

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**ALTERAÇÕES QUALITATIVAS NA CUTÍCULA DE MAÇÃS E TANGERINAS  
EM FUNÇÃO DO TRATAMENTO TÉRMICO E DA ESCOVAÇÃO**

**Cândida Raquel Scherrer Montero  
Engenheira Agrônoma-UFRGS**

Dissertação apresentada como um dos  
requisitos à obtenção do Grau de  
Mestre em Fitotecnia  
Área de Concentração Horticultura

Porto Alegre (RS), Brasil  
Fevereiro de 2007

CÂNDIDA RAQUEL SCHERRER MONTERO  
Engenheira Agrônoma - UFRGS

## DISSERTAÇÃO


Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

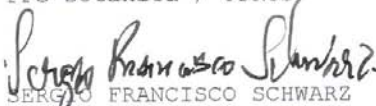
### MESTRE EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil


Aprovado em: 22.02.2007  
Pela Banca Examinadora

  
RENAR JOÃO BENDER  
Orientador - PPG Fitotecnia


  
RINALDO PIRES DOS SANTOS  
Co-orientador  
PPG Botânica / UFRGS


  
SÉRGIO FRANCISCO SCHWARZ  
PPG Fitotecnia

  
JORGE ERNESTO DE ARAÚJO MARIATH  
PPG Botânica / UFRGS

  
AURI BRACKMANN  
Centro de Ciências Rurais  
UFESM

Homologado em: 07.05.2007  
Por

  
JOSÉ ANTÔNIO MARTINELLI  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia

  
GILMAR ARDUINO BETTIO MARODIN  
Diretor da Faculdade de  
Agronomia

**DEDICO**

**Ao meu amado esposo Rodrigo Montero.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar em tudo que faço.

A meus pais e minhas irmãs pelo apoio e carinho.

A meu amado marido por estar sempre ao meu lado em todos os momentos da vida, pelo carinho e pela compreensão nos momentos difíceis.

Ao professor Renar João Bender pela orientação e amizade.

Ao professor Rinaldo Pires dos Santos do Instituto de Botânica da UFRGS pelos ensinamentos na parte de Microscopia Eletrônica e preparação de amostras para microscopia, bem como pelo incentivo constante durante todo trabalho.

Aos demais professores do pós-graduação da fitotecnia e da botânica pelos preciosos ensinamentos.

Aos colegas do departamento de Horticultura pela convivência e amizade.

Às colegas do Laboratório de Pós-colheita: Rose Beatriz Antes, Adriana R. Corrent, Lígia Loss, Sandra Rieth e Liege Cunha dos Santos por toda a ajuda que vocês me deram durante o curso. Em especial a Rose pela ajuda na análise estatística e ensinamentos na área de pós-colheita.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica por possibilitar que este trabalho fosse realizado.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A todas as pessoas que contribuíram para que este trabalho fosse realizado, agradeço.

# ALTERAÇÕES QUALITATIVAS NA CUTÍCULA DE MAÇÃS E TANGERINAS EM FUNÇÃO DO TRATAMENTO TÉRMICO E DA ESCOVAÇÃO <sup>1</sup>

Autor: Cândida Raquel Scherrer Montero  
Orientador: Renar João Bender  
Co-orientador: Rinaldo Pires dos Santos

## RESUMO

O tratamento térmico é um método antigo de desinfestação de frutos e vem sendo mais bem estudado com objetivo de utilizá-lo como método alternativo de controle de podridões em pós-colheita. O calor atua sobre a germinação e o crescimento de estruturas do patógeno e sobre o fruto, aumentando a resistência à infecção. Uma das formas de ação do calor sobre os frutos, proposta na literatura, ocorre sobre a cutícula, de modo a fundir as ceras presentes nesta camada e formar uma barreira física para evitar a entrada do patógeno durante a armazenagem. Neste trabalho, estudou-se o efeito do tratamento com água quente na cutícula de maçãs cv. Fuji e Gala e tangerinas cv. Montenegrina. O calor foi aplicado por imersão e aspersão aliado à escovação e, no caso da tangerina, também foram utilizados métodos de controle complementares e a aplicação de cera de carnaúba na superfície dos frutos. Os frutos do experimento com maçãs foram avaliados em mais de uma época de armazenagem e os de tangerina no final do experimento. Amostras foram retiradas, secas ao ar, montadas e visualizadas em microscopia eletrônica de varredura. As ceras cuticulares das maçãs e das tangerinas alteraram-se em função do tratamento com calor, da escovação e da aplicação de ceras. Em maçãs ocorreu alteração no formato dos cristalóides de cera e cobertura de rachaduras pela fusão da camada cerosa. Efeito similar foi visualizado para as tangerinas onde a fusão das ceras tornou a camada externa mais homogênea e as aberturas naturalmente existentes recobertas. A escovação resultou em remoção e arraste de algum conteúdo ceroso em maçã e na remoção de hifas de patógenos, principalmente, em tangerinas. A aplicação de cera de carnaúba na superfície das tangerinas mostrou efeito de recobrimento das aberturas similar ao calor. O tratamento térmico aplicado atuou reduzindo o número de tangerinas com podridão ao final de 20 dias a 5° C + 7 dias a temperatura ambiente e os resultados da microscopia eletrônica de varredura mostraram que o calor atua fundindo as ceras cuticulares e que estas recobrem os orifícios servindo como barreira física à entrada do patógeno.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (78 p.) Fevereiro, 2007.

# QUALITATIVE CHANGES ON THE CUTICLE OF APPLES AND TANGERINES IN RESPONSE TO HEAT TREATMENTS AND BRUSHING <sup>1</sup>

Author: Cândida Raquel Scherrer Montero

Adviser: Renar João Bender

Co-adviser: Rinaldo Pires dos Santos

## ABSTRACT

Heat treatment is an old method used to disinfest fruits and is, nowadays, again being better studied to be used as an alternative method to control post harvest decay. Heat affects germination and growing of the pathogen structures and enhances the ability of the fruit to resist pathogen infection after harvest. Heat acts on fruit cuticle, melting the waxes present in this layer and forming a physical barrier to hinder pathogen entrance during storage. In this work we studied the effects of heat treatments on the cuticle of 'Fuji' and 'Gala' apples and on 'Montenegrina' tangerines. Heat was applied by immersion or spraying plus brushing. Tangerines had also carnauba wax applied on the surface. Apples were evaluated after two storage periods and the tangerines at the end of the storage period. Samples were excised, air dried, mounted on stubs and visualized on a scanning electron microscope (SEM). The cuticular wax of apples and tangerines changed after heat treatment, brushing and wax application. On apples alteration on the wax crystalloid forms occurred as a result of the wax melting and covering of the cuticular cracks by the melted wax. Similar effect was visualized on tangerines where melting of the epicuticular waxes caused a homogeneous aspect on the outer layer covering cracks and stomata. Brushing resulted in removal and dragging of some wax content on apples and removal of pathogen hyphae mainly on tangerines. The carnauba wax application on tangerines surface showed a similar effect of recovering the natural openings as seen by heat treatment. The heat treatment applied acted reducing the number of rots in tangerine fruit at the end of 20 days at 5° C + 7 days at room temperature. SEM images indicate that heat acts melting the wax layer and the melted material recovers orifices on the surface which could act as a physical barrier against pathogen penetration.

---

<sup>1</sup> Masters dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (78 p.) February, 2007.

## SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I .....	1
1 INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO II – Caracterização da camada de ceras epicuticulares na cutícula de maçãs cultivar Fuji e Gala.....	8
2.1 INTRODUÇÃO.....	8
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
2.2.1 Material experimental.....	11
2.2.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	11
2.2.3 Microscopia óptica.....	12
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
2.3.1 Caracterização da cutícula.....	13
2.3.1.1 Rachaduras na superfície cuticular.....	13
2.3.1.2 Cristalóides de cera.....	17
2.4 CONCLUSÕES.....	19
CAPÍTULO III – Alterações na superfície cuticular de maçãs em função do tratamento térmico.....	20
3.1 INTRODUÇÃO.....	20
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.2.1 Material experimental.....	22
3.2.2 Tratamento com calor.....	22
3.2.3 Preparação da amostra e visualização.....	22
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
3.3.1 Alterações na cutícula de maçãs recém tratadas com calor.....	23
3.3.1.1 Rachaduras na cutícula.....	23
3.3.1.2 Cristalóides.....	26
3.3.2 Efeitos do tratamento com calor na cutícula de maçãs armazenadas.....	30
3.3.2.1 Rachaduras.....	30
3.3.2.1 Microorganismos na superfície de maçãs.....	32
3.3.2.3 Cristalóides.....	33
3.4 CONCLUSÕES.....	37
CAPÍTULO IV – Efeito da escovação na cutícula de maçãs.....	38
4.1 INTRODUÇÃO.....	38
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.2.1 Preparação das amostras.....	40

	Página
4.2.1.1 Microscopia eletrônica de varredura.....	40
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.3.1 Alterações nos cristalóides de ceras.....	41
4.3.1.1 'Gala' .....	41
4.3.1.2 'Fuji' .....	42
4.3.2 Formação de fendas na superfície cuticular de maçãs.....	44
4.3.2.1 'Gala' .....	44
4.3.2.2 'Fuji' .....	46
4.3.3 Outros efeitos da escovação na superfície cuticular.....	47
4.3.4 Aplicação da escovação por cinco minutos.....	48
4.3.5 Máquina classificadora da empresa Mercochen.....	49
4.4 CONCLUSÕES .....	52

CAPITULO V – Efeitos do calor no controle de podridão e na qualidade de tangerinas ( <i>Citrus deliciosa</i> Tenore) cv. Montenegrina e alterações na superfície cuticular das tangerinas em função do tratamento térmico, escovação e aplicação de cera de carnaúba.....	53
5.1 INTRODUÇÃO.....	53
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
5.2.1 Material experimental .....	55
5.2.2 Aplicação do calor.....	56
5.2.3 Aplicação da cera.....	56
5.2.4 Aplicação dos demais produtos.....	57
5.2.5 Análises após a armazenagem.....	57
5.2.3.6 Avaliação da superfície cuticular.....	58
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.3.1 Eficácia do tratamento térmico no controle de podridão.....	59
5.3.2 Efeito do tratamento térmico e da cera de carnaúba na qualidade dos frutos.....	61
5.3.3 Avaliação da superfície cuticular dos frutos.....	63
5.4 CONCLUSÕES.....	71
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74



## RELAÇÃO DE TABELAS

Página

1. Número de tangerinas cv. Montenegrina com podridão de um total de 25 frutos após 20 dias de armazenamento refrigerado a 5° C mais sete dias a temperatura ambiente. Porto Alegre – RS, 2006. .... 59
2. Perda de peso (%) em bergamota cv. Montenegrina aos 20 dias de armazenamento mais sete dias a temperatura ambiente. Porto Alegre – RS, 2006..... 62
3. Índice de cor (IC) em bergamota cv. Montenegrina aos 20 dias de armazenamento mais sete dias a temperatura ambiente. Porto Alegre – RS, 2006..... 63
4. Razão entre Sólidos solúveis totais (SST) e Acidez Total Titulável (ATT) em bergamota cv. Montenegrina aos 20 dias de armazenamento mais sete dias a temperatura ambiente. Porto Alegre – RS, 2006..... 63

## RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

- 2.1. Placa de petri contendo sílica e lâminas histológicas de vidro com epicarpo de maçãs aderidos com fita dupla face para secagem. Laboratório de Pós-colheita, Porto Alegre-RS, 2006..... 12
- 2.2. Suporte de alumínio (“stub”) com amostras de 1mm<sup>2</sup> de epicarpo de maçãs recobertas por uma camada de 15nm de ouro. Porto Alegre, 2006..... 12
- 2.3. Rachaduras na superfície cuticular de maçãs (indicadas pelas setas) armazenadas durante três meses. Cultivar Fuji (a); cultivar Gala (b). Porto Alegre – RS, 2006..... 13
- 2.4. Cortes em perfil mostrando as rachaduras na cutícula de maçã cv. Fuji visualizadas em microscópio óptico, as setas indicam locais das rachaduras. Porto Alegre – RS, 2006..... 14
- 2.5. Rachaduras presentes antes do armazenamento refrigerado (a), com 1 mês de armazenamento (b e c) e com 3 meses de armazenamento refrigerado a 0° C (d). Setas indicam rachaduras na superfície cuticular de maçãs cv. Fuji. Porto Alegre-RS, 2006..... 15
- 2.6. Estruturas de fungos entre rachaduras na camada de ceras de maçãs cultivar Fuji armazenadas por 2 meses e meio a 0° C: rachaduras visão geral com estruturas de fungos(a) e detalhe da entrada do patógeno dentro da fissura(b). Setas indicam as estruturas do fungo. Porto Alegre – RS, 2006..... 16
- 2.7. Corte transversal mostrando perfil da cutícula de maçãs cv. Gala (a) e Fuji (b). Barras indicam espessura da cutícula. Porto Alegre – RS, 2006..... 16
- 2.8. Camada amorfa de ceras (a). Fissura preenchida por cristalóides de ceras orientados (b). Cristalóides de ceras formados na superfície da cultivar Gala: prateletes (c) e grânulos (d). Porto Alegre – RS, 2006. .... 18
- 2.9. Cristalóides de ceras formados na superfície cuticular da cultivar Fuji: fios (a), túbulos (b), prateletes (c), fissura preenchida com cristalóides de ceras (d), setas indicam localização dos fios de cera. Porto Alegre – RS, 2006..... 18

	Página
3.1 Fusão total ou parcial de ceras e recobrimento de rachaduras da superfície em maçãs cv. Fuji: testemunha (a), 30s em imersão (b), 2 min em imersão (c), 30s aspensão (d). Porto Alegre – RS, 2006.....	24
3.2 Superfície cuticular cerosa amorfa em frutos não tratados pelo calor (a) e rachaduras na superfície em maçãs cv. Gala tratadas com clorofórmio (c). Porto Alegre – RS, 2006.....	24
3.3 Fusão total ou parcial e agrupamento dos cristalóides de ceras em maçãs cv. Fuji: testemunha (a e b) 30s em imersão (c), 1 min em imersão (d), 2 min em imersão (e e f), 30s aspensão (g e h). As imagens c e e mostram a fusão total, d e f a fusão parcial e g e h o agrupamento dos cristalóides de ceras em maçãs cv. Fuji. Porto Alegre – RS, 2006.....	28
3.4 Fusão total ou parcial dos cristalóides de ceras com formação de placas de cera em maçãs cv. Gala: testemunha (a e b) 30s em imersão (c), 1 min em imersão (d), 2 min em imersão (e e f), 30s aspensão (g). Fusão total ou parcial dos cristalóides de ceras (f) e formação de placas de cera (c, d e e): Porto Alegre – RS, 2006.....	29
3.5 Recobrimento de rachaduras na superfície cuticular de maçãs cv. Fuji armazenadas por 2 semanas e tratadas com calor: imersão 30s (a), imersão 1min (b), imersão 2min (c) e aspensão 30s (d). Porto Alegre – RS, 2006.....	30
3.6 Modificações na superfície cuticular de maçãs cv. Gala em função do calor: imersão 30s (a), imersão 1min (b), imersão 2min (c) e aspensão 30s (d). Porto Alegre – RS, 2006.....	32
3.7 Presença de microorganismos na superfície cuticular de maçãs cv. Fuji e Gala. Hifa de fungo penetrando na rachadura de frutos não tratados com calor em cv. Fuji (a), esporos na superfície de cv. Gala tratados com calor por imersão 1 min (b). Porto Alegre – RS, 2006. ....	33
3.8 Efeitos do calor na cutícula de maçãs cv. Gala armazenadas por duas semanas a 0° C: 30s em imersão (a, b e c). Fusão de cristalóides (a), formação ou recristalização de cristalóides após armazenamento (b e c). Porto Alegre – RS, 2006.....	34
3.9 Efeitos do calor na cutícula de maçãs cv. Fuji armazenadas por duas semanas a 0° C: 30s em imersão (a), 1 min em imersão (b, c e d), 2 min em imersão (e e f), 30s aspensão (g e h). Porto Alegre – RS, 2006.....	36
4.1 Alteração nos cristalóides de cera da cutícula de cv.Gala em função da escovação por 30 segundos. Escova pesada (a); escova suave (b). A seta indica o sentido do arraste dos cristalóides. Porto Alegre – RS, 2006.....	42

4.2 Efeito da escovação por 30 segundos sobre a superfície cuticular de maçãs cultivar Fuji, com uso de escovas de cerdas suaves (100% de crina de cavalo). Porto Alegre – RS, 2006.....	42
4.3 Arraste, desordenamento (a e b) e detalhe da modificação da estrutura dos cristalóides (c) de cera na cutícula de maçãs cv. Fuji em função da escovação com cerdas suaves. A seta (a e b) indica o sentido do arraste de cristalóides, e o círculo (c) evidencia local de maior modificação na estrutura dos mesmos. Porto Alegre – RS, 2006.....	43
4.4 Remoção dos cristalóides de cera com uso de escovas de cerdas pesadas em cv. Fuji. A área delimitada (a) e a seta (b) indicam locais de remoção. A imagem a direita (b) mostra detalhe da imagem à esquerda (a). Porto Alegre – RS, 2006.....	43
4.5 Remoção de cristalóides e formação de fissuras na camada de ceras intracuticulares na superfície externa de maçã cv. Fuji com uso de cerdas duras por 60 segundos. Porto Alegre – RS, 2006.....	44
4.6 Arraste com remoção parcial de cristalóides em função do uso de escovas com cerdas duras por 30 segundos em cv. Fuji. Porto Alegre – RS, 2006.....	44
4.7 Fissuras no epicarpo de maçãs cv. Gala resultante da escovação: escova suave (a e b); escova dura (c, d, e e f). Porto Alegre – RS, 2006.....	45
4.8 Fendas na superfície cuticular de cv. Fuji ocasionadas pela escovação com uso de cerdas duras com e sem a presença de cristalóides em seu interior. As setas indicam o local das fendas. Porto Alegre – RS, 2006.....	46
4.9 Fendas encontradas na superfície cuticular de frutos de maçã cv. Fuji escovados com cerdas duras com a presença de cristalóides em seu interior. Figura b mostra aumento da área delimitada na figura a. Porto Alegre – RS, 2006.....	47
4.10 Presença de hifa de fungo, indicada pela seta, na superfície de maçã cv. Fuji submetida à escovação. Porto Alegre – RS, 2006.....	48
4.11 Efeito da escovação por cinco minutos no arraste e na remoção de cristalóides da superfície cuticular da cv. Fuji. Porto Alegre – RS, 2006.....	48
4.12 Fendas profundas na superfície cuticular de maçã cv. Fuji, efeito mecânico da escovação por cinco minutos com uso de cerdas duras. Porto Alegre – RS, 2006.....	49
4.13 Escovação em máquina classificadora da empresa produtora e embaladora de maçãs Mercochem. Caxias do Sul, (Abril de 2006).....	49

4.14 Protótipo de máquina classificadora com aspersores para o tratamento térmico e escovas de cerdas suaves e duras. Porto Alegre, Faculdade de Agronomia, UFRGS.....	50
4.15 Arraste e remoção parcial de cristalóides de ceras da cutícula de maçã cv. Fuji passada pela máquina classificadora da empresa Mercochem. Porto Alegre – RS, 2006.....	50
4.16 Fendas repletas de cristalóides na cutícula de maçãs cv. Fuji oriundas da escovação em máquina classificadora da Empresa Mercochem. A imagem à direita mostra detalhe da imagem à esquerda. Porto Alegre – RS, 2006.....	50
4.17 Fendas na cutícula de maçãs cv. Fuji oriundas da escovação em máquina classificadora da Empresa Mercochem. Porto Alegre – RS, 2006.....	51
4.18 Arraste de ceras da cutícula de maçã cv. Gala passada pela máquina classificadora da empresa Mercochem. Porto Alegre – RS, 2006.....	51
5.1 Caracterização da superfície cuticular de tangerinas cv. Montenegrina recém colhida. Estômatos (a e c) indicados pelas setas pretas, rachaduras superficiais (c e d) indicados pelas setas brancas, esporos e hifas de fungos (b). Porto Alegre – RS, 2006.....	64
5.2 Presença de hifas de fungos penetrando em orifícios naturais da superfície cuticular de tangerinas cv. Montenegrina recém colhida. Penetração em estômato (a), e em rachadura superficial (b). Porto Alegre – RS, 2006.....	65
5.3 Superfície cuticular de tangerinas cv. Montenegrina após 20 dias de armazenamento a 5° C. Presença de hifas de fungos (a e b), hifas penetrando em aberturas naturais do fruto (b). Porto Alegre – RS, 2006.....	65
5.4 Efeito do calor aplicado por imersão na superfície cuticular de tangerinas cv. Montenegrina aos 20 dias de armazenamento. Recobrimento de fissuras (a), recobrimento parcial de estômatos (b e c) e presença de esporos e hifas de fungos (b e d). Porto Alegre – RS, 2006.....	66
5.5 Efeito do calor e da escovação na superfície cuticular de tangerinas cv. Montenegrina aos 20 dias de armazenamento. Recobrimento parcial de estômatos e fissuras (a e c), efeitos das escovas formando padrão de arraste na superfície cuticular (b e c), presença de esporos de fungos na superfície (d). Porto Alegre – RS, 2006.....	68
5.6 Efeito da aplicação de cera de carnaúba na superfície cuticular de tangerinas cv. Montenegrina aos 20 dias de armazenamento. Recobrimento de estômatos (a), de fissuras (b), hifas de fungos cobertas por ceras (c) e esporos de fungos (d), setas indicam hifas cobertas por cera. Porto Alegre – RS, 2006.....	69

5.7 Efeito do calor aplicado por imersão e do recobrimento de cera de carnaúba na superfície de tangerinas cv. Montenegrina aos 20 dias de armazenamento. Recobrimento de fissuras e estômatos (a), presença de esporos de fungos na superfície (b). Porto Alegre – RS, 2006.....	69
5.8 Efeito do calor aplicado por aspersão, escovação e recobrimento de cera de carnaúba na superfície de tangerinas cv. Montenegrina aos 20 dias de armazenamento. Recobrimento de fissuras e estômatos (a, b e c), presença de esporos e hifas de fungos na superfície (d). Porto Alegre – RS, 2006.....	70

## CAPÍTULO I

### 1. INTRODUÇÃO

A armazenagem refrigerada permitiu um aumento significativo no período de conservação da maçã, regulando a oferta e agregando valor ao fruto. Apesar dos avanços em termos de conservação no período de pós-colheita, as podridões de frutos armazenados podem chegar a atingir 35% nos galpões de embalagem (Valdebenito-Sanhueza, 2004). A redução de perdas por podridões é obtida com o manejo correto do fruto, medidas profiláticas e controle químico.

A expansão da comercialização e do consumo de produtos orgânicos, livres de resíduos químicos, é uma tendência cada vez maior na atualidade, originado da preocupação do consumidor em ingerir alimentos saudáveis e seguros. Além disso, os produtos químicos usados no controle de doenças estão sofrendo restrições de uso, especialmente na fase de pós-colheita (D'Hallenwin et al., 1994). Outro fator negativo ligado ao uso destes produtos é a resistência dos patógenos aos mesmos. Essa crescente demanda gerada a partir da vontade do consumidor de ingerir produtos mais saudáveis implica em maior canalização de esforços por parte da pesquisa para buscar formas alternativas de controle de doenças, especialmente no caso de produtos de consumo *in natura* como frutos e hortaliças.

Neste contexto, os métodos físicos de controle das podridões de pós-colheita vêm ganhando maior importância. Entre estes está o uso do calor. O calor pode ser aplicado de várias formas: imersão ou aspersão de água quente, vapor quente, ar seco quente, radiação infravermelha, radiação microondas (Couey, 1989) e radiação ultravioleta (D'Hallewin et al., 1994).

O pré-condicionamento por temperatura de frutas e hortaliças é um método antigo, que vem sendo usado por mais de 70 anos, quando Baker descreveu o tratamento térmico para desinfestação de mosca das frutas em citros (Lurie & Klein, 2005).

Estudos recentes confirmam que o tratamento com calor é capaz de reduzir podridões. Para variedades de citros imersão em água quente por 2 a 3 min a 53° C com ou sem fungicida reduziram a incidência de podridão (Rodov *et al.*, 1995; Schirra & Mulas, 1995; Schirra & D'hallewin, 1997; Schirra *et al.*, 1997). Prusky *et al.* (1999) reduziram significativamente a podridão causada por *Alternaria alternata* em frutos de manga com uso de escovação e água quente. De acordo com os estudos de Sams *et al.* (1993), o pré-condicionamento de maçãs 'Golden Delicious' por quatro dias a 38° C ou infiltração por pressão com solução de 4% de CaCl<sub>2</sub> reduziu a incidência de podridões e manteve a firmeza dos frutos durante seis meses a 0° C. No Brasil, Lunardi *et al.* (2003) utilizaram a imersão em água quente para controlar podridão branca em maçãs. Os autores observaram que houve redução no tamanho das lesões dos frutos com imersão por 3 min a 47° C. Oster (2004), estudando a mesma doença em maçãs cultivar Fuji, mostrou que conídios deste fungo submetidos à temperatura de 58° C foram inativados quando o tratamento foi realizado por 60 segundos e que a termoterapia com calor associada ou não ao carbonato de sódio reduziu a incidência e severidade da podridão branca.



O tratamento térmico atua de várias formas: diretamente sobre o patógeno e/ou insetos presentes na superfície; sobre os frutos alterando seu processo de maturação e externamente, na cutícula dos frutos.

Em relação ao processo de maturação o calor atua melhorando a qualidade dos frutos, e aumentando a vida pós-colheita em muitas espécies. O efeito do calor pode ser devido ao retardamento do amadurecimento de frutas climatéricas, em consequência da redução na síntese de etileno e na atividade de enzimas que degradam a parede celular (Kluge *et al.*, 2002). Um dos aspectos mais lembrados pela maioria dos autores é o efeito benéfico do calor sobre a injúria por frio em um posterior armazenamento em baixas temperaturas. Uma das hipóteses para este efeito está associada a uma resposta dos organismos vivos ao calor, com o aumento na síntese de proteínas de choque térmico, que são induzidas pelo calor. De acordo com Ferguson *et al.* (2000), é possível que essas proteínas de choque de calor possam persistir em baixas temperaturas, talvez provendo uma base para redução das injúrias por frio.

Além dos efeitos nos processos de maturação, o tratamento térmico tem efeito direto sobre o patógeno, reduzindo o desenvolvimento de doença. O efeito principal ocorre na inibição ou redução da elongação do tubo germinativo, ou morte dos esporos, reduzindo, efetivamente, o tamanho do inóculo e, subsequente, o desenvolvimento da lesão.

Efeitos do calor na parte externa do fruto são mencionados por alguns autores como atuando de forma indireta na relação patógeno hospedeiro. De acordo com alguns trabalhos, o tratamento por calor, especialmente aquele que envolve um tratamento físico como escovação, pode resultar em oclusão de fraturas cuticulares e micro ferimentos, protegendo o fruto de patógenos que penetram por ferimentos (Schirra *et al.*, 2000). Este

efeito parece estar ligado a um derretimento das ceras cuticulares, evidente em ambos tratamentos com água quente ou água quente e escovação (Ferguson *et al.*, 2000).

As principais alterações demonstradas por esses autores ocorrem na camada externa dos frutos, onde se encontram a cutícula e as ceras cuticulares. Estas se destacam como a principal barreira protetora contra perda de água por transpiração excessiva, ação de patógenos, radiação solar e entrada de produtos químicos e contaminantes (Heredia<sup>1</sup> *et al.*, 1998).

Alterações na camada externa dos frutos em função do tratamento térmico vêm sendo demonstradas por microscopia eletrônica de varredura em mais de uma espécie frutífera. Porat *et al.* (2000) observaram que o tratamento térmico aliado à escovação atuou derretendo a camada de ceras epicuticulares dos frutos e, assim, cobrindo e selando estômatos e fendas nas superfícies dos frutos, que poderiam servir como locais potenciais para invasão de patógenos. O mesmo efeito foi evidenciado em pimentão, por Fallik *et al.* (1999) e por Schirra & D'hallewin (1997), que imergiram em água quente tangerinas da variedade Fortune. Lurie *et al.* (1996) em um experimento com maçãs Golden Delicious e tratamento térmico por imersão em água quente mais 2% de CaCl<sub>2</sub>, sugeriram que o tratamento com calor amoleceu as ceras e que estas preencheram as fendas desta camada na superfície dos frutos.

Além do uso isolado do tratamento térmico, alguns autores têm sugerido e pesquisado o uso do mesmo aliado a outras técnicas para aumentar sua eficácia visto que o calor, apesar de ser um método promissor para redução de podridões, tem um efeito residual reduzido (Klein *et al.*, 1997). Conway *et al.* (1999) sugerem a combinação de três métodos de controle: ar quente, aumento da concentração de cálcio e controle biológico de patógenos pós-colheita por antagonistas como, por exemplo, *Pseudomonas syringae*. A

---

<sup>1</sup> HEREDIA, A. *et al.* apud MORQUERO *et al.*, 2004, p.204

tentativa dos autores foi no sentido de minimizar as deficiências de cada método e obter a complementaridade dos mesmos. Os resultados demonstraram que uma estratégia integrada de tratamento por calor, seguido de infiltração de cálcio e posterior tratamento por antagonista pode ser uma alternativa útil para controlar podridões de pós-colheita.

Atualmente, tratamentos por calor são usados comercialmente em muitos países. A pesquisa continua avaliando estes métodos, em novas técnicas, e nas respostas a tratamento com altas temperaturas em frutas e hortaliças, fungos patogênicos e insetos (Ferguson *et al.*, 2000).

Fallik *et al.* (1999) desenvolveram um método que lava e desinfesta frutos ao mesmo tempo, com o auxílio de escovas e água quente. O enxágüe com água quente e escovação, apesar de ser uma tecnologia recente, já vem sendo usado comercialmente em Israel, em linhas de processamento para exportação de milho, manga, pimentão e citros. A máquina asperge água quente nos frutos enquanto estes se movem através de escovas. Os benefícios desta técnica parecem ser a remoção física de esporos e sujeira, além de causar alterações na camada externa dos frutos, como preenchimento de fissuras, e com a possibilidade de induzir a resistência a patógenos, em alguns casos. Segundo resultados de Fallik *et al.* (1999), em experimentos com pimentão, o enxágüe com água quente e escovação (“hot water brushing” - HWB) melhorou a aparência do produto fresco e reduziu o desenvolvimento das podridões de pós-colheita, ao mesmo tempo em que manteve a qualidade dos frutos. Os autores observaram uma redução da população epifítica causadora de podridões fúngicas na superfície dos frutos (Fallik *et al.*, 1999 e 2000). Porat *et al.* (1999) encontraram resultados similares para citros. Já Prusky *et al.* (1999) verificaram melhora na aparência de frutos de manga sob o mesmo tratamento. Os autores, descrevendo seus resultados, afirmam que o tratamento com enxágüe em água quente e

escovação (HWB) teve efeito significativo, ao remover a poeira dos frutos e melhorar a coloração e o brilho dos mesmos.

Outro efeito na camada de ceras, evidenciado em alguns trabalhos, é o aumento na síntese de ceras dos frutos mediante a aplicação do tratamento térmico. Baker (1974) sugere que um rápido tratamento térmico poderia estimular o aumento da síntese de ceras para preencher as rachaduras existentes nos frutos. Além dele, Roy *et al.* (1994) pesquisando o efeito do tratamento térmico na estrutura de ceras e na infiltração de cálcio em maçãs 'Golden Delicious', verificaram que o tratamento por calor pode ter estimulado um aumento na síntese de ceras para preencher as fissuras, lenticelas, ou ambos.

Assim sendo, os objetivos deste trabalho foram:

- a) estudar a camada cuticular em maçãs cv. Gala e Fuji e tangerinas cv. Montenegrina;
- b) avaliar os efeitos do tratamento por calor e da escovação sobre a camada de ceras epicuticulares de frutos durante a armazenagem.

A primeira etapa deste trabalho (capítulo 2) foi o estudo da camada cuticular de maçãs cultivar Fuji e Gala, em termos de estruturas que a formam e identificação de características importantes e o estabelecimento de uma metodologia adequada, que permita a visualização de ceras através de microscópio eletrônico de varredura.

A seguir, no capítulo 3, são apresentados os efeitos dos tratamentos com calor aplicados por aspersão e imersão na superfície cuticular de maçãs.

No capítulo 4 avaliaram-se os efeitos da escovação em máquina classificadora na camada mais externa da cutícula de maçãs.

E no capítulo 5, a superfície cuticular de frutos cítricos foi avaliada após os tratamentos com calor, escovação e ceras na conservação pós-colheita, relacionados à

eficácia dos tratamentos alternativos, utilizados no controle de podridão, e a aspectos de qualidade dos frutos.

## **CAPÍTULO II**

### **Caracterização da camada de ceras epicuticulares em maçãs das cultivares Fuji e Gala**

#### **2.1 INTRODUÇÃO**

A superfície primária de folhas, hastes e frutos é coberta por uma camada extracelular fina: a cutícula (Neinhuis *et al.*, 2001). A cutícula é uma membrana fina, hidrofóbica, e flexível que está composta por uma matriz polimérica, a cutina e associada a lipídeos solvente-solúveis, as ceras cuticulares (Vogg *et al.*, 2004). A cutícula é um produto da epiderme, produzido pelas células epidérmicas da superfície externa (Scott, 1966).

A cutícula das plantas sofre mudanças em área à medida que as células se expandem durante o crescimento dos órgãos. Em órgãos com rápida expansão em área a cutícula pode estar muito solta ou enrugada o que aumenta sua área superficial. A medida em que o crescimento prossegue as dobras se achatam e conseqüentemente desaparecem. Apesar da área de superfície rugosa ser insuficiente para acomodar toda expansão do fruto que ocorre após a antese, o enrugamento pode ajudar a prevenir a rachadura cuticular durante a fase mais rápida de crescimento. As propriedades mecânicas da cutícula durante o crescimento são de importância comercial especialmente para indústria de frutas onde as rachaduras cuticulares causam manchas na superfície dos frutos (Jeffree, 1996).

Da mesma forma que a cutina, as ceras não são um composto específico, são polímeros extremamente heterogêneos que resultam de interação de ácidos graxos de cadeia muito longa, com até 34 carbonos. Existem duas classes distintas de ceras: epicuticulares na superfície da cutícula e intracuticulares, que ocorrem como partículas dentro da matriz de cutina. De acordo com Neinhuis (2001), estes lipídeos estão embebidos na matriz de cutina (ceras intracuticulares) e também se movem até a superfície (ceras epicuticulares), onde são, freqüentemente, encontrados formando estruturas tridimensionais complexas, mencionados na literatura como cristalóides de ceras. Enquanto a cutícula e as ceras intracuticulares funcionam principalmente como uma barreira à perda de água (Schönherr 1982; Riederer and Schreiber 1995; Schreiber *et al.*, 1996), as ceras epicuticulares servem para diferentes propósitos como a reflexão da luz (Barnes & Cadoso-Vilhena, 1996) e impermeabilização (Holloway 1969, 1971).

Cristais de cera epicuticular exibem grande diversidade ultraestrutural. É amplamente aceito que a micromorfologia da maioria dos cristais é determinada principalmente por sua composição química (Neinhuis *et al.*, 2001). O conteúdo de ceras epicuticulares pode variar enormemente, desde uma camada fina (5 a 10  $\mu\text{g}$  por  $\text{cm}^2$ ) a uma capa de mais de 5mm de espessura em *Ceroxylon andicola* (Martin and Juniper, 1970). A composição deste conteúdo ceroso também varia e depende principalmente de fatores genéticos, mas também de clima, tipo de tecidos e estágio de desenvolvimento. (Wilkinson & Kasperbauer, 1972; Baker, 1974). Estudos em frutos de tomate mostraram que a composição do conteúdo ceroso depende da cultivar e do estágio de maturação dos frutos (Bauer *et al.* 2004).

As ceras epicuticulares podem formar uma camada parcial ou contínua de ceras amorfas sobre a superfície de plantas superiores (Baker, 1982) e em muitos frutos, estruturas cristalinas surgem na superfície externa dando aos frutos o seu característico

“florescimento de ceras” (Jeffree, 1975). Storey e Price (1999) estudaram a microestrutura da epiderme de ameixa e observaram diferenças entre os lados com e sem florescimento de ceras. Segundo estes autores, a formação do florescimento na superfície de frutos está provavelmente influenciada pelo microclima da fruta, como efeito da radiação incidente na epiderme.

A cutícula da maçã a protege contra estresses do meio ambiente como vento, temperatura, agentes químicos e seca, não apenas quando o fruto está na planta mãe, mas também após a colheita, durante a estocagem (Jenks *et al.*, 1994, 1995). Sem a camada de ceras da cutícula, as maçãs estariam mais propensas a infecções por microorganismos, danos físicos e em particular perda de umidade (Jenks *et al.* 1994,1995). Além disso, a cutícula ainda é a primeira linha de defesa contra a infecção de tecidos vegetais por patógenos (Belding *et al.*, 1998).

A camada de ceras epicuticulares de maçãs já foi estudada por alguns pesquisadores. Estes mostram estruturas na forma de cristalóides que se formam na superfície da cutícula e a presença de fissuras na camada de ceras das maçãs. Faust & Shear (1972) examinaram superfícies de três variedades de maçãs e visualizaram diferenças consideráveis na aparência da estrutura de ceras, que variavam durante a temporada. Belding *et al.*, (1998) estudaram a composição e variabilidade das ceras epicuticulares em várias cultivares de maçã, principalmente as do grupo Delicious e Golden Delicious, e mostraram através de microscopia eletrônica de varredura a existência de estruturas diferentes entre as cultivares.

O conhecimento da ultraestrutura e da espessura da camada de ceras e como estas se alteram após a colheita pode ajudar a entender como as cultivares de maçã se comportam durante a estocagem.



A primeira etapa deste trabalho teve por objetivo o estudo da camada cuticular de maçãs, cultivares Gala e Fuji, em termos de estruturas que a formam, identificação de características importantes desta camada para armazenagem dos frutos e estabelecimento de uma metodologia adequada que permita a visualização de ceras através de microscópio eletrônico de varredura.

## **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1 Material experimental**

Foram utilizadas maçãs (*Malus domestica* Borkh.) das cultivares Gala e Fuji, provenientes da empresa produtora de maçãs Mercochem, do município de Caxias do Sul. Os frutos foram selecionados para ausência de defeitos e homogeneidade de tamanho e ponto de maturação. Os frutos foram mantidos em ar refrigerado a uma temperatura de 0° C por três meses.

### **2.2.2 Microscopia eletrônica de varredura**

Retirou-se 2 segmentos de aproximadamente 5mm<sup>2</sup> de cada fruto, em 3 repetições de 3 frutos cada, num total de 18 amostras por cultivar em três períodos de avaliação: não armazenadas, armazenadas por 1 mês e armazenadas por 3 meses. Também foram realizados cortes transversais para visualização do perfil e medição da espessura da camada cuticular das maçãs para caracterizar as duas cultivares estudadas. Para o estudo da superfície da cutícula foram extraídos segmentos de cinco mm<sup>2</sup> da região equatorial do epicarpo dos frutos foram retirados e aderidos com fita dupla face em uma lâmina histológica de vidro de modo a permanecerem estendidos durante o processo de secagem (Figura 2.1). Na seqüência, as lâminas foram colocadas em uma placa de Petri contendo sílica gel para secagem, segundo metodologia descrita por Castro *et al.*, (2002). As placas

foram mantidas em um dessecador contendo sílica durante um período mínimo de uma semana a temperatura ambiente. Posteriormente, um segmento de um  $\text{mm}^2$  foi retirado com auxílio de bisturi e microscópio óptico estereoscópico, colocado em suporte (stub) de alumínio (Figura 2.2), aderido com cola prata, recoberto com uma camada de 15 nm de ouro em metalizador Balzer e visualizado em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6060, sob 10kV.



Figura 2.1. Placa de petri contendo sílica e lâminas histológicas de vidro com epicarpo de maçãs aderidos com fita dupla face para secagem. Laboratório de Pós-colheita, Porto Alegre-RS, 2006.



Figura 2.2. Suporte de alumínio (“stub”) com amostras de  $1\text{mm}^2$  de epicarpo de maçãs recobertas por uma camada de 15nm de ouro. Porto Alegre, 2006.

### 2.2.3 Microscopia óptica

Foram feitos cortes a mão livre, com o uso de um suporte de poliestireno expandido e lâmina de barbear. Os cortes mais finos foram selecionados e corados com Azul de Aman

em lâmina histológica de vidro, lavados em água e cobertos por uma lamínula. A visualização e o registro foram realizados em microscópio óptico de campo claro.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Caracterização da cutícula

A cutícula de ambas as cultivares examinadas em microscopia eletrônica de varredura apresentaram duas características principais: a presença de rachaduras ou fissuras em sua superfície e a presença de ceras na forma de cristalóides. No entanto essas características variaram para as duas cultivares estudadas. A descrição dessas características e a variação entre as cultivares será discutida a seguir.

#### 2.3.1.1 Rachaduras na superfície cuticular

Nas eletromicrografias de varredura é possível observar que as cutículas de ambas as cultivares apresentaram rachaduras ou fraturas em sua superfície (Figura 2.3). No entanto a cultivar Fuji apresentou esta característica mais evidente (Figura 2.3a).

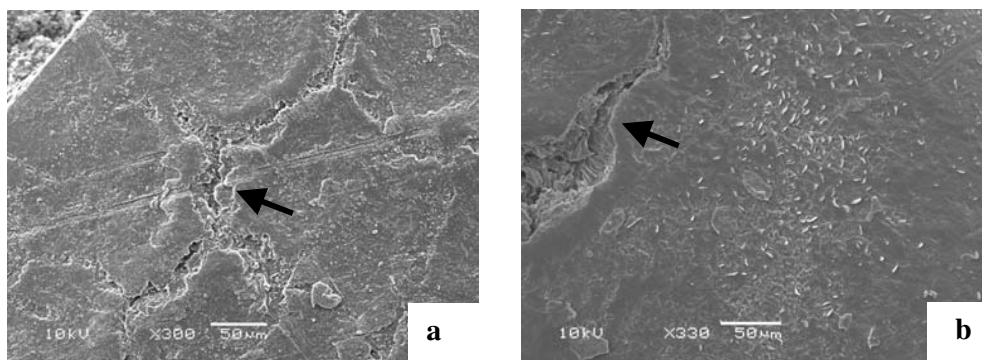


Figura 2.3. Rachaduras na superfície cuticular de maçãs (indicadas pelas setas) armazenadas durante três meses a 0° C. Cultivar Fuji (a); cultivar Gala (b). Porto Alegre – RS, 2006.

Estas fraturas também foram observadas através de seções transversais em microscópio óptico (Figura 2.4). Estas fissuras que ocorrem na cutícula de maçãs são resultado de um desbalanço entre a produção de ceras e o crescimento do fruto, e de

acordo com Roy *et al.*(1994), podem formar uma rede interconectada na superfície dos mesmos, como mostrado na Figura 2.3a. As rachaduras encontradas na cutícula das maçãs das cultivares estudadas já se evidenciaram nos primeiros trabalhos realizados com o uso do microscópio eletrônico de varredura em frutos do gênero *Malus* (Faust & Shear, 1971). Recentemente, Veraverbeke *et al.* (2001), trabalhando com modelagem para predição da perda de umidade através da cutícula de maçãs estabeleceram que a área de rachaduras para as cultivares Elstar e Jonagold é de 9,5 e 10,5% da superfície dos frutos, respectivamente.

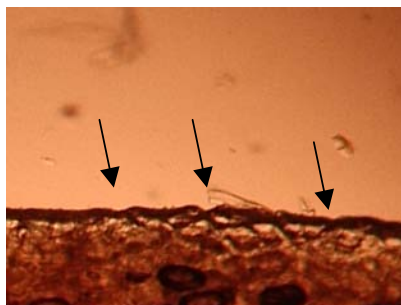


Figura 2.4. Cortes em perfil mostrando as rachaduras na cutícula de maçã cv. Fuji visualizadas em microscópio óptico, as setas indicam locais das rachaduras. Porto Alegre – RS, 2006.

Junto com as lenticelas, as rachaduras aumentam consideravelmente a permeância cuticular, apesar de poderem desaparecer durante a estocagem e vida de prateleira (Veraverbeke *et al.*, 2001). Apesar disso, os presentes resultados mostraram que as rachaduras apareceram mais e com maior clareza nas amostras de frutos armazenados e menos evidentes e às vezes ausentes em frutos recém colhidos (Figura 2.5).

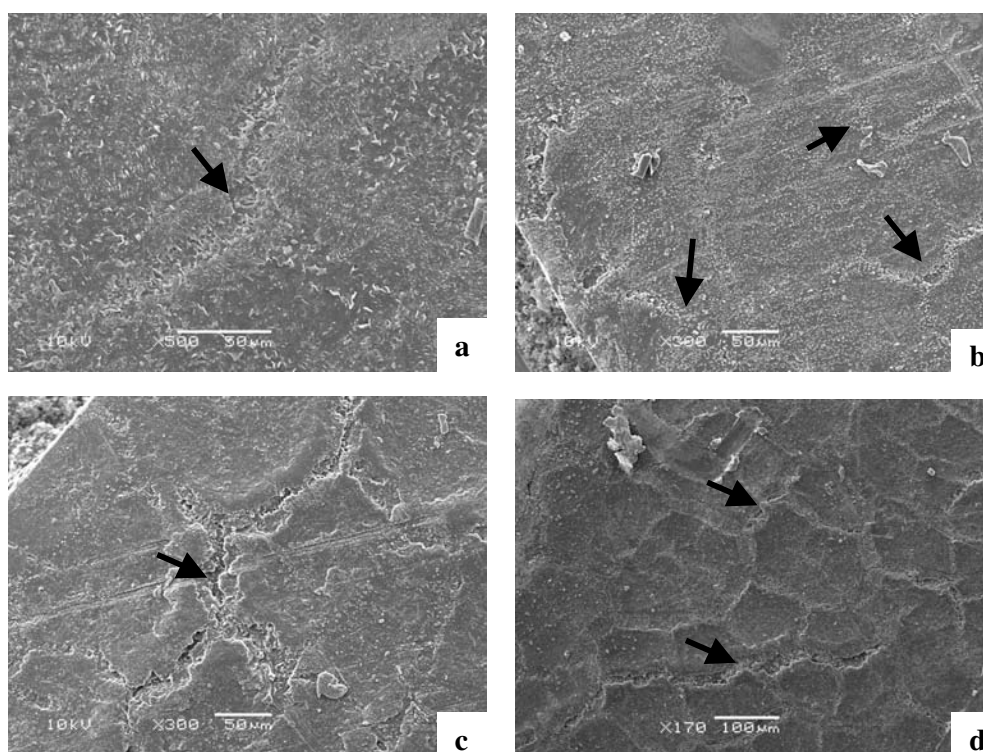


Figura 2.5. Rachaduras presentes antes do armazenamento refrigerado (a), com 1 mês de armazenamento (b e c) e com 3 meses de armazenamento refrigerado a 0° C (d). Setas indicam rachaduras na superfície cuticular de maçãs cv. Fuji. Porto Alegre – RS, 2006.

Além da perda de umidade, estas fraturas são importantes por serem possíveis portas de entrada de patógenos nos frutos. De acordo com Schirra *et al.*, (2000), uma importante parte do aumento da resistência de frutos a podridões com uso de métodos como o tratamento térmico está relacionado à fusão da superfície epicuticular, preenchendo as rachaduras existentes na cutícula e prevenindo o uso destas rachaduras cobertas como sítios de invasão de muitos patógenos. Neste trabalho, foi possível visualizar estruturas de fungos aderindo-se às rachaduras das camadas de ceras epicuticulares (Figuras 2.6 a e b), o que demonstra que estes locais também podem servir de apoio para a fixação do patógeno em frutos.

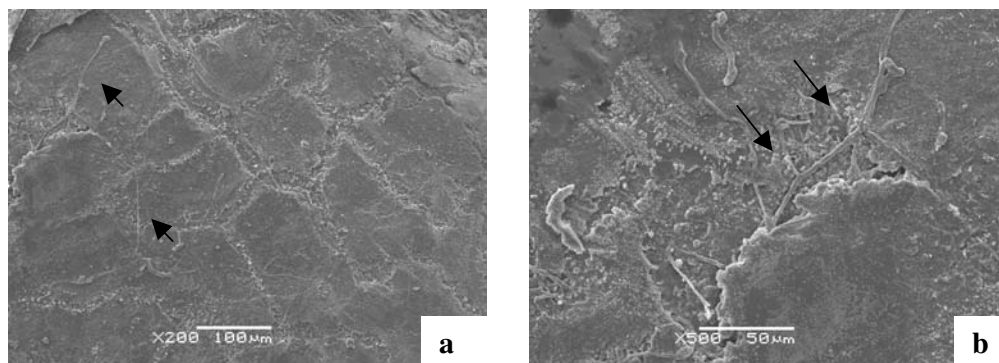


Figura 2.6. Estruturas de fungos entre rachaduras na camada de ceras de maçãs cultivar Fuji armazenadas por 2 meses e meio a 0° C: rachaduras visão geral com estruturas de fungos(a) e detalhe da entrada do patógeno dentro da fissura(b). Setas indicam as estruturas do fungo. Porto Alegre – RS, 2006.

A cutícula dos frutos estudados apresentou uma espessura variando entre 17 e 52 μm para cv. Gala e 12 a 23 μm para cv. Fuji (Figura 2.7).

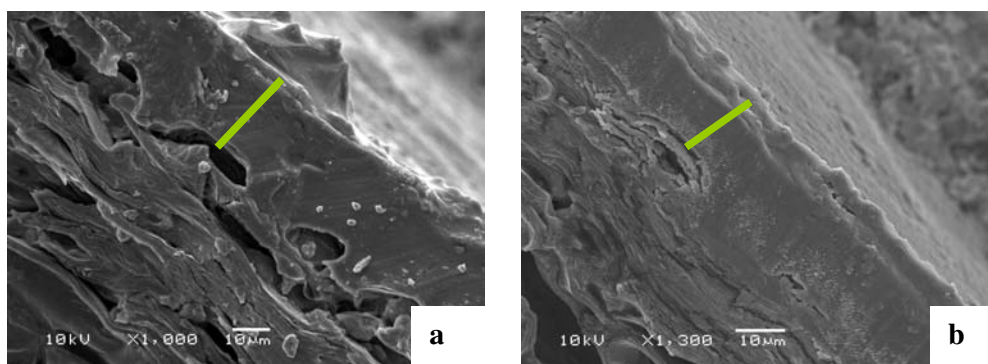


Figura 2.7. Corte transversal mostrando perfil da cutícula de maçãs cv. Gala (a) e Fuji (b). Barras indicam espessura da cutícula. Porto Alegre – RS, 2006.

Veraverbeke *et al.* (2001) utilizaram técnicas de microscopia laser confocal para medir a espessura da camada cuticular, de cutina e de ceras e encontraram espessuras de 11,2 e 16,07 μm para a cutícula de maçã cv. Jonagold e Estar, respectivamente. Nestas cultivares, a camada de cutina perfazia 78% e 74% e as ceras 22% e 26% da cutícula, respectivamente.

### 2.3.1.2 Cristalóides de cera

A cutícula é composta por duas camadas de ceras: uma camada mais interna, que constituem as chamadas ceras intracuticulares e uma camada mais externa, as ceras epicuticulares. A camada mais externa é muitas vezes composta por cristalóides de ceras com distintos formatos, que caracterizam determinada superfície cuticular vegetal. No presente estudo, vários cristalóides foram identificados. Os principais foram: pratos, prateletes, túbulos, fios e grânulos, de acordo com a classificação proposta por Bartholott *et al.*(1998). A cultivar Fuji apresentou maior variedade e abundância destes cristalóides em relação à 'Gala'. Além disso, em muitos casos, os cristalóides apresentaram um padrão específico de orientação. Por exemplo, os pratos que se orientaram enfileirados em uma única direção especialmente aqueles que se encontram dentro de alguma fissura (Figura 2.8 b).

A cv. Gala apresentou camada cerosa mais amorfa (Figura 2.8 a) e com menor presença de estruturas epicuticulares. Apesar disso, alguns cristalóides foram visualizados: prateletes com comprimento variando de 1,5 a 6,9  $\mu\text{m}$  (Figura 2.8 c) e grânulos arredondados com diâmetro variando de 1,2 a 3  $\mu\text{m}$  (Figura 2.8 d).

Na cv. Fuji, muitos cristalóides foram observados na camada epicuticular, tais como: fios com 1,6 a 3,3  $\mu\text{m}$  de comprimento (Figura 2.9 a), túbulos ocos com 0,55  $\mu\text{m}$  de comprimento em média (Figura 2.9 b) e prateletes com 0,8 a 4,1  $\mu\text{m}$  de comprimento (Figura 2.9 c). Estes cristalóides, em alguns casos, se formaram em fissuras provavelmente originadas durante o manuseio pós-colheita ou no campo. No campo pode ter ocorrido remoção de parte do conteúdo ceroso e posterior ressíntese do mesmo, quando os cristalóides se originaram de forma a preencher os espaços onde havia ocorrido remoção e protegendo estes locais (Figura 2.9 d).

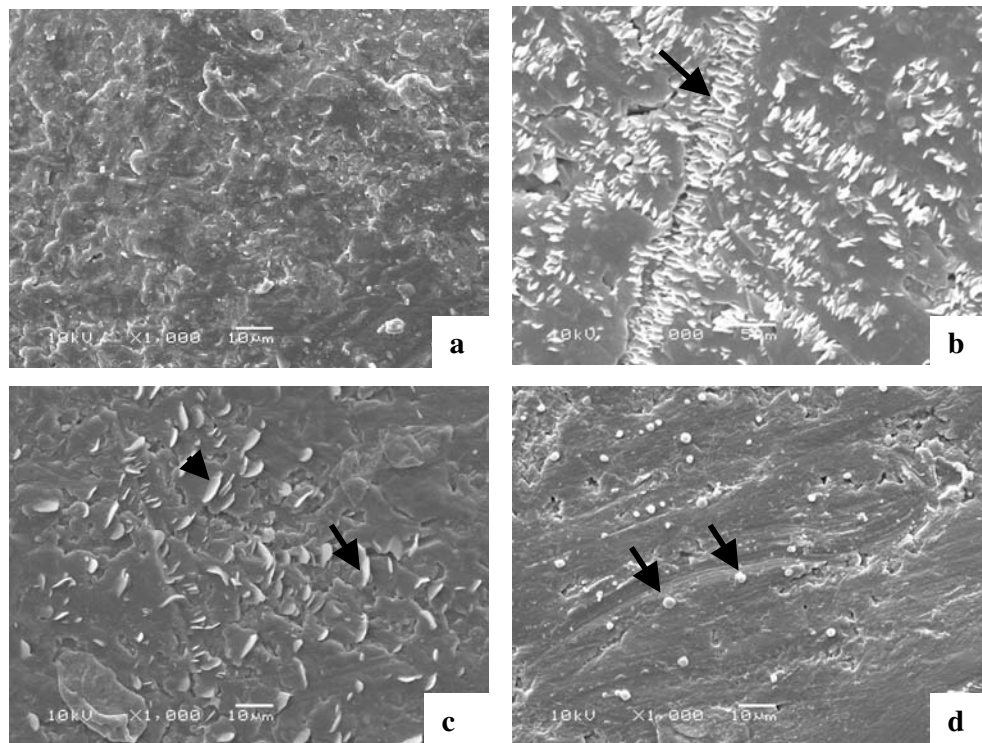


Figura 2.8. Camada amorfa de ceras (a). Fissura preenchida por cristálóides de ceras orientados (b). Cristálóides de ceras formados na superfície da cultivar Gala: prateletes (c) e grânulos (d). Porto Alegre – RS, 2006.

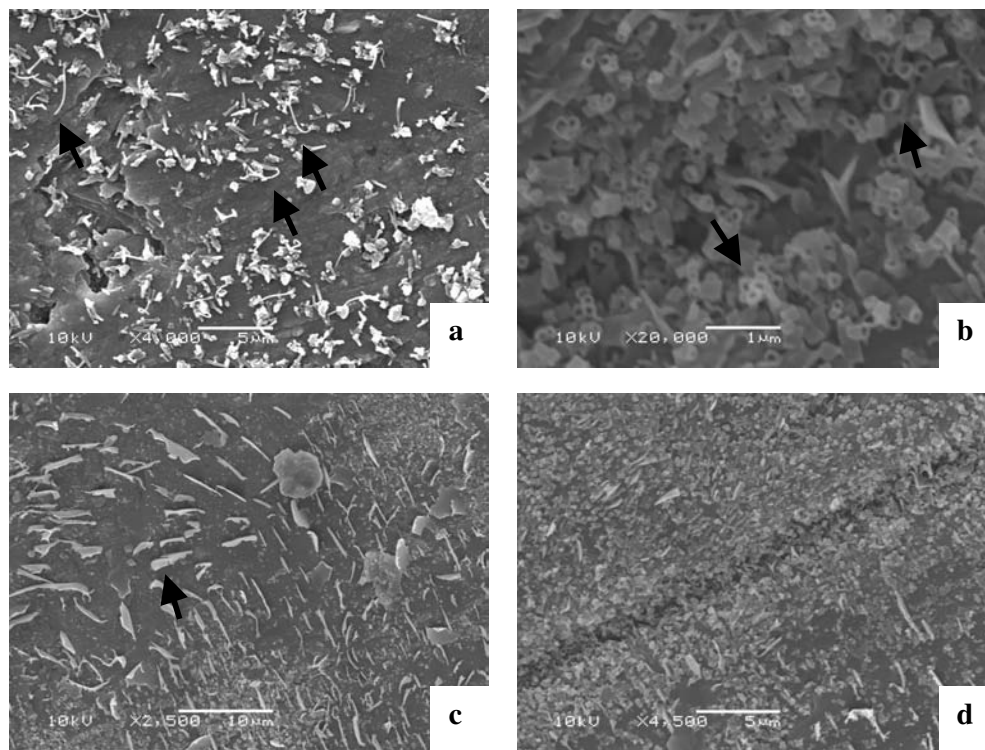


Figura 2.9. Cristálóides de ceras formados na superfície cuticular da cultivar Fuji: fios (a), túbulos (b), prateletes (c), fissura preenchida com cristálóides de ceras (d), setas indicam localização dos cristálóides de cera. Porto Alegre – RS, 2006.



## 2.4 CONCLUSÕES

O estudo das ceras cuticulares nas cultivares de macieira Fuji e Gala mostrou a existência de uma série de características já evidenciadas na literatura para outras cultivares, como rachaduras e cristalóides com distintos formatos e tamanhos. Este estudo mostrou que estas características não são as mesmas para ambas cultivares: a cv. Fuji apresentou maior variação e abundância de cristalóides e mostrou a característica de rachaduras em sua superfície mais evidente do que a cv. Gala. Esta última apresentou uma camada cerosa mais amorfa e homogênea. Além disso, a espessura da camada cuticular de ambas difere, sendo que a cutícula da cultivar 'Fuji' apresenta-se menos espessa a da cultivar Gala. Essa caracterização é importante para entendermos os processos fisiológicos que ocorrem com essas cultivares após a colheita, uma vez que as ceras atuam no sentido de restringir a perda de água por transpiração nos frutos e protegê-los do meio, atuando como uma barreira ao estabelecimento de microorganismos causadores de podridão.

A metodologia para preparação de amostras testada permitiu a visualização das ceras epicuticulares em frutos de macieira, e será utilizada para estudos posteriores.

## CAPÍTULO III

### Alterações na superfície cuticular de maçãs em função do tratamento térmico

#### 3.1 INTRODUÇÃO

As doenças de pós-colheita são fator limitante para estocagem de inúmeros produtos colhidos. Além disso, a susceptibilidade de produtos recém colhidos às doenças de pós-colheita aumenta durante a estocagem prolongada, como resultado de mudanças fisiológicas que favorecem o desenvolvimento dos patógenos nos frutos (Eckert e Ogawa, 1988). O mercado de exportação de frutas frescas exige frutos livres de sujeira, patógenos e produtos químicos, uma vez que o consumidor está cada vez mais exigente em relação à sua alimentação ser livre de resíduos de qualquer natureza. Dessa forma, fica cada vez mais difícil justificar o uso de produtos químicos sintéticos em produtos frescos colhidos (How, 1991), ao mesmo tempo em que aumenta o interesse por métodos não convencionais para o controle de podridão.

Neste contexto, o tratamento térmico pré-estocagem parece ser um dos mais promissores métodos de controle de podridão de pós-colheita (Couey, 1989; Klein e Lurie<sup>2</sup>, 1991; Schirra e Bem-Yehoshua, 1999). O tratamento térmico é um método físico de desinfecção e pode ser aplicado por imersão, por vapor, por ar seco (Lurie, 1998; Schirra e Bem-Yehoshua, 1999) ou por enxágüe rápido e escovação (Fallik *et al.*, 1996a). Estes métodos que utilizam calor para redução de podridão são fungistáticos e não fungicidas. O

---

<sup>2</sup> KLEIN, J.D. & LURIE, S. apud SCHIRRA *et al.*, 2000, p.72

patógeno é inibido tanto pela inibição térmica como pelo aumento da resistência do fruto contra o patógeno. Uma parte importante deste aumento de resistência do fruto está relacionada à 'soldagem' da superfície epicuticular, preenchendo rachaduras da cutícula e evitando o uso destas fissuras obstruídas como local de invasão por vários patógenos (Schirra *et al.*, 2000).

Além dos trabalhos realizados em todo mundo em vários produtos hortícolas recém colhidos, no Brasil, alguns trabalhos já foram realizados para conservação de maçãs com uso de tratamento térmico. Oster (2004), estudando a podridão branca em maçãs cultivar Fuji, mostrou que conídios deste fungo submetidos à temperatura de 58° C foram inativados quando o tratamento foi realizado por 60 segundos e que a termoterapia com calor associada ou não ao carbonato de sódio reduziu a incidência e severidade da doença podridão branca. Também, Lunardi *et al.* (2003) verificaram que os tratamentos por imersão em água quente reduziram o tamanho das lesões das maçãs quando o tratamento foi de 47° C por 3 minutos em maçãs 'Fuji' armazenadas em atmosfera controlada. A maioria destes trabalhos visou determinar o efeito do tratamento térmico no controle da podridão e na qualidade químico-física dos frutos e não seu efeito sobre a superfície do fruto.

Neste trabalho, o objetivo foi verificar os efeitos do tratamento térmico por aspersão e imersão, aliado ou não à escovação em máquina classificadora na superfície cuticular de maçãs cultivar Gala e Fuji.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 Material Experimental**

Foram utilizadas maçãs (*Malus domestica* Borkh.) das cultivares Gala e Fuji, provenientes da empresa produtora de maçãs Mercochem, do município de Caxias do Sul. Os frutos foram selecionados para ausência de defeitos e homogeneidade de tamanho e ponto de maturação.

### **3.2.2 Tratamento com calor**

O experimento consistiu de seis tratamentos, com três repetições de três frutos cada: T1=testemunha; T2=imersão em água quente a 58°C, por 30s; T3=imersão em água quente a 58°C, por 1min; T4= imersão em água quente a 58°C, por 2min; T5=aspersão em água quente a 58° C, por 30s, T6 – imersão em clorofórmio por 30s (metodologia para extração de ceras foi realizada conforme Neinhuis *et al.*, 2001). Foram retiradas amostras dos mesmos frutos para visualização em microscopia eletrônica de varredura no momento da instalação do experimento, e três semanas após a instalação com intuito de verificar os efeitos do calor após o período de armazenamento. Os frutos foram mantidos em ar refrigerado a uma temperatura de 0° C, durante o período de avaliação.

### **3.2.3 Preparação da amostra e visualização**

Segmentos de cinco mm<sup>2</sup> da epiderme dos frutos foram retirados e aderidos com fita dupla face em uma lâmina histológica de vidro, de modo a permanecerem estendidos durante o processo de secagem. Em seguida, as lâminas foram colocadas em uma placa de Petri contendo sílica gel para secagem. As placas foram mantidas em um dessecador contendo sílica gel, durante um período mínimo de uma semana. Posteriormente, um segmento de 1 mm<sup>2</sup> foi retirado com auxílio de bisturi e microscópio estereoscópico. A

seguir, as amostras foram coladas em suportes (stubs) de alumínio, com o uso de cola prata, recobertas com uma camada de 15 nm de ouro, em metalizador Balzer e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6060, sob 10kV.

### **3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.3.1. Alterações na cutícula de maçãs recém tratadas com calor**

O calor aplicado tanto por imersão como aspersão proporcionou dois efeitos distintos visualizados sob o microscópio eletrônico de varredura: recobrimento parcial ou total das fissuras naturais das camadas epicuticulares dos frutos e fusão parcial ou total dos cristalóides de cera, com alteração de formato dos mesmos.

##### **3.3.1.1 Rachaduras na cutícula**

As rachaduras naturais encontradas na cutícula dos frutos foram alteradas com uso do calor, variando conforme o tratamento aplicado. O tratamento de imersão na cultivar Fuji resultou em um padrão de fusão na camada cerosa e a cobertura das rachaduras foram mais homogêneos (Figura 3.1 b e c). Já quando foi utilizada a aspersão, o efeito foi menos homogêneo e o recobrimento das rachaduras foi parcial, parecendo mais esparso e “salpicado” (Figura 3.1d).

O efeito de fusão das ceras e cobertura de rachaduras foi mais evidente na cv. Fuji que na Gala, principalmente porque na cutícula dos frutos desta cultivar as rachaduras não são tão evidentes quanto na ‘Fuji’, o que pode ser visualizado ao comparar-se as cutícula dos frutos não tratados do experimento (Figura 3.2 a).

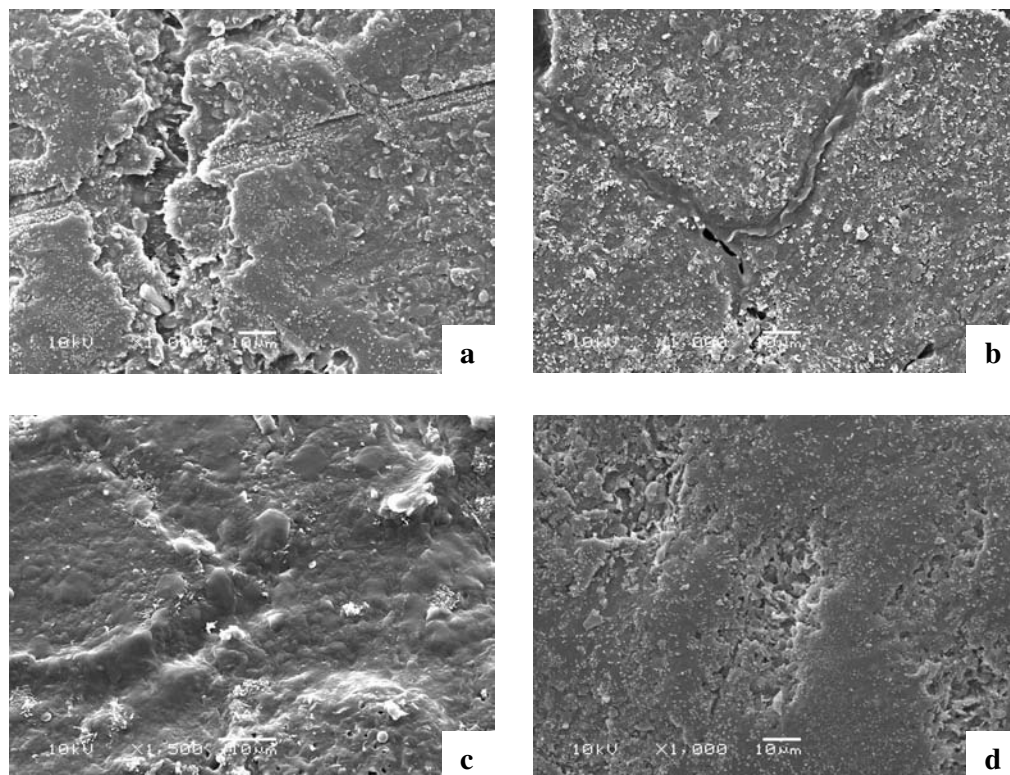


Figura 3.1. Fusão total ou parcial de ceras e recobrimento de rachaduras da superfície em maçãs cv. Fuji: testemunha (a), 30s em imersão (b), 2 min em imersão (c), 30s aspersão (d). Porto Alegre – RS, 2006.

Foi possível visualizar as rachaduras na cultivar Gala apenas quando foram retiradas parte das ceras cuticulares que recobriam os frutos com uso de clorofórmio (Figura 3.2b), o que demonstra que as ceras cuticulares em cv. Gala formam uma camada amorfa que recobre mais uniformemente estas rachaduras do fruto durante o seu crescimento, diferentemente do que ocorre na 'Fuji'.

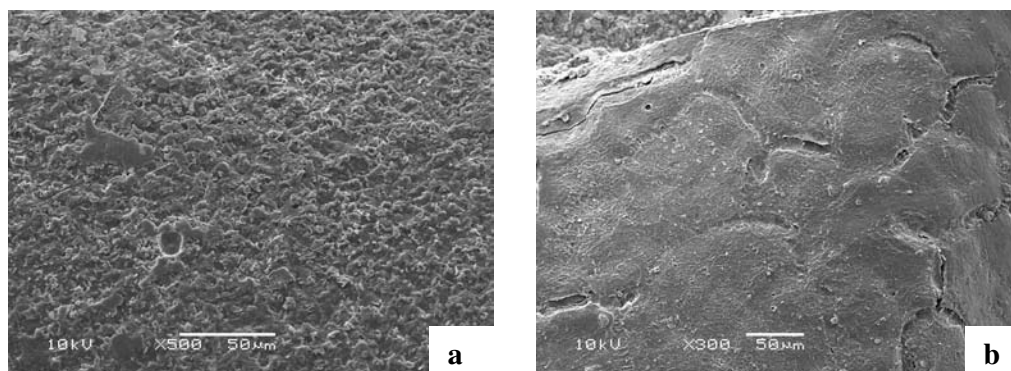


Figura 3.2. Superfície cuticular cerosa amorfa em frutos não tratados pelo calor (a) e rachaduras na superfície em maçãs cv. Gala tratadas com clorofórmio (b). Porto Alegre – RS, 2006.

A transpiração, processo fisiológico que continua ocorrendo após a colheita dos frutos, envolve o movimento da água através dos espaços intercelulares e da cutícula. A cutícula e as ceras epicuticulares são uma barreira entre alguns organismos vivos como os vegetais e o meio ambiente. Esta camada atua, entre outras coisas, protegendo contra a perda excessiva de água.

A presença de micro-fissuras na camada de ceras epicuticulares já foi demonstrada em outros estudos (Faust e Shear 1972; Lurie *et al.*, 1996; Roy *et al.*, 1994; Miguire *et al.*; Schirra *et al.*, 2000), e esta pode influenciar a permeabilidade ao vapor de água nos frutos.

Muitos autores já estudaram esta camada. Faust e Shear (1972) constataram o aparecimento de rachaduras em maçãs de diferentes cultivares e mencionam que estas poderiam ser devido a uma falha das ceras em manter a mesma velocidade de crescimento do tecido interno, ou ainda, que as rachaduras ocorrem como resultado da expansão do fruto durante o desenvolvimento e amadurecimento (Roy *et al.*, 1994). Miguire *et al.* (1999) estudaram as micro-fissuras em maçãs cv. Braeburn e a sua relação com a permeabilidade ao vapor de água, e concluíram que a permeabilidade das rachaduras era aproximadamente 15 vezes maior que a da cutícula intacta, e que mudanças na proporção de rachaduras poderiam criar um grande efeito na permeabilidade ao vapor de água do fruto como um todo.

Futuros estudos em termos de perda de massa fresca para frutos tratados com calor (e/ou o uso de ceras comerciais no recobrimento de rachaduras) podem determinar se o recobrimento parcial ou total das fissuras visualizados neste experimento de fato atuam no sentido de redução da desidratação dos frutos.

O tratamento térmico é utilizado para reduzir podridões de pós-colheita. Alguns autores mencionam que um dos efeitos do calor seria o efeito físico de oclusão das fraturas e microferimentos pelo derretimento das ceras existentes na camada epicuticular, desta

forma protegendo o fruto da entrada de patógenos (Schirra *et al.*, 2000). O calor utilizado neste experimento de fato alterou a camada de ceras epicuticulares dos frutos, sendo que estas se apresentaram fundidas e recobriram total ou parcialmente as rachaduras naturalmente existentes nestes frutos. No entanto, o tipo de tratamento térmico tem efeitos diferentes nesta camada, derretendo mais ou menos as estruturas que as formam e aumentando ou diminuindo o efeito do recobrimento de fissuras deixando esta camada mais homogênea. A eficácia deste recobrimento, em termos de proteção do fruto, é algo que deve ser determinado para cada cultivar e/ou espécie frutífera. A oclusão de fraturas pela fusão das ceras epicuticulares em função do calor que se observa neste trabalho mostra que este é um dos prováveis efeitos do calor sobre os frutos e pode estar atuando como uma barreira física para evitar a entrada de patógenos nas maçãs. Cabe salientar que o calor tem outros efeitos não discutidos neste trabalho e que atuam em conjunto com o efeito físico mencionado na possível proteção do fruto contra patógenos em pós-colheita.

### **3.3.1.2 Cristalóides**

O efeito do calor sobre os cristalóides epicuticulares foi bastante evidente na cv. Fuji, mais do que na Gala, principalmente pela abundância destes cristalóides nesta cultivar. A fusão parcial ou total e alteração de formato dos cristalóides na 'Fuji' podem ser visualizados na Figura 3.3. Ocorreu fusão em todos os tratamentos térmicos aplicados tanto por imersão como em aspersão. A fusão dos cristalóides com formação de uma camada mais amorfa (Figura 3.3 a e c) e homogênea provavelmente ajudou na cobertura das rachaduras e outras microfissuras na superfície epicuticular quando os frutos foram submetidos ao calor.

Outro efeito visualizado apenas nos frutos da cultivar Fuji tratados pelo calor foi um agrupamento de cristalóides (Figura 3.3 g e h).



A cultivar Gala também apresentou fusão parcial ou total de cristalóides (Figura 3.4 f). No entanto, como esta cultivar se caracteriza por uma presença menor de cristalóides na sua superfície, este fenômeno foi menos evidente do que na Fuji. Nesta cultivar não houve agrupamento de cristalóides, mas ocorreu a formação de placas na cutícula de muitas amostras tratadas com calor principalmente por imersão (Figura 3.4 c, d e e).

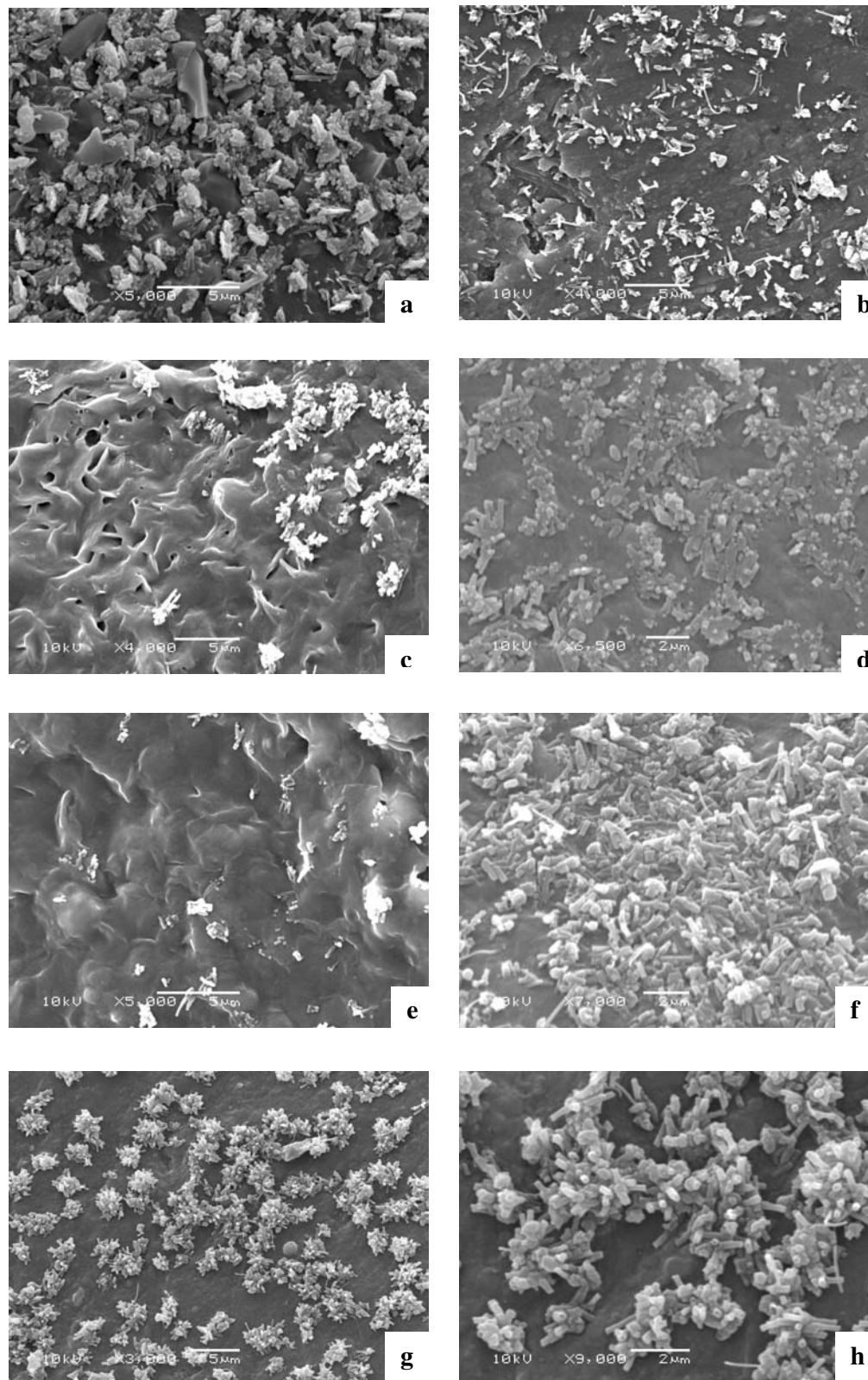


Figura 3.3. Fusão total ou parcial e agrupamento dos cristalóides de ceras em maçãs cv. Fuji: testemunha (a e b) 30s em imersão (c), 1 min em imersão (d), 2 min em imersão (e e f), 30s aspensão (g e h). As imagens c e e mostram a fusão total, d e f a fusão parcial e g e h o agrupamento dos cristalóides de ceras em maçãs cv. Fuji. Porto Alegre – RS, 2006.

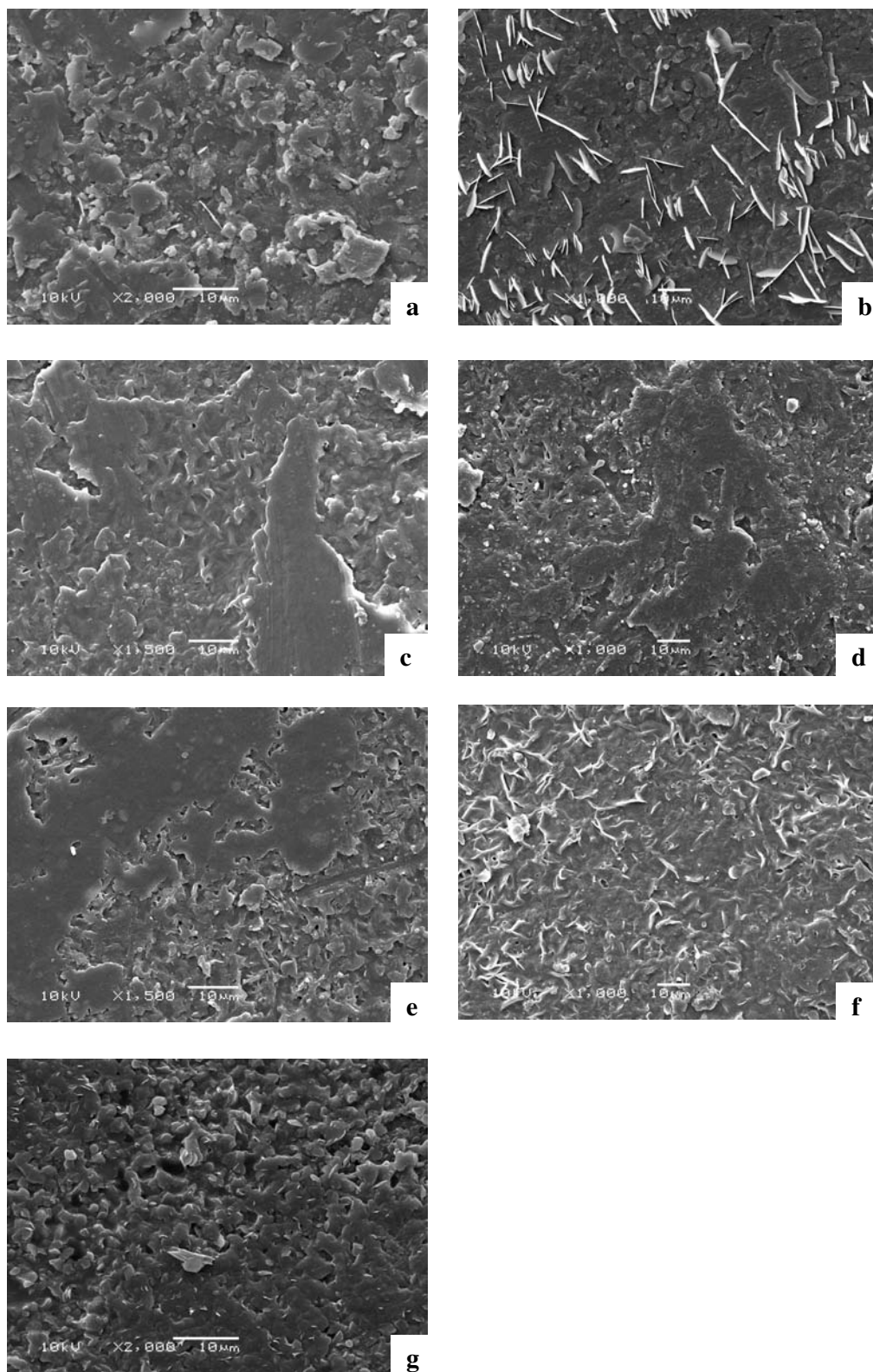


Figura 3.4. Fusão total ou parcial dos cristalóides de ceras com formação de placas de cera em maçãs cv. Gala: testemunha (a e b) 30s em imersão (c), 1 min em imersão (d), 2 min em imersão (e e f), 30s aspersão (g). Fusão total ou parcial dos cristalóides de ceras (f) e formação de placas de cera (c, d e e): Porto Alegre – RS, 2006.

### 3.3.2 Efeitos do tratamento com calor na cutícula de maçãs armazenadas

Uma segunda avaliação, duas semanas após os tratamentos com calor, foi realizada para possível ocorrência de alguma alteração no padrão visualizado durante o armazenamento dos frutos.

#### 3.3.2.1 Rachaduras

Efeitos similares aos observados antes do armazenamento foram registrados após duas semanas a 0° C, tais como recobrimento de rachaduras na superfície da cultivar Fuji, principalmente nos tratamentos onde o calor foi aplicado por imersão (Figura 3.5 a, b e c). Já quando o calor foi aplicado por aspersão, este efeito não foi evidente, ocorrendo um efeito “salpicado”, como antes do armazenamento (Figura 3.5 d).

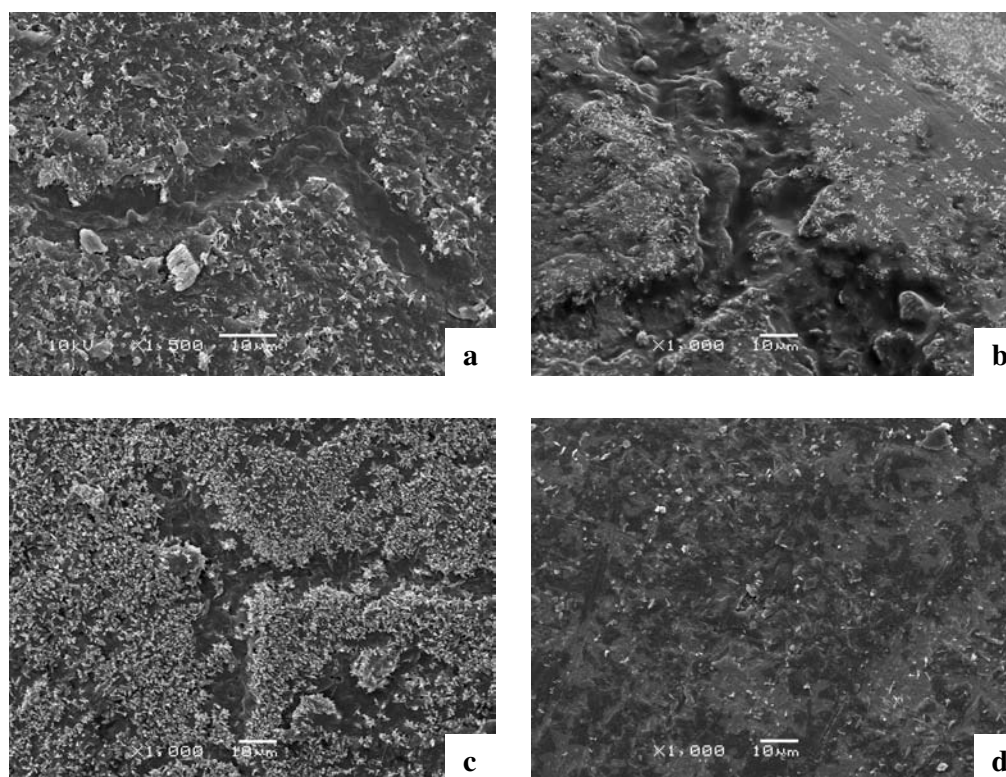


Figura 3.5. Recobrimento de rachaduras na superfície cuticular de maçãs cv. Fuji armazenadas por 2 semanas e tratadas com calor: imersão 30s (a), imersão 1min (b), imersão 2min (c) e aspersão 30s (d). Porto Alegre – RS, 2006.

Estudos em mais de uma espécie frutífera mostraram que ocorre modificação nas rachaduras da cutícula em função da armazenagem. Roy *et al.* (1994) estudando maçãs observaram que em frutos colhidos antes do climatério as rachaduras se tornavam mais largas e profundas durante uma estocagem prolongada. D'Hallewin e Schirra (2000) apresentaram resultados similares para pomelo. No presente trabalho, foi possível medir a largura das rachaduras antes e após a estocagem por um curto período. Os efeitos são similares aos citados na literatura em relação ao aumento de largura das rachaduras após o período de armazenagem. Os valores médios de largura das rachaduras cuticulares em maçãs Fuji foram: testemunha 15,47  $\mu\text{m}$ , testemunha após duas semanas de armazenamento 17,06  $\mu\text{m}$ , tratamento térmico por imersão 21,44  $\mu\text{m}$  e tratada com calor e armazenada 25,31  $\mu\text{m}$ .

As modificações que ocorreram na superfície cuticular da cultivar Gala foram um pouco diferentes. Similar ao que foi visualizado antes da armazenagem ocorreu a formação de “placas de cera” (Figura 3.6a, c e d) e quando esta formação não ocorreu visualizou-se apenas uma superfície amorfa relativamente homogênea de cobertura (Figura 3.6b). Este resultado já era esperado uma vez que esta cultivar apresenta a característica de rachaduras em sua superfície cuticular menos evidente.

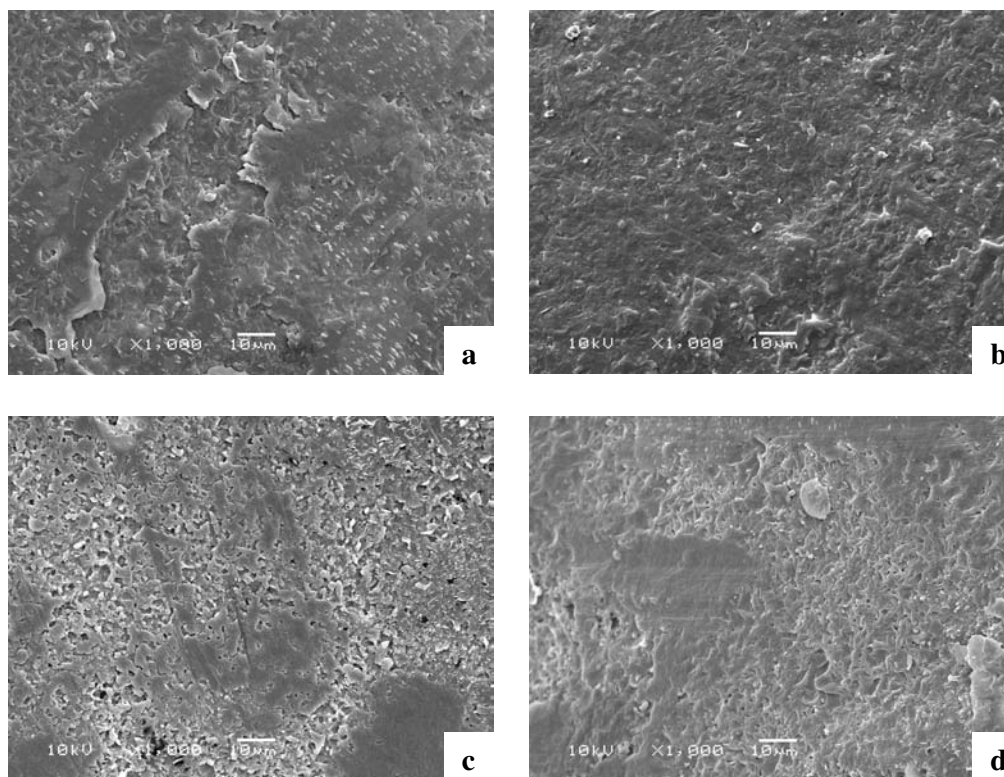


Figura 3.6. Modificações na superfície cuticular de maçãs cv. Gala em função do calor: imersão 30s (a), imersão 1min (b), imersão 2min (c) e aspersão 30s (d). Porto Alegre – RS, 2006.

### 3.3.2.2 Microorganismos na superfície de maçãs

Os frutos da cultivar Fuji não tratados com calor, avaliados após o armazenamento, apresentaram hifas de fungos penetrando as rachaduras. Este fenômeno pode ser visualizado nas figura 3.7 (a) e demonstra como as rachaduras podem ser uma porta de entrada para um patógeno ou um apoio para o desenvolvimento do mesmo na superfície externa dos frutos de maçã.

Já na cultivar Gala, não se observou nenhum microorganismo na superfície dos frutos, avaliados após armazenagem e que não sofreram tratamento térmico. Entretanto, em algumas amostras de frutos que foram tratados com calor, pode-se visualizar microorganismos desenvolvendo-se na superfície (Figura 3.7b). Neste caso, o tratamento com calor pode não ter sido suficiente para eliminar toda fonte de inóculo da superfície dos frutos.

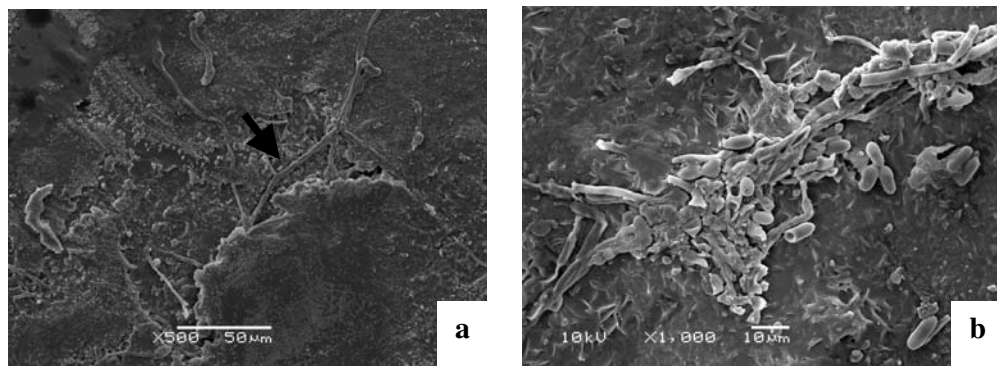


Figura 3.7. Presença de microorganismos na superfície cuticular de maçãs cv. Fuji e Gala. Hifa de fungo penetrando na rachadura de frutos não tratados com calor em cv. Fuji (a), esporos na superfície de cv. Gala tratados com calor por imersão 1 min (b). Porto Alegre – RS, 2006.

### 3.3.2.3 Cristalóides

O efeito de fusão de cristalóides de ceras de maçãs cv. Gala foi novamente visualizado (Figura 3.8a). Em algumas regiões da superfície das maçãs de determinadas amostras havia cristalóides intactos (Figura 3.8b e c), os quais podem tanto não ter sofrido derretimento por uma falha de aplicação do tratamento como podem ter sido originados após o tratamento térmico, provenientes de uma nova síntese destes compostos cerosos. Segundo Roy *et al.* (1994), o tratamento com calor pode estimular um aumento na síntese de ceras para preencher rachaduras, lenticelas, ou ambos. Baker (1974) também sugeriu que aumentos de temperatura estimulam a produção de ceras.

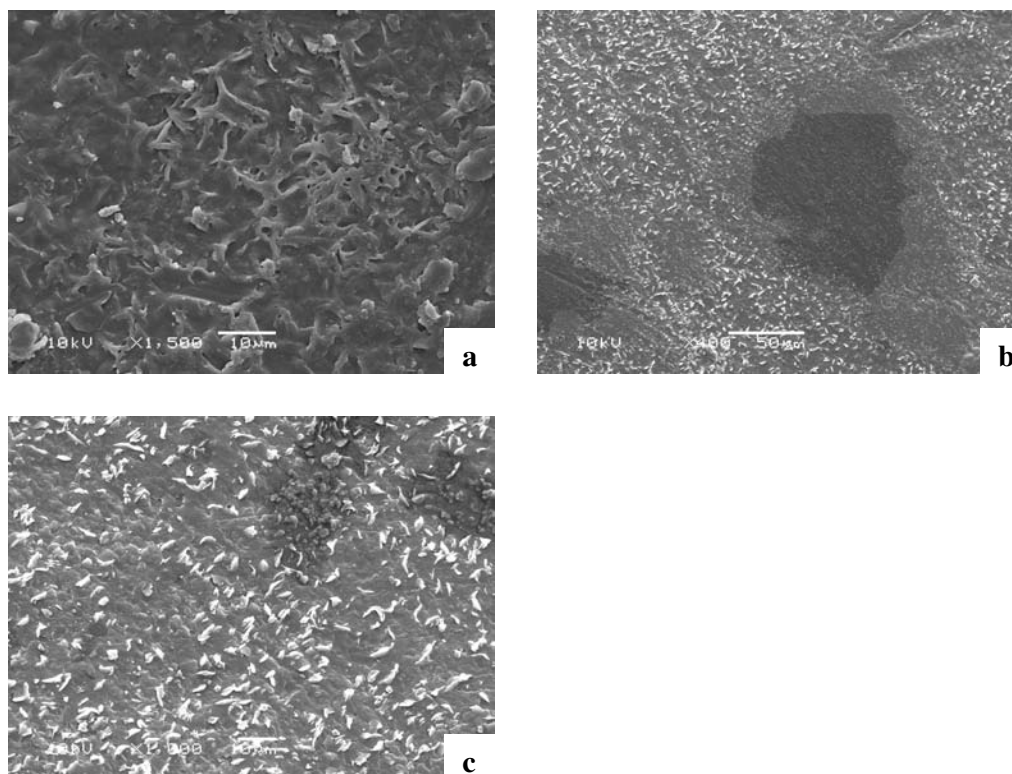


Figura 3.8. Efeitos do calor na cutícula de maçãs cv. Gala armazenadas por duas semanas a 0° C: 30s em imersão (a, b e c). Fusão de cristalóides (a), formação ou recristalização de cristalóides após armazenamento (b e c). Porto Alegre – RS, 2006.

Na cultivar Fuji, mesmo após o tempo de armazenamento, o efeito da fusão parcial ou total dos cristalóides e alteração de formato dos mesmos ainda pode ser visualizado com clareza em todos os tratamentos de calor aplicados (Figura 3.9a, d, f e h).

Além dos efeitos de fusão e alteração no formato, também ocorreu um agrupamento de cristalóides, semelhante ao que ocorreu nesta mesma cultivar antes do período de armazenagem (Figura 3.9b e c). Outro fato a salientar é uma quantidade muito grande de cristalóides intactos presentes na superfície dos frutos após o período de armazenagem, provavelmente devido a uma síntese de compostos de ceras durante este período (Figura 3.9c, g e h). Comparando-se os frutos tratados com calor antes e após o armazenagem (por três semanas), os primeiros apresentaram uma superfície mais homogênea e com menor quantidade de cristalóides (Figuras 3.1 e 3.4), provavelmente devido à fusão dos



cristalóides em função do calor, enquanto que após o armazenamento, visualizou-se uma maior quantidade de cristalóides intactos nos frutos tratados com calor (Figura 3.9c, g e h). Neste sentido, o estresse pelo tratamento de calor pode ter estimulado a produção de ceras nas maçãs durante a armazenagem como sugerem alguns autores (Roy *et al.*, 1994) ou o próprio armazenamento pode ter algum efeito neste sentido. Ou seja, os frutos durante o armazenamento podem ter sintetizado mais ceras para preencher fissuras em sua superfície no sentido de evitar excessiva desidratação. De acordo com a literatura, a modificação que vem sendo visualizada no epicarpo de frutos em função do armazenamento se refere às rachaduras na cutícula, que se tornam mais largas e profundas durante a estocagem (D'Hallewin e Schirra, 2000; Roy *et al.*, 1999), tais trabalhos não mencionam modificação nos cristalóides de ceras na superfície dos frutos visualizada neste trabalho.

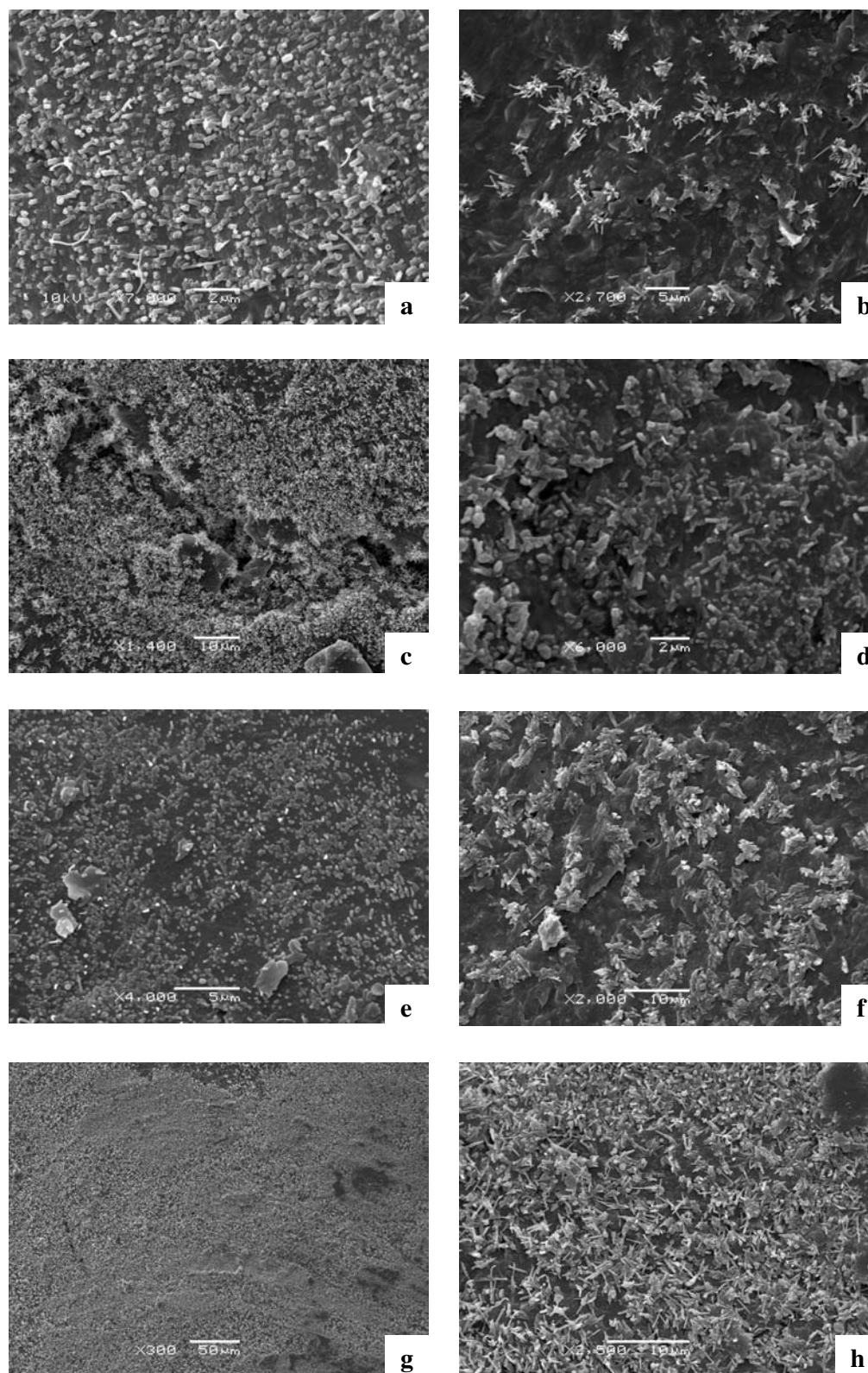


Figura 3.9. Efeitos do calor na cutícula de maçãs cv. Fuji armazenadas por duas semanas a 0° C: 30s em imersão (a), 1 min em imersão (b, c e d), 2 min em imersão (e e f), 30s aspersão (g e h). Porto Alegre – RS, 2006.

### 3.4 CONCLUSÕES

Durante o período de armazenagem a camada cuticular de maçãs se modifica, as rachaduras presentes nesta camada aumentam em largura, sendo esta uma característica importante na pós-colheita de frutos uma vez que as rachaduras propiciam maior perda de água e podem se tornar sítios de penetração de patógenos.

O calor atua fundindo parcial ou totalmente cristalóides da camada cerosa da cutícula, alterando seu formato e causando agrupamento dos mesmos. Além disso, esta fusão forma um padrão de recobrimento mais homogêneo na superfície das maçãs em alguns locais.

O calor ocasionou a oclusão de fraturas pela fusão das ceras epicuticulares mostrando que este é um dos prováveis efeitos do tratamento térmico sobre os frutos, o qual pode estar atuando como uma barreira física para evitar a entrada de patógenos nas maçãs.

## CAPÍTULO IV

### Efeito da escovação na cutícula de maçãs

#### 4.1 INTRODUÇÃO

A cutícula forma uma camada contínua protetora na superfície aérea de todas as plantas terrestres. Esta membrana fina, hidrofóbica e flexível está composta por uma matriz polimérica, a cutina, e associada a lipídeos solvente-solúveis, as ceras cuticulares (Vogg *et al.*, 2004). A cutina é um polímero polar de ligação cruzada, com grande peso molecular, formado por hidroxí-ácidos alifáticos com comprimento de cadeia de 16C e 18C. As ceras são polímeros extremamente heterogêneos que resultam de interação de ácidos graxos de cadeia muito longa (até 34 carbonos) distribuídas em duas classes distintas: as ceras epicuticulares, na superfície da cutícula e as ceras intracuticulares, que ocorrem como partículas dentro da matriz de cutina. Enquanto as ceras intracuticulares estão embebidas na matriz de cutina, as ceras epicuticulares se movem até a superfície (Neinhus, 2001), onde freqüentemente formam estruturas tridimensionais complexas ou cristalóides de ceras.

A principal função da cutícula e das ceras intracuticulares é funcionar como barreira à perda de água (Schönherr 1976, 1982; Schönherr *et al.*, 1984; Riederer and Schreiber 1995; Schreiber *et al.*, 1996), enquanto as ceras epicuticulares servem para reflexão da luz (Barnes & Cadoso-Vilhena, 1996) e impermeabilização (Holloway 1969, 1971).

A cutícula, presente no epicarpo da maçã, a protege contra estresses do meio ambiente tais como vento, temperatura, químicos e seca, não apenas quando o fruto está ainda ligado a planta mãe, mas também após a colheita durante o período de estocagem. Sem as ceras da cutícula, as maçãs estão propensas a infecções por microorganismos, dano físico e, principalmente, perda de umidade (Jenks *et al.*, 1994; 1995).

A maçã pode apresentar variações na forma, no tamanho e na coloração dos frutos. Desta forma, é necessária uma uniformização do produto, a fim de melhorar sua aparência e facilitar o processo de distribuição e comercialização, desde o produtor até o consumidor. A classificação dos frutos surge no momento em que se faz necessário o uso de uma só linguagem por todos os elos da cadeia de produção.

A classificação é realizada em instalações com auxílio de máquinas que coletam as maçãs imersas em tanques de água e as conduzem por meio de esteiras a diferentes calhas, sob o controle de programas computadorizados, separando-as por peso, em diferentes calibres. Neste processo, as maçãs que apresentam danos ou defeitos são retiradas manualmente (Girardi *et al.*, 2004). As máquinas classificadoras geralmente são providas de escovas que auxiliam na remoção de sujidades provenientes do campo além de favorecerem o brilho do fruto.

Apesar dos vários estudos já existentes sobre a cutícula em maçãs, (Faust & Shear, 1972; Belding *et al.*, 1998; Schirra *et al.*, 2000; Ferguson *et al.*, 2000) não há relatos de pesquisa em relação ao efeito das escovas das máquinas de classificação de frutos na alteração desta camada.

Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos da escovação em máquina classificadora na superfície da cutícula em frutos de maçãs, sob técnicas de microscopia eletrônica de varredura.

## **4.2 MATERIAL E MÉTODOS**

Foram realizados três experimentos utilizando o protótipo de parte de uma máquina classificadora no laboratório de pós-colheita da UFRGS. Os frutos provenientes da empresa produtora e embaladora de maçãs Mercochem foram utilizados e, além destes, foram analisadas amostras de maçãs que passaram por máquinas classificadoras da central de embalagem desta mesma empresa. Os experimentos 1 e 2 consistiram de aplicação de 30 segundos de escovação nas cultivares Gala e Fuji com uso de dois tipos de escovas com cerdas diferentes: uma mais suave, constituída de 100% de crina de cavalo, e outra mais pesada, contendo 70% de crina de cavalo e 30% de nylon. O experimento 3 consistiu de uma escovação mais drástica por um período de cinco minutos com ambas as escovas, com e sem a aplicação de calor a 58° C, ambos experimentos foram comparados com frutos testemunha, ou seja, frutos que não foram escovados. Os experimentos consistiram de três repetições de três frutos cada, com três amostras retiradas de cada fruto, para sua análise sob microscopia eletrônica de varredura (MEV). Nos experimentos conduzidos no laboratório as amostras foram retiradas logo após a aplicação do tratamento de escovação. Para os frutos beneficiados na empresa Mercochem as amostras foram retiradas no momento em que os frutos chegaram no laboratório de fisiologia pós-colheita em Porto Alegre.

### **4.2.1 Preparação das amostras**

#### **4.2.1.1 Microscopia eletrônica de varredura**

Para as amostras visualizadas em microscopia eletrônica de varredura: segmentos de 5 mm<sup>2</sup> do epicarpo dos frutos foram retirados e aderidos com fita dupla face em uma lâmina histológica de vidro, para que permanecessem estendidos durante o processo de secagem. Em seguida, as lâminas contendo as amostras foram colocadas em uma placa de Petri com sílica gel para secagem, segundo metodologia descrita por Castro *et al.* (2002)

As placas foram mantidas em um dessecador contendo sílica, durante um período mínimo de uma semana. Posteriormente, segmentos de 1 mm<sup>2</sup> foram retirados com auxílio de bisturi e microscópio estereoscópico, e colados com cola prata em suportes de alumínio (*stubs*), recobertos com uma camada de 15 nm de ouro, em metalizador Blazers (*sputtering system*) e visualizados em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6060, sob 10kV.

### **4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Foram observadas, através de microscopia eletrônica de varredura, alterações na camada mais externa da cutícula de maçãs de ambas as cultivares estudadas em função da escovação tanto nos estudos realizados no protótipo em laboratório como nas amostras trazidas da empresa embaladora. As principais alterações nas cultivares estudadas serão detalhadas a seguir.

#### **4.3.1 Alterações nos cristalóides de ceras**

##### **4.3.1.1 'Gala'**

As alterações visualizadas nos cristalóides da cultivar Gala mostram que os mesmos apresentam-se “arrastados” em uma direção e sentido (Figura 4.1b, seta). Uma segunda alteração ocorreu no formato dos cristalóides em relação ao formato original (Figuras 4.1a e 4.1b). As imagens não permitem concluir se realmente existem diferenças nos efeitos causados entre o uso dos dois tipos de cerdas nas escovas testadas. Além disso, pode ter ocorrido alguma remoção destes cristalóides ou de parte deles pelas cerdas durante o processo de escovação.

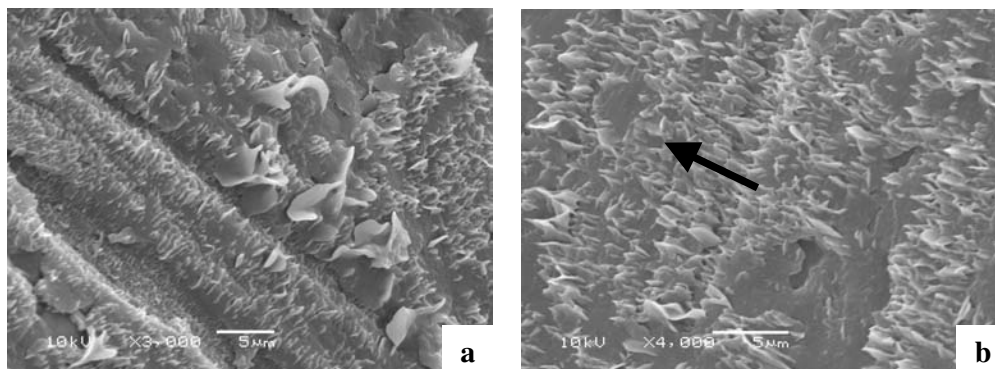
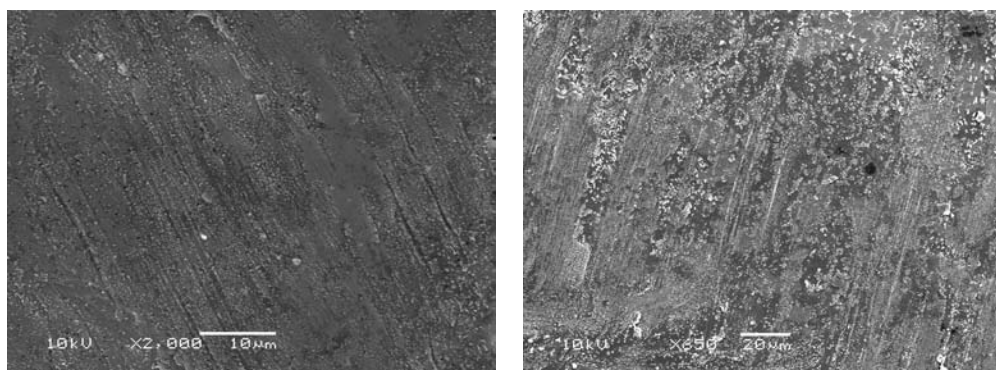


Figura 4.1. Alteração nos cristalóides de cera da cutícula de cv.Gala em função da escovação por 30 segundos. Escova pesada (a); escova suave (b). A seta indica o sentido do arraste dos cristalóides. Porto Alegre – RS, 2006.

#### 4.3.1.2 'Fuji'

Nas maçãs da cultivar Fuji ocorreu um efeito similar de arraste visualizado nas maçãs da cultivar Gala (Figuras 4.2 e 4.3).



Figuras 4.2. Efeito da escovação por 30 segundos sobre a superfície cuticular de maçãs cultivar Fuji, com uso de escova de cerdas suaves (100% de crina de cavalo). Porto Alegre – RS, 2006.

Também ocorreu remoção total ou parcial de cristalóides em algumas regiões (Figura 4.4) e desordenamento e modificação da estrutura original dos cristalóides de cera (Figura 4.3c). Além disso, em locais da superfície com a presença de cristalóides, foram visualizadas fendas sem a presença dos mesmos (Figura 4.5) indicando possível remoção de cristalóides e parte da camada de ceras intracuticulares pelo efeito da escovação. Outra



observação de alteração da estrutura dos cristalóides pode ser observada na Figura 4.6, onde ocorrem pedaços de cristalóides remanescentes ao processo de escovação.

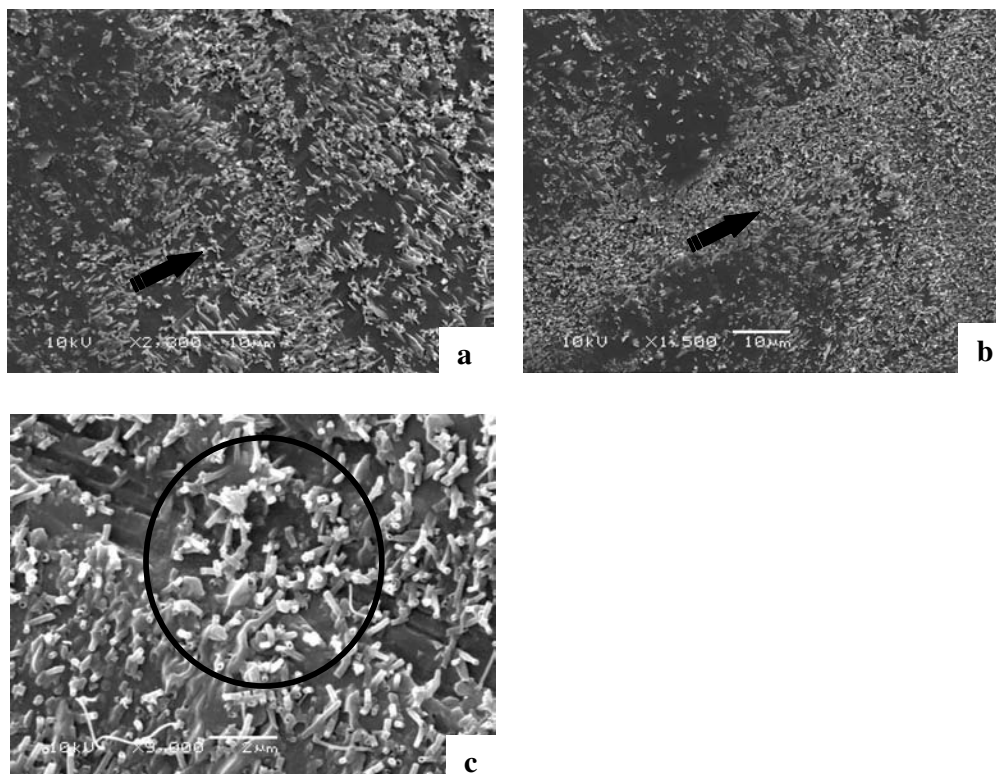


Figura 4.3. Arraste, desordenamento (a e b) e detalhe da modificação da estrutura dos cristalóides (c) de cera na cutícula de maçãs cv. Fuji em função da escovação com cerdas suaves. A seta (a e b) indica o sentido do arraste de cristalóides, o círculo (c) evidencia local de maior modificação na estrutura dos mesmos. Porto Alegre – RS, 2006.

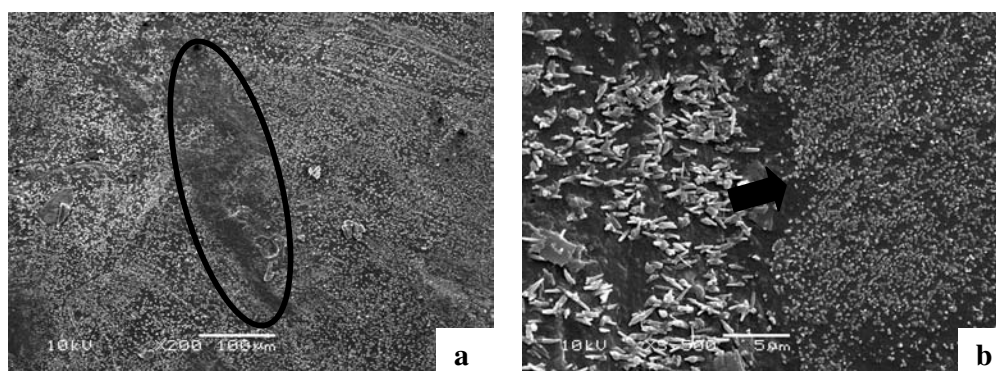


Figura 4.4. Remoção dos cristalóides de cera com uso de escovas de cerdas duras em cv. Fuji. A área delimitada (a) e a seta (b) indicam locais de remoção. A imagem à direita (b) mostra detalhe da imagem à esquerda (a). Porto Alegre – RS, 2006.

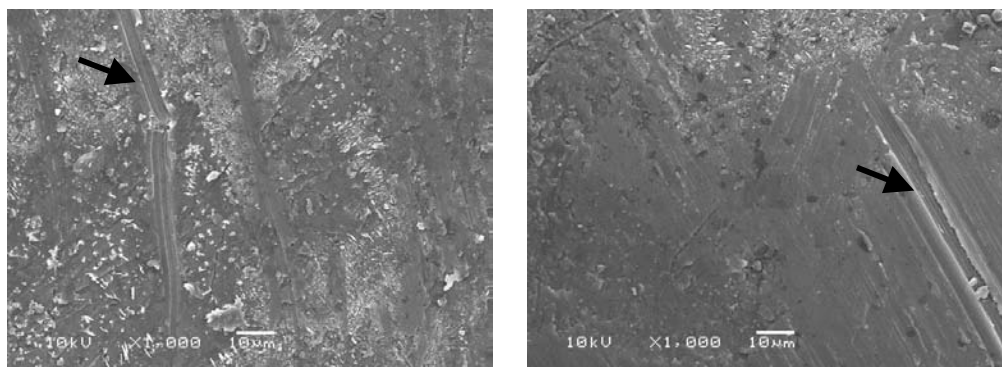


Figura 4.5. Remoção de cristalóides e formação de fissuras na camada de ceras intracuticulares na superfície externa de maçã cv. Fuji com uso de cerdas mais duras por 60 segundos. Porto Alegre – RS, 2006.

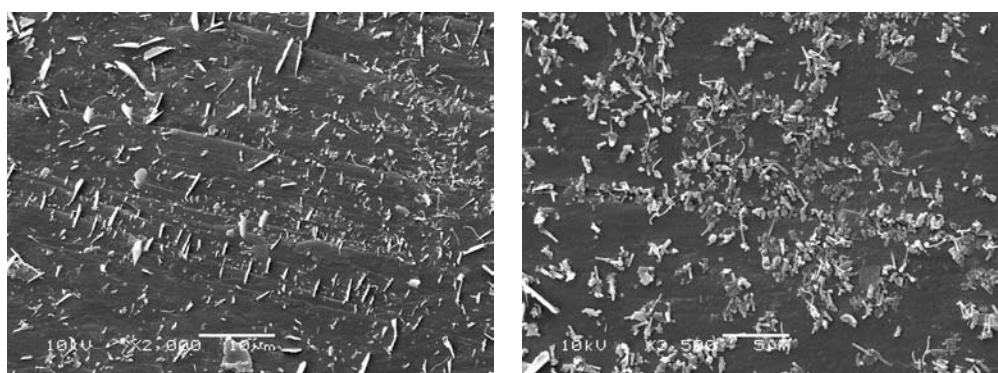


Figura 4.6. Arraste com remoção parcial de cristalóides em função do uso de escovas com cerdas duras por 30 segundos em cv. Fuji. Porto Alegre – RS, 2006.

### 4.3.2 Formação de fendas na superfície cuticular de maçãs

#### 4.3.2.1 'Gala'

Foram visualizadas fissuras diferentes daquelas encontradas no epicarpo de maçãs não escovadas (Figura 4.7). As fendas encontradas em maçãs não escovadas formavam uma “rede interconectada”, com forma similar a hexágonos (Figura 2.1 a) que, ao abrirem-se, muitas vezes mostravam as camadas de ceras e cristalóides. As fendas visualizadas neste caso ocorrem em linha reta (Figura 4.7) com uma direção bem definida, ora cruzando-se (Figura 4.7 c e e), como se as escovas tivessem passado em mais de uma direção. Algumas fissuras apresentam cristalóides em seu interior (Figura 4.7 b), mas essa característica foi mais evidente na 'Fuji'. Estas fissuras, em linha reta, que apareceram com frequência na camada cerosa da cutícula dos frutos escovados por vezes também

apareceram nos frutos não escovados, provavelmente por algum dano mecânico ocorrido com o fruto no campo, durante o processo de colheita e/ou transporte do mesmo, modificando a superfície ocasionando efeitos similares ao da escovação, em menor proporção.

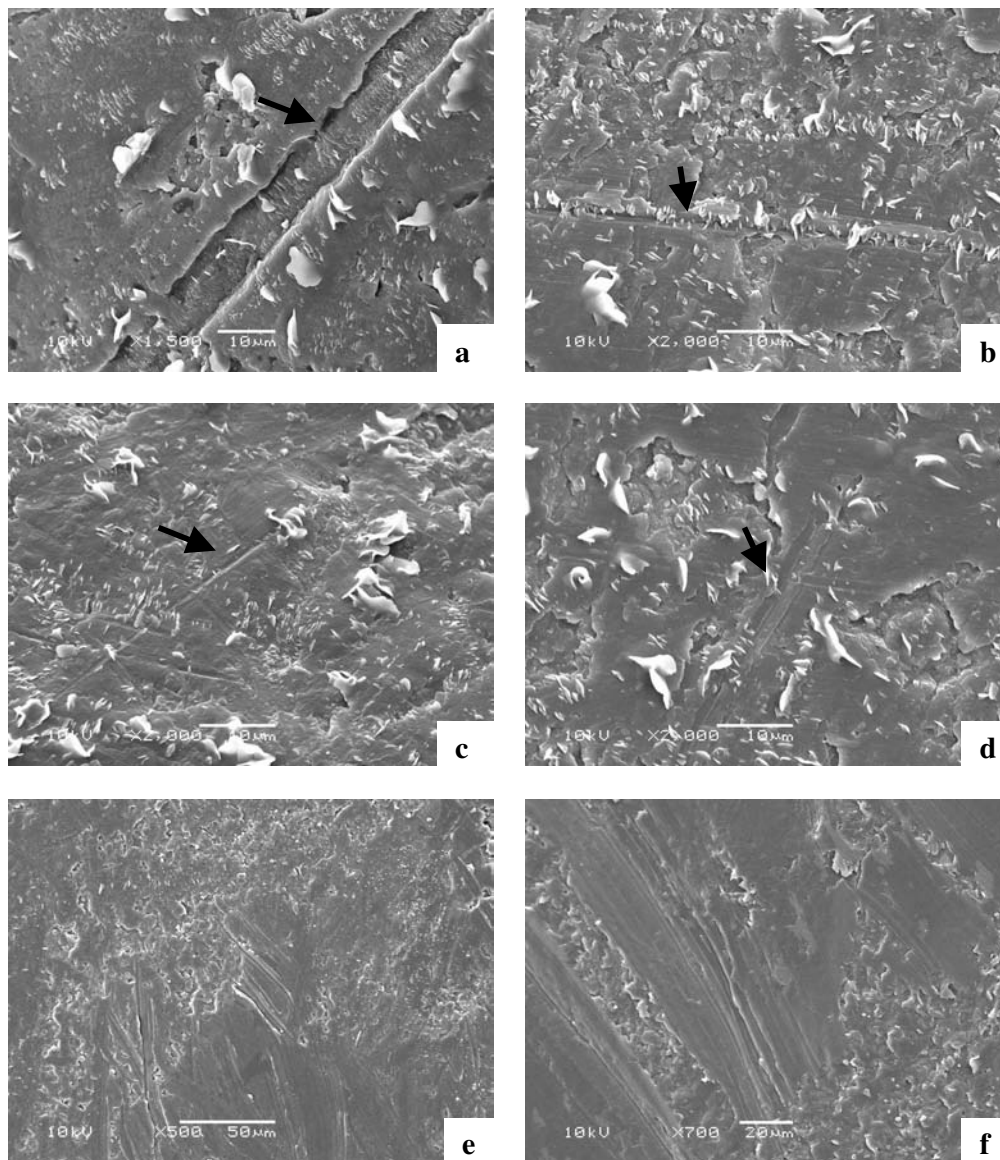


Figura 4.7. Fissuras no epicarpo de maçãs cv. Gala resultante da escovação: escova suave (a e b); escova dura (c, d, e e f). Porto Alegre – RS, 2006.

#### 4.3.2.2 'Fuji'

Fendas orientadas em linha reta, similares as encontradas em 'Gala', ocorrem também na 'Fuji' (Figuras 4.8 e 4.9) ambas com direção bem definida e, às vezes, cruzando-se (Figura 4.8). Não foi possível identificar diferenças em função do uso dos dois tipos de escova testados.

Fendas com cristalóides intactos em seu interior também ocorreram (Figura 4.9). Estas fendas podem não ser provenientes do processo de escovação, mas podem ter sido formadas mais cedo (no campo, por exemplo), o que leva a crer que o fruto pode ter sintetizado mais cristalóides de ceras para repor o local da remoção. Por outro lado, se a remoção ocorreu em função da escovação, pode ter ocorrido re-síntese de alguns compostos cerosos no mesmo local, como já comprovado por alguns pesquisadores para remoção dos mesmos pelo calor (Roy *et al.*, 1994; Baker, 1974). Segundo Roy *et al.* (1994), o tratamento térmico pode ter estimulado um aumento na síntese de ceras para preencher fissuras, lenticelas ou ambos. Assim, a remoção pelas cerdas durante a escovação poderia ter ocasionado um efeito de estimular a síntese similar ao do calor.

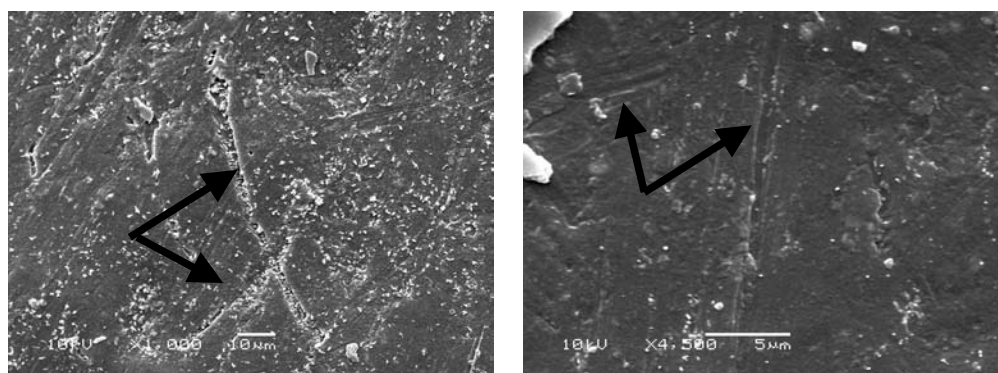


Figura 4.8. Fendas na superfície cuticular de cv. Fuji ocasionadas pela escovação com uso de cerdas duras com e sem a presença de cristalóides em seu interior. As setas indicam o local das fendas. Porto Alegre – RS, 2006.

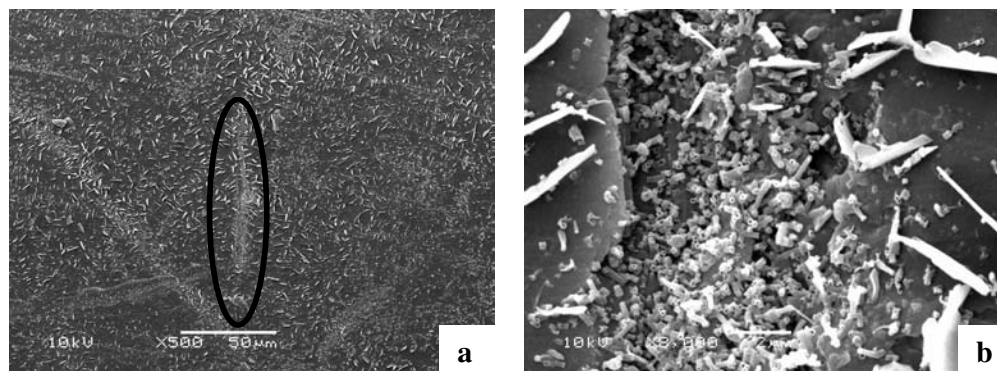


Figura 4.9. Fendas encontradas na superfície cuticular de frutos de maçã cv. Fuji escovados com cerdas duras com a presença de cristalóides em seu interior. Figura b mostra detalhe da área delimitada na figura a. Porto Alegre – RS, 2006.

#### 4.3.3 Outros efeitos da escovação na superfície cuticular

Oster (2004), estudando o tratamento com calor no controle de podridão branca em maçãs Fuji, também testou o efeito das escovas da máquina classificadora na remoção física do inóculo. Segundo a autora, a escovação tem se mostrado efetiva na redução da porcentagem de frutos infectados. A redução na porcentagem de podridão branca encontrada em seus experimentos poderia estar relacionada à eliminação física do inóculo da superfície das maçãs pelas cerdas das escovas.

Os experimentos conduzidos não permitiram concluir com precisão se a escovação é eficaz na remoção de microorganismos na superfície cuticular porque os frutos quase não apresentavam inóculo inicial na instalação do experimento. Em poucas amostras, verificamos a presença de hifas de fungos. Mesmo assim, observou-se a presença de hifas em frutos escovados (Figura 4.10), o que poderia sugerir que a escovação usada de forma isolada não é suficiente para remover toda fonte de inóculo presente nos frutos. No entanto, é difícil afirmar com certeza que tal fato ocorreu uma vez que os frutos testemunha não apresentaram muita fonte de inóculo inicialmente. Neste sentido, o efeito de remoção de inóculo do campo deveria ser testado em frutos com bastante presença de inóculo inicial.

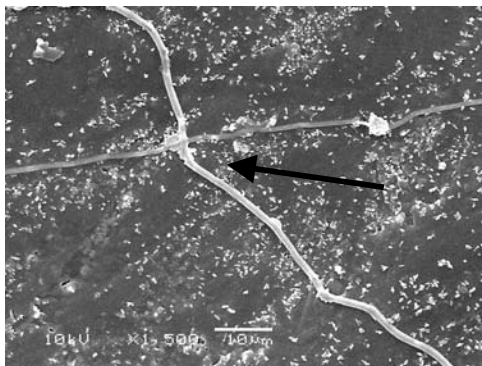


Figura 4.10. Presença de hifa de fungo, indicada pela seta, na superfície de maçã cv. Fuji submetida à escovação. Porto Alegre – RS, 2006.

De acordo com Oster, citando Fallik (2001), as escovas ocasionariam a oclusão de fraturas e microferimentos na superfície da epiderme dos frutos, dificultando a penetração do patógeno. No presente trabalho não se visualizaram os efeitos de oclusão de fraturas pela escovação mencionados pelos autores.

#### 4.3.4 Aplicação da escovação por cinco minutos

Ao aplicarmos escovação por cinco minutos nas maçãs, os efeitos anteriormente mencionados de formação de fendas retas orientadas em uma direção e remoção parcial ou completa de cristalóides em certas regiões se tornaram mais evidentes, o que já era esperado. Portanto, pode-se visualizar com mais precisão o que a escovação ocasiona na superfície cuticular de maçãs. O arraste e a remoção de cristalóides é evidente na Figura 4.11 e a formação de fendas sem a presença de cristalóides internos na Figura 4.12.

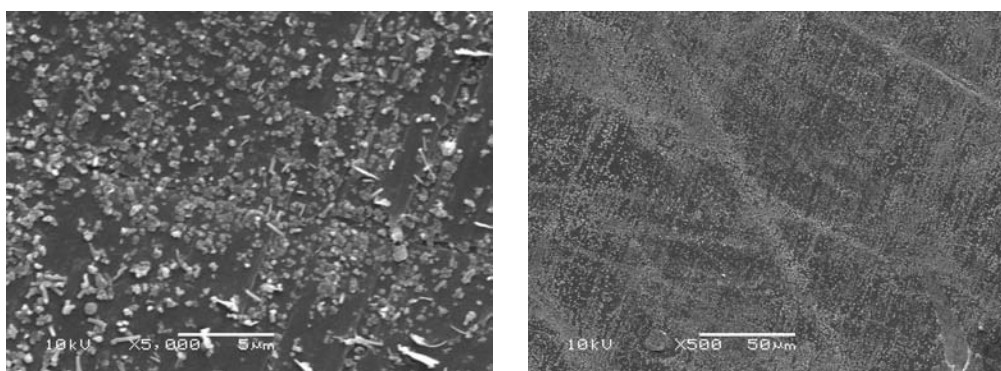


Figura 4.11. Efeito da escovação por cinco minutos no arraste e na remoção de cristalóides da superfície cuticular da cv. Fuji. Porto Alegre – RS, 2006.

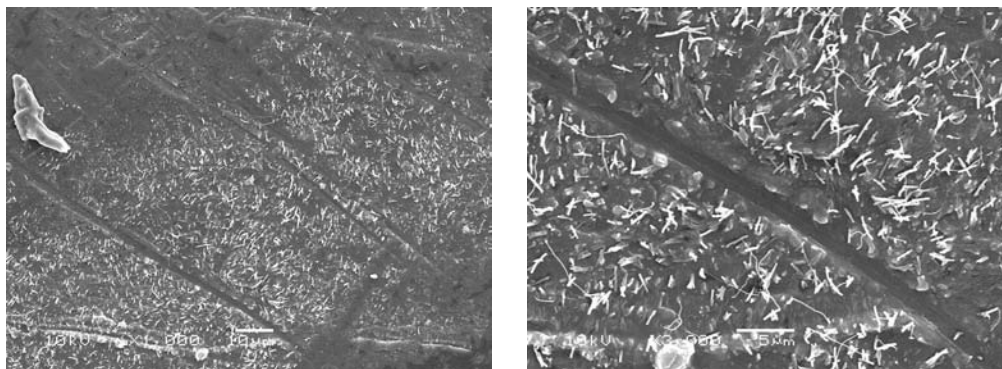


Figura 4.12. Fendas profundas na superfície cuticular de maçã cv. Fuji, efeito mecânico da escovação por cinco minutos com uso de cerdas duras. Porto Alegre – RS, 2006.

#### 4.3.5 Máquina classificadora da empresa Mercochem

As amostras coletadas das maçãs previamente beneficiadas e classificadas pela empresa Mercochem (Figura 4.13) mostraram um padrão similar àquelas que foram tratadas no protótipo de máquina classificadora do Laboratório de Pós-colheita da Faculdade de Agronomia da UFRGS (Figura 4.14).



Figura 4.13. Escovação em máquina classificadora da empresa produtora e embaladora de maçãs Mercochem. Caxias do Sul, (Abril de 2006).



Figura 4.14. Protótipo de máquina classificadora com aspersores para o tratamento térmico e escovas de cerdas suaves e duras. Porto Alegre, Faculdade de Agronomia, UFRGS.

Na cultivar Fuji foi possível evidenciar os fenômenos de arraste e remoção parcial de cristalóides (Figura 4.15) e formação das fendas provavelmente oriundas da escovação ora com a presença de cristalóides no seu interior (Figura 4.16), ora sem a presença dos mesmos (Figura 4.17).

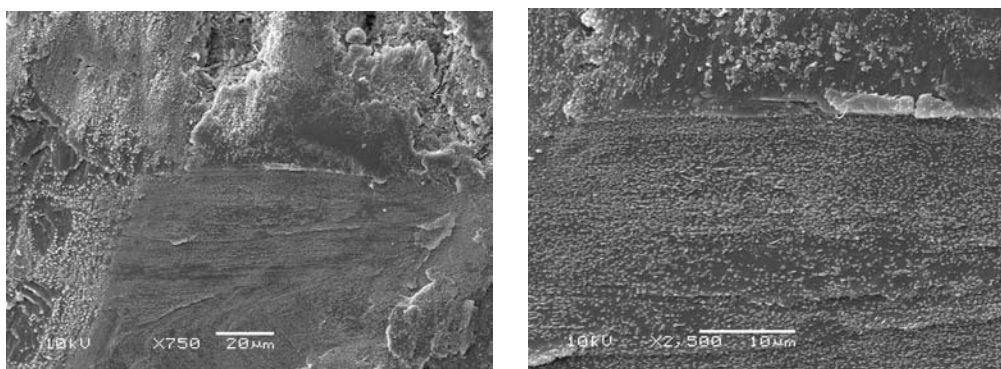


Figura 4.15. Arraste e remoção parcial de cristalóides de ceras da cutícula de maçã cv. Fuji passada pela máquina classificadora da empresa Mercochem. Porto Alegre – RS, 2006.

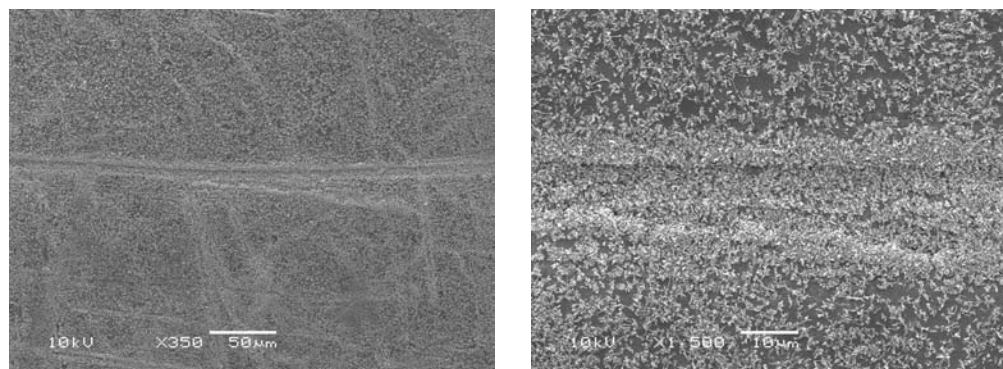


Figura 4.16. Fendas repletas de cristalóides na cutícula de maçãs cv. Fuji oriundas da escovação em máquina classificadora da Empresa Mercochem. A imagem à direita mostra detalhe da imagem à esquerda. Porto Alegre – RS, 2006.



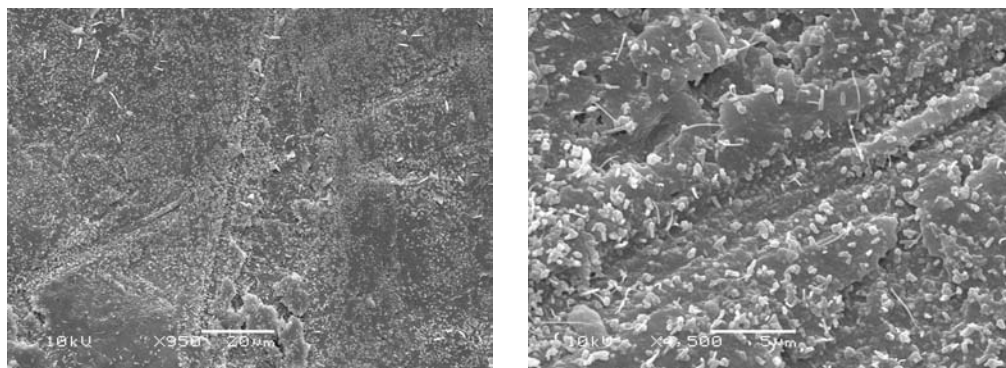


Figura 4.17. Fendas na cutícula de maçãs cv. Fuji oriundas da escovação em máquina classificadora da Empresa Mercochem. Porto Alegre – RS, 2006.

Na cultivar Gala, também se observou o fenômeno de arraste em função da escovação (Figura 4.18). No entanto, esta não apresentou o arraste de cristalóides de ceras nem sua remoção, provavelmente porque esta cultivar não apresenta tanta riqueza de cristalóides de cera em sua superfície como a cv. Fuji.

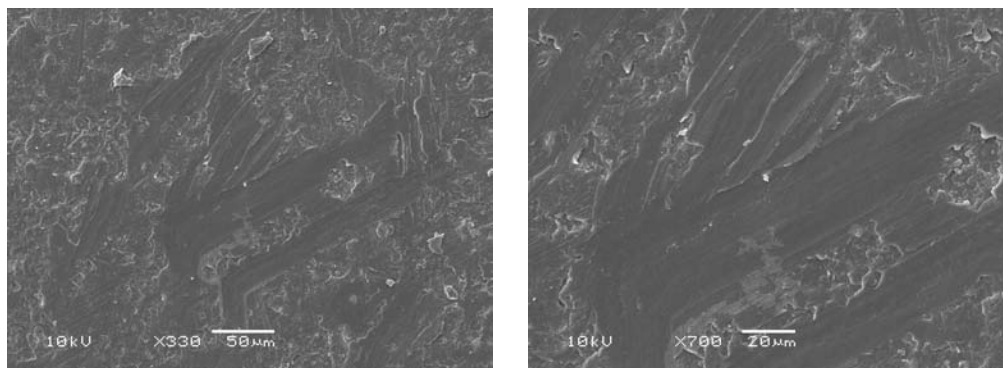


Figura 4.18. Arraste de ceras da cutícula de maçã cv. Gala passada pela máquina classificadora da empresa Mercochem. Porto Alegre – RS, 2006.

#### **4.4 CONCLUSÕES**

A escovação dos frutos provoca alterações na camada cuticular, arrastando, modificando a estrutura e removendo cristalóides da camada de ceras epicuticulares, formando fendas na superfície.

Não houve diferença de efeitos na superfície de ceras cuticulares de maçãs em função das escovas de cerdas suaves (100% de crina de cavalo) e das escovas de cerdas duras (30% de nylon e 70% de crina de cavalo) testadas.

A máquina classificadora utilizada para classificação na empresa Mercochem tem efeitos de remoção de cristalóides, arraste de ceras e formação de fissuras similares aos evidenciados nos experimentos com o protótipo em laboratório, porém mais pronunciados que aqueles encontrados nestes experimentos.

## CAPÍTULO V

### **Efeitos do calor no controle de podridão e na qualidade de tangerinas cv. Montenegrina (*Citrus deliciosa* Tenore) e alterações na superfície cuticular das tangerinas em função do tratamento térmico, escovação e aplicação de cera de carnaúba.**

#### **5.1 INTRODUÇÃO**

O Brasil é o maior produtor mundial de citros com mais de 19 milhões de toneladas produzidas em 2004 (FAO, 2005). Deste volume, mais de 80% dos frutos cítricos são produzidos no Estado de São Paulo, principalmente para a produção de suco concentrado (IBGE, 2005). O RS é o segundo maior produtor de tangerinas no país (IBGE 2003), com destaque para o Vale do rio Caí, onde a área plantada vem aumentando. No que se refere a frutos de mesa, o Estado se destaca ocupando a maior parte da produção já que as condições de clima e solo permitem a colheita de frutos de excelente qualidade.

Entre as tangerineiras destacam-se as cultivares: Montenegrina, Caí, Ponkan, Pareci, Satsuma Okitsu e Murcott (João, 2004), sendo que a cv. Montenegrina representa 30% da área plantada de tangerineiras, a mais expressiva dentre as tangerineiras (Fepagro, 2005).

A tangerineira ‘Montenegrina’ é uma cultivar de produção tardia, fácil de descascar e com boa conservação pós-colheita. A polpa é firme o que confere resistência ao transporte, maior tempo de conservação pós-colheita, bom sabor, aroma característico e

número reduzido de sementes, quando comparada com a tangerina 'Caí' (Schwarz, 1989; Rodrigues *et al.*, 1998).

As principais doenças de pós-colheita que ocorrem em citros são as podridões causadas por *Penicillium digitatum* Sacc (mofo verde) e *P. italicum* Wehmer (mofo azul). Estes patógenos ocorrem em quase todas regiões do mundo onde os citros são cultivados e causam sérias perdas de pós-colheita (Korsten *et al.*, 2000; Palou *et al.*, 2001). Além disso, injúrias ocorrentes nos citros durante a colheita facilitam a entrada deste patógeno (Obagwu, 2003).

Métodos alternativos de controle de podridão em pós-colheita vêm ganhando cada vez mais espaço a partir de uma crescente preocupação por parte do consumidor em adquirir alimentos saudáveis e sem a presença de resíduos químicos. Além disso, o uso de químicos sintéticos tem levado à proliferação de raças resistentes de patógenos (Archbald e Winter, 1990; Eckert, 1990).

Os métodos alternativos de controle de podridão, principalmente o controle biológico, são menos efetivos que muitos fungicidas comerciais em uso (Obagwu, 2003). Nesse sentido, é necessário utilizar um método integrado ao invés de um método isolado de controle (Pusey, 1994). Várias alternativas de controle já foram propostas: o uso de antagonistas (*Bacillus* spp.), aplicação de sais de carbonato e tratamentos físicos, além do uso combinado destes métodos.

Palou *et al.*(2001) obtiveram redução de até 90% na incidência dos mofos verde e azul depois de tratar frutas inoculadas artificialmente com diferentes concentrações de bicarbonato de sódio. Experimentos com uso de bicarbonato reduziram a incidência destes mofos em até 60% aos 40 dias de armazenamento de laranjas da cultivar Valência quando este produto era aplicado aliado ao calor de 58° C por 30s (Scherrer-Montero *et al.*, 2006).

Os benefícios do controle de podridão causada por *Penicillium* com uso de água quente em citros tem sido mencionado por vários pesquisadores (Porat *et al.*, 2000; Auret, 2001; Palou *et al.*, 2001). Porat *et al.* (2000) observaram o efeito do calor na inibição da germinação de esporos e subsequente crescimento de *P. digitatum*. Mas o calor também é conhecido por ter efeitos na superfície dos frutos, tais como derretimento das ceras cuticulares e recobrimento de rachaduras naturais obstruindo possíveis portas de entrada para o patógeno e atuando como uma barreira física contra infecção (Eckert e Eaks, 1988).

Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficácia de métodos físicos como o tratamento térmico e a aplicação de cera de carnaúba, aliados a outros métodos alternativos de controle, como desinfestantes na incidência de podridão e na qualidade de tangerinas cv. Montenegrina. Foi objetivo também avaliar o efeito do calor, da escovação e da aplicação de cera de carnaúba na superfície cuticular de tangerinas 'Montenegrina'.

## **5.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.2.1 Material experimental**

Os frutos de tangerineiras (*Citrus deliciosa* Tenore) cultivar Montenegrina foram colhidos na Estação Experimental Agronômica (E.E.A.) da UFRGS no dia 05/09/2006 e levados para o laboratório de Pós-colheita da Faculdade de Agronomia. Os frutos foram selecionados para ausência de defeitos e o pedúnculo foi cortado com uma tesoura. Em seguida os frutos foram separados em suas unidades experimentais.

Foram separados 15 frutos para análises iniciais de sólidos solúveis totais e acidez titulável. As tangerinas, no momento da colheita apresentaram que resultaram em 13,25° Brix, e 14,8 meq ácido/100 mL de suco. O peso médio das tangerinas foi 83,44g ± 4,5g.

O experimento consistiu de quatro repetições com 25 frutos cada: T1- testemunha – tangerinas não receberam tratamento algum; T2- aplicação de água quente por aspersão a 60° C por 30s aliado à escovação em máquina classificadora; T3- imersão em solução de dióxido de cloro (Tecsacor® - 5% de i.a.) a 25° C por 3 minutos, na concentração de 2mL p.c./L; T4- imersão em solução de fungicida imazalil (Magnate®) a 25° C por 1 minuto, na concentração de 10mL p.c./L; T5- aplicação de cera de carnaúba (Citrosol BR® 18%); T6- imersão em solução de bicarbonato de sódio (p.a. Labsyth) a 25° C por 30s na concentração de 3%; T7- T2+T5; T8- calor aplicado por imersão a temperatura de 58° C por 30s; T9- T6+T5; T10- T3+T5; T11- T4+T5; T12- T4+T8; T13- T6+T8; T14- T3+T8; T15- T8+T5; T16- T6+ T8+ T5; T17- T3+T8+T5; T18- T4+T8+T5.

### **5.2.2 Aplicação do calor**

O calor foi aplicado por imersão ou aspersão. No primeiro caso, a aplicação foi realizada com auxílio de um equipamento de banho-maria, onde os frutos foram imersos por 30 segundos em água previamente aquecida a 58° C. Já o calor aplicado por aspersão foi realizado com auxílio de um protótipo de parte de uma máquina classificadora construído na Faculdade de Agronomia da UFRGS (Figura 4.14). Os frutos foram submetidos à aspersão e escovados por 30 segundos.

### **5.2.3 Aplicação de cera**

A cera a base de carnaúba (Citrosol BR® 18%) foi aplicada aos frutos com auxílio de uma esponja doméstica comum, utilizando a parte não abrasiva da mesma. A cera foi colocada sob a esponja e espalhada em toda a superfície das tangerinas. O tratamento que consistia da aplicação de ceras apenas, os frutos foram lavados com detergente especial para frutas de modo que a cera não fosse aplicada sobre os frutos sujos. Nos demais tratamentos que sofreram tratamento de imersão em algum produto o procedimento de

lavagem não foi realizado. Em seguida os frutos foram colocados para secar a temperatura ambiente e, depois de secos transferidos para unidade de armazenagem.

#### **5.2.4 Aplicação dos demais produtos**

O dióxido de cloro, o bicarbonato de sódio e o fungicida imazalil foram adicionados à água em banho-maria com controle de temperatura onde os frutos foram submergidos nos períodos de tempo pré-determinados. Quando os tratamentos aplicados estavam aliados ao uso de calor, somente quando a temperatura do banho-maria atingia a temperatura desejada, colocava-se o produto em questão e a aplicação era realizada simultaneamente.

#### **5.2.5 Análises após a armazenagem**

Após 20 dias de armazenamento a  $5^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$  mais sete dias de simulação de vida de prateleira as amostras foram analisadas para: sólidos solúveis totais, acidez total titulável, cor de cobertura, perda de peso, número de frutos com podridão e avaliação da superfície cuticular por microscópio eletrônico de varredura.

Os sólidos solúveis totais foram determinados com auxílio de um refratômetro de mesa a partir de uma amostra de suco de 10 tangerinas.

Para acidez titulável foi coletada uma amostra de suco de 10 mL de 10 tangerinas que foi diluída em 90 mL de água destilada. Esta solução foi titulada com uma solução de NaOH a 0,1N até atingir pH 8,1.

A cor foi avaliada com uso de um colorímetro da marca Minolta, modelo CR400, em dois lados equatoriais opostos de todos os frutos em cada repetição. O índice de cor (IC) foi calculado a partir da fórmula:  $IC = 1000 \times a^* / L \times b^*$  (Mazzuz, 1996), onde L = luminosidade,  $a^*$  = variação entre cor verde e vermelha e  $b^*$  = variação entre a cor azul e amarela. O IC varia de -20 a +20, quanto mais negativo mais verde e quanto mais positivo mais alaranjado o fruto.

A perda de peso foi calculada a partir da diferença de peso medida na instalação do experimento e no final do período de armazenagem e simulação de vida de prateleira.

A avaliação da incidência de podridão foi realizada contando o número de frutos que apresentaram sinais de podridão e os valores foram apresentados em número de frutos com podridão em relação ao número de tangerinas sadias em cada amostra.

A análise estatística realizada foi um fatorial de 4 x 2 x 2 (4 produtos associados ou não ao uso de calor e aplicação ou não de cera de carnaúba). A comparação das médias pelo teste de Duncan a 5% de significância.

### **5.2.6 Avaliação da superfície cuticular**

A avaliação da superfície cuticular foi realizada a partir de amostras retiradas de região equatorial do epicarpo dos frutos para visualização em microscopia eletrônica de varredura. Segmentos de cinco mm<sup>2</sup> da epiderme dos frutos foram retirados e aderidos com fita dupla face em uma lâmina histológica de vidro, de modo a permanecerem estendidos durante o processo de secagem. Em seguida, as lâminas foram colocadas em uma placa de Petri contendo sílica gel para secagem, segundo metodologia descrita por Castro et al. (2002). As placas foram mantidas em um dessecador contendo sílica, durante um período mínimo de uma semana. Posteriormente, um segmento de um mm<sup>2</sup> foi retirado com auxílio de bisturi e sob visualização em microscópio estereoscópico. As amostras foram coladas em suportes (stubs) de alumínio, com o uso de cola prata, recobertas com uma camada de 15 nm de ouro, em metalizador Balzer e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6060, sob 10kV.



## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.3.1 Eficácia do tratamento térmico no controle de podridão

O tratamento térmico utilizado neste experimento atuou reduzindo significativamente o número de frutos com podridão (Tabela 1), onde se observa uma redução na ordem de 33% em média variando de 27% na testemunha até 45% com o uso do fungicida. Salientando que o calor atuou em todos os produtos testados de forma a aumentar a eficácia destes tratamentos.

Tabela 1. Número de tangerinas cv. Montenegrina com podridão de um total de 25 frutos após 20 dias de armazenamento refrigerado a 5° C mais sete dias a temperatura ambiente. Porto Alegre – RS, 2006.

Tratamentos	Testemunha	Dióxido de cloro	Bicarbonato de sódio	Imazalil	Médias
Com calor	8,9	7,1	6,5	2,3	6,18 b <sup>1</sup>
Sem calor	12,3	11,5	9,5	4,1	9,34 a
Com ceras	12,0	9,6	9,0	4,0	8,65 a
Sem ceras	9,1	9,0	7,0	2,4	6,87 b
Médias	10,56 A	9,31 AB	8,00 B	3,18 C	
c.v.(%)=33,57					

<sup>1</sup> Tratamentos com médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Duncan a 5%.

Riederer and Schreiber, (1995) concluíram que ocorre uma melhor difusão do fungicida através da cutícula, essencial para absorção do ingrediente ativo, quando o fungicida está associado ao calor. E durante este processo a cutícula age como uma barreira à difusão, mas a medida em que a temperatura aumenta, também aumenta a difusão e a absorção do fungicida (Cabras, 1999). Além disso, algo similar poderia estar ocorrendo em relação aos outros dois produtos testados, uma vez que o calor aumentou a eficácia de todos os tratamentos. Poder-se-á atribuir parte do efeito do calor a uma melhor absorção dos produtos na cutícula das tangerinas e maior efeito residual dos mesmos, apesar do calor apresentar outros efeitos que serão discutidos em seqüência.

Outro fator importante a ser considerado é a quantidade de resíduos de agroquímicos que permanecem nos frutos, Schirra et al. (1996b) mostraram em seus trabalhos que a imersão de limão em fungicida imazalil por 3 min a 50° C resultou em quatro a cinco vezes mais resíduos de fungicida nos frutos que aqueles que foram imersos em solução fungicida à temperatura ambiente, razão pela qual a menor concentração utilizada controlou a incidência tanto quanto a maior concentração. Os autores afirmam, baseados nestes estudos, que é possível reduzir as quantidades de químicos usualmente empregados em pós-colheita convencional em temperatura ambiente sem comprometer a qualidade dos frutos e a eficácia dos tratamentos em reduzir podridão. De acordo com a literatura, o controle de podridão pós-colheita de produtos hortícolas pelo uso do calor combinado a agroquímicos tem sido testado nos últimos anos com o intuito de aumentar a efetividade do ingrediente ativo e minimizar as concentrações dos químicos em relação aos tratamentos convencionais (Schirra, 2000).

A aplicação de cera de carnaúba aumentou significativamente o número de frutos com podridão (Tabela 1). O aumento médio foi de 25,9% quando aplicou-se cera de carnaúba em cobertura. Também vale ressaltar que o aumento ocorreu em todos os tratamentos, no entanto, em menor proporção no tratamento com dióxido de cloro e maior onde foi utilizado com fungicida. De acordo com a literatura, as ceras teriam um efeito indireto na incidência de podridões em frutos após a colheita, pois podem promover uma atmosfera modificada que retarda o amadurecimento e a senescência dos frutos, reduzindo a susceptibilidade dos tecidos a infecção por patógenos (Petracek et al., 1998; Durigan, 1999; Benato, 1999; Lana & Finger, 2000). Os resultados apresentados mostraram um efeito contrário da aplicação das ceras, com aumento da susceptibilidade dos tecidos a infecção. Talvez a cera tenha atuado protegendo o patógeno e fixando-o na superfície dos frutos, foi possível observar por microscopia de varredura estruturas do patógeno fixadas

nos frutos recobertos por cera de carnaúba (Figura 5.6c). É importante ressaltar que este experimento foi conduzido em frutos de um pomar com baixo nível de manejo e alta quantidade de inóculo inicial, condição evidenciada nas imagens de microscopia de varredura, ou seja, uma situação extrema onde é difícil atingir um nível de controle aceitável. Outra hipótese é que a elevada quantidade de inóculo inicial presente nos frutos no início do experimento tenha influenciado estes resultados.

Entre os produtos testados todos reduziram o número de frutos com podridão ao final dos 27 dias de avaliação, no entanto, o dióxido de cloro foi pouco eficiente e não se diferenciou da testemunha, enquanto que o bicarbonato de sódio em média foi o melhor tratamento alternativo de controle especialmente quando aplicado com calor, neste caso aumentando a eficácia do produto em 31,6% (Tabela 1).

Efeitos sinérgicos entre o calor e produtos químicos usados em controle de podridão pós-colheita vêm sendo estudados e já foram mencionados na literatura (Barkai-Golan & Apelbaum, 1991; Lurie, 1999; Smilanick et al., 1997; Tuset et al., 1996). Tratamentos combinados são investigados com mais frequência para tentar maximizar o potencial de uso de métodos alternativos com efeitos residuais pequenos em relação aos fungicidas. Os resultados deste trabalho reforçam a idéia de que os tratamentos alternativos devem ser usados de modo a complementar um ao outro para que possam atingir um nível de controle satisfatório similar aos fungicidas.

### **5.3.2 Efeito do tratamento térmico e da cera de carnaúba na qualidade dos frutos**

Para a variável perda de peso, ocorreu interação entre o produto utilizado, a cera de carnaúba e a aplicação do calor. Nos tratamentos em que o calor não foi utilizado, o uso da cera de carnaúba atuou aumentando o percentual de perda de peso (Tabela 2) na ausência

de produtos (tratamento testemunha). Nota-se uma redução deste percentual no tratamento onde utilizou-se o dióxido de cloro. Nos demais tratamentos não houve influência do uso de cera de carnaúba no percentual de perda de peso dos frutos. Quando se utilizou calor aliado aos métodos alternativos, estes resultados não foram observados, de modo que o uso da cera não influenciou o percentual de perda de peso dos frutos.

Tabela 2. Perda de peso (%) em bergamota cv. Montenegrina aos 20 dias de armazenamento mais sete dias a temperatura ambiente. Porto Alegre – RS, 2006.

Produtos	Sem calor		Com calor	
	Sem ceras	Com ceras	Sem ceras	Com ceras
Testemunha	4,95b	6,4a	5,58a	6,15a <sup>1</sup>
Dióxido de Cl	7,78a	4,9b	6,08a	6,10a
Bicarbonato de Na	5,95a	5,38a	5,53a	5,05a
Imazalil	6,00a	4,9b	6,75a	5,87a

c.v.(%)= 14,12

<sup>1</sup> Tratamentos com médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem pelo teste de Duncan a 5%.

O efeito positivo das ceras reduzindo a perda de peso dos frutos, como o ocorrido no tratamento com dióxido de cloro, já era esperado, uma vez que o efeito das ceras de um modo geral é um efeito de barreira à perda de água e redução do murchamento dos frutos. No entanto, o efeito das ceras promovendo o aumento da perda de peso nos frutos onde não se utilizou nenhum tratamento alternativo ou fungicida não era esperado e provavelmente se explique pelo maior número de frutos podres neste tratamento (Tabela 1) se comparados aos outros tratamentos. Ou seja, onde ocorreu maior número de podridão a perda de peso média foi maior do que naqueles tratamentos onde estavam atuando os métodos de controle.

Quanto aos demais parâmetros de qualidade, não ocorreu diferença significativa entre o índice de cor (IC) e os tratamentos testados (Tabela 3).

Tabela 3. Índice de cor (IC) em bergamota cv. Montenegrina aos 20 dias de armazenamento mais sete dias a temperatura ambiente. Porto Alegre – RS, 2006.

Tratamentos	Testemunha	Dióxido de cloro	Bicarbonato de sódio	Imazalil	Médias
com calor	4,72	4,88	4,47	4,66	4,68 a <sup>1</sup>
sem calor	5,01	5,07	4,77	4,60	4,87 a
com ceras	4,75	4,87	4,50	4,63	4,68 a
sem ceras	4,98	5,08	4,74	4,63	4,87 a
médias	4,87 A	5,00 A	4,62 A	4,62 A	

c.v.(%)=11,01

<sup>1</sup> Tratamentos com médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Duncan a 5%.

A razão entre os sólidos solúveis totais e a acidez total titulável foi em média significativamente diferente para os tratamentos com e sem calor (Tabela 4), onde o calor atuou reduzindo esta razão, ou seja, o calor atuou no sentido de acelerar o processo de senescência dos frutos. Nos demais tratamentos não ocorreram variações significativas.

Tabela 4. Razão entre Sólidos solúveis totais (SST) e Acidez Total Titulável (ATT) em bergamota cv. Montenegrina aos 20 dias de armazenamento mais sete dias a temperatura ambiente. Porto Alegre – RS, 2006.

Tratamentos	Testemunha	Dióxido de cloro	Bicarbonato de sódio	Imazalil	Médias
com calor	12,91	13,07	12,99	13,19	13,04b <sup>1</sup>
sem calor	13,91	13,89	13,98	12,97	13,69a
com ceras	13,44	13,43	13,35	13,15	13,34a
sem ceras	13,38	13,53	13,62	13,02	13,39a
médias	13,41A	13,48A	13,49A	13,08A	

c.v.(%)=7,30

<sup>1</sup> Tratamentos com médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Duncan a 5%.

### 5.3.3 Avaliação da superfície cuticular dos frutos

Os frutos de tangerineira cultivar Montenegrina apresentam em sua superfície cuticular uma cobertura cerosa amorfa e homogênea (Figura 5.1), sem a presença de cristalóides de ceras. As estruturas encontradas em sua superfície são estômatos e fissuras

ou rachaduras (Figura 5.1a e c), ambos mostraram ser aberturas naturais para possível entrada de patógenos.

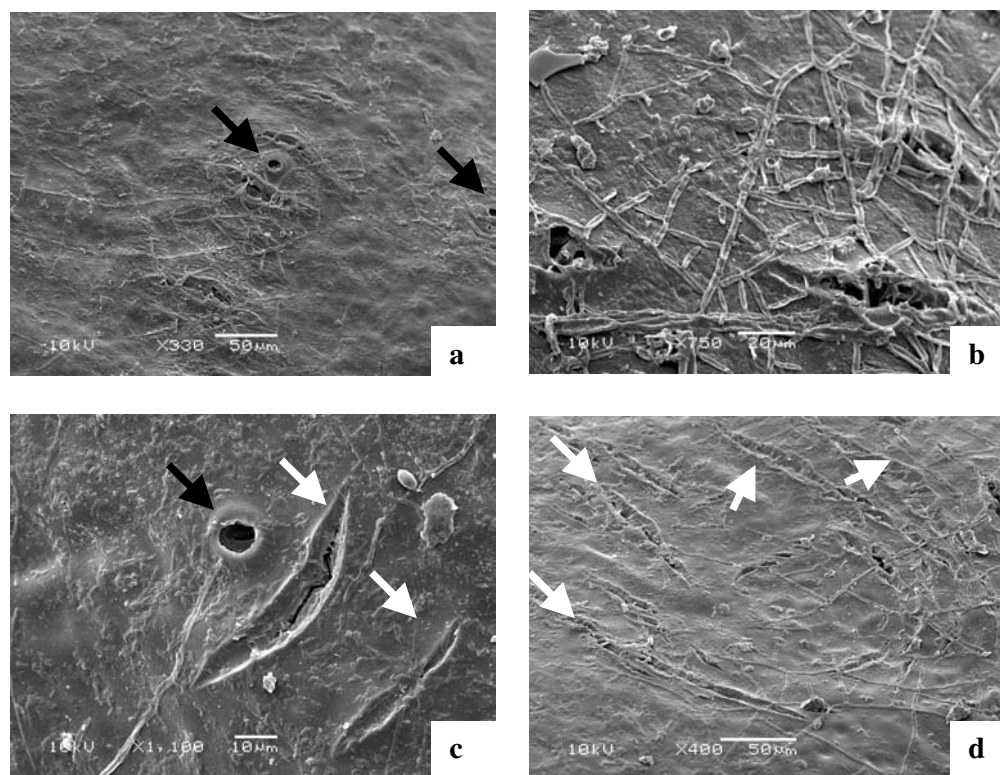


Figura 5.1. Caracterização da superfície cuticular de tangerinas cv. Montenegrina recém colhida. Estômatos (a e c) indicados pelas setas pretas, rachaduras superficiais (c e d) indicados pelas setas brancas, esporos e hifas de fungos (b). Porto Alegre – RS, 2006.

Além das aberturas naturais no epicarpo dos frutos, encontrou-se uma grande quantidade de hifas de fungos (Figura 5.1b) e esporos. Na figura 5.2, em detalhe está a entrada das estruturas de hifas nas aberturas naturais do epicarpo das tangerinas, tanto nos estômatos (Figura 5.2a), como nas fissuras da superfície (Figura 5.2b). O que demonstra a importância dessas aberturas para penetração do patógeno após a colheita dos frutos.

Após a armazenagem das tangerinas por 20 dias de experimento e 7 dias de simulação de vida de prateleira, um padrão similar de recobrimento por hifas foi encontrado na superfície dos frutos que não receberam nenhum tipo de tratamento (Figura

5.3a e b), e pode-se observar novamente a penetração de hifas nos orifícios formados pelos estômatos e fissuras da superfície das tangerinas (Figura 5.3b).

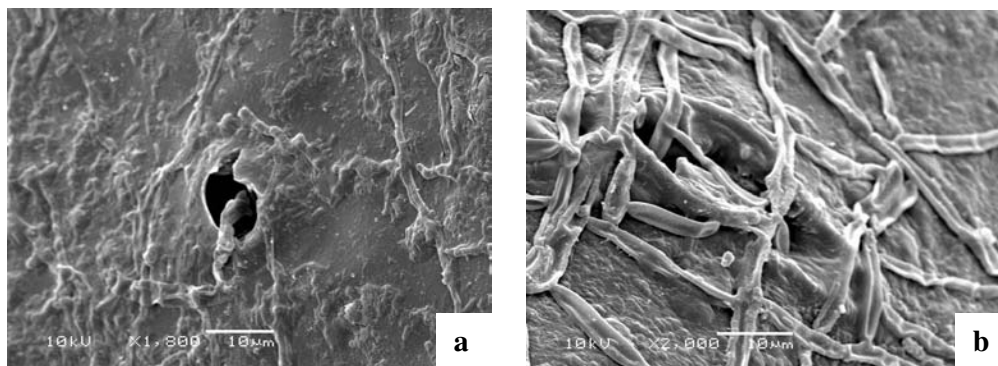


Figura 5.2. Presença de hifas de fungos penetrando em orifícios naturais da superfície cuticular de tangerinas cv. Montenegrina recém colhida. Penetração em estômato (a), e em rachadura superficial (b). Porto Alegre – RS, 2006.

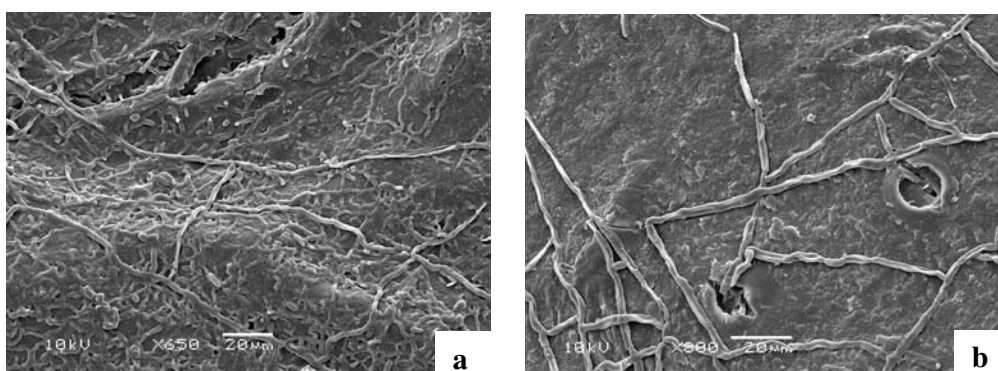


Figura 5.3. Superfície cuticular de tangerinas cv. Montenegrina após 20 dias de armazenamento a 5° C. Presença de hifas de fungos (a e b), hifas penetrando em aberturas naturais do fruto (b). Porto Alegre – RS, 2006.

De um modo geral o efeito do calor aplicado por imersão na superfície das tangerinas foi de recobrimento parcial dos orifícios naturais existentes nestes frutos que pode ter ocorrido a partir de um derretimento do conteúdo ceroso da camada cuticular que recobriu homogeneamente esses orifícios (Figura 5.4a e b). Outro efeito foi a limpeza parcial da superfície cuticular dos frutos tratados com a remoção de hifas encontradas na superfície dos frutos colhidos (Figura 5.4c). Apesar da remoção das hifas, foram encontrados esporos de fungos na superfície dos frutos tratados com calor (Figura 5.4a, b e

d), mostrando que este tratamento pode não ser homogêneo, e não atingir toda a superfície, ou não eliminar os esporos aí existentes. Mas, por outro lado, pode ser que os esporos tenham atingido os frutos após o tratamento térmico, durante a armazenagem e/ou simulação de vida de prateleira dos mesmos, provenientes daqueles frutos não tratados.

Outro fator a ser ressaltado, é que nem todos os orifícios naturais do epicarpo dos frutos foram recobertos com a fusão das ceras cuticulares pelo calor, como pode ser visualizado na figura 5.4c e d.

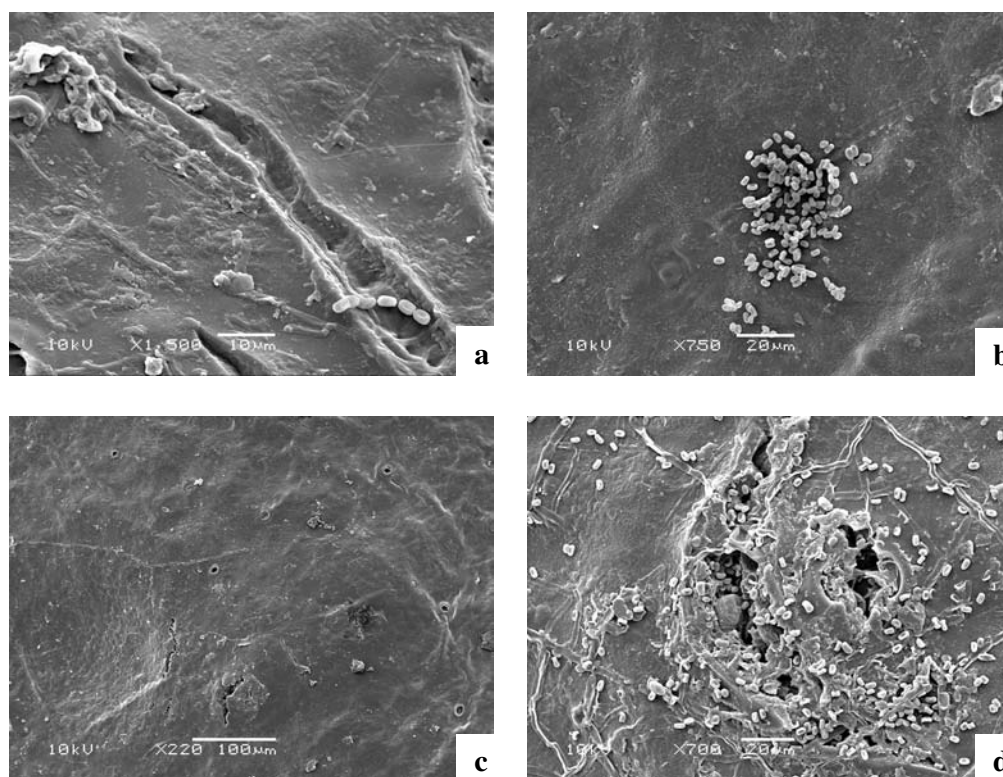


Figura 5.4. Efeito do calor aplicado por imersão na superfície cuticular de tangerinas cv. Montenegrina aos 20 dias de armazenamento. Recobrimento de fissuras (a), recobrimento parcial de estômatos (b e c) e presença de esporos e hifas de fungos (b e d). Porto Alegre – RS, 2006.

Foram observados poros estomáticos e fissuras na superfície cuticular que continuam abertos e propensos a entrada do patógeno. E neste caso, percebe-se que o tratamento não foi homogêneo em toda a superfície cuticular dos frutos.



Um outro método de aplicação de calor para controle de podridão é o chamado HWB do inglês “Hot water brushing”, que é o calor aplicado por aspersão aliado à escovação, proposto por Fallik (1999). Nesta metodologia, ao mesmo tempo em que os frutos são enxaguados com calor eles são escovados. Alguns trabalhos sugerem que ocorre a remoção física do patógeno em função desta escovação.

Os trabalhos realizados com o calor aplicado por aspersão e escovação evidenciaram efeitos similares aos já citados para o tratamento térmico por imersão: recobrimento dos orifícios naturais da cutícula (Figura 5.5).

Um efeito de arraste da camada cerosa foi visualizado (Figura 5.5b e c) apenas no uso deste tratamento provavelmente devido à passagem das cerdas durante o processo de escovação no protótipo da máquina classificadora. Inclusive, o recobrimento de estômatos parece ter sido distinto do recobrimento ocorrido exclusivamente pelo calor. A figura 5.5c mostra a camada cerosa que parece ter sido arrastada ao recobrir o estômato e não derretida como já mostrado para o efeito do calor exclusivamente.

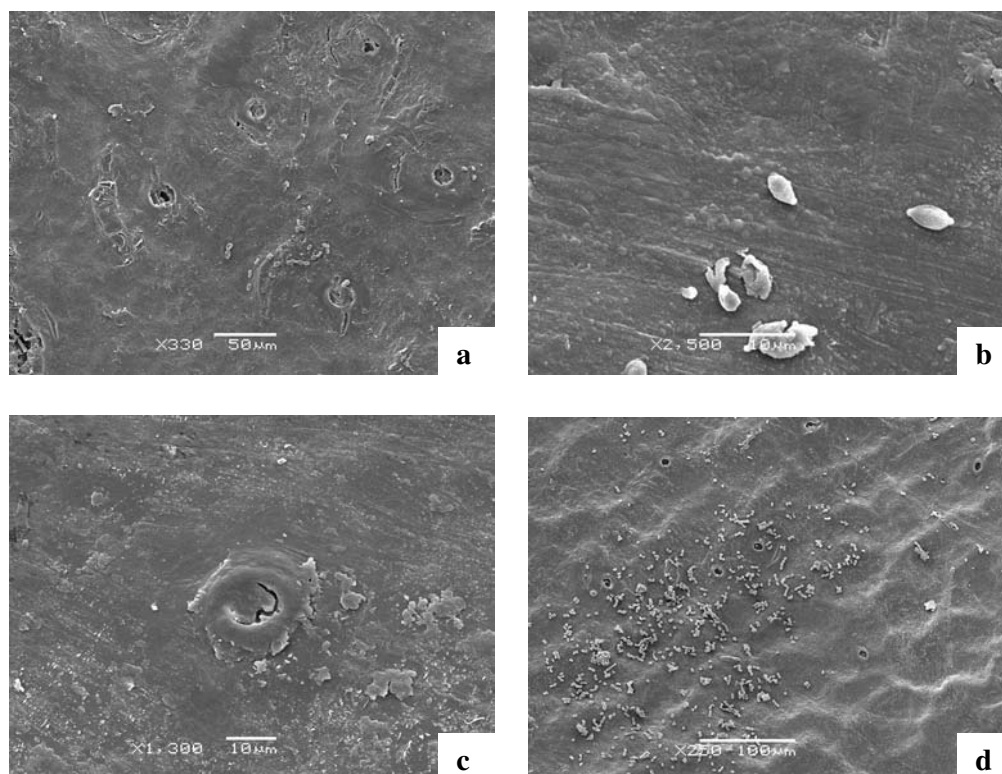


Figura 5.5. Efeito do calor e da escovação na superfície cuticular de tangerinas cv. Montenegrina aos 20 dias de armazenamento. Recobrimento parcial de estômatos e fissuras (a e c), efeitos das escovas formando padrão de arraste na superfície cuticular (b e c), presença de esporos de fungos na superfície (d). Porto Alegre – RS, 2006.

Além disso, este efeito de arraste pode também ter auxiliado na remoção das hifas e esporos de microorganismos abundantes na superfície dos frutos recém colhidos. Todavia, similar aos resultados obtidos com o calor por imersão, também foi possível visualizar esporos de fungos na superfície dos frutos tratados com calor e escovação (Figura 5.5b e d).

Ao se aplicar cera de carnaúba na superfície dos frutos de tangerineira observou-se um efeito de recobrimento de orifícios naturais similar ao ocorrido na aplicação do calor (Figura 5.6). Este efeito foi mais homogêneo que aquele proporcionado pelo calor, e parece ter recoberto todos os orifícios existentes na superfície. Além disso, também recobriu hifas de fungos existentes sob esta camada (Figura 5.6c).

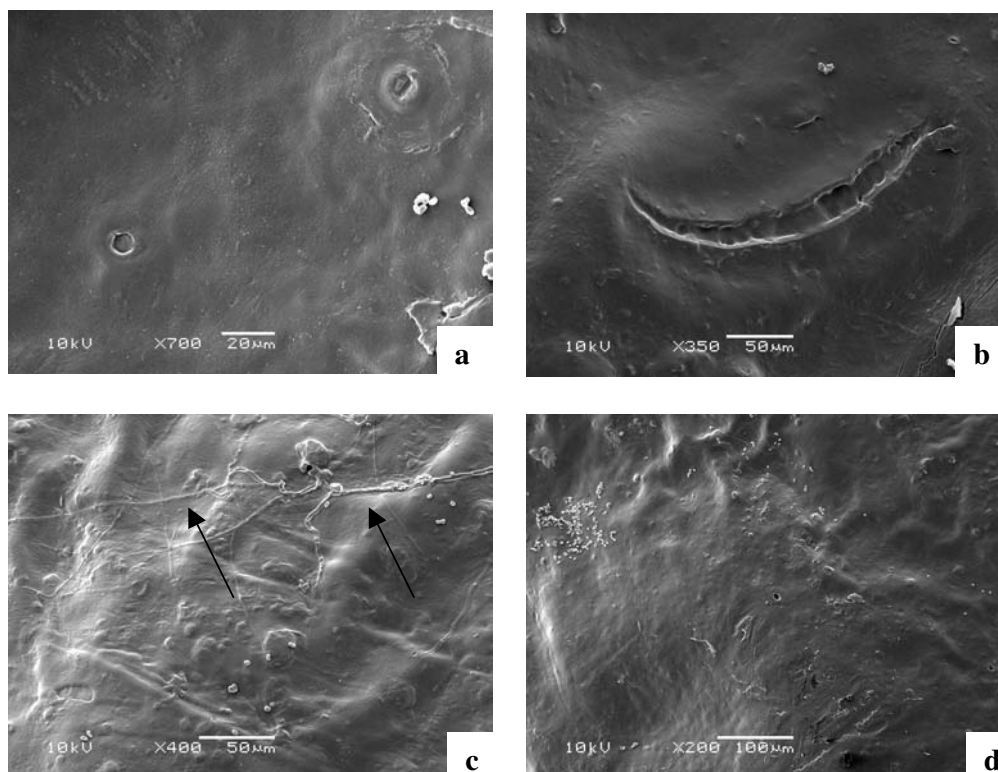


Figura 5.6. Efeito da aplicação de cera de carnaúba na superfície cuticular de tangerinas cv. Montenegrina aos 20 dias de armazenamento. Recobrimento de estômatos (a), de fissuras (b), hifas de fungos cobertas por ceras (c) e esporos de fungos (d), setas indicam hifas cobertas por cera. Porto Alegre – RS, 2006.

Quando aplicado o calor e a cera de carnaúba, os frutos mostraram uma superfície similar ao uso de cera de carnaúba somente, com um recobrimento homogêneo e quase todos os orifícios fechados (Figura 5.7). Além disso, parece ter ocorrido menor quantidade de inóculo do que no tratamento onde se utilizou cera de carnaúba isoladamente, provavelmente pelo efeito do calor atuando sobre o patógeno.

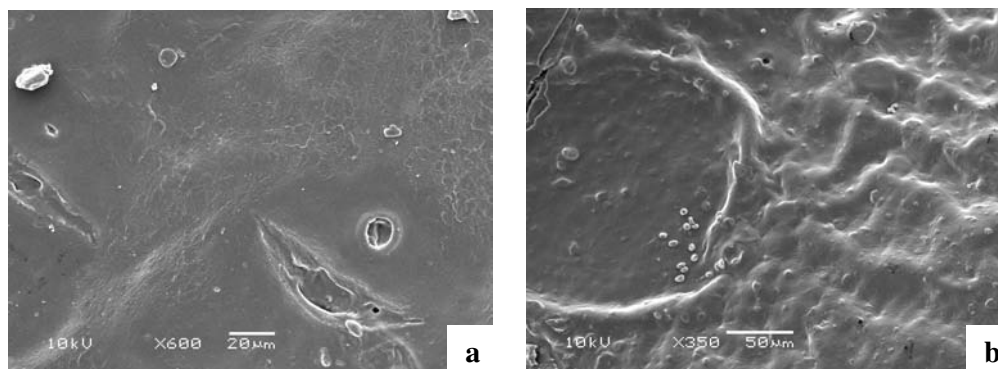


Figura 5.7. Efeito do calor aplicado por imersão e do recobrimento de cera de carnaúba na superfície de tangerinas cv. Montenegrina aos 20 dias de armazenamento. Recobrimento de fissuras e estômatos (a), presença de esporos de fungos na superfície (b). Porto Alegre – RS, 2006.

Efeitos similares aos já mencionados de recobrimento homogêneo de aberturas naturais, e menor quantidade de inóculo presente na superfície ocorreram ao se utilizar calor aplicado por aspersão, escovação e cera de carnaúba (Figura 5.8). Neste caso, no entanto, a escovação pode ter auxiliado na remoção de estruturas de fungos como hifas e esporos. Mesmo assim, foi possível visualizar algumas hifas e esporos (Figura 5.8d). Outro detalhe é que as imagens não mostram mais os efeitos da escovação que foram mostrados anteriormente de arraste de parte do conteúdo ceroso natural da cutícula, evidenciando o fato de as ceras aplicadas externamente recobrirem a camada mais externa de maneira a reduzir as imperfeições ocorrentes nesta camada inclusive as ocasionadas pelas escovas do protótipo de máquina classificadora.

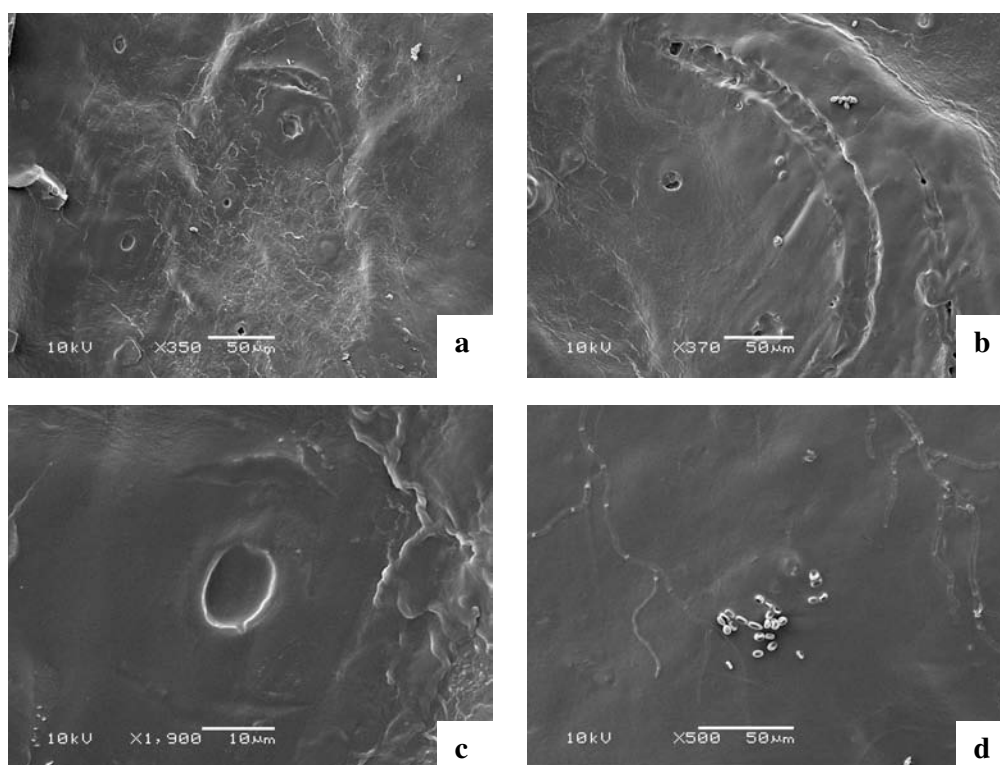


Figura 5.8. Efeito do calor aplicado por aspersão, escovação e recobrimento de cera de carnaúba na superfície de tangerinas cv. Montenegrina aos 20 dias de armazenamento. Recobrimento de fissuras e estômatos (a, b e c), presença de esporos e hifas de fungos na superfície (d). Porto Alegre – RS, 2006.

## 5.4 CONCLUSÕES

O tratamento térmico aplicado atua reduzindo o número de tangerinas com podridão ao final de 20 dias a 5° C + 7 dias a temperatura ambiente. Os efeitos do calor sobre as estruturas do patógeno e sobre a superfície cuticular foram de remoção de grande parte das hifas de fungo existentes na superfície, bem como derretimento do conteúdo ceroso e recobrimento de estômatos e rachaduras. Os resultados deste trabalho em relação ao controle de podridão pós-colheita demonstram que os métodos alternativos como dióxido de cloro e carbonato podem ser utilizados aliados ao calor, e reforçam a idéia de uso de métodos complementares a fim de atingir um nível de controle satisfatório. Estes métodos devem continuar a ser testados para que se possa recomendá-los no futuro como alternativa segura e eficiente no combate a podridões em pós-colheita.

Em relação à qualidade dos frutos, o calor não atua na maioria dos parâmetros estudados, com exceção da relação SST/ATT, onde o mesmo atua reduzindo ligeiramente o valor da relação, no sentido de acelerar o processo de senescência das tangerinas.

O uso de cera de carnaúba na superfície dos frutos atua negativamente aumentando o número de frutos com podridão, e refletindo em maior perda de peso dos frutos testemunha, onde não foram utilizados métodos de controle. Ressaltando a importância de se utilizar métodos combinados de controle.

A escovação atua removendo estruturas como hifas e esporos de fungos da superfície cuticular das tangerinas, e arrastando parcialmente o conteúdo ceroso desta camada, por vezes recobrando orifícios da superfície.

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

As ceras cuticulares das cultivares de maçã estudadas apresentaram características distintas, a cv. Fuji apresentou maior variação e abundância de cristalóides e mostrou a característica de rachaduras em sua superfície bastante evidente. Já a cv. Gala apresenta uma camada cerosa mais amorfa e homogênea. A espessura da camada cuticular de ambas difere, sendo que a camada cuticular da 'Fuji' é menos espessa que a da 'Gala'.

Durante o período de armazenagem a camada cuticular de maçãs se modifica, as rachaduras presentes nesta camada aumentam em largura, sendo esta uma característica importante na pós-colheita de frutos uma vez que as rachaduras propiciam maior perda de água e podem se tornar sítios de penetração de patógenos.

Em relação aos efeitos do calor, o mesmo atua fundindo parcial ou totalmente os cristalóides da camada cerosa da cutícula de maçãs, alterando o seu formato e causando agrupamento dos mesmos. Além disso, esta fusão forma um padrão de recobrimento mais homogêneo na superfície das maçãs em alguns locais. A fusão das ceras epicuticulares e a conseqüente oclusão de fraturas naturalmente existentes na superfície cuticular das maçãs foram evidenciadas neste trabalho, o que demonstra que estes são prováveis efeitos do tratamento térmico sobre a superfície dos frutos e pode estar atuando como uma barreira física evitando a entrada de patógenos nas maçãs.

Existe efeito da escovação na camada externa dos frutos de macieira, a escovação provoca arraste, modificação da estrutura e remoção de cristalóides da camada de ceras epicuticulares, além de formar fendas na superfície. Não houve diferença de efeitos na superfície de ceras cuticulares de maçãs em função dos dois tipos escovas testadas.

O tratamento térmico reduz o número de tangerinas cv. Montenegrina com podridão ao final de 20 dias a 5° C + 7 dias a temperatura ambiente. O calor tem efeito na remoção de grande parte das hifas de fungos existentes na superfície, bem como fusão do conteúdo ceroso e recobrimento de aberturas naturais como poros estomáticos e rachaduras. Este trabalho demonstra que é possível utilizar métodos alternativos como dióxido de cloro e carbonato aliados ao calor, e reforçam a idéia de uso de métodos complementares a fim de atingir um nível de controle satisfatório. Estes métodos devem continuar a ser estudados para recomendá-los no futuro como uma alternativa segura e eficiente no combate a podridões em pós-colheita.

A cera de carnaúba atua negativamente, sob as condições testadas, aumentando o número de frutos com podridão, e refletindo em maior perda de peso dos frutos testemunha, onde não foram utilizados métodos de controle. Ressaltando a importância de se utilizar métodos combinados de controle.

Já a escovação atua arrastando parcialmente o conteúdo ceroso da camada cuticular, por vezes recobrimo orifícios da superfície. Além disso, remove estruturas como hifas e esporos de fungos da superfície das tangerinas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCHBALD, S.O.; WINTER, C.K. Pesticides in our food; assessing the risk. In: WINTER, C.K.; SEIBER, J.N.; NUCKTON, C.K. (Eds.) **Chemicals in the Human Food Chain**. New York: Van Nostrand Reinbolds, 1990.

AURET, E.E. **Control strategies for citrus postharvest diseases**. 2001. 101f. Dissertação (Mestrado) - Department of Microbiology and Plant Pathology, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of Pretoria, Pretoria, 2000.

BAI et al. Formulation of zein coatings for apples (*Malus domestica* Borkh). **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.28, n.2, p.259-268, 2003.

BAKER, A.G. **The basis for treatment of products where fruit flies are involved as a condition for entry into the United States**. Washington, DC: USDA, 1939. (USDA Circular, 551).

BAKER, A.G. **USDA Yearbook: The vapor-heat process**. Washington, DC.: U.S. Gov.Prirtn. Off., 1952.

BAKER, E.A. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In: ALVIN, D.J.; PRICE, C.E. (Eds.) **The Plant Cuticle**. London: Academic Press Cutles, 1982. p.139-165.

BAKER, E.A. The influence of environment on leaf wax development in *Brassica oleracea gemmifera*. **New Phytology**, New York, v.73, n.5, p.955-966, 1974.

BALDIWIN, E.A. et al. Effect of two edible coatings with different permeability characteristics on mango (*Mangifera indica* L.) ripening during storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.3 n.3, p.269-284, 1999.

BARKAI-GOLAN R.; APELBAUM, A. Synergistic effects of heat and sodium o-phenyl phenate treatments to inactivate *Penicillium* spores and suppress decay in citrus fruits. **Tropical Science**, London, v. 31, n.4, p.229-233, 1991.

BARNES, J.D.; CADOSO-VILHENA, J. Interactions between electromagnetic radiation and the plant cuticle. In: KERSTIENS G. (Ed.) **Plant cuticles and integrated functional approach**. Oxford: Bios Scientific, 1996. p. 157-174.

BAUER, S.; SCHULTE, E.; THIER, H-P. Composition of the surface wax from tomatoes. **European Food Research Technology**, Heidelberg, v.219, n.5, p.487-491, 2004.

BELDING et al. Composition and Variability of Epicuticular Waxes in Apple Cultivars. **Journal of American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v.123, n.3, p.348-356, 1998.

BENATO, E.A. Controle de doenças pós-colheita em frutas tropicais. **Summa Phytopathologica**, Jabiticabal, v.25, n.1, p.90-93, 1999.



CASTRO, L.A.S. de et al. Metodologia para observação da camada de cera em maçãs utilizando microscopia eletrônica de varredura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.3, p.774-775, 2002.

CONWAY, W.S. et al. Strategy for combining heat treatment, calcium infiltration, and biological control to reduce postharvest decay of 'Gala' apples. **HortScience**, Alexandria, v.34, n.4, p.700-704, 1999.

COUEY, H.M. Heat treatment for control of post harvest diseases and insect pests of fruits. **HortScience**, Alexandria, v.24, n.2, p.198-202, 1989.

D'HALLENWIN, G.; SCHIRRA M. Structural changes of epicuticular wax and storage response of 'Marsh' grapefruits after ethanol dips at 21 and 50°C. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.553, p.441-442, 2000.

D'HALLENWIN, G. et al. Reducing decay of Avana mandarin fruit by use of UV, heat and thiabendazole treatments. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.368 p.387-394, 1994.

DURIGAN, J.F. Uso da modificação da atmosfera no controle de doenças. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.25, n.1, p.83-88, 1999.

ECKERT, J.W.; EAKS, I.L. Postharvest disorders and diseases of citrus fruit. In: REUTHER, W.; CALAVAN, E.C.; CARMAN, G.E. (Eds.) **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, 1988. pp.179-260.

ECKERT, J.W.; OGAWA, J.M. The Chemical Control of Postharvest Diseases: Deciduous Fruits, Berries, Vegetables and Root/Tuber Crops. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.26, p.433-469, 1988.

ECKERT, J.W. Recent development in the chemical control of postharvest diseases. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.269, p.477, 1990.

FALLIK, E. et al. A unique rapid hot water treatment to improve storage quality of sweet pepper. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.15, n.1, p.25-32, 1999.

FALLIK, E. et al. Prestorage heat treatment reduces pathogenicity of *Penicillium expansum* in apple fruit. **Plant Pathology**, Oxford, v.45, n.1, p.92-97, 1995.

FALLIK, E. et al. The effectiveness of postharvest hot water dips on the control of gray and black moulds in sweet red pepper (*Capsicum annuum*). **Plant Pathology**, Oxford, v.45, n.4, p.644-649, 1996.

FAO. **Produção mundial de frutas cítricas**. 2005. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: dezembro de 2006.

FAUST, M.; SHEAR, C.B. Fine structure of the fruit surface of three apple cultivars. **Journal of American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v.110, n.2, p.166-171, 1972.

FDA. Food and Drug Administration, **Code of Federal Regulations (CFR)**. Washington, D.C.: U.S. Government Printing Office, 1999.

FEGURSON, I. B. et al. Postharvest heat treatments: introduction and workshop summary. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.21, n.1, p.1-6, 2000.

GIRARDI, L.C. **Frutas do Brasil, Maçã Pós-colheita**. Brasília: Embrapa, 2004. 109p. (Informação Tecnológica)

HAGENMAIER, R.D.; SHAW, P.E. Gas permeability of fruit coating waxes. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.117, n.1, p.105-109, 1992.

HOLLOWAY, P.J. The chemical and physical characteristics of leaf surfaces. In: PREECE T.F.; DICKINSON C.H. (Eds.) **Ecology of leaf surface micro-organisms**. London: Academic Press, 1971. pp.39-53.

HOLLOWAY, P.J. The effects of superficial wax on leaf wettability. **Annals Applied Biology**, United Kingdom, v.63, p.145-153, 1969.

HOW, R.B. **Marketing fresh fruits and vegetables**. New-York: AVI Book by Van Nostrand Reinhold, 1991. 336 p.

IBGE. **Produção Vegetal**. Agricultura: laranja, limão e tangerina, 2005. Disponível em: <http://www.ibge.org.br>. Acesso em: dezembro de 2006.

JEFFREE, C.E. Structure and ontogeny of plant cuticles. In: KERSTIENS, G. (eds.) **Plant Cuticles**. Lancaster: BIOS Scientific Publishers, 1996. p.33-82.

JEFFREE, C.E.; BAKER, E.A.; HOLLOWAY, P.J. Ultrastructure and recrystallization of plant epicuticular waxes. **New Phytology**, Cambridge, v.75, n.3, p.539-549, 1975.

JENKS, M.A. et al. Chemically induced cuticle mutation affecting epidermal conductance to water vapour and disease susceptibility in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.105, n.4, p.1239-1245.

JENKS, M.A. et al. Leaf epicuticular waxes from *Eceriferum* mutants in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.108, n.1, p.369-377.

JENKS, M.A.; TUTTLE, H.A.; EIGENBRODE, S.D.; FELDMANN, K.A. Leaf epicuticular waxes from the *Eceriferum* mutants in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.108, n.1, p.369-377, 1995.

JOÃO, P.L. (Coord.). **Levantamento da Fruticultura comercial do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR, 2004. 89p.

KESTER, J.J.; FENNEMA, O.R. Edible films and coatings: a review. **Food Technology**, Chicago, v.40, n.12, p.47-59, 1986.

KLEIN, J. et al. Botrytis cinerea decay in apples is inhibited by postharvest heat and calcium treatments. **Journal of American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v.122, n.1, p.91-94, 1997.

KLUGE, R.A. et al. **Fisiologia e manejo pós-colheita de frutas de clima temperado**. Campinas:Emopi, 2002. 214p. Cap.8: Tratamentos Complementares ao Armazenamento Refrigerado.

KORSTEN, L. et al. Alternative control of citrus postharvest diseases. **Proc. International Society of Citriculture**, in press 2000.

LANA, M.M.; FINGER, F.L. **Atmosfera modificada e controlada**: aplicação na conservação de produtos hortícolas. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 2000. 34p.

LUNARDI, R et al. Efeito de tratamentos térmicos por imersão na qualidade de maçãs cv. Fuji inoculadas com *Botryosphaeria dothidea* e armazenadas em atmosfera controlada. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.2, p.332-334, 2003.

LUNARDI, R.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; BENDER, R.J. Imersão em água quente no controle pós-colheita da podridão branca em maçãs 'Fuji'. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.4, p.431-443, 2003.

LURIE, S.; KLEIN, J.D. **Temperature preconditioning**. Vulcano Center, Israel. Disponível em: <<http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/014temperature.pdf>> Acesso em: 20 ago 2005.

LURIE, S. Postharvest heat treatments of horticultural crops: commodity responses. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.14, n.3, p.257-269, 1998.

LURIE, S.; FALLIK, E.L.; KLEIN, J.D. The effect of heat treatment on apple epicuticular wax and calcium uptake. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.8, n.4 p.271-277, 1996.

MARTIN, J.T.; JUNIPER, B.E. **The cuticles of plants**. London:Edward Arnold, 1970. 347p.

MAZZUZ, C.F. **Calidad de frutos cítricos**: manual para sugestion desde la recoleccion hasta la expedicion. Barcelona: Ediciones de Horticultura, 1996. 202 p.

MIGUIRE, K. M. et al. Relationship between water vapor permeance of apples and micro-cracking of the cuticle. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.17, n.2, p.89-96, 1999.

MORQUERO et al. Caracterização da superfície foliar e das ceras epicuticulares em *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* e *Amaranthus hybridus*. **Planta daninha**, Viçosa, v.22, n.2, p.203-210, 2004.

NEINHUIS, C.; KOCH, K.; BARTHLOTT, W. Movement and regeneration of epicuticular waxes through plant cuticles. **Planta**, Berlin, v. 213, n.3, p.427-434, 2001.

OBAGWU, J.; KORSTEN, L. Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.28, n.1, p.187-194, 2003.

OSTER, A.H. **Tratamento com calor no controle de *Botryosphaeria dothidea* (Maug.) Ces. & De Not.) em Maçãs cv. Fuji**. 2004. 90f. Tese (Doutorado) - Programa de pós-graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

PALOU L.; SMILANICK, J.L. Control of Postharvest Blue and Green Molds of Oranges by Hot Water, Sodium Carbonate, and Sodium Bicarbonate. **Plant Disease**, Saint Paul, v.85, n.4, p.371-376, 2001.

PETRACEK, P.D. et al. The influence of applied waxes on postharvest physiological behavior and pitting of grapefruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.14, n.1, p.99-106, 1998.

PORAT et al. Reduction of postharvest decay in organic citrus fruit by a short hot water brushing treatment. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.18, n.2, p.151-157, 2000.

PORAT, R.E.; PANVOCELLO, D.; PERETZ, J.; BEN-YEHOSHUA S.; LURIE, S. Effects of various heat treatments on the induction of cold tolerance and on the postharvest qualities of 'Star Ruby' grapefruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.18, n.2, p.159-165, 2000.

PRUSKY, D. et al. Effect of hot water brushing, perchloraz treatment and waxing on the incidence of black spot decay caused by *Alternaria alternata* in mango fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.15, n.2, p.165-174, 1999.

PUSEY, P. L. Enhancement of biocontrol agents for postharvest diseases and their integration with other control strategies. In: WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M.E. (Eds.) **Biological Control of Postharvest Diseases**. [s.l.]: CRC Press, 1994. pp.77-88.

RIEDERER, M.; SCHREIBER, L. Waxes – The transport barriers of plant cuticles. In: HAMILTON, R.J. (Ed.) **Waxes: Chemistry, molecular biology and functions**, Dundee, Scotland: The Oily Press, 1995. p.131-156. 6v.

RODOV, V. et al. Reducing chilling injury and decay of stored citrus fruit by hot water dips. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.5 n.1-2, p. 119-127, 1995.

RODRIGUES, L.R. et al. **Raleio manual de frutos em tangerinas 'Montenegrina'**. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.33, n.8, p.14-21, 1998.

ROY, S. et al. Heat treatment affects epicuticular wax structure and postharvest calcium uptake in 'Golden Delicious' apples. **HortScience**, Alexandria, v.29, n.9, p.1056-1058, 1994.

ROY, S., W.S. et al. Changes in ultrastructure of the epicuticular wax structure and postharvest calcium uptake in apple. **HortScience**, Alexandria, v.34, n.1, p.121-124, 1999.

SAMS, C.E. et al. Firmness and decay of apples following postharvest pressure infiltration of calcium and heat treatment. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.118, n.5, p.623-627, 1993.

SCHERRER-MONTERO, C.R et al. Métodos alternativos de controle de podridão pós-colheita em laranjas cv. Valência. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 19., 2006, Cabo Frio. Frutas do Brasil: Saúde para o mundo - **Resumos e palestras**. Cabo Frio, 2006. p.419.

SCHIRRA, M.; BEN-YEHOSHUA, S. Heat treatments: a possible new technology in Citrus handling. Challenges and prospects. In: SCHIRRA, M. (eds.) **Advances in postharvest diseases and disorders control of Citrus fruit**. Trivandrum, Índia:Research Singpost, 1999. p.133-147.

SCHIRRA, M.; D'HALLEWIN G. Storage performance of Fortune mandarins following hot water dips. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.10, n.3, p.229-238, 1997.

SCHIRRA, M. et al. Host-pathogen interactions modulated by heat treatment. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.21, n.1, p.71-85, 2000.

SCHIRRA, M. et al. Postharvest heat conditioning effects on early ripening 'Gialla' cactus pear fruit. **HortScience**, Alexandria, v.32, n.4, p.702-704, 1997.

SCHIRRA, M.; MULLAS, M. Improving storability of 'Tarocco' oranges by postharvest hot-dip fungicide treatments. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.6, n.1-2, p.119-127, 1995.

SCHÖNHERR, J. Encyclopedia of plant physiology In: LANGE, O.L.; NOBEL, O.S.; OSMOND C.B.; ZEIGLES, H. (Eds) **Resistance of plant surfaces to water loss: transport properties of cutin, suberin and associated lipids**. New York:Berlin Heidelberg, 1982. pp.153-179. 12Bv.

SCHREIBER, L. et al. Plant cuticles and integrated functional approach. In: KERSTIENS G. (Ed.) **Diffusion through cuticles: principles and models**. Oxford:Bios Scientific, 1996. p. 109-120.

SCHREIBER, L. et al. Diffusion through cuticles: principles and models. In: Kerstiens G. (Ed.) **Plant cuticles and integrated functional approach**. Oxford: Bios Scientific, 1996. p. 109-120.

SCHWARZ, S.F. **Influência do raleio manual de frutinhas sobre a produção de tangerineiras 'Montenegrina' (Citrus deliciosa Tenore)**. 1989. 105f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação e Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1989.

SCOTT, F. M. Cell wall surface of the higher plants. **Nature**, London, v.210, n.5040, p.1015 – 1017, 1966.

SMILANICK J.L. et al. Influence of concentration of soda ash, temperature, and immersion period on the control of post harvest green mold of oranges. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n.4, p.379-382, 1997.

STOREY, R.; PRICE, W.E. Microstructure of the skin of d'Agén plums. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.81, n.3, p.279-286, 1999.

TUSET et al. Tratamientos térmicos a los frutos cítricos para el control de las enfermedades de la post-recolección. **Levante Agrícola**, Valencia, v.337, p.342-347, 1996.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. Podridões de maçãs frigorificadas In: GIRARDI C.L. (Org.). **Frutas do Brasil, Maçã Pós-colheita**. Brasília:Embrapa, 2004. p.35-44 (Informação Tecnológica)

VERABERBEKE, E.A. et al. Non-destructive analysis of the wax layer of apple (*Malus domestica* Borkh.) by means of confocal scanning microscopy. **Planta**, Berlin, v.213, n.4, p.525-533, 2001.

VOGG, G. et al. Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid  $\beta$ -ketoacyl-CoA synthase. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, n.401, p.1401-1410, 2004.

WILKINSON R. E.; KASPERBAUER M.J. Epicuticular alkane content of tobacco as influenced by photoperiodic, temperature and leaf age. **Phytochemistry**, New York, v.11, n. 8, p.2439-2442, 1972.