente nos tratamentos contendo óleo essencial de erva-príncipe.

Em todos os grupos e momentos de contagem, o número de mesófilos, fungos e leveduras nunca chegou a atingir o limite de aceitação para consumo de frutos imposto pelo Institute of Food Science & Technology (IFST), de 6 Log CFU/g (Bierhals et al., 2011).

Uma das razões do baixo crescimento microbiano durante o ensaio poderá ter sido o pequeno número de microrganismos presente nas peras no início deste.

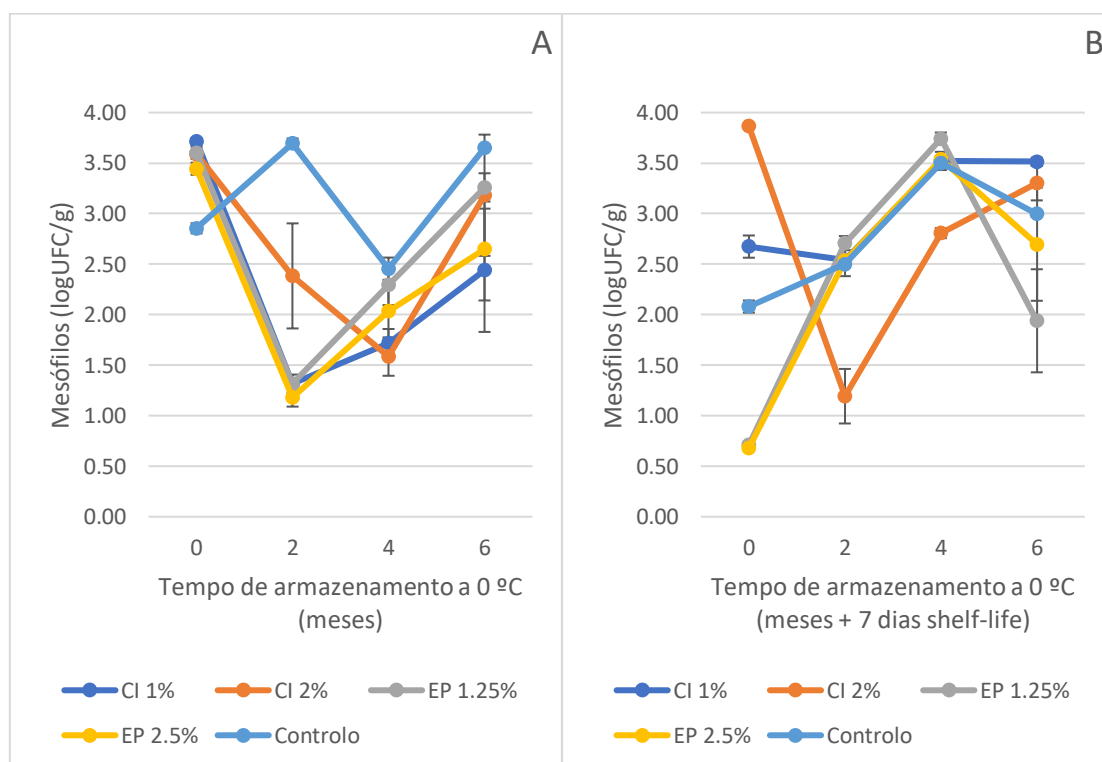


Figura 14 – Contagem de microrganismos mesófilos (logUFC/g) em pera ‘Rocha’ revestidas com citral 1% (CI 1%) e 2% (CI 2%), óleo essencial de erva-príncipe 1,25% (EP 1.25%) e 2,5% (EP 2.5%) e Controlo (frutos sem tratamento), ao longo do armazenamento a 0 °C (A) e após os subsequentes 7 dias shelf-life (B).

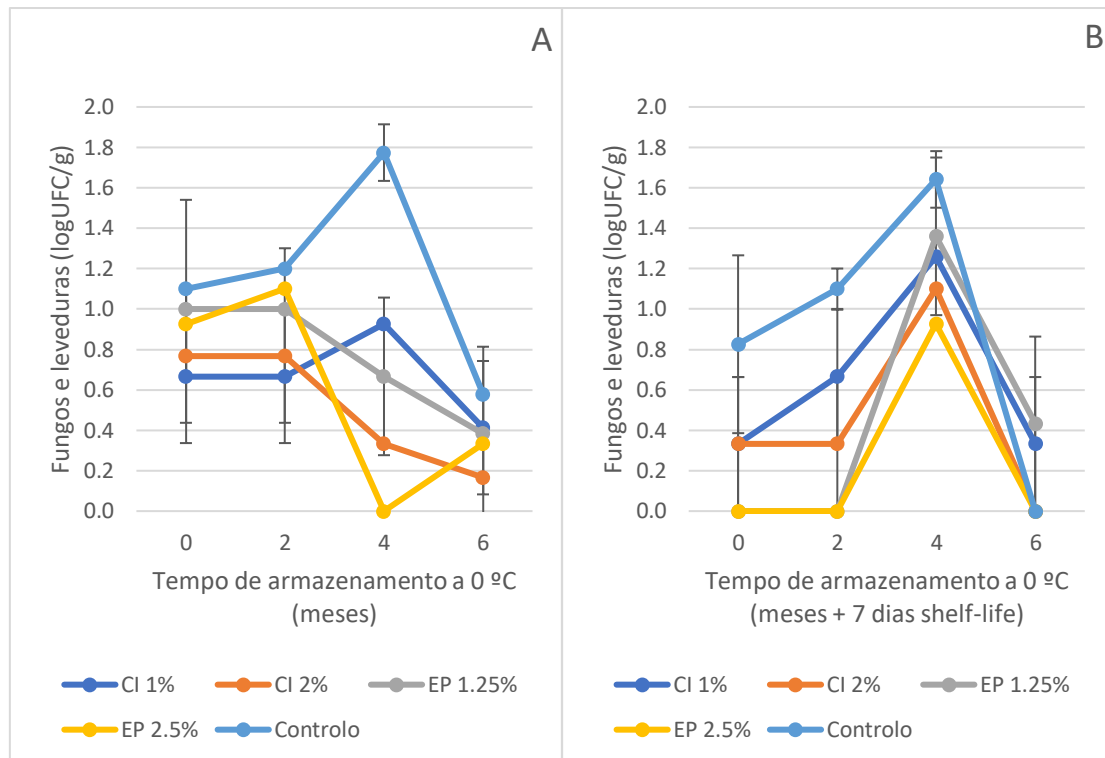


Figura 15 – Contagem de fungos e leveduras (logUFC/g) em pera ‘Rocha’ revestidas com citral 1% (CI 1%) e 2% (CI 2%), óleo essencial de erva-príncipe 1,25% (EP 1.25%) e 2,5% (EP 2.5%) e Controlo (frutos sem tratamento), ao longo do armazenamento a 0 °C (A) e após os subsequentes 7 dias shelf-life (B).

4.2.8. Perda de peso

Todos os grupos tiveram uma perda de peso, tanto após o armazenamento no frio como depois do tempo de prateleira. Os frutos tratados com nanoemulsões contendo óleo essencial de erva-príncipe apresentaram a maior percentagem de perda de peso, em comparação com o controlo, após o armazenamento em câmara e após o tempo de prateleira. As peras tratadas com películas contendo citral apresentaram uma taxa de perda de peso semelhante ao controlo, também nas duas situações. É expectável que determinados componentes das películas edíveis, como o quitosano, formem uma barreira semipermeável que provoquem uma redução da respiração, oxidação e perda de água (Maqbool et al., 2011; Gol et al., 2013). Medeiros et al. (2012), num ensaio com pera ‘Rocha’ fatiada e inteira, obtiveram uma taxa de perda de peso mais baixa em relação a peras não tratadas usando películas de polissacáridos/proteína. Rojas-Graü et al. (2008), num ensaio com maçã ‘Fuji’ fatiada tratada com películas edíveis contendo alginato, não obteve diferenças nas trocas gasosas em relação ao controlo. É possível que este resultado

se aplique também à permeabilidade à água. Segundo Dhital et al. (2018) e Rojas-Graü et al. (2008) as películas de polissacáridos podem não ter por si só a capacidade de reduzir as perdas de água, necessitando de um componente lipídico adicional para esse efeito. Duan et al. (2011) obtiveram resultados semelhantes, referindo-se a uma maior perda de peso em frutos tratados com películas de polissacáridos do que nos controlos.

No presente ensaio as primeiras pesagens foram efetuadas após a aplicação das nanoemulsões nos frutos. Como tal, é provável que uma percentagem da perda de peso dos frutos tratados seja devido à perda da água das películas e não apenas dos frutos. No caso do controlo, toda a perda de peso provém do fruto, que já este grupo não levou qualquer tipo de tratamento.

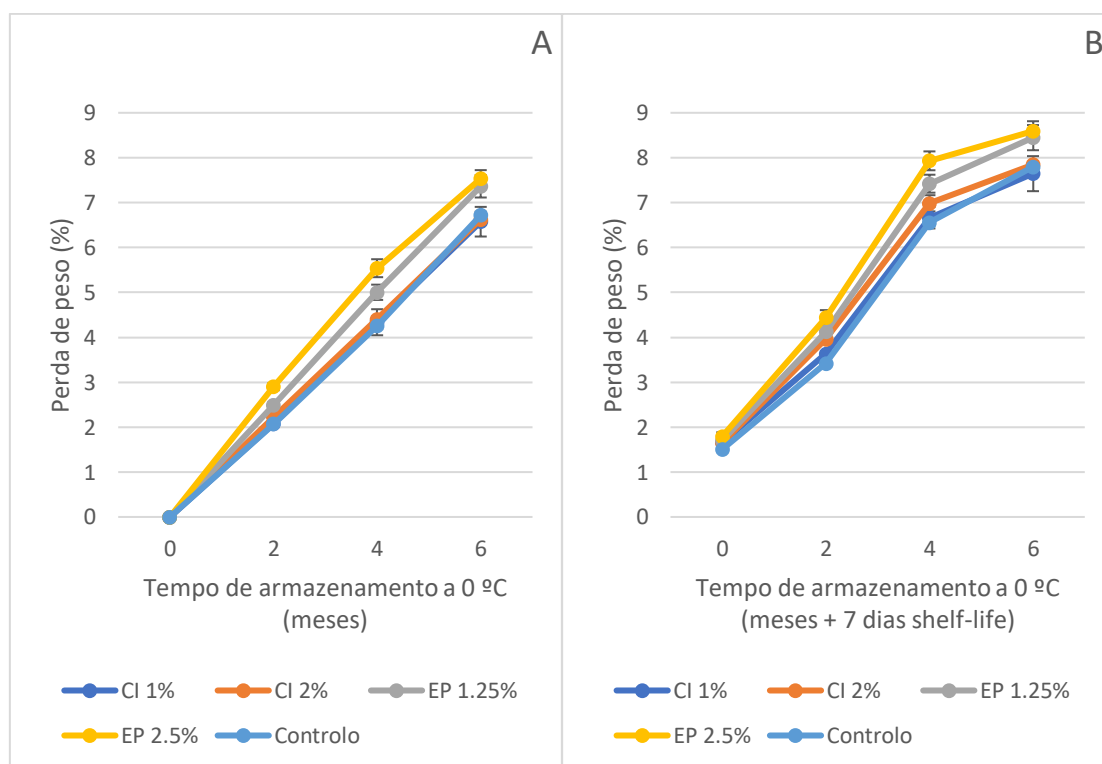


Figura 16 – Perda de peso (%) em pera ‘Rocha’ revestidas com citral 1% (CI 1%) e 2% (CI 2%), óleo essencial de erva-príncipe 1,25% (EP 1.25%) e 2,5% (EP 2.5%) e Controlo (frutos sem tratamento), ao longo do armazenamento a 0 °C (A) e após os subsequentes 7 dias shelf-life (B).

4.2.9. Avaliação sensorial

A utilização de películas edíveis em frutos pode afetar as suas características organoléticas (Rojas-Graü et al., 2008), então a execução de painéis de provadores é importante para testar a aceitação dos consumidores dos produtos.

No presente ensaio, após armazenamento em câmara frigorífica durante 6 meses e permanência em condições de prateleira durante 7 dias, os grupos de peras tiveram uma aceitação razoável, obtendo-se pontuações de aceitação geral na maior parte dos grupos iguais ou superiores a 4,0, numa escala de 1 = desgosto bastante a 7 = gosto muito. O grupo que obteve melhor aceitação geral por parte dos provadores foi o grupo tratado com a nanoemulsão EP 1,25%, tendo valores de aceitação superiores aos restantes quanto à aparência do fruto, doçura e acidez. O controlo foi o grupo que obteve uma pontuação mais baixa relativamente à textura, doçura e acidez. O grupo com pior classificação quanto à aparência dos frutos foi o CI 2%, o que vai ao encontro dos resultados da ocorrência de desordens fisiológicas nos frutos com este tratamento.

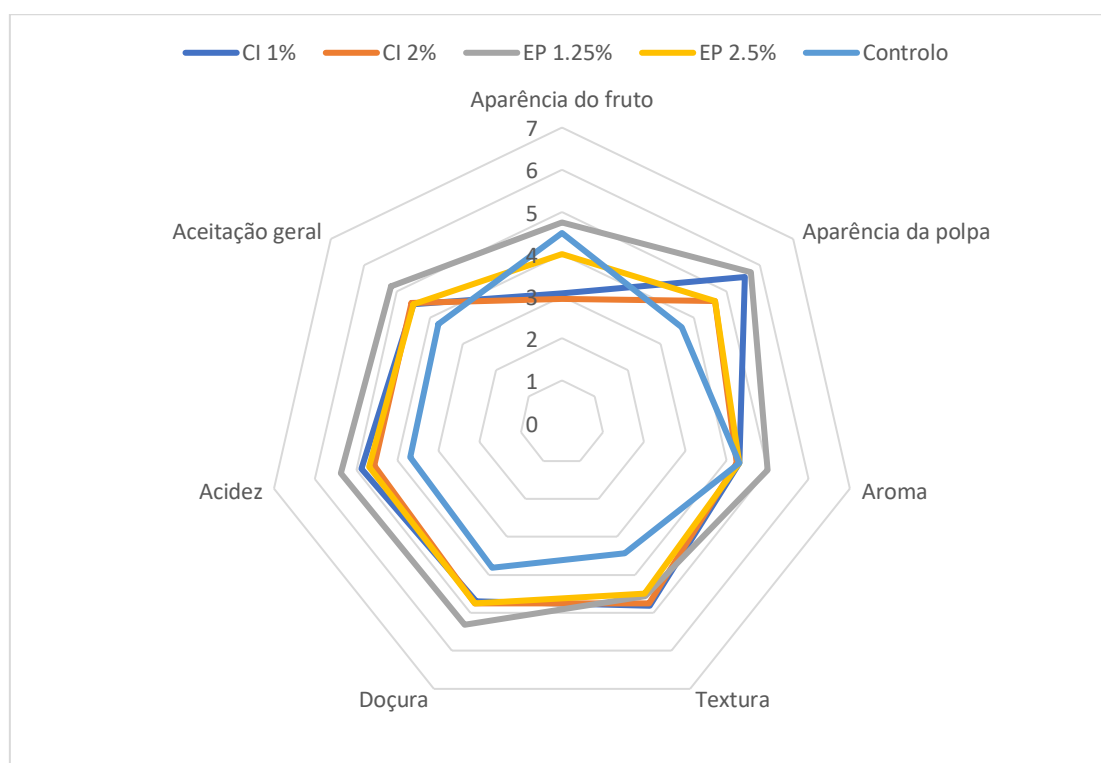


Figura 17 – Avaliação sensorial de pera ‘Rocha’ revestidas com citral 1% (CI 1%) e 2% (CI 2%), óleo essencial de erva-príncipe 1,25% (EP 1.25%) e 2,5% (EP 2.5%) e Controlo (frutos sem tratamento), após 6 meses de armazenamento a 0 °C mais 7 dias de shelf-life. Os valores representam a média de 15 repetições.

5. Conclusão

Com este ensaio concluiu-se que a utilização de nanoemulsões de alginato contendo óleos essenciais de citral e erva-príncipe têm um efeito positivo na conservação no frio de pera 'Rocha', em atmosfera normal, durante 6 meses, e manutenção da qualidade dos frutos em tempo de prateleira, comparativamente a frutos não tratados.

As películas, por conterem gotículas de óleo de dimensão nano, não causaram alteração na coloração dos frutos após a sua aplicação. Estas, por atrasarem o processo de maturação, também retardaram a mudança de cor característica do amadurecimento ao longo do armazenamento no frio e em tempo de prateleira. As peras tratadas com as nanoemulsões, em comparação com peras controlo, apresentaram valores de firmeza superiores, indicando um atraso na maturação dos frutos, sem comprometer o amadurecimento após o tempo de prateleira. Os valores de extravasamento eletrolítico também apontaram para uma redução do amadurecimento, sendo mais baixos nas peras tratadas com as películas do que em peras não tratadas, apontando para uma maior conservação da integridade dos tecidos. Quanto à ocorrência do escaldão superficial, as peras tratadas com as nanoemulsões contendo óleo essencial de erva-príncipe obtiveram os melhores resultados, tendo estas prevenido a ocorrência desta desordem fisiológica até ao fim do armazenamento no frio e último tempo de prateleira. A nanoemulsão EP 1,25% foi o tratamento que teve melhores resultados na manutenção das características organoléticas das peras, após 7 dias de tempo de prateleira ao fim de 6 meses de armazenamento em câmara frigorífica. Relativamente à microbiologia, não se observaram diferenças significativas entre frutos tratados e não tratados.

Com base nos resultados obtidos com a utilização de nanoemulsões contendo óleo essencial de erva-príncipe – prevenção do escaldão superficial e manutenção da qualidade do fruto e características organoléticas ao fim de 6 meses de armazenamento no frio e 7 dias em condições de prateleira – este ensaio permitiu concluir que estas formulações são um contributo para a pesquisa de alternativas à utilização do 1-metilciclopropeno (1-MCP) na conservação de pera 'Rocha' no frio e constam numa base para futuros ajustes de componentes e métodos de aplicação nos frutos.

Bibliografia

- Acevedo-Fani A., Salvia-Trujillo L., Rojas-Graü M., Martín-Belloso O., 2015. Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. *Food Hydrocolloids* 47 (2015) 168-177
- Alexandre J., Soares J., Silva, A., 2001. O Livro da Pêra Rocha. Volume Primeiro. Contributo para uma Produção Integrada. Cadaval, Associação Nacional de Produtores de Pera Rocha. Cadaval, 184pp
- Almeida D.P.F. 2017. Novas recomendações para o armazenamento prolongado de pera ‘Rocha’ produzida na região Oeste de Portugal. *Atas Portuguesas de Horticultura*.
- Almeida D.P.F., Carvalho R., Dupille E., 2015. Efficacy of 1-methylcyclopropene on the mitigation of storage disorders of ‘Rocha’ pear under normal refrigerated and controlled atmospheres. *Food Science and Technology International* 0(0) 1-11
- Alpalhão A., Neto C., Goulão L., Clemente J., Henriques J., Lourenço I., Oliveira C.M., 2006. Efeito do 1-metilciclopropeno em pera ‘Rocha’ em diferentes estados de maturação armazenadas em atmosfera normal. *Actas Portuguesas de Horticultura*, nº 11 (2009)
- ANP – Associação Nacional de Produtores de Pera Rocha. 2009. Caderno de Especificações da Pera Rocha D.O.P.
- Antunes, M., Sfakiotakis, E., 2008. Changes in fatty acid composition and electrolyte leakage of ‘Hayward’ kiwifruit durante storage at different temperatures. *Food Chemistry* 110 (2008) 891-896.
- Asmawati, Wan Aida Wan Mustapha, Salma Mohamad Yusop, Mohamad Yusof Maskat, and Ahmad Fuad Shamsuddin., 2014. Characteristics of Cinnamaldehyde Nanoemulsion Prepared using APV-High Pressure Homogenizer and Ultra Turrax. *AIP Conference Proceedings* 1614, 244 (2014).
- Barbosa, P., Lima, A.S., Vieira, P., Dias, L.S., Tinoco, M.T., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Figueiredo, A.C., Mota, M., 2010. Nematicidal activity of essential oils and volatiles derived from Portuguese aromatic flora against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *J. Nematol.* 42, 8–16.
- Bierhals, V.S., Chiumarelli, M., Hubinger, M.D., 2011. Effect of casava starch coating on quality and shelf life of pineapple (*Ananas comorus* L. Merrill cv. ‘Pérola’). *J. Food Sci.* 76, 62–76.
- Chervin, C., Truett, J.K., Speirs, J., Industry, C.P., Unit, H., Box, P.O., Osmond, G., 1999. Alcohol dehydrogenase expression and alcohol production during pear ripening. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 124, 71–75.
- Deuchande, T., Carvalho, S.M.P., Guterres, U., Fidalgo, F., Isidoro, N., Larrigaudière, C., Vasconcelos, M.W., 2016. Dynamic controlled atmosphere for prevention of internal browning disorders in “Rocha” pear. *LWT - Food Sci. Technol.* 65, 725–730. doi:10.1016/j.lwt.2015.08.075
- DGADR - Direção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural. 2012. Normas Técnicas para a Produção Integrada de Pomóideas (Volume II). Lisboa, Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território.

- Donsì F., Annunziata M., Sessa M., Ferrari G., 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT – Food Science and Technology* 44 (2011) 1908-1014
- Drzyzga O., 2003. Diphenylamine and derivatives in the environment: a review. *Chemosphere* 53 (2003) 809-818
- Duan, J., Wu, R., Strik B.C., Zhao, Y., 2011. Effect of edible coatings on the quality of fresh blueberries (Duke and Elliott) under commercial storage conditions. *Postharvest Biology and Technology*. 59, 71–79.
- Eaton, P., Quaresma, P., Soares, C., Neves, C., Almeida, M.P., Pereira, E., West, P., 2017. A direct comparison of experimental methods to measure dimensions of synthetic nanoparticles. *Ultramicroscopy* 182, 179–190.
- Gago, C., Antão, R., Dores, C., Guerreiro, A., Miguel, M.G., Faleiro, M. L., Figueiredo, A.C., Antunes, M.D. 2019. The effect of nanoemulsions loaded with lemongrass essential oil and its main component (citral) on ‘Rocha’ pear quality through cold storage and shelf-life. (Submetido)
- Gago, C.M., Miguel, M.G., Cavaco, A.M., Almeida, D.P., Antunes, M.D., 2015. Combined effect of temperature and controlled atmosphere on storage and shelf-life of “Rocha” pear treated with 1-methylcyclopropene. *Food Sci. Technol. Int.* 21, 94–103. doi:10.1177/1082013213511808
- Gago, C.M.L., Artiga-Artigas, Antunes, M. D.C., M., Faleiro, M.L, Miguel, M.G., Martín-Belloso, O., 2019. Effectiveness of nanoemulsions of clove and lemongrass essential oils and their major components against *Escherichia coli* and *Botrytis cinerea*. *Journal of Food Science and Technology*, 56 (5): 2721–2736. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03762-1>
- Galvis-Sánchez, A.C., Fonseca, S.C., Morais, A.M., Malcata, F.X., 2004. Sensorial and physicochemical quality responses of pears(cv Rocha) to long-term storage under controlled atmospheres. *J. Sci. Food Agric.* 84, 1646–1656. doi:10.1002/jsfa.1798
- Gol, N.B., Patel, P., Rao, T.V.R., 2013. Postharvest Biology and Technology Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. *Postharvest Biol. Technol.* 85, 185–195.
- Guerra, R., Gardé, I. V., Antunes, M.D., da Silva, J.M., Antunes, R., Cavaco, A.M., 2012. A possibility for non-invasive diagnosis of superficial scald in ‘Rocha’ pear based on chlorophyll a fluorescence, colorimetry, and the relation between α -farnesene and conjugated trienols. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 134, 127–138. doi:10.1016/j.scienta.2011.11.017
- Gündel, S., Reis, T., Copetti, P., Favarin, F., Sagrillo, M., Silva, A., Segat, J., Baretta, D., Ourique, A., 2019. Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity of nanoemulsions containing Mancozeb and Eugenol. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 169 (2019) 207–215.
- Harwansh, R., Deshmukh, R., Rahman, Md., 2019. Nanoemulsion: Promising nanocarrier system for delivery of herbal bioactives. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 51 (2019) 224–233.
- Hatsugai, N. and Katagiri, F., 2018. Quantification of Plant Cell Death by Electrolyte Leakage Assay. *Bio-protocol* 8(5): e2758. DOI: 10.21769/BioProtoc.2758.
- Hui W., Niu R., Song Y., Li D., 2011. Inhibitory Effects of 1-MCP and DPA on Superficial Scald of Dangshansuli Pear. *Agricultural Sciences in China* 2011, 10(10): 1638-1645

- Ishaka, A., Imam, M.U., Mahamud, R., Zuki, A.B.Z., Maznah, I., 2014. Characterization of rice bran wax 720 policosanol and its nanoemulsion formulation. *Int. J. Nanomedicine* 9, 2261–2269.
- Isidoro N., Almeida D.P.F., 2006. A-Farnesene, conjugated trienols, and superficial scald in ‘Rocha’ pear as affected by 1-methylcyclopropene and diphenylamine. *Postharvest Biology and Technology* 42 (2006) 49-56
- Khin, M.M., Zhou, W., Yeo, S.Y., 2007. Mass transfer in the osmotic dehydration of coated apple cubes by using maltodextrin as the coating material and their textural properties. *J. Food Eng.* 81, 514–522. doi:10.1016/j.jfoodeng.2006.12.005
- Krstic, M., Medarevic, D., Duris, J., Ibric, S. Chapter 12 - Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) and self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) as lipid nanocarriers for improving dissolution rate and bioavailability of poorly soluble drugs. *Lipid Nanocarriers for Drug Targeting*. 2018. 473-508
- Larrigaudière, C., Vilaplana, R., Soria, Y., Recasens, I., 2004. Oxidative behaviour of Blanquilla pears treated with 1-methylcyclopropene during cold storage. *J. Sci. Food Agric.* 84, 1871–1877. doi:10.1002/jsfa.1850
- Li P., Lu W., 2016. Effects of storage conditions on the physical stability of D-limonene nanoemulsion. *Food Hydrocolloids* 53 (2016) 218-224
- Lu W., Huang D., Wang C., Yeh C., Tsai J., Huang Y., Li P., 2017 Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. *Journal of Food and Drug Analysis* XXX (2017) 1-8
- Luís Vicente - Pêra Rocha - http://www.luisvicente.eu/?avada_portfolio=pera-rocha (acedido em 21-8-2016)
- Lurie, S., Watkins, C.B., 2012. Superficial scald, its etiology and control. *Postharvest Biol. Technol.* 65, 44–60. doi:10.1016/j.postharvbio.2011.11.001
- M. Artiga-Artigas, A. Acevedo-Fani, O. Martín-Belloso, Effect of Sodium alginate incorporation procedure on the physicochemical properties of nanoemulsions, *Food Hydrocolloids* (2017), doi: 10.1016/j.foodhyd.2017.04.006
- Maqbool, M., Ali, A., Alderson, P.G., Zahid, N., Siddiqui, Y., 2011. Effect of a novel edible composite coating based on gum arabic and chitosan on biochemical and physiological responses of banana fruit during cold storage. *J. Agric. Food Chem.* 59, 5474–5482.
- Medeiros, B.G. de S., Pinheiro, A.C., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., Carneiro-da-Cunha, M.G., 2012. Polysaccharide/Protein Nanomultilayer Coatings: Construction, Characterization and Evaluation of Their Effect on “Rocha” Pear (*Pyrus communis* L.) Shelf-Life. *Food Bioprocess Technol.* 5, 2435–2445. doi:10.1007/s11947-010-0508-0
- Otoni, C.G., Avena-Bustillos, R.J., Olsen, C.W., Bilbao-Sáinz, C., McHugh, T.H., 2016. Mechanical and water 761 barrier properties of isolated soy protein composite edible films as affected by carvacrol and 762 cinnamaldehyde micro and nanoemulsions. *Food Hydrocoll.* 57, 72–79.
- Pêra Rocha - Sabor de Portugal | ANP - <http://www.perarocha.pt/custompages/showpage.aspx?pageid=33eae525-41ba-481b-b58d-5b686360edfd&m=b26> (acedido em 21-8-2017).

- PeraFI.pdf. Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral. Ficha de Internacionalização – Pera Rocha. <http://www.gpp.pt/images/gam/1/fi/PeraFI.pdf> (acedido a 21-8-2017).
- Pesis, E., Ebeler, S.E., de Freitas, S.T., Padda, M., Mitcham, E.J., 2010. Short anaerobiosis period prior to cold storage alleviates bitter pit and superficial scald in Granny Smith apples. *J. Sci. Food Agric.* 90, 2114–23. doi:10.1002/jsfa.4060
- Riquelme N., Herrera M.L., Matiacevich S., 2017. Active films based on alginate containing lemongrass essential oil encapsulated: Effect of process and storage conditions. *Food and Bioproducts Processing.* 104 (2017) 94-103
- Rojas-Graü, M.A., Tapia, M.S., Martín-Belloso, O., 2008. Using polysaccharide-based edible coatings to maintain quality of fresh-cut Fuji apples. *LWT - Food Sci. Technol.* 41, 139–147. doi:10.1016/j.lwt.2007.01.009
- Sappi, 2013. Sappi Fine Paper North America. <https://cdn-s3.sappi.com/s3fs-public/sappietc/Defining%20and%20Communicating%20Color.pdf> (acedido a 10/08/2017).
- Saquet, A., Almeida, D., 2016. Energy metabolism and fruit quality of ‘Rocha’ pear as affected by oxygen partial pressures and 1-methylcyclopropene. IX Simpósio Ibérico de Maturação e Pós Colheita.
- Saquet, A.A., Streif, J., 2008. Fermentative metabolism in “Jonagold” apples under controlled atmosphere storage. *Eur. J. Hortic. Sci.* 73, 43–46.
- Shrivastava, A., 2018. Introduction to Plastics Engineering. William Andrew Publishing. 2018. ISBN 9780323395007.
- Soares, J.; Silva, A.; Marques, H., 2003. O livro da pêra ‘Rocha’: intensificação cultural e regulação da produção (2ª edição). Associação Nacional de Produtores de Pera Rocha. Cadaval, 191pp
- Uluata, S., Decker, E.A., McClements, D.J., 2016. Optimization of Nanoemulsion Fabrication Using Microfluidization: Role of Surfactant Concentration on Formation and Stability. *Food Biophys.* 11, 52–59.
- Wensink, H., 2019. Effect of size polydispersity on the pitch of nanorod cholesterics. Laboratoire de Physique des Solides - UMR 8502, CNRS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France.
- Whitaker, B.D., 2003. Genetic and biochemical bases of superficial scald storage disorder in apple and pear fruits. *Acta Hortic.* 989, 47-60
- Xiaoyang Z., Lin S., Danwen F., Zhenwei S., Bin W., Weixin C., Xueping L., 2015. Effects of the combination treatment of 1-MCP and ethylene on the ripening of harvested banana fruit. *Postharvest Biology and Technology* 107 23–32
- Xing, Y., Lin, H., Cao, D., Xu, Q., Han, W., Wang, R., Che, Z., Li, X., 2015. Effect of chitosan coating with cinnamon oil on the quality and physiological attributes of china jujube fruits. *Biomed Res. Int.* 2015, 1–10

Anexo

Anexo 1 – Composição química do óleo essencial de erva-príncipe (*Cymbopogon citratus*) (Fonte: Gago et al., 2019).

Components	RI	%
Tricyclene	921	0.4
α -Fenchene	938	t
Camphene	938	1.7
6-Methylhept-5-en-2-one	960	1.0
β -Myrcene	975	0.3
1,8-Cineole	1005	0.4
Limonene	1009	0.4
Linalool	1074	1.1
Citronellal	1121	0.4
α -Terpineol	1159	0.3
Neral	1210	34.8
Piperitone	1211	0.1
Geraniol	1236	16.9
Geranial	1240	33.7
Geranyl acetate	1370	3.2
β -Caryophyllene	1414	1.2
<i>trans</i> - α -Bergamotene	1434	t
α -Humulene	1447	0.1
δ -Cadinene	1505	0.1
Elemol	1530	0.3
β -Caryophyllene oxide	1561	0.4
% of Identification		96.8
Grouped components		
Monoterpene hydrocarbons		2.8
Oxygen-containing monoterpenes		90.9
Sesquiterpene hydrocarbons		1.4
Oxygen-containing sesquiterpenes		0.7
Others		1.0

RI: In-lab calculated Retention Index relative to C₉-C₁₆ *n*-alkanes on the DB-1 column,
t: trace (<0.05%)

Anexo 2 – Evolução na Luminosidade (L*), Tonalidade (Hue), Firmeza (N) e Teor de sólidos solúveis (°Brix) durante o armazenamento a 0 °C (0, 2, 4 e 6 meses) e subsequentes períodos de shelf-life (7 dias) em pera ‘Rocha’ tratada com nanoemulsões CI 1%, CI 2%, EP 1.25%, EP 2.25% e sem tratamento (Controlo).

	0 meses		2 meses		4 meses		6 meses	
	0 dias	7 dias	0 dias	7 dias	0 dias	7 dias	0 dias	7 dias
Luminosidade (L*)								
CI 1%	71.02±0.52 aD	71.17±0.49 aD	74.03±0.49 cC	74.91±0.45 bBC	75.45±0.50 cB	75.56±0.62 bB	77.31±0.35 aA	77.87±0.21 abA
CI 2%	70.36±0.37 aC	70.42±0.41 abDC	73.61±.62 cB	73.76±0.55 bcB	76.98±0.25 bcA	77.43±1.21 abA	78.04±0.27 aA	77.04±0.31 bA
EP 1.25%	71.16±0.39 aD	70.30±0.42 abD	75.64±0.29 bB	73.13±0.61 cdC	76.10±0.55 bcB	76.01±0.56 abB	78.04±0.31 aA	77.71±0.37 abA
EP 2.5%	70.80±0.45 aCD	69.41±0.57 bD	75.06±0.62 bcB	72.08±0.54 dC	76.50±0.65 bcA	76.76±0.34 abA	77.79±0.32 aA	77.76±0.37 abA
Controlo	71.39±0.58 aB	71.45±0.49 aB	77.30±0.39 aA	78.20±0.39 aA	78.02±0.30 aA	77.90±0.29 aA	77.62±0.25 aA	78.02±0.25 aA
Tonalidade (Hue)								
CI 1%	108.86±0.71 aA	107.33±0.61 bcA	105.44±0.53 aB	103.04±0.80 aC	100.35±0.62 aD	95.85±0.73 aE	93.77±0.53 aF	94.42±0.31 aEF
CI 2%	109.96±0.53 aA	109.43±0.49 aA	105.14±0.63 abB	103.05±0.63 aC	98.30±0.44 bD	96.18±0.61 aE	94.08±0.33 abF	92.79±0.36 bF
EP 1.25%	109.59±0.53 aA	108.87±0.44 abA	103.54±0.49 bcB	104.02±0.62 aB	97.98±0.55 bC	97.00±0.56 aC	93.10±0.47 abD	93.42±0.37 bD
EP 2.5%	109.83±0.49 aA	108.91±0.58 abA	102.73±0.58 cC	104.31±0.39 aB	96.37±0.49 cD	95.79±0.36 aD	91.66±0.60 cE	92.52±0.29 bE
Controlo	108.76±0.70 aA	106.20±0.99 cB	98.35±0.69 dC	93.21±0.36 bDE	94.70±0.28 dD	91.48±0.31 bE	92.36±0.36 bcE	91.59±0.24 cE
Firmeza (N)								
CI 1%	52.01±1.98 aA	39.83±2.93 abC	45.98±2.45 bABC	19.18±3.55 abD	48.22±1.32 aAB	14.95±3.34 bcD	43.74±1.16 abBC	19.18±2.22 abD
CI 2%	51.19±1.88 aA	45.37±2.25 aB	51.68±1.39 aA	15.45±3.18 bcC	46.35±0.91 abAB	14.96±2.41 bcC	44.26±1.35 aB	14.42±1.45 bcC
EP 1.25%	47.34±1.32 aA	40.89±2.56 abA	46.04±0.97 bA	22.54±3.31 abB	45.28±1.64 abA	23.72±3.20 aB	40.73±1.05 bcA	21.01±1.78 aB
EP 2.5%	48.98±1.77 aA	37.57±3.53 abC	45.30±1.65 bAB	26.94±3.64 aD	43.69±0.87 bcABC	21.13±2.22 abD	39.44±1.15 cBC	20.41±2.75 aD
Controlo	49.83±2.24 aA	33.47±4.79 bC	39.95±2.45 cB	7.63±0.50 cD	40.68±1.21 cB	7.78±0.81 cD	40.73±0.91 bcB	9.63±0.53 cD
Teor de sólidos solúveis (°Brix)								
CI 1%	12.63±0.09 abB	13.63±0.28 bcA	13.43±0.19 bAB	14.10±0.21 aA	13.93±0.12 aA	14.07±0.29 aA	13.87±0.17 aA	13.97±0.21 aA
CI 2%	12.23±0.07 bD	13.17±0.29 cBC	13.43±0.09 bBC	13.83±0.09 aAB	13.43±0.09 aBC	13.87±0.24 aAB	14.43±0.38 aA	12.97±0.15 bC
EP 1.25%	12.33±0.19 bB	13.87±0.18 bcA	14.07±0.07 aA	14.40±0.35 aA	14.30±0.25 aA	14.47±0.21 aA	14.30±0.28 aA	13.80±0.29 abA
EP 2.5%	12.63±0.23 abB	14.17±0.17 abA	14.30±0.15 aA	14.10±0.26 aA	14.10±0.37 aA	14.40±0.26 aA	14.40±0.21 aA	13.63±0.35 abA
Controlo	12.97±0.27 aC	14.70±0.3 aA	14.13±0.17 aAB	13.80±0.10 aABC	14.20±0.41 aAB	13.70±0.25 aBC	14.03±0.32 aAB	13.27±0.32 abBC

Os valores representam as médias ± erro padrão; os valores seguidos da mesma letra minúscula, na mesma coluna e parâmetro e pela mesma letra maiúscula na mesma linha não são significativamente diferentes (Duncan's new multiple test at P<0.05).

Anexo 3 – Evolução na Acidez titulável (g ácido málico/mL), Extravasamento eletrolítico (%) e Perda de peso (%) durante o armazenamento a 0°C (0, 2, 4 e 6 meses) e subsequentes períodos de shelf-life (7 dias) em pera ‘Rocha’ tratada com nanoemulsões CI 1%, CI 2%, EP 1.25%, EP 2.25% e sem tratamento (Controlo).

	0 meses		2 meses		4 meses		6 meses	
	0 dias	7 dias	0 dias	7 dias	0 dias	7 dias	0 dias	7 dias
Acidez titulável (g ácido málico/mL)								
CI 1%	0.42±0.03 aA	0.18±0.01 abB	0.16±0.00 aB	0.16±0.00 abB	0.13±0.01 aC	0.10±0.00 abC	0.10±0.01 cC	0.11±0.00 aC
CI 2%	0.43±0.06 aA	0.20±0.01 aB	0.15±0.01 abBC	0.18±0.01 aBC	0.11±0.01 aC	0.11±0.00 abC	0.15±0.01 aBC	0.12±0.01 aC
EP 1.25%	0.39±0.00 aA	0.15±0.01 bBC	0.14±0.01 bBC	0.16±0.01 abB	0.12±0.01 aD	0.13±0.00 aCD	0.14±0.01 abBCD	0.12±0.00 aD
EP 2.5%	0.45±0.03 aA	0.19±0.01 aB	0.15±0.01 abC	0.14±0.00 bC	0.12±0.01 aC	0.12±0.01 aC	0.12±0.02 abcC	0.13±0.00 aC
Controlo	0.49±0.02 aA	0.17±0.01 abcB	0.14±0.00 bBC	0.16±0.01 abBC	0.14±0.01 aBC	0.09±0.02 bD	0.11±0.00 bcCD	0.11±0.00 aCD
Extravasamento eletrolítico (%)								
CI 1%	54.23±0.79 aC	58.15±0.80 aC	42.41±1.39 bE	69.40±4.02 aB	46.36±1.95 bDE	69.59±3.63 bB	52.72±0.77 bCD	76.49±0.34 bA
CI 2%	49.12±1.41 aC	59.60±1.77 aB	41.82±1.02 bC	69.62±2.65 aA	45.35±1.21 bC	68.60±1.58 bA	48.10±2.67 bcC	75.37±6.74 bA
EP 1.25%	49.66±1.24 aCD	56.07±2.17 aBC	41.92±1.30 bE	61.02±3.32 abB	43.2±1.34 bDE	54.89±0.82 cBC	43.51±1.83 cDE	71.39±3.04 bA
EP 2.5%	51.44±2.17 aBC	55.49±0.34 aBC	40.38±3.02 bE	58.92±1.21 bB	42.39±1.07 bDE	53.85±4.38 cBC	48.36±2.09 bcCDE	71.33±2.03 bA
Controlo	50.56±2.62 aC	60.12±3.76 aB	49.43±3.25 aC	62.60±3.04 abB	55.09±2.10 aBC	83.04±1.51 aA	59.83±1.61 aB	88.26±1.88 aA
Perda de peso (%)								
CI 1%	0.00±0.00 aF	1.66±0.03 abE	2.08±0.05 cE	3.63±0.05 cD	4.34±0.29 bC	6.66±0.24 cB	6.57±0.33 bB	7.64±0.39 bA
CI 2%	0.00±0.00 aH	1.65±0.03 abG	2.23±0.03 cF	3.96±0.03 bE	4.40±0.06 bD	6.99±0.18 bcB	6.63±0.05 bC	7.84±0.02 abA
EP 1.25%	0.00±0.00 aG	1.70±0.05 aF	2.49±0.06 bE	4.13±0.06 bD	5.00±0.17 aB	7.42±0.20 abB	7.36±0.25 aB	8.45±0.28 abA
EP 2.5%	0.00±0.00 aG	1.80±0.09 aF	2.90±0.08 aE	4.44±0.17 aD	5.54±0.20 aC	7.93±0.21 aB	7.53±0.19 aB	8.59±0.22 aA
Controlo	0.00±0.00 aG	1.51±0.04 bF	2.08±0.03 cE	3.42±0.02 cD	4.25±0.07 bC	6.56±0.07 cB	6.72±0.08 bB	7.8±0.11 abA

Os valores representam as médias ± erro padrão; os valores seguidos da mesma letra minúscula, na mesma coluna e parâmetro e pela mesma letra maiúscula na mesma linha não são significativamente diferentes (Duncan's new multiple test at P<0.05).

Anexo 4 – Contagem de fungos e leveduras (logUFC/g) e mesófilos aeróbios (logUFC/g) durante o armazenamento a 0 °C (0, 2, 4 e 6 meses) e subsequentes períodos de shelf-life (7 dias) em pera ‘Rocha’ tratada com nanoemulsões CI 1%, CI 2%, EP 1.25%, EP 2.25% e sem tratamento (Controlo).

	0 meses		2 meses		4 meses		6 meses	
	0 dias	7 dias	0 dias	7 dias	0 dias	7 dias	0 dias	7 dias
Fungos e leveduras (logUFC/g)								
CI 1%	0.67±0.33 aA	0.33±0.33 aA	0.67±0.33 aA	0.67±0.33 abA	0.93±0.47 abA	1.00±0.00 aA	0.41±0.22 aA	0.33±0.33 aA
CI 2%	0.77±0.39 aA	0.33±0.33 aA	0.77±0.39 aA	0.33±0.33 bA	0.33±0.33 bA	0.00±0.00 bA	0.17±0.17 aAB	0.00±0.00 aA
EP 1.25%	1.00±0.00 aA	0.00±0.00 aB	1.00±0.00 aA	0.00±0.00 bB	0.67±0.33 bAB	0.77±0.39 aAB	0.38±0.20 aBC	0.43±0.43 aAB
EP 2.5%	0.93±0.47 aA	0.00±0.00 aB	1.10±0.10 aA	0.00±0.00 bB	0.00±0.00 bB	0.00±0.00 bB	0.33±0.17 aAB	0.00±0.00 aB
Controlo	1.10±0.10 aBC	0.83±0.44 aBC	1.20±0.10 aB	1.10±0.10 aBC	1.77±0.04 aA	1.26±0.14 aAB	0.58±0.08 aD	0.00±0.00 aD
Mesófilos aeróbios (logUFC/g)								
CI 1%	3.72±0.03 aA	2.67±0.11 bB	1.32±0.02 cC	2.54±0.16 aB	1.72±0.14 bcDE	3.52±0.09 aA	2.44±0.61 aB	3.51±0.04 aA
CI 2%	3.59±0.02 aAB	3.87±0.02 aA	2.38±0.52 bCD	1.19±0.27 bE	1.59±0.19 cDE	2.81±0.05 cBC	3.18±0.60 aABC	3.30±0.17 aABC
EP 1.25%	3.60±0.06 aA	0.71±0.03 dF	1.32±0.09 cEF	2.71±0.07 aBC	2.30±0.20 abCD	3.74±0.06 aA	3.26±0.14 aAB	1.94±0.51 bDE
EP 2.5%	3.44±0.06 bAB	0.68±0.03 dE	1.18±0.09 cDE	2.54±0.02 aBC	2.04±0.28 abcCD	3.54±0.02 bA	2.65±0.51 aABC	2.70±0.56 abABC
Controlo	2.85±0.05 cC	2.08±0.06 cE	3.69±0.05 aA	2.50±0.02 aD	2.45±0.11 aD	3.50±0.02 bB	3.65±0.00 aAB	3.00±0.03 abC

Os valores seguidos da mesma letra minúscula, na mesma coluna e parâmetro e pela mesma letra maiúscula na mesma linha não são significativamente diferentes (Duncan's new multiple test at P<0.05).

Anexo 5 – Valores médios da avaliação sensorial das peras ‘Rocha’ revestidas com citral 1% (CI 1%) e 2% (CI 2%), óleo essencial de erva-príncipe 1,25% (EP 1.25%) e 2,5% (EP 2.5%) e Controlo (frutos como vêm do campo), após 6 meses de armazenamento a 0 °C mais 7 dias de shelf-life. Os valores representam a média de 15 repetições ± erro padrão.

	Aparência do fruto	Aparência da polpa	Aroma	Textura	Doçura	Acidez	Aceitação geral
CI 1%	3.06±0.27	5.55±0.31	4.31±0.25	4.81±0.31	4.69±0.37	4.88±0.27	4.50±0.29
CI 2%	2.94±0.38	4.64±0.47	4.25±0.30	4.75±0.34	4.75±0.36	4.56±0.33	4.56±0.34
EP 1.25%	4.75±0.36	5.73±0.27	5.00±0.24	4.56±0.36	5.31±0.20	5.38±0.27	5.19±0.28
EP 2.5%	4.00±0.38	4.64±0.45	4.31±0.24	4.50±0.35	4.75±0.31	4.69±0.31	4.50±0.26
Controlo	4.50±0.29	3.64±0.49	4.31±0.35	3.44±0.39	3.81±0.41	3.69±0.36	3.75±0.37