



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Dispositivo integrador tempo-temperatura enzimático para aferição cromática da qualidade da Cereja da Cova da Beira

Adriana Sebastião Quelhas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Pedro Dinis Gaspar
Universidade da Beira Interior
Covilhã, Portugal

Covilhã e UBI, junho de 2017

Agradecimentos

Poderia perder imenso tempo a agradecer ...

Mas em tempos difíceis, como foi o caso deste ano letivo, existem pessoas que se destacam, porque nos bons momentos é fácil estar, nos menos bons, apenas os verdadeiros permanecem.

Realço a minha gratidão para com a minha família, à minha mãe Graça Quelhas, ao meu pai António Quelhas e aos meus avós Maria e José Quelhas, porque sem eles nada teria sido possível.

Ao meu namorado, companheiro e amigo José Maria Martins, que me acompanhou nesta jornada, esteve ao meu lado e me apoiou em todas as etapas.

Professor Doutor Pedro Dinis Gaspar, o impulsionador da dissertação, ao qual agradeço toda a disponibilidade, profissionalismo, acompanhamento e claro, uma amizade que tornou toda esta fase o mais agradável que poderia ser. Bem-haja por toda a aprendizagem, vou levar certamente para o meu futuro.

Por último, mas sem dúvida não menos importante... Um obrigada do fundo do coração à minha querida amiga Liliana Machadeiro, a minha “co-orientadora”, e o meu gerador de energia! Estou certa que sem ela, teria ficado muito por fazer... Obrigada pela tua amizade e apoio incondicional.

Dedico esta dissertação a todos aqueles que acreditam em mim, nunca duvidaram e principalmente nunca me deixaram desistir.

Resumo

A cereja é um fruto bastante apreciado pelos consumidores em geral. Em Portugal, a Beira Interior, e em particular, a Cova da Beira, é a área de cultura mais representativa com uma produção superior a 50% da produção nacional.

As características peculiares da cereja, tais como a cor, a firmeza, o paladar, entre outros, aumentam a procura deste fruto, num curto período em que pode ser comercializada. No entanto, a sua elevada perecibilidade interfere com o tempo de vida útil e consequentemente gera alterações indesejáveis na cadeia de escoamento da cereja.

Nesse sentido, por forma a diminuir o desperdício alimentar e aumentar a segurança alimentar, propõe-se o desenvolvimento de um dispositivo integrador de tempo-temperatura, que possa monitorizar em tempo real o estado qualitativo da cereja. Este dispositivo, permite supervisionar a variação da temperatura ao longo do tempo, e para o caso específico da cereja, é efetuada uma referência a sistemas enzimáticos, após determinação dos parâmetros cinéticos para inativação térmica.

Com este dispositivo, pretende-se criar a possibilidade de poder alterar diversos fatores de comercialização, de decisão de compra por parte do consumidor e garantia de segurança de consumo.

Palavras-chave

Cereja; TTI (Time-Temperature Integrators); Reação enzimática; Temperatura

Abstract

The cherry is a fruit widely appreciated by consumers in general. In Portugal, the Beira Interior region, and in particular the Cova da Beira, is the most representative area with a production of more than 50% of the national production.

The peculiar characteristics of the cherry, such as color, firmness, palate, among others, increase the demand of this fruit, in a short period in which it can be commercialized. However, its high perishability interferes with the shelf life and consequently generates undesirable changes in the cherry flow chain.

In order to reduce food waste and increase food safety, it is proposed to develop a time-temperature integrator device that can monitor the quality of the cherry in real time. These devices allow the supervision of the variation of the temperature over time, and for the specific case of the cherry, a reference is made to enzymatic systems, after determination of the kinetic parameters for thermal inactivation

With this device, it is intended to create the possibility of being able to change several factors of commercialization, decision of purchase by the consumer and guarantee of consumer safety.

Keywords

Cherry; TTI (Time-Temperature Integrators); enzymatic reaction; Temperature

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
Índice	vii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas	xi
Nomenclatura.....	xiii
1. Introdução	1
1.1. Enquadramento	1
1.2. O problema em estudo e a sua relevância	3
1.3. Objetivos e contribuição da dissertação	6
1.4. Visão geral e organização da dissertação	6
2. Características e Propriedades de Produtos Frutícolas	9
2.1. Introdução	9
2.2. Caso específico: Cereja da Cova da Beira	10
2.3. Características organolépticas	12
2.4. Compostos presentes na Cereja e sua relevância.....	14
2.4.1. Introdução	14
2.4.2. Compostos fenólicos	14
2.5. Métodos de conservação	18
2.6. Parâmetros de comercialização.....	22
2.7. Nota conclusiva	24

3. Estado da Arte	25
3.1. Introdução	25
3.2. Rastreabilidade	27
3.3. Ferramentas e métodos de monitorização de parâmetros	30
3.3.1. Dispositivos integradores de temperatura	30
3.3.2. TTI enzimático.....	34
3.4. Nota conclusiva	39
4. Modelos Cinéticos de Crescimento Microbiano.....	41
4.1. Introdução	41
4.2. Combase.....	42
4.3. Cinética Microbiana: Dedução para o caso específico da cereja.....	43
4.4. Microrganismos: Caso particular do género Monilinia	48
4.5. Nota conclusiva	51
5. Desenvolvimento/Adequação de Tecnologias de Monitorização de Parâmetros ...	53
5.1. Introdução	53
5.2. Dispositivo integrador tempo-temperatura (TTI)	54
5.3. Protótipo	55
5.4. Nota conclusiva	57
6. Conclusões.....	59
6.1. Conclusões gerais.....	59
6.2. Sugestões de trabalhos futuros.....	60
Referências Bibliográficas	Erro! Marcador não definido.

Lista de Figuras

- Fig. 1 - Ilustração do produto comercializado, a cereja do Fundão [15] .**Erro! Marcador não definido.**
- Fig. 2 - Ilustração das estruturas químicas de diferentes polifenóis: Ácidos hidroxibenzóicos (Hba), Ácidos Hidrocinâmicos (Hca), Flavonóides (F), Chalconas (C), Estilbenos (S) e Lignanos (L). O Grupo R poderá ser constituido por H, OH ou OCH₃ [30]..... 15
- Fig. 3 - Ilustração do mecanismo de ação da polifenoloxidase [29]. 18
- Fig. 4 - Etapas da cadeia de abastecimento alimentar onde pode ser feita a gestão do desperdício alimentar [10]..... 28
- Fig. 5 - Ilustração das funções básicas das embalagens e interface de atividade das novas embalagens, ativa e inteligente [30]. 29
- Fig. 6 - Ilustração do processo de hidrólise . A) Estado primordial da cor do TTI (verde); B) Estados vermelho-alaranjado, o qual indica que o produto não esta apto a ser consumido; C) O TTI apresenta uma coloração branca, o que significa que não foi ativado, não podendo efetuar a monitorização do estado de conservação do produto [58]. 35
- Fig. 7 - Ilustração de um TTI baseado num polímero Fresh-Check® [62]. 36
- Fig. 8 - TTI fotocromico em estado sólido OnVu™ [64]. 37
- Fig. 9 - Ilustração da mudança de cor do OnVu™, em função dos fatores tempo e temperatura, onde é perceptível a maior influência da temperatura face ao tempo [65]. 38
- Fig. 10 - O ciclo de reação do sistema fotocromico. A exposição à luz UV (a) induz a coloração (b) enquanto o calor (c) promove a reação inversa [62]. 38
- Fig. 11 - Principais danos pós-colheita causados na cerejeira pelos fungos visualizados ao microscópio ótico (a) Monilinia fruticula, (b) Botrytis cinerea e (c) Penicillium expansum [19]. 41
- Fig. 12- Página inicial da ferramenta ComBase, com acesso disponível: <http://www.combase.cc/index.php/en/> 42

- Fig. 13- Gráfico ilustrativo da cinética de crescimento da bactéria *Pseudomonas*, para uma exposição à temperatura de 20°, durante um período de 24 horas.....45
- Fig. 14- Representação gráfica do modelo genérico de crescimento microbiano, em que A representa a fase de crescimento exponencial, B a fase de resistência às condições ambientais e por fim C, a fase de crescimento logarítmico que irá refletir a “capacidade de carga”, ou seja o limite de crescimento segundo as condições envolventes. [22]46
- Fig. 15- Representação gráfica da cinética de crescimento da bactéria *Clostridium botulinum*, para um período de tempo de 48 horas, exposta a uma temperatura de 20° num ambiente totalmente desprovido de oxigênio.47
- Fig. 16 -Efeito o fungo género *Monilinia*, no caso particular da cereja48
- Fig. 17 - Ciclo de vida do fungo *Monilinia fructicola*. De A-D ocorre a fase de reprodução assexuada (haplóide), em que as hifas desenvolvidas nos tecidos produzem cadeias de conídeos; estes por sua vez são espalhados pelo vento e vão posteriormente encontrar um hospedeiro (fase *Monilinia*). De E-I, ocorre a fase de reprodução sexuada, em que há invasão dos tecidos do fruto por hifas somáticas quais produzem estromas, agravando assim o processo de contaminação [75]....50
- Fig. 18 - Proposta de TTI para a cereja.....56
- Fig. 19 - Proposta de TTI para a cereja - Esquema de cores.57

Lista de Tabelas

Tabela 1. Riscos que interferem na taxa de crescimento microbiano dos produtos alimentares [4].	2
Tabela 2. Exemplos de indicadores externos e internos e respectivos princípios de funcionamento utilizados em embalagens inteligentes [46].	25
Tabela 3. Valores estabelecidos das energias de ativação das reações de degeneração que ocorrem nos alimentos [52]	33
Tabela 4- Valores limite de dose infetante para microrganismos patogénicos.....	44

Nomenclatura

Acrónimos:

CFD	Dinâmica de fluidos computacional
HACCP	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo
ISO	Organização Internacional de Normalização
MAP	Modified Atmosphere Packaging
ONPG	Orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo
RFID	Radio Frequency Identification
TIA	Toxinfecções alimentares
TTIs	Time Temperature Integrators
UV	Ultravioleta

1. Introdução

1.1. Enquadramento

Nos dias de hoje, assiste-se a um cenário que inclui um aumento progressivo da população, bem como uma situação de crise económica e défice de produção em diversos países desenvolvidos [1].

A redução das perdas e do desperdício alimentar é uma prioridade por forma a mobilizar o aumento da alimentação da população a nível mundial. Considera-se assim um compromisso ético a assumir por todos, melhorando assim o nível nutricional da população carenciada e conseqüentemente a luta contra a fome [1].

De forma a concretizar este objetivo, é necessária a criação de uma aliança entre a política dos países e respetivas populações, bem como mobilizar todos os elementos pertencentes à cadeia agroalimentar, culminando numa modificação de atitudes, processos implementados e sistemas de gestão eficazes [2].

Aliado a esta situação, há que referir também a constante preocupação com a segurança alimentar, ou seja, a qualidade certificada que os produtos comercializados chegam até ao consumidor final em ótimas condições de consumo sem por em risco a saúde dos consumidores. Evidentemente, existem inúmeras falhas nesta temática, sendo necessário o estudo e projeção do maior número de estratégias de monitorização e controlo da segurança e qualidade alimentar desses mesmos produtos [1],[2].

Sendo a temperatura um dos fatores que mais influencia o estado de conservação dos alimentos, surge a necessidade de desenvolver e testar novos sensores adequados, Indicadores Tempo-Temperatura (*Time Temperature Integrators*, TTIs), baseados em

proteínas e/ou sistemas químicos, para quantificar o impacto de qualidade ou segurança dos processos térmicos [2].

Estes sensores, os TTIs, são um dos principais elos em falta para aperfeiçoar a introdução de novas tecnologias de monitorização, os quais reduzem tanto os custos de produção, assegurando a segurança alimentar, e com efeitos positivos na mitigação o desperdício alimentar. Esta necessidade de monitorização é acrescida quando falamos de produtos perecíveis, os quais necessitam de um controlo bastante mais qualificado e rigoroso [3].

De forma a avaliar a higiene e qualidade alimentar, é fundamental conhecer e classificar os diversos perigos existentes que influenciam estes parâmetros diretamente. Assim, os riscos alimentares podem ser repartidos por três grupos: físico, químico e biológico. O risco físico prende-se com a possibilidade de existir contato do alimento com outros materiais; o risco químico refere-se ao manuseamento de diversas substâncias químicas utilizadas no processo de produção, bem como agentes de limpeza utilizados; por fim, o risco biológico, o qual é o foco de preocupação dado não estar dependente do produtor mas sim da sua natureza, passando pelas condições a que o alimento está exposto. Na Tabela 1 podem verificar-se os riscos que interferem na taxa de crescimento microbiano dos produtos alimentares [4].

Tabela 1. Riscos que interferem na taxa de crescimento microbiano dos produtos alimentares [4].

Fatores de Crescimento Microbiano	Exemplo
Intrínsecos	Propriedades físico-químicas dos alimentos
Extrínsecos	Condições do ambiente de armazenamento
Fatores de processamento	Desrespeito do tempo e temperatura de confeção do alimento

O caso específico da cereja da Cova da Beira pode ser encarado como um tema que necessita de atenção, nomeadamente no que se refere às exigentes normas de controlo de qualidade do produto. No âmbito de melhorar o controlo de qualidade da

cereja da Cova da Beira, a implementação de TTIs será certamente uma mais-valia, tanto na vertente da comercialização bem como na vertente de exportação. Esta tecnologia visa proporcionar uma indicação em tempo real do estado de qualidade alimentar, contribuindo mais uma vez para a redução do desperdício, pois poderá auxiliar no processo de tomada de decisão acerca do momento de colocação do produto à venda ao consumidor final.

1.2. O problema em estudo e a sua relevância

A segurança alimentar apresenta-se nos dias de hoje como um assunto de extrema relevância. Apesar de não ser um tema recente, o qual se integra na temática do desenvolvimento do ser humano, mais especificamente no que se refere às suas práticas e costumes, com a evolução do conhecimento, o tema adquiriu bastante importância [5].

De um modo geral, ao abordar o conceito de segurança alimentar deve ter-se em conta toda a cadeia alimentar, bem como todos os seus intervenientes como um todo. Este processo simplifica o estabelecimento de uma relação sequencial, garantindo a segurança alimentar do produto até ao destinatário principal, o consumidor [6].

Assim, todos os membros de qualquer cadeia alimentar, deverão comprometer-se a garantir a segurança dos produtos alimentares independentemente da natureza das atividades que desenvolvem. Nesta cadeia alimentar incluem-se todas as empresas que, direta ou indiretamente, intervêm no transporte de produtos alimentares. O controlo da segurança dos alimentos é fundamental devido ao facto de estes poderem constituir um perigo para a população quando não são devidamente preparados ao longo da cadeia agroalimentar [7].

As doenças mais comuns causadas por alimentos são provocadas por microrganismos, nomeadamente bactérias e/ou suas toxinas, designadas por toxinfecções alimentares (TIAs). A origem das TIAs está diretamente relacionada com a capacidade de multiplicação do microrganismo bem como a sua produção de toxinas, as quais são suficientes para provocar lesões ou danos no consumidor. Um surto de toxinfecção

alimentar caracteriza-se pela existência de dois ou mais casos humanos da mesma doença/infeção, ou um número de casos humanos maior do que o normal e onde os casos estão relacionados, ou ligados à mesma origem (consumo do mesmo alimento contaminado) (Diretiva 2003/99/EC) [2].

Considera-se que o tempo e a temperatura são os fatores mais importantes a considerar no controlo microbiológico. É também imprescindível preservar a cadeia de frio para alimentos que tendem a alterar-se com o aumento de temperatura [2].

De forma a inibir a multiplicação de microrganismos, na maioria das situações a atmosfera que envolve o produto é manipulada. Os processos utilizados nesta situação são habitualmente [2]:

1) Embalamento a vácuo em que é retirado o ar fazendo com que a embalagem colapse à volta do produto antes de ser selada. Ao reduzir o nível de oxigénio na embalagem, a capacidade dos microrganismos que respiram oxigénio se multiplicarem reduz-se. A falta de oxigénio também reduz a deterioração devido à oxidação. Todavia, é importante realçar que a remoção de oxigénio (que nunca é total) do ambiente de um produto alimentar, apesar de possibilitar a extensão da sua vida útil e redução da sua deterioração, não elimina de todo a possibilidade de crescimento bacteriano e pode causar outros problemas. É importante lembrar que estes tipos de deterioração servem como indicadores de que o produto alimentar está comprometido e pode colocar em causa a saúde dos consumidores. Assim, como todos os produtos alimentares perecíveis estão sujeitos ao risco de contaminação por bactérias patogénicas (causadoras de doenças), aeróbias e anaeróbicas, estes devem ser refrigerados ou congelados depois de terem sido embalados em ambiente de vácuo parcial ou selados a vácuo; 2) Embalamento em atmosfera modificada em que é alterada a composição dos gases que rodeiam o produto. A atmosfera modificada (*Modified Atmosphere Packaging* - MAP), por outro lado, pode ser adaptada ao produto alimentar em particular, com diferentes gases e diferentes proporções de gás na mistura utilizada, tipicamente oxigénio, dióxido de carbono e azoto, para dar a máxima vida útil e para manter a qualidade e aspeto do produto;

3) Atmosfera controlada em que o ambiente do produto é mantido constante durante o armazenamento. Este procedimento é frequentemente aplicado a todos os produtos alimentares perecíveis, e ao longo de toda a cadeia de frio. É conveniente que seja verificada a integridade da embalagem no ato da compra e no armazenamento posterior de modo a que a atmosfera envolvente não se altere e acelere a deterioração do alimento [2].

A minimização das ocorrências com impacto para o consumidor deve constituir uma preocupação para todos intervenientes na cadeia, desde o produtor até ao consumidor. Nesta cadeia, o transporte e a distribuição de produtos alimentares (incluindo a comercialização) é muitas vezes um dos elos mais fracos na garantia da segurança alimentar, sendo esse o foco de relevância da presente dissertação, por forma a melhorar a qualidade do produto e satisfação do consumidor [8].

De forma a controlar estes parâmetros, são empregados sistemas de garantia de segurança e qualidade, os quais assentam na monitorização e conseqüente registo de critérios críticos que influenciam diretamente o ciclo de vida do alimento. A fase inicial deste tipo de sistemas desenvolve-se antes do processamento e estende-se até ao consumidor final. Para isso, a indústria alimentar, rege-se pelos sistemas de qualidade ISO (Organização Internacional de Normalização), os quais são recomendados pelo sistema de segurança e higiene padrão, Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (*Hazard Analysis and Critical Control Points* - HACCP) [9].

Diretamente relacionado com esta temática está o desperdício alimentar, o qual se caracteriza como um problema global e transversal de considerável dimensão. Perante esta situação, é necessário criar estratégias que progressivamente o eliminem ou, na pior das hipóteses, o minimizem [10].

Considerando os métodos atuais usados para avaliar o impacto integrado do tempo e da temperatura na preservação de um produto alimentar por um tratamento térmico, é imperativo identificar a premissa básica que qualquer esquema de preservação deve cumprir. O esquema deve assentar no foco central baseado numa descrição viável para a cinética de ativação por calor de microrganismos, esporos e outros atributos de qualidade [11].

As falhas dos métodos de avaliação predominantes são destacadas e dá-se especial atenção ao desenvolvimento, às restrições e às possibilidades dos TTIs como "novas" ferramentas de avaliação para medir o impacto de um tratamento térmico "clássico". Nas diversas embalagens bem como na avaliação das suas condições de conservação/refrigeração, os TTI auxiliam no processo de decisão acerca de qual a regulação mais adequada dos parâmetros que regem estas técnicas [11].

1.3. Objetivos e contribuição da dissertação

A presente dissertação tem como objetivo explorar a capacidade de adaptação de um dispositivo de controlo do estado de conservação na comercialização do caso específico da cereja da Cova da Beira. Com este dispositivo, um TTI, pretende-se a integração de uma medida ainda não implementada em Portugal, contribuindo para a diminuição do desperdício alimentar pela monitorização do estado de conservação da cereja, garantindo a máxima segurança alimentar.

1.4. Visão geral e organização da dissertação

De uma forma geral, a dissertação encontra-se organizada de forma estratégica culminando na proposta de protótipo de TTI enzimático para o controlo da cereja da Cova da Beira.

É importante conhecer as características e propriedades dos produtos frutícolas, mais precisamente o caso da cereja da Cova da Beira, explorando as suas características organolépticas, propriedades, métodos de conservação e parâmetros de comercialização.

Numa ordem lógica, é importante compreender o que são TTIs, quais os tipos existentes bem como o seu funcionamento. Seguidamente, analisando o estado da arte, é focado o caso do TTI mais indicado para a cereja da Cova da Beira, analisando a sua rastreabilidade e monitorização.

De acordo com o estudo da cereja, os métodos de crescimento microbiano são extremamente importantes por forma a estabelecer os parâmetros de funcionamento e avaliação de um TTI específico para o caso em estudo.

Como objetivo final, é elaborada uma proposta de protótipo de um TTI enzimático, o qual irá monitorizar em tempo real o estado de conservação do produto em estudo.

2. Características e Propriedades de Produtos Frutícolas

2.1. Introdução

As frutas e hortaliças integram-se nos produtos agrícolas mas destacam-se essencialmente pela sua perecibilidade e pelo impacto que a aparência visual tem na escolha do consumidor no momento da compra. As características peculiares dos produtos hortofrutícolas (morfológicas, anatómicas, fisiológicas e químicas) são responsáveis pela precocidade da sua degradação comparativamente com outros produtos alimentares. Pelo facto de muitos destes produtos serem consumidos crus, é de extrema importância a manutenção e controlo de qualidade ao longo do tempo, desde a produção até ao período pós-colheita [12].

Para além de serem utilizadas para consumo imediato, as frutas e hortaliças frescas constituem uma importante matéria-prima para diversas indústrias alimentares, das quais se podem referir o vinho, azeite, sumos e congelados. Na maioria das situações, num estabelecimento comercial, a qualidade e frescura dos produtos hortofrutícolas pode sobressair pela positiva [12].

O foco deste capítulo será a cerejeira, uma árvore da família das rosáceas, nativas de regiões temperadas sobretudo no hemisfério norte, as quais incluem espécies frutíferas tais como a ameixeira, damasqueiro e pessegueiro, denominadas prunóideas. Distinguem-se das pomóideas pelo facto de estas exibirem a forma de arbusto ou árvore com folhas estipuladas [13].

2.2. Caso específico: Cereja da Cova da Beira

Ocupando cerca de 14% da área de frutos frescos em Portugal, a cultura da cerejeira preenche 2191 ha na Beira Interior, constituindo mais de 50% da produção nacional da cereja. A cereja é maioritariamente reconhecida como a “cereja do Fundão”, fruto do excelente marketing patrocinado, exemplificado na Figura 1, pela Câmara Municipal do Fundão, que culmina no enriquecimento regional e consequentemente nacional [14].



Fig. 1 - Ilustração do produto comercializado, a cereja do Fundão [15].

A produção anual estimada de cerejas em Portugal é de 17.000 toneladas. A cereja da Cova da Beira é um fruto originário de diferentes variedades da cerejeira, usualmente cultivadas entre as Serras da Gardunha, Estrela e Malcata, zona nomeada como Cova da Beira. Fundamentalmente, as cerejas são produzidas pelas variedades “Saco da Cova da Beira”, “Roxa”, “Espanhola”, “Napoleão Pé Comprido” entre outras. Naturalmente, para o sucesso da colheita, o solo possui características singulares, altitude, exposição solar e um clima temperado típico e favorável [16]. Podem referir-se como condições edafoclimáticas únicas, um número elevado de horas de frio, um bom resguardo dos ventos fortes, os solos de origem granítica da encosta, solos profundos e bem escoados [14].

De acordo com a classificação sistemática, a cerejeira pertence à família Rosaceae, sub-família Prunoideae, género *Pronus L.*, e espécie *Prunus Avium L.* As cerejas doces, às quais nos referimos ao longo deste documento, são originárias de regiões com clima

temperado, essencialmente no Mediterrâneo e na Europa Central, África do Norte, Próximo e extremo Oriente, Austrália do Sul e Nova Zelândia, Estados Unidos da América e Canadá, Argentina e Chile, possuindo um período de colheita sensivelmente entre Maio e Julho [17].

Existem diferentes culturas de cereja, devem estar sobretudo de acordo com as exigências do mercado externo. As considerações fundamentais de cada cultura são essencialmente o tempo de colheita, a adequação para o posterior transporte bem como os atributos desejados. Embora nem todas sejam produzidas em Portugal, é importante conhecer as variedades de cereja comercializadas atualmente, sendo elas 'Attika', 'Bing', 'Brooks', 'Burlat', 'Chelan', 'Hedelfingen', 'Kordia', 'Lambert', 'Lapins', 'Rainier', 'Regina', 'Skeena', 'Sonata', 'Staccato', 'Stella', 'Sweetheart', 'Techolvan', 'tulare' e 'Van' [18].

É essencial que o cultivo da cerejeira deva ser limitado a regiões temperadas que têm invernos frios para atender à exigência de refrigeração da árvore de cereja e têm verões que permitem o desenvolvimento de frutos de alta qualidade. O bom fornecimento dos nutrientes e água necessários, é extremamente importante no decorrer do período de floração bem como no crescimento, colheita e pós-colheita [17],[19].

Segundo um estudo realizado por Golding *et al.* [18], à temperatura de 0 °C, as cerejas doces demonstraram tolerar níveis de oxigénio relativamente baixos (0,02% de oxigénio por cerca de 21 dias), o que permite um armazenamento mais duradouro. Embora esteja descrito que a temperatura ideal para conservar a cereja esteja próxima de 0 °C, não deverão ser utilizadas temperaturas muito inferiores visto que aumentam o risco de dano [20].

Embora ainda estejam diversos estudos a decorrer, são atualmente reconhecidos os efeitos benéficos da cereja doce para a saúde humana. A cereja é uma fonte de compostos poli(fenólicos), em particular as antocianinas. Estes benefícios estão diretamente relacionados com a diminuição da peroxidação lipídica e consequentemente o efeito adverso dos radicais livres. Também o fato de ser uma

fonte de antioxidantes e compostos fenólicos constitui uma mais-valia para o ser humano no equilíbrio das reações metabólicas [21].

A fase da colheita das cerejas é feita basicamente realizada à mão, evitando o uso de maquinaria por forma a diminuir os possíveis danos causados ao fruto [20].

As cerejas são frutos muito sensíveis aos danos mecânicos e altamente perecíveis apresentando um período de colheita bastante limitado. Este processo requer a realização de ensaios com intuito de viabilizar o seu tempo de armazenamento e que preservem todos os seus componentes. Inevitavelmente, o controlo e monitorização deste produto é fulcral e essencial para um consumo seguro e prevenção da saúde humana. Economicamente, será um processo também vantajoso, o qual perspetiva a diminuição do desperdício alimentar [17],[21].

2.3. Características organoléticas

As características mais valorizadas pelo consumidor apresentam uma cor vermelha escura, um sabor adoçado, um diâmetro elevado (sensivelmente entre 28-30 mm), não apresenta fissuras e tem uma forma arredondada perfeita [22]. A qualidade da fruta é muitas vezes avaliada através da firmeza, uma vez que esta afeta diretamente a duração da vida útil, a aceitação do consumidor e também a suscetibilidade não só a danos mecânicos como também à infeção por microrganismos [23],[24].

Inevitavelmente, as condições climatéricas, de cultivo, tempo de maturação e posterior colheita e armazenamento influenciam diretamente todas estas características, o que define sobre qual das cerejas recai a escolha do consumidor [25].

Como referido anteriormente, algumas das variedades de cereja não são bem aceites pelo consumidor, devido então à discrepância de características entre as mesmas. Consequentemente, esta porção que não tem aceitação pelo consumidor, é considerada um desperdício da cadeia de alimentos, produzidos de uma forma

crecente, que não são favoráveis a nível económico nem escoadas devidamente a nível ambiental. A variedade *Saco*, é um bom exemplo disso, sendo atualmente cultivada apenas em algumas regiões em Portugal. De forma a rentabilizar o produto, as variedades que se encontram nesta situação são utilizadas para recapturar compostos funcionais e bioativos, como os fenóis bem como para o desenvolvimento de novos produtos com potencial económico no mercado [22].

Energeticamente, as cerejas doces são caracterizadas pela sua composição ser predominantemente água (80%), não possuir sódio e ter um baixo teor calórico. Adicionalmente possuem uma percentagem considerável de ácidos orgânicos, fibras, vitaminas, potássio e compostos fitoquímicos. Destes últimos podem ser referidos os compostos voláteis, tais como carotenoides, flavonoides e hidroxibenzoicos [22]. Um grupo de compostos que merece destaque nesta temática é o grupo dos polifenóis, devido à sua aptidão para captar espécies reativas de oxigénio bem como de azoto. As condições climatéricas, genótipo e condições de maturação são os principais agentes de regulação da composição das cerejas doces, nomeadamente os compostos [22], [26].

Os parâmetros significativamente qualitativos da cereja são maioritariamente o peso, a firmeza, o pH do sumo, a acidez titulável, o conteúdo de sólidos solúveis totais, e a cor da película e do pedúnculo. Numa perspetiva de melhorar o fruto da cerejeira, diversos estudos estão atualmente em curso têm como principais metas o prolongamento do período de maturação, aperfeiçoar a qualidade do fruto fresco e transformado e aumentar a resistência às doenças e criar cultivares auto-férteis [19], [27]. É importante referir que a maturidade do fruto varia não só dentro como também entre as árvores; com abertura precoce de flores produzindo frutos maiores. Os parâmetros de cor e sólidos solúveis diminuem com o atraso na antese da flor [23],[24].

Inevitavelmente, o êxito da produção está dependente das condições edafoclimáticas, presentes em todo o ciclo vegetativo da respetiva cultura, tais como a temperatura, geada, precipitação, luminosidade e recursos do solo [19].

2.4. Compostos presentes na Cereja e sua relevância

2.4.1. Introdução

A cereja, *Prunus avium*, contém inúmeros constituintes químicos tais como cálcio, ferro, proteínas, fibras, magnésio, sais minerais, potássio, fósforo, e vitaminas A, B e C. Relativamente aos benefícios que fornece à área da medicina, podem referir-se a capacidade calmante, desinfetante, desintoxicante, diurética, reguladora intestinal, antibacteriana, anti-inflamatória, entre outras. Estas propriedades só serão reconhecidas como benéficas, caso a cereja se encontre em perfeitas condições de consumo, caso contrário não poderá exercer os mesmos efeitos [28].

Nesse sentido, e como tem sido referido ao longo da dissertação, o controlo de qualidade da cereja durante todo o seu percurso é fundamental. Para incorporar um TTI na embalagem existem determinadas características específicas, as quais merecem um estudo intensivo, por forma a estabelecer uma relação entre concentração de certos constituintes com a qualidade do produto [28].

Atualmente já se encontram descritos alguns estudos cujo objetivo residiu em isolar e caracterizar determinados compostos, nomeadamente fenólicos, presentes na cereja, os quais são responsáveis pelas suas particularidades biológicas. É sobre as características destes compostos que as seguintes seções se debruçam [28].

2.4.2. Compostos fenólicos

Nos alimentos, os polifenóis influenciam diretamente a cor, as propriedades sensoriais e as propriedades nutricionais. De forma a melhorar a comercialização, as cerejas bem como outros produtos alimentares são processados de diversas maneiras previamente. Antes do consumo, são aperfeiçoadas as características funcionais e nutricionais bem como os seus atributos e capacidade de preservação [29].

Em produtos hortofrutícolas, existe uma vasta diversidade de compostos fenólicos, resultado das inúmeras combinações da Natureza. Daí que os compostos consequentes se intitulem de polifenóis, repartidos por essencialmente seis classes, como ilustra a Figura 2 [30].

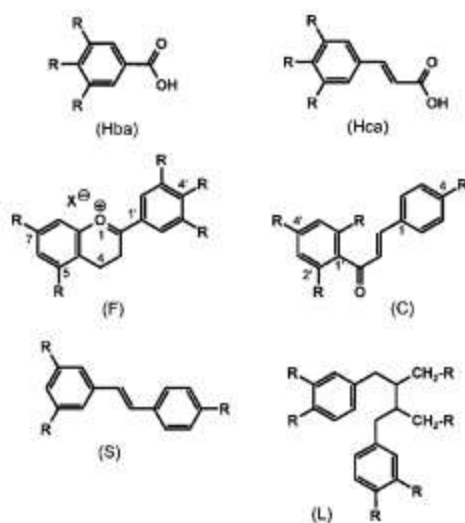


Fig. 2 - Ilustração das estruturas químicas de diferentes polifenóis: Ácidos hidroxibenzóicos (Hba), Ácidos Hidrocinnâmicos (Hca), Flavonóides (F), Chalconas (C), Estilbenos (S) e Lignanos (L). O Grupo R poderá ser constituído por H, OH ou OCH₃ [31].

Como já referido anteriormente, existem inúmeros fatores físicos que influenciam diretamente a qualidade e consequente constituição das cerejas doces, tais como o clima e fatores do solo. Também a intensidade da luz, a temperatura e a maturação do fruto influenciam a estabilidade de fitoquímicos e valor nutricional da cereja, nomeadamente, o ácido ascórbico e o conteúdo fenólico total. Segundo um estudo realizado por Kardilag *et al.* [22], o cultivo da cereja em climas de 25-30 °C, melhora significativamente o conteúdo fenólico total bem como as antocianinas.

As enzimas que determinam as alterações de textura durante o amadurecimento e a maturação da cereja são a pectina metil-esterase, b-galactosidase e a poligalactur-

onase. Estas duas últimas são responsáveis pela solubilização das paredes celulares, provocando o seu amolecimento. Assim, a formação dos principais polifenóis das cerejas (antocianinas e hidroxiciamínicas) ocorre nesta fase de desenvolvimento, contribuindo para a sua atividade antioxidante total, podendo ocorrer também na fase de amadurecimento [23],[32].

Quimicamente, os compostos fenólicos possuem uma nomenclatura variada, devido às diferenças significativas estruturais e são classificados de acordo com o número de anéis de fenol bem como a sua ligação. Naturalmente, os polifenóis, possuem uma estrutura comum, a qual integra um anel aromático rodeado por um ou mais grupos hidroxilo, passando por moléculas fenólicas simples até moléculas com elevado grau de polimerização, como revela a Figura 2 [28]. Nas plantas, os compostos fenólicos são solúveis em água e circulam de forma livre ou ligados a glicósidos ou proteínas; podem destacar-se os fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácido benzoico e cinâmico), cumarinas, estilbenos, flavonoides, taninos hidrolisáveis e condensados, lignanos e ligninas [28],[30].

A síntese de determinados antioxidantes como os polifenóis, depende efetivamente da temperatura e propriedades espectrais da luz [21] .

Os compostos fenólicos desempenham funções intervenientes no crescimento e reprodução de plantas, o que lhes concede não só elasticidade metabólica (alteração de ambientes a que estão expostos) mas também pigmentação. A biodisponibilidade de polifenóis e a sua concentração nos tecidos varia entre eles, dependendo essencialmente da estrutura [28].

No caso específico da cereja, esta possui ácidos hidroxicinâmicos e flavonóides, nomeadamente as antocianinas [28].

As principais vias de biossíntese são a via do Ácido Xiquímico e a do Acetato-Malonato. A primeira, converte precursores de carboidratos, resultantes da glicólise e da via da pentose fosfato, em aminoácidos aromáticos. A acumulação destes compostos nas plantas/frutos pode ser controlado de forma endógena, durante o período de diferenciação e desenvolvimento, ou por outro lado por fatores exógenos como a temperatura e luz [30].

Os flavonóides detêm a estrutura ideal para o processo de neutralização de radicais livre, demonstrando assim as suas aptidões antioxidantes, as quais dependem da sua estrutura. A capacidade antioxidante pode ser influenciada por diversos fatores tais como: reatividade (como agentes doadores de H⁺ ou e⁻), capacidade quelante, interação enzimática, solubilidade e interação com membranas [30].

A principal característica da maturação da cereja é a transição da cor verde inicial para a cor vermelha, originária da acumulação de antocianinas e consequente degradação da clorofila. Este fator é o indicador major de qualidade e maturidade da cereja fresca e o qual se pretende monitorizar [23].

Também as características organoléticas e sensoriais são diretamente influenciadas pelos compostos fenólicos, acumulados na pele do fruto, os quais são substratos da enzima polifenoloxidase, cuja reação de hidroxilação de um monofenol em o-difenol culmina numa oxidação para o-quinona. A enzima polifenoloxidase catalisa a oxidação de polifenóis em quinonas que reagem de forma não enzimática, produzindo pigmentos coloridos. De uma forma geral, é armazenada em plastídios e por outro lado os compostos fenólicos são armazenados em vacúolos, pelo que a enzima só exerce a sua função caso estes compartimentos sofram alterações estruturais. Existente também num estado latente, esta enzima pode ser ativada através de diversos agentes, tais como dodecil sulfato de sódio, o qual provoca a lise celular [33].

As o-quinonas podem intervir em inúmeras reações, culminando assim na coloração acastanhada indesejada de diversos frutos, tais como a cereja. As medidas que permitem evitar esta situação incluem inativação das enzimas por tratamento térmico, recurso a agentes redutores (como o ácido ascórbico) ou eliminação do oxigénio disponível. A polifenoloxidase contém, no seu centro ativo, dois iões Cu⁺ bem como dois resíduos de histidina, cada um no campo do ligando [30].

Num mecanismo organizado, como ilustra a Figura 3, a enzima liga-se primeiramente ao oxigénio e de seguida ao monofenol. Os iões Cu⁺ alteram a sua valência para Cu²⁺ e o complexo resultante apresenta uma forte ligação polarizada (O-O=ligação), resultando numa hidroxilação para o o-difenol, culminando na oxidação deste último resultando o-quinona [30].

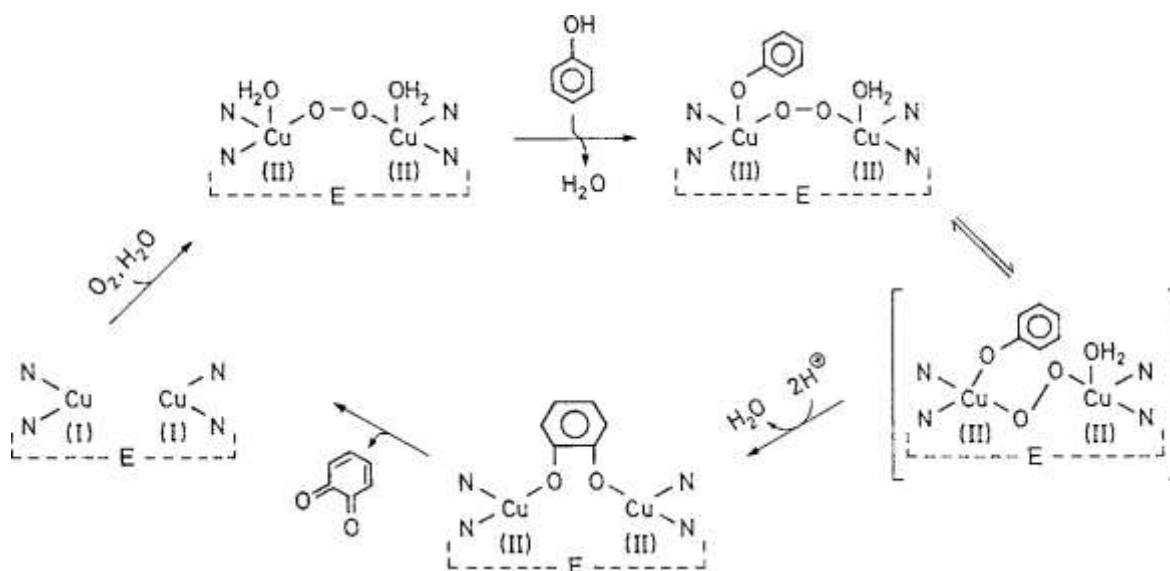


Fig. 3 - Ilustração do mecanismo de ação da polifenoloxidase [30].

2.5. Métodos de conservação

Os produtos hortofrutícolas são tecidos vivos, os quais sofrem transformações constantes no período que sucede a colheita. Destas transformações, algumas são desejáveis para o consumidor, porém muitas delas são encaradas como inconvenientes e prejudiciais para a qualidade dos mesmos, culminando mesmo na perda [34].

Portanto, como todos os produtos alimentares, também os produtos hortofrutícolas independentemente do estado físico, são afetados pelo crescimento e propagação de microrganismos, bem como pelo aumento da atividade enzimática. Este processo vai estar dependente de diversos fatores, dos quais se podem destacar o meio ambiente envolvente, a temperatura, a humidade e também o valor do pH [35].

A variedade das cerejeiras, a sua nutrição, as condições climáticas durante o desenvolvimento bem como a aplicação de tratamentos fitossanitários para controlo de pragas e doenças, são os fatores principais para obter uma fruta com elevada qualidade e uma validade superior. Em especial devem referir-se os tratamentos com

fungicidas para controlo de doenças pós-colheita tais como *Monilinia spp.* Nos Estados Unidos da América, estão referenciados os inibidores Tebuconazol, Propiconazol e Fenbuconazol nos programas destinados ao tratamento e prevenção pós-colheita [20].

O processo de conservação deve ser perspectivado por forma a inibir a propagação microbiana, conservando sempre a qualidade do produto. Por outro lado, um tratamento amplamente utilizado no período pré-colheita é a aplicação de ácido giberélico, que promove uma melhoria da qualidade da fruta e simplificam o seu manuseio e armazenamento. Os principais efeitos nas cerejas pré tratadas são o aumento do tamanho e firmeza, retardamento da colheita e também menos suscetibilidade para desenvolver doenças pós-colheita [20].

De uma forma generalizada, é comum recorrer-se a temperaturas baixas para retardar este crescimento, bem como a temperaturas elevadas para adiar o crescimento. A desidratação, diminuição do pH e diversos aditivos químicos com funções conservantes são outras técnicas de conservação, que permitem controlar o ambiente envolvente ao qual o produto está submetido [36].

O principal objetivo do processo de conservação é prolongar o tempo de vida útil dos produtos hortofrutícolas, seguindo sempre um método seguro e inócuo por forma a estabilizar as características biológicas, químicas e físicas. Além de um interesse económico associado ao processo de conservação, esta visa assegurar segurança e qualidade alimentar ao longo de toda a cadeia de abastecimento alimentar, desde o produtor até ao consumidor final [34],[35].

Na conservação, a utilização do frio é o fator mais relevante para o retardamento das alterações indesejáveis, pelo facto de diminuir a respiração e todas as reações metabólicas que ocorrem. Os efeitos atenuados pela refrigeração controlada no caso particular da cereja são, perda de água (peso e apresentação), deterioração devido a microrganismos (bactérias e fungos) e envelhecimento devido ao amadurecimento. É também importante referir que toda esta gestão permite a obtenção de um retorno económico mais elevado, pela comercialização no período indicado. A principal via de reduzir a transpiração e respiração das cerejas doces, prolongando o período de vida

na prateleira é a eliminação mais rápido possível de calor no meio onde estão introduzidas no máximo nas quatro horas seguidas à colheita.[37].

O transporte deverá ser sempre realizado de forma fechada e preferencialmente em camiões refrigerados e com uma cobertura isolante [20].

Quando armazenadas e posteriormente transportadas a temperaturas inferiores a 2 °C, podem ser conservadas com qualidade durante duas semanas. Caso haja intenção de prolongar este período por mais uma semana, devem colocar-se as cerejas em sacos de polietileno fechados até ao fim do transporte. Os sacos de polietileno podem ser aplicados tanto a embalagens pequenas como caixas ou até mesmo em alguns casos em paletes. Caso a temperatura de armazenamento seja alterada para um valor superior, por exemplo na retirada da loja, os sacos de polietileno utilizados devem ser abertos de imediato e em último caso retirados, por forma a evitar a fermentação e consequente emissão de cheiros indesejáveis [38].

Para além da temperatura, o ambiente ideal de conservação poderá também ser alcançado pela manipulação da concentração de oxigénio e dióxido de carbono e pela manipulação da humidade relativa (por forma a reduzir as perdas de água), através da circulação de ar, pois a temperatura do ar vai subindo à medida que remove calor do produto [34].

No processo de conservação da cereja, a qual é suscetível a lesões causadas pelo frio para temperaturas inferiores a 0 °C, a temperatura ótima para o armazenamento situa-se entre os -1 a -0,5 °C; já a temperatura para transporte deverá estar compreendida entre os 0 e 3 °C. A humidade relativa deve situar-se entre os 90 a 95% e as concentrações de oxigénio e dióxido de carbono deverão ser 0,5 a 2% e 20 a 25%, respetivamente [35].

Todo este processo, como por exemplo o controlo da temperatura, deverá ser adaptado a cada produto alimentar, devido às diferentes reações a diferentes ambientes envolventes, mas também à embalagem em que se encontram [38],[39].

Os principais fatores descritos que geram alterações são os fatores biológicos, nomeadamente a respiração, transpiração e a ação da libertação do etileno, o qual no

caso da cereja (fruto não climatérico), poderá ser utilizado apenas com o intuito de promover a pigmentação da epiderme. A respiração designa-se pelo processo biológico a partir do qual, principalmente hidratos de carbono sofrem transformação para produtos mais simples com conseqüente libertação de calor, dióxido de carbono e água, tendo como combustível da reação o oxigénio. No caso dos produtos frescos, a respiração utiliza os hidratos de carbono (os quais não são repostos após a colheita), até estes se esgotarem. Após este processo segue-se o envelhecimento (senescência) e em último caso a morte dos tecidos, o que resulta numa redução do valor nutritivo, sabor, e peso, seguindo-se o envelhecimento que se designa por senescência. A taxa de respiração no caso da cereja é moderada [34].

A transpiração é a volatilização da água dos tecidos, a qual após perda não é repostada após a colheita. Esta situação acarreta inúmeras desvantagens para o produto que irá ser comercializado, nomeadamente a perda do peso vendável e, por outro, a aparência (emurchecimento) e textura (amolecimento, perda de sumo), as quais podem ser decisivas no momento de aquisição do produto [34],[39].

No caso particular dos produtos hortofrutícolas, a qualidade física é definida maioritariamente pelas fases finais do processo produtivo, colheita e transporte e as conseqüentes condições de armazenamento. Como exemplos de danos físicos nos produtos hortofrutícolas pode destacar-se como muito frequente a formação de fissuras [39].

A relevância de entender e controlar as características do alimento e do ambiente envolvente, prende-se com o facto da atividade dos microrganismos depender de diversos fatores para se desenvolver, dos quais podemos referir a temperatura, humidade e relação tempo/temperatura. O objetivo da refrigeração no retardamento da atividade microbiana reside essencialmente no controlo das reações metabólicas microbianas, as quais são catalisadas por enzimas totalmente dependentes da temperatura, a qual não é o único fator preponderante neste processo [40].

Uma solução para retardar esta situação, é recorrer a novas tecnologias pós-colheita por forma a adiar o aparecimento destas alterações [34].

2.6. Parâmetros de comercialização

A cereja, devido ao rendimento da colheita, exhibe um impacto relativamente baixo no que se refere à produção total de frutos frescos em Portugal. Porém, o seu rendimento não é afetado, visto que é um fruto que gera habitualmente um bom rendimento aos produtores, devido ao seu valor mercantil [14].

O fruto ideal para o mercado norte-americano, podendo transpor-se para os consumidores em geral, deverá ter um peso entre as 11 a 13 g/fruto, uma coloração escura (cor 5 na escala Ctifl), uma dureza de 70 a 75 unidades Durofel, um teor de sólidos solúveis nunca inferior a 15%, uma relação açúcares-ácidos de 1,8 a 2 (calculado através da quantidade de hidróxido de sódio gasta na titulação de 15 ml de sumo) [25],[41].

Em termos de exportação, Portugal apresenta um enorme potencial, a qual está associada a uma procura (consumidor) deste fruto, devido à antecipação da maturação, obtida em especial na região da Cova da Beira devido, como já foi referido, às condições edafoclimáticas [42].

O processo de exportação deverá ter em conta a fragilidade da cereja, adequando cautelosamente o manuseamento deste fruto. O sucesso deste processo, está assim dependente da obtenção de cerejas com a maior qualidade possível, uma dimensão favorável, e adequação de estratégias modernas de pós-colheita e otimização dos circuitos de distribuição e comercialização [42],[43].

Para uma elevada produtividade, em primeira instância, deve proceder-se a uma reconversão de variedades, porta-enxerto e reconfiguração das densidades de plantação. Seguidamente, as práticas culturais devem ser repensadas e modernizadas (poda, rega, fertilização, tratamentos fitossanitários), embora seja um processo moroso e dispendioso, mas indispensável para fazer frente às exigências do mercado de comercialização de produtos hortofrutícolas [42].

No seguimento desta dissertação, devido à globalização e ao incremento da competitividade dos mercados internacionais, os critérios europeus para a distribuição de produtos são cada vez mais rigorosos. Assim sendo, a qualidade dos produtos deve

ser controlada ao longo de toda a cadeia, por forma a garantir a segurança alimentar e também, mas não menos importante, o desperdício alimentar. Atualmente, o consumidor procura avaliar de forma mais intensiva o produto que pretende adquirir, sendo que o fornecimento informação deverá ser o mais completo e perceptível possível [44].

Voltando à questão do desperdício alimentar, a criação de alternativas de escoamento da cereja será uma mais-valia, criando dinâmica no mercado fresco e diminuindo este desaproveitamento. Destas alternativas podem destacar-se a produção de compotas, doces, licor [42].

Por forma a rentabilizar a exportação, a associação dos produtores individuais é crucial para gerar uma dimensão capaz de enfrentar o mercado internacional [42].

Segundo intermediários de mercado, o tamanho da cereja, a firmeza, a aparência visual, sabor e doçura são parâmetros extremamente valorizados, o que não acontece com o alto teor de fitonutrientes. Segundo um estudo realizado [44], em termos de relevância, as características marcantes foram a firmeza (32,7%), a aparência externa (30,5%), a vida útil (26,6%) e o prazo de validade (25,9%). De acordo com as estatísticas, o tamanho da cereja assume-se como um atributo de qualidade que domina a indústria atualmente, afetando os valores de comercialização [44].

Os produtores consideram o tamanho do fruto, seguidamente o sabor, a firmeza e a ausência de danos como parâmetros de produção/comercialização fulcrais. Os intermediários de mercado bem como os produtores, consideram o tamanho mais importante que a doçura e o sabor, embora os primeiros estivessem dispostos a pagar um preço mais elevado pela doçura do que pelo tamanho. Os cultivadores classificam o tamanho mais importante que a doçura e o sabor. Porém os intermediários indicaram que pagariam mais por doçura e sabor em comparação com o tamanho, coincidindo com a apreciação do consumidor final [44], [45].

Perante os estudos existentes, os produtores devem estabelecer como prioridade a doçura e o sabor por forma a satisfazer as preferências dos consumidores. Segundo uma análise de segmentação, as preferências dos consumidores são influenciadas sobretudo pelos atributos demográficos e hábitos de compra. No mercado dos produtos

hortofrutícolas, as empresas ganham vantagem se estabelecerem prioridades e se focarem nas necessidades dos consumidores. Este processo passa por reconhecer os mercados-alvo bem como clientes, adquirindo uma vantagem competitiva através desta segmentação seletiva [46].

2.7. Nota conclusiva

Este capítulo pretende caracterizar a cereja, bem como todas as suas propriedades e característica. Tanto os métodos de conservação como os parâmetros de comercialização, serão úteis para que, posteriormente ao abordar o Estado da Arte, se possa verificar qual oTTI indicado para a monitorização da cereja.

3. Estado da Arte

3.1. Introdução

Como consequência da pressão constante do consumidor, a legislação referente à segurança e qualidade dos alimentos está cada vez mais rigorosa e exigente. Para garantir a segurança dos seus produtos, os fabricantes utilizam diversas técnicas de monitorização de alimentos, conforme exposto na Tabela 2. Comumente, nos processos de transformação são utilizadas técnicas que aplicam elevadas temperaturas por forma a reduzir a quantidade de microrganismos e esporos, os quais são responsáveis por intoxicações alimentares ou mesmo a degradação dos próprios alimentos [47].

Tabela 2. Exemplos de indicadores externos e internos e respetivos princípios de funcionamento utilizados em embalagens inteligentes [47].

Técnica	Princípio/Reagentes	Informação fornecida	Aplicação
TTIs	Mecânicos, Químicos e Enzimáticos	Condições de armazenamento	Alimentos armazenados em condições refrigeradas e congeladas
Indicadores de Oxigénio	Corantes Redox, Corantes pH, enzimas	Condições de armazenamento ou informação acerca vazamento do pacote	Alimentos armazenados em embalagens com concentração reduzida de oxigénio
Indicadores de crescimento microbiano e indicadores de frescura	Corantes de pH, todos os corantes que reagem com metabolitos	Qualidade microbiana dos alimentos	Alimentos perecíveis
Indicador de agentes patogénicos	Vários métodos químicos e imunoquímicos que reagem com toxinas	Bactérias patogénicas específicas	Alimentos perecíveis

A qualidade das frutas e legumes frescos geralmente diminui com o tempo durante o armazenamento, resultado de reações bioquímicas, sendo uma etapa normal do metabolismo do produto. Inevitavelmente, esta degradação da qualidade está sujeita a diversos fatores que contribuem na reação, tais como a composição do gás e a temperatura de armazenamento [48].

O principal objetivo dos fabricantes é sobretudo oferecer produtos seguros com o valor nutricional máximo possível. As duas técnicas mais utilizadas na avaliação de processos térmicos são a abordagem *in situ* e o método físico-matemático. No método *in situ*, as alterações no produto são monitorizadas antes e após o processamento, para fornecer informações diretas e exatas sobre o estado do mesmo. Contudo, na prática, a medição da contagem microbiana, da textura, do conteúdo vitamínico e da qualidade organolética é laboriosa, demorada, dispendiosa e, em alguns casos, impossível devido ao limite de deteção do valor analítico de técnicas disponíveis e/ou requisitos de amostragem. No método físico-matemático, o gráfico de estudo da temperatura em função do tempo, reconstruída por modelagem matemática, conciliada com o conhecimento da cinética do produto alimentar no que se refere à segurança e qualidade, permite calcular o impacto de um tratamento térmico sobre o critério de interesse [49].

Todavia, a necessidade da obtenção da curva tempo-temperatura influencia a aplicabilidade e fiabilidade deste método pelo facto de esta ser obtida de forma direta, não sendo adequado em diversas condições de processamento. Um exemplo desta limitação é por exemplo, ligar sensores de temperatura a partículas em misturas sólido-líquidas processadas numa retorta rotativa, o que pode perturbar a livre circulação do sólido e levar a interpretações erradas do histórico de temperatura [50].

A RFID (*Radio Frequency Identification*) com indicadores de temperatura é um *microchip* combinado com uma antena num pacote compacto. A embalagem é estruturada de forma que a RFID seja vinculada a um objeto a ser rastreado. A constituição da RFID também incorpora memória, uma bateria e um relógio para gravar os dados do sensor na memória em intervalos constantes. A principal vantagem é permitir o registo de informações de tempo-temperatura e executar a

gestão da mesma em várias empresas, adquirindo os dados de forma independente, sem exigir que outras empresas realizem o trabalho necessário para a gestão da temperatura. Do ponto de vista económico, o sistema pode ser fabricado a um preço relativamente reduzido [51].

A dinâmica de fluidos computacional (*Computational Fluid Dynamics* - CFD), é uma técnica alternativa que permite solucionar problemas do escoamento de fluidos com transferência de calor. A CFD baseia-se numa malha computacional constituída por volumes de controlo na qual foi discretizada geometria do fluido de interesse. Esta técnica é atualmente considerada uma mais-valia na medida em que é uma ferramenta poderosa de projeto e análise para o engenheiro agroalimentar [52]. Todavia, a CFD destina-se à simulação do processo e não à avaliação em tempo real da evolução das condições de conservação dos produtos [52].

3.2. Rastreabilidade

O tempo de vida útil de um produto é “apresentado” ao consumidor final através do rótulo presente na embalagem, dando a conhecer a natureza bem como as características do género alimentício. Esta informação tem um papel mais importante do que aparenta, sendo uma responsabilidade que é imposta na medida em que o consumidor é informado e entende corretamente o significado das citações do rótulo. Este processo de compreensão é fundamental e pode ser um critério fulcral na diminuição do desperdício alimentar [10].

Pretende-se assim que, com a informação disponibilizada, o consumidor esteja ciente de que o consumo do produto em causa não representa um perigo para a sua saúde, daí que o objetivo será sempre fornecer informação mais precisa e em tempo real possível [10].

Neste contexto, deve dar-se especial atenção aos alimentos mais desperdiçados, que por consequência são os produtos que devem ser consumidos em maior proporção numa dieta alimentar equilibrada, os alimentos perecíveis. Este grupo

inclui assim frutas e vegetais, pão e produtos afins, lacticínios, carne e peixe, os quais são mais suscetíveis a degradação por ação do tempo, luz e armazenamento [10],[31].

O facto de não existirem dados concretos acerca do desperdício alimentar em Portugal, é crucial definir as etapas onde este processo pode ocorrer. As etapas da cadeia de abastecimento alimentar onde pode ocorrer o desperdício, estão descritas na Figura 4.

Fig. 4 - Etapas da cadeia de abastecimento alimentar onde pode ser feita a gestão do desperdício alimentar [10].



A tendência vigente prolonga a cadeia alimentar resultando assim num aumento da distância física e temporal entre o produtor e o consumidor final. A monitorização deverá assentar na criação de infraestruturas de armazenamento e conservação, diminuindo o desperdício [10]. Pormenorizando o caso específico desta dissertação, os produtos hortofrutícolas, dada a sua perecibilidade requerem especial atenção no que se refere às condições de armazenamento, as quais são bastante variáveis. Em Portugal, o incumprimento de determinados padrões de qualidade exigidos para o consumo como a forma, grau de maturação, cor ou textura, culmina num direcionamento dos produtos para a indústria agroalimentar/rações, comercializada a um preço inferior mas sustentando a questão da redução do desperdício [10],[48].

A distribuição faz a ponte entre produtores e consumidores, devendo estar associada a uma logística adequada e estratégias comerciais para redução desta questão.

Atualmente em Portugal, os produtos perecíveis são comercializados em embalagens convencionais, as quais executam apenas as quatro funções básicas: conter, proteger, comunicar e conferir conveniência. Estas funções excluem qualquer interação entre a embalagem e o seu respetivo conteúdo durante todo o processo do produto desde a produção, passando pelo armazenamento e finalizando na distribuição [31]. Com o progresso da tecnologia, as embalagens convencionais estão, ainda que lentamente, a ser substituídas pelas embalagens denominadas por “ativas” e “inteligente”, as quais diferem entre si, mas que têm uma característica em comum: interagem diretamente com o produto, como exemplificado na Figura 5. Como vantagens desta interação, podemos destacar a possibilidade de controlar a qualidade dos produtos, bem como garantir a sua qualidade. O consumidor obtém assim mais informação do produto que tem interesse em adquirir, podendo avaliar o processo até ao momento do consumo final [31].

Fig. 5 - Ilustração das funções básicas das embalagens e interface de atividade das novas embalagens, ativa e inteligente [31].



Esta necessidade de evolução baseia-se na necessidade de controlar a qualidade de produtos perecíveis, a qual diminui naturalmente no período de tempo desde o

produtor até ao consumidor final. O processo de degradação é consequência de uma série de reações bioquímicas as quais ocorrem no produto durante o processo de armazenamento, e que dependem diretamente da atmosfera de armazenamento da embalagem e da variação da temperatura ao longo do tempo [53],[54].

Desde sempre têm vindo a ser desenvolvidos modelos de qualidade de forma a prever a qualidade de diferentes produtos perecíveis, estando sujeitos a ambientes distintos tanto ao nível da temperatura a que estão sujeitos bem como da composição atmosférica. Estes fatores são peculiarmente importantes não só quando os produtos estão dispostos em grandes salas de armazenamento a granel, mas também pelo importante facto de os produtos gerarem calor durante todo o processo de armazenamento [53].

Primeiramente, a monitorização da temperatura em alimentos recorria a métodos invasivos tais como termopares e termístores, tanto em partículas estáticas como em partículas em movimento. Este processo, embora forneça alguma informação das condições do produto, não é representativo do processo real de degradação [53],[54].

Atualmente, na prática, a melhoria da eficácia deste processo de monitorização alcançou-se através dos TTI, pela sua capacidade de avaliar este processo de degradação ao longo do tempo, sem qualquer histórico de informação das circunstâncias prévias a que o produto esteve sujeito [54].

3.3. Ferramentas e métodos de monitorização de parâmetros

3.3.1. Dispositivos integradores de temperatura

Para transpor as limitações e desvantagens inerentes a estes dois métodos apresentados anteriormente, os TTIs foram desenvolvidos como alternativa para a monitorização destes processos, especialmente de produtos perecíveis [51]. Um

TTI pode ser definido como "um pequeno dispositivo de medição que mostra uma mudança irreversível mensurável, dependente da temperatura, que de forma fácil e precisa ilustra as mudanças de um atributo de destino, estando sujeito à variação da temperatura". A equação 1, expressão de Arrhenius ilustra a dependência de temperatura da função de qualidade do produto [55],

$$\propto k_{Aref} \exp\left(\frac{-E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right) \quad [1] \square$$

onde k_{ref} é a constante cinética da reação a uma temperatura referência T_{ref} , E_a é a energia de ativação (sensibilidade à temperatura) da reação que controla a perda de qualidade e R é a constante universal dos gases.

O atributo de destino poderá ser qualquer relacionado com questões de segurança ou por exemplo inativação de microrganismos (esporos), perda de uma determinada vitamina, textura ou cor. Forçosamente, a alteração ocorrida durante o processo térmico terá de ser irreversível para ser passível de quantificar o impacto do processo após o processamento. Excecionalmente, após a leitura do sistema de monitorização, existe a possibilidade de reverter a mudança para reutilizar o indicador [49].

Os TTIs são atualmente classificados em três diferentes categorias [56]:

- Os indicadores críticos de temperatura, os quais evidenciam a variação da temperatura em torno de um valor de referência;
- Os integradores críticos temperatura / tempo, úteis para detetar quebras na cadeia de distribuição; são também utilizados para avaliação de qualidade e segurança de produtos cujas reações surgem a taxas mensuráveis acima de uma temperatura crítica (tais como reações de crescimento microbiano ou atividade enzimática).

- Os integradores ou indicadores de temperatura temporal, os quais fornecem uma resposta contínua da variação da temperatura ao longo de um período de tempo [56].

Os TTIs são usados como dispositivos económicos e de fácil utilização para monitorizar, registar e traduzir o efeito da temperatura na qualidade dos alimentos na cadeia de refrigeração até ao seu consumo [56].

Estes dispositivos contêm uma substância lábil, que sob um tratamento térmico sofre alterações irreversíveis que podem ser quantificadas. São relativamente pequenos (alguns cm de tamanho), possibilitando uma monitorização resistente aos choques térmicos, os quais podem ser neutralizados a partir de materiais com a mesma condutividade térmica que o alimento. No que se refere ao seu formato, estes podem ser modificados para simular partículas de alimentos e podem ser colocados dentro de uma partícula sem interferir com o movimento do fluido [50].

A principal vantagem dos TTIs é a aptidão para quantificar o impacto integrado tempo-temperatura do atributo alvo sem quaisquer informações sobre o histórico do tempo real e temperatura do produto. Os TTIs podem ser usados como uma ferramenta alternativa na conceção do processo, na avaliação de processos bem como na otimização dos mesmos quando a abordagem dos métodos convencionais são inviáveis [48].

Todos os TTIs são, por definição, indicadores *post factum* do impacto de um processo térmico, pois o cálculo do impacto no processo de alteração baseia-se na modificação do estado do TTI após exposição térmica, comparativamente com o seu estado inicial. Os TTIs podem ser usados para calcular a contribuição de cada etapa para o impacto total/final do processo, porém, o tempo após o processamento térmico necessário para avaliar o impacto total, depende da natureza do sistema de monitorização: por exemplo, os ensaios microbiológicos são demorados (vários dias), ao invés da avaliação da atividade enzimática e quantificação de um composto químico, os quais são extremamente mais rápidos (minutos) [49].

Naturalmente, devido à variedade de enzimas e substratos que existem e podem ser empregues numa reação, existem assim várias energias de ativação das reações, as quais estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Valores estabelecidos das energias de ativação das reações de degeneração que ocorrem nos alimentos [53].

Reação	Energia de Ativação [kcal·mol ⁻¹]
Oxidativa	10-25
Enzimática	10-30
Perda de Vitaminas	20-30
Escurecimento não enzimático	25-50
Agentes patogénicos	45

Idealmente, as características de um TTI ideal estão claramente definidas, tendo como principal requisito evidenciar uma alteração com o aumento da temperatura, não existindo a possibilidade de reversibilidade. Outras características de um TTI são [57]:

- A mudança deverá ser contínua, fiável e dependente dos fatores tempo-temperatura.
- A resposta tem de ser mensurável e irreversível.
- A alteração deverá estar diretamente relacionada com a degradação progressiva da qualidade bem como do prazo de validade do alimento.
- O custo deverá ser baixo.
- Para além de pequeno, deverá ser flexível por forma a facilitar a integração tanto no processo de embalagem como na embalagem.
- Deverá ser facilmente ativado, não sendo afetado por condições ambientais.
- A resistência a abusos mecânicos deverá ser uma característica imperativa para os TTI.

- A resposta deverá ser visualmente compreensível e adaptável à medição por equipamentos eletrônicos (para armazenamento e uso posterior)
- Não deverá ser tóxico, preservando a segurança do consumidor e deve transmitir a informação de uma forma suficientemente clara a todos os utilizadores.

É de extrema importância referir que a temperatura não é o único fator determinante da taxa, daí que o uso de apenas um TTI para monitorar a segurança alimentar ou a qualidade induziria em erro, pelo facto de outros fatores variáveis com o tempo poderem alterar também estes parâmetros em avaliação, tais como o teor de humidade e a pressão [48],[49].

3.3.2. TTI enzimático

A variação da temperatura ao longo do tempo pode ser facilmente monitorizada. Quando é efetuada uma referência a sistemas enzimáticos, há certas propriedades que determinam os parâmetros cinéticos para inativação térmica. Podem-se ser referidos a sensibilidade à temperatura da constante de velocidade (valor E_a) e a constante de velocidade (k_{TTI}). A maior parte das enzimas usadas no desenvolvimento de TTIs revelam uma estabilidade térmica relativamente natural [58].

A variação da temperatura ao longo do tempo pode ser facilmente monitorizada.

O CheckPoint® TTI apresenta-se como um rótulo adesivo, o qual reage ao tempo e à temperatura de forma semelhante à do produto alimentar. Este processo possibilita uma avaliação dos parâmetros qualitativos do produto em estudo, visto reagir à atividade enzimática existente [56]. Este tipo de TTI assenta num princípio fisiológico, visível, ou seja traduz-se numa alteração de cor, a qual é devida a uma diminuição do pH. Esta variação do pH é consequência da hidrólise enzimática controlada de um determinado substrato lipídico. O processo de

hidrólise vai provocar uma libertação de um ácido, a qual permite verificar através da alteração progressiva da cor, partindo de um verde profundo e culminando num vermelho-alaranjado, tal como ilustra a Figura 6 [56].



Fig. 6 - Ilustração do processo de hidrólise . A) Estado primordial da cor do TTI (verde); B) Estados vermelho-alaranjado, o qual indica que o produto não está apto a ser consumido; C) O TTI apresenta uma coloração branca, o que significa que não foi ativado, não podendo efetuar a monitorização do estado de conservação do produto [59].

Consoante o produto em estudo, podem efetuar-se diferentes combinações de enzima-substrato. De forma a gerar várias respostas aos fatores tempo e temperatura, podem utilizar-se diferentes concentrações desta dupla. O dispositivo CheckPoint® está disponível em duas configurações, I para configurações básicas e III, para configurações mais complexas (ponto triplo por exemplo) [56]. Os TTIs enzimáticos conhecidos até então empregaram substratos cromogénicos sintéticos (muito dispendiosos), os quais são hidrolisados para produzir cor [56].

Um exemplo de substratos cromogénicos é o orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG), frequentemente requisitado para a deteção de coliformes totais. Aquando da utilização desta técnica, o conjunto de bactérias designado por coliformes totais, é designado como aquele onde as bactérias possuem a enzima β -Dgalactosidase, cuja função é hidrolisar o substrato cromogénico e consequentemente provocar alterações na cor do teste [60].

Idealmente, caso uma enzima utilizasse pigmentos naturais como se fosse o seu substrato natural, um TTI ao produzir essa enzima proporcionaria inúmeras

vantagens, tais como uma visibilidade melhorada, um custo reduzido e um maior espectro de cor [56],[61].

De forma a inovar nas tecnologias existentes dos TTI, a União Europeia solicitou a realização de um estudo sobre novos indicadores denominados Fresh-Check®. As conclusões do estudo foram bastante esclarecedoras, dado que a mudança de cor evidenciou uma boa correlação com a qualidade sensorial e microbiológica dos produtos em estudo [62]. O Fresh-Check® baseia-se então numa reação química de polimerização, onde o monómero acetilénico incolor polimeriza e torna-se opaco. A reação dependente da temperatura, dá-se no estado sólido, tendo como produto final da reação um polímero colorido, à medida que o monómero polimeriza [35]. Esta formação do polímero, a qual é acompanhada da mudança de cor, é explicada pela diminuição da refletancia. Sendo a refletância a proporção entre o fluxo de radiação eletromagnética incidente numa superfície e o fluxo que é refletido, há uma clara diminuição deste último [63].

O formato do TTI é circular, pelo que a cor do centro “ativo” é avaliada e comparada com a cor de referência do anel circundante, sendo que a mudança de cor estende-se desde o transparente até um limiar de preto. Numa fase prévia à utilização deste TTI, há que ter o cuidado de proceder ao seu armazenamento (a cerca de -24° C) ainda congelados, visto estes estarem ativos durante o fabrico por forma a melhorar o rendimento da reação química [63]. O indicador Fresh Check® pode ser aplicado a uma embalagem, num formato autoadesivo, como um círculo rodeado por um anel de cor escura, como ilustra a Figura 7 [63].

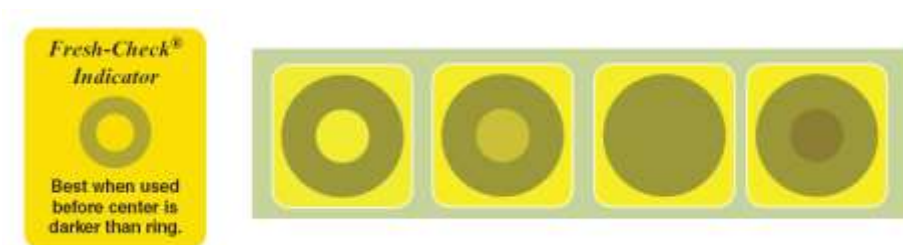


Fig. 7 - Ilustração de um TTI baseado num polímero Fresh-Check® [63].

Seguramente, os consumidores não deverão consumir o produto caso o círculo interior for relativamente mais escuro que o anel exterior. Esta alteração progressiva que permite fazer esta análise, deriva da transmutação da temperatura do produto ao longo do tempo, o que nos dá uma indicação precisa do estado de frescura do mesmo [64].

O OnVu™ é também um TTI, desenvolvido pela CIBA Specialty Chemicals, multinacional com sede na Suíça especializada em química e FreshPoint, empresa de tecnologia israelita especializada em novos projetos para a indústria de embalamento [65].

Este TTI possui a forma característica de uma “maçã” com formato de coração, como apresentado na Figura 8, a partir da qual podemos retirar as elações acerca do estado de conservação do produto [66].



Fig. 8 - TTI fotocromico em estado sólido OnVu™ [65].

Face aos outros TTI's, o OnVu™ pode ser armazenado à temperatura ambiente, uma vez que só será ativado por luz ultravioleta (UV) e pode ainda ser aplicado na embalagem, como um rótulo ou impresso diretamente na mesma. A luz UV induz a coloração da tinta ativa (centro da “maçã”) de incolor a azul (ativação) [66]. Estes indicadores personalizados são também bastante precisos e consistentes na monitorização da frescura dos produtos, tendo como indicadores o tempo e a temperatura a que são expostos, como se pode verificar na Figura 9. Assim sendo, o OnVu™ pode ser considerado um indicador de frescura, não

substituindo o prazo de validade, mas sim providenciando um complemento de informação [67].



Fig. 9 - Ilustração da mudança de cor do OnVu™, em função dos fatores tempo e temperatura, onde é perceptível a maior influência da temperatura face ao tempo [66].

A dinâmica de funcionamento baseia-se numa reação fotocromica em estado sólido, a qual ocorre devido à presença de cristais orgânicos que alteram a cor consoante a variação da temperatura registada, tal como demonstra a Figura 10 [65].

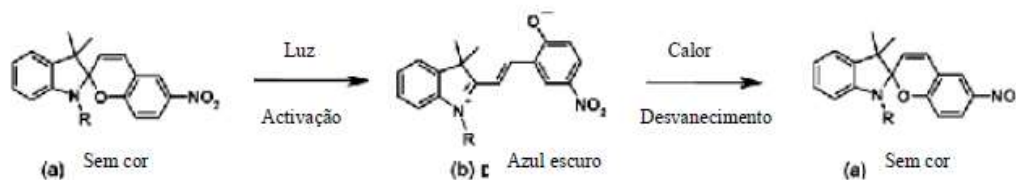


Fig. 10 - O ciclo de reação do sistema fotocromico. A exposição à luz UV (a) induz a coloração (b) enquanto o calor (c) promove a reação inversa [63].

Os cristais orgânicos presentes no OnVu™ constituem a base para o pigmento que é utilizado na formação da tinta de água que possibilita a mudança de cor, o que neste caso é perceptível com a mudança de incolor para azul-escuro após a irradiação com UV [65].

O pigmento fotocromico orgânico pertence à classe dos espiropiranos, que são moléculas orgânicas heterocíclicas ligadas através de um carbono assimétrico comum aos ciclos, e existe em dois estados fundamentais: o estado A (incolor, estável) e estado B (azul, metaestável) [63].

Por forma a compreender quando se está perante o fim de vida útil do TTI, este é definido como o tempo necessário para que a cor da mancha fotocromica azul atinja a cor referência impressa em formato de anel em torno dessa mesma tinta. A durabilidade do processo de esmorecimento da cor, e naturalmente, o termo da vida útil do TTI, devem ser calibrados considerando as características do produto tais como a data de validade. A impressão das etiquetas, é efetuada num tipo de papel adequado, de forma a aumentar o desempenho reprodutível do TTI [63], [65].

3.4. Nota conclusiva

Assumindo que o TTI enzimático, é sem dúvida o mais adequado para a monitorização do estado de conservação da cereja, é agora crucial estudar a cinética de crescimento microbiano por forma a estabelecer em padrão. O objetivo é conhecer este mecanismo por forma a estabelecer uma conexão com a reação enzimática escolhida.

4. Modelos Cinéticos de Crescimento Microbiano

4.1. Introdução

Durante o período pós-colheita, as fissuras e contusões são os danos mais frequentes nas cerejas, e são consequência direta da rutura e colapso das células do mesocarpo, originado pelo impacto e compressão das frutas durante o desenvolvimento, colheita, transporte e consequente manuseio [18],[20].

Os fungos patogénicos que surgem no período pós-colheita da cereja são uma das principais causas de perdas no mercado fresco. Em cerejas doces, os principais microrganismos patogénicos responsáveis pela alteração dos parâmetros de qualidade da cereja são essencialmente: *Penicillium expansum*, *Monilinia fruticula* (spp), *Botrytis cinerea*, *Alternaria* spp e *Rhizopus stolonifer*, dos quais alguns dos seus efeitos na fruta se podem verificar na Figura 11. Estes dois últimos são responsáveis pelo amadurecimento excessivo da cereja, criando o aspeto visual de podridão do fruto [20].

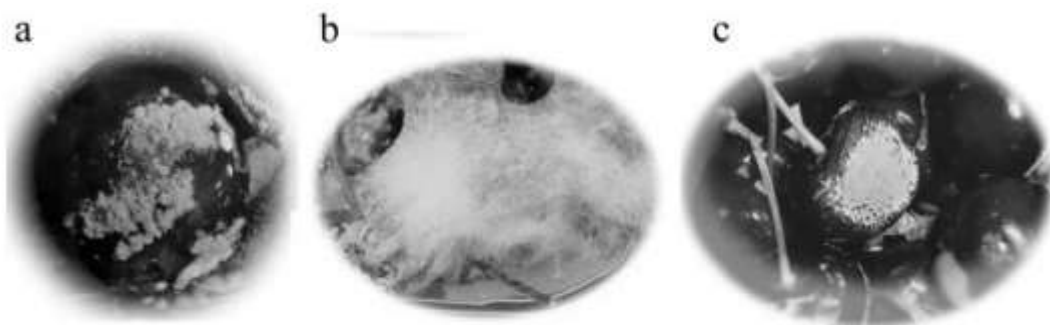


Fig. 11 - Principais danos pós-colheita causados na cerejeira pelos fungos visualizados ao microscópio ótico (a) *Monilinia fruticula*, (b) *Botrytis cinerea* e (c) *Penicillium expansum* [20].

Os fungos desenvolvem-se a temperaturas superiores a 4°C, pelo que é recomendado que o armazenamento seja feito a uma temperatura de 0°C, a fim de evitar a sua propagação. Visualmente, o processo inicia-se com o escurecimento, surgindo uma mancha de cor castanha, evoluindo progressivamente para uma espécie de pó, que se designa por esporos, na superfície do fruto. Estes esporos por vezes possuem um tamanho tão reduzido que confere uma coloração acinzentada à cereja [18].

As condições climáticas que propiciam esta situação são fundamentalmente ambientes húmidos e com temperaturas a rondar os 20-26 °C, frequente nas diferentes fases do processo de transporte, e na fase pré-venda. Tendo em consideração que os danos surgem maioritariamente após vários dias à temperatura atmosférica ou a longo prazo a baixas temperaturas, a temperatura de 7°C é recomendada para reduzir os eventuais danos durante este processo [20].

4.2. Combase

O ComBase é uma ferramenta disponível *online*, recentemente redesenhada para facilitar o acesso (como ilustra a Figura 12), que permite prever o comportamento microbiano em alimentos. Assim, o produto final pretende descrever como os microrganismos sobrevivem e proliferam expostos a determinadas condições pré-definidas, as quais influenciam diretamente os alimentos.[68]



Fig. 12- Página inicial da ferramenta ComBase, com acesso disponível:

<http://www.combase.cc/index.php/en/>

Os pilares desta ferramenta são o banco de dados ComBase e o Predictor ComBase, baseado em dados armazenados no primeiro [68].

Para empresas que desenvolvem não só novos produtos como também novas formas de armazenamento mais seguras, o ComBase é uma ferramenta bastante útil, a qual utiliza uma interface do utilizador muito simples [68].

Atualmente, existem mais de 50.000 registos, que descrevem o comportamento de diversos microrganismos sob condições variáveis de temperatura, pH, constituição da atmosfera entre outros. Cada registo representa como as concentrações de células microbianas, ou a sua taxa de crescimento específica máxima varia para diferentes combinações de fatores ambientais. A plataforma ComBase foi recentemente redesenhada para torná-la ainda mais acessível. A interface da web agora pode ser acedida facilmente em qualquer plataforma, incluindo dispositivos móveis, de forma amigável [68].

4.3. Cinética Microbiana: Dedução para o caso específico da cereja

Devido à presença de compostos fenólicos, fibras, antocianinas e flavonóides, a cereja e os frutos em geral, são componentes essenciais para uma dieta saudável. Estes possuem propriedades que lhes permitem interagir com biomoléculas tais como as enzimas, o que resulta na manutenção da saúde humana [69],[70].

Contudo, como já foi referido, devido à elevada perecibilidade da cereja, a vida útil é reduzida e o armazenamento torna-se um desafio para os produtores. Apesar de existirem diversos métodos que promovem o aumento desta vida útil, tais como o uso de produtos antimicrobianos e fungicidas, a preocupação com a saúde alimentar bem como o elevado custo limitam a sua utilização [69].

A cereja, uma das frutas mais perecíveis, tem elevado valor no mercado, justificado pela sua cor atrativa, doçura, acidez, firmeza e propriedades benéficas como o poder antioxidante. A estação, o período de colheita e as suas características peculiares, tornam a cereja extremamente suscetível não só a

distúrbios fisiológicos bem como o desenvolvimento de diversos fungos. As principais causas de deterioração da cerejeira são assim, a perda de peso, alterações da cor, amaciamento e feridas causadas ou na fase de colheita ou de embalagem [23].

Relativamente os fungos, estes causam perdas económicas bastante consideráveis, pela deterioração originada pelo metabolismo fermentativo que culmina na produção de etanol e acetaldeído. Estes compostos originam assim alterações nas propriedades físicas e consequentemente nas propriedades do paladar [71].

A patologia mais grave é o cancro bacteriano causado por *Pseudomonas syringae* [71]. Através do Combase, podemos prever qual a cinética microbiana da função logarítmica que traduz o crescimento da bactéria em função do tempo. O objetivo principal é verificar quando é atingida a dose infetante, e daí prever quando se inicia o processo de degradação. Os valores limite das doses infetantes de microrganismos patogénicos, estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Valores limite de dose infetante para microrganismos patogénicos [71]

Microrganismo	T _{min} [°C]	Colónia inicial [UFC/g]	Colónia infetante
<i>Bacillus cereus</i>	5,0	1000	>10 ⁵
<i>Escherichia coli</i>	10,0	100	>10 ⁶
<i>Listeria monocytogenes</i>	1,0	20	>10 ²
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,5	20	>10 ⁵
<i>Salmonella</i>	7,0	100	>10 ⁵
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-1,0	100	>10 ⁷
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	0	100	>10 ⁷
<i>Pseudomonas spp.</i>	0	100	>10 ⁷

Como podemos verificar na Figura 13, a dose efetiva é atingida sensivelmente passadas 29 horas, o que ignifica que a partir deste instante, deverá ser realizada monitorização com maior acuidade.

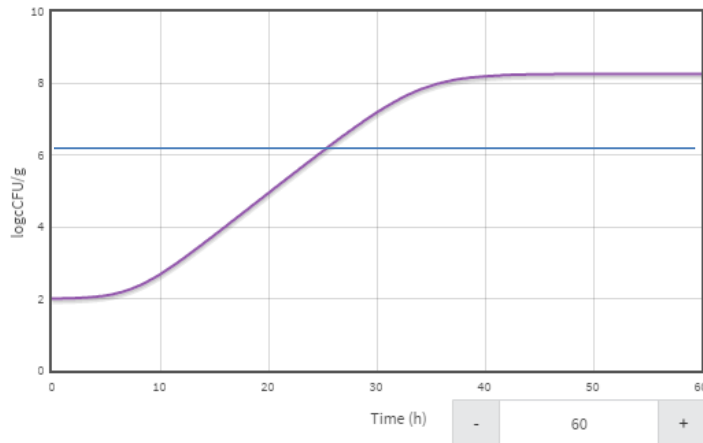


Fig. 13- Gráfico ilustrativo da cinética de crescimento da bactéria *Pseudomonas*, para uma exposição à temperatura de 20°, pH 7 (valor máximo), dose infetante 100 UFC/g (Unidade formadora de colónias) durante um período de 24 horas. [72]

Para quaisquer bactérias, o comportamento pode ser previsto, tendo em conta os diferentes estádios da função logarítmica que descreve a evolução do crescimento, como ilustra a Figura 14.

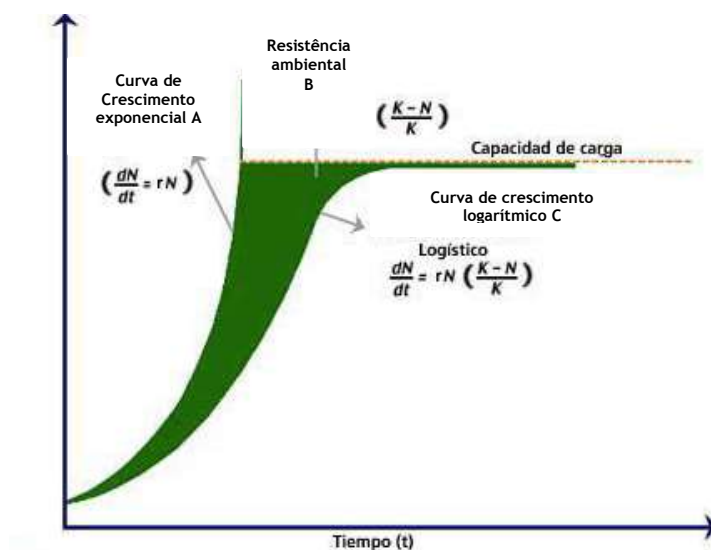


Fig. 14- Representação gráfica do modelo genérico de crescimento microbiano, em que A representa a fase de crescimento exponencial, B a fase de resistência às condições ambientais e por fim C, a fase de crescimento logarítmico que irá refletir a “capacidade de carga”, ou seja o limite de dose infetante crescimento segundo as condições envolventes. [23]

Comercialmente, as cerejas são comumente embaladas tanto em caixas de papelão dentro de forros de filme de polietileno como em caixas de madeira, embora menos frequente. O empilhamento em paletes dificulta assim a remoção de calor nestas condições de embalagem, resultando assim em atmosferas variáveis aumentando a taxa de deterioração [71].

Por forma a combater esta situação, recentemente foram desenvolvidas as embalagens de atmosfera modificada (MAP), com intuito de aumentar a vida útil da cereja e reduzir perdas pós-colheita. Esta tecnologia combinada com a refrigeração, atrasa as alterações físico-químicas, retarda a deterioração microbiana e alteração da cor por redução da oxidação. Está descrito também que, o dióxido de carbono deprime o crescimento de espécies bacterianas anaeróbias e vários fungos a baixas temperaturas. Porém, caso não se estabeleça um equilíbrio entre elevadas concentrações deste gás com a refrigeração apropriada, podem surgir alterações da cor bem como do sabor [69], [71].

No caso específico do oxigénio, este deve ser diminuído para um valor mínimo, nunca excluindo totalmente a sua presença, pelo fato de favorecer o crescimento anaeróbio específico da bactéria *Clostridium botulinum* (proteolítica, não sendo necessária ativação da toxina) [71]. A cinética de crescimento desta bactéria está exemplificada na Figura 15., e a dose infetante é atingida sensivelmente às 36 horas.

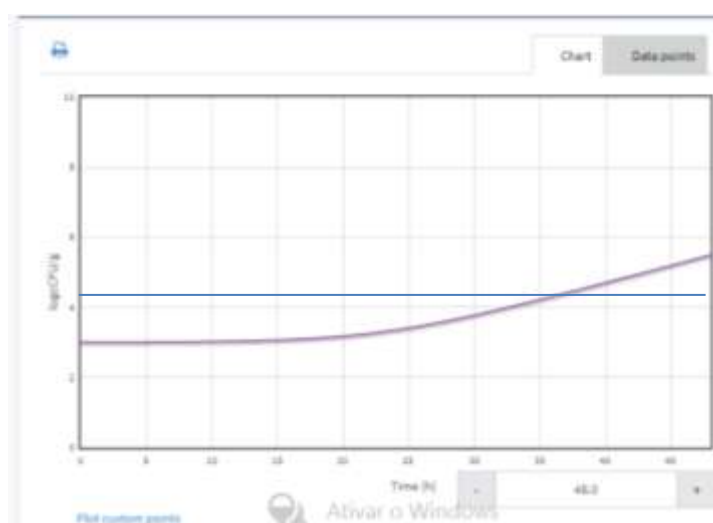


Fig. 15- Representação gráfica da cinética de crescimento da bactéria *Clostridium botulinum*, para um período de tempo de 48 horas, exposta a uma temperatura de 20°, pH 7 num ambiente totalmente desprovido de oxigénio e dose infetante 1 UFC/g (Unidade formadora de colónias).

Embora vantajoso, assim como os TTI este processo de MAP ainda não está implementado em Portugal.

Outras alterações são causadas por outros géneros de fungos, tais como *Botrytis*, *Penicillium* e *Monilinia*. Estes agentes patogénicos podem infetar a cereja tanto no pomar como no armazenamento pós-colheita. Naturalmente, quando exposta a períodos de armazenamento mais longos com constante desvio da temperatura

ideal de conservação, os efeitos são cada vez mais nocivos e destruidores. Seguidamente será descrito o caso específico do género *Monilinia*.

4.4. Microrganismos: Caso particular do género *Monilinia*

Um pouco por todo o mundo, os fungos pertencentes ao género *Monilinia*, são agentes patogénicos que afetam maioritariamente a produção de frutas. De um modo pormenorizado, este género de fungos é responsável pelos danos irreparáveis nas árvores frutíferas, responsáveis pela coloração castanha, vulgarmente designada por “podridão”, como ilustra a Figura 16 [73].



Fig. 16 - Efeito o fungo género *Monilinia*, no caso particular da cereja Disponível em: <http://www.gettyimages.ae/detail/photo/sweet-cherry-infected-with-brown-rot-high-res-stock-photography/128134204>

No setor económico, é impossível não atribuir responsabilidade às inúmeras perdas nos pomares que este fungo causa. Diversos estudos estão em curso por forma a identificar uma causa para este flagelo, o qual está a aumentar cada vez mais, nomeadamente se existem diferenças entre hospedeiros que propiciem esta resposta, tendo por base as propriedades morfológicas, culturais e genéticas [72].

A nível sintomático estão descritos sintomas evidentes tais como, uma pequena mancha castanha circular, que rapidamente dissemina para todo o fruto. Acompanhando esta situação, também pequenos e numerosos esporos se espalham por todo o fruto [73].

Geralmente nesta fase de crescimento microbiano do género *Monilinia*, também o género *Botrytis* (os quais se podem confundir), agente responsável pelo aparecimento do “mofo cinzento”, afeta um enorme número de plantas frutíferas, e a cerejeira não é exceção. No início, os danos são caracterizados pelo crescimento de tufo branco na superfície dos frutos, seguido do seu amolecimento por completo [73].

Ambos os géneros provocam prejuízos estéticos, qualitativos e quantitativos, sendo de difícil controlo mediante as alterações meteorológicas, tais como a variação de temperatura a que os frutos estão sujeitos [75].

O género *Monilinia fructicola*, foi observado primeiramente no início de Outubro de 2015, em pêssegos importados de Itália e Espanha. Visualmente observou-se uma mancha castanha inicial (podridão) que rapidamente evoluiu e se espalhou por todo o fruto, sob a forma de conídios, os quais se reproduzem assexuadamente, surgindo sob a forma de esporos. Seguidamente, os estudos realizados, conseguiram isolar os genes M11 e M13, com base nas características morfológicas moleculares. A patogenicidade foi testada incubando pêssegos maduros e esterilizados com conídios. Cinco dias após a incubação, os sintomas típicos de podridão desenvolveram-se em frutos incubados, ao contrário dos frutos de controlo, que permaneceram saudáveis [76].

Através do resultado molecular do espaço interno transcrito molecular do rDNA bem como da região genómica transcrita, o agente patogénico foi caracterizado como *Monilinia fructicola* [77].

O fungo entrou no comércio por meio de embarques de exportação, sendo por isso facilmente disseminado para inúmeros países. Está comprovado que durante o Inverno, o agente patogénico hiberna nos gomos infetados, nas lesões existente nos ramos e também nas folhas caídas no ano anterior. Porém, os esporos

hibernados, permanecem totalmente viáveis mesmo em períodos quentes e secos. Por ação das condições climatéricas características e favoráveis da Primavera, tais como humidade elevada, precipitação e temperatura amena (14-15 °C), pode desencadear a proliferação de conídios, infetando assim os pomares. Embora a temperatura ótima para o desenvolvimento dos esporos seja 19 °C, na presença de humidade, estes podem germinar com temperaturas de 2-4 °C [78]. O mecanismo de proliferação e evolução encontra-se descrito na Figura 17.

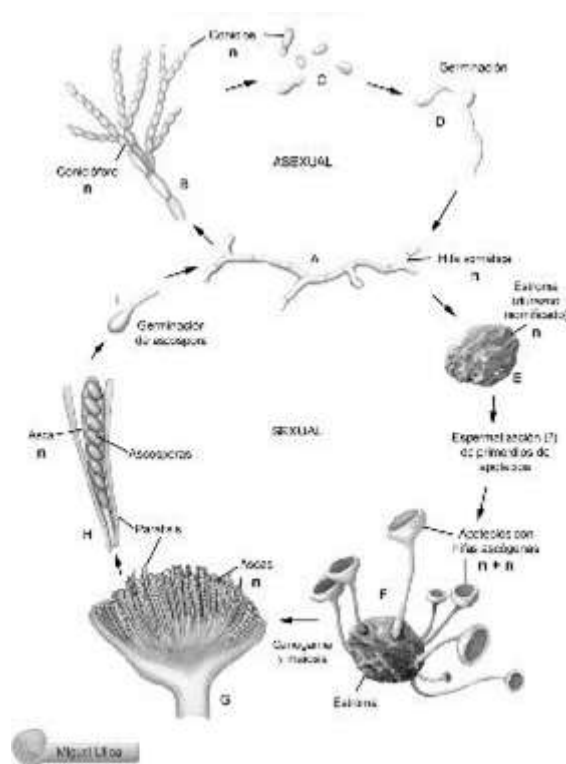


Fig. 17 - Ciclo de vida do fungo *Monilinia fructicola*. De A-D ocorre a fase de reprodução assexuada (haplóide), em que as hifas desenvolvidas nos tecidos produzem cadeias de conídios; estes por sua vez são espalhados pelo vento e vão posteriormente encontrar um hospedeiro (fase Monilinia). De E-I, ocorre a fase de reprodução sexuada, em que há invasão dos tecidos do fruto por hifas somáticas quais produzem estromas, agravando assim o processo de contaminação [78].

Segundo dados estatísticos, a doença causada por este fungo, a moniliose, é a principal doença fúngica que afeta a conservação de cerejas, e como já foi

referido, causa inúmeros prejuízos tanto no pomar como no período pós-colheita [78].

Esta doença é das mais importantes e referenciadas das prunóideas em quase todo o mundo. Caso a madeira seja infetada, e não for devidamente tratada e erradicada, esta pode constituir uma fonte de inóculo durante vários anos [78].

A moniliose, pode causar danos nos frutos, posteriormente à colheita e durante o período de armazenamento, sendo pertinente monitorizar a situação. Embora os frutos sejam suscetíveis todas as fases, a vulnerabilidade atinge o seu pico no início da maturação, sendo que caso haja a presença do *Monilinia fruticula* em cerca de cinco dias, os frutos ficam podres por completo, cobertos de esporos, exibindo a aparência “branco cremoso”, característico e facilmente reconhecido [78].

No caso particular da cereja, esta pode ser infetada a partir de outras cerejas em contato direto ou através de esporos transportados por via aérea, chuva, ou insetos que penetram nas flores. No entanto, os principais fatores que contribuem para as infeções nas cerejas são as lesões causadas pela chuva, granizo, vento, fissuras, e contato com insetos e outros frutos. Mais uma vez, as condições favoráveis tais como a humidade e as temperaturas amenas favorecem a proliferação do fungo [20], [78].

4.5. Nota conclusiva

Pudemos verificar quais os fungos e bactérias que afetam maioritariamente a cereja. Nesse sentido, e sendo o principal objetivo a criação de uma nova tecnologia que consiga rastrear em tempo real a situação, o resultado do estudo calculado é apresentado no capítulo seguinte.

5. Desenvolvimento/Adequação de Tecnologias de Monitorização de Parâmetros

5.1. Introdução

A preservação dos alimentos é um fator de extrema importância que permite fornecer segurança alimentar, manter a qualidade, prolongar a vida útil e prevenir a sua deterioração.

Para os alimentos refrigerados minimamente processados, a preservação é considerada como o último recurso desenvolvida no sentido de proporcionar segurança alimentar máxima, qualidade e frescura e aumento substancial da vida útil.

Em diversas situações já foi questionado se a embalagem em si, é um método de preservação, já que atua como um veículo que visa proteger ou fornecer uma atmosfera adequada para frutas e legumes minimamente processados. Porém, o método de preservação real pode preceder o processo de embalamento ou poderá surgir no decorrer do tratamento do alimento.

No entanto, muitos procedimentos são realizados antes e após o processo de embalamento, e um dos mais importantes é a refrigeração, associada às variações de temperatura que ocorrem durante a cadeia do produto, neste caso a cereja. A refrigeração é assim caracterizada com um processo de preservação ativo, que permite confinar o produto, evitando condições adversas, com objetivo de prolongar a vida de prateleira de muitos alimentos, tais como a cereja, uma fruta minimamente processada.

Para além da refrigeração, existem outros métodos clássicos de preservação que permitem aumentar o tempo de vida útil dos alimentos. Destes são conhecidos a

preservação do calor, preservação química, acidulantes, antioxidantes, cloro, antimicrobianos e outros compostos semelhantes.

Estes métodos acima referidos, devem usufruir dos sinergismos dos vários obstáculos ou barreiras de preservação, tais como sistemas enzimáticos intactos ou até mesmo danificados nos tecidos vivos. Particularmente, no caso da cereja, deve ser tida em conta a polifenoloxidase.

A refrigeração é assim o método de preservação considerado necessário não só para a cereja, mas também para todas as frutas e legumes minimamente processados. No entanto, assim como todos os processos benéficos, também possui as suas desvantagens, nomeadamente o abuso de temperatura durante o intervalo de tempo após o embalamento e posterior distribuição e transporte finalizando com o armazenamento.

Com intuito de monitorizar a qualidade e o estado da cereja, propõe-se assim a criação de um dispositivo integrador de tempo-temperatura (*Time-Temperature Integrator* -TTI).

5.2. Dispositivo integrador tempo-temperatura (TTI)

O uso de TTI, no caso da cereja, é especialmente útil não só para fabricantes como também para operadores de transporte. No entanto, o consumidor final tem um papel extremamente importante e conseqüentemente tem o direito de poder verificar quais as condições de produto que está prestes a adquirir para consumir, nomeadamente rastrear a localização e extensão da exposição a temperaturas adequadas.

A embalagem pode facilmente controlar outros fatores, tais como a composição do gás e a humidade relativa; porém a temperatura da cereja depende exclusivamente das condições externas durante o processo de armazenamento e transporte.

Idealmente, muitos fabricantes ambicionam uma rotulagem do produto e vida útil com data aberta e indefinida; por outro lado esta exigência é meramente inaceitável, tendo em conta a dificuldade em controlar e conhecer o histórico completo de temperatura a que o produto foi submetido durante toda a cadeia de procedimentos. Assim, a vida útil real é difícil de prever, não se podendo estimar o prazo em que o produto pode ser consumido.

A mais-valia do TTI centra-se essencialmente na possibilidade de transmitir informações confiáveis em tempo real do estado da cereja, sendo assim possível prever o tempo restante de vida útil. Esta abordagem pode assim corrigir as datas de validade, por vezes sem sentido e levar a uma melhor gestão das cerejas, evitando como já foi referido o desperdício alimentar.

Pelo facto de os TTI serem pequenos dispositivos, facilmente integrados na embalagem com um custo associado relativamente baixo, são assim sugeridos para a comercialização da cereja do Fundão. A alteração da cor é imediata e síncrona com as alterações na cereja, facilmente mensurável e neste caso irreversível, diretamente relacionada com as alterações consequentes da temperatura ao longo do tempo.

5.3. Protótipo

Na Figura 18 é apresentada uma proposta para um TTI destinado à cereja, denominado, CheckCherry. Tal como a TTI indica, aquando da conservação em condições de temperatura adequadas, o TTI manterá o interior da cereja de cor vermelha, a sua cor usual. As enzimas presentes no TTI irão alterar a cor deste em função da acumulação do histórico tempo-temperatura para os microrganismos descritos no capítulo anterior, tendo em consideração as curvas de crescimento-



Fig. 18 - Proposta de TTI para a cereja.

Assim sendo as especificações técnicas do TTI proposto para cereja são:

Nome: CheckCherry

Modo de funcionamento: Este TTI assenta num princípio fisiológico, visível, ou seja, traduz-se numa alteração de cor, a qual é devida a uma reação de oxidação.

Processo enzimático detetado: Degradação dos compostos fenólicos, os quais são substratos da enzima polifenoloxidase, cuja reação de hidroxilação de um monofenol em o-difenol culmina numa oxidação para o-quinona. A enzima polifenoloxidase catalisa a oxidação de polifenóis em quinonas que reagem de forma não enzimática, produzindo pigmentos coloridos.

Na Figura 19 é apresentado o esquema de cores que traduz a evolução da qualidade geral da cereja: A Figura 19 a) apresenta o TTI não ativado, logo não deverá ser considerado válido para apreciação. A Figura 19 b) indica o estado de consumo ideal da cereja; qualidade máxima detetada. A Figura 19 c) providencia uma indicação visual no TTI que a cereja entrou em início de processo de degradação; Os momentos seguintes devem ser analisados com a máxima atenção;

A Figura 19 d) indica um processo de degradação agravado, com degradação em massa dos compostos fenólicos. Por último, a Figura 19 e) fornece a indicação que o consumo da cereja é desaconselhado.

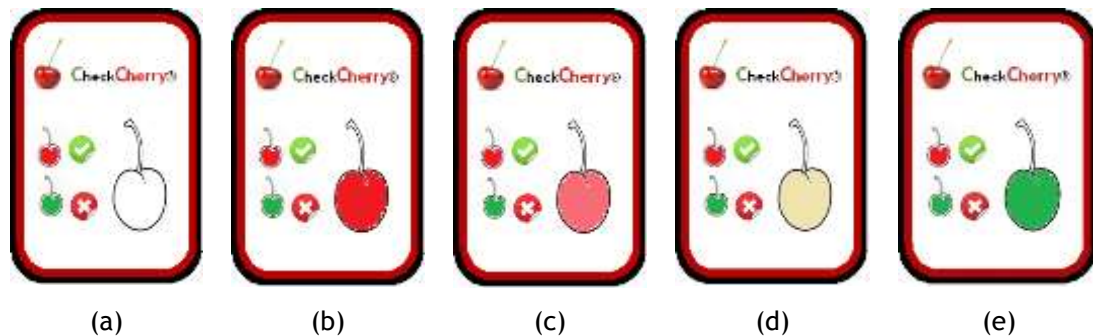


Fig. 19 - Proposta de TTI para a cereja - Esquema de cores.

Legenda:

- TTI não ativado, logo não deveser considerado valido para apreciação.
- Estado de consumo ideal da cereja; qualidade máxima detetada.
- Cereja em início de processo de degradação; Os momentos seguintes devem ser analisados com a máxima atenção;
- Processo de degradação agravado, com degradação em massa dos compostos fenólicos.
- Consumo desaconselhado da cereja.

5.4. Nota conclusiva

O objetivo proposto para esta dissertação foi conseguido: a criação de um protótipo que permita rentabilizar o consumo da cereja, evitando o desperdício e contribuindo para a segurança alimentar do produto regional, cereja da Cova da Beira.

6. Conclusões

6.1. Conclusões gerais

Como desafio desta dissertação, foi proposto o desenvolvimento de um dispositivo integrador de tempo-temperatura (TTI) para monitorização do estado qualitativo da cereja em tempo real.

Verificou-se que, de acordo com as reações enzimáticas ocorridas, que o TTI do tipo enzimático, seria o mais pertinente para adequar ao caso específico da cereja da Cova da Beira. Os compostos fenólicos são assim a chave para que possa ser detetado um substrato enzimático, que indique ao produtor, distribuidor e consumidor qual o estado de conservação real da cereja, deixando de lado as previsões “aleatórias”.

Embora existam inúmeros microrganismos que afetam a cereja, estes não são facilmente detetáveis pelo TTI, também pelo fato de existirem muitas outras condições ambientais que os influenciam diretamente, não sendo possível prever com certeza que a deteção pela substância lábil do TTI seria totalmente fidedigna.

Em suma, o desperdício alimentar e a segurança do consumo da cereja, é garantida com o uso dos TTI, assegurando o controlo de todas as fases da cadeia de escoamento da cereja. O objetivo de promover a rentabilização do produto e investigar modos e procedimentos de fornecer o máximo de informação possível em tempo real é assim alcançado, esperando ainda a futura implementação desta tecnologia em Portugal.

6.2. Sugestões de trabalhos futuros

Futuramente, a implementação dos TTI em Portugal deverá ser uma prioridade, não apenas para o caso da cereja da Cova da Beira como para todos os produtos.

Prioritariamente devem ser considerados TTI para os produtos mais perecíveis, como sejam a carne, o peixe, todo o tipo de hortofrutícolas e marisco e moluscos, e posteriormente para outros produtos em que o prazo de validade muitas vezes é meramente indicativo e burocrático no que diz respeito à comercialização.

Relativamente aos sistemas de embalagens Inteligentes, são considerados uma mais-valia que adia a degradação dos produtos perecíveis em geral. No entanto, mais estudos são necessários com intuito de combinar componentes atmosféricos que erradiquem o desenvolvimento de determinados microrganismos, mas também não favorecendo a proliferação de outros.

Finalmente, a utilização conjunta dos TTI com as novas embalagens, será certamente o futuro do comércio, embora os custos necessitem de ser revistos.

Referências Bibliográficas

- [1] T. Y. Assao, A. de A. Cordeiro, C. Costa, and A. M. Cervato, “Práticas e Percepções acerca da Segurança Alimentar e Nutricional entre os Representantes das Instituições Integrantes de um Centro de Referência localizado na Região do Butantã , Município de São Paulo 1 Food Security Practices and Perceptions among Repr,” *Saúde e Soc.*, vol. 16, no. 1, pp. 102-116, 2007.
- [2] S. J. Viegas, “Segurança Alimentar - Guia de Boas Práticas do Consumidor,” Lisboa, 2015.
- [3] P. D. Gaspar, P. D. Silva, L. P. Andrade, J. Nunes, and D. Nunes, “Technologies for monitoring the safety of perishables food products.”
- [4] P. D. Gaspar, P. D. Silva, and L. P. Andrade, “Applicability of Time-Temperature Indicators in Supporting the Tasting of Gourmet Products,” 2015.
- [5] Comissão de Produtos Alimentares e Segurança Alimentar da APED, *Código de Boas Práticas da Distribuição Alimentar*, 1st ed. Lisboa, 2010, pp. 1-44.
- [6] D. Pereira, “Importância da Cadeia de Frio na Segurança Alimentar de Produtos Congelados e Refrigerados,” Escola Superior Agrária de Coimbra, 2011.
- [7] P. Baptista, “Higiene e Segurança Alimentar no Transporte de Produtos Alimentares,” 2006, 1st ed., p. 160.
- [8] M. A. F. Loureiro, “Código de Boas Práticas de Segurança Alimentar (HACCP) na Restauração Temporária,” 2009.
- [9] H. Vaikousi, C. G. Biliaderis, and K. P. Koutsoumanis, “Development of a microbial time/temperature indicator prototype for monitoring the microbiological quality of chilled foods,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 10, pp. 3242-3250, 2008.
- [10] J. Sales *et al.*, “Redução do Desperdício Alimentar - Um desafio ao nosso alcance,” 2015.
- [11] A. T. M. M. Rahman, S. J. Lee, and S. W. Jung, “Evaluation of time-temperature integrators (TTIs) with microorganism- entrapped microbeads produced using homogenization and SPG membrane emulsification techniques,” *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 25, no. 12, pp. 2058-2071, 2015.
- [12] D. Almeida, “Manuseamento de Produtos Hortofrutícolas,” SPI - Sociedade Portuguesa de Inovação, Porto, 2005.
- [13] A. P. Félix and M. Cavaco, “Manual de Proteção Fitossanitária para proteção integrada e agricultura biológica de prunóideas,” Lisboa, 2008.

- [14] F. M. M. da Costa, "Avaliação Das Características Agronómicas Da Cerejeira ' De Saco ' Na Região Da Cova Da Beira," UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA, 2006.
- [15] Agronegócios, "9c61fc7d37897eef33cdfb3775e19dc6a993f180 @ www.agronegocios.eu," *Cerejas do Fundão valem 20 milhões de euros*, 2017. [Online]. Available: <http://www.agronegocios.eu/noticias/cerejas-do-fundao-valem-20-milhoes-de-euros/>.
- [16] D. D. C. Agrárias, I. M. Rodrigues, and I. M. Rodrigues, "Universidade dos Açores Contributo para a gestão das relações entre a cultura da cerejeira e a conservação na Serra da Gardunha Universidade dos Açores Contributo para a gestão das relações entre a cultura da cerejeira e a conservação de *Asphodelus bento-*," 2006.
- [17] M. Serrano *et al.*, "Maturity stage at harvest determines the fruit quality and antioxidant potential after storage of sweet cherry cultivars," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, no. 8, pp. 3240-3246, 2009.
- [18] S. Chockchaisawasdee, J. B. Golding, Q. V. Vuong, K. Papoutsis, and C. E. Stathopoulos, "Sweet cherry: Composition, postharvest preservation, processing and trends for its future use," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 55, pp. 72-83, 2016.
- [19] N. Beyhan and B. Karakaş, "Investigation of the fertilization biology of some sweet cherry cultivars grown in the Central Northern Anatolian Region of Turkey," *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 121, no. 3, pp. 320-326, 2009.
- [20] Y. H. Hui, *Handbook of Fruits and Fruit Processing*, 1st ed. Iowa, USA: Blackwell Publishing Ltd, 2007.
- [21] M. A. Schmitz-Eiberger and M. M. Blanke, "Bioactive components in forced sweet cherry fruit (*Prunus avium* L.), antioxidative capacity and allergenic potential as dependent on cultivation under cover," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 46, no. 2, pp. 388-392, 2012.
- [22] Y. Y. U. J. A. G. R. Sci, H. C. Sarisu, Ö. F. Karamürsel, and F. P. Öztürk, "Fruit Characteristics , Phenology and Yield of Six Sweet Cherry Cultivars Altı Kiraz Çeşidinin Verim , Fenoloji ve Meyve Özellikleri," vol. 26, no. 4, pp. 547-555, 2016.
- [23] A. A. Wani, P. Singh, K. Gul, M. H. Wani, and H. C. Langowski, "Sweet cherry (*Prunus avium*): Critical factors affecting the composition and shelf life," *Food Packag. Shelf Life*, vol. 1, no. 1, pp. 86-99, 2014.
- [24] S. Predieri, R. Dris, and F. Rapparini, "Influence of growing conditions on yield and quality of cherry : II. Fruit quality," *J. food Agric. Environ.*, vol. 2, no. 1, pp. 307-309, 2004.
- [25] M. Clayton, W. V. Biasi, I. T. Agar, S. M. Southwick, and E. J. Mitcham, "Sensory quality of 'bing' sweet cherries following preharvest treatment with hydrogen cyanamide, calcium ammonium nitrate, or gibberellic acid," *HortScience*, vol. 41, no. 3, pp. 745-748, 2006.
- [26] Z. Zorić, S. Pedisić, D. B. Kovačević, D. Ježek, and V. Dragović-Uzelac, "Impact of packaging material and storage conditions on polyphenol stability, colour and

- sensory characteristics of freeze-dried sour cherry (*Prunus cerasus* var. *Marasca*),” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 53, no. 2, pp. 1247-1258, 2016.
- [27] S. Peschel, R. Franke, L. Schreiber, and M. Knoche, “Composition of the cuticle of developing sweet cherry fruit,” *Phytochemistry*, vol. 68, no. 7, pp. 1017-1025, 2007.
- [28] B. M. D. C. GONÇALVES, “ECOFISIOLOGIA DA CEREJEIRA (*Prunus avium* L .), COMPOSIÇÃO FENÓLICA E ACTIVIDADE,” UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO, 2006.
- [29] A.-M. Oancea, M. Turturică, G. Bahrim, G. Râpeanu, and N. Stănciuc, “Phytochemicals and antioxidant activity degradation kinetics during thermal treatments of sour cherry extract,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 82, pp. 139-146, 2017.
- [30] H. D. Belitz *et al.*, *Food Chemistry*, vol. 114, no. 1. 2009.
- [31] J. Yam, K. L., Takhistov, P. T. and Miltz, “No Title,” *Intell. Packag. Concepts Appl. J. Food Sci.*, vol. 70, pp. 1365-2621, 2005.
- [32] H. Karlidag, S. Ercisli, M. Sengul, and M. Tosun, “Physico-chemical diversity in fruits of wild-growing sweet cherries (*Prunus Avium* L.),” *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, vol. 23, no. 3, pp. 1325-1329, 2009.
- [33] C. Queiroz, A. J. R. da Silva, M. L. M. Lopes, E. Fialho, and V. L. Valente-Mesquita, “Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale*, L.) after processing,” *Food Chem.*, vol. 125, no. 1, pp. 128-132, 2011.
- [34] L. Kitinoja and A. a Kader, “Small-Scale Postharvest Handling Practices: A Manual for Horticultural Crops,” *Postharvest Technol. Res. Inf. Cent.*, no. 8, p. 267, 2003.
- [35] T. F. Mendoza, “KINETIC PARAMETER ESTIMATION OF TIME-TEMPERATURE INTEGRATORS INTENDED FOR USE WITH PACKAGED FRESH SEAFOOD,” University of Florida, 2003.
- [36] Associação Portuguesa de Horticultura, *2º Simpósio Nacional De Fruticultura*. 2014.
- [37] A. R. G. Ribeiro, “Impacto da distribuição na qualidade de produtos hortofrutícolas frescos,” Universidade Técnica de Lisboa, 2013.
- [38] F. Vinagre, “Conservação pós-colheita das cerejas,” Santarém, 2016.
- [39] M. T. Coelho, “ESTUDOS DE PROPAGAÇÃO IN VITRO, CARACTERIZAÇÃO E VALORIZAÇÃO DE CARQUEJA,” Universidade de Lisboa, 2015.
- [40] É. Rosa, D., Figueiredo, F., Castanheira, “Avaliação de Ciclo de Vida dos Hortofrutícolas,” 2014.
- [41] F. Kappel, B. Fisher-Fleming, and E. Hogue, “Fruit characteristics and sensory attributes of an ideal Sweet Cherry,” *HortScience*, vol. 31, no. 3, pp. 443-446,

- 1996.
- [42] F. Costa, “Estatística da Cerejeira em Portugal e no Mundo,” Fundação, 2008.
- [43] European Commission, “Commercialisation of Energy Storage in Europe,” 2015.
- [44] R. K. Gallardo, H. Li, V. Mccracken, C. Yue, and J. Luby, “Market Intermediaries’ Ratings of Importance for Rosaceous Fruits’ Quality Attributes,” *Int. Food Agribus. Manag. Rev.*, vol. 18, no. 4, pp. 121-154, 2015.
- [45] C. Yue *et al.*, “An evaluation of U.S. tart and sweet cherry producers trait prioritization: Evidence from audience surveys,” *HortScience*, vol. 49, no. 10, pp. 1271-1276, 2014.
- [46] X. Zheng, C. Yue, K. Gallardo, V. McCracken, J. Luby, and J. McFerson, “What Attributes Are Consumers Looking for in Sweet Cherries? Evidence from Choice Experiments,” *Agric. Resour. Econ. Rev.*, vol. 45, no. 1, pp. 124-142, 2016.
- [47] K. Mehauden, P. Cox, S. Bakalis, M. Simmons, G. Tucker, and P. Fryer, “A novel method to evaluate the applicability of time temperature integrators to different temperature profiles,” *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 8, no. 4, pp. 507-514, 2007.
- [48] A. Schenk, V. A. N. I. J, B. Nicolai, and A. Geeraerd, “A Tool for Predicting the Quality of Food Products During Refrigerated Storage,” no. 2008, 2011.
- [49] A. Van Loey, M. Hendrickx, S. De Cordt, T. Haentjens, and P. Tobback, “Quantitative evaluation of thermal processes using time-temperature integrators,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 7, no. 1, pp. 16-26, 1996.
- [50] P. J. Fryer *et al.*, “Temperature Integrators as tools to validate thermal processes in food manufacturing,” *Procedia Food Sci.*, vol. 1, no. Icef 11, pp. 1272-1277, 2011.
- [51] J. Zhang, L. Liu, W. Mu, L. M. Moga, and X. Zhang, “Development of temperature-managed traceability system for frozen and chilled food during storage and transportation,” *J. Food, Agric. Environ.*, vol. 7, no. 3-4, pp. 28-31, 2009.
- [52] C. E. Z. Y. Kouki Sahin Jemai Dallery, “Assessing the impact of perishability and the use of time temperature technologies on inventory management,” *Int. J. Prod. Econ.* 143, no. Anexo 1, 2010.
- [53] L. R. Braga and L. Peres, “NOVAS TENDÊNCIAS EM EMBALAGENS PARA ALIMENTOS : REVISÃO,” pp. 69-84, 2010.
- [54] K. P. Nott and L. D. Hall, “Advances in temperature validation of foods,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 10, no. 11, pp. 366-374, 1999.
- [55] P. S. Taoukis, T. Tsironi, M. Giannoglou, I. Metaxa, and E. Gogou, “Historical review and state of the art in Time Temperature Integrator (TTI) technology for the management of the cold chain of refrigerated and frozen foods,” in *Food Process Engineering in a Changing World*, 2011.

- [56] A. Pavelková, "Time Temperature Indicators As Devices Intelligent Packaging," *Lxi*, vol. 30, no. 1, pp. 245-252, 2013.
- [57] P. S. Taoukis, "19 - Modelling the use of time-temperature indicators in distribution and stock rotation," in *Food Process Modelling*, Athens: National Technical University, 2001, pp. 402-431.
- [58] T. H. Haentjens, A. M. Van Loey, M. E. Hendrickx, and P. P. Tobback, "The Use of α -Amylase at Reduced Water Content to Develop Time Temperature Integrators for Sterilization Processes," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 31, no. 5, pp. 467-472, 1998.
- [59] Vitsab International AB, "No Title," 2015. [Online]. Available: <http://vitsab.com/index.php/en/tti-label/>. [Accessed: 29-Mar-2017].
- [60] Frilabo, "Cromogénicos," 2017. [Online]. Available: <http://www.frilabo.pt/microbiologia/cromogenicos>. [Accessed: 23-Mar-2017].
- [61] K. Kim, E. Kim, and S. J. Lee, "New enzymatic time-temperature integrator (TTI) that uses laccase," *J. Food Eng.*, vol. 113, no. 1, pp. 118-123, 2012.
- [62] C. Fortin and H. L. Goodwin Jr, "Valuation of Temp-Time 's Fresh-Check ® Indicator on Perishable Food Products in Belgium," *South. Agric. Econ. Assoc. Annu. Meet.*, 2008.
- [63] P. SIMÕES and VERDADE, "Estudo de um TTI fotocromico para aplicação em alimentos refrigerados," Universidade de Aveiro, 2010.
- [64] L. Feliciano, "Color Changing Plastics for Food Packaging," Ohio.
- [65] T. Tzironi, A. Stamatiou, M. Giannoglou, E. Velliou, and P. S. Taoukis, "Predictive modelling and selection of Time Temperature Integrators for monitoring the shelf life of modified atmosphere packed gilthead seabream fillets," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 44, no. 4, pp. 1156-1163, 2011.
- [66] WRAP and P. Bulter, "Survey of packaging with potential to reduce food thrown away at home," *Wrap*, no. December 2006, 2007.
- [67] M. Mohamed, "The Intelligent Colorimetric Timer Indicator Systems to develop label Packaging Industry in Egypt," vol. 4, no. 2.
- [68] "ComBase," 2017. .
- [69] S. Muzaffar *et al.*, "Ultrasound treatment: effect on physicochemical, microbial and antioxidant properties of cherry (*Prunus avium*)," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 53, no. 6, pp. 2752-2759, 2016.
- [70] R. Di Cagno *et al.*, "Exploitation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) puree added of stem infusion through fermentation by selected autochthonous lactic acid bacteria," *Food Microbiol.*, vol. 28, no. 5, pp. 900-909, 2011.
- [71] R. P. Queirós, D. Rainho, M. D. Santos, L. G. Fidalgo, I. Delgadillo, and J. A.

- Saraiva, "High pressure and thermal pasteurization effects on sweet cherry juice microbiological stability and physicochemical properties," *High Press. Res.*, vol. 35, no. 1, pp. 69-77, 2015.
- [72] M. HORTVÁTHNÉ PETRÓCZY, "Appearance of *Monilinia Fructicola* and *Monilia Polystroma* in Hungary and Newer Possibility of the Protection," 2009.
- [73] J. G. Töfoli, J. T. Ferrari, R. J. Domingues, and E. M. C. Nogueira, "Botrytis sp. em espécies hortícolas: hospedeiros, sintomas e manejo," *Inst. Biológico*, vol. 73, no. 1, pp. 11-20, 2011.
- [74] S. Africa and C. America, "*Monilinia fructicola*," *EPPO Bull.*, vol. 39, no. 3, pp. 337-343, 2009.
- [75] M.-J. Côté, M.-C. Tardif, and A. J. Meldrum, "on Inoculated and Naturally Infected Fruit Using Multiplex PCR," *Plant Dis.*, vol. 88, no. 11, pp. 1219-1225, 2004.
- [76] N. Rungjindamai, X.-M. Xu, and P. Jeffries, "Identification and Characterisation of New Microbial Antagonists for Biocontrol of *Monilinia laxa*, the Causal Agent of Brown Rot on Stone Fruit," *Agronomy*, vol. 3, no. 4, pp. 685-703, 2013.
- [77] J. M. Jay, *Modern Food Microbiology*, Sixth Edit. 2014.
- [78] C. Martini, "Phenotype and genotype characterization of *Monilinia* spp . isolates and preformed antifungal compounds in peach peel fruit at different developmental stages," 2012.