

Desenvolvimento de uma ferramenta molecular para a deteção rápida de *Xylella fastidiosa* e caracterização nutricional das diferentes variedades de *Cydonia oblonga* Miller (marmeleiro) cultivadas na região da Beira Interior

Marlene Abreu Mota

Relatório de Estágio para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2^o ciclo de estudos)

Orientador: Doutor Christophe Ruis Espírito Santo
Coorientadores: Prof.^a Doutora Joana Cardoso da Costa
Prof. Doutor António José Geraldês de Mendonça

junho de 2021

O presente trabalho foi desenvolvido no Centro de Apoio Tecnológico Agro Alimentar (CATAA), localizado na zona industrial de Castelo Branco, em colaboração com o Instituto Pedro Nunes (IPN) no âmbito do projeto CULTIVAR (CENTRO-01-0145-FEDER-000020), cofinanciado pelo Programa Operacional Regional do Centro 2020, Portugal 2020 e União Europeia, através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER).

Este trabalho foi apresentado em formato de e-poster na 3.^a Conferência Europeia de “*Xylella fastidiosa* and XF-ACTORS final meeting”, tendo ficado em 3.º lugar dos e-posters mais visualizados e partilhados de um conjunto de 102. Posteriormente, o mesmo trabalho foi apresentado em formato poster no congresso internacional da *Oxford Nanopore Technologies*, tendo sido escolhido para uma “*lightning talk*” (apresentação oral de curta duração).

O produto desenvolvido no âmbito deste trabalho, vinagre de marmelo, foi apresentado à maior indústria vinagreira de Portugal, Mendes Gonçalves S.A., tutora da marca PALADIN (temperos de Portugal), com grande aceitação.

Cofinanciado por:



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu
de Desenvolvimento Regional

Agradecimentos

Em primeiro lugar, ao Centro Tecnológico Agro Alimentar de Castelo Branco e ao Instituto Pedro Nunes pela oportunidade.

Um enorme obrigada ao Christophe Espírito Santo e à Mafalda Resende por toda a disponibilidade, paciência e dedicação demonstrada ao longo destes meses, assim como pela compreensão, confiança e por todo o conhecimento transmitido.

À Joana Costa, à Aitana Ares, à Alexandra Camelo, à Daniela Figueira, ao Mário Cristóvão, à Liliana Moreira, à Helena Beato e ao Abel Veloso por toda a ajuda e apoio. À equipa M&M's por todos os momentos de descontração proporcionados.

Aos que estão comigo desde o início e aos que foram chegando ao longo destes seis anos, um enorme obrigada! Foram muitos os momentos partilhados e histórias vividas. O meu mais sincero obrigada à minha gémea, Marlène, e à minha abelha, Ana Maia, começamos e acabámos esta jornada juntas. Ao Filipe, à Tatiana, à Francisca, à Laura, às Bárbaras, à Ana Luísa, à Carolina, à Miriam, à Alexandra, ao Emanuel e ao Francês, todos vocês ocupam um lugar igualmente importante. Ao Nuno Almeida² por toda a paciência e carinho. Obrigada, Covilhã pelos amigos que se tornaram família.

À Joana e à Soraia, que apesar de chegarem mais tarde, fizeram-me sentir em casa quando estava de longe dos meus.

Aos que estão comigo desde sempre, à Raquel, à Adriana, à Bruna Pinto, à Carolina, ao Nuno e ao Luís. Obrigada por toda a amizade, por estarem sempre lá, mesmo estando longe.

Por último, aos meus verdadeiros guerreiros, aos meus ídolos, pai, mãe, sem vocês isto não seria possível. Um enorme obrigada, por todo o carinho, dedicação e sacrifício que fizeram para me proporcionarem concluir mais uma etapa, por acreditarem sempre em mim e nunca me terem deixado desistir. Tudo o que sou, devo-o a vocês.

Resumo

Atualmente, a *Xylella fastidiosa* (*Xf*) é uma das bactérias fitopatogénicas mais perigosas do mundo, sendo responsável por uma vasta gama de doenças com enorme impacto económico e ambiental. Detetada em Portugal em 2019, e com uma crescente área afetada, torna-se fundamental dispormos de ferramentas de diagnóstico rápidas e confiáveis. Neste contexto, um dos objetivos deste trabalho foi desenvolver uma ferramenta para a deteção e identificação rápida de *Xf* com aplicabilidade em campo. A solução de diagnóstico aqui proposta consiste em acoplar uma deteção preliminar de *Xf* através da reação *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) com a confirmação e identificação molecular através da sequenciação de genes específicos na plataforma *MinION MK1C*. Esta estratégia reduz o tempo de diagnóstico de semanas para horas, permitindo a adoção de medidas profiláticas em tempo útil, diminuindo o risco de dispersão da bactéria. Estes ensaios serão posteriormente validados de forma a determinar a especificidade e sensibilidade para a deteção de *Xf*. Adicionalmente, o cultivo do marmeleiro (*Cydonia oblonga* Miller) tem evoluído na Beira Interior, demonstrando ser um recurso endógeno de grande potencial na região. Desta forma, o outro objetivo deste trabalho consistiu na caracterização nutricional das diferentes cultivares de marmelo cultivadas na região da Beira Interior. As cultivares em estudo demonstraram que os hidratos de carbono foram os macronutrientes em maior abundância, apresentando ainda, teores reduzidos de gordura e um baixo poder calórico. Com a finalidade de diversificar os produtos disponíveis no mercado e valorizar a produção de marmelo, foi desenvolvido neste trabalho um produto inovador, o vinagre de marmelo.

Palavras-chave

Marmelo; *Xylella fastidiosa*; *Loop-Mediated Isothermal Amplification*; *Oxford Nanopore Technology*.

Abstract

Currently, *Xylella fastidiosa* (*Xf*) is one of the world most dangerous phytopathogenic bacteria, responsible for a wide range of diseases with enormous economic and environmental impact. Detected in Portugal in 2019, and with a growing affected area, it is essential to have quick, sensitive and specific diagnostic tools. Therefore, one of the objectives was to develop a tool for the rapid detection and identification of *Xf* with field applicability. The proposed diagnostic solution consists of coupling a preliminary *Xf* detection through the Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) reaction with the specific genes sequencing using the portable MinION MK1C platform. This strategy reduces the diagnosis time from weeks to hours, allowing the adoption of timely prophylactic measures, reducing the bacterial dissemination risk. The assays will be further validated to determine specificity and sensitivity for detecting *Xf*. Additionally, quince (*Cydonia oblonga* Miller) production has evolved in the Beira Interior, demonstrating to be an endogenous resource with great potential in the region. Accordingly, the other objective of this work consisted in the nutritional characterization of different quince cultivars cultivated in the Beira Interior region. All cultivars showed that carbohydrates were the macronutrients in higher quantity, reduced fat levels and low in calories. Moreover, an innovative product was developed in this work, quince vinegar, to diversify the offer for available products.

Keywords

Quince; *Xylella fastidiosa*; Loop-Mediated Isothermal Amplification; Oxford Nanopore Technology

Índice

Capítulo 1	1
1. Introdução	3
1.1 Marmelo	3
1.1.1 Origem	3
1.1.2 Morfologia.....	3
1.1.3 Cultivares	4
1.1.4 Adaptabilidade da espécie	4
1.1.5 Produção e mercado comercial.....	5
1.1.6 Composição nutricional	6
1.1.7 Compostos biologicamente ativos	8
1.1.8 Fitoterapia.....	8
1.1.9 Doenças e pragas.....	9
1.2 <i>Xylella fastidiosa</i>	10
1.2.1 Classificação e morfologia.....	10
1.2.2 Insetos vetores, hospedeiros e transmissão.....	10
1.2.3 Sintomas	11
1.2.4 Subespécies e doenças	12
1.2.5 Distribuição geográfica	12
1.2.6 Epidemiologia	14
1.2.7 Detecção.....	14
1.2.8 Tratamento e prevenção	15
1.3 Técnicas moleculares	15
1.3.1 <i>Loop-Mediated Isothermal Amplification</i>	16
1.3.1.1 Conceito.....	16
1.3.1.2 Desenho de <i>primers</i>	17
1.3.1.3 Mecanismo de amplificação	19
1.3.1.4 Otimização	21
1.3.1.5 Vantagens e desvantagens	21
1.4 Técnicas de sequenciação.....	22
1.4.1 Sequenciação nanopore	24
1.4.1.1 Conceito.....	24
1.4.1.2 Natureza dos nanoporos	25
1.4.1.3 <i>Oxford Nanopore Technologies</i>	25
1.4.1.4 Vantagens e desvantagens	26
1.5 Objetivos	27

Capítulo 2.....	29
2. Materiais e métodos.....	31
2.1 Colheita.....	31
2.2 Parâmetros de qualidade.....	31
2.2.1 Análise instrumental da cor	32
2.2.2 Análise da textura.....	32
2.2.3 Sólidos solúveis totais	33
2.2.4 Determinação do pH e acidez titulável	33
2.3 Parâmetros físico-químicos – Nutricionais.....	34
2.3.1 Determinação do teor de humidade.....	34
2.3.2 Determinação do teor de cinzas	34
2.3.3 Determinação do teor de gordura	34
2.3.4 Determinação do teor de proteína	34
2.3.5 Fibra	35
2.3.6 Determinação dos hidratos de carbono	35
2.3.7 Valor energético	35
2.3.8 Determinação do teor de açúcares por cromatografia iónica	35
2.3.9 Composição mineral.....	36
2.3.10 Perfil vitamínico	37
2.4 Análise estatística	39
2.5 Desenvolvimento de um novo produto	40
2.5.1 Fermentação alcoólica e acética	40
2.5.2 Teor alcoólico em volume.....	40
2.5.3 Acidez volátil	40
2.6 Ferramenta de diagnóstico de <i>Xylella fastidiosa</i>	41
2.6.1 Desenho dos <i>primers</i>	41
2.6.2 Extração DNA total de amostras de vegetais	44
2.6.3 Reação LAMP	44
2.6.4 Eletroforese em gel dos produtos de amplificação.....	45
Capítulo 3.....	47
3. Resultados e discussão.....	49
3.1 Caracterização e valorização do marmelo	49
3.1.1 Parâmetros de qualidade.....	50
3.1.1.1 Cultivares de marmelo.....	50
3.1.1.2 Local de produção.....	54
3.1.1.3 Data de colheita	56
3.1.2 Parâmetros nutricionais.....	58

3.1.2.1	Cultivares de marmelo	58
3.1.2.2	Local de produção	62
3.1.2.3	Data de colheita.....	63
3.1.2.4	Perfil vitamínico.....	63
3.1.3	Desenvolvimento de um novo produto.....	65
3.2	Ferramenta de diagnóstico rápida de campo.....	69
3.2.1	Desenho dos <i>primers</i>	69
3.2.2	Condições de reação – LAMP	70
3.2.3	Visualização dos produtos de amplificação	72
3.2.4	Sequenciação.....	73
Capítulo 4	75
4.	Conclusões e Perspetivas Futuras	77
Bibliografia	79
Anexos	95
Anexo I	– Correlação dos parâmetros de qualidade das cultivares.....	97
Anexo II	– Análise <i>t-student</i> dos parâmetros de qualidade da Portugal – local de produção	98
Anexo III	– Análise <i>t-student</i> dos parâmetros de qualidade da Gigante de Vranja – data de colheita.....	99
Anexo IV	– Correlação dos parâmetros dos parâmetros nutricionais das cultivares (exceto os minerais).....	100
Anexo V	– Análise <i>t-student</i> dos parâmetros nutricionais da Portugal – local de produção	101
Anexo VI	– Análise <i>t-student</i> dos parâmetros nutricionais da Gigante de Vranja – data de colheita.....	102

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida da <i>Xf</i>	11
Figura 2. Distribuição geográfica da <i>Xf</i>	12
Figura 3. Zona demarcada de <i>Xf</i> em Portugal	13
Figura 4. Restrições de movimentos em zona demarcada para <i>Xf</i> em Portugal.....	15
Figura 5. Representação esquemática dos primers LAMP.....	18
Figura 6. Mecanismo de amplificação do LAMP	20
Figura 7. Sequenciação por nanoporos.....	24
Figura 8. Nanoporos biológicos.....	25
Figura 9. Dispositivos da ONT disponíveis no mercado	26
Figura 10. Esquema da análise da textura.....	33
Figura 11. Diferentes pomares de marmelo no concelho da Covilhã.....	49
Figura 12. Amostragem das cultivares.....	50
Figura 13. Comparação dos locais de produção para a cultivar Portugal – parâmetros de qualidade	55
Figura 14. Comparação das datas de colheita para a cultivar Gigante de Vranja – parâmetros de qualidade	57
Figura 15. Cromatógrafo das vitaminas hidrossolúveis com uma concentração de 2,5 ppm. lavina, 268 nm.....	65
Figura 16. À esquerda o fermentador de laboratório, ao meio e à direita o depósito de plástico, no início e no fim da fermentação alcoólica.....	67
Figura 17. À esquerda “mãe de vinagre” de marmelo e à direita vinagre de marmelo...68	
Figura 18. Amplificação por LAMP para amostras de DNA de <i>Xf</i> a 68°C durante 60 minutos para os primers: <i>rpoD</i> , <i>cysG</i> , <i>malF</i> e <i>rimM</i>	70
Figura 19. Amplificação por LAMP para amostras de DNA de <i>Xf</i> a 62°C durante 60 minutos para os primers: <i>rpoD</i> , <i>cysG</i> e <i>malF</i>	71
Figura 20. Amplificação por LAMP para amostras de extratos negativos, positivos e inconclusivos de <i>Xf</i> a 65°C durante 60 minutos para os primers <i>malF</i> e <i>rimM</i>	72
Figura 21. Amplificação por LAMP para amostras com e sem DNA de <i>Xf</i> a 65°C durante 60 minutos para os primers <i>malF</i> e <i>rimM</i>	72
Figura 22. Análise dos produtos da reação de LAMP em gel de agarose 2,5%	73

Lista de Tabelas

Tabela 1. Cultivares de marmelo presentes em Portugal.....	4
Tabela 2. Produção mundial de marmelo em 2017	5
Tabela 3. Produção nacional de marmelo em 2018.....	6
Tabela 4. Tabela nutricional por 100 g de parte edível de marmelo	7
Tabela 5. Propriedades dos métodos de amplificação LAMP e PCR.....	22
Tabela 6. Data da colheita das diferentes cultivares na região da Beira Interior.....	31
Tabela 7. Condições cromatográficas para a determinação do teor de açúcares.	36
Tabela 8. Parâmetros instrumentais ICP- OES.	37
Tabela 9. Condições cromatográficas para a quantificação das vitaminas hidrossolúveis.	38
Tabela 10. Preparação dos padrões de calibração.	39
Tabela 11. <i>Primers</i> desenhados para os genes MLST (<i>rpoD</i> , <i>cysG</i> e <i>malF</i>).....	42
Tabela 12. Preparação das reações LAMP para um volume total de 13µL.	45
Tabela 13. Parâmetros biométricos das cultivares de marmeleiro da Beira Interior.	51
Tabela 14. Parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*), teor de SST (°Brix) e acidez total (g ácido málico/L) dos marmelos das diferentes cultivares.....	52
Tabela 15. Teor de SST (°Brix) e acidez total (g ácido málico/L) referenciados em marmelo.....	53
Tabela 16. Análise da textura – dureza (N), elasticidade (%), resiliência, coesividade e mastigabilidade (N) das cultivares.	54
Tabela 17. Composição nutricional das cultivares de marmelo por 100 g de parte edível.	59
Tabela 18. Teor de açúcares (g/ 100g) – glucose, frutose e sacarose das cultivares.	61
Tabela 19. Equação da reta para cada vitamina.	63
Tabela 20. Monitorização dos valores SST, pH, TAV ao longo das fermentações alcoólicas.....	67
Tabela 21. Monitorização dos valores de pH, ácido acético e TAV nas diferentes fermentações acéticas.	68

Lista de Abreviaturas, Acrónimos e Símbolos

A	Adenina
a*	Teor de vermelho
APN	Associação Portuguesa de Nutrição
b*	Teor de amarelo
B ₃	<i>Primer</i> externo dianteiro
BCYE	<i>Buffered charcoal yeast extract</i>
BIP	<i>Primer</i> interno traseiro
bp	Par de bases
C	Citosina
CATAA	Centro de Apoio Tecnológico Agro Alimentar
CIE	<i>Commission Internationale de l'Éclairage</i>
CTAB	<i>Cetyltrimethylammonium Bromide</i>
cysG	<i>Siroheme synthase</i>
ddNTP	Dideoxynucleótidos
DGAV	Direção Geral de Alimentação e Veterinária
DIBA	<i>Dot-immunobinding assay</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Oxigénio dissolvido
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadeia dupla
DTBIA	<i>Direct Tissue Immuno Blot Assay</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPPO	<i>European and Mediterranean Plant Protection Organization</i>
F ₃	<i>Primer</i> externo traseiro
FAAS	Espectrometria de absorção atómica de chama
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FIP	<i>Primer</i> interno traseiro
FitoLab	Laboratório de Fitossanidade
G	Guanina
ha	Hectares
HDA	<i>Helicase-dependent amplification</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPV	Vírus do papiloma humano

ICP – OES	<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
INE	Instituto Nacional de Estatística
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
IPN	Instituto Pedro Nunes
I*	luminosidade
LAMP	<i>Loop-Mediated Isothermal Amplification</i>
LB	<i>Primer loop</i> traseiro
LF	<i>Primer loop</i> dianteiro
malF	<i>ABC transporter sugar permease</i>
MERS	Síndrome respiratória do médio oriente
MLST	<i>multilocus sequence typing</i>
NGS	Sequenciação de Nova Geração
ONT	<i>Oxford Nanopore Technologies</i>
PacBio	<i>Pacific Biosciences</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PW	<i>Periwinkle wilt</i>
RCA	<i>Rolling circle amplification</i>
rimM	<i>ribosome maturation factor</i>
RNA	Ácido ribonucleico
rpoD	<i>RNA polymerase sigma factor</i>
RT-LAMP	Transcrição reversa – <i>Loop-Mediated Isothermal Amplification</i>
SARS-CoV-2	Síndrome respiratória aguda grave – coronavírus 2
SD	Desvio padrão
SMRT	<i>Single Molecule Real Time</i>
ssDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadeia simples
SST	Sólidos solúveis totais
ST	<i>Sequence Types</i>
T	Tiamina
t	Tonelada
TAV	Teor alcoólico em volume
T _m	Temperatura de <i>melting</i>
TMA	<i>Transcription-mediated amplification</i>
UE	União Europeia
<i>Xf</i>	<i>Xylella fastidiosa</i>
ΔG	Energia livre

Capítulo 1

1. Introdução

1.1 Marmelo

1.1.1 Origem

O marmelo (*Cydonia oblonga* Miller) é o fruto do marmeleiro, uma das árvores de fruto mais antiga cultivada há mais de 4 000 anos (Zhang *et al.*, 2019). O marmelo teve origem na Transcaucásia, Ásia Menor, e no Sudoeste da Europa, no entanto pode ser encontrado noutras regiões como África do Sul, China, Médio Oriente, Cáucaso do Norte e Europa Central (Ashraf *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019). Na antiguidade, o marmelo era apreciado pelo seu aroma, sendo oferecido aos deuses pelo povo como prova de amor (Serralves, 2020) e nos casamentos como símbolo de fertilidade, também era usado como uma planta medicinal (Sabir *et al.*, 2015).

1.1.2 Morfologia

O marmeleiro é a única árvore do género *Cydonia*, da subfamília *Pomoideae* pertencente à família *Rosaceae* (Zhang *et al.*, 2019). É uma árvore pequena, com 4 a 5 metros de largura e 5 a 8 metros de altura (Ashraf *et al.*, 2016), apresenta um tronco tortuoso, de ritidoma cinzento e uma epiderme lisa (Regato, Guerreiro, and Regato, 2017). As folhas, caducas, são simples, alternas e elípticas (Serralves, 2020; Regato, Guerreiro, and Regato, 2017) com margens inteiras e um limbo ovado (Serralves, 2020), tendo um comprimento entre 6 e 11 centímetros (Ashraf *et al.*, 2016). A floração ocorre no período da primavera, de março a maio (Serralves, 2020). As flores do marmeleiro apresentam uma cor rosa-claro e têm cerca de 3 a 5 centímetros de diâmetro (Regato, Guerreiro, and Regato, 2017). O fruto é classificado como um pomo globoso de formato piriforme, de cor amarela brilhante (Serralves, 2020; Ashraf *et al.*, 2016) com uma altura que pode variar entre os 6 e os 9 centímetros e um diâmetro entre 7 a 12 centímetros (Ashraf *et al.*, 2016). A polpa é amarelada, dura, ácida e adstringente, devido à presença de pectinas, taninos e mucilagens, contendo um grande número de sementes com uma coloração castanho-escura (Regato, Guerreiro, and Regato, 2017). Em Portugal, o marmelo fica pronto a ser colhido em setembro (Serralves, 2020), apresentando um aroma bastante característico e pelagem na casca, que diminui com o avanço da maturação (Mir *et al.*, 2016) tornando-se praticamente inexistente. Porém, devido à sua adstringência não é normalmente consumido em fresco (Regato, Guerreiro, and Regato, 2017) mas preferencialmente assado ou cozido, transformado em geleia, compota ou marmelada (Legua *et al.*, 2013; Ashraf *et al.*, 2016; Mir *et al.*, 2016).

1.1.3 Cultivares

Consoante a forma do fruto são descritas duas variedades de marmelo, *Cydonia oblonga* subespécie *polyformis* com a forma de pera, e *Cydonia oblonga* subespécie *maliformis* com a forma de maçã. Esta última contém uma polpa mais dura e um sabor mais adstringente relativamente à subespécie *polyformis* (Ashraf *et al.*, 2016).

Em Portugal, estão descritas quatro cultivares de marmelo, nomeadamente, a Gigante de Vranja, a De Portugal ou Portugal, a Gamboa e a Champion (Tabela 1). As cultivares Gigante de Vranja e a Portugal apresentam diferentes estados de maturação que correspondem a diferentes períodos de colheita. Por exemplo, a cultivar Gigante de Vranja deve colher-se a partir da primeira quinzena de setembro enquanto, a cultivar Portugal é colhida a partir do início de outubro (Regato, Guerreiro, and Regato, 2017).

Tabela 1. Cultivares de marmelo presentes em Portugal.

Cultivar	Características	Referência bibliográfica
Gigante de Vranja	Frutos em forma oblonga com grande peso e calibre médio, 344 g e 87 mm, respetivamente. Adocicados com 16,9% de sólidos solúveis totais.	Regato, Guerreiro, and Regato, 2017; Viveiros e Centro de Jardinagem.
De Portugal/Portugal	Frutos em forma arredondada com um peso médio de 305 g e um calibre 85 mm. Apresentam 16,1% de sólidos solúveis totais. A epiderme contém alguma pubescência esbranquiçada.	DGAV, 2016; Regato, Guerreiro, and Regato, 2017.
Gamboa	Frutos em forma de pera, muito doces, com epiderme amarelo-vivo e polpa branca.	DGAV, 2016; Viveiros e Centro de Jardinagem
Champion	Polpa amarela e macia, sumarenta e perfumada.	Viveiros e Centro de Jardinagem.

1.1.4 Adaptabilidade da espécie

Este tipo de árvore adapta-se com facilidade a um clima mediterrânico e temperado, ou seja, verões quentes e invernos longos, resistindo a temperaturas baixas. Deste modo, o marmeleiro pode ser cultivado nas mesmas regiões onde se cultiva a videira. Tanto durante o desenvolvimento do marmeleiro, como durante o desenvolvimento do fruto esta árvore requer bastante luminosidade, assim como temperaturas altas. Contudo, as geadas tardias prejudicam a fecundação, floração e crescimento de novos ramos, tal como o excesso de humidade no verão é prejudicial uma vez que pode potenciar o aparecimento de pragas e doenças (Regato, Guerreiro, and Regato, 2017).

Esta espécie prolifera em diferentes tipos de solos, desde os mais pobres até aos mais férteis, tendo preferência por solos drenados, argiloarenosos, franco-argilosos, ricos em matéria orgânica e que tenham a capacidade de reter uma quantidade moderada de humidade. Desde que sejam frescos e com uma reação ligeiramente ácida, com extremos de pH a variar entre 5,6 e 7,2 (Regato, Guerreiro, and Regato, 2017).

Por norma os marmeleiros surgem nas margens das ribeiras e nas orlas de bosques, sendo considerada uma espécie ruderal (Regato, Guerreiro, and Regato, 2017; Serralves, 2020). É utilizado como porta-enxerto de nespereira (*Eriobotrya japonica* Lindl), pereira (*Pyrus communis* L.) (Regato, Guerreiro, and Regato, 2017; Legua *et al.*, 2013) e macieira (*Malus domestica*) (Zhang *et al.*, 2019) pelo facto de ser tolerante ao encharcamento e asfixia radicular (Regato, Guerreiro, and Regato, 2017).

1.1.5 Produção e mercado comercial

Em 2017, de acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO), a produção mundial de marmelo foi de 697 532 toneladas (t), distribuídas por uma área de 89 669 hectares (ha). Já em 2019, a produção de marmelo a nível mundial sofreu uma quebra tendo sido produzidas 666 589 t, apesar do aumento da área de produção para 93 699 ha (FAOSTAT, 2019). Em 2017, a Ásia e a Europa foram os principais continentes produtores, sendo a Turquia o maior país produtor, com 174 038 t, seguido da China e do Uzbequistão com 120 528 e 109 516, respetivamente. Portugal ocupou o 14º lugar no *ranking* da produção mundial com 5 492 t, numa área de 728 ha (Tabela 2) (FAOSTAT, 2019).

Tabela 2. Produção mundial de marmelo em 2017, adaptado do FAOSTAT, 2019.

País	Produção (t)	Área (ha)	Produtividade (hg/ha)
Turquia	174 038	6 568	264 979
China	120 528	41 287	29 193
Uzbequistão	109 516	6 867	192 539
Irão	76 082	6 867	110 794
Marrocos	45 746	4 067	112 481
Portugal (14)	5 492	728	75 440
Mundo	697 532	89 699	77 764

Relativamente às trocas comerciais, a Rússia é o país que mais importa, seguido da Áustria e Roménia com 5 825, 2 990 e 2 560 t, respetivamente. No que diz respeito às exportações, as primeiras posições são ocupadas pela Turquia, Holanda e Grécia com 15 698, 9 194 e 3 287 t, respetivamente (FAOSTAT, 2019).

De acordo com o Instituto Nacional de Estatística (INE), em 2018, Portugal produziu 9 633 t de marmelo, das quais 6 553 t foram produzidas na Beira Interior numa área de 1 031 ha (INE, 2020) (Tabela 3). Relativamente ao comércio internacional, a balança comercial portuguesa é deficitária, tendo sido importadas 730 t e exportadas apenas 34 t de marmelo (INE, 2019), existindo uma necessidade, devido à procura, de aumentar a produção em Portugal e aproveitar o facto desta espécie adaptar-se a diferentes condições edáficas.

Tabela 3. Produção nacional de marmelo em 2018, adaptado do INE, 2020.

Regiões	Produção (t)	Área (ha)	Produtividade (hg/ha)
Entre Douro e Minho	355	35	10 169
Trás-os-Montes	616	76	8 065
Beira Litoral	308	46	6 742
Beira Interior	6 553	1 031	6 357
Ribatejo e Oeste	1 100	111	9 910
Alentejo	532	55	9 680
Algarve	170	18	9 611
Açores	0	0	0
Madeira	0	0	0
Portugal	9 633	1 371	7 024

1.1.6 Composição nutricional

O marmelo é composto por 90,6% de polpa, 4,4% de casca e 5% de sementes (Velo, Sousa, and Sempiterno, 2020). Em termos nutricionais apresenta um baixo teor calórico, pobre em proteínas e lípidos, contém um elevado teor de água, sendo rico em ácido ascórbico (vitamina C), fibras e em minerais, destacando-se o potássio, cálcio e fósforo (Gironés-Vilaplana *et al.*, 2014; Legua *et al.*, 2013; Velo, Sousa, and Sempiterno, 2020). De acordo com o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) o marmelo é composto por 83,6 g de água, 9,3 g de hidratos de carbono, 6,0 g de fibra, 0,3 g de proteína e ácidos orgânicos e, 0,2 g de lípidos (Tabela 4) (INSA, 2019).

O marmelo confere grandes benefícios para a saúde dadas as suas propriedades nutricionais, sendo uma fonte de compostos fenólicos e de ácidos orgânicos (Silva *et al.*, 2005; Velo, Sousa, and Sempiterno, 2020).

Tabela 4. Tabela nutricional por 100 g de parte edível de marmelo, adaptado do INSA, 2019.

Informação nutricional	g/100 g
Energia	223 kJ/ 53 kcal
Lípidos	0,2 g
Ácidos gordos monoinsaturados	0,1 g
Ácidos gordos polinsaturados	0,1 g
Ácido linoleico	0,1 g
Hidratos de carbono	9,3 g
Açúcares	9,3 g
Sacarose	0,3 g
Fibra	6,0 g
Proteínas	0,3 g
Sal	0,0 g
Água	83,6 g
Ácidos orgânicos	0,3 g
Vitaminas	
Vitamina C	14 mg
a-tocoferol	0,55 mg
Niacina	0,1 mg
Equivalentes de niacina	0,2 mg
Triptofano/ 60	0,1 mg
Riboflavina	0,04 mg
Vitamina B6	0,04 mg
Tiamina	0,02 mg
Caroteno	29 µg
Vitamina A total (equivalentes de retinol)	5 µg
Folatos	3 µg
Minerais	
Cinzas	0,35 g
Potássio	200 mg
Cálcio	14 mg
Fósforo	14 mg
Magnésio	7 mg
Sódio	4 mg
Ferro	0,1 mg
Zinco	0,1 mg

1.1.7 Compostos biologicamente ativos

O marmelo é conhecido por ser rico em compostos fenólicos. Estes possuem atividade antioxidante, tendo a capacidade de inibir a ação dos radicais livres e retardar ou impedir a oxidação (Y. Zhang *et al.*, 2008). A polpa é constituída por ácidos 3-O-cafeoilquínico, 4-O-cafeoilquínico, 5-O-cafeoilquínico e 3,5-O-dicafeoilquínico, quercetina 3-galactosídeo e rutina, estando presente em maior quantidade os ácidos 3-cafeoilquínico e 5-O-cafeoilquínico. A casca é composta pelos mesmos compostos que a polpa aos quais acrescem o 3-O-rutinosilcampferol, 3-O-glucosilcampferol e outros compostos parcialmente identificados (dois glicósidos da quercetina acilados com ácido p-cumárico, um glicosídeo do campferol e dois glicósidos do campferol também acilados com ácido p-cumárico) (Silva *et al.*, 2006).

Relativamente aos aminoácidos livres, este fruto é constituído por 21 aminoácidos, estando estes em maior quantidade na casca. Os mais abundantes são a asparagina, ácido aspártico, glicina, ácido glutâmico, hidroxiprolina e histidina. Quanto aos ácidos orgânicos, estes, ao contrário dos aminoácidos, apresentam um perfil semelhante, tanto na polpa, como na casca. Constituídos por ácido ascórbico, cítrico, quínico, shiquímico, fumárico, oxálico e málico. Dos quais o ácido málico e quínico são os mais abundantes, correspondendo a mais de 90% (Silva *et al.*, 2006).

1.1.8 Fitoterapia

A composição química do marmelo é de grande importância, tendo grandes benefícios para a saúde, devido às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, anti ulcerativas e anti carcinogénicas (Zhang *et al.*, 2019). As frutas com elevadas concentrações de compostos fenólicos são aconselháveis para a prevenção de doenças degenerativas (Legua *et al.*, 2013). Tradicionalmente, as sementes do marmelo são aplicadas sob a forma de infusão contra a dor de garganta, constipação e tosse. Por outro lado, as pectinas e fibras solúveis, contribuem na regularização do trânsito intestinal e na prevenção de úlceras. Quando esmagadas, devido às suas mucilagens podem ser aplicadas em feridas (Ashraf *et al.*, 2016). O consumo de marmelo tem, aparentemente, um efeito protetor sobre inflamações, dermatites atópicas, úlceras e cancro. Os elevados teores de potássio e cálcio, são importantes para prevenir a deficiência destes nutrientes no ser humano (Veloso, Sousa, and Sempiterno, 2020).

1.1.9 Doenças e pragas

O marmeleiro pode ser afetado tanto por doenças, como por pragas. A entomosporiose (*Entomosporium maculatum*) é um fungo que origina lesões circulares necróticas nas folhas, ramos e até mesmo nos frutos, sendo considerada a doença mais importante no marmeleiro (AGROTEC, 2020). A ocorrência desta doença é favorecida por temperaturas a rondar os 20 e os 25 °C, afetando não só o desenvolvimento da árvore, bem como a produção de frutos, e quando não é convenientemente controlada pode causar prejuízos graves (Regato, Guerreiro, and Regato, 2017). A bactéria *Erwinia amylovora* é considerada um organismo de quarentena na lista A2 da *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO), responsável pela doença vulgarmente designada por fogo bacteriano (EPPO, 2020). Esta bactéria afeta principal as macieiras, pereiras e marmeleiros. Pode ser transportada por insetos a curtas distâncias, pelo vento ou chuva. Temperaturas superiores a 15 °C e a presença de elevados níveis de humidade, superior a 80 %, são propensos à disseminação da bactéria que, conseqüentemente, origina um aspeto acastanhado dos ramos, folhas e flores, assemelhando-se este aspeto ao de uma queima provocada pelo fogo (DGADR, 2011; Ruiz *et al.*, 2018). Esta doença em casos mais extremos pode conduzir à morte das plantas. Quanto às pragas, as mais comuns são a mosca do Mediterrâneo (*Ceratitis capitata* Wiedeman), os afídeos (*Aphis pomi* De Geer) e o “bichado-da-fruta” (*Cydia pomonella* L.) (Regato, Guerreiro, and Regato, 2017).

Para além das pragas e doenças, um dos problemas que mais frequentemente afeta a produção de marmelos é a suscetibilidade ao ferro, conhecida como clorose férrica (Regato, Guerreiro, and Regato, 2017; Rahimi *et al.*, 2020; Valipour *et al.*, 2020). A clorose férrica ocorre, especialmente, em solos de origem calcária (Rahimi *et al.*, 2020) e em solos alcalinos (Valipour *et al.*, 2020). Os níveis excessivos de carbonato de cálcio, a presença de altos teores de bicarbonato no solo, bem como elevados valores de pH são as principais causas da clorose em solos calcários (Lucena, 2000). Contudo, os marmeleiros não são capazes de tolerar baixas concentrações de carbonato de cálcio ativo (<50 g kg⁻¹) e, desta forma, rapidamente apresentam sintomas da deficiência de ferro, tanto em solos calcários, como em alcalinos (Valipour *et al.*, 2020). Esta deficiência de ferro caracteriza-se pelo decréscimo da concentração de pigmentos fotossintéticos nas folhas e o aparecimento de um fino reticulado, no qual apenas as nervuras permanecem verdes (Pestana and Correia, 2019) e, deste modo, as árvores ficam fragilizadas originando uma redução no crescimento e na produtividade (Rahimi *et al.*, 2020).

1.2 *Xylella fastidiosa*

1.2.1 Classificação e morfologia

Até ao momento, não há registo da deteção de *Xylella fastidiosa* (*Xf*) em marmeleiro. Porém, a *Xf* é uma das bactérias fitopatogénicas mais perigosas do mundo (Schneider *et al.*, 2020), tendo a capacidade de colonizar o xilema de inúmeras espécies agrícolas, ornamentais e florestais, sendo responsável por uma vasta gama de doenças com enorme impacto económico e ambiental (Godefroid *et al.*, 2019).

O género *Xylella* é composto por uma única espécie designada *Xylella fastidiosa*, descrita por Wells e colaboradores (Wells *et al.*, 1987) e classificada pela EPPO como organismo de quarentena (Lista A2 EPPO, 2021) devido ao seu potencial destrutivo. A *Xf* é uma bactéria gram-negativa da família *Xanthomonadaceae* (Rapicavoli *et al.*, 2018), com forma de bastonete, com paredes celulares onduladas e desprovida de flagelo, com 0,25 a 0,50 µm de diâmetro e 0,90 a 4,00 µm de comprimento (Almeida, Coletta-Filho, and Lopes, 2014), tendo um crescimento lento e estritamente aeróbio (Baldi and La Porta, 2017). A *Xf* coloniza dois habitats distintos, o xilema das plantas hospedeiras e o tubo digestivo de insetos sugadores de seiva (Jeger *et al.*, 2018), disseminando-se através dos insetos vetores e por propagação vegetativa (Jeger *et al.*, 2018; Waliullah *et al.*, 2019), levando ao aumento da distribuição geográfica (Almeida, Coletta-Filho, and Lopes, 2014). O tempo de inoculação e o aparecimento de sintomas na planta é altamente variável, alterando de acordo com a espécie e idade da planta, geralmente mais curto em hospedeiros herbáceos do que lenhosos (Jeger *et al.*, 2018).

1.2.2 Insetos vetores, hospedeiros e transmissão

A bactéria é transmitida por insetos que se alimentam do fluído xilémico, pertencentes à ordem Hemiptera (Clastopteridae, Cercopidae, Cicadellidae, Cicadidae e Aphrophoridae) (Godefroid *et al.*, 2019), de forma persistente, não havendo um período de latência após a aquisição. Os vetores adquirem a bactéria enquanto se alimentam do xilema de plantas infetadas e podem inocular o patógeno em plantas saudáveis imediatamente após a aquisição (Figura 1). Uma vez infetados, os vetores adultos podem transmitir a bactéria durante toda a sua vida (Yaseen *et al.*, 2015), embora não exista transmissão à descendência (Jeger *et al.*, 2018). A *Xf* tem uma ampla gama de hospedeiros, que inclui plantas agrícolas, ornamentais e florestais pertencentes a mais de 563 espécies (Schneider *et al.*, 2020), sendo considerada patogénica em mais de 100 espécies de plantas (Rapicavoli *et al.*, 2018). Depois de inoculadas em plantas suscetíveis, as células

bacterianas aderem às paredes dos vasos e multiplicam-se ativamente, produzindo exopolissacarídeos, formando biofilmes que vão bloqueando os vasos do xilema à medida que a bactéria os invade, impedindo o transporte de água e sais minerais (Baldi and La Porta, 2017; Janse and Obradovic, 2010; Schneider *et al.*, 2020; EPPO Bulletin, 2019). Este processo culmina com o aparecimento de inúmeros sintomas, que podem ser confundidos com stress hídrico (Jeger *et al.*, 2018), problemas nutricionais (Baldi and La Porta, 2017), queimaduras solares ou outros patógenos, tornando difícil a sua detecção precoce (EPPO Bulletin, 2019).

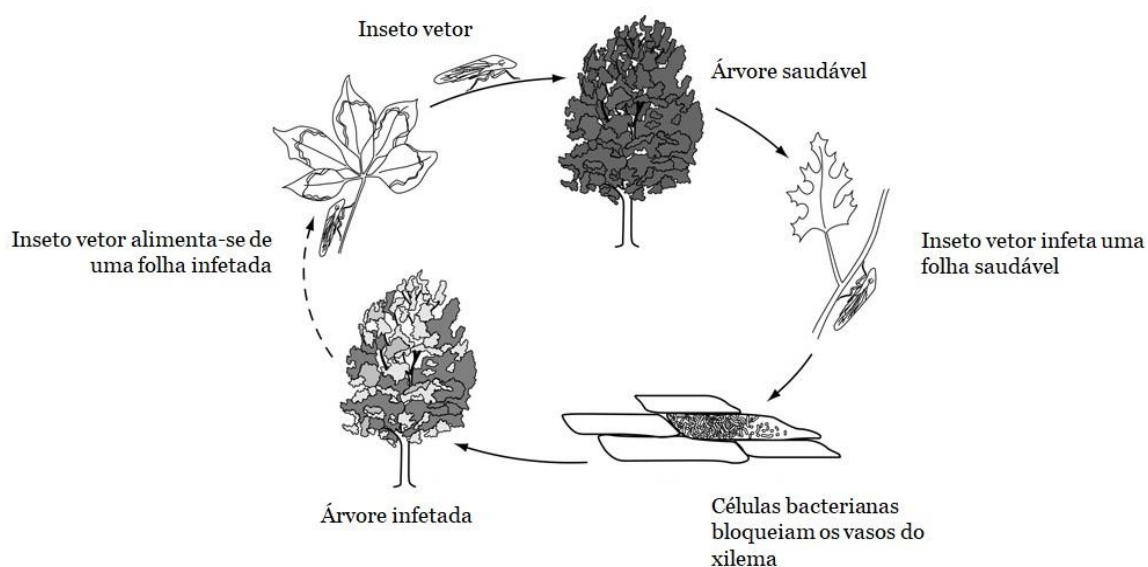


Figura 1. Ciclo de vida da *Xf*, adaptado de Gould and Lashomb, 2007.

1.2.3 Sintomas

Geralmente, os sintomas em plantas hospedeiras incluem necrose marginal da folha, queimaduras na mesma, clorose interveinal nas superfícies desta, murcha foliar, desfolha, crescimento vegetativo severamente reduzido, floração prematura, redução da produção e dimensão dos frutos, e endurecimento dos frutos (EPPO Bulletin, 2019; Schneider *et al.*, 2020; Ropicavoli *et al.*, 2018; Waliullah *et al.*, 2019). Normalmente, os sintomas aparecem em apenas alguns ramos, espalhando-se pela planta (EPPO Bulletin, 2019). Muitas das plantas hospedeiras permanecem assintomáticas, contudo uma vez infetadas podem servir como reservatório ambiental, enquanto que, para outras a infecção pode ser tão grave que conduz à morte rápida da planta (Jeger *et al.*, 2018).

1.2.4 Subespécies e doenças

Atualmente, foram descritas seis subespécies de *Xf* associadas a doenças que afetam gravemente o sector agroflorestal. A *Xf* subespécie *fastidiosa* provoca a doença de *Pierce* na videira (*Vitis vinifera*) tendo sido também detetada numa ampla variedade de plantas perenes; *Xf* subespécie *multiplex* encontra-se relacionada com a queimadura foliar de algumas espécies, nomeadamente a doença “queimadura foliar” nas amendoeiras (*Prunus dulcis*), sendo a subespécie que apresenta maior gama de plantas hospedeiras; *Xf* subespécie *sandyi* causa a doença “queimadura nas folhas” de oleandro (*Nerium oleander*); *Xf* subespécie *pauca* está associada com a clorose variegada dos citrinos (*Citrus spp*), com o síndrome do declínio rápido da oliveira (*Olea europaea*) e com a “queimaduras da folha” do café; *Xf* subespécie *morus* provoca a “queimadura nas folhas” da amoreira vermelha (*Morus rubra*); por fim a *Xf* subespécie *tashke* está relacionada com as “queimaduras foliares” em *Chitalpa tashkentensis* (Godefroid *et al.*, 2019; Rapticavoli *et al.*, 2018; Jeger *et al.*, 2018; Baldi and La Porta, 2017). No entanto, cada subespécie tem a sua lista de hospedeiro suscetíveis e com ocorrências distintas (Nunney, Elfekih, and Stouthamer, 2012).

1.2.5 Distribuição geográfica

Xf é nativa do continente americano onde ocorreram diversas introduções e reintroduções associadas a eventos de diversificação genética (Nunney, Elfekih, and Stouthamer, 2012; Baldi and La Porta, 2017) (Figura 2).



Figura 2. Distribuição geográfica da *Xf*, adaptado da EPPO, 2021.

No entanto, em 2013 foi detetado o primeiro surto na Europa, mais concretamente em Apúlia, no sul de Itália. A doença afetou principalmente oliveiras, onde se identificou a subespécie *pauca* (Rapicavoli *et al.*, 2018; Schneider *et al.*, 2020), estirpe CoDIRO. Desde então, esta subespécie disseminou-se pelo sul de Itália, onde tem devastado uma extensa área de olival e afetado diversas espécies ornamentais, causando problemas socioeconómicos sem precedentes (Godefroid *et al.*, 2019; Rapicavoli *et al.*, 2018). Em 2015, a subespécie *multiplex* e *pauca* foram detetadas no Sul de França e em Córsega e, posteriormente em Nice, na região Provença-Alpes-Côte d'Azur. Em 2016, na Alemanha foi detetada a subespécie *fastidiosa* em plantas de alecrim e oleandro. Em 2017, a Espanha confirmou a deteção das subespécies *multiplex*, *pauca* e *fastidiosa* em amendoeiras, videiras, cerejeiras e ameixoeiras na província de Alicante e nas Ilhas Baleares (Godefroid *et al.*, 2019). Em 2019, foi confirmado pela primeira vez a presença desta bactéria em território nacional, em plantas de *Lavandula dentada*, no jardim do Zoo de Santo Inácio, em Vila Nova de Gaia, identificada como subespécie *multiplex* de acordo com a Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) (Ofício circular N.º 2/2019).

Em fevereiro de 2021, foi confirmada a presença da bactéria em cinco novos locais no concelho do Porto, tendo sido até à data identificadas quarenta e três espécies de plantas infetadas em mais de 110 focos. Deste modo, Portugal já contém sete concelhos em zona demarcada de *Xf* (Figura 3) (Despacho N.º 4/G/2021).



Figura 3. Zona demarcada de *Xf* em Portugal, adaptado do Despacho N.º 4/G/2021.

1.2.6 Epidemiologia

O estabelecimento e a ocorrência de um surto depende da subespécie introduzida, dos hospedeiros presentes, da existência de vetores e de fatores ambientais favoráveis. O aparecimento de doenças em áreas onde antes eram inexistentes e a gravidade das doenças provocadas pela *Xf* tem vindo a aumentar, devido às alterações climáticas e globalização do comércio de plantas (Godefroid *et al.*, 2019). O clima temperado das áreas costeiras do mediterrâneo e atlântico caracterizado com invernos amenos, proporciona condições favoráveis para o crescimento e colonização da bactéria (Janse and Obradovic, 2010), sendo os 26 e os 28 °C a temperatura ótima para o seu crescimento (Baldi and La Porta, 2017). Nas estações quentes o patógeno não só evolui mais rapidamente, como possui maior taxa de transmissão quando comparado com as estações frias, uma vez que nestas as temperaturas baixas afetam a sobrevivência da mesma nos vasos do xilema, assim como a abundância de insetos vetores fundamentais para a disseminação da doença (Godefroid *et al.*, 2019; Almeida, Coletta-Filho, and Lopes, 2014). Desta forma, a Europa reúne condições favoráveis para a disseminação da *Xf*, nomeadamente na Grécia, Itália, Espanha, França e Portugal, tornando-se assim uma ameaça, não só para agricultura como para a biodiversidade (Jeger *et al.*, 2018).

1.2.7 Detecção

A deteção no campo acontece já tardiamente, através da visualização de sintomas na planta e, em laboratório, as abordagens para o diagnóstico de *Xf* incluem o isolamento em meios de cultura, testes serológicos e testes moleculares. No entanto, para além da *Xf* ter um crescimento lento, não cresce em meios de cultura comuns, requerendo meios seletivos como *periwinkle wilt* (PW) (Baldi and La Porta, 2017) ou *buffered charcoal yeast extract* (BCYE) (Janse and Obradovic, 2010), nos quais demora entre duas a três semanas até se obterem colónias (Jeger *et al.*, 2018; Baldi and La Porta, 2017). Os testes serológicos para a deteção de *Xf* incluem *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), *Dot-immunobinding assay* (DIBA), *Direct Tissue Immuno Blot Assay* (DTBIA), imunofluorescência indireta e *western blotting* (Yaseen *et al.*, 2015; Jeger *et al.*, 2018). Para além destes métodos, existem vários testes moleculares, que podem ser aplicados a diferentes matrizes, como plantas ou insetos (Elbeaino *et al.*, 2020) como é o caso do *Polymerase Chain Reaction* (PCR), *real-time PCR* e *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) (Yaseen *et al.*, 2015; Jeger *et al.*, 2018).

1.2.8 Tratamento e prevenção

Uma vez que não há um tratamento específico para a *Xf*, a União Europeia (UE) aplicou estratégias, de forma a erradicar e/ou evitar a disseminação da bactéria através da remoção do hospedeiro, controlo de vetores e restrição ao movimento de plantas para plantar (Schneider *et al.*, 2020). Deste modo, de acordo com a Portaria n.º 243/2020, foram implementados procedimentos e medidas de proteção fitossanitária, destinadas à erradicação no território nacional da bactéria (Figura 4). Assim, sempre que seja confirmada a presença da bactéria é estabelecida uma zona demarcada, constituída por duas áreas. A zona infetada onde se procede à destruição das plantas hospedeiras da subespécie identificada (Portaria n.º 243/2020), e a zona tampão onde são realizados ensaios para a deteção das bactérias a todas as plantas suscetíveis. Desta forma, é essencial desenvolver métodos de diagnósticos específicos, sensíveis, simples e rápidos para evitar a disseminação do patógeno (Waliullah *et al.*, 2019).

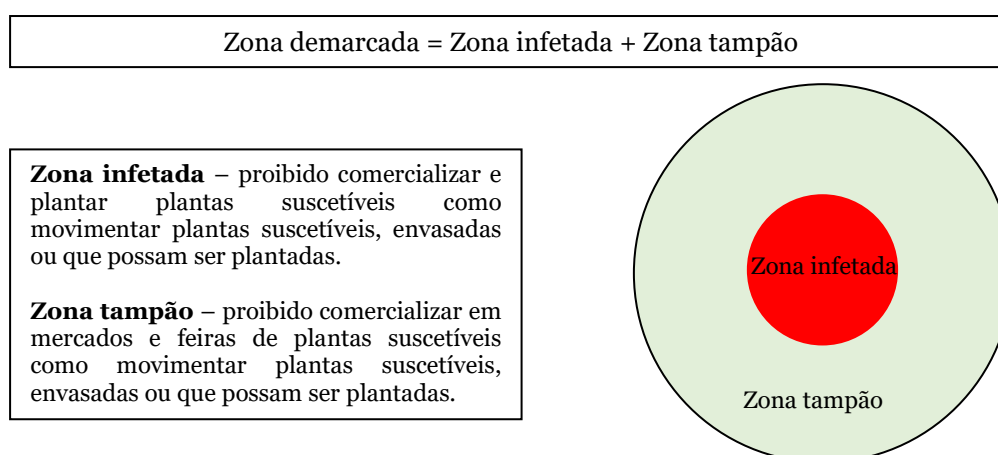


Figura 4. Restrições de movimentos em zona demarcada para *Xf* em Portugal, adaptado do Despacho N.º 4/G/2021.

1.3 Técnicas moleculares

As técnicas moleculares que promovem a amplificação de ácidos nucleicos são ferramentas valiosas em diversos campos da ciência (Wong *et al.*, 2018), sendo amplamente utilizadas em diagnóstico, não só com aplicações clínicas como, para o controlo de qualidade alimentar e monitorização ambiental (Becherer *et al.*, 2020).

Uma das técnicas de amplificação de ácidos nucleicos mais utilizada é o PCR, desenvolvido em 1983, sendo aplicado em diversas áreas da saúde, como no diagnóstico de doenças e investigação de distúrbios genéticos (Obande and Singh, 2020). Esta técnica sensível e específica é capaz de detetar um número de cópias extremamente baixas de ácidos

nucleicos numa amostra (Tabatabaei, Islam, and Ahmed, 2021). Contudo, requer materiais e equipamentos sofisticados e caros, nomeadamente um termociclador, limitando a sua aplicação no campo (Gallas-lindemann *et al.*, 2016; Pumford *et al.*, 2020).

Nas últimas duas décadas, surgiram novas técnicas de amplificação de ácidos nucleicos baseados em condições isotérmicas, ultrapassando algumas limitações do PCR. Dentro destas encontram-se a *transcription-mediated amplification* (TMA), *helicase-dependent amplification* (HDA), *rolling circle amplification* (RCA) e LAMP, destacando apenas as mais relevantes. Estas novas técnicas permitem reações de amplificação a uma temperatura constante e moderada, eliminando a necessidade de um termociclador, requerendo dispositivos simples e de baixo custo, com tempos de processamento mais rápidos quando comparados com o PCR. Estas vantagens tornam estas técnicas mais apelativas tornando a aplicação em contexto real possível (Pumford *et al.*, 2020; Becherer *et al.*, 2020).

Assim, as técnicas que permitem uma aplicação em contexto real de uma forma simples e rápida têm sido uma aposta da ciência, uma vez que produzem resultados fáceis de interpretar, sem exigirem o uso de muitos equipamentos caros (Augustine *et al.*, 2020; Aglietti *et al.*, 2019). Nos últimos anos, o LAMP surgiu como uma opção robusta para o diagnóstico rápido de *Xf* (Harper, Ward, and Clover, 2010; Yaseen *et al.*, 2015; Aglietti *et al.*, 2019), permitindo uma deteção mais precoce (Augustine *et al.*, 2020; Aglietti *et al.*, 2019).

1.3.1 Loop-Mediated Isothermal Amplification

1.3.1.1 Conceito

O LAMP é uma técnica molecular de amplificação de ácidos nucleicos desenvolvida em 2000 por Notomi e coautores (Notomi *et al.*, 2000). A tecnologia LAMP é rápida, sensível, eficiente e de baixos custos quando comparada com o PCR, produzindo resultados fáceis de interpretar (Aglietti *et al.*, 2019; Tomita *et al.*, 2008). Possui uma elevada especificidade (Becherer *et al.*, 2020; Notomi *et al.*, 2000) obtida através da utilização de um conjunto de quatro a seis *primers* de *primers* específicos (Pumford *et al.*, 2020). Através da utilização da DNA polimerase *Bst*, isolada da bactéria *Bacillus stearothermophilus* (Ahuja and Somvanshi, 2020; Wong *et al.*, 2018). A reação LAMP ocorre a uma temperatura constante, entre 60 a 65 °C (Augustine *et al.*, 2020; Yang, Domesle, and Ge, 2018) tendo a capacidade de amplificar cerca de 10⁹ cópias em 60 minutos (Notomi *et al.*, 2000). A reação LAMP permite amplificar ácido desoxirribonucleico (DNA), contudo se o material de partida for ácido ribonucleico (RNA)

é necessário adicionar à reação uma transcriptase reversa, sendo a técnica denominada por transcrição reversa – LAMP (RT – LAMP) (Wong *et al.*, 2018; Augustine *et al.*, 2020; Ahuja and Somvanshi, 2020).

Uma particularidade desta técnica encontra-se associada ao facto de ser possível visualizar os produtos amplificados através da observação da turbidez associada à formação de um subproduto da reação de amplificação, mais precisamente um precipitado de pirofosfato de magnésio de cor branca (Becherer *et al.*, 2020). Contudo, existem outros métodos que permitem visualizar os produtos resultantes da amplificação de LAMP, através de métodos colorimétricos ou fluorescentes, no entanto envolve equipamentos caros (Harper, Ward, and Clover, 2010). Outra forma de confirmar a amplificação consiste na utilização de uma eletroforese em gel de agarose, utilizando-se um agente intercalante fluorescente, por exemplo o *SYBR Green I*, no entanto é um processo lento e envolve tanto material como mão de obra especializado (Becherer *et al.*, 2020; Augustine *et al.*, 2020; Ahuja and Somvanshi, 2020; Yang, Domesle, and Ge, 2018).

Ao longos dos anos, o LAMP tem vindo a ganhar popularidade no diagnóstico de diversas doenças (Aglietti *et al.*, 2019), sendo aplicado no diagnóstico de vários agentes patogénicos humanos, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Hosaka *et al.*, 2009), vírus do papiloma humano (HPV) (Hagiwara *et al.*, 2007), vírus dengue (Parida *et al.*, 2005), síndrome respiratória do médio oriente (MERS) (Bhadra *et al.*, 2015) e na síndrome respiratória aguda grave – coronavírus 2 (SARS-CoV-2) (Alekseenko *et al.*, 2021); bem como em patógenos de plantas, nomeadamente, *Erwinia amylovora* (Bühlmann *et al.*, 2013), *Sclerotinia sclerotiorum* (Duan *et al.*, 2014), *Colletotrichum truncatum* (Tian *et al.*, 2017), *Aspergillus fumigatus* (King *et al.*, 2019), *Ceratocystis platani*, *Xylella fastidiosa* e *Phytophthora ramorum* (Aglietti *et al.*, 2019) e *Pseudomonas syringae* (Chen *et al.*, 2020).

1.3.1.2 Desenho de *primers*

O desenho de *primers* é uma etapa crucial, sendo um processo complexo e exigente (Ahuja and Somvanshi, 2020). Como referido anteriormente, a especificidade da técnica baseia-se na utilização de quatro (B3, F3, FIP e BIP) ou seis *primers* (B3, F3, FIP, BIP, LF e LB) (Wang, X-R. *et al.*, 2015) específicos, que reconhecem seis a oito regiões diferentes da sequência de DNA alvo, respetivamente (Becherer *et al.*, 2020; Ahuja and Somvanshi, 2020). Na Figura 5 é possível observar 8 regiões distintas da cadeia de DNA alvo (representado a vermelho), na posição 3' temos as regiões F3c, F2c, FL e F1c e na posição

5' as regiões B1, BLc, B2 e B3. Estas regiões são desenhadas de modo a serem sequências complementares à cadeia de DNA (Panno *et al.*, 2020).

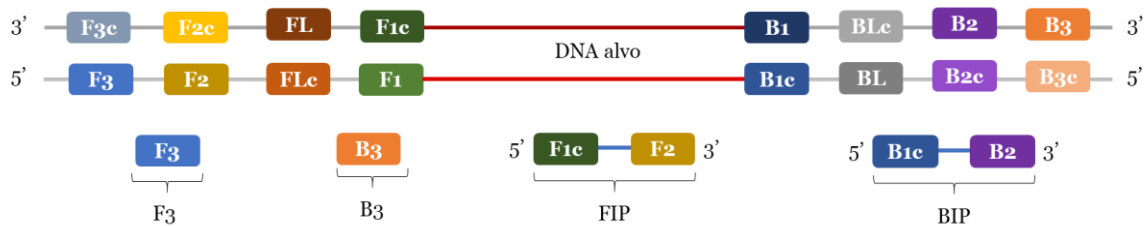


Figura 5. Representação esquemática dos primers LAMP, adaptado de Panno *et al.*, 2020.

Os *primers* designados de F3 e B3 correspondem aos *primers* exteriores, sendo o F3 o *primer* externo dianteiro e o B3 o *primer* externo traseiro. Por outro lado, os *primers* designados de FIP e BIP correspondem aos *primers* internos, sendo o FIP o *primer* interno dianteiro e o BIP o *primer* interno traseiro (Becherer *et al.*, 2020). O *primer* FIP é composto pelo 5' F1c-F2 3', enquanto o *primer* BIP é composto pelo 5' B1c-B2 3' (Ahuja and Somvanshi, 2020), como se pode observar na Figura 5. Os *primers* designados de LF e LB correspondem aos *primers loop*, sendo o LF o *primer loop* dianteiro e o LB o *primer loop* traseiro (Ahuja and Somvanshi, 2020; Augustine *et al.*, 2020).

O desenho dos *primers* é feito com recurso a um *software* específico uma vez que se trata de um processo complexo, existindo dois tipos de *software*, o *PrimerExplorer*, *online* e de acesso gratuito e o *LAMP Designer* (disponível no *Premier Biosoft*), um *software* que requer licença, no entanto, oferece a capacidade de evitar homologias cruzadas ao desenhar os *primers*, permitindo o desenho através do alinhamento de múltiplas sequências (Ahuja and Somvanshi, 2020; Panno *et al.*, 2020; Aglietti *et al.*, 2019). Os *primers* são específicos de 5' para 3' (Rockweiler, 2018), no entanto durante o processo de desenho, deve ter-se em consideração alguns fatores como, a temperatura de *melting* (T_m), percentagem em guanina (G) citosina (C), distância entre os *primers* na sequência alvo, estabilidade na terminação de cada *primer* e a formação de estruturas secundárias (Tomita *et al.*, 2008; Panno *et al.*, 2020).

A T_m é afetada tanto pelo teor em GC como pelo número de par de bases (bp), pelo que o teor de GC deve variar entre os 40 a 60 %, evitando extremidades ricas em adenina (A) timina (T) (Rockweiler, 2018; Eiken, 2014; Tomita *et al.*, 2008; Panno *et al.*, 2020).

A região a amplificar por LAMP, distância entre F2 a B2, inclusive, não deve ser superior a 300 pares de bases (Notomi *et al.*, 2000). Assim, as distâncias recomendadas são de 120 a 160 nucleótidos entre F2 a B2, de 40 a 60 nucleótidos no *loop* (F1c a F2), 60 nucleótidos

de F2 a F3, e até 100 nucleótidos entre F1c e B1c (Rockweiler, 2018; Eiken, 2014; Tomita *et al.*, 2008). Para além da distância entre cada par de *primer*, estes devem ter um determinado comprimento, ou seja, tanto os *primers* externos, como os internos devem ter entre 15 a 25 nucleótidos, enquanto os *primers loop* devem ter entre 15 a 22 nucleótidos (Rockweiler, 2018).

A estabilidade das terminações dos *primers* baseia-se na variação de energia livre (ΔG). Assim, as terminações 3' de F2/B2, F3/B3 e LF/LB e as terminações 5' de F1c/B1c são desenhadas de modo a apresentarem uma $\Delta G \leq -4$ kcal/mol. A estabilidade é de extrema importância, uma vez que são nestas extremidades que se dá o início da síntese de DNA (Rockweiler, 2018; Eiken, 2014).

Por fim, para além dos pontos mencionados anteriormente deve evitar-se a formação de estruturas secundárias, assim como ter em conta que as extremidades 3' não sejam complementares, uma vez que estas podem levar à formação de dímeros (Eiken, 2014; Panno *et al.*, 2020).

1.3.1.3 Mecanismo de amplificação

Num primeiro passo, o *primer* FIP liga-se com a região complementar F2c do DNA alvo. Após a ligação, ocorre a polimerização da cadeia complementar através da atividade da DNA polimerase (Figura 6 – A). Seguidamente, a cadeia formada é libertada quando o *primer* externo F3 emparelha com a região complementar F3c, localizada na extremidade 3' do DNA (Figura 6 – B). A cadeia libertada adquire uma estrutura de *stem-loop* na extremidade 5' devido à complementaridade das regiões F1c e F1 (Figura 6 – C). De seguida, o *primer* BIP liga-se à região complementar B2c da cadeia, contendo o *stem-loop* e, subsequentemente, ocorre a polimerização da cadeia complementar. Posteriormente, o *primer* B3 hibridiza com a região complementar B3c (Figura 6 – D) e é libertada uma nova cadeia. Esta contém regiões complementares B1/B1c e F1/F1c, levando à formação de um *stem-loop* em cada extremidade, obtendo-se uma estrutura em forma de “haltere” (Figura 6 – E). O passo seguinte consiste numa amplificação cíclica, onde atuam os *primers* internos na estrutura em forma de “haltere”, levando à formação de novas cadeias de DNA, o que conduz a uma amplificação exponencial do número de sequências de DNA amplificado (Figura 6 - F). Como resultado da amplificação, formam-se várias estruturas de diferentes tamanhos, com múltiplos *loops*, que consistem em repetições invertidas dispostas, alternadamente do DNA alvo (Figura 6 – G) (Augustine *et al.*, 2020; Becherer *et al.*, 2020; Notomi *et al.*, 2000; Deng *et al.*, 2019; Pumford *et al.*, 2020; Tomita *et al.*, 2008).

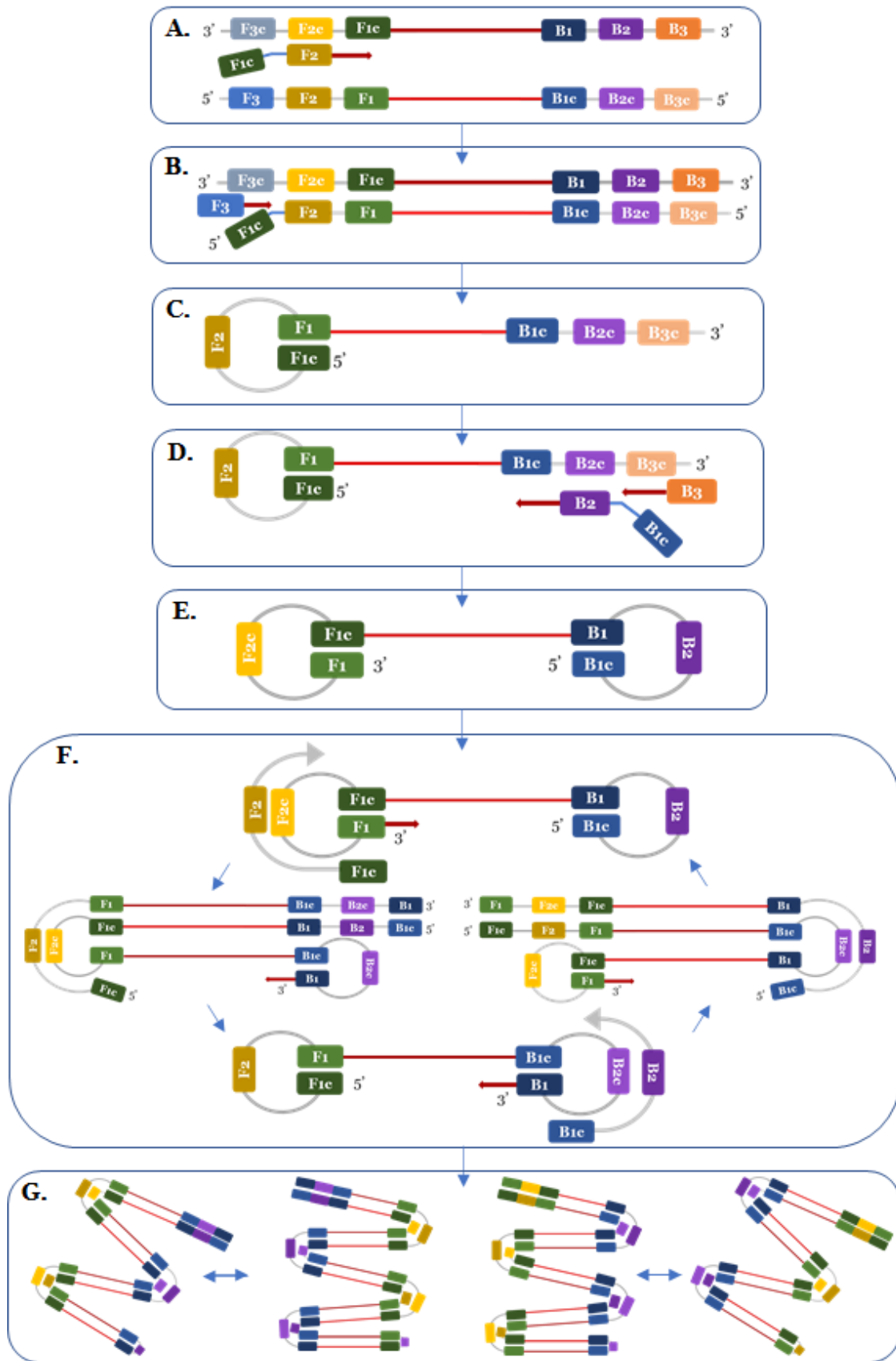


Figura 6. Mecanismo de amplificação do LAMP, adaptado de Notomi *et al.*, 2000. A – Ligação do *primer* F1P a região complementar. B – Emparelhamento do F3. C – Formação de uma estrutura de *stem-loop* na extremidade 5'. D – Ligação do *primer* B1P e, posteriormente ligação do B3. E – Formação de uma estrutura *stem-loop* em cada extremidade. F – Amplificação cíclica. G – Formação de várias estruturas.

1.3.1.4 Otimização

Notomi e colaboradores descreveram algumas condições de otimização para que a reação seja bem-sucedida. É importante garantir o emparelhamento dos *primers*, uma vez que se trata de um passo fundamental para a amplificação e especificidade. Assim, a T_m dos *primers* F2 e B2, do FIP e BIP, deve ser semelhante à temperatura ótima de atividade da DNA polimerase, ou seja, entre 60 a 65 °C. F1c e B1c devem ter uma T_m superior ao F2 e B2, de modo a promoverem a formação da estrutura *stem-loop*. Além disso, a T_m dos *primers* externos (F3 e B3) deve ser ligeiramente mais baixa do que a dos *primers* F2 e B2, de forma a garantir que os *primers* internos começam primeiro a reação que os *primers* externos (Notomi *et al.*, 2000).

Para além da T_m , Notomi e coautores referiram que alguns produtos químicos, como betaína destabilizam a hélice DNA, promovendo um aumento da eficiência da amplificação, assim como um aumento da seletividade em relação ao DNA alvo (Notomi *et al.*, 2000).

1.3.1.5 Vantagens e desvantagens

A tecnologia LAMP confere inúmeras vantagens quando comparada com o PCR (Tabela 5). Desta forma, o LAMP permite uma amplificação altamente específica do DNA alvo, uma vez que requer 4 a 6 *primers*. A amplificação pode ser realizada num bloco de aquecimento ou num banho quente, não requerendo equipamento sofisticado, pois a reação ocorre a uma temperatura constante, de 60 a 65 °C, com duração de aproximadamente uma hora (Karami *et al.*, 2011) sendo assim, uma técnica com elevada eficiência e sensibilidade (Notomi *et al.*, 2000), conferindo uma interação simples com os resultados, uma vez que é possível visualizar os mesmos em tempo real, através da turbidez ou por corantes colorimétricos (Becherer *et al.*, 2020; Augustine *et al.*, 2020; Ahuja and Somvanshi, 2020; Yang, Domesle, and Ge, 2018). Trata-se ainda de uma técnica de simples manuseamento após otimização, não requerendo técnicos altamente especializados para executar, o que permite a sua aplicação em contexto real. Contudo, o desenho dos *primers* é um processo exigente, para além de que o uso de *primers* longos possibilita a formação de dímeros, originado “falsos positivos” (Becherer *et al.*, 2020). Estes “falsos positivos” podem ser eliminados através do acoplamento desta metodologia a outras tecnologias que possibilitem uma confirmação do resultado (Yamagishi *et al.*, 2017; Imai, Tarumoto, Amo, *et al.*, 2018; Imai *et al.*, 2017; Imai, Tarumoto, Runtuwene, *et al.*, 2018).

Tabela 5. Propriedades dos métodos de amplificação LAMP e PCR, adaptado de Karami *et al.*, 2011.

Características	LAMP	PCR
Amplificação DNA	Sim	Sim
Amplificação RNA	Sim (RT-LAMP)	Sim (RT-PCR)
Temperatura (°C)	60-65	94, 55-60, 72
<i>Primers</i>	4/6	2
Desenho dos <i>primers</i>	Complexo	Simples
Duração (h)	1	4 a 8
Capacidade de amplificação múltipla	Não	Sim
Método de detecção dos produtos	Turbidez, gel de eletroforese, <i>Real-time</i>	ELISA, gel de eletroforese, <i>Real-time</i>
Tolerância a compostos biológicos	Sim	Não
Necessidade de desnaturação do DNA alvo	Não	Sim

1.4 Técnicas de sequenciação

A sequenciação consiste na determinação da sequência de DNA. O conhecimento da posição dos nucleótidos na cadeia de DNA ou RNA tornou-se imprescindível para a ciência tendo aplicabilidade em diversos ramos (Heather and Chain, 2016).

Em 1977, os bioquímicos Frederick Sanger, Nicklen e Coulson desenvolveram o método de Sanger, também conhecido como o método da terminação em cadeia (Sanger, Nicklen, and Coulson, 1977) baseado na reação de PCR. Rapidamente dominou o mercado, tornando-se o *standard gold* por um longo período de tempo para a sequenciação de fragmentos de DNA, sendo atualmente ainda o mais adequado para sequenciar genes. A sequenciação de *Sanger* usa nucleótidos de terminação de cadeia específicos dideoxinucleótidos (ddNTPs), os quais não contêm o grupo OH na posição 3' da pentose. Assim, sempre que um ddNTP é incorporado na reação de amplificação deixa de ser possível que a DNA polimerase forme uma nova ligação fosfodiéster, resultando na terminação da síntese da cadeia de DNA. Os ddNTPs são marcados com radioisótopos ou com fluoróforos (mais comum) diferentes para cada nucleótido, posteriormente detetados e analisados por eletroforese capilar e laser, respetivamente (Heather and Chain, 2016; Slatko, Gardner, and Ausubel, 2018), permitindo uma resolução de 25-1200 nucleótidos (Bruijns, Tiggelaar, and Gardeniers, 2018). Deste modo, o método de *Sanger* foi considerado a técnica da sequenciação da primeira geração (Wasfi, Awwad, and Ayesh, 2018; Slatko, Gardner, and Ausubel, 2018).

Ao longo dos anos surgiram novos métodos de sequenciação designados por Sequenciação de Nova Geração (NGS), com a finalidade de sequenciar grandes quantidades de DNA, através de métodos mais rápidos e económicos quando comparados ao método de Sanger (Bruijns, Tiggelaar, and Gardeniers, 2018). A maioria destas metodologias tem a capacidade de sequenciar em paralelo, o que significa que são sequenciados simultaneamente milhões de fragmentos (Goldfeder *et al.*, 2017).

O 454 *Life Sciences*, introduzido no mercado em 2005, mais conhecido como pirosequenciação, originou a primeira geração de Sequenciação Massiva de nova geração e a segunda geração de sequenciação permitindo que várias amostras e genes (até genomas inteiros) sejam sequenciados ao mesmo tempo, diminuindo o custo e o tempo de sequenciação. Esta técnica baseia-se na deteção de pirofosfato libertado durante a síntese de DNA, onde é gerada uma luz visível que é proporcional ao número de nucleótidos incorporados (Slatko, Gardner, and Ausubel, 2018; Heather and Chain, 2016). Em 2007, surge a sequenciação *Illumina*, semelhante ao método de Sanger, no entanto baseia-se na utilização de nucleótidos terminadores reversíveis para os nucleotídeos, sendo que cada nucleótido é marcado com um corante fluorescente diferente e com uma DNA polimerase capaz de os incorporar, permitindo sequenciar 36-300 bp (Goldfeder *et al.*, 2017; Bruijns, Tiggelaar, and Gardeniers, 2018). Posteriormente, em 2010, surge o *Ion Torrent* baseando-se na alteração do pH. Assim, após a adição de um nucleótido na sequência há a libertação de H⁺ originando pequenas alterações do pH (Bruijns, Tiggelaar, and Gardeniers, 2018; Slatko, Gardner, and Ausubel, 2018) apresentando com uma capacidade de sequenciar 200-400 bp (Goldfeder *et al.*, 2017).

Nos finais de 2010, a *Pacific Biosciences (PacBio)* desenvolveu um instrumento de sequenciação *Single Molecule Real Time (SMRT)*, sendo o primeiro método com a capacidade de sequenciar em tempo real uma única molécula. Em 2014, surgiu o sequenciação por nanoporo comercializado pela *Oxford Nanopore Technologies (ONT)* com uma capacidade de ler aproximadamente 250 000 bp (Goldfeder *et al.*, 2017; Heather and Chain, 2016). Surgindo, deste modo, a terceira geração de sequenciação, caracterizada pela capacidade de sequenciar em tempo real. Estas são técnicas muito rápidas e que geram leituras mais longas quando comparadas com as gerações anteriores (Bruijns, Tiggelaar, and Gardeniers, 2018; Slatko, Gardner, and Ausubel, 2018; Heather and Chain, 2016).

1.4.1 Sequenciação nanopore

1.4.1.1 Conceito

A tecnologia de nanoporo difere das técnicas de sequenciação tradicionais por não exigir amplificação antes da análise bem como não requer a marcação de nucleótidos para a sua detecção, o que torna esta tecnologia mais versátil, permitindo a detecção e análise de DNA e RNA (Branton *et al.*, 2008; Heather and Chain, 2016), bem como de proteínas e lípidos (Sutton *et al.*, 2019).

A sequenciação em nanoporos depende da variação da corrente elétrica que é alterada quando uma molécula de DNA passa por um poro em nano escala na membrana. A membrana separa duas câmaras, que são preenchidas com um eletrólito condutor (Bruijns, Tiggelaar, and Gardeniers, 2018). Uma pequena voltagem (± 100 mv) (Branton *et al.*, 2008) é aplicada à membrana, de modo que à medida que os nucleótidos passam pelo nanoporo, bloqueiem o fluxo de iões, diminuindo a corrente por um período de tempo. O bloqueio é característico de cada base permitindo assim determinar a sequência (Heather and Chain, 2016).

Desta forma, a sequenciação ONT utiliza um nanoporo biológico, α -hemolisina (Bruijns, Tiggelaar, and Gardeniers, 2018), embutido numa membrana eletricamente resistente. Durante a preparação da biblioteca é adicionado uma enzima helicase ao DNA de cadeia dupla (dsDNA), que tem como finalidade “desenrolar” o dsDNA, permitindo apenas que o DNA de cadeia simples (ssDNA) passe através do nanoporo (Figura 7 – A) (Sutton *et al.*, 2019; Lamb *et al.*, 2020). Assim, uma corrente flui através do nanoporo que é interrompida de forma característica pelos nucleotídeos que passam por ele (Lamb *et al.*, 2020). A identificação de cada nucleotídeo ocorre pela detecção da modulação característica da corrente elétrica pelas diferentes bases à medida que passam pelo nanoporo (Figura 7 – B) (Cummings, Olszewicz, and Obom, 2017).

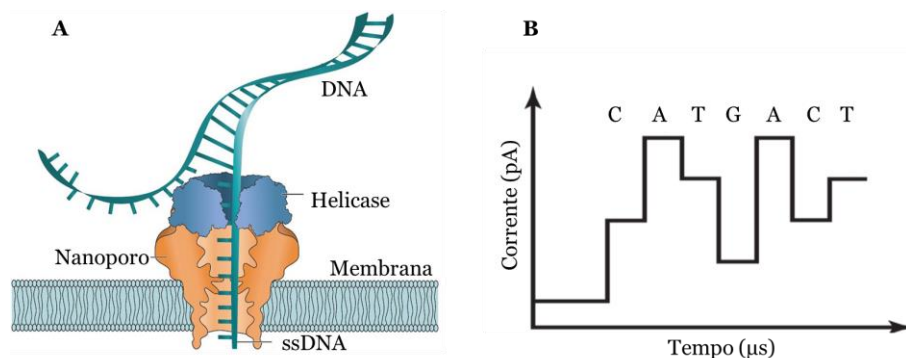


Figura 7. Sequenciação por nanoporos, adaptado de Gierhart *et al.*, 2008 e Sutton *et al.*, 2019.

1.4.1.2 Natureza dos nanoporos

Os nanoporos são os principais componentes deste tipo de sequenciação, sendo essencial o conhecimento das características físicas e químicas destes, uma vez que o sinal gerado se deve à interação entre o DNA e o nanoporo (Wasfi, Awwad, and Ayesh, 2018).

Os nanoporos biológicos são normalmente colocados na membrana como proteínas transmembranares, existindo três tipos de nanoporos biológicos, o nanoporo de α -hemolisina, que é bastante estável e permanece funcional até ao ponto de ebulição da água, cujo seu diâmetro interno é de 1,5 nm, sendo quase tão grande quanto o diâmetro do ssDNA (Branton *et al.*, 2008; Wasfi, Awwad, and Ayesh, 2018). Assim, o transporte do ssDNA através de um nanoporo pode atingir a velocidade de cerca de 1 nucleótido/ μ s. De forma, a minimizar a velocidade do ssDNA através do nanoporo, a α -hemolisina pode ser substituída pela porina MspA de *mycobacterium smegmatis* (Bruijns, Tiggelaar, and Gardeniers, 2018; Wasfi, Awwad, and Ayesh, 2018), cujo diâmetro interno é menor, 1,0 nm (Figura 8). O Phi29 é outro tipo de nanoporo biológico proposto para detetar dsDNA, com um diâmetro aproximadamente de 3,6 nm.

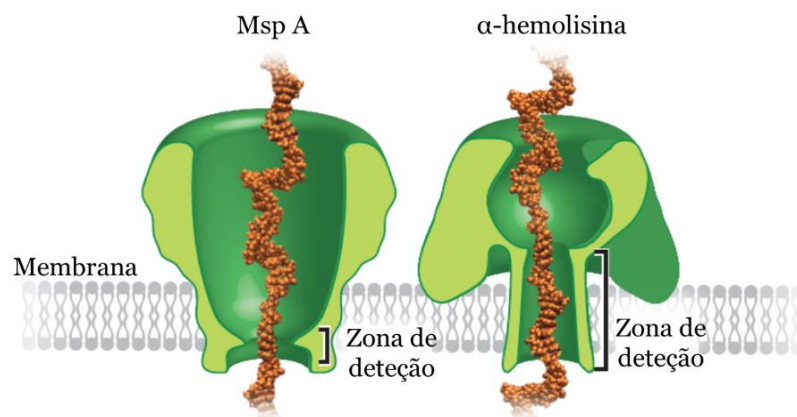


Figura 8. Nanoporos biológicos, adaptado de Deamer, Akeson, and Branton, 2016.

1.4.1.3 Oxford Nanopore Technologies

As tecnologias de sequenciação de última geração são capazes de fornecer uma sequência completa do genoma para a maioria dos organismos. À medida que estas tecnologias se tornaram mais confiáveis, a sua aplicabilidade tem vindo a ser mais usual com a finalidade de detetar e caracterizar patógenos, substituindo os métodos de sequenciação existentes (J. Wang *et al.*, 2015).

A sequenciação ONT por nanoporo revela um elevado rendimento, permitindo a obtenção de grandes conjuntos de informação genética (Faino *et al.*, 2019). Em 2014, a ONT lançou comercialmente o *MinION*, um dispositivo portátil com 150 mm x 23 mm x 33 mm, alimentado por *USB* (Leggett and Clark, 2017). Recentemente, lançou o *MinION Mk1C* que combina o sequenciador *MinION* com um computador de alto desempenho, uma *drive* de alta capacidade e com ecrã tátil (Lamb *et al.*, 2020). Atualmente, ONT tem disponível no mercado mais opções como o *Flongle*, *GridION Mk1* e *PromethION* (Figura 9) (Lamb *et al.*, 2020; Leggett and Clark, 2017). Esta tecnologia combina a sequenciação em tempo real, rápida e portátil, com uma computação poderosa integrada. O interesse por esta tecnologia reside sobretudo no facto de esta fornecer comprimentos de leitura bastante longos, podendo atingir os 250 000 bp (Goldfeder *et al.*, 2017) e transmitir até 100 MB de dados em 24 horas (Badial *et al.*, 2018).



Figura 9. Dispositivos da ONT disponíveis no mercado (ONT, 2021). A – MinION, B – MinION MK1C, C – Flongle, D – GridION e E– PromethION.

Os dispositivos *MinION* têm vindo a ser utilizados um pouco em todo o mundo, com um enorme leque de aplicações desde pesquisas clínicas, diagnósticos clínicos rápidos, deteção de patógenos vegetais, animais e ambientais, microbiomas, análise de transcriptómica, microbiologia e genoma humana (ONT, 2021).

1.4.1.4 Vantagens e desvantagens

A sequenciação por nanoporo apresenta baixa complexidade, baixo custo, permite a sequenciação de sequências longas em tempo real de uma forma rápida, tanto para DNA, como para RNA (Cummings, Olszewicz, and Obom, 2017). A preparação da biblioteca é um processo igualmente simples e rápido (Badial *et al.*, 2018) e permite analisar várias

amostras simultaneamente, através da utilização de *barcodings* (Seah *et al.*, 2020). No entanto, a maior limitação deste método consiste na integração das sequências obtidas, requerendo conhecimentos bioinformáticos avançados (Badial *et al.*, 2018).

1.5 Objetivos

O presente trabalho teve como objetivos desenvolver uma ferramenta molecular para detecção rápida de *Xylella fastidiosa* no campo e adicionalmente caracterizar e valorizar o marmelo da região da Beira Interior. Deste modo, este trabalho foi o primeiro passo para o desenvolvimento de uma ferramenta simples, precisa e sensível que permite detetar e identificar *Xylella fastidiosa* em tempo real no campo. Adicionalmente, caracterizou-se nutricionalmente as cultivares presentes na região e desenvolveu-se um novo produto à base de marmelo.

Capítulo 2

2. Materiais e métodos

2.1 Colheita

Durante o mês de setembro foram efetuadas visitas a diferentes produtores na região da Beira Interior, nomeadamente na freguesia do Ferro e de Orjais, ambas pertencentes ao concelho da Covilhã. Foram selecionadas de forma aleatória e marcadas cinco árvores por cada cultivar.

As amostras foram colhidas durante os meses de setembro e outubro, a partir do momento em que o produtor indicou a data ótima de colheita (Tabela 6). No entanto, a cultivar Gigante de Vranja foi colhida por duas vezes, em datas distintas, de modo a avaliar eventuais diferenças nos parâmetros de qualidade e físico-químicos da mesma.

Tabela 6. Data da colheita das diferentes cultivares na região da Beira Interior.

Localização	Cultivar	Data de colheita
Ferro – quinta das Rasas	Gigante de Vranja	24-09-2020
	Portugal	24-09-2020
	Gigante de Vranja	06-10-2020
Orjais – quinta da Branca	Portugal	06-10-2020
	Galega	12-12-2020

2.2 Parâmetros de qualidade

Para avaliar os parâmetros de qualidade foram analisados 100 frutos por cultivar, mais concretamente, foram colhidos 20 frutos/árvore sendo no total amostradas 5 árvores/cultivar. No laboratório todas as amostras foram limpas com papel (seco) de forma a remover impurezas e a pelagem e codificadas.

Após receção das amostras no laboratório os parâmetros biométricos, calibre e peso, foram analisados. O calibre foi determinado com o auxílio de um calibrador manual e o peso através de uma balança de precisão (*PA413C, OHAUS*, Estados Unidos).

De seguida, os marmelos foram analisados individualmente no que diz respeito à cor, textura e sólidos solúveis totais (SST). Para o pH e a acidez total foram efetuados grupos constituídos por 5 marmelos. Na determinação destes últimos parâmetros, os frutos foram centrifugados (*Fiber Boost, Philips*, China) por forma a obter uma polpa. Todas as análises

foram efetuadas no laboratório de físico-química do Centro de Apoio Tecnológico Agro Alimentar (CATAA), com exceção da determinação do teor de fibra.

2.2.1 Análise instrumental da cor

A medição da cor foi efetuada em quatro pontos opostos da zona equatorial da epiderme do fruto através do colorímetro (*Chroma-Meter CR-400, Konica Minolta, Japão*) com o *software Color Data CM-S100w*. O colorímetro foi previamente calibrado com uma placa cerâmica branca, utilizando o iluminante D65, o ângulo de observador de 2º e uma área de medição de 8 mm. Foram determinadas as coordenadas L*, a* e b*, que segundo a *Commission Internationale de l'Éclairage (CIE)* representam a luminosidade, o teor de vermelho e o teor de amarelo, respetivamente. A luminosidade varia entre preto (0) e branco (100), o teor de vermelho varia entre verde (valores negativos) e vermelho (valores positivos) e o teor de amarelo varia entre azul (valores negativos) e amarelo (valores positivos) (Guiné *et al.*, 2015).

2.2.2 Análise da textura

A análise da textura foi efetuada num texturómetro (*TA.XT Plus Texture Analyser, Stable Micro Systems, Reino Unido*) com o *software Exponent*. Foi utilizada uma sonda P/75 tendo sido efetuados dois ciclos de compressão com um intervalo de 5 segundos/ciclo. Deste modo, foi possível determinar a dureza (1), a elasticidade (2), a resiliência (3), a coesividade (4) e a mastigabilidade (5) (Figura 10) (Guiné and Barroca, 2012).

$$\text{Dureza (N)} = F_1 \quad (1)$$

$$\text{Elasticidade (\%)} = \Delta T_2 / \Delta T_1 * 100 \quad (2)$$

$$\text{Resiliência (adimensional)} = A_2 / A_1 \quad (3)$$

$$\text{Coesividade (adimensional)} = A_3 / (A_1 + A_2) \quad (4)$$

$$\text{Mastigabilidade (N)} = F_1 * \Delta T_2 / \Delta T_1 * A_3 / (A_1 + A_2) \quad (5)$$

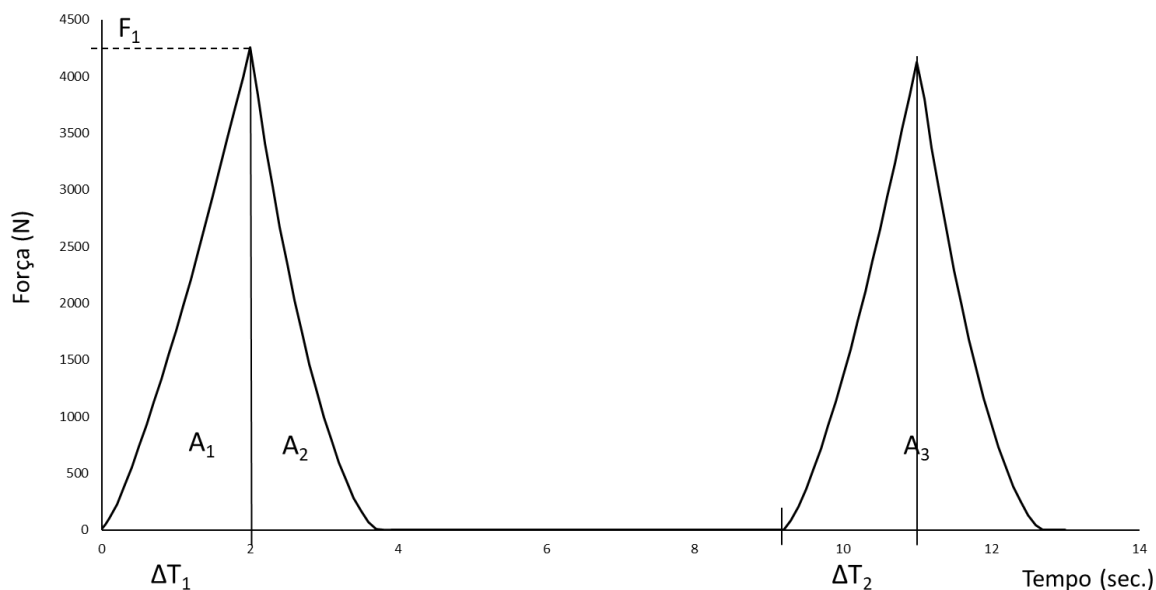


Figura 10. Esquema da análise da textura, adaptado de Guiné and Barroca, 2012.

2.2.3 Sólidos solúveis totais

O teor dos SST (*°Brix*) foi determinado através de um refratômetro digital (*PR-32α*, *ATAGO™*, Japão). O equipamento foi calibrado com água ultrapura no início de cada ensaio. A análise foi realizada com uma gota de polpa obtida de cada marmelo, de acordo com NP EN 12143:1999.

2.2.4 Determinação do pH e acidez titulável

O pH foi determinado por potenciometria e a acidez por titulação potenciométrica, de acordo com a NP EN 1132:1996 (Edição 1) e NP EN 1421:1977 (Edição 1), respetivamente. Para a determinação destes parâmetros utilizou-se um titulador automático (*TitroMatic 2S+3B*, *Crison™*, Espanha) com um eletrodo de pH (*SP10B*, *Consort™*, Bélgica) e o *software TiCom*. Antes de efetuar as análises, o eletrodo foi calibrado com as soluções padrão de pH a 4,00 e 7,00 (BDH Prolabo®).

A acidez titulável consiste na adição de uma solução alcalina de hidróxido de sódio a 0,1 M (BDH Prolabo®) até obter a neutralização dos ácidos a pH igual a 8,1. A acidez foi expressa em g ácido málico/L, utilizando um fator de conversão de 0,067.

2.3 Parâmetros físico-químicos – Nutricionais

Na avaliação dos parâmetros físico-químicos, foram colhidos por cultivar 20 marmelos/árvore sendo agrupados em dois grupos constituídos por 10 frutos. De salientar, que após trituração das partes edíveis (na *Bimby, Vorwerk*, Alemanha), as amostras foram congeladas a -80°C , até posterior análise do perfil vitamínico. Todos os resultados foram expressos em g/ 100g, exceto o valor energético.

2.3.1 Determinação do teor de humidade

O teor de humidade foi determinado segundo o método AOAC 934.06 (1934). É um método gravimétrico, que consiste na secagem das amostras a uma temperatura de 70°C (sob vácuo) (*VDL 115, Binder*, Estados Unidos) durante um período de 4 horas, até se obter peso constante.

2.3.2 Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas foi obtido segundo o método AOAC 940.26 (2000). É um método gravimétrico que consiste na incineração das amostras até ficarem totalmente carbonizadas e, de seguida, colocadas na mufla (*SAF 11/1, Lenton*, Estados Unidos) a $550 \pm 25^{\circ}\text{C}$, durante a noite, até se obter cinzas brancas. O resíduo mineral conseguido por incineração corresponde ao teor de matéria inorgânica presente na amostra.

2.3.3 Determinação do teor de gordura

O teor de gordura foi determinado segundo o método interno PT.LFQ.0104. Para este tipo de amostras é requerido inicialmente uma hidrólise ácida no *Soxcap (SoxCapTM 2047, FOSS*, Dinamarca), por recurso a uma solução de ácido clorídrico 6 M (BDH Prolabo®). De seguida, procedeu-se a uma filtração e lavagem das amostras. Posteriormente realizou-se a etapa de extração com solvente orgânico (éter de petróleo 40-60 (v/v), BDH VWR®), no *Soxtec (SoxtecTM 2055, FOSS*, Dinamarca). Por fim, procedeu-se à eliminação do solvente por evaporação a $103 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e respetiva pesagem.

2.3.4 Determinação do teor de proteína

O teor de proteína foi determinado segundo o método interno PT.LFQ.0105 (Kjeldahl). Numa primeira fase, a amostra foi mineralizada através de uma mistura catalisadora (*kjeltabs Cu/3,5, FOSS*), combinada com ácido sulfúrico concentrado (95%, BDH Prolabo®), a 420°C , num bloco de digestão (*TecatorTM Digestor 2508, FOSS*, Dinamarca). Durante este processo todo o azoto orgânico foi convertido em ião amónio. Durante a

segunda fase, o ião amónio foi convertido em amónia, por adição de uma solução alcalina (hidróxido de sódio a 40 %, BDH Prolabo®). De seguida, foi destilado em corrente de vapor e recolhido numa solução de ácido bórico (a 1 %), onde foi doseado, por titulação, com ácido clorídrico a 0,1 N (BDH Prolabo®). Esta segunda fase ocorreu no equipamento *Kjeltec* (*Kjeltec™ 8400*, FOSS, Dinamarca). A percentagem de proteína foi calculada através de um fator de conversão de azoto em proteína, que para a matriz em causa tem o valor de 6,25.

2.3.5 Fibra

O teor de fibra como mencionado anteriormente foi determinado por um laboratório subcontratado externo ao CATAA, de acordo com a NP 2029:1983.

2.3.6 Determinação dos hidratos de carbono

A determinação dos hidratos de carbono foi obtida por cálculo de acordo com (UE) N.º 1169/2011, por recurso ao conhecimento dos parâmetros nutricionais, de acordo com a seguinte equação (6).

$$\text{Hidratos de carbono} = 100 - (\text{humidade} + \text{proteína} + \text{gordura} + \text{cinzas} + \text{fibra}) \quad (6)$$

2.3.7 Valor energético

O valor energético foi calculado utilizando os fatores de conversão indicados no regulamento (UE) N.º 1169/2011. Sendo expresso em kJ (7) e em kcal (8).

$$\text{Energia (kJ)} = 37 \times \text{Gordura} + 17 \times \text{Hidratos de carbono} + 17 \times \text{Proteína} + 8 \times \text{Fibra} \quad (7)$$

$$\text{Energia (kcal)} = 9 \times \text{Gordura} + 4 \times \text{Hidratos de carbono} + 4 \times \text{Proteína} + 2 \times \text{Fibra} \quad (8)$$

2.3.8 Determinação do teor de açúcares por cromatografia iónica

A quantificação dos açúcares totais (glucose, frutose, sacarose e maltose) foi determinada pelo método AOAC 982.14. Os açúcares foram quantificados por cromatografia líquida através de um cromatógrafo iónico (*ICS-3000-DC1*, *Dionex*, Estados Unidos) com as condições cromatográficas descritas na Tabela 7 com o *software Chromeleon*®.

Tabela 7. Condições cromatográficas para a determinação do teor de açúcares.

Parâmetros	Condições
Coluna	CarboPac (3 x 150mm)
Pré-coluna	CarboPac Guard (3 x 30mm)
Fluxo (mL/min)	0,5
Temperatura da coluna (°C)	30
Temperatura do detetor (°C)	30
Tempo de corrida (minutos)	35
Tempo de regeneração	40 minutos

Foi efetuada uma extração com água ultrapura (dado que os açúcares são muito solúveis), seguida de homogeneização no *ultra-turrax (T 50 basic, IKA® Werke, Alemanha)* e clarificação por centrifugação (*Biofuge Primo R, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos*). Os interferentes foram removidos através de uma coluna SPE C18 (500 mg/10 mL) e a amostra foi filtrada.

Os açúcares foram eluídos com uma solução de hidróxido de sódio a 50 % (fase de regeneração a 200 mM e fase móvel a 15 mM) e detetados por um sistema de detecção amperimétrica pulsado com uma resposta estável e sensível devido à contínua eliminação dos produtos de oxidação dos açúcares. No entanto, para determinar o teor de açúcares, mono e dissacáridos em géneros alimentícios, foi necessário preparar padrões individuais dos açúcares puros (glucose (99,8%, *Sigma-Aldrich*), frutose (99%, *Alfa Aesar*), sacarose (99,9%, *Alfa Aesar*) e maltose (96,2%, *Alfa Aesar*)), para que de seguida fosse preparado uma mistura de padrões de concentrações entre 0,1 e 5 ppm e efetuar uma reta de calibração.

2.3.9 Composição mineral

O sódio, cálcio e potássio foram determinados por espectrometria de absorção atômica de chama (FAAS), enquanto o cobre, ferro, manganês, zinco, fósforo e magnésio foram determinados por *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP – OES)*. Antes de proceder à quantificação dos minerais é necessário digerir as amostras num micro-ondas, de acordo com as indicações do mesmo.

2.3.9.1 Preparação de amostras para quantificação de minerais por digestão (micro-ondas)

A preparação prévia das amostras é considerada uma etapa crítica devido às possíveis contaminações e perdas de analitos que possam ocorrer. A destruição da matéria orgânica e disponibilização dos analitos para posterior determinação dos minerais foi efetuada por

digestão por micro-ondas (*ETHOS One, Milestone, Itália*). As amostras foram pesadas diretamente para os vasos de digestão e, em seguida foram adicionados 6 mL de ácido nítrico a 65% (BDH Prolabo®) e 2 mL de peróxido de hidrogénio a 30% (BDH Prolabo®). Os tubos de digestão foram fechados e levados ao micro-ondas, a digestão ocorreu em rampa. Após a digestão, a amostra foi transferida para tubos de 50 mL (*DigiTubes, SCP Science, França*), perfez-se com água ultrapura e armazenou-se para posterior análise.

2.3.9.2. Determinação de minerais por absorção atômica

O sódio (589,0 nm), cálcio (422,7 nm) e potássio (766,5 nm) foram determinados através de um espectrofotómetro (*ICE 3000, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos*) com o *software Solari*. Os minerais foram determinados individualmente e, desta forma, foi necessária a preparação de padrões e respetivas retas de calibração para cada mineral. De maneira a eliminar as interferências, foi necessário adicionar: lantânio aos padrões de cálcio e, lítio aos padrões de sódio e de potássio.

2.3.9.3. Determinação de minerais por ICP-OES

Os minerais, cobre, ferro, manganês, zinco, fósforo e magnésio foram determinados através de um espectrofotómetro (ICP-OES *ACTIVA – M, HORIBA Scientific, Estados Unidos*) com os parâmetros instrumentais descritos na Tabela 8 e com o *software ActivAnalyst 5.4.2*. O ICP – OES permite uma análise multielementar, assim as curvas de calibração para a determinação dos teores dos minerais foram realizadas por diluição de uma solução padrão multielementar a 1000 ppm.

Tabela 8. Parâmetros instrumentais ICP- OES.

Parâmetros	Condições
Potência do plasma (W)	1100
Fluxo de gás no plasma (L min ⁻¹)	15
Fluxo de ar no nebulizador (L min ⁻¹)	0,02
Pressão do ar (Bar)	1,0
Comprimento de onda (nm)	213,618 (P); 213,857 (Zn); 257,611 (Mn); 259,940(Fe); 279,553(Mg) e 327,395 (Cu)

2.3.10 Perfil vitamínico

A quantificação das vitaminas hidrossolúveis, nomeadamente, ácido ascórbico (vitamina C), tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), niacinamida (vitamina B3), ácido nicotínico (vitamina B3), piridoxina (vitamina B6), biotina (vitamina B7) e o ácido fólico (vitamina B9) foi determinada de acordo com (Joseph, 2011) por

cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (*UltiMate™ 3000*, *Dionex™*, Estados Unidos), de acordo com as condições cromatográficas descritas na Tabela 9 e com recurso ao *software Chromeleon®*.

Tabela 9. Condições cromatográficas para a quantificação das vitaminas hidrossolúveis.

Parâmetros	Condições
Coluna	C18 3,0 mm x 150 mm 2,7µm (Poroshell 120 EC-C18)
Temperatura da coluna	35° C
Rácio de aquisição	20 Hz
Volume de injeção	20 µL
Temperatura da amostra	5° C
Fase móvel A	25 mM HPO ₄ Na ₂ , pH 7,0
Fase móvel B	Acetonitrilo
Gradiente	0 min → 99% A + 1% B
	5 min → 99% A + 1% B
	15 min → 70% A + 30% B
	20 min → 70% A + 30% B
	20,1 min → 99% A + 1% B
	Pós corrida 5 min → 99% A + 1% B
Fluxo	0,45 mL/min
Comprimentos de onda de aquisição	205 nm – Biotina
	214 nm – Ácido nicotínico e niacinamida
	220 nm – Piridoxina
	232 nm – Tiamina
	266 nm – Ácido ascórbico
	268 nm – Riboflavina
	280 nm – Ácido fólico
	214 nm – Ácido nicotínico e niacinamida

Inicialmente, na determinação das vitaminas foi necessário preparar padrões individuais como uma concentração de 2 000 ppm (ácido ascórbico (99,8 %, *Alfa Aesar*), tiamina (99,9%, *Sigma-Aldrich*), riboflavina (97,94%, *Sigma-Aldrich*), ácido nicotínico (99,5%, *Sigma-Aldrich*), niacinamida (99,9%, *TCI*), piridoxina (99,9%, *Sigma-Aldrich*), biotina (99,8%, *Sigma-Aldrich*) e ácido fólico (91,2%, *Sigma-Aldrich*)). Dado que a biotina, riboflavina e o ácido fólico apresentam baixa solubilidade em água, foi necessário adicionar algumas gotas de hidróxido de sódio a 0,20 M. É de salientar que as vitaminas são extremamente sensíveis à luz e ao calor, pelo que o manuseamento das mesmas foi realizado cuidadosamente e armazenadas a 4 °C. De seguida, preparou-se uma mistura de padrões com uma concentração de 200 ppm, tendo-se pipetado 200 µL de cada padrão

para um *vial*. Por fim, preparam-se os padrões de calibração de acordo com a Tabela 10, tendo sido utilizado como solvente a fase móvel A.

Tabela 10. Preparação dos padrões de calibração.

Condições	V_{mistura de padrões} (μL)	V_f (μL)	C_{padrão} (ppm)
P1	10 (P6)	1000	0,010
P2	25 (P6)	1000	0,025
P3	50 (P6)	1000	0,05
P4	0,5	1000	0,10
P5	1,25	1000	0,25
P6	5	1000	1,00
P7	12,5	1000	2,50
P8	25	1000	5,00
P9	50	1000	10,00
P10	125	1000	25,00
P11	250	1000	50,00
P12	500	1000	100,00

2.4 Análise estatística

Todos os dados foram inseridos em base de dados com o *software Microsoft Excel 365* e a análise estatística foi efetuada com o auxílio do *software SPSS Statistics 27* para o *Windows*. Começou por se analisar a normalidade e homogeneidade da variância através dos testes *Shapiro-Wilk* e *Levene*, respetivamente. Para avaliar a variável cultivar recorreu-se à ANOVA, seguida do teste *post-hoc* HSD de *Tukey* tendo sido considerado como tendo diferenças estatísticas para valores de $p < 0,05$. A existência de correlações significativas foi também avaliada pela aplicação do teste de *Pearson*. Quanto a variável local de produção e data de colheita foram consideradas como tendo diferenças estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ (*t-student*). Todos os resultados obtidos neste trabalho apresentam-se expressos como média \pm desvio padrão (SD).

2.5 Desenvolvimento de um novo produto

2.5.1 Fermentação alcoólica e acética

Previamente os marmelos foram descongelados, lavados em água corrente (por forma a remover as impurezas remanescentes) e descaroçados. De seguida, centrifugaram-se os frutos (*Fiber Boost, Philips, China*) de forma a obter um sumo. Procedeu-se à etapa de *chaptalização*, que consiste na correção dos SST do mosto até à obtenção de um teor entre 19,0 a 20,0 °Brix. Por fim, inoculou-se com o *kit Byosal*, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, iniciando-se a fermentação alcoólica. Esta fermentação ocorreu numa estufa climatizada (30°C), em ambiente anaeróbio, até se alcançar um teor alcoólico compreendido entre 9 a 10°. Após o término da referida fermentação, separou-se a parte líquida da sólida, obtendo-se assim um fermentado alcoólico de marmelo (comumente, denominado de vinho de marmelo).

Com o fermentado alcoólico procedeu-se à fermentação acética, para obtenção de vinagre de marmelo, inoculando-se vinagre de sidra (*Paladin, Portugal*), com mãe, não pasteurizado. A fermentação acética ocorreu numa estufa climatizada (25°C) até cumprir com os requisitos legais, descritos no Decreto-Lei n. °174/2007 de 8 de maio.

Durante as fermentações foram retiradas amostras de modo a monitorizar o processo. Mais concretamente, durante a fermentação alcoólica foi determinado o teor de SST, o pH e o Teor Alcoólico em Volume (TAV). Enquanto na fermentação acética para além do pH e do TAV, foi também determinada a acidez volátil.

2.5.2 Teor alcoólico em volume

O TAV foi determinado segundo o método OIV-MA-AS313-01A. Numa primeira fase, realizou-se a destilação volúmica do vinho (*Digital Distilling Unit - SUPER D.E.E, Gibertini, Itália*), com a finalidade de eliminar as substâncias não voláteis. Posteriormente, determinou-se a massa volúmica do destilado por densimetria eletrónica (*Density Meter DS 7000, A. Kraüss Optronic, Alemanha*). Sabendo a massa volúmica do destilado e a sua temperatura é possível determinar a percentagem de título alcoométrico. Os resultados foram expressos % em volume.

2.5.3 Acidez volátil

A acidez volátil foi determinada pelo método OIV-MA-AS313-02. Inicialmente, procedeu-se a uma destilação por arrastamento de vapor (*Digital Distilling Unit - SUPER D.E.E,*

Gibertini, Itália) para obter o destilado. De seguida, realizou-se uma titulação ácido-base, tendo sido utilizado NaOH 0,1 M como titulante e fenolftaleína como indicador ácido-base, até se alcançar uma mudança de cor, equivalente ao ponto de viragem. Os resultados foram expressos em g de ácido acético/ 100 mL, tendo sido utilizado um fator de conversão de 0,3.

2.6 Ferramenta de diagnóstico de *Xylella fastidiosa*

2.6.1 Desenho dos primers

O desenho dos primers foi realizado por duas metodologias, através do software *LAMP Designer 1.16* (Premier Biosoft, Estados Unidos da América) e pelo *PrimerExplorer V5* (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/>), com base nas sequências consenso para os genes *multilocus sequence typing* (MLST) de três genes *housekeeping*: *RNA polymerase sigma factor* (*rpoD*), *siroheme synthase* (*cysG*) e *ABC transporter sugar permease* (*malF*) de *Xf*. Através da ferramenta *BioEdit 7.2* realizou-se o alinhamento das sequências, obtendo-se as respetivas regiões consenso para cada gene. Porém, nas bases degeneradas selecionou-se manualmente os nucleótidos que estavam em maioria. O gene *malF* foi o único que apresentou duas bases degeneradas com 50/50 dos nucleótidos TG e TA, respetivamente, tendo-se selecionado T e A.

Todos os primers selecionados foram sintetizados pela *Integrated DNA Technologies* (Estados Unidos da América) e são mencionados na Tabela 11.

Tabela 11. Primers desenhados para os genes MLST (*rpoD*, *cysG* e *malF*).

Gene	Primer	Sequência (5' - 3')	Tamanho de amplificação	Rating	Programa
<i>rpoD</i>	F3	GAAGATTGCTAAAGAGCCAATC	247	91,3	<i>LAMP Designer</i>
	B3	AGTCAATATCAAGGAATGAGCG			
	FIP	AGCCAACACTTCACGCACTGATCCTAATGTTGAGTCTCCTG			
	BIP	CTCGTGAACGTATTCGCCAGATGTTGTTTCAAGGACTTGGA			
	LF	TCCGACAAGTTGACATTGGT			
	LB	AAAGCATTACGGAAACTTCGTC	978	93,1	<i>LAMP Designer</i>
	F3	TCCGTAACCTCCTCAGTG			
	B3	TCCACAGGAGACTCAACAT			
	FIP	TCGGCAGGATCAGGACCAGTTGACGAAGAAGACGATGA			
	BIP	TGCCGAGGACAAGATCCGTAATGAGAATCTTCATCATCTCCG			
	LF	ATCCTCATCATTACCGACTG	139	-	<i>PrimerExplorer V5</i>
	LB	AGAGCCAATCTCAATGGAGAC			
	F3	TGAGGTTGACGAAGAAGACG			
	B3	GGTCAATGGCAACGACAGTT			
	FIP	ACAGCGATTTCGATACGCGAAGCTGAGGATGCGCCTACGAT			
BIP	CCAAGCATGGCCCTGAGCACACAAAGATCGCAGCCACATC	143	-	<i>PrimerExplorer V5</i>	
LF	CGGCAGGATCAGGACCA				
LB	GCAGTCATTAAGGTGCGTGAA				
F3	GGACGTTACTGACGAGTCGA				
B3	CAGCCACATCTTCACGCA				
<i>cysG</i>	FIP	TCAGGACCAATCGTAGGCGCATGAGGTTGACGAAGAAGACG	378	91,8	<i>LAMP Designer</i>
	BIP	TCGCTGTCCACTGAGTATGCCACTGCTTTGTGCTCAGGGC			
	LF	CCTCATCATTACCGACTGTCA			
	LB	AGTTCAAGAACTTTACGCCAAGC			
	F3	CGGGCTACTGACCTTAAATG			
	B3	TGCCGTTCTTGTGCCAG	378	90,8	<i>LAMP Designer</i>
	FIP	GCCTACTTCGATCTGCTCCGAATGAAGCCGACATCATCC			
	BIP	CTTGCTGTGCCGCTATGTCTAGGGAGGATTGGCA			
	LF	TGCCATCTGTAACACGGTG			
	LB	CCAATCGCTATGCCTGATC			
	F3	CGGGCTACTGACCTTAAATG	378	90,8	<i>LAMP Designer</i>
	B3	CTGGATGGTGGGTAGTCC			
FIP	GCCTACTTCGATCTGCTCCGAATGAAGCCGACATCATCC				
BIP	CTTGCTGTGCCGCTATGTCTAGGGAGGATTGGCA				
LF	TAACACGGTGTGCTGAC				
LB	GACCATGCCAATCGCTA				

Tabela 11. Continuação.

<i>cysG</i>	F3	GCGGAGCAGATCGAAGTAGG	160	-	<i>PrimerExplorer V5</i>			
	B3	GGGGATACCGGCATAGGC						
	FIP	ACGACACGCTGGCCAGCAGTGTGCGCCAAGAAGACA						
	BIP	GTCGTGGTGGCGAGGAACTGAGGGCGGCGGTGATT						
	LF	TGCAGCATCAGGGTGTGA						
	LB	CGGCATCCCCTATGAGGTCA						
	F3	AGACATTCACACCCTGATGC						
	B3	TGTTTCGGCCCCGTCCAG						
<i>cysG</i>	FIP	AAGGGCGGCGGTGATTCCGGGCGATCCATTCGTCTTCGG	224	-	<i>PrimerExplorer V5</i>			
	BIP	TTGACCCACCGGACCATGAGAACGCCAGCGTTTGC						
	LF	GGGATGCCGTGGGTACGTAAGA						
	LB	CACCGCCATTGCCAATCCTC						
	F3	TCTGGGCAATCCGATGTA				230	91,4	<i>LAMP Designer</i>
	B3	AAATCACCATGTTGTAGCCA						
	FIP	AATTCAGCAGCAACGCAGCGGAAGTCGCTGTGGAATAC						
	BIP	GTGGTGACGACGCTGGTAGAACACAATTCAGCAGCCA						
LF	AGACACCGTAATCGACATCG							
LB	TCTGTTTCACCTGAAGTATGGG							
F3	TGGTGCTCAGTTTGACC	308	87	<i>LAMP Designer</i>				
B3	CGGATCACCCAACCAATC							
FIP	GGGTGTGCAACAACCTCCAGAGTATGCTCTGGGCAATCC							
BIP	GGTAGCTGTCGCGCTGATTCACAATTCAGCAGCCAATTC							
LF	CAATCCAACAAAAGCGCAGAT							
LB	TCTGTTTCACCTGAAGTATGGG							
F3	GCGTTGGTGCTCAGTTTGA				422	-	<i>PrimerExplorer V5</i>	
B3	CCATTTGGACGCGCCATC							
FIP	CGGGGTGTGCAACAACCTCCAGTATGCTCTGGGCAATCCGA							
BIP	TGTTTCGCGTGTGGAAGAAGTATCCTGTGGAATCGCCTG							
LF	ATCCAATCCAACAAAAGCGCAGA							
LB	GGCTACAACATGGTGATTTTTTTGG							
F3	TGCGCTTTGTTGGATTGGAT	140	-	<i>PrimerExplorer V5</i>				
B3	AGCTACCAGCGTCGTCAC							
FIP	TCCCCAGCAGCACAAAATAGGTGAGTTGTTGCACACCCCG							
BIP	GGAGCTGCGTTGCTGCTGAACAAACAACCGGTGCGAAAC							
LF	CCACAGCGACTTCCAGAAACA							
LB	GCGGCGCGTTTTAAGGGAT							

2.6.2 Extração DNA total de amostras de vegetais

Tanto a obtenção dos extratos, como do DNA das amostras vegetais foi realizado no Laboratório de Fitossanidade (FitoLab) do Instituto Pedro Nunes (IPN), de acordo com o método de extração *Cetyltrimethylammonium Bromide* (CTAB) a 2% (EPPO Bulletin, 2019).

O material vegetal, preferencialmente os pecíolos e a nervura central, foram inicialmente macerados com tampão fosfato salino (PBS) (BDH VWR®), através do homogeneizador (HOMEX 6, Bioreba, Suíça), obtendo-se assim o extrato da planta.

Para a extração do DNA, o macerado foi lisado pela adição de um tampão de lise, 2% CTAB (CTAB (99%, *Acros Organics™*), 1 M TRIS pH 8,0 (*Thermo Fisher Scientific*), 0,5 M EDTA pH 8,0 (*PanReac AppliChem*), 5 M NaCl (99,5%, *Fisher Chemical*), PVP-40 (*Alfa Aesar*)) e aquecido a 65° C durante 30 minutos. De seguida, foi centrifugado a 16 000 g durante 5 minutos. Após a lise celular, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e homogeneizado com clorofórmio álcool-isoamílico (24:1) (*Fisher Chemical*), com a finalidade de desnaturar as proteínas, obtendo-se uma separação entre a fase aquosa e a fase fenólica, através de uma centrifugação a 16 000 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e homogeneizado por inversão com 2-propanol (*Fisher Chemical*) a 4°C e incubado a -20°C durante, pelo menos, 5 horas. Posteriormente, foi centrifugado a 16 000g durante 20 minutos, no qual o precipitado foi lavado com etanol a 70%, removendo-se as moléculas de água, resíduos de solutos orgânicos e fenóis. De seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em tampão TE (1M TRIS pH 8,0, 0,5 M EDTA pH 8,0), obtendo-se DNA puro.

2.6.3 Reação LAMP

Antes de se efetuar a reação de LAMP, as amostras dos extratos foram submetidas a uma desnaturação prévia a 95° C durante 10 minutos (Yaseen *et al.*, 2015), com posterior arrefecimento a 4° C. As reações tanto dos extratos como de DNA foram realizadas num *PikoReal Real-Time* (*Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos), através do *software* 2.2.250.602, a diferentes temperaturas durante 60 minutos. Cada lote de reações de LAMP incluiu um controlo positivo de amplificação por adição de DNA do *kit* e um controlo negativo de amplificação por adição de água ultrapura estéril. De realçar que a preparação das reações foi efetuada em gelo.

Previamente foi realizada uma mistura de *primers* de 10x (2 μ M F3 e B3; 8 μ M LF e LB; 16 μ M FIP e BIP). As reações foram preparadas para um volume total de 13 μ L, como mencionado na Tabela 12, utilizando o *kit LavaLAMP™ DNA Master Mix* (Lucigen, Lot 17836).

Tabela 12. Preparação das reações LAMP para um volume total de 13 μ L.

Componentes	Extrato		DNA		Controlo positivo
	Controlo negativo	Amostra	Controlo negativo	amostra	
H ₂ O RNase-free (Nztech)	5	-	5	4	4
LavaLAMP™ DNA Master Mix (2x)	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25
Mistura de <i>primers</i> , 10x	1,25	1,25	1,25	1,25	-
Green Fluorescent Dye	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
DNA alvo	-	5	-	1	-
DNA positive control lamp primer mix	-	-	-	-	1,25
DNA positive control	-	-	-	-	1
Volume total (μL)	13	13	13	13	13

2.6.4 Eletroforese em gel dos produtos de amplificação

Para confirmar a amplificação do DNA alvo foi realizada a técnica de eletroforese em gel de agarose, com uma fonte de alimentação (*Power Source* 300V, BDH VWR®, Bélgica) e um transiluminador de ultravioleta (*GenoPlex*, BDH VWR®, Bélgica). Para a análise dos produtos de reação LAMP, foram utilizados 5 μ L de cada reação LAMP e homogeneizados com 1 μ L de 6x NZYDNA *loading dye* (NZYTech). Estes foram aplicados ao gel de agarose 2,5 % e sujeitos a uma corrente de 100 V em tampão TAE a 1 %, decorrido num período de 40 minutos (Tomita *et al.*, 2008). O gel foi corado com *GreenSafe Premium* (NZYTech) a uma concentração de 0,2 μ L /mL e o marcador utilizado foi de 100 – 1000 bp (NZYDNA Ladder V, NZYTech).

Capítulo 3

3. Resultados e discussão

3.1 Caracterização e valorização do marmelo

Com o objetivo de valorizar o marmelo procedemos à caracterização das cultivares presentes na região da Beira Interior através da avaliação de parâmetros de qualidade e nutricionais. Posteriormente, apostou-se na inovação através do desenvolvimento de um novo produto à base de marmelo.

Numa primeira fase foram efetuadas visitas aos diferentes produtores na região da Beira Interior, mais concretamente no concelho da Covilhã (Figura 11). No Ferro obtivemos as cultivares Gigante de Vranja e a Portugal, produzidas num sistema de produção integrada (Figura 11 – A e B). Enquanto em Orjais obtivemos a cultivar Portugal regada só com água e a Galega com a fertirrega utilizada para os pessegueiros (Figura 11 – C e D).

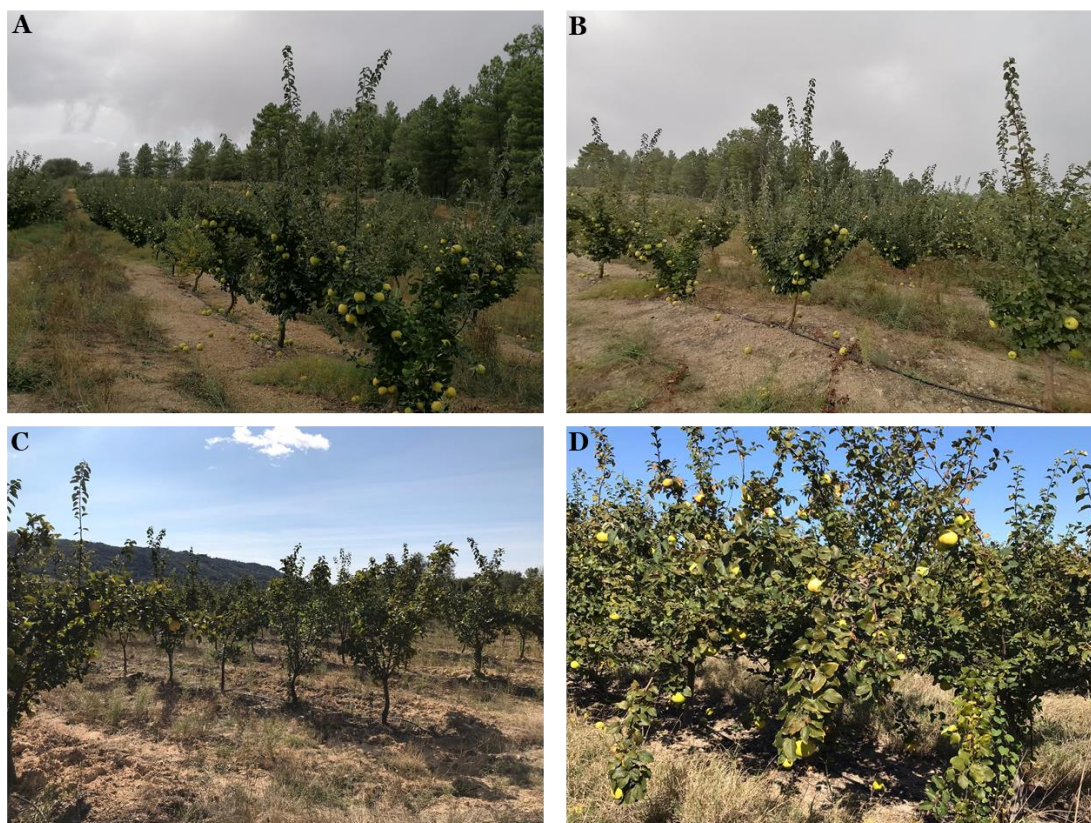


Figura 11. Diferentes pomares de marmelo no concelho da Covilhã. A) Quinta das Rasas, Ferro – Cultivar Gigante de Vranja. B) Quinta das Rasas, Ferro – Cultivar, Portugal. C) Quinta da Branca, Orjais – Cultivar Portugal. D) Quinta da Branca, Orjais – Cultivar Galega.

Foram recolhidos marmelos apenas de dois pomares uma vez que a colheita nos outros dois proprietários identificados na região da Beira Interior, não se realizou.

As amostras foram colhidas durante o período de setembro a outubro, de acordo com a colheita de cada produtor (Figura 12). A 24 de setembro realizou-se a colheita da Gigante de Vranja e da Portugal, no Ferro, e a 06 de outubro, voltou-se a colher a Gigante de Vranja no Ferro e a Portugal em Orjais. Por último, a 12 de outubro colheu-se a Galega em Orjais.



Figura 12. Amostragem das cultivares. A – Gigante de Vranja (24 de setembro), B – Gigante de Vranja (06 de outubro), C – Portugal (24 de setembro), D – Portugal (06 de outubro) e E – Galega (12 de outubro).

3.1.1 Parâmetros de qualidade

3.1.1.1 Cultivares de marmelo

Por forma a comparar e analisar as diferentes cultivares de *Cydonia oblonga*, estas foram agrupadas conforme a época ideal de colheita, de acordo com a data dos respetivos produtores. Assim, tanto para a avaliação dos parâmetros de qualidade, como para a caracterização nutricional para a variável cultivar, a Gigante de Vranja que se considerou foi a colhida no dia 06 de outubro, uma vez que o produtor indicou que esta era a data ideal de colheita.

Os resultados obtidos em relação à avaliação dos parâmetros de qualidade encontram-se apresentados na Tabela 13, 14 e 16.

Na Tabela 13 encontram-se os resultados obtidos para os parâmetros biométricos, peso e calibre, das três cultivares em estudo. Sendo possível observar que o peso variou entre 205,03 e 277,75 g e o calibre entre 71,42 e 80,60 mm. De salientar que a cultivar Gigante de Vranja apresentou não só o maior peso, como o maior calibre e a Galega o contrário, o menor peso e o menor calibre. Ambas as cultivares diferem estatisticamente entre si em ambos os parâmetros ($p < 0,05$). De salientar, que existe uma correlação fortemente positiva e muito significativa ($p < 0,01$) entre os parâmetros peso e calibre ($r = 0,91$) (Anexo – I).

Tabela 13. Parâmetros biométricos das cultivares de marmeleiro da Beira Interior.

Parâmetro	Cultivar	Nº de frutos	Média ¹ ± SD
Peso (g)	Gigante de Vranja	100	277,75 ^a ± 47,44
	Portugal	200	238,61 ^b ± 49,41
	Galega	100	205,03 ^c ± 40,04
Calibre (mm)	Gigante de Vranja	100	80,60 ^a ± 4,60
	Portugal	200	74,06 ^b ± 5,55
	Galega	100	71,42 ^c ± 5,51

¹letras diferentes no mesmo parâmetro indica diferenças significativas ($p < 0,05$).

O peso e o calibre variam de acordo com a cultivar, assim, segundo Regato e colaboradores, a Gigante de Vranja, geralmente, contém um peso médio de 344,00 g e um diâmetro de 87,00 mm, enquanto a Portugal apresenta um peso médio de 305,00 g e um diâmetro de 85,00 mm (Regato, Guerreiro, and Regato, 2017). Estes valores são ligeiramente superiores aos que se obtiveram. Estas diferenças resultam do fato dos parâmetros de qualidade serem afetados, não só pelas condições climáticas, mas, também, pelas respetivas práticas agronómicas (Musacchi and Serra, 2018). Foi ainda possível correlacionar o peso e o calibre, sendo que ambos mostram uma tendência crescente ao longo do tempo, pois com o avançar da maturação os frutos tendem a aumentar os parâmetros biométricos (Ahmad and Siddiqui, 2015).

Na Tabela 14 encontram-se os resultados obtidos para a cor (L^* , a^* e b^*), SST e acidez total. No que diz respeito à cor, esta foi analisada na epiderme do fruto por forma a complementar a caracterização das cultivares e, não, como teste de maturação. De um modo geral, a cor predominante do marmelo é amarelo brilhante (Mir *et al.*, 2016; Regato, Guerreiro, and Regato, 2017). Realçando que a cor é um fator importante na escolha do consumidor (Paltrinieri, 2014). Assim, para a coordenada L^* verificou-se que os valores

variaram entre 73,04 e 75,39, sendo a Portugal a que apresenta uma epiderme mais brilhante. Para a coordenada a^* os valores obtidos foram negativos, variando entre -12,10 e -11,30, indicativos de uma tonalidade mais verde, no entanto, não se detetaram diferenças significativas ($p > 0,05$). Por último, quanto ao b^* os valores variam entre 51,27 e 55,20, demonstrando uma cor mais amarela. A Galega foi a cultivar que apresentou a cor mais amarela e, conseqüentemente, uma menor tonalidade de verde (Tabela 14). Tendo sido possível verificar que quanto mais a fruta se aproxima de uma tonalidade vermelha e amarela, maior o teor de SST (Anexo – I).

Segundo Guiné e Barroca (Guiné and Barroca, 2012), as coordenadas relativamente à cor do marmelo correspondem a $L^* = 78,02 \pm 0,86$, $a^* = -1,27 \pm 0,32$ e $b^* = 31,75 \pm 1,68$. Os resultados obtidos não estão totalmente de acordo com a literatura, uma vez que as cultivares em estudo apresentam valores mais negativos de a^* , ou seja, mais verdes, enquanto para b^* apresentam valores mais positivos, ou seja, mais amarelos. Relativamente à luminosidade, os valores foram semelhantes com os mencionados na literatura, demonstrando ser brilhantes, uma vez que os valores da coordenada correspondente estavam mais próximo de 100 do que de 0. De salientar que a coloração é condicionada pelo número de horas de exposição solar do fruto e por fatores climáticos (Koshita, 2015).

Tabela 14. Parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*), teor de SST ($^{\circ}$ Brix) e acidez total (g ácido málico/L) dos marmelos das diferentes cultivares.

Parâmetro	Cultivar	Nº de frutos	Média ¹ ± SD
L*	Gigante de Vranja	100	74,11 ^b ± 2,58
	Portugal	200	75,39 ^a ± 4,11
	Galega	100	73,04 ^b ± 3,26
a*	Gigante de Vranja	100	-11,64 ^a ± 1,84
	Portugal	200	-12,10 ^a ± 3,99
	Galega	100	-11,30 ^a ± 3,31
b*	Gigante de Vranja	100	51,27 ^c ± 2,01
	Portugal	200	53,53 ^b ± 1,79
	Galega	100	55,20 ^a ± 2,77
SST ($^{\circ}$ Brix)	Gigante de Vranja	100	12,77 ^c ± 0,54
	Portugal	199	15,97 ^b ± 1,07
	Galega	100	18,86 ^a ± 1,05
Acidez total (g ácido málico/L)	Gigante de Vranja	20	9,35 ^b ± 1,19
	Portugal	40	12,34 ^a ± 2,45
	Galega	20	8,33 ^b ± 1,51

¹letras diferentes no mesmo parâmetro indica diferenças significativas ($p < 0,05$).

Relativamente aos valores obtidos para os SST, constataram-se diferenças significativas entre as cultivares, tendo os valores variado entre 12,77 e 18,86 °Brix, sendo a Gigante de Vranja menos doce que a Portugal e esta, por sua vez, menos doce que a Galega (Tabela 14). Os teores de SST determinados no presente trabalho enquadram-se num intervalo ligeiramente superior aos descritos na Tabela 15, evidenciando que a região da Beira Interior apresenta condições favoráveis para o seu cultivo.

No que diz respeito à acidez total, Tabela 14, a Galega e a Gigante de Vranja são menos ácidas que a Portugal, variando entre 8,33 a 12,34 g ácido málico/L, corroborado pelo descrito na literatura por Legua e colaboradores (Legua *et al.*, 2013). Já os valores para a Portugal não são concordantes com os da literatura, uma vez que a acidez obtida é superior aos dados da Tabela 15. No entanto, a acidez da fruta está relacionada com a aproximação do estado de maturação. Geralmente, quanto mais próximo do estado de maturação a fruta estiver, maior a redução da acidez (Paltrinieri, 2014).

Tabela 15. Teor de SST (°Brix) e acidez total (g ácido málico/L) referenciados em marmelo.

SST (°Brix)	Acidez total (g ácido málico/L)	Referência bibliográfica
11,57 ± 0,3 – 14,70 ± 0,6	4,71 ± 0,1 – 7,95 ± 0,3	Rodríguez-Guisado <i>et al.</i> , 2009
13,40 – 18,63	5,28 – 9,54	Legua <i>et al.</i> , 2013
16,9 – Gigante de Vranja 16,1 – Portugal	---	Regato, Guerreiro, and Regato, 2017

Posteriormente, os marmelos foram avaliados quanto à sua textura (Tabela 16) e através de dois ciclos de compressão foi possível obter a dureza, a elasticidade, a resiliência, a coesividade e a mastigabilidade. A dureza consiste na força necessária para deformar o alimento numa determinada distância, ou seja, a força para comprimir entre os molares, morder com os incisivos ou comprimir entre a língua e palato. Elasticidade é a taxa de resistência com que a amostra retorna à sua forma original após a remoção da força que provocou a compressão parcial. Resiliência consiste na capacidade de o alimento voltar ao seu estado normal depois de ter sido aplicado uma força. Coesividade é o grau em que um alimento se deforma antes de ser mordido com os molares. A mastigabilidade corresponde ao esforço necessário para mastigar a amostra a uma consistência adequada para engolir (Guiné *et al.*, 2015). Neste contexto, constatou-se que a cultivar Galega é menos dura e resiliente que a Portugal e, por sua vez que a Gigante de Vranja. Já em relação à elasticidade, coesividade e mastigabilidade, a Gigante de Vranja apresentou maior elasticidade, coesividade, assim como uma maior mastigabilidade em relação à Portugal e à Galega, verificando-se diferenças significativas entre as cultivares.

No entanto, é possível verificar algumas diferenças entre os valores obtidos quando comparados com os descritos por Guiné e Barroca (Guiné and Barroca, 2012). Deste modo, em relação à dureza, as amostras encontram-se ligeiramente abaixo, ou seja, menos duras ($48,46 \pm 6,47$ N), enquanto para a mastigabilidade são ligeiramente superiores ($27,23 \pm 4,06$ N). Já a elasticidade, resiliência e coesividade são superiores às descritas ($74,86 \pm 5,17$ %, $0,47 \pm 0,08$ e $0,75 \pm 0,06$), respetivamente. Por norma, valores de dureza mais baixos evidenciam características organoléticas mais adequadas às preferências do consumidor e, conseqüentemente, à comercialização (Guiné and Barroca, 2012).

Tabela 16. Análise da textura – dureza (N), elasticidade (%), resiliência, coesividade e mastigabilidade (N) das cultivares.

Parâmetro	Cultivar	Nº de frutos	Média¹ ± SD
Dureza (N)	Gigante de Vranja	99	$42,94^a \pm 6,95$
	Portugal	199	$39,49^b \pm 7,02$
	Galega	100	$37,00^c \pm 4,43$
Elasticidade (%)	Gigante de Vranja	99	$90,13^a \pm 3,47$
	Portugal	199	$87,49^b \pm 3,04$
	Galega	100	$87,32^b \pm 4,63$
Resiliência (adimensional)	Gigante de Vranja	99	$0,71^a \pm 0,03$
	Portugal	199	$0,69^b \pm 0,05$
	Galega	100	$0,66^c \pm 0,03$
Coesividade (adimensional)	Gigante de Vranja	99	$0,91^a \pm 0,07$
	Portugal	199	$0,87^b \pm 0,05$
	Galega	100	$0,88^b \pm 0,06$
Mastigabilidade (N)	Gigante de Vranja	99	$35,21^a \pm 7,09$
	Portugal	199	$30,25^b \pm 6,53$
	Galega	100	$28,48^b \pm 5,53$

¹letras diferentes no mesmo parâmetro indica diferenças significativas ($p < 0,05$).

3.1.1.2 Local de produção

Quanto à variável local, como referido anteriormente, a Portugal foi colhida em dois locais distintos, no Ferro e em Orjais, tendo sido possível observar diferenças em todos os parâmetros de qualidade, exceto a luminosidade (Anexo – II).

No Ferro, os frutos apresentaram tanto maior peso, 266,39 g, como um maior calibre, 76,80 mm, quando comparados com os frutos obtidos em Orjais. Os marmelos colhidos em Orjais continham um maior teor de SST (16,59) do que no Ferro (15,35), no entanto, é possível constatar que os frutos com menor teor SST apresentaram menor acidez e os com maior teor SST apresentaram maior acidez (Figura 13). Estas diferenças surgem devido as

diferentes práticas culturais. Salientado que em ambos os locais o sistema de rega difere. No Ferro a produção ocorreu num sistema de produção integrada, enquanto em Orjais numa produção convencional, apenas com água. No entanto, para ter uma análise referente ao local mais concreta deveria ter-se a confirmado se árvores são idênticas assim como as datas de colheita e normalizar o mesmo tipo de rega variando unicamente o local. Desta forma, para ter dados mais robustos esta análise deveria de ocorrer ao longo de várias colheitas, mais locais e com o mesmo tipo de produção.

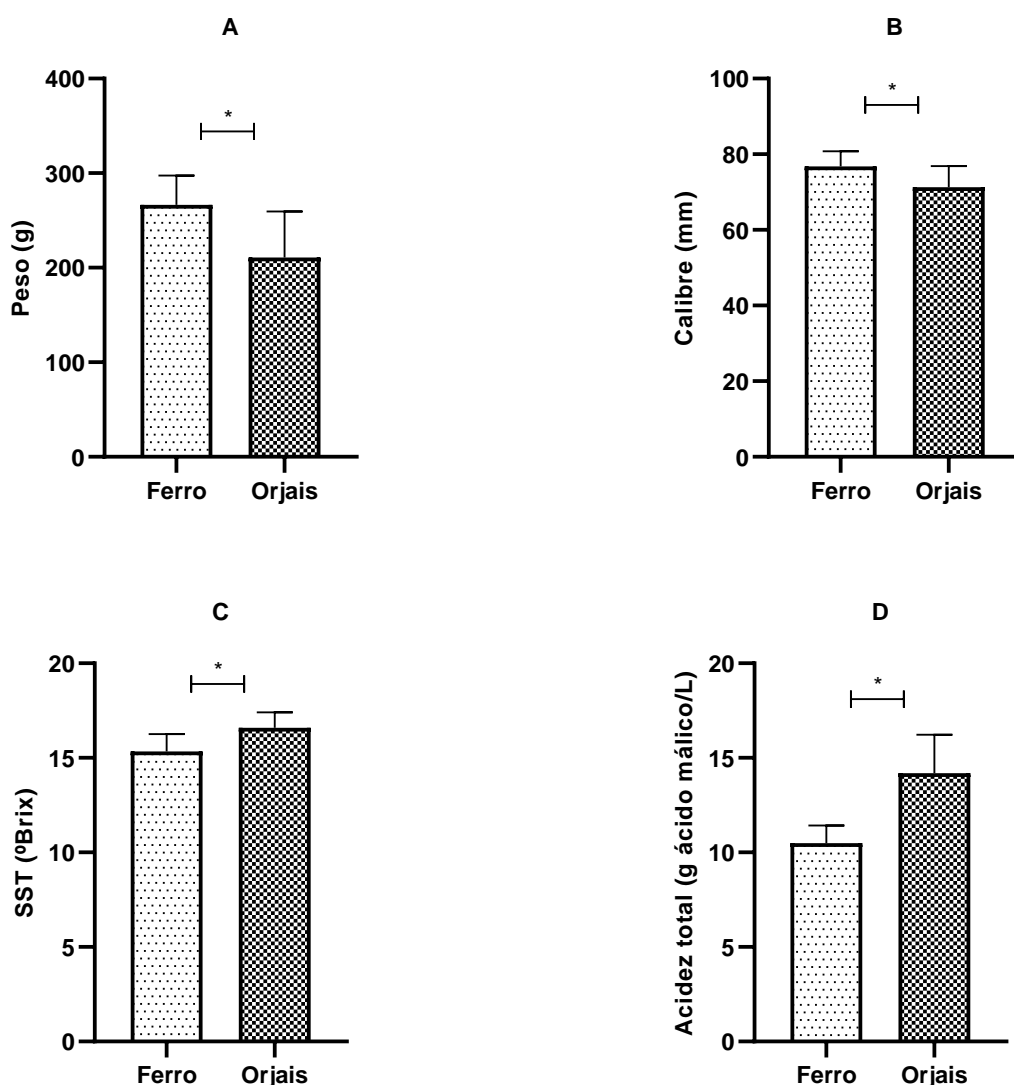


Figura 13. Comparação dos locais de produção para a cultivar Portugal – parâmetros de qualidade (A - peso, B - calibre, C - SST e D - acidez total; * $p < 0,05$).

3.1.1.3 Data de colheita

Quanto à variável data de colheita, como referido anteriormente, a Gigante de Vranja foi colhida das mesmas árvores em duas datas distintas, 24 de setembro e 06 de outubro. Foi possível verificar que a data de colheita influencia todos os parâmetros de qualidade analisados, constatando-se um aumento destes parâmetros com o passar do tempo (Anexo – III).

Num período de 13 dias entre colheitas, o peso e o calibre aumentaram 8,02% e 7,54%, respetivamente (Figura 14). Com estes dados, tendo em conta a proporção peso dos frutos e preço para o produtor, poderemos considerar que a última data de colheita é a mais favorável, em termos económicos. No entanto, para determinar a data ideal de colheita teria que se prolongar o estudo acrescentando mais datas de colheita, o que não é o objetivo deste estudo.

Ao nível do consumidor, a luminosidade da epiderme do fruto descrita pelos valores de L* é dos parâmetros mais apelativos quando dispostos nas prateleiras dos supermercados. Por outro lado, as cores verdes com as suas variantes, desde o verde intenso até ao amarelo, ajudam na decisão da compra em função dos gostos sensoriais dos comparadores (Sánchez and Santos, 2011). Verificando-se que os valores da luminosidade, assim como o teor de amarelo, aumentaram em função da data de colheita.

Quanto à dureza dos frutos observou-se uma tendência para o endurecimento (Figura 14), que poderá ser devido à inativação das enzimas hidrolíticas das pectinas das paredes celulares (Sánchez and Santos, 2011). Realçando que os valores dos SST aumentaram à medida que avança o estado de maturação dos frutos. Contudo, importa mencionar, que raramente a qualidade gustativa se reflete nos preços do mercado, sendo o parâmetro peso dos frutos o que traduz maior retorno económico para o produtor.

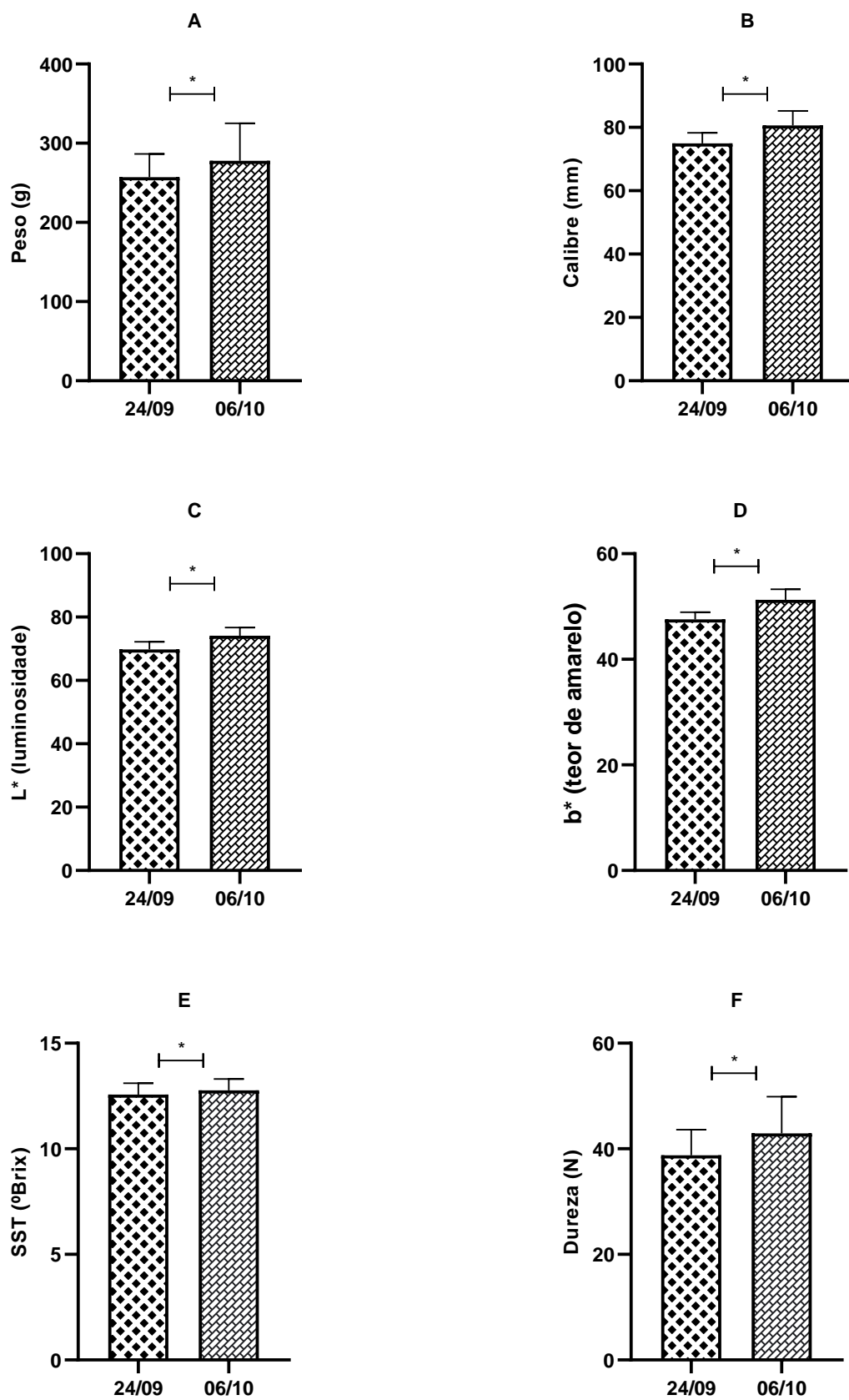


Figura 14. Comparação das datas de colheita para a cultivar Gigante de Vranja – parâmetros de qualidade (A - peso, B - calibre, C - L*, D - b*, E - SST e F - dureza; * p<0,05).

3.1.2 Parâmetros nutricionais

A escolha por uma alimentação mais adequada é uma preocupação cada vez maior dos consumidores, uma vez que existe uma correlação positiva entre a saúde e alimentação. O conhecimento das propriedades nutricionais dos alimentos, como o respetivo valor calórico, permitem ao consumidor selecionar os alimentos mais adequados à sua alimentação.

De acordo com a Associação Portuguesa de Nutrição (APN), o consumo de fruta enquadra-se num estilo de vida saudável, garantindo nutrientes essenciais para o organismo. O consumo diário de fruta fornece uma quantidade considerável de minerais e vitaminas. Em geral, a fruta é composta na sua maioria por água, variando entre 75 – 95 %. É rica em hidratos de carbono, aproximadamente 8 – 10 %, que são os principais responsáveis pelo seu valor energético e, em contrapartida, pobre em proteínas e lípidos. Para além disso, a fruta fornece quantidades relativamente reduzidas de calorías. Uma das razões pela qual a dieta mediterrânica é considerável saudável, é o facto de incluir uma grande quantidade de fruta e legumes. A Roda da Alimentação Mediterrânica recomenda a ingestão de três a cinco porções de fruta, de preferência diferentes, diariamente. A falta de fruta na dieta origina carências nutricionais, especialmente vitamínicas (APN, 2017).

3.1.2.1 Cultivares de marmelo

A caracterização nutricional das diferentes cultivares de marmelo é muito importante para o aumento do conhecimento sobre estas, uma vez que existe pouca informação disponível. Deste modo, os valores nutricionais obtidos para cada uma das cultivares de marmelo em estudo encontram-se apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Composição nutricional das cultivares de marmelo por 100 g de parte edível.

	Gigante de Vranja	Portugal	Galega
Valor energético (KJ)	278,09 ^c ± 12,07	349,25 ^b ± 18,72	396,16 ^a ± 20,06
Valor energético (kcal)	65,75 ^c ± 2,80	82,48 ^b ± 4,40	93,55 ^a ± 4,72
Lípidos (g/100g)	<LQ (0,2)	<LQ (0,2)	<LQ (0,2)
Hidratos de carbono (g/100g)	14,57 ^c ± 0,93	18,78 ^b ± 1,12	21,40 ^a ± 1,16
dos quais açúcares	7,51 ^b ± 0,38	8,82 ^a ± 0,53	9,29 ^a ± 0,81
Fibra (g/100g)	2,22 ^a ± 0,59	2,10 ^a ± 0,27	2,37 ^a ± 0,26
Proteína (g/ 100g)	0,31 ^a ± 0,04	0,34 ^a ± 0,06	0,35 ^a ± 0,05
Sal (g)	0,00	0,00	0,00
Humidade (g /100g)	82,36 ^a ± 0,59	78,19 ^b ± 1,07	75,33 ^c ± 1,22
Cinzas (g/100g)	0,34 ^a ± 0,06	0,39 ^a ± 0,08	0,35 ^a ± 0,04
Minerais			
Potássio (mg)	120,61 ^c ± 18,20	204,53 ^a ± 33,12	172,27 ^b ± 21,45
Cálcio (mg)	7,72 ^a ± 0,94	11,63 ^a ± 7,24	7,42 ^a ± 0,94
Fósforo (mg)	16,22 ^{ab} ± 0,83	17,42 ^a ± 2,57	15,16 ^a ± 2,29
Magnésio (mg)	6,53 ^b ± 0,44	8,57 ^a ± 2,48	7,30 ^{ab} ± 0,80
Sódio (mg)	0,84 ^a ± 0,35	0,41 ^b ± 0,11	0,68 ^a ± 0,18
Ferro (mg)	0,18 ^a ± 0,07	0,13 ^b ± 0,02	0,20 ^a ± 0,03
Zinco (mg)	0,13 ^b ± 0,02	0,18 ^a ± 0,04	0,13 ^b ± 0,02
Cobre (mg)	0,07 ^b ± 0,01	0,09 ^a ± 0,02	0,07 ^b ± 0,01
Manganês (mg)	0,02 ^a ± 0,01	0,05 ^a ± 0,04	0,02 ^a ± 0,01

<LQ – valor abaixo do limite de quantificação;
letras diferentes na mesma linha indica diferenças significativas (p<0,05).

Apesar das cultivares apresentarem diferentes valores para cada parâmetro, é possível observar uma ordem decrescente de cada nutriente idêntica entre as cultivares, sendo a humidade o parâmetro com maior predominância, seguido dos hidratos de carbono, fibra, proteínas e, por último, os lípidos (Tabela 17).

Como referido anteriormente, o marmelo é constituído maioritariamente por água, variando entre 75 e 82 %, consoante a cultivar. Sendo a Gigante de Vranja a que apresenta maior teor de humidade e a Galega menor. Quanto aos macronutrientes, os hidratos de carbono são os mais abundantes, encontrando-se entre 14,57 e 21,40 g/100g, sendo a Galega superior à Portugal e, por sua vez, à Gigante de Vranja. De salientar, que existe uma correlação fortemente negativa e muito significativa (p<0,01) entre a humidade e os hidratos de carbono (r = -0,99) (Anexo – IV), ou seja, à medida que o teor de humidade aumenta, a quantidade de hidratos de carbono diminui.

Em relação à fibra e às proteínas, estas não apresentam diferenças significativas entre as cultivares, estando compreendidas entre 2,10 a 2,37 g/100g e 0,31 a 0,35 g/100g,

respetivamente, destacando-se a Galega, como a que apresentou o maior teor de fibra e proteína.

Quanto aos lípidos, não foi possível quantificá-los, uma vez que estes são inferiores ao limite de detecção do método (0,2 g/100g).

A nível energético, verificou-se que, por cada 100 g de marmelo consumido, a energia fornecida é de apenas 65,75 a 93,55 kcal, sendo a Galega a que contém maior valor energético e a Gigante de Vranja menor.

Ao comparar os resultados obtidos com a tabela nutricional do INSA (Tabela 4) é possível verificar inúmeras diferenças, nomeadamente, o valor energético e os hidratos de carbono apresentam valores superiores aos descritos. Enquanto, o teor de fibra obtido é muito inferior, tal como a humidade, exceto para a Gigante de Vranja. Já os resultados da proteína são semelhantes aos descritos pelo INSA (2019). Contudo, apesar dos resultados apresentarem algumas diferenças para os parâmetros analisados, a ordem decrescente de cada macronutriente é igual à obtida, sendo a humidade o parâmetro com maior predominância, seguidos dos hidratos de carbono, fibra, proteínas e, por último, os lípidos. Desta forma, o marmelo é um alimento adequado para dietas pouco calóricas e pobres em gordura. Esta heterogeneidade dos resultados pode estar relacionada com alguns fatores, nomeadamente genéticos e agronómicos, tais como: as práticas culturais aplicadas em cada cultivar, as características do solo, assim como por fatores edafoclimáticos, como a maturação da fruta, clima e exposição solar (Faniadis, Drogoudi, and Vasilakakis, 2010).

Os resultados da composição em açúcares livres do marmelo encontram-se resumidos na Tabela 18. No qual, através da determinação do teor de açúcares por cromatografia iónica foi possível detetar dois monossacarídeos (glucose e frutose) e um dissacarídeo (sacarose), que contribuem para o sabor doce da fruta. O açúcar presente em maior quantidade foi a frutose (4,51 a 5,82 g/100g), seguida da glucose (1,91 a 2,66 g/100g) e, em menor quantidade a sacarose (0,81 a 1,18 g/100g). O teor total em açúcares foi de 7,51 a 9,29 g/100g. A Galega foi a cultivar que apresentou maior teor de glucose, frutose e, conseqüentemente, mais açúcares totais. No entanto, esta foi a que apresenta menor valor de sacarose. Contudo, quando existe um elevado teor de açúcar não significa necessariamente que apresente um sabor mais doce, pois a quantidade de ácidos orgânicos também é importante na perceção do sabor da fruta (Milivojević *et al.*, 2011). Também é possível observar que as cultivares com menor proporção de açúcar foram aquelas que apresentaram os maiores teores de humidade ($r = -0,63$), como é o caso da

Gigante de Vranja (Anexo - IV). Porém os valores apresentados de glucose mais frutose são inferiores aos descritos pelo INSA (2019), enquanto os da sacarose são superiores.

Tabela 18. Teor de açúcares (g/ 100g) – glucose, frutose e sacarose das cultivares.

Parâmetro	Cultivar	Nº de frutos	Média¹ ± SD
Glucose (g/ 100 g)	Gigante de Vranja	10	1,91 ^c ± 0,18
	Portugal	20	2,38 ^b ± 0,17
	Galega	10	2,66 ^a ± 0,26
Frutose (g/ 100 g)	Gigante de Vranja	10	4,51 ^c ± 0,29
	Portugal	20	5,26 ^b ± 0,36
	Galega	10	5,82 ^a ± 0,55
Sacarose (g/ 100 g)	Gigante de Vranja	10	1,09 ^b ± 0,28
	Portugal	20	1,18 ^a ± 0,34
	Galega	10	0,81 ^a ± 0,20

¹letras diferentes no mesmo parâmetro indica diferenças significativas (p<0,05).

Em relação ao teor de cinzas os valores variam entre 0,34 e 0,39 g/100g (Tabela 17), não havendo diferenças significativas. As cinzas permitem obter uma estimativa aproximada do teor mineral total presente na matriz alimentar, sendo um parâmetro nutricional importante. Os valores obtidos são semelhantes aos descritos pelo INSA (0,35 g/100g), exceto para a Portugal, que apresenta valores ligeiramente superiores.

Observando a Tabela 17 em relação ao teor em minerais é possível verificar que para todas as cultivares a composição mineral é composta por ordem decrescente por potássio, fósforo, cálcio, magnésio, sódio, ferro, zinco, cobre e manganês, exceto para a cultivar Portugal em que o teor de zinco foi superior ao teor de ferro. Constatando-se que o potássio, fósforo, cálcio e o magnésio são os minerais mais abundantes nas cultivares em estudo. Contudo, foi possível observar diferenças significativas para todos os minerais, exceto para o cálcio e o manganês, destacando a cultivar Portugal como a que apresentou maior teor de minerais, exceto para o sódio e o ferro.

De acordo com INSA (2019), os minerais disponíveis no marmelo são, por ordem decrescente, potássio, fósforo, cálcio, magnésio, sódio, ferro e zinco, estando de acordo com os resultados obtidos. Contudo, apesar dos minerais estarem disposto pela mesma ordem, os resultados obtidos apresentam diferenças para os valores quantificados. Mais concretamente, em ambas as cultivares, o sódio foi seis vezes inferior ao descrito (4 mg/100g). Já para o potássio e para o cálcio a cultivar Portugal foi a única que apresentou um resultado semelhante (200mg/100g) e (14 mg/100g), respetivamente. Enquanto as restantes cultivares apresentaram valores inferiores aos descritos pelo INSA para o cálcio

e para o potássio. O fósforo obtido também apresentou valores superiores ao descrito para todas as cultivares (14 mg/100g). Já o magnésio foi semelhante para as cultivares (0,1 mg/100g), exceto na Gigante de Vranja que foi ligeiramente inferior. E, por último, os valores do ferro foram semelhantes para a cultivar Portugal (0,1 mg/100g) e superior para as restantes, enquanto, o zinco foi semelhante para a Galega e para a Gigante de Vranja (0,1 mg/100g) e superior para a Portugal.

A heterogeneidade apresentada na composição mineral deve-se ao facto de esta variar consoante a cultivar, as práticas culturais realizadas e do estado nutricional das plantas. Deste modo, o conhecimento da composição mineral de cada cultivar constitui um contributo importante para a elaboração de recomendações de fertilização ajustadas à capacidade de absorção das plantas e com menor risco de poluição dos recursos naturais (Veloso, Sousa, and Sempiterno, 2020). De acordo com o despacho n.º 12030/2018 as exigências quantitativas de cada nutriente variam com a cultivar e o respetivo nível de produção (Despacho n.º 12030/2018).

Assim, para as cultivares produzirem plenamente quer em quantidade quer em qualidade necessitam não só de condições ambientais favoráveis como, terem à sua disposição durante todo o período de crescimento, os minerais nas quantidades e proporções adequadas.

3.1.2.2 Local de produção

Ao nível nutricional o local de produção, Ferro e Orjais, influencia alguns parâmetros da cultivar Portugal, como as cinzas, frutose, sacarose e alguns minerais, tais como cobre, manganês, fósforo, cálcio, magnésio e o potássio, sendo possível observar diferenças significativas (Anexo – V).

A diferença entre os minerais pode estar correlacionada com o facto de no Ferro a produção ocorrer num sistema de produção integrada, enquanto em Orjais numa produção convencional, apenas regada com água.

De uma maneira geral, a produção integrada é um sistema que segue estratégias amigas do ambiente, recorrendo a boas práticas agrícolas. Tendo em conta a gestão racional dos recursos naturais e mecanismos de regulação natural, em substituição de fatores de produção prejudiciais ao ambiente, com a finalidade de produzir alimentos de alta qualidade, promovendo a agricultura sustentável. Um dos fatores tidos em consideração neste tipo de produção é a melhoria da fertilidade do solo, ou seja, garantir que as culturas

tenham à sua disposição durante todo o período de crescimento os diversos nutrientes nas quantidades e proporções mais adequadas (Decreto-Lei n.º 37/2013).

Assim, ao comparar os minerais obtidos em ambos os locais (Anexo – V), é possível verificar que os minerais no Ferro vão de acordo com os dados descritos pelo INSA na Tabela 4, já o mesmo não ocorre para os resultados obtidos em Orjais, uma vez que para este os valores dos minerais são elevados. Deste modo, é possível verificar que no Ferro são aplicados fertilizantes nas proporções adequadas para a cultura, enquanto em Orjais será necessário realizar uma correção na fertilização utilizada.

3.1.2.3 Data de colheita

Ao nível nutricional a data de colheita influencia diversos parâmetros nomeadamente a humidade, proteína, glucose, sacarose, cinzas, cálcio e magnésio, observando-se diferenças significativas. Verificando-se que houve um aumento para os parâmetros humidade, cinzas e fósforo do dia 24 de setembro para o dia 06 de outubro, enquanto os restantes parâmetros diminuíram (Anexo - VI). Podendo-se inferir que a produção frutícola é fortemente influenciada pelas condições meteorológicas (APN, 2017).

3.1.2.4 Perfil vitamínico

A análise do perfil vitamínico teve como base quantificar as vitaminas hidrossolúveis presentes no marmelo, no entanto, apenas foi possível efetuar retas de calibração para os padrões, uma vez que ocorreu uma avaria no equipamento impossibilitando a quantificação das mesmas. Deste modo, obteve-se as retas de calibração para cada vitamina, conforme descrito na Tabela 19.

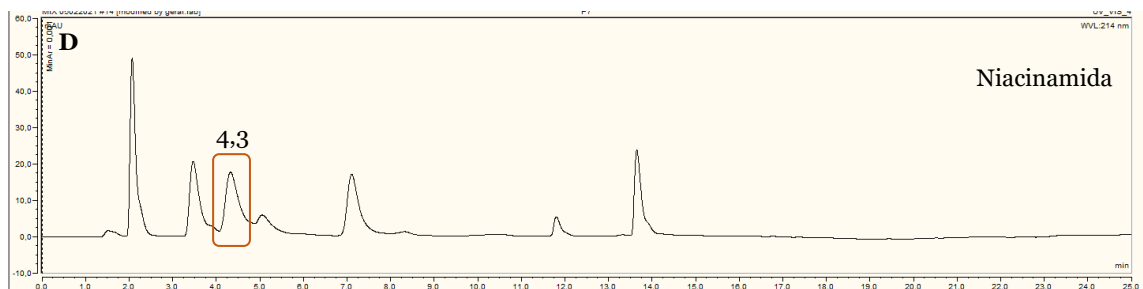
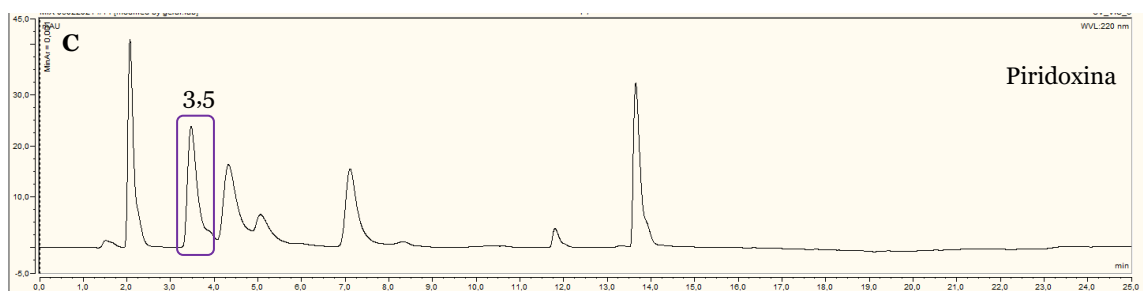
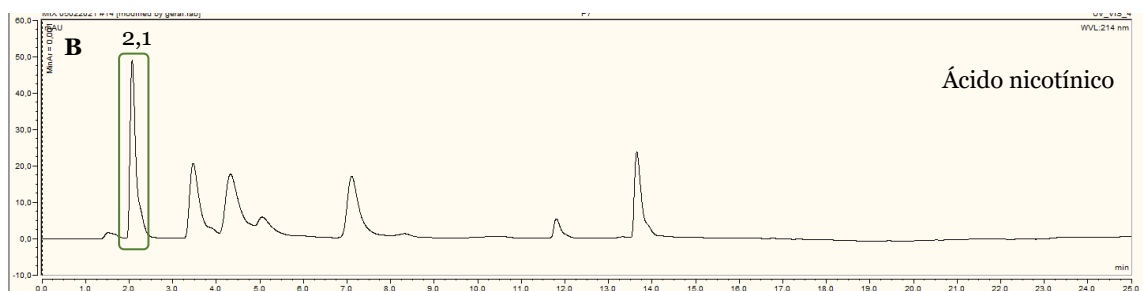
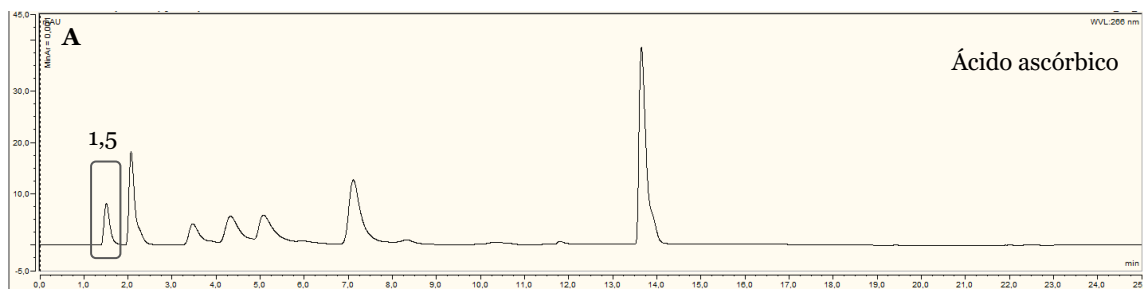
Tabela 19. Equação da reta para cada vitamina.

Vitaminas	Concentração (ppm)	Equação da reta	R ²
Ácido ascórbico	1,0 – 100	$y = 3,2288x - 7,7371$	0,9988
Acido nicotínico	0,01 – 100	$y = 2,9246x + 0,085$	0,9999
Piridoxina	0,025 – 100	$y = 2,7943x - 0,1708$	0,9998
Niacinamida	0,025 – 100	$y = 2,5256x - 0,4126$	0,9999
Tiamina	0,025 – 100	$y = 1,327x - 0,8071$	0,9995
Riboflavina	0,01 – 100	$y = 2,9866x + 0,135$	0,9999

De acordo com a Figura 15, é possível observar os diferentes tempos de retenção e os respetivos comprimentos de onda a que cada padrão foi analisado. Assim, os ácidos foram os primeiros a eluírem, mais precisamente, o ácido ascórbico aos 1,5 minutos (266 nm) e, de seguida, o ácido nicotínico aos 2,1 minutos (214 nm). Posteriormente, a piridoxina aos

3,5 minutos (220 nm), a niacinamida aos 4,3 minutos (214 nm), a tiamina aos 5,1 minutos (232 nm) e por último a riboflavina aos 13,7 minutos (268 nm). Ambas as vitaminas surgiram ao mesmo comprimento de onda descrito por Joseph (Joseph, 2011), no entanto, apesar dos comprimentos de onda serem os mesmos, os tempos de retenção foram ligeiramente diferentes, isto deve-se ao facto de o equipamento de HPLC não ser o mesmo.

Relativamente, ao ácido fólico e à biotina não foi possível quantificá-las porque os tempos de retenção são bastante próximos, 10,280 e 10,590 minutos (Joseph, 2011), respetivamente.



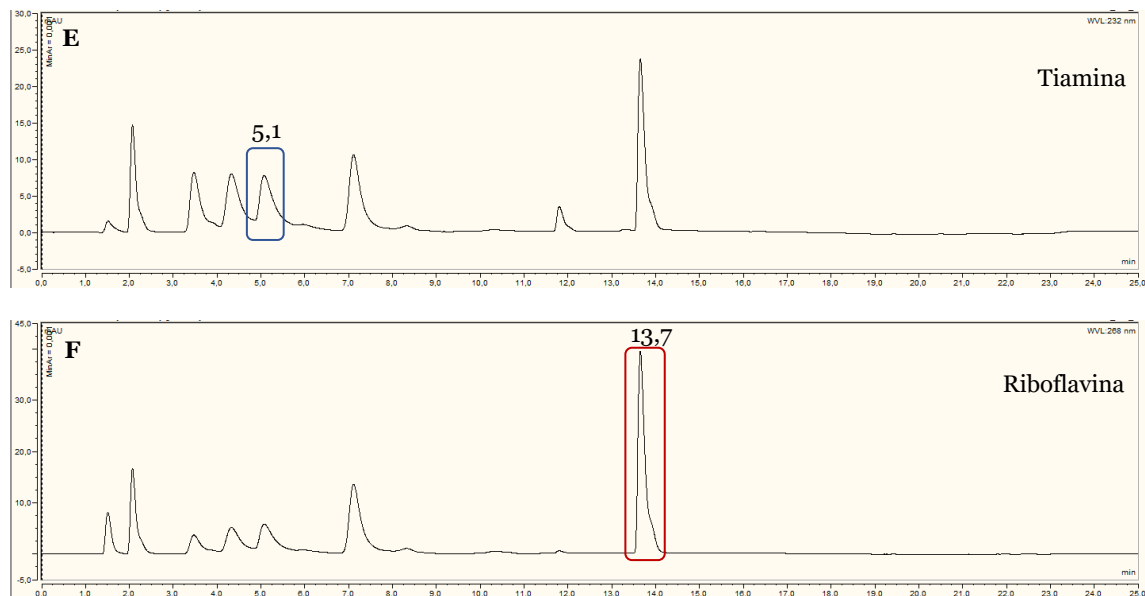


Figura 15. Cromatógrafo das vitaminas hidrossolúveis com uma concentração de 2,5 ppm. A – Ácido ascórbico, 266 nm. B – Ácido nicotínico, 214 nm. C – Piridoxina, 220 nm. D – Niacinamida, 214 nm. E – Tiamina, 232 nm. F – Riboflavina, 268 nm.

3.1.3 Desenvolvimento de um novo produto

Atualmente, os produtos existentes à base de marmelo são maioritariamente doces, como as compotas e as marmeladas. De forma a potencializar novos sabores e acrescentando o facto de o consumo em fresco não ter grande adesão, devido à acidez e adstringência que o marmelo apresenta, foi desenvolvido um produto fermentado, mais concretamente, vinagre de marmelo.

O vinagre pode definir-se, de acordo com o Decreto-Lei n.º 174/2007 de 8 de maio, como “o produto obtido exclusivamente pelo processo biológico de dupla fermentação, alcoólica e acética, de produtos de origem agrícola” (Decreto-Lei n.º 174/2007).

Assim, a produção do vinagre consiste em dois processos bioquímicos distintos, a fermentação alcoólica e a acética. A primeira fermentação (alcoólica) decorre num meio anaeróbio, pela ação das leveduras do género *Saccharomyces*, permitindo a conversão dos açúcares em etanol. Enquanto, a fermentação acética dá-se por ação de bactérias aeróbias, do género *Acetobacter*, produzindo ácido acético através da oxidação do etanol (Tesfaye *et al.*, 2002).

Ao longo dos anos, o processo de produção de vinagre foi evoluindo. O método de Orleães, também conhecido pelo processo estacionário, surgiu em 1670. Este processo é utilizado até hoje para o fabrico caseiro de vinagre. Deste modo, o vinagre é produzido em barris

que contêm um tubo em forma de *J* até ao fundo e as duas extremidades estão seladas por forma a garantir apenas uma entrada de ar. O tubo em forma de *J* permite a adição de vinho ao longo do processo, sem originar a rutura da película sobre o líquido. Desta forma, é possível ir adicionando vinho à medida que se retira vinagre, no entanto o processo é demorado (Mas *et al.*, 2014). Atualmente, o sistema submerso é o processo mais utilizado na indústria, por ser um método mais célere. Este, ocorre em fermentadores de aço inoxidável onde o ar é aplicado no líquido, produzindo uma cultura “submersa”(Hidalgo *et al.*, 2010).

O Decreto-Lei n. °174/2007 de 8 de maio, evidencia as normas a que deve obedecer o fabrico e comercialização de vinagre em Portugal. Deste modo, para o vinagre em causa deve-se ter em conta as seguintes características: acidez total (expressa em ácido acético por 100 mL) no mínimo 5 g/100 mL; álcool residual (em volume, a 20°C) no máximo 0,5 %; e um aspeto límpido, podendo conter algum depósito ou turvação.

Ao longo deste trabalho foram necessárias algumas tentativas até se obter vinagre de marmelo. Inicialmente, procedeu-se à fermentação alcoólica num fermentador de laboratório (Figura 16), com controlo de temperatura e pH, sendo também possível monitorizar ao longo do processo o oxigénio dissolvido (DO). Porém, devido a problemas técnicos, não foi possível efetuar novos ensaios no referido fermentador. Uma vez que esta fermentação não requer um controlo rigoroso do pH nem do DO, foi possível substituir o vaso de fermentação por um depósito de plástico e, a manta de aquecimento por uma estufa climatizada (à temperatura de 30°C). Convém salientar, que o depósito de plástico foi adaptado com um borbulhador de água, de forma a permitir a libertação de gases, nomeadamente, CO₂ e, ao mesmo tempo, impedir a entrada de ar (Figura 16). Contudo, ao recorrer a este tipo de depósitos inviabiliza o número de amostragens, ao longo do processo.



Figura 16. À esquerda o fermentador de laboratório, ao meio e à direita o depósito de plástico, no início e no fim da fermentação alcoólica, respetivamente.

Ambas as fermentações alcoólicas foram corrigidas, para obtenção de um teor de SST de 19,2°Brix. Durante o processo, que decorreu durante 174 horas (Tabela 20), os SST diminuíram (terminando entre 6,7 a 8,7°Brix) e o teor alcoólico aumentou (atingindo valores entre 8,21 a 9,10 % vol.). Porém, constatou-se que o fermentador de laboratório torna o processo mais rápido e origina teores de álcool inferiores.

Tabela 20. Monitorização dos valores SST, pH, TAV ao longo das fermentações alcoólicas.

Tentativas	Horas de fermentação (h)	SST (°Brix)	pH	TAV (% vol.)
1	0	19,2	3,38	-
	20	17,4	3,39	-
	44	13,0	3,46	-
	51	11,5	3,48	-
	67	9,0	3,44	-
	73	8,6	3,72	8,21
	91	8,4	3,49	-
	99	8,5	3,55	-
	119	8,5	3,57	-
	164	8,5	3,60	8,46
2	0	19,2	3,38	-
	188	6,7	3,39	8,91
3	0	19,2	3,29	-
	170	8,7	3,57	9,10

Posteriormente, procedeu-se à segunda fermentação, a acética. Sendo que, cada fermentação alcoólica correspondeu, respetivamente, a uma fermentação acética. A fermentação acética foi igualmente realizada num depósito de plástico, no entanto, a

entrada de ar foi selada, por recurso a uma gaze esterilizada que impede a entrada de insetos e outros corpos estranhos, permitindo simultaneamente a circulação de ar. Esta fermentação ocorreu numa estufa climatizada à temperatura de 25°C. É de salientar que a primeira tentativa não foi bem-sucedida, uma vez que se obteve contaminação. A segunda, apesar do fermentado apresentar 0% de teor alcoólico, não cumpriu com a acidez legislada (ácido acético \geq 5%), porém obteve-se “mãe de vinagre” de marmelo (Figura 17). Esta foi conservada à temperatura ambiente e utilizada na terceira fermentação acética. Assim, após 866 horas, o fermentado apresentou um teor alcoólico inferior a 0,5% e uma acidez igual a 5%, pelo que o fermentado obtido cumpre os requisitos legislados (Tabela 21).

Tabela 21. Monitorização dos valores de pH, ácido acético e TAV nas diferentes fermentações acéticas.

Tentativas	Horas de fermentação (h)	pH	Ácido acético %	TAV (%/100 mL)
2	0	3,29	0,64	8,91
	645	2,97	1,49	0
3	0	3,62	-	9,07
	527	3,10	1,20	-
	866	3,08	5,00	0,00

O produto obtido da dupla fermentação, vinagre de marmelo, não foi filtrado nem pasteurizado e, não possui adição de conservantes (Figura 17). Este foi engarrafado e apresentado à maior indústria vinagreira de Portugal, Mendes Gonçalves S.A., tutora da marca PALADIN (temperos de Portugal), tendo sido alvo de vários elogios, nomeadamente, a originalidade, o aspeto e o aroma. Adicionalmente, este vinagre de marmelo foi sujeito a uma avaliação sensorial por consumidores de vinagre, no entanto os resultados desta análise ainda não estão disponíveis para serem incluídos neste trabalho.



Figura 17. À esquerda “mãe de vinagre” de marmelo e à direita vinagre de marmelo.

3.2 Ferramenta de diagnóstico rápida de campo

Apesar de até à data não existir registo da suscetibilidade do marmeleiro a *Xf* é importante existir ferramentas de diagnóstico rápidas e confiáveis que permitam detetar *Xf* atempadamente, evitando danos, não só para agricultura como para a biodiversidade. Assim, o presente trabalho consistiu no primeiro passo para o desenvolvimento de uma ferramenta de diagnóstico rápida e confiável.

3.2.1 Desenho dos *primers*

O desenho dos *primers* consistiu em delinear *primers* específicos, que promovessem a amplificação das zonas de maior variabilidade. De acordo com a EPPO Bulletin (2019), para identificar as subespécies de *Xf* devem-se utilizar pelo menos dois conjuntos de genes *housekeeping*, como o *rpoD* (Minsavage *et al.*, 1994) e o *malF* (MLST) ou o *cysG* e *malF* (MLST).

A sequenciação de um dos pares de genes descritos anteriormente permite identificar a subespécie de *Xf* detetada na amostra. Esta informação é bastante relevante, uma vez que ao identificar a subespécie é possível determinar a gama de hospedeiros suscetíveis (European Commission, 2019) e, assim, aplicar as respetivas medidas legislativas (Despacho N.º 4/G/2021). Para estudos epidemiológicos, a metodologia de MLST têm grande relevância, uma vez que permitem determinar a diversidade dentro de cada subespécie, através do agrupamento em *Sequence Types* (ST) (Jeger *et al.*, 2018; EPPO Bulletin, 2019).

Apesar de se terem desenhado *primers* através de duas metodologias, teve-se em consideração os que apresentavam um maior *rating* e, de seguida, uma maior zona de amplificação, tendo-se assim optado pelos *primers* desenhados no *LAMP Designer 1.16* por conferir mais zona de amplificação.

Para além dos *primers* desenhados, utilizaram-se também os *primers* previamente descritos na literatura para o gene *ribosome maturation factor* (*rimM*) (Harper, Ward, and Clover, 2010). Os *primers* do gene *rimM* têm vindo a ser utilizados em alguns ensaios (Harper, Ward, and Clover, 2010; Waliullah *et al.*, 2019; Yaseen *et al.*, 2015), sendo por isso escolhidos neste trabalho para funcionarem como uma referência para a reação LAMP.

3.2.2 Condições de reação – LAMP

Os primeiros ensaios realizados visaram testar a amplificação, de acordo com as instruções do fabricante do *kit* da *Lucigen*, nomeadamente, amplificação a 68°C durante 60 minutos. Tendo-se testando, numa primeira etapa, amostras com e sem DNA de *Xf*. No entanto, apenas foi possível observar amplificação do gene *rimM* nas amostras de *Xf* (Figura 18).

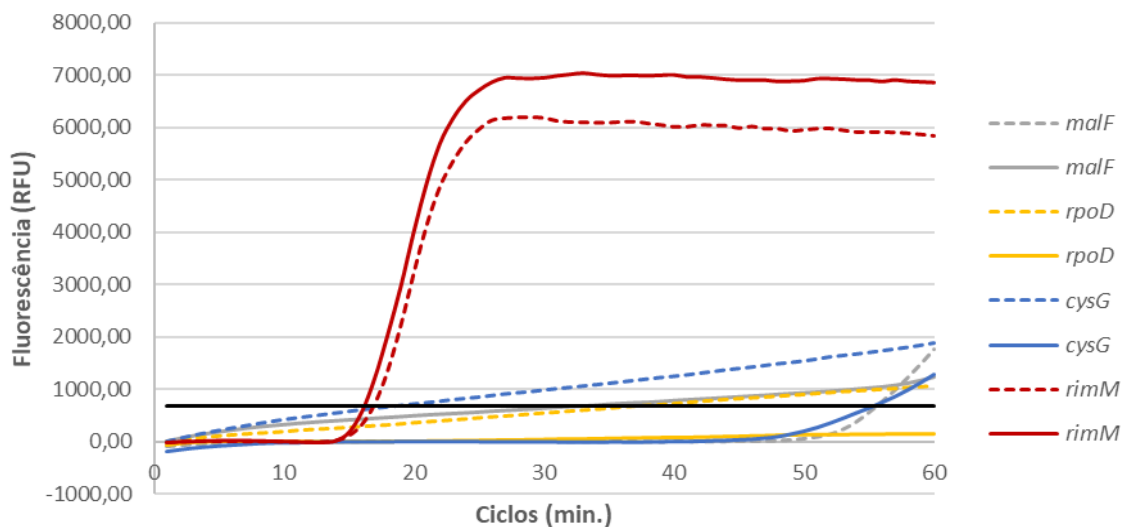


Figura 18. Amplificação por LAMP para amostras de DNA de *Xf* a 68°C durante 60 minutos para os *primers*: *rpoD*, *cysG*, *malF* e *rimM*.

De seguida, de forma a otimizar as condições de reação e melhorar o rendimento da mesma, teve-se em conta a temperatura média dos *primers* (62°C). Testando-se, exclusivamente, para os *primers* *rpoD*, *malF* e *cysG*, novamente, para amostras com e sem DNA de *Xf*. No entanto, também não se conseguiram resultados de amplificação positivos para os *primers* desenhados (Figura 19).

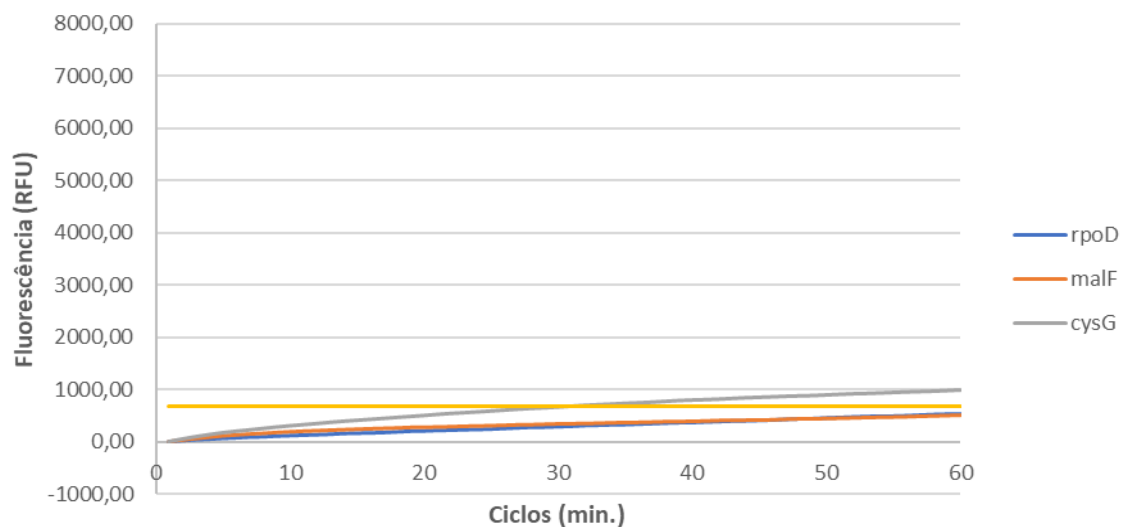


Figura 19. Amplificação por LAMP para amostras de DNA de *Xf* a 62°C durante 60 minutos para os *primers*: *rpoD*, *cysG* e *malF*.

Posteriormente, testou-se a amplificação sob condições padrão, particularmente uma amplificação a 65°C durante 60 minutos. Estas condições foram utilizadas em diferentes estudos, por diferentes autores, tendo sido consideradas as mais adequada a utilizar numa reação LAMP para deteção de *Xf* (Harper, Ward, and Clover, 2010; Waliullah *et al.*, 2019; Yaseen *et al.*, 2015). Desta vez, testaram-se tanto para os extratos positivos, negativos e inconclusivos, como para amostras com e sem DNA de *Xf*.

Contudo, apesar da reação ter sido levada a cabo de acordo com o protocolo experimental descrito por Yaseen e coautores (Yaseen *et al.*, 2015) seriam esperados resultados de amplificação positivos para os extratos. No entanto, esta também não resultou, uma vez que não se obteve amplificação para nenhum dos extratos, assim como para nenhum dos *primers* *rimM* e *malF* (Figura 20). Obtendo-se, tal como esperado, unicamente a amplificação do DNA para o gene *rimM* (Figura 21).

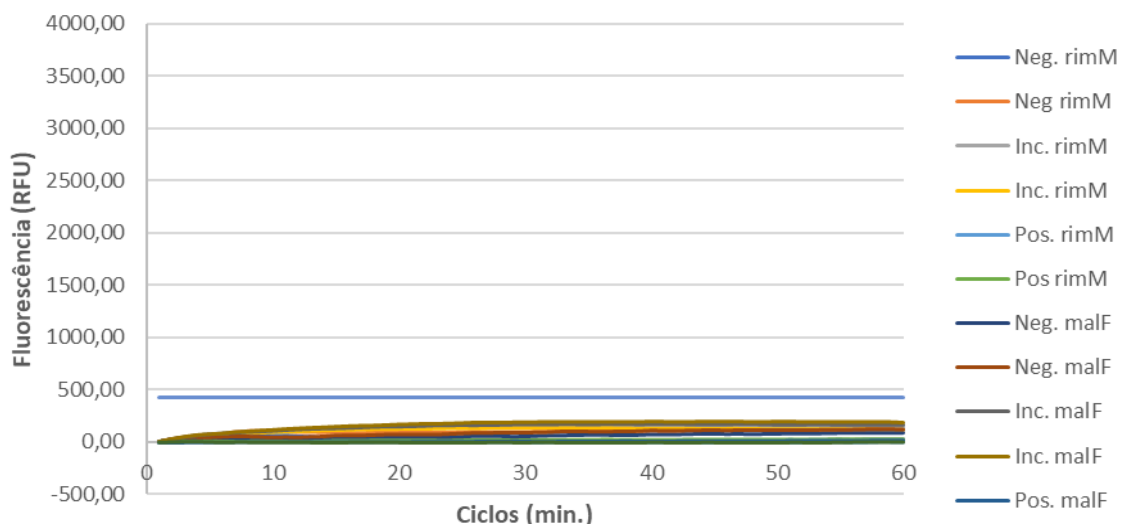


Figura 20. Amplificação por LAMP para amostras de extratos negativos, positivos e inconclusivos de *Xf* a 65°C durante 60 minutos para os *primers malF* e *rimM*.

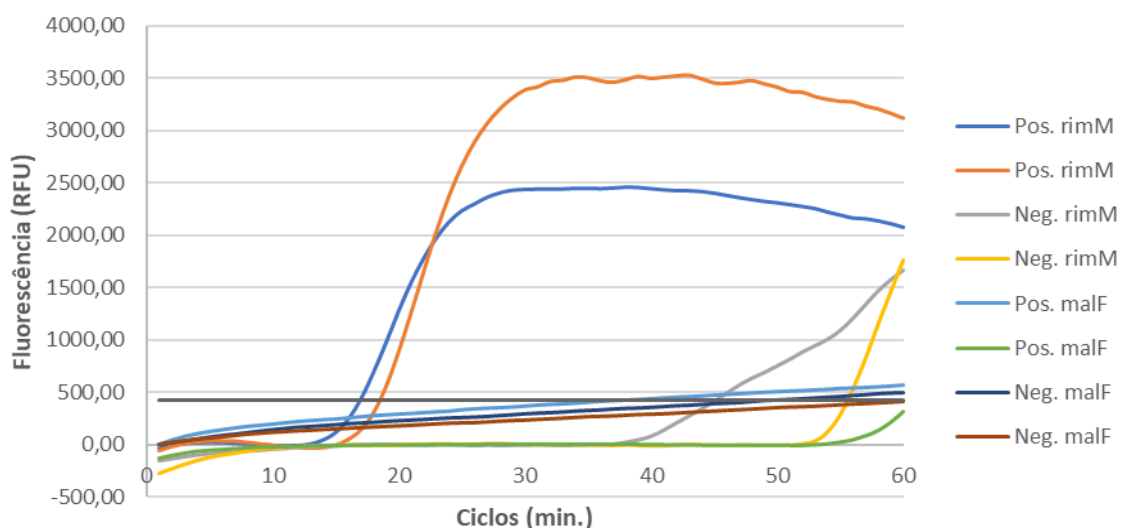


Figura 21. Amplificação por LAMP para amostras com e sem DNA de *Xf* a 65°C durante 60 minutos para os *primers malF* e *rimM*.

3.2.3 Visualização dos produtos de amplificação

Através da análise dos produtos resultantes da reação LAMP a 65°C (Figura 22), é possível observar que foram obtidos resultados de amplificação positivos tanto para o DNA positivo, como para os *primers* do gene *rimM*. Estes resultados indicam que os pares de *primers* utilizados, *rimM* e *malF*, não resultam na detecção de *Xf*.

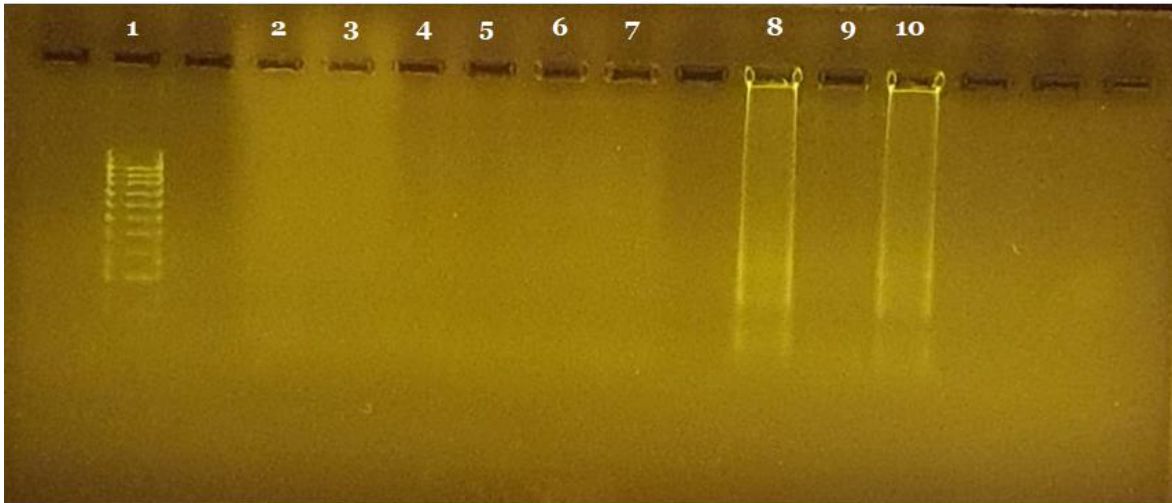


Figura 22. Análise dos produtos da reação de LAMP em gel de agarose 2,5%. 1 – marcador, 2 - extrato negativo *rimM*, 3 – extrato negativo *malF*, 4 – extrato inconclusivo *rimM*, 5 – extrato inconclusivo *malF*, 6 – extrato positivo *rimM*, 7 – extrato positivo *malF*, 8 – DNA positivo *rimM*, 9 – DNA positivo *malF* e 10 – Controlo positivo da reação.

3.2.4 Sequenciação

Uma vez que não foi conseguida a deteção de *Xf* através dos *primers* desenhados nos diferentes ensaios será necessário desenhar novos *primers*, como próxima etapa. Realçando que o desenho dos *primers* é uma etapa crucial, sendo um processo complexo e bastante exigente (Ahuja and Somvanshi, 2020).

Mediante os resultados obtidos não foi possível proceder à sequenciação, através do *MinION MK1C*. No entanto, apesar de se ter obtido amplificação para o gene *rimM*, não é economicamente viável sequenciar um único gene quando o mesmo não confere muita informação para identificar a subespécie.

Todavia, apesar de não se ter realizado a sequenciação como se pretendia foi possível ter contacto com a técnica de terceira geração de sequenciação, através de uma colaboração com a Unidade Local de Saúde de Castelo Branco pela sequenciação por *MinION MK1C* do vírus SARS-CoV-2, através do protocolo “nCoV-2019 sequencing protocol (single sample)” (Tyson *et al.*, 2020; Freed *et al.*, 2020).

Capítulo 4

4. Conclusões e Perspetivas Futuras

O presente trabalho visou avaliar os parâmetros de qualidade, assim como caracterizar nutricionalmente as cultivares de *Cydonia oblonga* existentes na região da Beira Interior. Para o efeito, comparou-se amostras recolhidas em diversas datas e provenientes de locais distintos, com tipos de produção igualmente diferentes. Salienta-se que este é o primeiro trabalho que descreve detalhadamente a composição nutricional para diferentes cultivares, contribuindo assim para a inventariação e alargamento do conhecimento no que diz respeito à caracterização deste fruto.

Em relação aos parâmetros de qualidade, a cultivar Gigante de Vranja foi aquela que apresentou maior peso e calibre, proporcionando um maior retorno económico para o produtor. Por outro lado, a Galega apesar de apresentar o menor peso, expressa um elevado teor de amarelo na sua epiderme, tendo assim maior aceitação por parte do consumidor, como também contém menor dureza evidenciando as suas características organoléticas.

Os estudos de caracterização do valor nutricional das cultivares demonstraram que os hidratos de carbono foram os macronutrientes em maior abundância, seguidos ao teor de água. Além disso, os marmelos apresentaram teores reduzidos de gordura e um baixo poder calórico. Quanto aos compostos responsáveis pela doçura, o marmelo apresentou três açúcares livres, nomeadamente a frutose (o açúcar mais abundante), glucose e sacarose. Também foi possível quantificar os minerais presentes, sendo maioritariamente compostos por potássio, fósforo, cálcio e magnésio. Com particular destaque para a cultivar Galega, uma vez que foi a cultivar que apresentou maior quantidade de proteínas, fibras e valor energético, assim como maior concentração de açúcares.

Os resultados obtidos demonstram que tanto a data de colheita como a respetiva localização têm influência tanto a nível nutricional como a nível de qualidade. Uma vez que estas variáveis variam consoante as cultivares, assim como por fatores edafoclimáticos, práticas culturais e com a qualidade do solo.

Com o intuito de valorizar o marmelo foi desenvolvido um produto de dupla fermentação, o vinagre de marmelo. Salienta-se que todas as fermentações alcólicas foram bem sucedidas, indicando que o *kit* de leveduras utilizado foi adequado para o processo. No que diz respeito à fermentação acética foi igualmente bem sucedida, visto que se obteve um produto que cumpre com os requisitos estabelecidos no Decreto-Lei que regula o produto.

No futuro, poderá ser estudada a influência da maturação do fruto nas diferentes cultivares de forma a compreender qual a data ótima de colheita, bem como, realizar estudos mais detalhados de fertilização, por forma a obter frutos com a quantidade ideal de nutrientes. Ou seja, auxiliar os produtores no processo de produção, por forma a garantir não só um maior rendimento como maior qualidade. A nível nutricional pretende-se dar continuidade à análise do perfil vitamínico no marmelo.

Com o intuito de preservar a cultura de marmelo e prevenir perdas por *Xf*, o presente trabalho foi o primeiro passo para o desenvolvimento de uma ferramenta de deteção em tempo real, simples, precisa e sensível, com aplicabilidade em contexto real, consistindo em acoplar o LAMP a uma tecnologia de sequenciação através do *MinION MK1C*.

Apesar dos resultados obtidos não serem os ambicionados, pretende-se dar continuidade a este estudo, desenhando-se novos *primers* e verificar se os mesmos apresentam sensibilidade à deteção de *Xf*.

Numa visão para o futuro, pretende-se que esta ferramenta de diagnóstico molecular após otimizada seja aplicada em campo e deste modo quando um técnico agrónomo suspeitar da presença de *Xf*, consiga detetar e identificar rapidamente. Esta ferramenta permitirá reduzir o tempo de diagnóstico de semana para horas evitando a disseminação do patógeno no ecossistema.

Bibliografia

Bibliografia

Aglietti, C., Luchi, N., Pepori, A. L., Bartolini, P., Pecori, F., Raio, A., Santini, A. (2019). Real-time loop-mediated isothermal amplification: an early-warning tool for quarantine plant pathogen detection. *AMB Express*, 9 (1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0774-9>.

AGROTEC. (2020). Medidas preventivas para as doenças que afetam as pomóideas. Acedido 28 de dezembro de 2020. Disponível em <http://www.agrotec.pt/noticias/medidas-preventivas-para-as-doencas-que-afetam-as-pomoideas/>.

Ahmad, M. S., Siddiqui, M. W. (2015). *Postharvest quality assurance of fruits*. Cham: Springer.

Ahuja, A., Somvanshi, V. S. (2020). Diagnosis of plant-parasitic nematodes using loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a review. *Crop Protection*, 105459. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105459>.

Alekseenko, A., Barrett, D., Pareja-Sanchez, Y., Howard, R. J., Strandback, E., Ampah-Korsah, H., Pelechano, V. (2021). Direct detection of SARS-CoV-2 using non-commercial RT-LAMP reagents on heat-inactivated samples. *Scientific Reports*, 11 (1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80352-8>.

Almeida, R. P., Coletta-Filho, H. D., Lopes, J. R. (2014). *Xylella fastidiosa*. *Manual of Security Sensitive Microbes and Toxins*, 841-850.

Ashraf, M. U., Muhammad, G., Hussain, M. A., Bukhari, S. N.A. (2016). *Cydonia oblonga* M., A Medicinal plant rich in phytonutrients for pharmaceuticals. *Frontiers in pharmacology*, 7, 163. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00163>.

Associação Portuguesa de Nutrição. (2017). Colher saber. E-book nº 45.

Augustine, R., Hasan, A., Das, S., Ahmed, R., Mori, Y., Notomi, T., S Thakor, A. (2020). Loop-mediated isothermal amplification (Lamp): A rapid, sensitive, specific, and cost-effective point-of-care test for coronaviruses in the context of covid-19 pandemic. *Biology*, 9 (8), 182. <https://doi.org/10.3390/biology9080182>.

Badial, A. B., Sherman, D., Stone, A., Gopakumar, A., Wilson, V., Schneider, W., King, J. (2018). Nanopore sequencing as a surveillance tool for plant pathogens in plant and insect tissues. *Plant disease*, 102(8), 1648-1652. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0488-RE>.

Baldi, P., La Porta, N. (2017). *Xylella fastidiosa*: host range and advance in molecular identification techniques. *Frontiers in Plant Science*, 8, 944. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00944>.

Becherer, L., Borst, N., Bakheit, M., Frischmann, S., Zengerle, R., Von Stetten, F. (2020). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection. *Analytical Methods*, 12 (6), 717-746. <https://doi.org/10.1039/C9AY02246E>.

Bhadra, S., Jiang, Y. S., Kumar, M. R., Johnson, R. F., Hensley, L. E., Ellington, A. D. (2015). Real-time sequence-validated loop-mediated isothermal amplification assays for detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). *PLOS ONE*, 10 (4), e0123126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123126>.

Branton, D., Deamer, D. W., Marziali, A., Bayley, H., Benner, S. A., Butler, T. (2008). The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol* 26, 1146–1153. <https://doi.org/10.1038/nbt.1495>.

Bruijns, B., Tiggelaar, R., Gardeniers, H. (2018). Massively parallel sequencing techniques for forensics: A review. *Electrophoresis*, 39 (21), 2642-2654. <https://doi.org/10.1002/elps.201800082>.

Bühlmann, A., Pothier, J. F., Rezzonico, F., Smits, T. H., Andreou, M., Boonham, N., Frey, J. E. (2013). *Erwinia amylovora* loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid pathogen detection and on-site diagnosis of fire blight. *Journal of Microbiological Methods*, 92 (3), 332-339. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.12.017>.

Catálogo Nacional de Variedades – Fruteiras. Revisão N.º 1. (2016). Direção Geral de Alimentação e Veterinária.

Chen, Z. D., Kang, H. J., Chai, A. L., Shi, Y. X., Xie, X. W., Li, L., Li, B. J. (2020). Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Pseudomonas syringae* pv. tomato in planta. *European Journal of Plant Pathology*, 156 (3), 739-750. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01923-8>.

Cummings, P. J., Olszewicz, J., Obom, K. M. (2017). Nanopore DNA sequencing for metagenomic soil analysis. *Journal of Visualized Experiments*, 130, e55979. <https://dx.doi.org/10.3791/55979>.

Deamer, D., Akeson, M., & Branton, D. (2016). Three decades of nanopore sequencing. *Nature biotechnology*, 34 (5), 518-524. <https://dx.doi.org/10.1038/nbt.3423>

Decreto-Lei n.º 174/2007. Diário da República n.º 88/2007, Série I de 2007.

Decreto-Lei n.º 37/2013. Diário da República n.º 51/2013, Série I de 2013.

Deng, M. H., Zhong, L. Y., Kamolnetr, O., Limpanont, Y., Lv, Z. Y. (2019). Detection of helminths by loop-mediated isothermal amplification assay: a review of updated technology and future outlook. *Infectious Diseases of Poverty*, 8 (1), 1-22. <https://doi.org/10.1186/s40249-019-0530-z>.

Despacho n.º 12030/2018. Diário da República n.º 25, Série 2 de 2018.

Despacho N.º 4/G/2021. (2021). Atualização da Zona Demarcada para *Xylella fastidiosa*. Direção Geral de Alimentação e Veterinária.

Duan, Y., Ge, C., Zhang, X., Wang, J., Zhou, M. (2014). A rapid detection method for the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Australasian Plant Pathology*, 43 (1), 61-66. <https://doi.org/10.1007/s13313-013-0239-6>.

Eiken, C. (2014). A Guide to LAMP primer designing (PrimerExplorer V5). Manual V1.

Elbeaino, T., Incerti, O., Dakroub, H., Valentini, F., Huang, Q. (2020). Development of an FTP-LAMP assay based on TaqMan real-time PCR and LAMP for the specific detection of *Xylella fastidiosa* De Donno and mulberry strains in both plants and insect vectors. *Journal of Microbiological Methods*, 175, 105992. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105992>.

EPPO Bulletin. (2019). PM 7/24 (4) *Xylella fastidiosa*. *EPPO* 49 (2), 175-227. <https://doi.org/10.1111/epp.12575>.

EPPO. (2020) *Erwinia amylovora*. Fichas técnicas de EPPO sobre pragas recomendadas para regulamentação. Disponível em <https://gd.eppo.int>.

EPPO. (2021) *Xylella fastidiosa*. Fichas técnicas de EPPO sobre pragas recomendadas para regulamentação. Disponível em <https://gd.epp.int>.

European Commission. (2019). Commission database of host plants found to be susceptible to *Xylella fastidiosa* in the Union territory – update 12.

Faino, L., Scala, V., Albanese, A., Modesti, V., Grottoli, A., Pucci, N., Loreti, S. (2019). Nanopore sequencing for the detection and the identification of *Xylella fastidiosa* subspecies and sequence types from naturally infected plant material. *BioRxiv*, 810648. <https://doi.org/10.1101/810648>.

Faniadis, D., Drogoudi, P. D., Vasilakakis, M. (2010). Effects of cultivar, orchard elevation, and storage on fruit quality characters of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Scientia horticulturae*, 125 (3), 301-304. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.04.013>.

FAO. (2017). Acedido 14 de dezembro de 2020. Disponível em <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.

FAO. (2019). Acedido 14 de dezembro de 2020. Disponível em <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>.

Freed, N. E., Vlková, M., Faisal, M. B., Silander, O. K. (2020). Rapid and inexpensive whole-genome sequencing of SARS-CoV-2 using 1200 bp tiled amplicons and Oxford Nanopore Rapid Barcoding. *Biology Methods and Protocols*, 5 (1). <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpaa014>.

Gallas-Lindemann, C., Sotiriadou, I., Plutzer, J., Noack, M. J., Mahmoudi, M. R., Karanis, P. (2016). Giardia and Cryptosporidium spp. dissemination during wastewater treatment and comparative detection via immunofluorescence assay (IFA), nested polymerase chain reaction (nested PCR) and loop mediated isothermal amplification (LAMP). *Acta Tropica*, 158, 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.02.005>.

Gierhart, B. C., Howitt, D. G., Chen, S. J., Zhu, Z., Kotecki, D. E., Smith, R. L., Collins, S. D. (2008). Nanopore with transverse nanoelectrodes for electrical characterization and sequencing of DNA. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 132 (2), 593-600. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2007.11.054>.

- Gironés-Vilaplana, A., Baenas, N., Villaño, D., Moreno, D. A. (2014). Iberian-American fruits rich in bioactive phytochemicals for nutrition and health. *LIMENCOP SL: Alicante, Spain*.
- Godefroid, M., Cruaud, A., Streito, J. C., Rasplus, J. Y., & Rossi, J. P. (2019). *Xylella fastidiosa*: climate suitability of European continent. *Scientific reports*, 9 (1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45365-y>.
- Goldfeder, R. L., Wall, D. P., Khoury, M. J., Ioannidis, J. P., Ashley, E. A. (2017). Human genome sequencing at the population scale: a primer on high-throughput DNA sequencing and analysis. *American journal of epidemiology*, 186 (8), 1000-1009. <https://doi.org/10.1093/aje/kww224>.
- Gould, A. B., Lashomb, J. H. (2007). Bacterial leaf scorch (BLS) of shade trees. *The Plant Health Instructor*.
- Guiné, R. P.F., Almeida, C. F., Correia, P. M., Mendes, M. (2015). Modelling the influence of origin, packing and storage on water activity, colour and texture of almonds, hazelnuts and walnuts using artificial neural networks. *Food and Bioprocess Technology*, 8 (5), 1113-1125. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1474-3>.
- Guiné, R.P.F., Barroca, M. J. (2012). Effect of drying on the physical properties of quince. In *6th Central European congress on Food-CEFood*. <http://hdl.handle.net/10400.19/1101>.
- Guiné, R.P.F., Correia, P., Correia, A. (2015). Avaliação comparativa de queijos Portugueses de cabra e ovelha. *Millenium*, (49), 111-130.
- Hagiwara, M., Sasaki, H., Matsuo, K., Honda, M., Kawase, M., Nakagawa, H. (2007). Loop-mediated isothermal amplification method for detection of human papillomavirus type 6, 11, 16, and 18. *Journal of medical virology*, 79 (5), 605-615. <https://doi.org/10.1002/jmv.20858>.
- Harper, S. J., Ward, L. I., Clover, G. R. G. (2010). Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications. *Phytopathology*, 100 (12), 1282-1288. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-10-0168>.

Heather, J. M., Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107 (1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>.

Hidalgo, C., Vegas, C., Mateo, E., Tesfaye, W., Cerezo, A. B., Callejón, R. M., Torija, M. J. (2010). Effect of barrel design and the inoculation of *Acetobacter pasteurianus* in wine vinegar production. *International journal of food microbiology*, 141 (1-2), 56-62. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.018>.

Hosaka, N., Ndembi, N., Ishizaki, A., Kageyama, S., Numazaki, K., Ichimura, H. (2009). Rapid detection of human immunodeficiency virus type 1 group M by a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *Journal of virological methods*, 157 (2), 195-199. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.01.004>.

Imai, K., Tarumoto, N., Amo, K., Takahashi, M., Sakamoto, N., Kosaka, A., Maeda, T. (2018). Non-invasive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by the direct boil loop-mediated isothermal amplification method and MinION™ nanopore sequencing. *Parasitology international*, 67 (1), 34-37. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.03.001>.

Imai, K., Tarumoto, N., Misawa, K., Runtuwene, L. R., Sakai, J., Hayashida, K., Maeda, T. (2017). A novel diagnostic method for malaria using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and MinION™ nanopore sequencer. *BMC infectious diseases*, 17 (1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2718-9>.

Imai, K., Tarumoto, N., Runtuwene, L. R., Sakai, J., Hayashida, K., Eshita, Y., Maeda, T. (2018). An innovative diagnostic technology for the codon mutation C580Y in kelch13 of *Plasmodium falciparum* with MinION nanopore sequencer. *Malaria journal*, 17 (1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2362-x>.

INE. (2019). Estatísticas Agrícolas 2018. ISSN 0079-4139.

INE. (2020). Acedido 14 de dezembro de 2020. Disponível em https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000019&contexto=bd&selTab=tab2.

Janse, J. D., Obradovic, A. (2010). *Xylella fastidiosa*: its biology, diagnosis, control and risks. *Journal of Plant Pathology*, S35-S48.

Jeger, M., Caffier, D., Candresse, T., Chatzivassiliou, E., Dehnen-Schmutz, K., Gilioli, G., Bragard, C. (2018). Updated pest categorization of *Xylella fastidiosa*. *EFSA Journal*, 16 (7), 5357. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5357>.

Joseph, S. (2011). Analysis of water-soluble vitamins from multivitamin tablets for nutrition labeling. *Agilent Application Solution*.

Karami, A., Gill, P., Motamedi, M. H. K., Saghafinia, M. (2011). A review of the current isothermal amplification techniques: applications, advantages and disadvantages. *J Global Infect Dis*, 3(3), 293-302.

King, K. M., Hawkins, N. J., Atkins, S., Dyer, P. S., West, J. S., Fraaije, B. A. (2019). First application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid identification of mating type in the heterothallic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses*, 62 (9), 812-817. <https://doi.org/10.1111/myc.12959>.

Koshita, Y. (2015). Effect of temperature on fruit color development. *Abiotic Stress Biology in Horticultural Plants*, 47- 58.

Lamb, H. J., Hayes, B. J., Nguyen, L. T., Ross, E. M. (2020). The Future of Livestock Management: A Review of Real-Time Portable Sequencing Applied to Livestock. *Genes*, 11 (12), 1478. <https://doi.org/10.3390/genes11121478>.

Leggett, R. M., Clark, M. D. (2017). A world of opportunities with nanopore sequencing. *Journal of Experimental Botany*, 68 (20), 5419-5429. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx289>.

Legua, P., Serrano, M., Melgarejo, P., Valero, D., Martínez, J. J., Martínez, R., Hernández, F. (2013). Quality parameters, biocompounds and antioxidant activity in fruits of nine quince (*Cydonia oblonga* Miller) accessions. *Scientia Horticulturae*, 154, 61-65. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.02.017>.

Lucena, J. J. (2000). Effects of bicarbonate, nitrate and other environmental factors on iron deficiency chlorosis. A review. *Journal of Plant Nutrition*, 23(11-12), 1591-1606. <https://doi.org/10.1080/01904160009382126>.

Manual de boas práticas para o controlo do fogo bacteriano (*Erwinia amylovora*). (2011). Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural.

Mas, A., Torija, M. J., García-Parrilla, M. D. C., Troncoso, A. M. (2014). Acetic acid bacteria and the production and quality of wine vinegar. *The Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/394671>.

Milivojević, J., Maksimović, V., Nikolić, M., Bogdanović, J., Maletić, R., & Milatović, D. (2011). Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild *Fragaria* and *Rubus* berries. *Journal of food quality*, 34 (1), 1-9. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2010.00360.x>.

Milivojević, J., Maksimović, V., Nikolić, M., Bogdanović, J., Maletić, R., Milatović, D. (2011). Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild *Fragaria* and *Rubus* berries. *Journal of food quality*, 34 (1), 1-9.

Minsavage, G. V., Thompson, C. M., Hopkins, D. L., Leite, R. M. V. B. C., Stall, R. E. (1994). Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* 84, 45, 6–461.

Mir, S. A., Wani, S. M., Wani, T. A., Ahmad, M., Gani, A., Masoodi, F. A., Nazir, A. (2016). Comparative evaluation of the proximate composition and antioxidant properties of processed products of quince (*Cydonia oblonga* Miller). *International Food Research Journal*, 23 (2), 816-821.

Musacchi, S., Serra, S. (2018). Apple fruit quality: Overview on pre-harvest factors. *Scientia Horticulturae*, 234, 409-430. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.057>.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 28 (12), e63-e63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>.

Nunney, L., Elfekih, S., Stouthamer, R. (2012). The importance of multilocus sequence typing: cautionary tales from the bacterium *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology*, 102 (5), 456-460. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-11-0298>.

Obande, G. A., Singh, K. K. B. (2020). Current and future perspectives on isothermal nucleic acid amplification technologies for diagnosing infections. *Infection and drug resistance*, 13, 455. <https://dx.doi.org/10.2147%2FIDR.S217571>.

Ofício circular N.º 2/2019. (2019). Primeira deteção de *Xylella fastidiosa* em Portugal. Direção Geral de Alimentação e Veterinária.

Oxford Nanopore Technologies. (2021). Acedido 23 de março de 2021. Disponível em <https://nanoporetech.com/products>.

Paltrinieri, G. (2014). Handling of fresh fruits, vegetables and root crops: A training manual for grenada. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.

Panno, S., Matic, S., Tiberini, A., Caruso, A. G., Bella, P., Torta, L., Davino, S. (2020). Loop mediated isothermal amplification: principles and applications in plant virology. *Plants*, 9 (4), 461. <https://doi.org/10.3390/plants9040461>.

Parida, M., Horioko, K., Ishida, H., Dash, P. K., Saxena, P., Jana, A. M., Morita, K. (2005). Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *Journal of clinical microbiology*, 43 (6), 2895-2903. <https://dx.doi.org/10.1128%2FJCM.43.6.2895-2903.2005>.

Pestana M., Correia, P. J. (2019). O ferro: novos desafios para uma produção agrícola sustentável. *Voz do Campo*.

Portaria n.º 243/2020. Diário da República n.º 200/2020, Série I de 2020.

Pumford, E. A., Lu, J., Spaczai, I., Prasetyo, M. E., Zheng, E. M., Zhang, H., Kamei, D. T. (2020). Developments in integrating nucleic acid isothermal amplification and detection systems for point-of-care diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics*, 170, 112674. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112674>.

Rahimi, S., Talebi, M., Baninasab, B., Gholami, M., Zarei, M., Shariatmadari, H. (2020). The role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in improving iron acquisition by altering physiological and molecular responses in quince seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 406-415. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.07.045>.

Rapicavoli, J., Ingel, B., Blanco-Ulate, B., Cantu, D., Roper, C. (2018). *Xylella fastidiosa*: an examination of a re-emerging plant pathogen. *Molecular plant pathology*, 19 (4), 786-800. <https://doi.org/10.1111/mpp.12585>.

Regato, M. D., Guerreiro, I. M., Regato, J. M. (2017). A cultura do marmeleiro no Alentejo. *Voz do Campo*. N.º 203.

Rockweiler, T. (2018). Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) – Primer Design and Assay Optimization. *Lucigen*.

Rodríguez-Guisado, I., Hernández, F., Melgarejo, P., Legua, P., Martínez, R., Martínez, J. J. (2009). Chemical, morphological and organoleptically characterization of five Spanish quince tree clones (*Cydonia oblonga* Miller). *Scientia Horticulturae*, 122(3), 491-496. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.06.004>.

Ruiz, C., Nadal, A., Foix, L., Montesinos, L., Montesinos, E., Pla, M. (2018). Diversity of plant defense elicitor peptides within the Rosaceae. *BMC Genetics*, 19 (1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0593-4>.

Sabir, S., Qureshi, R., Arshad, M., Amjad, M. S., Fatima, S., Masood, M., Chaudhari, S. K. (2015). Pharmacognostic and clinical aspects of *Cydonia oblonga*: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5 (11), 850-855. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60934-3](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60934-3).

Sánchez, C., Santos, M. J. (2011). Influência da data de colheita na qualidade da pera rocha. *Agrorrural – Contributos Científicos*, 725-735.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74 (12), 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.

Schneider, K., Van der Werf, W., Cendoya, M., Mourits, M., Navas-Cortés, J. A., Vicent, A., Lansink, A. O. (2020). Impact of *Xylella fastidiosa* subspecies pauca in European olives. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117 (17), 9250-9259. <https://doi.org/10.1073/pnas.1912206117>.

Seah, A., Lim, M. C., McAloose, D., Prost, S., Seimon, T. A. (2020). MinION-based DNA barcoding of preserved and non-invasively collected wildlife samples. *Genes*, 11 (4), 445. <https://doi.org/10.3390/genes11040445>.

Serralves. (2020). Flora no parque - ficha técnica *Cydonia oblonga* Mill. Acedido 8 de janeiro de 2021. Disponível em <http://sig.serralves.pt/pt/flora/detalhe.php?id=971>.

Silva, B. M., Andrade, P. B., Martins, R. C., Seabra, R. M., Ferreira, M. A. (2006). Principal component analysis as tool of characterization of quince (*Cydonia oblonga* Miller) jam. *Food Chemistry*, 94 (4), 504-512. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.11.045>.

Silva, B. M., Andrade, P. B., Martins, R. C., Valentão, P., Ferreres, F., Seabra, R. M., Ferreira, M. A. (2005). Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit characterization using principal component analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (1), 111-122. <http://doi.org/10.1021/jf040321k>.

Slatko, B. E., Gardner, A. F., Ausubel, F. M. (2018). Overview of next-generation sequencing technologies. *Current protocols in molecular biology*, 122 (1), e59. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>.

Sutton, M. A., Burton, A. S., Zaikova, E., Sutton, R. E., Brinckerhoff, W. B., Bevilacqua, J. G., Johnson, S. S. (2019). Radiation tolerance of Nanopore sequencing technology for life detection on Mars and Europa. *Scientific reports*, 9 (1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41488-4>.

Tabatabaei, M. S., Islam, R., Ahmed, M. (2021). Applications of gold nanoparticles in ELISA, PCR, and immuno-PCR assays: A review. *Analytica Chimica Acta*, 1143, 250-266. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.08.030>.

Tabela da Composição de Alimentos. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I. P.- INSA. v 4.0 - 2019.

Tesfaye, W., Morales, M. L., Garcia-Parrilla, M. C., Troncoso, A. M. (2002). Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in food science & technology*, 13 (1), 12-21. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00023-7).

Tian, Q., Lu, C., Wang, S., Xiong, Q., Zhang, H., Wang, Y., Zheng, X. (2017). Rapid diagnosis of soybean anthracnose caused by *Colletotrichum truncatum* using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *European Journal of Plant Pathology*, 148 (4), 785-793. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1132-2>.

Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., Notomi, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature protocols*, 3 (5), 877-882. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57>.

Tyson, J. R., James, P., Stoddart, D., Sparks, N., Wickenhagen, A., Hall, G., Choi, J. H., Lapointe, H., Kamelian, K., Smith, A. D., Quick, J. (2020). Improvements to the ARTIC multiplex PCR method for SARS-CoV-2 genome sequencing using nanopore. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.09.04.283077>.

Valipour, M., Baninasab, B., Khoshgoftarmanesh, A. H., Gholami, M. (2020). Oxidative stress and antioxidant responses to direct and bicarbonate-induced iron deficiency in two quince rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 261, 108933. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108933>.

Veloso, A., Sousa, R., Sempiterno, C. (2020). Mineral composition of the fruits of five quince cultivars in the Portuguese region of Alcobaça. *Revista de Ciências Agrárias (Portugal)*, 43 (2), 220-230. <http://dx.doi.org/10.19084/rca.20025>.

Viveiros e Centro de Jardinagem. Acedido 6 de fevereiro de 2021. Disponível em <https://www.planfor.pt/comprar,marmeleiro,0089,PO>.

Waliullah, S., Hudson, O., Oliver, J. E., Brannen, P. M., Ji, P., Ali, M. E. (2019). Comparative analysis of different molecular and serological methods for detection of *Xylella fastidiosa* in blueberry. *PLOS ONE*, 14 (9), e0221903. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221903>.

Wang, J., Moore, N. E., Deng, Y. M., Eccles, D. A., & Hall, R. J. (2015). MinION nanopore sequencing of an influenza genome. *Frontiers in microbiology*, 6, 766. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00766>.

Wang, X-R., Wu, L. F., Wang, Y., Ma, Y. Y., Chen, F. H., & Ou, H. L. (2015). Rapid detection of *Staphylococcus aureus* by loop-mediated isothermal amplification. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175 (2), 882-891. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1328-x>.

Wasfi, A., Awwad, F., Ayesh, A. I. (2018). Graphene-based nanopore approaches for DNA sequencing: A literature review. *Biosensors and Bioelectronics*, 119, 191-203. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.07.072>.

Wells, J. M., Raju, B. C., Hung, H., Weisburg, W. G., Mandelco-Paul, L., Brenner, D. J. (1987). *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov.: Gram-Negative, Xylem-Limited, Fastidious Plant Bacteria Related to *Xanthomonas* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37 (2), 136-143. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-2-136>.

Wong, Y. P., Othman S., Lau, Y. L., Radu, S., Chee, H. Y. (2018). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 124 (3), 626-643. <https://doi.org/10.1111/jam.13647>

Yamagishi, J., Runtuwene, L. R., Hayashida, K., Mongan, A. E., Thi, L. A. N., Thuy, L. N., Suzuki, Y. (2017). Serotyping dengue virus with isothermal amplification and a portable sequencer. *Scientific Reports*, 7 (1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03734-5>.

Yang, Q., Domesle, K. J., Ge, B. (2018). Loop-mediated isothermal amplification for *Salmonella* detection in food and feed: current applications and future directions. *Foodborne pathogens and disease*, 15 (6), 309-331. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2445>.

Yaseen, T., Drago, S., Valentini, F., Elbeaino, T., Stampone, G., Digiario, M., D'Onghia, A. M. (2015). On-site detection of *Xylella fastidiosa* in host plants and in “spy insects” using the real-time loop-mediated isothermal amplification method. *Phytopathologia Mediterranea*, 54 (3), 488-496. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-15250.

Zhang, M., Wang, Z., Mao, Y., Hu, Y., Yang, L., Wang, Y., Zhang, L., Shen, X. (2019). Effects of quince pollen pollination on fruit qualities and phenolic substance contents of apples. *Scientia Horticulturae*, 256, 108628. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108628>.

Zhang, Y., Seeram, N. P., Lee, R., Feng, L., Heber, D. (2008). Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56 (3), 670-675. <http://doi.org/10.1021/jf071989c>.

Anexos

Anexo I – Correlação dos parâmetros de qualidade das cultivares

	Peso (g)	Calibre (mm)	L*	a*	b*	SST (°Brix)	Acidez total (g ácido málico/L)	Dureza (N)	Elasticidade (%)	Resiliência (adimensional)	Coesividade (adimensional)	Mastigabilidade (N)
Peso (g)	1,00											
Calibre (mm)	0,91**	1,00										
L*	0,00	-0,01	1,00									
a*	-0,17**	-0,12*	0,77**	1,00								
b*	-0,11*	-0,17**	0,25**	0,28**	1,00							
SST (°Brix)	-0,56**	-0,58**	-0,06	0,14**	0,45**	1,00						
Acidez total (g ácido málico/L)	-0,22*	-0,19	0,29**	0,13	-0,16	0,00	1,00					
Dureza (N)	0,25**	0,22**	0,10*	0,21**	-,12*	-0,26**	0,26*	1,00				
Elasticidade (%)	0,23**	0,21**	0,11*	0,06	0,00	-0,26**	-0,02	0,32**	1,00			
Resiliência (adimensional)	0,31**	0,30**	0,26**	0,12*	-0,08	-0,44**	0,04	0,45**	0,41**	1,00		
Coesividade (adimensional)	0,19**	0,15**	0,08	0,02	0,04	-0,18**	-0,02	0,17**	0,88**	0,17**	1,00	
Mastigabilidade (N)	0,29**	0,26**	0,13*	0,18**	-0,08	-0,31**	0,15	0,89**	0,70**	0,48**	0,60**	1,00

** A correlação é significativa no nível 0,01

* A correlação é significativa no nível 0,05

Anexo II – Análise *t-student* dos parâmetros de qualidade da Portugal – local de produção

	Local	Nº de frutos	Média¹ ± SD	p-value
Peso (g)	Ferro	100	266,39 ± 31,15	0,000
	Orjais	100	210,85 ± 48,78	
Calibre (mm)	Ferro	100	76,80 ± 3,97	0,000
	Orjais	100	71,32 ± 5,56	
L*	Ferro	100	74,96 ± 4,82	0,137
	Orjais	100	75,82 ± 3,22	
a*	Ferro	100	-13,93 ± 4,09	0,000
	Orjais	100	-10,27 ± 2,92	
b*	Ferro	100	54,37 ± 1,50	0,000
	Orjais	100	52,70 ± 1,66	
SST (°Brix)	Ferro	100	15,35 ± 0,92	0,000
	Orjais	99	16,59 ± 0,82	
Acidez total (g ácido málico/L)	Ferro	20	10,49 ± 0,94	0,000
	Orjais	20	14,19 ± 2,05	
Dureza (N)	Ferro	100	37,06 ± 6,02	0,000
	Orjais	99	41,94 ± 7,13	
Elasticidade (%)	Ferro	100	87,94 ± 2,48	0,037
	Orjais	99	87,04 ± 3,46	
Resiliência (adimensional)	Ferro	100	0,70 ± 0,02	0,017
	Orjais	99	0,68 ± 0,06	
Coesividade (adimensional)	Ferro	100	0,88 ± 0,04	0,001
	Orjais	99	0,86 ± 0,07	
Mastigabilidade (N)	Ferro	100	28,96 ± 5,77	0,005
	Orjais	99	31,55 ± 7,01	

Anexo III – Análise *t-student* dos parâmetros de qualidade da Gigante de Vranja – data de colheita

	Data	Nº de frutos	Média¹ ± SD	p-value
Peso (g)	24 de setembro	100	257,14 ± 29,32	0,000
	06 de outubro	100	277,75 ± 47,44	
Calibre (mm)	24 de setembro	100	74,95 ± 3,32	0,000
	06 de outubro	100	80,60 ± 4,60	
L*	24 de setembro	100	69,80 ± 2,44	0,000
	06 de outubro	100	74,11 ± 2,58	
a*	24 de setembro	100	-15,98 ± 1,47	0,000
	06 de outubro	100	-11,64 ± 1,84	
b*	24 de setembro	100	47,60 ± 1,35	0,000
	06 de outubro	100	51,27 ± 2,01	
SST (°Brix)	24 de setembro	100	12,57 ± 0,54	0,009
	06 de outubro	100	12,77 ± 0,54	
Acidez total (g ácido málico/L)	24 de setembro	20	7,16 ± 0,81	0,000
	06 de outubro	20	9,35 ± 1,19	
Dureza (N)	24 de setembro	99	38,77 ± 4,84	0,000
	06 de outubro	99	42,94 ± 6,95	
Elasticidade (%)	24 de setembro	99	86,45 ± 2,82	0,000
	06 de outubro	99	90,13 ± 3,47	
Resiliência (adimensional)	24 de setembro	99	0,68 ± 0,02	0,000
	06 de outubro	99	0,71 ± 0,03	
Coesividade (adimensional)	24 de setembro	99	0,88 ± 0,06	0,004
	06 de outubro	99	0,91 ± 0,07	
Mastigabilidade (N)	24 de setembro	99	29,57 ± 5,16	0,000
	06 de outubro	99	35,21 ± 7,09	

Anexo IV – Correlação dos parâmetros dos parâmetros nutricionais das cultivares (exceto os minerais)

	Valor energético (KJ)	Valor energético (kcal)	Hidratos de carbono (g/100g)	Açúcares totais (g/100g)	Glucose (g/100g)	Frutose (g/100g)	Sacarose (g/100g)	Fibra (g/100g)	Proteína (g/ 100g)	Humidade (g /100g)	Cinzas (g/100g)
Valor energético (KJ)	1,00										
Valor energético (kcal)	1,000**	1,00									
Hidratos de carbono (g/100g)	1,00**	1,00**	1,00								
Açúcares totais (g/100g)	0,67**	0,67**	0,68**	1,00							
Glucose (g/100g)	0,67**	0,67**	0,66**	0,90**	1,00						
Frutose (g/100g)	0,72**	0,72**	0,72**	0,90**	0,84**	1,00					
Sacarose (g/100g)	-0,21	-0,22	-0,18	0,09	-0,17	-0,31*	1,00				
Fibra (g/100g)	0,00	0,01	-0,07	-0,07	0,15	0,06	-0,44**	1,00			
Proteína (g/ 100g)	0,40*	0,40*	0,37*	0,14	0,19	0,14	-0,08	0,26	1,00		
Humidade (g /100g)	-1,00**	-1,00**	-1,00**	-0,66**	-0,68**	-0,71**	0,23	-0,07	-0,42**	1,00	
Cinzas (g/100g)	0,13	0,13	0,14	-0,08	-0,01	-0,30	0,37*	-0,20	0,17	-0,14	1,00

** A correlação é significativa no nível 0,01

* A correlação é significativa no nível 0,05

Anexo V – Análise *t-student* dos parâmetros nutricionais da Portugal – local de produção

	Local	Nº de frutos	Média¹ ± SD	p-value
Valor energético (KJ)	Ferro	10	355,95 ± 12,44	0,111
	Orjais	10	342,55 ± 22,04	
Valor energético (kcal)	Ferro	10	84,07 ± 2,92	0,108
	Orjais	10	80,90 ± 5,17	
Hidratos de carbono (g/100g)	Ferro	10	19,13 ± 0,72	0,169
	Orjais	10	18,44 ± 1,36	
Açúcares totais (g/100g)	Ferro	10	8,89 ± 0,65	0,566
	Orjais	10	8,75 ± 0,41	
Glucose (g/100g)	Ferro	10	2,35 ± 0,15	0,551
	Orjais	10	2,40 ± 0,18	
Frutose (g/100g)	Ferro	10	5,54 ± 0,26	0,000
	Orjais	10	4,98 ± 0,21	
Sacarose (g/100g)	Ferro	10	0,99 ± 0,32	0,011
	Orjais	10	1,36 ± 0,26	
Fibra (g/100g)	Ferro	10	2,17 ± 0,15	0,207
	Orjais	10	2,02 ± 0,34	
Proteína (g/100g)	Ferro	10	0,35 ± 0,07	0,535
	Orjais	10	0,33 ± 0,05	
Humidade (g/100g)	Ferro	10	77,82 ± 0,68	0,124
	Orjais	10	78,56 ± 1,28	
Cinzas (g/100g)	Ferro	10	0,33 ± 0,04	0,000
	Orjais	10	0,46 ± 0,06	
Potássio (mg)	Ferro	10	181,64 ± 9,51	0,000
	Orjais	10	227,42 ± 32,56	
Cálcio (mg)	Ferro	10	5,10 ± 0,48	0,000
	Orjais	10	18,15 ± 3,96	
Fósforo (mg)	Ferro	10	15,86 ± 1,55	0,004
	Orjais	10	18,97 ± 2,48	
Magnésio (mg)	Ferro	10	6,76 ± 0,49	0,000
	Orjais	10	10,39 ± 2,33	
Sódio (mg)	Ferro	10	0,45 ± 0,12	0,059
	Orjais	10	0,36 ± 0,07	
Ferro (mg)	Ferro	10	0,13 ± 0,02	0,602
	Orjais	10	0,13 ± 0,03	
Zinco (mg)	Ferro	10	0,19 ± 0,04	0,438
	Orjais	10	0,17 ± 0,04	
Cobre (mg)	Ferro	10	0,08 ± 0,02	0,001
	Orjais	10	0,11 ± 0,02	
Manganês (mg)	Ferro	10	0,02 ± 0,01	0,000
	Orjais	10	0,08 ± 0,03	

Anexo VI – Análise *t-student* dos parâmetros nutricionais da Gigante de Vranja – data de colheita

	Local	Nº de frutos	Média¹ ± SD	p-value
Valor energético (KJ)	24 de setembro	10	287,80 ± 15,35	0,133
	06 de outubro	10	278,09 ± 12,07	
Valor energético (kcal)	24 de setembro	10	68,06 ± 3,56	0,124
	06 de outubro	10	65,75 ± 2,80	
Hidratos de carbono (g/100g)	24 de setembro	10	14,99 ± 1,14	0,379
	06 de outubro	10	14,57 ± 0,93	
Açúcares totais (g/100g)	24 de setembro	10	8,29 ± 0,55	0,002
	06 de outubro	10	7,51 ± 0,38	
Glucose (g/100g)	24 de setembro	10	2,05 ± 0,12	0,049
	06 de outubro	10	1,91 ± 0,18	
Frutose (g/100g)	24 de setembro	10	4,62 ± 0,22	0,377
	06 de outubro	10	4,51 ± 0,29	
Sacarose (g/100g)	24 de setembro	10	1,62 ± 0,41	0,004
	06 de outubro	10	1,09 ± 0,28	
Fibra (g/100g)	24 de setembro	10	2,43 ± 0,70	0,481
	06 de outubro	10	2,22 ± 0,59	
Proteína (g/100g)	24 de setembro	10	0,36 ± 0,03	0,003
	06 de outubro	10	0,31 ± 0,04	
Humidade (g/100g)	24 de setembro	10	81,77 ± 0,66	0,047
	06 de outubro	10	82,36 ± 0,59	
Cinzas (g/100g)	24 de setembro	10	0,25 ± 0,06	0,004
	06 de outubro	10	0,34 ± 0,06	
Potássio (mg)	24 de setembro	10	129,63 ± 15,62	0,250
	06 de outubro	10	120,61 ± 18,20	
Cálcio (mg)	24 de setembro	10	8,81 ± 1,20	0,038
	06 de outubro	10	7,72 ± 0,94	
Fósforo (mg)	24 de setembro	10	14,41 ± 0,87	0,622
	06 de outubro	10	16,22 ± 0,83	
Magnésio (mg)	24 de setembro	10	7,09 ± 0,56	0,023
	06 de outubro	10	6,53 ± 0,44	
Sódio (mg)	24 de setembro	10	0,84 ± 0,38	0,986
	06 de outubro	10	0,84 ± 0,35	
Ferro (mg)	24 de setembro	10	0,16 ± 0,04	0,533
	06 de outubro	10	0,18 ± 0,07	
Zinco (mg)	24 de setembro	10	0,13 ± 0,03	0,883
	06 de outubro	10	0,13 ± 0,02	
Cobre (mg)	24 de setembro	10	0,07 ± 0,01	0,955
	06 de outubro	10	0,07 ± 0,01	
Manganês (mg)	24 de setembro	10	0,03 ± 0,01	0,660
	06 de outubro	10	0,02 ± 0,01	

