

02255

MEU27015

**SILVANA DE PAULA QUINTÃO SCALON**

**QUALIDADE DO MORANGO: EFEITO DO  $\text{CaCl}_2$  SOBRE A PAREDE CELULAR  
E NÍVEIS RESIDUAIS DE BENOMIL**

**Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação  
em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de  
«Doutor »**

**Orientador**

**Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL**

**1996**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da  
Biblioteca Central da UFLA

Scalon, Silvana de Paula Quintão

Qualidade do morango: Efeito do  $\text{CaCl}_2$  sobre a parede celular e  
níveis residuais de benomil / Silvana de Paula Quintão Scalon. --  
Lavras : 105 UFLA, 1997.

105p. : il.

Orientador: Mário Sobral de Abreu.

Tese (Doutorado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Morango - Cálcio. 2. Benomil. 3. Pós-Colheita. 4. Resíduos  
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.758981

# SILVANA DE PAULA QUINTÃO SCALON

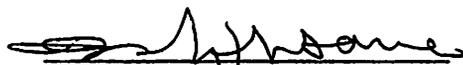
## QUALIDADE DO MORANGO: EFEITO DO $\text{CaCl}_2$ SOBRE A PAREDE CELULAR E NÍVEIS RESIDUAIS DE BENOMIL

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação  
em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de  
«Doutor »

APROVADA EM 18/12/96

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Adimilson Bosco Chitarra  
(Co-Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Renê Luis O. Rigitano

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr.ª Maria Isabel F. Chitarra

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José da Cruz Machado

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu  
(Orientador)

À memória de meu pai

A minha mãe

Aos meus filhos

Letícia e Lourenço

Ao meu marido Homero

**Dedico**

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE QUADROS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Características gerais do morango.....	4
2.2 Aspectos bioquímicos.....	6
2.2.1 Parede celular.....	6
2.2.2 Cálcio.....	13
2.2.3 Enzimas Pectolíticas.....	19
2.2.4 Vitamina C.....	24
2.3 Controle químico de doenças.....	25
2.3.1 Resíduos de Benomil.....	28
3 EFEITO DO CÁLCIO SOBRE O COMPORTAMENTO PÓS-COLHEITA DE MORANGO.....	33
RESUMO.....	34
ABSTRACT.....	35
3.1 INTRODUÇÃO .....	36
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	38
3.2.1 Procedência dos frutos .....	38
3.2.2 Tratamentos .....	38
3.2.3 Delineamento Estatístico .....	39
3.2.4 Análises .....	40
3.2.4.1 Análises químicas e bioquímicas.....	40

3.2.4.2 Compostos de Parede Celular .....	41
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	45
3.3.1 Cálcio .....	45
3.3.2 Solubilização de pectinas.....	49
3.3.3 Atividade da Pectinametilesterase.....	55
3.3.4 Atividade de Poligalacturonase.....	57
3.3.5 Grau de esterificação.....	60
3.3.6 Celulose .....	63
3.3.7 Vitamina C .....	65
3.4 CONCLUSÕES .....	67
4 RESÍDUOS DE BENOMIL EM MORANGO .....	68
RESUMO .....	69
ABSTRACT .....	70
4.1 INTRODUÇÃO .....	71
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	73
4.2.1 Procedência dos frutos .....	73
4.2.2 Obtenção dos tratamentos.....	73
4.2.3 Delineamento Estatístico.....	74
4.2.4 Análise de resíduo de Benomil .....	75
4.2.4.1 Tratamento das vidrarias.....	75
4.2.4.2 Metodologia .....	75
4.2.4.3 Condições cromatográficas.....	78
4.2.4.4 Recuperação do Benomil.....	78
4.2.4.5 Cálculo da concentração.....	79
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
4.4 CONCLUSÕES.....	86
5 CONCLUSÕES GERAIS.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	89
ANEXO.....	103

## LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 Valores médios de celulose (%) obtidos para morangos tratados com 3 níveis de $\text{CaCl}_2$ .....	64
2 Valores médios de Vitamina C (mg/100g) obtidos para morangos tratados com três concentrações de $\text{CaCl}_2$ e 6 dias de armazenamento. ....	66
3 Recuperação de Benomil .....	81
4 Valores médios de resíduo de três concentrações de Benomil aplicados de duas formas obtidos em morangos armazenado por 6 dias.....	83

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1- Esquema de extração de parede celular de morango .....	44
2- Valores médios de Cálcio total (%) de morangos tratados na pré (A) e na pós-colheita (B) com 2 e 4% de $\text{CaCl}_2$ e armazenados durante 6 dias.....	46
3- Valores médios de Cálcio ligado (%) de morangos tratados na pré (A) e na pós-colheita (B) com 2 e 4% de $\text{CaCl}_2$ e armazenados durante 6 dias.....	48
4- Valores médios de Pectina total (mg/100g) de morangos tratados na pré (A) e na pós-colheita (B) com 2 e 4% de $\text{CaCl}_2$ e armazenados durante 6 dias.....	50
5- Valores médios de Pectina solúvel (mg/100g) de morangos tratados na pré (A) e na pós-colheita (B) com 2 e 4% de $\text{CaCl}_2$ e armazenados durante 6 dias.....	52
6- Valores médios de Solubilização de pectinas (%) de morangos tratados na pré (A) e na pós-colheita (B) com 2 e 4% de $\text{CaCl}_2$ e armazenados durante 6 dias.....	54
7- Valores médios de Atividade de Pectinametilesterase (U/100g) de morangos tratados na pré (A) e na pós-colheita (B) com 2 e 4% de $\text{CaCl}_2$ e armazenados durante 6 dias.....	56
8- Valores médios de Atividade de Poligalacturonase (U/100g) de morangos tratados na pré (A) e na pós-colheita (B) com 2 e 4% de $\text{CaCl}_2$ e armazenados durante 6 dias.....	58
9- Valores médios de Grau de esterificação (%) de morangos tratados na pré (A) e na pós-colheita (B) com 2 e 4% de $\text{CaCl}_2$ e armazenados durante 6 dias.....	61
10- Esquema de extração e <i>cleanup</i> de resíduo de Benomil para quantificação em HPLC.....	77

## LISTA DE QUADROS

Quadro	Página
1- Análise de variância para pectina total, pectina solúvel, solubilização de pectinas, atividade de Poligalacturonase e Pectinametilesterase de morangos.....	104
2- Análise de variância para grau de esterificação, cálcio total e ligado, celulose e Vitamina C de morangos.....	104
3- Análise de Variância de resíduo de Benomil em morango.....	105

## RESUMO

SCALON, Silvana de Paula Quintão. **Qualidade do morango:** Efeito do  $\text{CaCl}_2$  sobre a parede celular e níveis residuais de benomil. Lavras: UFLA, 1996. p.105 (Tese - Doutorado em Ciência dos Alimentos )\*

O desenvolvimento de tecnologias adequadas de cultivo e armazenamento de morango poderá estender sua vida útil, fornecendo ao consumidor um produto de boa qualidade organoléptica e toxicológica. Morangos tratados pré-colheita e pós-colheita com  $\text{CaCl}_2$  (0, 2 e 4%) e Benomil (0, 600 e 1200 ppm) foram analisados quanto ao teor de pectina total e solúvel, solubilização de pectinas, grau de esterificação, porcentagem de cálcio total e ligado à parede celular, atividade das enzimas poligalacturonase e pectinametilsterase, conteúdo de celulose e vitamina C, e resíduo de Benomil durante o armazenamento refrigerado sob atmosfera modificada por 6 dias. Os morangos tratados com 2% de  $\text{CaCl}_2$  pré-colheita, 600 ou 1200 ppm de Benomil, encontravam-se ao final do armazenamento em melhores condições químicas para consumo e comercialização e com níveis residuais dentro do limite de tolerância estabelecido pela legislação.

---

\* Orientador: Mário Sobral de Abreu. Membros da Banca: Adimilson Bosco Chitarra, Maria Isabel Fernandes Chitarra, Renê Luis Oliveira Rigitano, José da Cruz Machado.

## **ABSTRACT**

### **QUALITY OF STRAWBERRY: EFFECT OF CaCl<sub>2</sub> ON CELL WALL AND RESIDUE OF BENOMYL .**

Development of a suitable technology of cultivation and storage permits prolonged shelf-life of strawberry, offering for consumer a product of organoleptic and toxicological quality. Strawberries before and after harvesting treated with CaCl<sub>2</sub> (0, 2 and 4%) and Benomyl (0, 600 and 1200 ppm) were analysed for total and soluble pectin, pectin solubilization, degree of esterification, total and bound calcium in cell wall, polygalacturonase and pectinmethylesterase activities, cellulose, vitamin C and residue of Benomyl during 6 days in refrigerated storage under modified atmosphere. Strawberries treated with 2% CaCl<sub>2</sub> before harvesting and 600 or 1200 ppm Benomyl presented the optimum chemical conditions for consumer and commercialization and level of residues within the RML recommended by legislation at the end of its storage.

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura do morangueiro iniciou-se no século XIX apresentando nos últimos anos, evolução considerável em todo o mundo. No Brasil, a partir da década de 60, a introdução de cultivares mais adaptadas e de novas técnicas de cultivo, bem como a maior oferta de mudas com sanidade controlada, contribuíram para o maior desenvolvimento da cultura.

O sabor morango, natural ou sintético, é o preferido, quando em comparação ao de muitas outras frutas, fazendo com que o fruto seja bastante consumido, tanto *in natura*, como em uma grande variedade de produtos com ele formulados.

Apesar das excelentes características organolépticas, o morango é um fruto altamente perecível, apresentando alta taxa respiratória e limitada vida pós-colheita, e devido aos altos teores de umidade, açúcares e ácidos ele se torna um substrato ideal à proliferação de organismos patogênicos que causam consideráveis danos durante o transporte, amadurecimento, pós-colheita e armazenamento à temperatura ambiente.

Assim, a comercialização e disponibilidade de morangos é restrita devido à rápida deterioração dos frutos causada pela senescência e doenças pós-colheita, acarretando perdas consideráveis tanto nutricionais quanto econômicas. Várias tecnologias vêm sendo pesquisadas e desenvolvidas para minimizar e prevenir estas perdas pós-colheita, garantir a manutenção da qualidade e prolongar a vida útil de morangos, dentre elas a colheita nos estádios iniciais de

maturação, o controle da atmosfera e da temperatura de armazenamento, a irradiação gama, o controle biológico e as práticas culturais.

A modificação da atmosfera associada a baixas temperaturas de armazenamento, tem sido considerada uma técnica promissora e de baixo custo para prolongar a vida útil de frutos e hortaliças, minimizando as perdas de qualidade e de peso, e a degradação por microrganismos.

Um dos fatores mais importantes na utilização de atmosfera modificada por filmes plásticos é a possibilidade de manter a umidade bastante elevada no seu interior (acima de 95%), reduzindo a perda de peso e conseqüentemente, retardando o enrugamento dos produtos armazenados.

Normalmente o morango é estocado comercialmente por um período de no máximo 6 dias a uma temperatura entre 0 e 4°C. Após este período, há uma redução acentuada nas suas propriedades de aroma, paladar e de seu brilho característico. Bleinroth (1986), observou que sem o uso de refrigeração os morangos conservam sua boa qualidade no máximo por 2 dias, quando então se tornam excessivamente maduros ou apodrecem.

O cálcio aplicado nos períodos pré e pós colheita tem conseguido prevenir desordens fisiológicas e retardar o amadurecimento de vários frutos. Entretanto, poucas pesquisas têm sido realizadas quanto ao seu efeito sobre a qualidade e longevidade pós-colheita e proteção dos morangos contra patógenos.

Oliveira e Toledo (1995), comentam que o morangueiro, devido a sua suscetibilidade ao ataque de fungos e à deterioração por podridão, necessita de aplicações de agrotóxicos a fim de viabilizar economicamente sua cultura. Entretanto, eleva o risco de contaminação do fruto, devido à prática comum de se comercializar o morango imediatamente após o uso do agrotóxico,

além do fato de que, nem sempre, o agricultor segue as recomendações dos receituários agronômicos, os quais contêm informações à respeito do emprego de agrotóxicos autorizados por lei e de sua aplicação adequada. Com base nestes fatos, existe entre os consumidores a crença de que os morangos comercializados estão contaminados com resíduos de agrotóxicos, havendo inclusive pessoas que deixam de consumi-los com receio de intoxicação.

Este trabalho foi desenvolvido com os seguintes objetivos:

- Determinar o efeito das aplicações de cálcio sobre o comportamento pós-colheita de morangos.
- Comparar as aplicações de cálcio pré e pós-colheita sobre os constituintes da parede celular e vitamina C do morango.
- Determinar o nível residual de Benomil, aplicado pré e pós-colheita em diferentes doses em morangos armazenados em atmosfera modificada à baixa temperatura.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Características gerais do morango

O morangueiro pertence à família das Rosáceas e ao gênero *Fragaria*. A espécie cultivada (*Fragaria ananassa* Duch.) resulta da hibridação de até três espécies americanas (*Fragaria chiloensis*, *Fragaria virginiana* e *Fragaria ovalis*). O receptáculo do fruto verdadeiro, que apresenta a polpa avermelhada e com excelentes sabor e aroma, é confundido com o fruto, um aquênio que se assemelha com minúsculas sementes de cor escura (fruto propriamente dito) e preso ao receptáculo (Passos, 1986; Terrassioli Neto, 1991).

O morango tem atração peculiar, por sua cor vermelho brilhante, odor envolvente, textura macia e sabor levemente acidificado. Essas características, segundo Hulme (1971), devem-se ao alto teor de umidade, que pode atingir 90% da parte comestível; o sabor característico é proveniente principalmente dos ácidos cítricos (10-18 mEq) e málico (1-3 mEq) e açúcares, entre os quais predominam a glicose e a frutose (4,5%) e sacarose (0,9%). Os minerais de maior destaque são o cálcio e fósforo (29 mg/100g). A vitamina C predomina sob a forma de ácido ascórbico, com teor em torno de 60 mg/100g. A coloração vermelha do morango é devida ao pigmento antocianina; sendo os fenólicos predominantes os ácidos clorogênico, p-cumárico e

o neoclorogênico. Como componente da textura sobressai-se o pectato de cálcio com teor de 0,6% na parte comestível do fruto.

Atualmente, as cultivares de morangueiro cultivadas no Brasil se comportam como plantas de dias curtos, isto é, necessitam que haja diminuição do fotoperíodo e da temperatura para iniciarem a floração e a frutificação (Passos, 1986). Assim, os plantios de mudas ocorrem em geral de março a abril e dependendo da região e da cultivar utilizada, as colheitas de frutos se iniciam em maio podendo prolongar-se até início de dezembro (Castellane, 1993).

De acordo com informações obtidas no Instituto de Economia Agrícola-SP (IEA) e na Coordenadoria de Assistência Técnica Integral-SP (CATI), a cultura do morangueiro atingiu, na última década, uma área cultivada de 600-800 hectares/ano e uma produção de 35 a 40 mil toneladas/ano. No período de 1987-1989, a estimativa anual da área cultivada foi de 670-810 hectares com produção de 26000 - 34000 toneladas (Lisbão, 1991).

São Paulo e Minas Gerais destacam-se como os maiores produtores de morango para consumo *in natura*, e o Rio Grande do Sul com produção voltada para a indústria (EMATER, 1993). Atualmente, a cultura vem sendo incrementada também nos estados de Santa Catarina, Paraná e Goiás (Castellane, 1993).

As cultivares mais utilizadas no país são: Campineiro, Sequóia, Reiko, Lassen, AGF-80 (destacando-se como as mais utilizadas para a produção de frutos para consumo *in natura*), Guarani e Konovoy-Cascata (principais no fornecimento de frutos às indústrias no Rio Grande do Sul).

A podridão pós-colheita causada por *Botrytis cinerea* e outros fungos é particularmente séria devido às perdas que ocasionam aos frutos, custos de armazenamento, embalagens,

resfriamento e transporte, além do mercado ser desvalorizado como resultado de um produto pouco satisfatório (Paulus, 1990).

Observações de campo confirmam que cultivares de morango diferem quanto à suscetibilidade ao mofo cinzento. Cultivares com menor quantidade de folhas e que produzem frutos mais firmes são menos suscetíveis (Barrit, 1980).

O grande interesse que a cultura do morangueiro vem despertando está relacionado, segundo Luccas (1989), à sua maior rentabilidade (224%) quando comparada à outras culturas, como o milho (72%) e a soja (2%). Independente da finalidade, indústria ou consumo *in natura*, o morango atinge cotações relativamente elevadas pelo fato de não encontrar grandes concorrências com outras frutas, uma vez que é colhido do final do outono a meados da primavera (Castellane, 1986).

## **2.2 Aspectos bioquímicos**

### **2.2.1 Parede celular**

A parede celular é constituída de várias camadas das quais, a primeira encontra-se unindo as células vizinhas e a última, próxima ao plasmalema (Brett e Waldron, 1990).

A principal característica da parede celular de todas as células é a rede de agregados organizados de moléculas de celulose, referidas como microfibrilas (rigidez e resistência), embebidas numa matriz constituída principalmente de polissacarídeos não celulósicos como as substâncias pécticas, hemicelulose, proteínas e ligninas (plasticidade e elasticidade).

A lamela média é a camada mais externa e a primeira a ser depositada durante a divisão celular. Pode ser considerada uma extensão do material da matriz da parede celular primária, faltando as fibrilas de celulose, desempenhando primariamente a função de adesão intercelular. Nessa porção, as substâncias pécticas, constituídas principalmente por polímeros de ácido galacturônico esterificados ou não, são os polímeros predominantes e qualquer modificação nas suas características, altera a coesão entre as células (Malis-Arad et al., 1983; Brett e Waldron, 1990).

Os polímeros pécticos da lamela média são essencialmente lineares com apenas cadeias laterais curtas consistindo de diferentes açúcares neutros, principalmente arabinose e galactose, presos aos resíduos de ramnose da cadeia de ramnogalacturonanas. As pectinas da lamela média apresentam, em geral, alto grau de metilesterificação e as cadeias de ramnogalacturonanas são formadas de regiões altamente esterificadas e ramificadas, intercaladas com resíduos não esterificados que são mantidas juntas por ligações com íons de cálcio (Brett e Waldron, 1990), e assim, podem ser extraídas por agentes quelantes que removem o cálcio por complexação.

Na camada seguinte, a parede celular primária, existem proporções semelhantes de seus componentes apresentando aproximadamente 23% de celulose, 24% de hemicelulose, 34% de pectina e 19% de glicoproteína rica em hidroxiprolina (John e Dey, 1986). Os polímeros pécticos são mais altamente ramificados, as cadeias laterais são mais longas e a cadeia de ramnogalacturonanas tem baixo grau de metilesterificação (Selvendran citado por Fisher, Arrigoni e Amado, 1994). O conteúdo de pectina nos frutos é substancialmente maior e de proteínas menor (Knee e Bartley, 1981). A parede celular primária tem um maior grau de

organização que a lamela média (Brett e Waldron, 1990), constituída por uma fase microfibrilar e uma matriz.

A fase microfibrilar possui alto grau de cristalinidade, constituída de moléculas de celulose. A celulose consiste de cadeias lineares de glicose unidas por ligações  $\beta$  - 1,4. Estas cadeias unem-se via pontes de hidrogênio para formar uma malha altamente estruturada e estável ao redor da qual se organizam os outros polímeros que formam o gel da matriz (Brett e Waldron, 1990).

As substâncias pécticas são constituídas por um esqueleto básico de  $\alpha$  - 1,4 galacturonana entremeado com resíduos de ramnose em ligações 2- e 2,4- . Estes resíduos podem servir de pontos de ramificação, onde se ligam cadeias laterais de açúcares neutros, principalmente galactose e arabinose. As cadeias laterais de açúcares neutros tendem a formar blocos que resultam em regiões muito ramificadas e ligam pectinas com hemicelulose (Mangas et al., 1992).

Cerca da metade dos poliuronídeos da parede celular de morango é fracamente ligada, sendo estabilizados, na parede, pela presença de íons metálicos divalentes. A ramificação de resíduos de açúcares neutros na cadeia de poliuronídeos, pode estar envolvida em ligações cruzadas com microfibrilas de celulose (Keegstra et al., 1973; Knee et al., citados por Knee, Sargent e Osborne, 1977). Entretanto, a parede celular de morango contém menores níveis de arabinose, galactose e xilose que a parede celular de maçã (Knee citado por Knee, Sargent e Osborne, 1977). Isto pode significar que existem menos ramificações disponíveis para ligações cruzadas do poliuronídeo com as microfibrilas.

A alta proporção de ácido galacturônico na pectina confere uma característica altamente acídica ao polissacarídeo. As plantas alteram essa característica pela adição ou remoção de ésteres metílicos a partir dos resíduos de ácido galacturônico. O grau de metilesterificação varia entre os tecidos e estágio de desenvolvimento (Maness, Ryan, Mort, 1990), e determina a habilidade da pectina formar ligações cruzadas com o cálcio, pela alteração e distribuição de cargas na molécula. Sete ou mais resíduos de ácidos metilesterificados podem ser necessários para estabilizar uma ligação cruzada de cálcio entre cadeias adjacentes de pectina (Powell et al., 1982).

As ramnogalacturonanas são polímeros aniônicos com reconhecida capacidade de formar gel. Em solução, o esqueleto de galacturonana assume a conformação de dupla hélice, que permite aos íons cálcio se ligarem de maneira cooperativa a grupos carboxílicos de segmentos não esterificados e não ramificados de cadeias adjacentes. Essa ligação em modelo denominado *egg-box* estabiliza o gel (Fry, 1986; John e Dey, 1986; Bacic, Harris e Stone, 1988). A esterificação dos grupos carboxílicos impede a formação das pontes de cálcio (Bacic, Harris e Stone, 1988).

Enquanto as ligações covalentes são importantes na estrutura da parede celular, a estabilização iônica entre grupos carboxílicos na pectina pelo cálcio são também importantes, e dependem do grau de esterificação da pectina (Neal, 1965).

As hemiceluloses são polímeros formados por diferentes açúcares neutros, como xilose, glicose, fucose e manose, os quais polimerizam-se a formas diversas, como xiloglucanas, glucomananas ou galactoglucomananas, que podem ligar-se covalentemente às pectinas ou via pontes de hidrogênio às microfibrilas de celulose (Gross, 1990). Variam conforme a espécie ou

tipo de célula. Em dicotiledôneas, em geral, a principal hemicelulose é a xiloglucana constituída por um esqueleto de  $\beta$  (1-4)-glicose. A maioria dos resíduos de glicose unem-se a resíduos de xilose em ligação  $\alpha$  (1-6), aos quais podem se ligar resíduos de galactose e arabinose (Brett e Waldron, 1990).

A maioria das proteínas de parede celular é glicosilada. A glicoproteína mais estudada é conhecida como extensina, sendo constituída de aproximadamente 40% do aminoácido hidroxiprolina, que geralmente não é encontrado nas proteínas protoplasmáticas, além de serina e lisina. A parede celular do morango contém cerca de 1% de hidroxiprolina nos primeiros estádios de desenvolvimento do fruto (Knee, Sargent e Osborne, 1977), aumentando cerca de 8 vezes durante o amadurecimento. O aumento das ligações cruzadas entre polissacarídeos de parede celular pela proteína rica em hidroxiprolina, parece ser a causa da paralisação da expansão celular no morango.

A causa do aumento de solubilidade da parede celular tem sido objeto de constantes estudos. O equilíbrio dinâmico entre os seus constituintes sugere que haja não somente a quebra de ligações covalentes mas, também, a incorporação constante de material recém-sintetizado (Labavitch, 1981; Mitcham, Gross e Ng, 1991). Huber (1984), sugere que os poliuronídeos de morango sintetizados *de novo* e associados à parede celular são menos firmemente ligados, o que poderia afetar a integridade estrutural da parede.

Na maioria dos frutos, a fração solúvel das substâncias pécticas aumenta durante o amadurecimento num processo atribuído à ação de enzimas pectolíticas (Gross e Wallner, 1979). Assim, uma considerável perda de firmeza ocorre em muitos frutos nesta fase, e o amaciamento é

primariamente devido à mudanças no metabolismo dos carboidratos de parede celular, resultando em redução líquida de alguns componentes estruturais.

Em revisão realizada por Gross e Sams (1984), observa-se que a mudança mais aparente e extensivamente estudada na composição da parede celular de frutos é a perda de polímeros de ácido urônico, a qual é acompanhada por um aumento de poliuronídeos solúveis. Entretanto, além da solubilização de pectinas, uma perda líquida de resíduos de açúcares neutros não celulósicos também ocorre durante o amadurecimento de pêras, maçãs, morangos e tomate.

Já foi constatado que a solubilização de pectinas não é o único fator que afeta a firmeza, ou que diferencia frutos firmes de macios. Além disso, a associação entre pectinas e outros polímeros pode afetar sua sensibilidade à solubilização. Portanto, o estudo da solubilidade de pectinas não deve ser dissociado dos outros constituintes da parede celular e suas possíveis interações (Malis-Arad et al., 1983).

A complexa relação entre composição de carboidratos, estrutura celular e propriedades físicas do morango é agravada pelo aumento no volume celular, o qual continua durante o amadurecimento do fruto. Entretanto nesta fase, a síntese líquida de poliuronídeos pode mascarar algumas mudanças ocorridas nos polímeros pré-existentes da parede celular (Woodward, 1972; Huber, 1984).

As pesquisas sobre a composição de parede celular de morango têm sido concentradas nas substâncias pécticas. Huber (1984), observou que a proporção de poliuronídeos solúveis aumentou de 30% nos frutos verdes para 65% nos maduros, havendo entretanto, pequena alteração no tamanho molecular desses polímeros durante o desenvolvimento dos frutos.

No amadurecimento do morango, observa-se mudanças no plastídeo, aumento de hidratação e desorganização da parede celular, solubilização da lamela média e matriz da parede. A rapidez e extensão com que os frutos amaciam e perdem sua firmeza durante o amadurecimento, constitui o fator determinante de sua qualidade e vida útil pós-colheita (Manning, 1993).

Durante o amadurecimento do morango, ocorre um aumento na proporção de açúcares neutros associados com poliuronídeos solúveis, destacando-se ramnose e em menor extensão arabinose e galactose (Huber, 1984, Gross e Sams, 1984). O aumento desses açúcares, os quais podem estar ligados à cadeia poligalacturônica via ramificações de ramnosil (Mc Neil et al., citado por Manning, 1993), indica que alterações nas ligações entre carboidratos e parede celular podem ocorrer durante o amadurecimento do fruto.

Knee, Sargent e Osborne (1977), observaram no morango um aumento nos resíduos de xylose, manose e glicose na fração solúvel de parede celular com o amadurecimento, sugerindo que os polissacarídeos hemicelulósicos podem estar sendo degradados ou liberados das ligações interpoliméricas.

Estudos sugerem que a perda líquida desses resíduos seja devida à mudança na taxa de *turnover* principalmente de galactose e/ou arabinose do polímero (Gross e Sams, 1984). No morango a perda desses açúcares atinge 30%.

Huber (1984), observou pequena alteração na composição de açúcar na fração hemicelulósica, mas, uma significativa redução em seu tamanho molecular com o amadurecimento.

Pouco é conhecido sobre as alterações no conteúdo de celulose em frutos macios, tendo sido relatado uma redução de 60% em morangos durante o amadurecimento (Spayd e Morris, 1981 citado por Manning, 1993). Entretanto, quando recalculado com base por fruto, os dados mostraram um aumento de 2,5 vezes durante o desenvolvimento.

### 2.2.2 Cálcio

O cálcio ocorre em tecidos na forma livre ou ligado a grupos carboxílicos, fenólicos e fosforílicos. A maior parte do cálcio dos tecidos encontra-se imobilizado no apoplasto (parede celular e espaços intercelulares), nos vacúolos ou em associação com as membranas e certas organelas, como mitocôndrias e cloroplastos.

O citoplasma celular contém um grande número de compostos solúveis os quais são capazes de se ligar ao cálcio, tais como proteínas, adenina nucleotídeos, fosfatos inorgânicos, oxalatos e citratos. Entretanto, a concentração de cálcio no citoplasma é extremamente baixa, caso contrário seria incompatível com o funcionamento normal da célula, por interferir com as funções normais do magnésio e diminuir excessivamente a atividade do fosfato. Em contraste, os vacúolos e outras organelas acumulam grandes quantidades de cálcio na forma de quelados e precipitados insolúveis de ácidos orgânicos tais como oxalatos e fosfatos (Hepler e Wayne, 1985).

O cálcio ligado à parede celular parece ser um fator importante no desencadear da maturação, assim um decréscimo no teor de cálcio ligado à parede facilita a produção de etileno e aumenta a permeabilidade das membranas, que é a etapa essencial da maturação (Ricardo, 1983).

Parece que o efeito do cálcio em retardar a senescência é parcialmente devido à redução na microviscosidade das membranas associada com a senescência (Poovaiah, 1986).

Cerca de 60% do cálcio celular total encontra-se localizado na parede celular e a maioria do cálcio introduzido no tecido do fruto acumula-se na região parede celular - lamela média, onde exerce sua função estabilizante (Burns e Pressey, 1987; Rossignol et al., citado por Tobias et al., 1993)

Estudos sobre o amadurecimento de frutos têm indicado que a taxa de senescência depende do nível de cálcio dos tecidos. Com o incremento desse nível, várias características da senescência tais como aumento da respiração seguida pela perda de substratos respiratórios endógenos dos vacúolos para enzimas respiratórias no citoplasma, descompartimentalização celular, conteúdo de proteína e clorofila e fluidez da membrana são alterados (Poovaiah, 1986; Menguel e Kirkby, 1982; Glen, Reddy e Poovaiah, 1988).

Embora outros fatores estejam envolvidos, a perda de cálcio pela lamela média é considerada um grande fator contribuinte para o amaciamento dos frutos (Stow, 1993).

Tem sido estabelecido uma estreita relação entre níveis de cálcio no fruto e numerosas desordens fisiológicas e patológicas. Sendo o cálcio um constituinte normal da parede celular-lamela média, a relação entre íons cálcio e parede celular pode explicar parcialmente, a manutenção da firmeza e o aumento da resistência à invasão por certos microrganismos, promovida pelo cálcio (Conway, Sams e Watada, 1995).

Sérias perdas econômicas ocorrem anualmente devido a desordens fisiológicas resultantes de um nível inadequado de cálcio nos frutos, raízes e tubérculos de muitas plantas, e também em folhas de mandioca, alface entre outras (Shear, 1975). Dentre estas desordens podem

ser citadas o *bitter pit* em maçã, *cork spot* em maçã e pêra, *cracking* em cereja, maçã, cenoura, ameixa e tomate, *internal breakdown* em maçã, *tipburn* em escarola, chicória e morango, *blossom-end rot* em pimentão e tomate, entre outras.

A presença de cálcio além de conferir insolubilidade ao material péctico, inibe a degradação pela poligalacturonase (Alonso, Rodrigues e Canet, 1995), uma vez que o pectato de cálcio formado é resistente à degradação pela PG (Heppler e Wayne, 1985).

Bateman e Lumsden (1965) e Watkins et al., (1982) concluíram que os pectatos de cálcio retardam o amaciamento de frutos por impedir a ação de poligalacturonases produzidas por fungos. Eckert e Ratnayake (1983), observaram que o desenvolvimento de doenças pós-colheita depende sobretudo da capacidade dos patógenos secretarem enzimas que despolimerizam os polímeros pécticos insolúveis, levando a perda de coesão do tecido e separação das células individuais, que tem aumentada sua permeabilidade, permitindo a difusão de metabólitos que podem ser usados como substratos para o crescimento do patógeno.

Biggs, Ingle e Solihati (1993), observaram que maçãs pulverizadas ou imersas em  $\text{CaCl}_2$ , apresentavam reduzida incidência e severidade de podridão causada por *Alternaria spp.*, e sugeriram que a atividade de enzimas pectolíticas do fungo, teria sido impedida pelos íons cálcio associados às substâncias pécticas do fruto, ou por outro lado, que o cálcio teria reduzido a incidência de desordens fisiológicas que serviriam de sítio de infecção por fungos.

Tobias et al., (1993), infiltrando maçãs com 4% de  $\text{CaCl}_2$  e inoculando-as com *Botrytis cinerea*, observaram que, enquanto os frutos com baixos níveis de cálcio mostraram elevação na solubilização de polissacarídeos não celulósicos como ramnosil, arabinosil, xilosil e galactosil e aumento de celulose, fenólicos e proteínas associadas à parede celular, os frutos com altos níveis

de cálcio e inoculados, apresentaram mudanças composicionais muito pequenas. Os autores sugeriram que a capacidade do cálcio em reduzir 70% a degradação fúngica seria devida à manutenção da estrutura da parede celular, retardando ou alterando as modificações químicas na composição da parede.

A resistência de maçã, pêsego e batata à degradação tem sido substancialmente aumentada por tratamentos pós-colheita com solução de cálcio, o qual reduz desordens fisiológicas, “*pitting*”, senescência e amolecimento do fruto durante o armazenamento (Conway e Sams, 1987; Hardenburg e Anderson, 1981).

A infiltração sob pressão de 4%  $\text{CaCl}_2$  em maçãs seguida de armazenamento por 6 meses a  $0^\circ\text{C}$ , reduziu 60% da degradação causada por *Penicillium expansum*, aumentou o conteúdo de cálcio dos frutos e conseqüentemente, a firmeza (Sams et al., 1993). Os autores sugeriram que o aumento das ligações cruzadas entre o cátion e os ácidos urônicos da parede celular, pode tornar a parede menos acessível às enzimas do próprio fruto que causam seu amaciamento, ou às enzimas produzidas pelo fungo responsáveis pela degradação.

A infiltração normalmente é o tratamento mais eficiente para a absorção do cálcio nos frutos, entretanto, pode causar injúrias devido à delicada textura de frutos como o morango. Como na pulverização foliar pequena ou nenhuma translocação de cálcio ocorre das folhas para os frutos, a imersão em solução de  $\text{CaCl}_2$  torna-se o tratamento que permite translocação de cálcio mais eficiente no fruto (Garcia, Herrera e Morilla, 1996).

Morangos imersos pós-colheita em solução de 1, 2 e 4% de  $\text{CaCl}_2$  a 25 e  $45^\circ\text{C}$  armazenados por 1 dia a  $1^\circ\text{C}$  e 3 dias a  $18^\circ\text{C}$ , apresentaram menor degradação, menor perda de

peso, maior firmeza e maiores conteúdos de sólidos solúveis e de cálcio no fruto quando tratados com 1% de  $\text{CaCl}_2$  à 45°C. Nenhum tratamento afetou a qualidade sensorial dos morangos (Garcia, Herrera e Morilla, 1996).

A aplicação foliar de  $\text{CaCl}_2$  em morangueiros efetivamente aumentou o conteúdo de Ca nas folhas e frutos, retardando o amadurecimento e o desenvolvimento de *Botrytis cinerea*, quando armazenados à 4°C por 23-28 dias. O cálcio retardou o aumento de antocianinas e de açúcares em níveis inversamente proporcionais à concentração aplicada, aumentou diretamente a firmeza e reduziu a acidez dos frutos. Entretanto, a resposta ao tratamento de cálcio variou não só com a taxa de cálcio aplicadas, mas também, com a capacidade da cultivar acumular e translocar o cálcio (Cheour et al., 1990 e 1991).

Morangos termicamente processados ou congelados tratados com 1 e 2% de lactato de cálcio, apresentaram aumento de firmeza, redução na acidez, no teor de ácido ascórbico e na perda de peso (Main, Morris e Wehunt, 1986).

✕ Morris, Main e Sistrunk (1991), trataram morangos inteiros e em pedaços com 0,18% de Ca na forma de  $\text{CaCl}_2$ . Observaram que em imersão por 5 minutos e armazenamento em embalagens de polietileno, houve maior aumento na firmeza, sem alterar a cor e peso dos frutos inteiros. A imersão em lactato de cálcio 0,5% aumentou a firmeza de pedaços de morango (Morris et al., 1985). Embora essa fonte de Ca seja menos solúvel que o  $\text{CaCl}_2$ , produz menor alteração de "flavor".

Bitencourt et al., (1995), armazenando morangos tratados com 0,5 e 1% de  $\text{CaCl}_2$  durante 21 dias sob refrigeração e atmosfera modificada, observaram que os frutos mantiveram a

aparência externa e não apresentaram contaminação fúngica durante o armazenamento. Entretanto o cálcio não exerceu nenhuma influência sobre o valor de pH, sólidos solúveis, acidez total titulável, pectinas total e solúvel e solubilização de pectinas.

Geraspoulos, Chouliaras e Lionakis (1996), observaram um significativo aumento na concentração de cálcio em kiwi pulverizado com  $\text{CaCl}_2$ , provocando retardo no amadurecimento e conseqüentemente, adiando a colheita, aumentando a firmeza e a acidez titulável e reduzindo sólidos solúveis. Baseados nessas observações, os autores concluem que o cálcio exógeno facilmente penetra na epiderme do fruto.

O resultado de pulverizações foliares ou imersão pós-colheita de cerejas em solução de cálcio, é a obtenção de frutos com maior turgescência celular, maior conteúdo de proteínas de membrana plasmática e maior firmeza com conseqüente redução da susceptibilidade à injúrias (Campbell, Anderson e Walker, 1992; Anderson e Campbell, 1995).

Pereiras tratadas com diferentes fontes de cálcio forneceram, quando pulverizadas com  $\text{CaCl}_2$ , pêras com reduzida incidência de *cork spot* e elevada firmeza comparadas com as de árvores testemunhas. O cálcio manteve a acidez titulável, sólidos solúveis e a cor dos frutos (Raese, Drake e Staiff, 1993).

Mootoo (1991) tratando mangas pós-colhidas por imersão em solução de  $\text{CaCl}_2$  a 0, 2, 4, 6, e 8% e 0,1% Tween 20 por duas horas, observou um aumento na vida útil de 4,5; 8,6; 9,4; 14,6 e 14,8 dias nos frutos armazenados a 28°C e 90% UR.

A qualidade de pêsegos armazenados a 3°C durante 7 semanas após aplicações pré e pós-colheita de  $\text{CaCl}_2$  2% foi determinada por Ochei, Basiounyc e Woods (1993), que

observaram aumento no conteúdo de cálcio nos frutos, aumentando em até 20% a firmeza, retardando o aumento de sólidos solúveis e a redução da acidez e consequentemente retardando o amadurecimento.

Durante o processo normal de maturação do fruto, os íons cálcio são translocados para zonas de crescimento da planta, o que tem sido associado à solubilização e degradação do material péctico da lamela média causando o amaciamento dos frutos (Lidster, Porritt e Tung, 1978; Fils-Lycaon e Buret, 1990).

O fruto acumula cálcio mais rapidamente no início de seu desenvolvimento (Wilkinson citado por Hilmerick e McDuffie, 1983), comumente devido o fruto jovem possuir uma alta taxa superfície aérea : volume e permeabilidade à água (Blanke e Lenz, 1989). Cline e Hanson (1992), observaram que durante o crescimento do fruto, a taxa superfície aérea : volume diminui, a cutícula torna-se mais lipofílica, os estômatos são menos densos e funcionais e a taxa de número de folhas : frutos e área aumenta. Essas mudanças reduzem a transpiração do fruto e o movimento de água e cálcio no xilema para o fruto.

O cálcio é transportado para drenos metabolicamente ativos (via floema) como folhas em crescimento, frutos e meristema apical (Shear e Faust, 1970). Entretanto, este transporte representa uma porcentagem relativamente pequena da acumulação do cálcio total (Hilmerick e McDuffie, 1983).

### **2.2.3 Enzimas pectolíticas**

A solubilização e a despolimerização de poliuronídeos durante o amadurecimento são atribuídas a duas enzimas: a poligalacturonase (PG) que catalisa a hidrólise de ligações  $\alpha$ -1,4

entre dois resíduos adjacentes de ácido galacturônico, e a pectinametilesterase (PME) que promove a desmetilação na posição C6 de resíduos de ácido metilgalacturônico (Seymour, Lasslet e Tucker, 1987).

A PG é mais ativa na degradação de pectinas pelo menos parcialmente desmetiladas. Portanto, a PME parece ter um papel importante para determinar a extensão na qual a pectina é acessível à degradação pela PG (Pilnik e Voragen, 1970; Fisher e Bennett, 1991).

A taxa e extensão da hidrólise pela PG depende do grau de esterificação da pectina e sugere-se que são necessários pelo menos dois grupos carboxílicos livres adjacentes para sua ação. Este requerimento para despolimerização sugere que a hidrólise da pectina nas plantas pode ser controlada pela enzima PME.

A endo-poligalacturonase (endo-PG) tem sido identificada em vários frutos amadurecendo, e sua presença tem sido correlacionada com um aumento na pectina solúvel e amaciamento (Pilnik e Voragen, 1970; Hobson citado por Nogata, Ohta e Voragem, 1993). A síntese de endo-PG ocorre durante o amadurecimento após o aumento da produção de etileno. A exo-poligalacturonase (exo-PG) participa da completa hidrólise da fração pectica solubilizada pela endo-PG.

Morangos apresentam aumento nos níveis de poliuronídeos solúveis durante o amadurecimento (Knee, Sargent e Osborne, 1977), sem contudo haver mudanças no peso molecular desses poliuronídeos, indicativo de atividade enzimática (Huber, 1984).

Assim, a presença de PG em morangos é incerta, tendo sido relatada em alguns trabalhos (Woodward, 1972; Nogata, Ohta e Voragen, 1993, El Zoghbi, 1994) mas não em outros (Neal, 1965; Barnes e Patchett, 1976 e Huber, 1984).

A PME catalisa a desesterificação da pectina ao longo da cadeia, aumentando os blocos de grupos carboxílicos livres e de distribuição aleatória. Entretanto, o modo de ação da PME baseia-se no coeficiente de atividade do cálcio, o qual é uma função complexa da densidade linear de cargas, isto é, da distância média entre dois grupos carboxílicos livres vizinhos (Markovic e Kohn, 1984).

Na presença de cálcio, a pectina da lamela média forma gel, e a gelatinização é governada por vias complexas e grande número de parâmetros intrínsecos e extrínsecos como grau de metoxilação, distribuição de cargas ao longo da cadeia de ácido poligalacturônico, peso molecular, força iônica, pH e temperatura (Axelos e Thibault citados por Garnier, Axelos e Thibault, 1994).

O material péctico incorporado *de novo* na parede celular é altamente metilado (Moustacas et al., 1991) e sua desesterificação necessária para formação de ligações de cálcio é catalisada pela PME. A ação da PME requer certas concentrações de íons metálicos, os quais, juntamente com o potencial eletrostático da parede celular, parecem regular sua atividade. A concentração ótima de cálcio para diferentes PME de origem vegetal está entre 5 e 25 mM e acima desta concentração há efeito inibitório (Rexova-Benkova e Markovic, 1976).

A atividade da PME reconhecidamente decresce durante o amadurecimento da maioria dos frutos, o que provavelmente leva à redução do grau de esterificação nestes frutos (El Zoghbi, 1994).

O efeito promotor da atividade da PME sobre a hidrólise da parede celular pela PG tem sido demonstrado (Pressey e Avants, 1982; Seymour, Lessle e Tucker, 1987). Entretanto, altos níveis de PME inibem completamente a hidrólise, provavelmente pelo excesso de

desesterificação (Pressey e Avants, 1982), indicando que a PG deve agir sobre um substrato com uma extensão limitada de desesterificação.

O papel do grau de esterificação das pectinas durante o amadurecimento tem sido questionado, uma vez que ainda não se esclareceu se o aumento ou a diminuição de sua porcentagem pode explicar melhor o amaciamento e a solubilização de pectinas (Fisher, Arrigoni e Amado, 1994).

Um alto grau de esterificação leva à fraca interação iônica dos polímeros com cálcio, e menos coesão na lamela média. Uma redução no grau de esterificação poderia favorecer a ação da PG, entretanto, as correlações entre PG e PME ainda não estão completamente explicadas (Huber, 1983 a, b).

Durante muitos anos, considerou-se que as modificações de textura ocorressem devido à hidrólise de pectinas pela PG. Entretanto, têm-se evidenciado outros mecanismos aos quais se podem atribuir papéis no amaciamento dos frutos (Gross, 1990), uma vez que a PG sozinha não é suficiente para explicar a perda de açúcares neutros que se observa *in vivo*.

Além do morango, frutos como melão amaciam-se em ausência de atividade de PG, e frutos transgênicos, mesmo tendo atividade de PG inibida, há solubilização de poliuronídeos (Huber, 1984; Seymour, Lesslet e Tucker, 1987; McCollum, Huber e Cantliff, 1989).

A alta proporção de poliuronídeos solúveis durante o amadurecimento de morangos, pode ser devida à quebra de ligações da parede resultante da hidrólise enzimática de poliuronídeos causada pela PG, ou à perda na estrutura gélica estabilizada pelo cálcio devido ao aumento na metilação do poliuronídeo (Neal, 1965).

Como a atividade potencial de PG não parece ser o único determinante do amaciamento de frutos, devem ser estudados outros mecanismos de solubilização da parede. Assim, características estruturais e teor dos substratos pécticos podem regular a ação da PG, bem como pontes de cálcio, grau de esterificação e a presença de cadeias laterais de açúcares neutros (Gross, 1990).

O envolvimento de outras hidrolases (Fisher e Bennett, 1991) como celulase (d'Amour, 1993) e  $\beta$ -galactosidase, e a síntese *de novo* dos diversos compostos (Huber, 1983 a; Huber, 1984 ; Mitchan, Gross e Ng, 1989), também devem ser considerados.

A  $\beta$  - galactosidase presente na parede celular, hidrolisa galactanas (Bartley, 1974), e sua capacidade de solubilizar pectinas poderia explicar parcialmente como frutos carnosos podem amaciar na ausência de PG (Gross, 1984; Smith et al., 1988; Giovannoni et al., 1989).

A atividade dessa enzima é encontrada em tomates e abacates, sendo que a atividade aparece no início do amadurecimento, anteriormente ao aparecimento da PG em abacate e blueberry (Pressey, 1983; Procter e Miesle, 1991).

Tem sido sugerido que a celulase, em adição às enzimas pécticas, pode contribuir para o amaciamento dos frutos durante o amadurecimento. Numerosos trabalhos relatam claramente que a parede celular pode ser digerida por celulase como observado em manga (Roe e Brummer, 1981) e goiaba (Mowlah e Ito citados por El-Zoghbi, 1994).

Em morango, observou-se que a atividade da celulase aumenta durante o crescimento e amadurecimento do fruto, havendo maior aumento no estágio super maduro (Barnes e Patchett, 1976; Abeles e Takeda, 1990).

As celulasas são enzimas com atividade de endo  $\beta$ -(1-4) glucanases, que podem agir sobre diferentes substratos, entre os quais as xiloglucanas (Fisher e Bennett, 1991), que mantêm a associação entre as microfibrilas e a matriz da parede.

#### 2.2.4 Vitamina C

Os frutos e hortaliças representam importante fonte de nutrientes na dieta de muitos países em desenvolvimento. Os frutos tropicais são particularmente importantes devido ao seu alto teor de vitamina C. Dentre eles podem ser citados : caju, 219 ; goiaba, 218; abacaxi, 61; laranja, 59; manga, 53mg/100g (In: Chitarra e Chitarra, 1990).

O morango embora não seja um fruto tropical, encontra-se entre os frutos de maior teor de vitamina C variando entre 118 - 177 mg/100g segundo a cultivar e região de cultivo (Berbari, 1992 ; Scalon, Lima e Abreu, 1995).

Vários estudos têm sido conduzidos com o objetivo de se investigar o efeito do manuseio pós-colheita e práticas de armazenamento sobre o conteúdo de vitamina C em frutos e hortaliças, sabendo-se que esse teor tende a se reduzir significativamente com o avanço da maturação.

Vasquez-Salinas e Lakshminarayana (1985), observaram um declínio gradual no teor de ácido ascórbico de mangas amadurecendo à temperaturas de 16 e 28 °C.

Dudck et al., citados por Islan, Colon e Vargas (1993) relataram que a taxa de degradação pós-colheita do ácido ascórbico em produtos frescos, é muito alta durante a

comercialização e armazenamento à temperatura ambiente. Eles atribuem esta degradação à alta atividade pós-colheita da enzima ácido ascórbico oxidase.

Alves (1993), observou que o armazenamento refrigerado associado à atmosfera modificada, aumentou o tempo de vida pós-colheita de acerolas para uma semana, porém, não foi eficiente na redução das perdas de vitamina C.

A literatura sugere ser o aumento do teor de Vitamina C resultante de uma síntese contínua de ácido L-ascórbico a partir do seu precursor, a glicose -6- fosfato, e de um efeito aditivo da baixa taxa de oxidação na respiração (Singh, 1982; Glen, Reddy e Poovaiah, 1988).

O cálcio atuando na manutenção da estrutura e compartimentalização celular, dificultaria a translocação interna de substrato e a glicose -6- fosfato destinada à respiração, seria desviada para a formação de Vitamina C, aumentando seu valor. A quebra dessa compartimentalização causada pela degradação da parede celular, permitiria a oxidação do ácido ascórbico. Assim, uma relação inversa entre conteúdo de cálcio e respiração em maçãs tem sido relatada (Faust e Shear, 1972; El-Ansary, Ayaad e El-Morshed, 1994).

### **2.3 Controle químico de doenças**

Com o objetivo de evitar perdas de até 30%, os agrotóxicos são utilizados com eficácia em grandes e pequenas plantações, assegurando culturas isentas de doenças. Assim, enquanto a ciência não apresentar outra forma eficiente de combater pragas nocivas às culturas, o emprego de agrotóxicos na agricultura dificilmente poderá ser evitado. Entretanto, a presença de resíduos de pesticidas em alimentos tem preocupado as autoridades e a população, com respeito à ingestão de

alimentos contaminados com resíduos de agrotóxicos, e o futuro controle de pragas e doenças na agricultura.

Os tratamentos químicos têm sido usados em pré e pós-colheita, e embora os tratamentos pós-colheita sejam mais econômicos, são de eficácia relativa, uma vez que controlam apenas aqueles organismos que se instalaram durante e/ou após a colheita. Embora se apresente como uma das principais opções no combate às doenças, o controle químico requer muita cautela tendo em vista a toxicidade dos produtos. Toledo (1993), ressalta que as autoridades mundiais estão convencidas de que o controle químico continuará a desempenhar papel significativo nos programas a serem desenvolvidos nas próximas décadas.

O monitoramento é um meio adequado para garantir medidas que visam reduzir a contaminação, revelando tendências do crescimento de pesticidas nos alimentos, permitindo que medidas preventivas e de controle possam ser iniciadas antes que a contaminação se torne um perigo para a saúde pública ou cause grandes perdas econômicas.

A reunião sobre o meio ambiente realizada em 1972 na Suécia, originou o Programa das Nações Unidas para o meio ambiente (PNUMA) que criou o Sistema Global de Monitoramento do Ambiente (GEMS), e no campo dos alimentos criou o GEMS/FOOD (Programa conjunto FAO/OMS para monitoramento da contaminação de alimento).

A OMS (Organização Mundial de Saúde) possui um grupo de peritos constituído de toxicologistas escolhidos pela própria organização, responsáveis pela avaliação dos dados toxicológicos de cada pesticida e pelos cálculos da ingestão diária aceitável (IDA) para o homem.

A FAO (Organização para Alimentos e Agricultura) é integrada por engenheiros agrônomos e químicos cuja tarefa consiste nos estudos fitossanitários e no levantamento de

culturas em que o uso de agrotóxicos é necessário, reunindo os dados disponíveis sobre a quantidade de resíduos remanescentes nos alimentos e finalmente, recomendando métodos de análises de resíduos de agrotóxicos (Nunes, 1989).

Dentre as avaliações feitas pelo GEMS/FOOD está a ingestão usual da população, que no caso do Brasil é relativamente difícil de se saber, já que não existe uma dieta única no País. Amostras dos alimentos representativos são reunidas, pesadas na proporção que entram na dieta, preparadas na maneira em que são consumidas e posteriormente analisadas. Esta determinação é um dos parâmetros mais importantes e úteis para que um toxicologista possa estudar os possíveis danos de um agrotóxico para a saúde. As pesquisas feitas nesta área, mesmo a nível mundial, na sua maioria tem envolvido um pequeno número de produtos utilizados e de amostras (Toledo, 1993).

O *Codex Alimentarius Mundial*, tendo como referência informações da FAO/OMS, estabelece as tolerâncias internacionais através de seu Comitê de Resíduos de Agrotóxicos (CCPR) (Vettorazzi e Radaelli-Benvenuti, 1982). O estabelecimento dessas tolerâncias internacionais é de grande importância para uniformizar conceitos, elimina dificuldades devido às legislações peculiares de cada país, tornando viável a importação e exportação de gêneros alimentícios.

Para países que exportam alimentos, a execução de um monitoramento é de grande importância econômica. Atualmente a tendência é de serem instituídos sistemas de controle para prevenir a importação de alimentos contaminados. Por este motivo é necessário que os exportadores garantam que seus produtos atendam a requisitos impostos pelos importadores, para não correrem o risco de terem seus produtos rejeitados e sofrerem graves perdas econômicas.

### 2.3.1 Resíduos de Benomil

O Benomil [methyl 1-(butilcarbamoil) 2-benzimidazol-carbamato] e o carbendazim [methyl 2-benzimidazol carbamato] (MBC) são fungicidas sistêmicos frequentemente usados para controlar diversos fungos que afetam frutos, sementes, verduras e grandes culturas (Itak et al., 1993). Assim, são usados para controlar uma grande variedade de doenças vegetais (Liu et al., 1990).

Recentemente entretanto, têm surgido relatos a cerca de danos e efeitos adversos sobre animais e seres humanos causados pelo Benomil, destacando-se sua atuação sobre o sistema reprodutor masculino de mamíferos, sua embriotoxicidade e teratogenicidade (Winter e Teaf, Hess et al., Linder et al., citados por Guan et al., 1994). Entretanto, a base bioquímica para esses efeitos ainda permanece incerta.

O Benomil é rapidamente decomposto em carbendazim em tecidos vegetais e mesmo na presença de solventes orgânicos (Clemens e Sisler, 1969; Peterson e Edgington, 1971; Singh et al., 1990; Tang, Yanagihara e Zhang, 1992). Como o carbendazim é reconhecidamente fungitóxico, acredita-se ser a fungitoxicidade do Benomil devida ao carbendazim (Clemens e Sisler, 1969, Guan et al., 1994).

A determinação de Benomil e Carbendazim na água, solo e em várias culturas é frequentemente requerida devida ao seu amplo uso e para garantir resíduos dentro da tolerância regulamentada pela legislação (Itak et al., 1993). Entretanto, o Benomil tem se mostrado um produto de difícil determinação devido à sua rápida decomposição (Calmon e Sayag, 1976).

Devido a essa instabilidade, os métodos analíticos que determinam os resíduos de Benomil envolvem a extração com solvente orgânico (metanol, acetato de etila ou acetona) ou

uma mistura do solvente orgânico com solução aquosa ácida, promovendo a hidrólise ácida com conversão quantitativa de Benomil para Methyl 2-Benzimidazol Carbamato (MBC), um composto estável. Após a partição com n-hexano ou solução alcalina, o MBC é analisado por HPLC com coluna de troca catiônica ou fase reversa (Bardalaye e Wheeler, 1985) com detectores ultravioleta ou de fluorescência (Jimenez et al., 1994).

A pulverização constitui um método mais comum de aplicação, tanto de fungicidas sistêmicos como protetores. Entretanto, a absorção é severamente afetada em virtude da presença da cutícula foliar, ceras, tensão superficial e direção do jato de pulverização.

Assim, a aplicação de fungicidas sistêmicos via solo tem sido um novo método de controle de doenças. Além de ser uma alternativa à pulverização foliar, apresenta algumas vantagens como: maior facilidade de aplicação em áreas de difícil acesso a máquinas agrícolas e cultivos adensados, liberação das máquinas para outras atividades, dispensa de água na aplicação, menor compactação do solo, proteção contínua das folhas e novas brotações, menor impacto sobre o meio ambiente, possibilidade de ação sobre pragas e outras doenças tanto na parte aérea como no sistema radicular e maior segurança na aplicação por não ocorrer lavagens pelas chuvas. Os fungicidas quando aplicados em pulverização, estão sujeitos à inativação pela adsorção e degradação, apresentando também custo elevado, alta toxicidade ao homem e ineficiência se aplicados inadequadamente (Souza, 1991).

Como fungicidas sistêmicos, o Benomil e carbendazim podem ser absorvidos através das raízes, folhas e tecidos verdes das plantas juntamente com a água. Assim, a ação sistêmica dos benzimidazóis não é naturalmente usada quando eles são aplicados em pulverização foliar,

uma mistura do solvente orgânico com solução aquosa ácida, promovendo a hidrólise ácida com conversão quantitativa de Benomil para Methyl 2-Benzimidazol Carbamato (MBC), um composto estável. Após a partição com n-hexano ou solução alcalina, o MBC é analisado por HPLC com coluna de troca catiônica ou fase reversa (Bardalaye e Wheeler, 1985) com detectores ultravioleta ou de fluorescência (Jimenez et al., 1994).

A pulverização constitui um método mais comum de aplicação, tanto de fungicidas sistêmicos como protetores. Entretanto, a absorção é severamente afetada em virtude da presença da cutícula foliar, ceras, tensão superficial e direção do jato de pulverização.

Assim, a aplicação de fungicidas sistêmicos via solo tem sido um novo método de controle de doenças. Além de ser uma alternativa à pulverização foliar, apresenta algumas vantagens como: maior facilidade de aplicação em áreas de difícil acesso a máquinas agrícolas e cultivos adensados, liberação das máquinas para outras atividades, dispensa de água na aplicação, menor compactação do solo, proteção contínua das folhas e novas brotações, menor impacto sobre o meio ambiente, possibilidade de ação sobre pragas e outras doenças tanto na parte aérea como no sistema radicular e maior segurança na aplicação por não ocorrer lavagens pelas chuvas. Os fungicidas quando aplicados em pulverização, estão sujeitos à inativação pela adsorção e degradação, apresentando também custo elevado, alta toxicidade ao homem e ineficiência se aplicados inadequadamente (Souza, 1991).

Como fungicidas sistêmicos, o Benomil e carbendazim podem ser absorvidos através das raízes, folhas e tecidos verdes das plantas juntamente com a água. Assim, a ação sistêmica dos benzimidazóis não é naturalmente usada quando eles são aplicados em pulverização foliar,

pois novas flores e frutos que são produzidos diariamente devem ser pulverizados repetidas vezes para serem protegidos.

Os Benzimidazóis podem ser aplicados no solo ou em pulverizações para controlar *Botrytis* em frutos de morangueiro (Ben-Aziz et al., 1974). Em morangos, Benzimidazóis são translocados das raízes para as folhas em movimentos apoplástico e das folhas para os frutos, podendo haver translocação lateral de uma planta-mãe para a filha num mesmo estolão dentro de 24 horas após a aplicação (Nicholson et al., 1972; Siegel, 1973). Entretanto, pulverizações repetidas resultam em níveis residuais muito altos nas folhas, possivelmente muito maiores do que os necessários para controlar a doença.

Siegel (1973), demonstrou que o movimento e a acumulação de MBC nos vários órgãos do morango são controlados pela taxa de transpiração. Como o morango tem poucos ou nenhum estômato funcional, a concentração do fungicida depende da quantidade de água requerida para seu crescimento.

Jordan (1973) demonstrou que Benomil, Tiabendazol e Tiofanato-metílico exerceram uma ação fungistática em morangueiro contra *Verticillium dahliae*, quando o tratamento foi feito pelo mergulho da raiz ou pela aplicação do fungicida no solo o qual conferia suficiente ação fungitóxica ao tecido vegetal, reduzindo a severidade da doença.

Como os fungicidas sistêmicos são muito ativos, há uma tendência de usá-los em lugar dos não sistêmicos tradicionais, uma vez que possuem grande habilidade de penetrar no tecido hospedeiro, capacitando-o a erradicar muitas infecções latentes que podem ter ocorrido antes da colheita. Entretanto, um dos problemas do uso desses fungicidas é sua taxa de degradação relativamente baixa e altos níveis residuais no fruto pós-colheita (Ben-Aziz et al., 1974). Em

morangos pulverizados com Benomil e MBC, após duas semanas da última aplicação, o nível residual destes pesticidas detectado foi apenas 20% menor.

Em sua revisão sobre armazenamento refrigerado e atmosfera modificada ou controlada Papadoupolou-Mourkidou, (1991) observou um retardamento ou inibição no processo de amadurecimento dos frutos, com preservação de suas qualidades. Dependendo das condições de estocagem (tempo e temperatura), do tipo de alimento e da natureza química do contaminante (Kawar et al., 1973), a taxa de degradação dos pesticidas aplicados pré-colheita ou antes do armazenamento é reduzida .

No tratamento pós-colheita de morangos com Carbendazim, Tiofanato metílico ou Benomil e o posterior armazenamento dos frutos por 20 dias em “containers” com fluxo de ar à 4 ou 15° C em atmosfera controlada ou normal, os resíduos de todos esses fungicidas diminuíram durante todo o armazenamento. Entretanto, a taxa de dissipação foi menor nos morangos armazenados em atmosfera controlada e baixa temperatura (Kepczynska citado por Papadoupolou-Mourkidou, 1991).

Os resíduos de Benomil, Tiabendazol, Tiofanato metílico e Carbendazim aplicados pós-colheita, reduziram durante o armazenamento de maçãs a 0 - 2° C. O Carbendazim mostrou-se mais estável durante o armazenamento mantendo-se em níveis residuais de 40-65%, enquanto o Benomil variou com a cultivar, mantendo-se entre 30-25% (cv.Starking) ou 45-55% (cv.Golden Delicious) (Cano, De la Plaza e Muñoz-Delgado, 1987).

Ben-Aziz e Aharonson (1974), cultivando tomate e pimentão em solução nutritiva contendo Thiabendazol e Methiltiabendazol, observaram que a taxa de degradação de TBZ em

pimentão é relativamente rápida (75% em 10 dias) comparada com a do MBC no mesmo período (15%) enquanto em tomate foi apenas de 13,5%.

Alguns trabalhos sugerem que após muitos dias de armazenamento, os resíduos de pesticidas aumentam nos frutos provavelmente devido à perda de peso destes, conforme observado pela FAO (1984) em caqui tratados com imazalil, após 112 dias de armazenamento e por Muller e Burt citados por Papadopolou-Mourkidou, 1991 em mangas tratadas com Benomil, após 14 dias de armazenamento.



**3 - EFEITO DO CÁLCIO SOBRE O COMPORTAMENTO PÓS-COLHEITA DE  
MORANGOS**

## RESUMO

### EFEITO DO CÁLCIO SOBRE O COMPORTAMENTO PÓS-COLHEITA DE MORANGOS

Morangos foram tratados com  $\text{CaCl}_2$  (0, 2 e 4%) pré-colheita por pulverização foliar e pós-colheita por imersão. Os frutos foram colhidos no estágio de maturação 3/4 vermelho e armazenados à 4°C sob atmosfera modificada. Os frutos foram avaliados quanto ao teor de pectina total, pectina solúvel, solubilização de pectinas, atividades de Poligalacturonase e Pectinametilesterase, cálcio total e vitamina C. No material de parede celular foram determinados grau de esterificação da pectina, cálcio ligado e celulose. As aplicações de  $\text{CaCl}_2$  por pulverização aumentaram a porcentagem de cálcio ligado, grau de esterificação e conteúdo de vitamina C, e reduziram a solubilização das pectinas. A concentração de 2% de  $\text{CaCl}_2$  independente da época de aplicação aumentou a porcentagem de cálcio ligado, grau de esterificação e reduziu a solubilização de pectinas. Houve redução da porcentagem de celulose com os tratamentos de cálcio enquanto o teor de Vitamina C não variou significativamente.

## **ABSTRACT**

### **EFFECT OF CALCIUM IN POSTHARVEST BEHAVIOUR OF STRAWBERRIES**

Strawberries were treated with  $\text{CaCl}_2$  (0, 2 and 4%) in preharvesting pulverization and postharvesting immersion. Fruits were harvested in the 3/4 red maturation stage and stored at 4°C under modified atmosphere. Total pectin, soluble pectin, pectin solubilization, polygalacturonase and pectinmethylesterase activities, total calcium and vitamin C were evaluated. Cell wall material was analysed for degree of esterification, bound calcium and cellulose. The treatment with calcium applied by pulverization, increased the percentage of bound calcium, degree of esterification, vitamin C and decreased pectin solubilization. The 2%  $\text{CaCl}_2$  concentration increased bound calcium, degree esterification and decreased pectin solubilization. The content of cellulose decreased with calcium whereas the content of vitamin C did not change significantly.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Recentemente tem-se relacionado o efeito da nutrição mineral na manutenção da qualidade pós-colheita de frutos e hortaliças. O cálcio tem sido relatado como um importante e determinante fator da qualidade de frutos, destacando-se a alta relação existente entre níveis de  $\text{Ca}^{+2}$  no fruto e retenção de suas qualidades (Bramlage, Drake e Lord, 1980; Cownay, Sams e Watada, 1995; Raese, Drake e Staiff, 1993) .

Tem-se observado a participação do cálcio na redução da respiração e retardamento do amadurecimento de tomates, pêssegos e maçã (Burns e Pressey, 1987; El-Ansary, Ayaad e El-Morshed, 1994), prolongamento na vida de armazenamento, aumento da firmeza em maçãs, tomate e cereja (Bangert et al., 1972; Lima, 1992; Anderson e Campbell, 1995) e redução da podridão no armazenamento de tomates (VanGoor, 1968).

O cálcio tem sido aplicado antes e após a colheita para prevenir desordens fisiológicas e retardar o amadurecimento de vários frutos (Poovaiah, 1986). A maioria do cálcio do tecido acumula-se na parede celular e membranas que são considerados os sítios dessa ação antisenescente (Glen, Reddy e Poovaiah, 1988).

Na parede celular, o cálcio está associado a grupos carboxílicos livres das pectinas saturando a maioria dos seus sítios (Menguel e Kirkby, 1982). Normalmente encontra-se

formando ligações entre resíduos de ácido galacturônico ao longo de cadeias pécnicas adjacentes. O complexo cálcio-pectina formado, atua como um cimento intracelular conferindo firmeza ao tecido vegetal.

Pequena translocação de cálcio ocorre das folhas para os frutos durante seu crescimento. Visto ser um elemento essencial para a qualidade pós-colheita dos frutos, e frequentemente, os problemas ligados a uma má suplementação de cálcio na planta surgirem nos frutos após a colheita e durante o armazenamento (Ricardo, 1983), muitos autores julgam necessário sua suplementação via foliar, no próprio fruto em formação ou em pós-colheita (Link, 1974; Burns e Pressey, 1987; Glen, Reddy e Poovaiah, 1988).

Assim sendo, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar química e bioquimicamente o efeito das aplicações pré e pós-colheita de cálcio nos frutos do morangueiro.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 Procedência dos morangos**

Os morangos da cultivar Campineiro foram cultivados no Sítio Rio do Peixe, Rodovia 381 Km 12, Município de Cambuí, Minas Gerais. A região se localiza numa altitude de 900 m, a 22° 36' 50" de latitude Sul e 46° 03' 40" de longitude W. A região apresenta temperatura e umidade relativa de 20,7° C e 80% com regime pluviométrico em torno de 1436,3 mm e insolação média de 2314,5 horas/ano.

Os frutos foram colhidos no estágio 3/4 vermelho, pela manhã e transportados para o Laboratório de Bioquímica de Frutos e Fisiologia Pós-Colheita do DCA/UFLA, onde foram imediatamente desinfectados em solução de hipoclorito de sódio 1%.

### **3.2.2 Tratamentos**

#### **Pré-colheita:**

Os morangos foram tratados com duas concentrações de cálcio (2 e 4% de  $\text{CaCl}_2$ ) e os frutos não tratados serviram como testemunha. Foram realizadas quatro pulverizações de cálcio após o

pegamento das mudas: duas durante o desenvolvimento vegetativo, uma durante a floração e uma dois dias antes da colheita dos frutos.

### **Pós-colheita**

Os morangos foram imersos pós-colheita em solução de 2 e 4% de  $\text{CaCl}_2$  com Tween 0,1% durante 10 minutos. Os frutos testemunha foram imersos apenas em água destilada.

Após secagem dos frutos ao ar, eles foram distribuídos em bandejas de isopor de 12 x 12 cm. As bandejas contendo 8 frutos cada, foram revestidas com filme auto adesivo de polietileno (Rollopac), em seguida armazenadas em BOD à 4°C e UR  $\pm$ 80%, durante 6 dias.

### **3.2.3 Delineamento estatístico**

O experimento foi conduzido em esquema fatorial 2 (aplicação pré e pós-colheita) x 3 (concentrações) x 4 (épocas de armazenamento) em Delineamento Inteiramente Casualizado, com 2 repetições. A unidade experimental correspondeu a uma bandeja com oito frutos.

Os resultados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio do programa SANEST- Sistema de Análise Estatística, de autoria de Elio Paulo Zonta e Amauri Almeida Machado, do Instituto Agronômico de Campinas.

### 3.2.4 Análises

#### 3.2.4.1 Análises químicas e bioquímicas

- **Substâncias pécticas** - foram extraídas da polpa segundo metodologia adaptada por Mc Cready e Mc Comb (1952) e doseadas segundo Blumenkrantz e Ashboe-Hansen (1973), após reação com metahidroxidifenil. Os resultados foram expressos em mg de ácido galacturônico/100g de polpa. Foram determinadas as substâncias pécticas total e solúvel, e pela relação entre elas obteve-se a porcentagem de solubilidade.
- **Cálcio total** - foi determinado à partir da polpa liofilizada e moída, após digestão nitroperclórica e quantificação por espectrometria de absorção atômica, segundo metodologia de Sarruge e Haag (1974), e os resultados expressos em % (g de Ca/ 100g de peso seco).
- **Atividade de Poligalacturonase (PG)** - A obtenção do extrato e a determinação da atividade foram realizados segundo Pressey e Avants (1973). A atividade foi determinada por incubação do extrato com solução de pectina cítrica 0,25% em tampão acetato de sódio 37,5 mM pH 5,0 a 30°C por 3 horas. A reação foi interrompida em banho-maria fervente, e os grupos redutores liberados foram determinados pela técnica de Somogyi modificada por Nelson (1944), usando glicose anidra como padrão. Uma unidade de atividade de PG foi considerada como sendo a

quantidade de enzima capaz de catalisar a épocação de um nanomol de grupos redutores por minuto nas condições do ensaio. Os resultados foram expressos em unidades/100g.

- **Atividade de Pectinametilsterase (PME)** - foi determinada segundo metodologia de Jen e Robinson (1984). O substrato usado foi pectina cítrica 1% em NaCl 0,1M pH 7,0, à temperatura ambiente. A taxa de desmetilação da pectina, adicionada do extrato enzimático, foi medida pela titulação da mistura de reação com NaOH 0,0025N, mantendo o pH 7,0 por 10 minutos.

Uma unidade de atividade de pectinametilsterase foi considerada como sendo a quantidade de enzima capaz de catalisar a desmetilação de pectina correspondente a um micromol de NaOH por minuto nas condições do ensaio. Os resultados foram expressos em unidades/100g.

**Vitamina C** - foi determinada por colorimetria segundo metodologia de Strohecker e Henning (1967) e Brune et al (1966). Os resultados foram expressos em mg/100g.

#### 3.2.4.2 Compostos de parede celular

A parede celular foi obtida segundo metodologia de Huber (1984) modificada, seguindo as etapas descritas abaixo e ilustradas na FIGURA 1:

- 1- 50 g de polpa previamente "descascada" foram trituradas em homogeneizador de tecidos TEKMAR modelo Tissumizer, com 200 ml de tampão fosfato de sódio 30 mM contendo 20 mM de Na<sub>2</sub>EDTA pH 6,0.

A camada epidérmica superficial do morango contendo os frutos propriamente ditos, foi retirada afim de facilitar a filtração e obter um material de parede celular facilmente digerido pelo ácido sulfúrico.

2- O homogenato foi aquecido por 20 minutos em banho fervente e após esfriado, filtrado em duas camadas de tecido tipo "organza".

3- O resíduo foi lavado com 150 ml de NaCl 100 mM e transferido para um becker contendo 50 ml de acetona p.a.

4- O resíduo permaneceu em imersão por 30 minutos, foi filtrado e a acetona renovada mais 2 vezes.

5- Após as 3 lavagens com acetona, o resíduo foi lavado com 100 ml de clorofórmio:metanol (2:1) e deixado secar ao ar.

A metodologia de extração da parede celular ilustrada na FIGURA 1, permitiu obter um rendimento médio de 8mg/g de peso seco de material de parede celular . Este rendimento encontra-se na faixa daquele obtido por Menezes (1996) para melão.

As amostras secas foram acondicionadas em frascos porta-amostra, mantidos vedados à temperatura ambiente até sua utilização.

**Grau de esterificação** - foi empregado o método modificado por Lurie et al (1994), o qual determina as quantidades de ácido galacturônico na parede celular antes e depois de incubação com boroidreto de sódio. Foi determinado o conteúdo de ácido galacturônico total no material de parede celular, em seguida, uma outra amostra, foi incubada com boroidreto. Depois de neutralizada, a mistura de reação foi evaporada, lavada e ressuspensa em ácido sulfúrico 67%

(v/v). Na solução sulfúrica foi feita a determinação colorimétrica de ácido galacturônico. Com essa incubação os resíduos esterificados de ácido galacturônico foram reduzidos, deixando de reagir com meta-hidroxidifenil. Por diferença obteve-se a porção não esterificada.

O grau de esterificação foi definido como a porcentagem de ácido galacturônico esterificado em relação ao total.

- **Cálcio ligado à parede celular** - foi determinado pela mesma metodologia empregada para cálcio total, utilizando porém material de parede celular. Os resultados foram expressos em porcentagem de cálcio no material de parede celular.

- **Celulose** - foi determinada segundo método modificado de Lurie et al (1994). O material bruto de parede celular foi tratado com ácido trifluoracético 2N a 120°C por 1 hora. O resíduo foi lavado com água destilada e dissolvido em ácido sulfúrico 67% (v/v). Os açúcares liberados foram determinados colorimetricamente pelo reagente de antrona (Dishe, 1962). Os resultados expressos em porcentagem do material de parede celular.

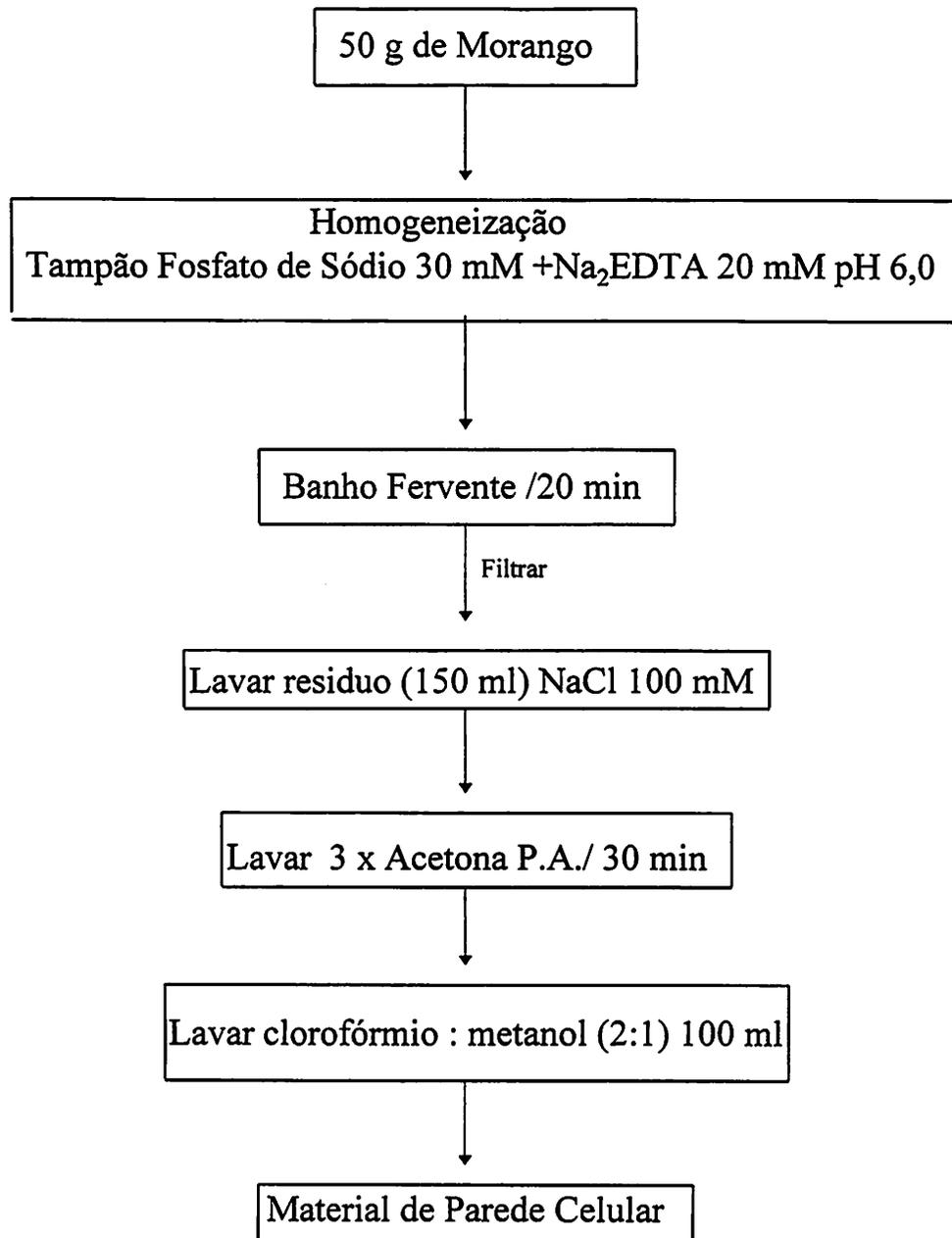


FIGURA 1 : Esquema de extração de parede celular de morango

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

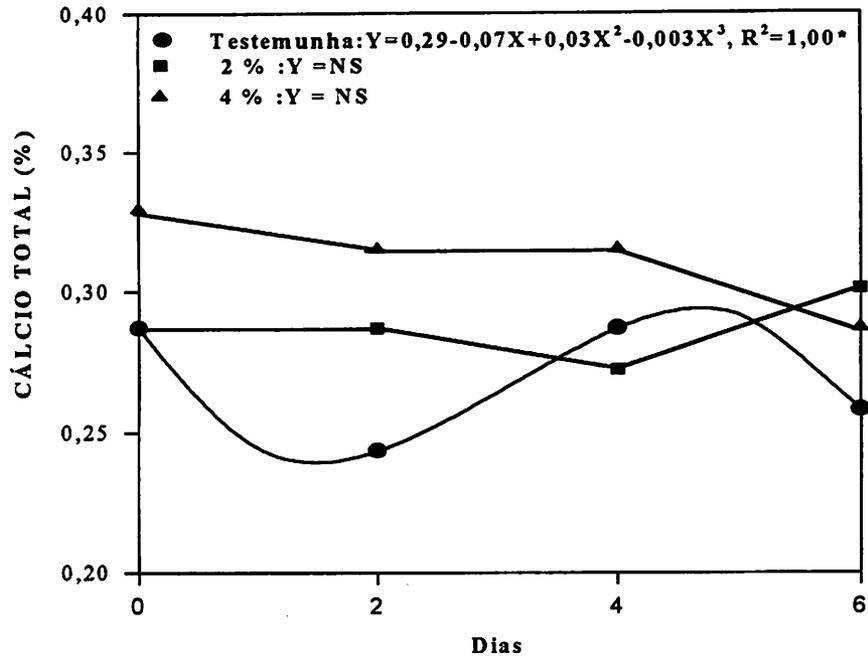
#### 3.3.1 Cálcio

A análise de variância mostrou que não houve interação significativa entre níveis de cálcio e época de aplicação com as épocas de armazenamento para a variável cálcio total (Quadro 1 - Anexo).

O teor de cálcio foi maior nos frutos tratados pós-colheita, sendo diretamente proporcional à concentração aplicada (FIGURA 2). Os frutos tratados pré-colheita com 4% de  $\text{CaCl}_2$  apresentaram maior teor de cálcio que aqueles tratados com 2%. Já os frutos tratados pós-colheita, o teor de cálcio foi maior, sendo diretamente proporcional à concentração de  $\text{CaCl}_2$  aplicado.

De maneira geral, a variação na porcentagem de cálcio total foi menor nos morangos tratados pré-colheita. Os valores médios de cálcio total (0,244 - 0,358 %) neste estudo, estão acima daqueles observados por Cheour et al. (1990/1991) (0,190 - 0,280 %) para morangos testemunha, já para os frutos tratados estes valores (0,301 - 0,602 %) variaram em função da concentração de  $\text{CaCl}_2$  aplicada.

(A)



(B)

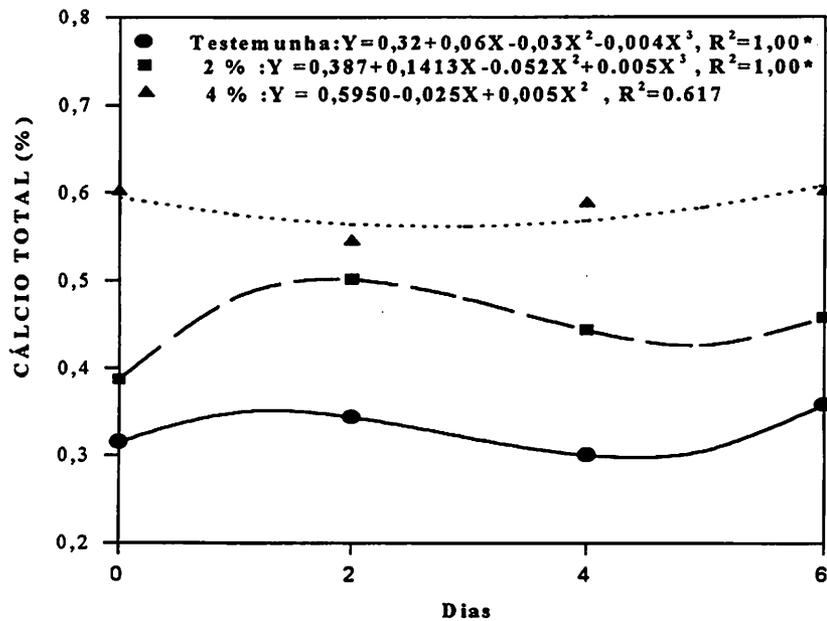


FIGURA 2: Valores médios de cálcio total (%) de morangos tratados na pré (A) e na pós-colheita (B) com 2 e 4% de  $CaCl_2$  e armazenados durante 6 dias.

Não houve interação significativa entre níveis de cálcio e época de aplicação e entre as aplicações e épocas de armazenamento para a variável cálcio ligado (Quadro 1 - Anexo)). A porcentagem de cálcio ligado à parede celular variou significativamente pelo teste F ( $P < 0,05$ ) entre as épocas de aplicação de  $\text{CaCl}_2$ , onde os morangos pulverizados apresentaram em média 0,41% e aqueles tratados por imersão 0,35% .

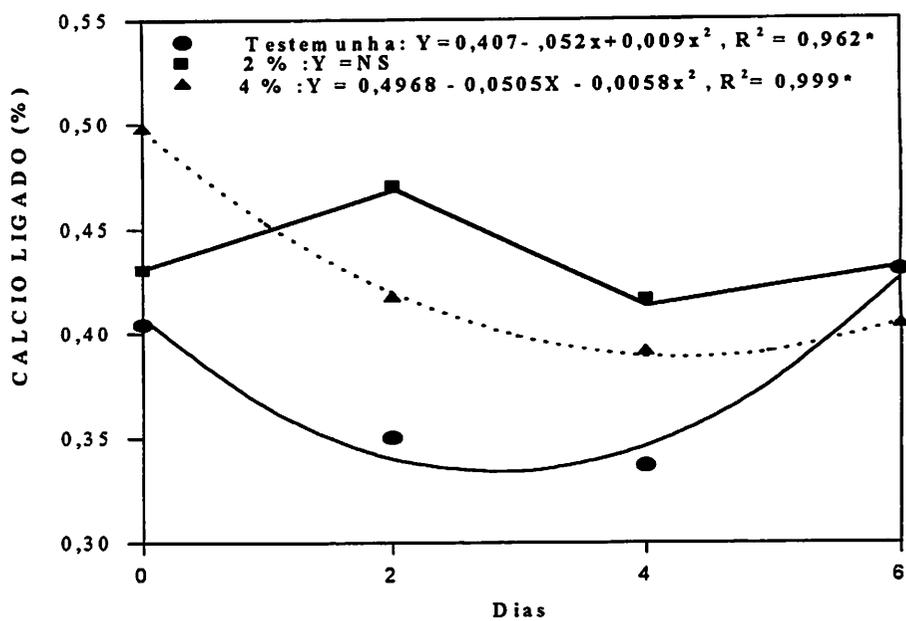
Os frutos tratados com 2% de  $\text{CaCl}_2$  independente da época de aplicação, apresentaram tendência de maior porcentagem de cálcio ligado, comparado àqueles tratados com 4%.

Os frutos tratados pré-colheita com 2% de  $\text{CaCl}_2$  chegaram ao final do período experimental com a mesma porcentagem de cálcio ligado do início (FIGURA 3). Nos demais tratamentos, o cálcio ligado reduziu durante o experimento, exceto na testemunha dos frutos tratados pós-colheita.

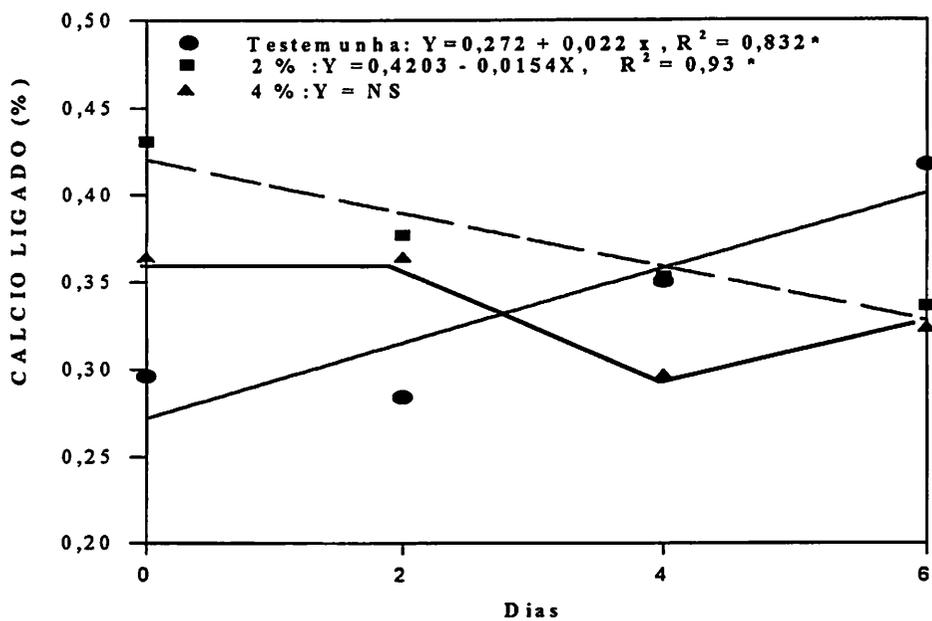
Essa redução pode ser entendida como sendo resultado de solubilização do  $\text{Ca}^{+2}$  ligado, o que segundo Rigney e Wills (1981), resultaria em avanço no processo de amadurecimento .

A redução no teor de cálcio ligado durante o armazenamento foi observada em maçãs por Siddiqui e Bangerth (1995) e em melão por Menezes (1996). Esses autores não conseguiram correlacionar as mudanças na firmeza da polpa com o conteúdo de cálcio preso à parede celular. Entretanto sugerem que não se pode descartar a sua importância no amolecimento do fruto antes da realização de estudos mais detalhados. Parece que o efeito do cálcio na manutenção da integridade do fruto está mais relacionado com a membrana plasmática, pois recentemente, Lester (1996) verificou que a aplicação de cálcio em melão pode retardar as mudanças relacionadas com

(A)



(B)



a senescência através da redução de perda de fosfolípedes de membrana, proteína e atividade de H-ATPase.

Os resultados encontrados neste estudo para cálcio total e ligado podem ser comparados aqueles obtidos por Conway, Sams e Watada (1995), que infiltrando 2% de  $\text{CaCl}_2$  em maçãs, observaram um aumento no conteúdo de cálcio total e ligado à parede celular. Entretanto, nos frutos tratados com 4%, o aumento do cálcio total foi mais significativo do que do cálcio ligado, sugerindo que os sítios ligados com cálcio possam ter sido saturados com o cálcio disponível na solução 2%. Já nos frutos tratados com 4%, houve saturação e o restante do cálcio ficou armazenado nos espaços intercelulares ou mesmo no citoplasma, o que poderia causar injúria ao tecido.

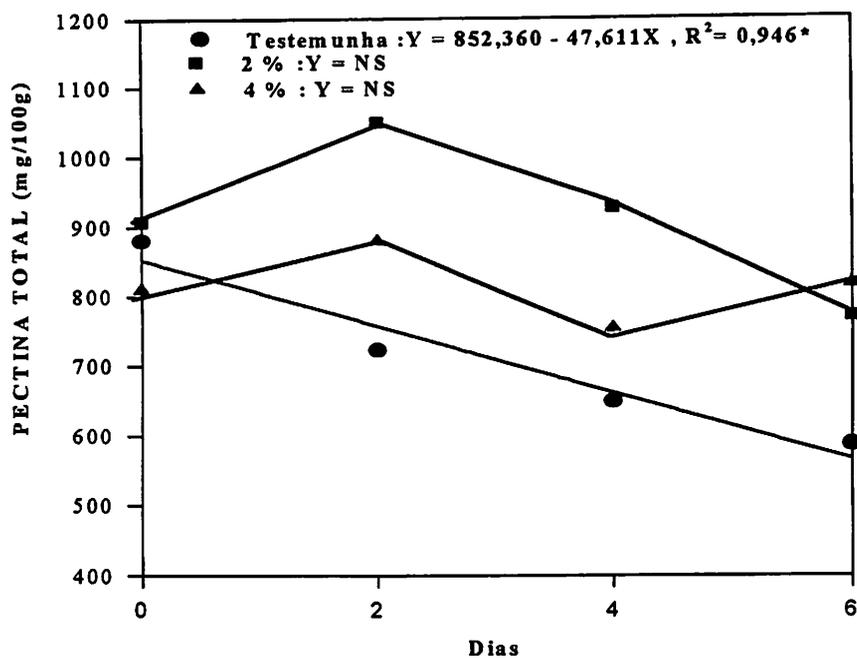
### **3.3.2 Solubilização de pectinas**

O Quadro 1 (Anexo) mostra que houve interação significativa entre as épocas de aplicação, concentração de  $\text{CaCl}_2$  e épocas de armazenamento para a variável pectina total.

Os morangos apresentaram redução nos teores de pectina total durante o período experimental, embora tenha se mantido maior nos frutos tratados com  $\text{CaCl}_2$  (FIGURA 4).

Os frutos tratados pré-colheita com 2 % de  $\text{CaCl}_2$  apresentaram o maior teor de pectina total. Nos frutos tratados pós-colheita, aqueles tratados com 2% , até o 4º dia, apresentaram maior teor de pectina total.

(A)



(B)

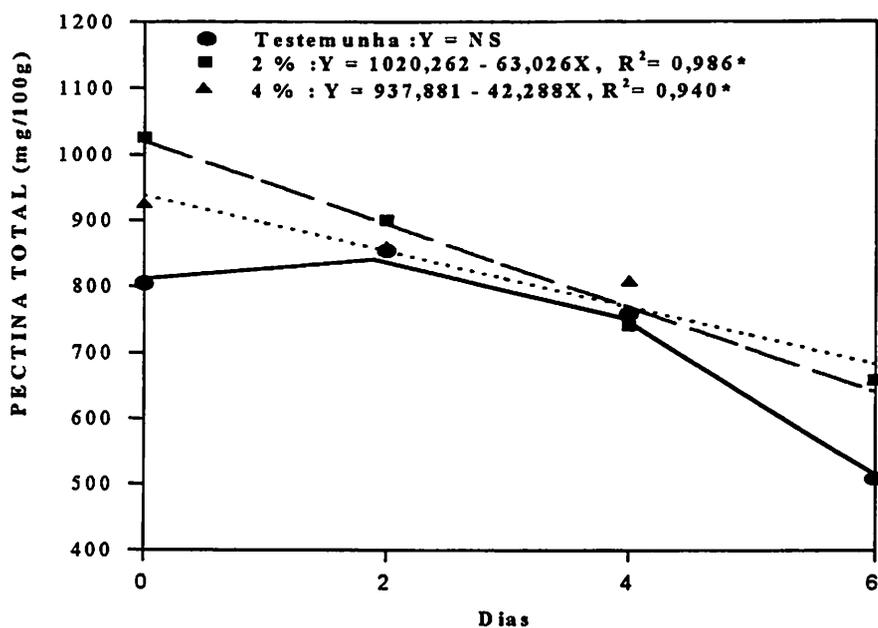


FIGURA 4: Valores médios de pectina total de morangos tratados na pré (A) e na pós-colheita (B) com 2 e 4% de  $CaCl_2$  e armazenados por 6 dias.

A análise de variância mostrou que não houve variação significativa nos teores de pectina solúvel durante o período experimental e nem interação do período com as épocas de aplicação de  $\text{CaCl}_2$  (Quadro 1 - Anexo).

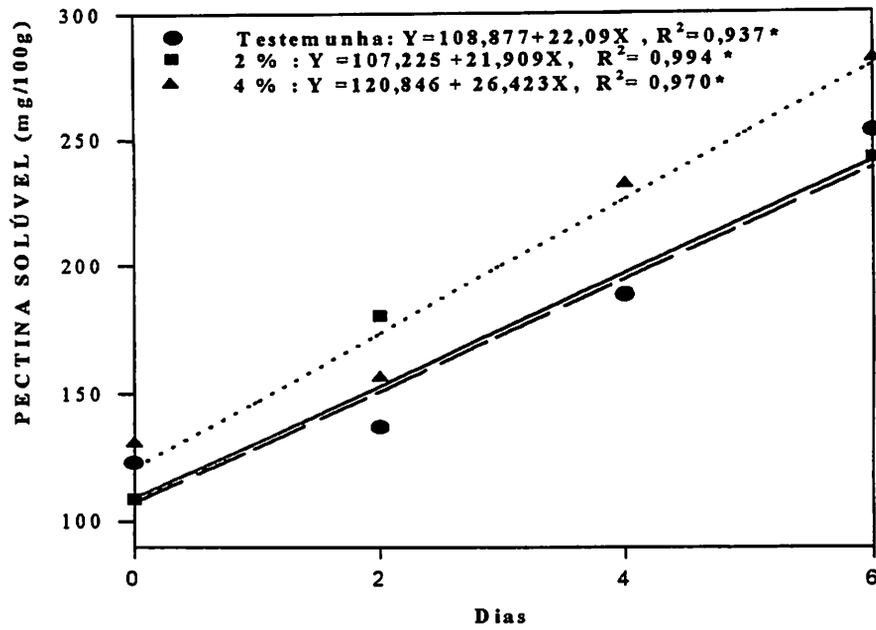
Os morangos apresentaram aumento linear no teor de pectina solúvel durante o período experimental (FIGURA 5).

A pectina solúvel dos frutos tratados pré-colheita com 2% de  $\text{CaCl}_2$  e da testemunha, apresentaram comportamento semelhante. Os frutos tratados com 4% apresentaram maior teor de pectina solúvel. Já nos frutos tratados pós-colheita com 2%, a pectina solúvel foi menor que nos frutos testemunha e tratados com 4%.

Chung et al (1993) observaram aumento na firmeza dos frutos e no teor de pectina total, redução na pectina solúvel, pelargonidina-3-monoglicose, sólidos solúveis, ácidos orgânicos e conteúdo de açúcar. 100% dos frutos tratados com 0,5% de  $\text{CaCl}_2$  e armazenados a 30°C encontravam-se em ótimo estado para comercialização.

Lima (1992) tratando tomates com gesso no solo, observou que embora a pectina total tenha reduzido em todos os tratamentos, os frutos controle apresentaram a menor concentração de pectina total, a qual aumentou com o aumento das doses de gesso aplicadas e durante os estádios de maturação. O autor ressalta o efeito do cálcio na manutenção do teor de pectina total dos frutos.

(A)



(B)

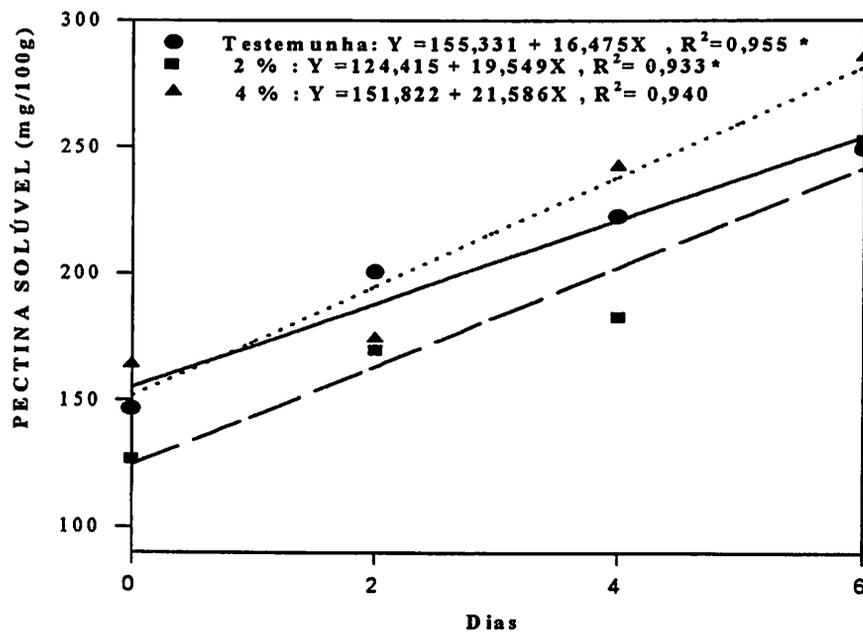


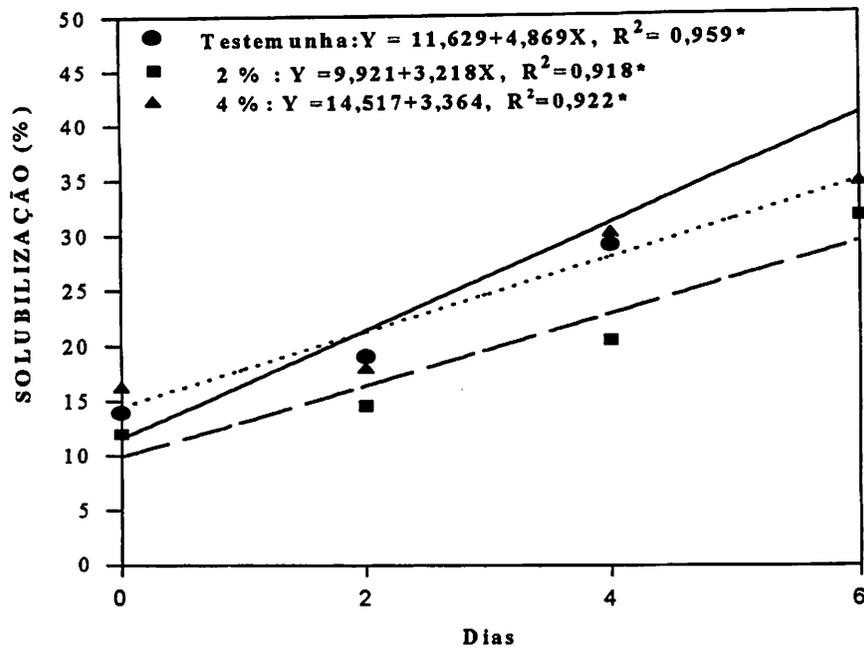
FIGURA 5: Valores médios de pectina solúvel de morangos tratados na pré (A) e na pós-colheita (B) com 2 e 4% de  $\text{CaCl}_2$  e armazenados durante 6 dias.

Bissoli (1992) embora tenha também observado elevação no teor de pectina total no início do amadurecimento de mangas tratadas com cálcio, atribui esse aumento a um processo incompleto de sequestro de cátions durante a análise levando a erros de avaliação. O autor sugere que o cálcio atua somente sobre a manutenção da firmeza dos frutos, não atuando sobre a síntese de pectina, uma vez que não existem na literatura, relatos de que o cálcio possa interferir no processo de síntese das cadeias de ácido poligalacturônico.

Não houve variação significativa na solubilização da pectina quanto a época de aplicação do  $\text{CaCl}_2$  pelo teste F em ( $P < 0,05$ ).

A solubilização de pectinas aumentou durante o período experimental (FIGURA 6). De maneira geral, os frutos tratados com  $\text{CaCl}_2$  independente da época de aplicação apresentaram menor solubilização de pectinas que a testemunha. Os frutos tratados com 2% de  $\text{CaCl}_2$  em ambas as épocas de aplicação apresentaram menor solubilização. Nos frutos tratados pré-colheita, observa-se menor solubilização de pectinas.

(A)



(B)

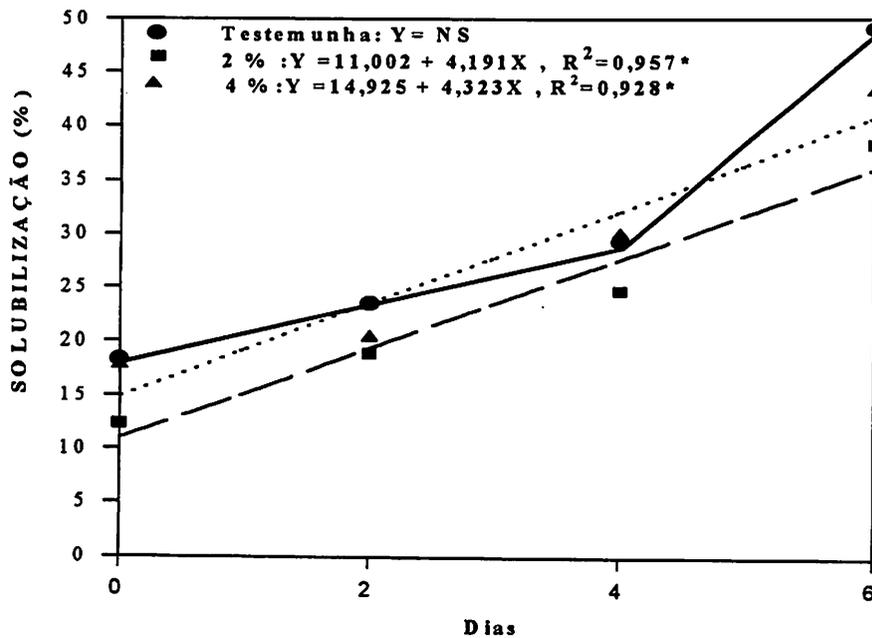


FIGURA 6: Valores médios de solubilização de pectinas de morangos tratados na pré (A) e na pós-colheita (B) com 2 e 4% de  $\text{CaCl}_2$  e armazenados durante 6 dias.

### 3.3.3 Atividade da Pectinametilesterase

A análise de variância mostrou que houve interação significativa entre todos os tratamentos para a variável atividade de PME (Quadro 2 - Anexo).

Os morangos testemunha apresentaram aumento de atividade de PME até o 4º dia com subsequente redução nos frutos tratados pré-colheita (FIGURA 7).

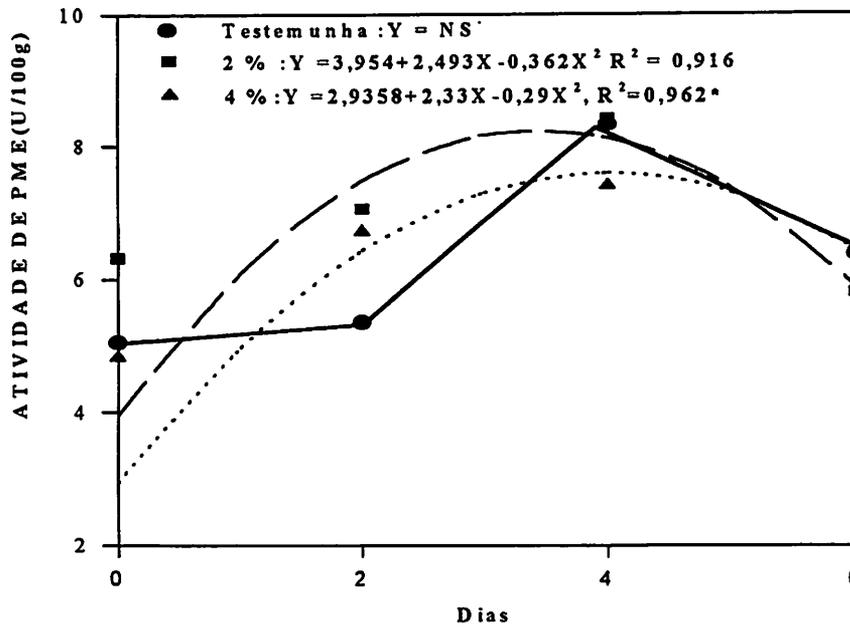
A atividade da PME nos frutos tratados pré-colheita aumentou até o 4º dia, sendo que os frutos tratados com 2% de  $\text{CaCl}_2$ , apresentaram maior atividade, comparada àqueles tratados com 4%.

Os resultados obtidos contradizem a idéia de que os íons cálcio inibem a atividade da PME, sendo que, na literatura, alguns pesquisadores têm proposto algumas explicações para o aumento da atividade dessa enzima em presença de íons cálcio.

O mecanismo pelo qual a PME é ativada pelo cálcio não tem sido satisfatoriamente explicado (Rexova e Markovic, 1976). Tem sido proposto que o cálcio liga-se aos grupos carboxílicos livres, invertendo a inibição da PME produzida pela presença desses grupos carboxílicos livres na pectina (Moustacas et al., 1991; Nari et al., 1991), assim, a ativação do íon cálcio ocorreria mais por sua ligação à enzima do que devido ao efeito direto sobre as cadeias de ácido poligalacturônico (Alonso, Rodrigues e Canet, 1995).

Nos frutos tratados 2% pós-colheita, observa-se redução da PME durante o experimento. Já os frutos tratados com 4% apresentaram atividade irregular. Entretanto, em ambas as concentrações, os frutos apresentaram menor atividade da PME que a testemunha já a partir do 2º dia de armazenamento.

(A)



(B)

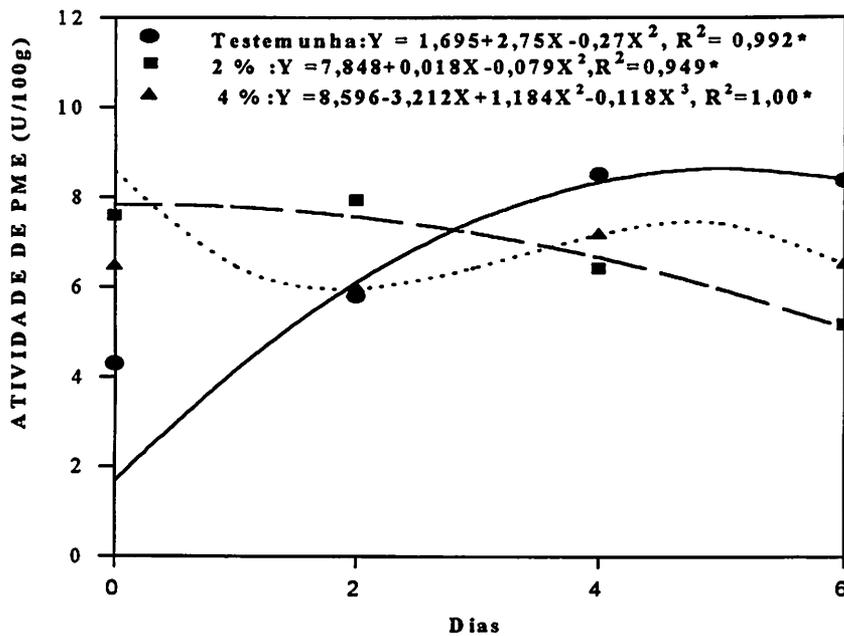


FIGURA 7: Valores médios de atividade da PME de morangos tratados na pré (A) e na pós-colheita (B) com 2 e 4% de  $CaCl_2$  e armazenados durante 6 dias.

Os valores de atividade de PME encontrados neste estudo (4,67 - 8,42 U/100g) encontram-se na faixa daqueles observados por El-Zoghbi (1994) (5,2 - 8,0 U/100g).

### 3.3.4 Atividade da Poligalacturonase

A análise de variância mostrou que houve interação significativa entre todos os tratamentos para a variável atividade de poligalacturonase (Quadro 2 - Anexo).

Os frutos tratados pré-colheita com 2% de  $\text{CaCl}_2$  apresentaram maior atividade de PG que os frutos tratados com 4% até o 4º dia de armazenamento. Embora essa atividade tenha apresentado redução linear durante o período experimental, ao final desse período, a menor atividade de PG foi observada nos frutos tratados com 2% de  $\text{CaCl}_2$  (FIGURA 8).

Nos morangos tratados pós-colheita, a atividade da PG foi inversamente proporcional à concentração da solução de  $\text{CaCl}_2$  aplicada, sendo que nos frutos tratados com 2%, observa-se elevação na atividade da PG até o 4º dia e subsequente redução, mantendo-se porém, maior ao final do período experimental. Os frutos tratados pós-colheita com 4% de  $\text{CaCl}_2$  apresentaram a menor atividade de PG durante o armazenamento.

Os resultados obtidos mostram que a ação da PG é inibida por íons cálcio, confirmando a idéia de que as substâncias pécticas da parede celular - lamela média servem de sítio de ligação para o metal, e que o complexo é resistente ao ataque da enzima.

Entretanto, o comportamento da PG não explica o padrão de solubilização de pectinas encontrado neste estudo. Assim, a atividade irregular da PG nos frutos tratados pré-colheita com 4% e na testemunha dos frutos tratados pós-colheita não explica o aumento linear da

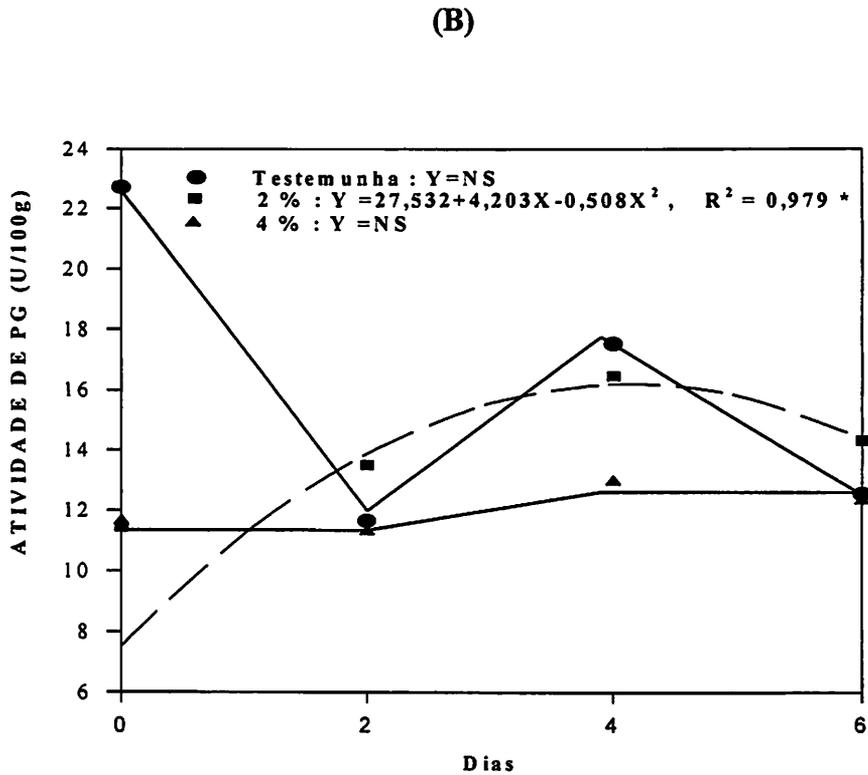
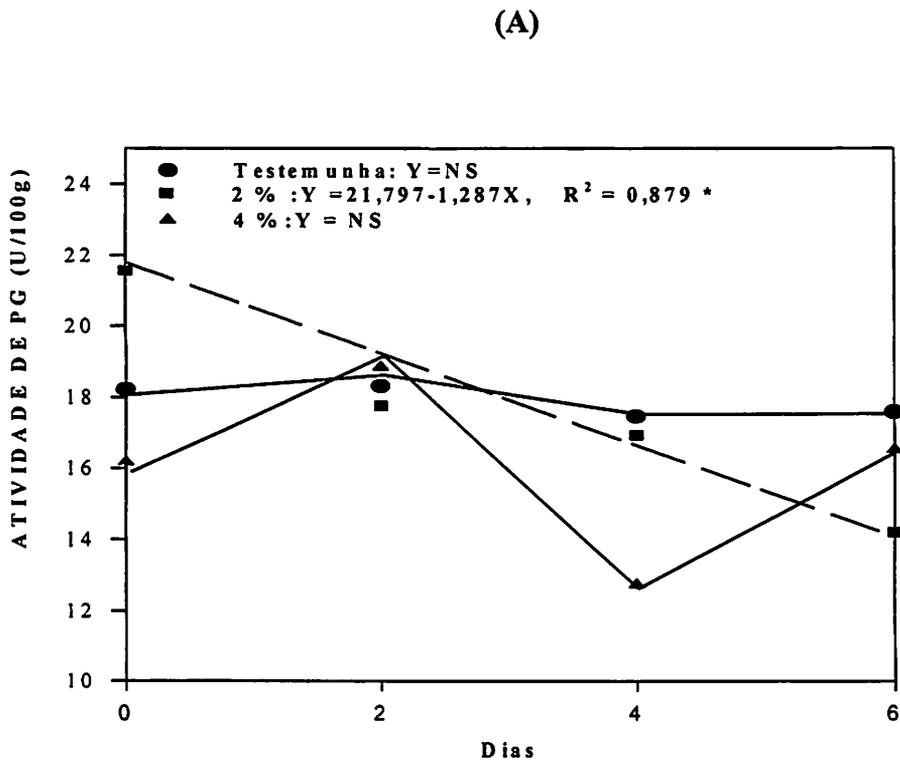


FIGURA 8: Valores médios de atividade da PG de morangos tratados na pré (A) e na pós-colheita (B) com 2 e 4% de CaCl<sub>2</sub> e armazenados durante 6 dias.

solubilização observada nesses mesmos frutos. Da mesma forma, a atividade decrescente da PG nos frutos tratados pré-colheita com 2% de  $\text{CaCl}_2$  e a solubilização crescente nesse mesmo tratamento.

Seymour et al (1987) observaram que a ação da PG não se correlaciona com a solubilização, mas sim com a despolimerização dos poliuronídeos. Entretanto a suscetibilidade das paredes celulares à degradação enzimática é variável, e essa variação pode ser devida a diferenças no teor de substâncias pécticas ou em características estruturais que afetam a interação enzima-substrato, como grau de esterificação e ligações de cálcio (Wallner e Bloon, 1970; Tong e Gross, 1988).

Os valores de atividade de PG encontrados neste estudo (11,27 - 22,71 U/100g) são inferiores aqueles observados por El Zoghbi (23,5 - 36,0).

A atividade da PME aumentou até o 4º dia de armazenamento nos frutos tratados pré-colheita, enquanto a atividade da PG reduziu. Uma possível explicação seria o fato de que a PME é considerada capaz de aumentar a firmeza dos frutos e vegetais pela desesterificação da pectina e subsequente quelação com o cálcio.

Javeri, Toledo e Wicker (1991) aplicando extrato de PME em  $\text{CaCl}_2$  1% à vácuo em pêssegos, observaram que embora a atividade da enzima no fruto tenha aumentado mais de 20 vezes, aumentou também a firmeza da polpa.

Huber (1983a) observou que somente tratando poliuronídeos de morango com extrato enzimático de tomate, havia produção de poliuronídeos solúveis de baixo peso molecular e oligouronídeos. Esta observação veio sugerir a ausência de atividade da exo-poligalacturonase em morango, reforçando a idéia de que a degradação do poliuronídeo pode não ser o fator decisivo no aumento da solubilização de poliuronídeos durante o amadurecimento (Huber, 1984)

morango, reforçando a idéia de que a degradação do poliuronídeo pode não ser o fator decisivo no aumento da solubilização de poliuronídeos durante o amadurecimento (Huber, 1984)

### 3.3.5 Grau de esterificação

A análise de variância mostrou que não houve interação significativa entre época de aplicação de  $\text{CaCl}_2$  e concentrações de cálcio nem com as épocas de armazenamento para a variável Grau de esterificação (Quadro 2 - Anexo). Pelo teste F em ( $P < 0,05$ ) o grau de esterificação das pectinas foi maior nos morangos tratados pré-colheita (14,15%) com  $\text{CaCl}_2$  comparado com aqueles tratados pós-colheita (11,32%).

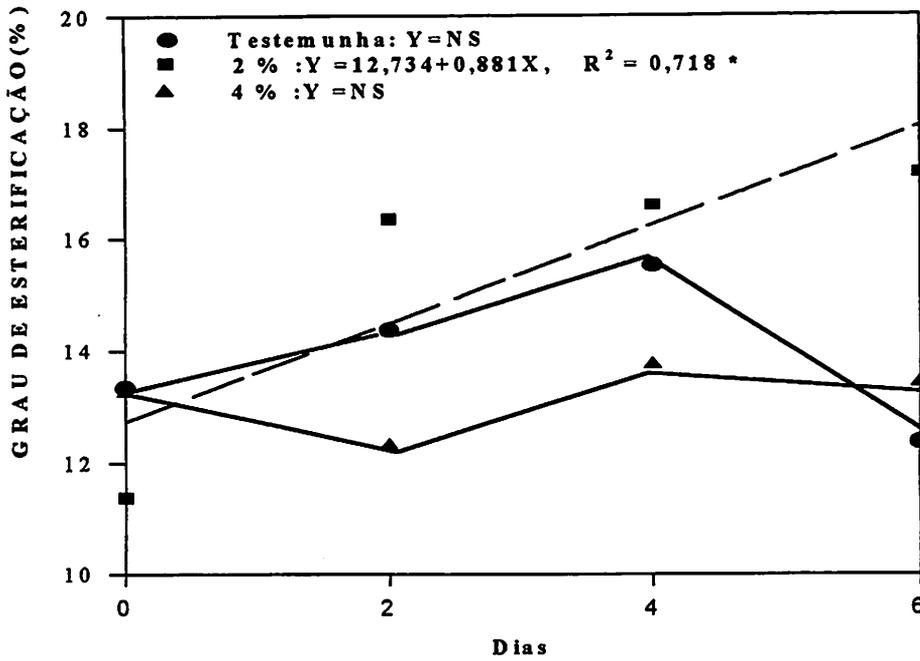
O grau de esterificação dos morangos testemunha apresentou aumento percentual até o 4º dia de armazenamento, reduzindo em seguida (FIGURA 9).

Nos frutos tratados pré-colheita, aqueles tratados com 2% de  $\text{CaCl}_2$  apresentaram maior GE do que aqueles tratados com 4%, sendo que estes últimos, apresentaram o menor GE.

Nos frutos tratados pós-colheita, aqueles tratados com 2% apresentaram pequena redução no GE até o 2º dia, aumentando em seguida. Já os frutos tratados com 4%, o GE aumentou até o 4º dia, reduzindo em seguida.

É interessante notar que os frutos tratados pré-colheita com 2% de  $\text{CaCl}_2$  apresentaram maiores % de cálcio ligado à parede celular, atividade de PME e GE até o 4º dia, entretanto, observa-se menor solubilização de pectinas e redução na atividade da PG durante o mesmo período.

(A)



(B)

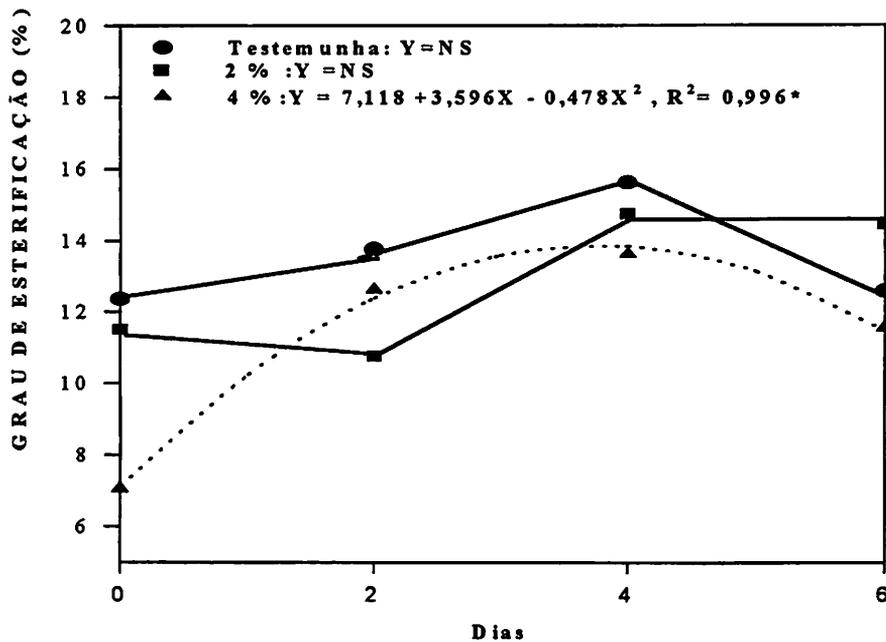


FIGURA 9: Valores médios do grau de esterificação de morangos tratados na pré (A) e na pós-colheita (B) com 2 e 4% de  $CaCl_2$  e armazenados durante 6 dias.

Woodward (1972) e Knee, Sargent e Osborne (1977), mostraram aumento nos níveis de poliuronídeos solúveis durante o amaciamento do morango, entretanto, a natureza exata dessa solubilização ainda é desconhecida. Como a atividade da PG em morangos permanecia duvidosa, Neal (1965) sugeriu que o aumento da metilação dos poliuronídeos possa ser o responsável pela solubilização, uma vez que reduz as ligações de cálcio que estabilizam a estrutura gélica da parede celular.

Embora a literatura tenha observado que o GE reduz durante o amadurecimento de vários frutos, outros estudos mostraram que o grau de esterificação dos poliuronídeos de morango é baixo (14%) e não muda durante seu desenvolvimento.

El Zoghbi (1994) estudando as mudanças bioquímicas de alguns frutos tropicais durante o amadurecimento, observou redução no grau de esterificação de manga, goiaba, tâmara e morango, entretanto, neste e em outros estudos (Lurie et al., 1994), o grau de esterificação foi determinado no material de parede celular no resíduo insolúvel em álcool.

O método empregado neste estudo para determinar o GE (Lurie et al., 1994), quantifica os resíduos de ácido galacturônico envolvidos em ligação éster, não necessariamente metílico. Assim, uma possível explicação para o fato do cálcio ligado, PME e GE terem se mantido elevados nos frutos tratados pré-colheita com 2% , e a pectina solúvel e solubilização de pectinas terem sido menores, seria a hipótese de que outras ligações éster tenham impedido a ação de enzimas hidrolíticas de parede celular.

Uma outra explicação seria a de que, um dos papéis da PME no tecido vivo é catalisar reações de transesterificação, gerando grupos carboxílicos livres para formar ligações éster com

hidroxilas de açúcares neutros. O uronil-éster assim formado manteria o polímero ligado à parede ao invés de torná-lo mais solúvel.

Nos morangos tratados pós-colheita com 2%, a elevação na atividade de PG não resultou em maior porcentagem de solubilização de pectinas e embora nos frutos tratados com 4% a atividade da PG tenha sido menor e praticamente constante, a solubilização das pectinas apresentou aumento gradual durante o período experimental. Assim, parece que existem outros fatores responsáveis por essa solubilização.

Apesar das diferenças na metodologia de extração do material péctico e considerando o estágio de maturação dos frutos estudados, a porcentagem de GE encontrada neste estudo está de acordo com aquela encontrada por El Zoghbi (1994), onde o grau de esterificação para morangos verdes é de 35% caindo para 12% no estágio vermelho.

### 3.3.6 Celulose

A análise de variância mostrou que não houve interação significativa entre os tratamentos para a variável celulose (Quadro 2- Anexo). Em geral não houve perda líquida de celulose durante o experimento.

O tratamento com  $\text{CaCl}_2$  reduziu significativamente o teor de celulose nos morangos tratados com 4% , sendo que o tratamento de 2% não variou significativamente da testemunha.

Considerando que a porcentagem de cálcio ligado à parede celular nos morangos tratados com 4% de  $\text{CaCl}_2$  tenha sido menor que naqueles tratados com 2%, a redução no teor de celulose nesse tratamento pode ser explicada como sendo resultado da maior facilidade de acesso

de outras enzimas degradantes de parede como a celulase. Entretanto, essa suposição contradiz o comportamento da celulose nos frutos testemunha.

Lima (1992) observou que o conteúdo de celulose reduziu nos tomates tratados com cálcio, sendo esta redução proporcional à dose de cálcio aplicada.

TABELA 1: Valores médios de celulose (%) obtidos para morangos tratados com três níveis de  $\text{CaCl}_2$

Cálcio(%)	Celulose
0	30.105 a
2	28.621 a
4	24.500 b

Médias seguidas de mesma letra não variam entre si pelo Teste de Tukey em (  $P < 0,05$  )

Diante das informações controvertidas sobre a atividade da PG e PME no morango, a determinação da celulose neste trabalho visou buscar explicação para o amaciamento do morango durante seu amadurecimento.

Embora a atividade da celulase seja conhecida em morangos, tem-se observado que essa atividade aumenta durante seu amadurecimento, entretanto o maior aumento ocorre do estágio maduro para super maduro (Barnes e Patchett, 1976; Abeles e Takeda, 1990; El Zoghbi, 1994).

Considerando essa possibilidade, talvez possamos explicar porque o morango manteve o teor de celulose durante o armazenamento e aparentemente sua textura, uma vez que a baixa temperatura de armazenamento e a modificação da atmosfera, mantiveram o estágio de

amadurecimento dos frutos durante o período experimental, não favorecendo mudanças na atividade da celulase.

Uma avaliação da atividade da celulase nestes frutos seria recomendada a fim de comprovar essas possibilidades e explicar o comportamento da celulose observado neste estudo.

### **3.3.7 Vitamina C**

Não houve interação significativa entre os níveis de cálcio e épocas de aplicação e com as épocas de armazenamento (Quadro 2 - Anexo). O teor de Vit. C não variou significativamente entre os tratamentos de cálcio.

Main, Morris e Wehunt (1986) tratando morangos com 1 e 2% de nitrato de cálcio por imersão e vácuo, observaram redução no teor de ácido ascórbico com o aumento da concentração de cálcio. Entretanto, dentro da mesma concentração, não houve diferença nos teores quanto à época de aplicação.

Embora os níveis de cálcio estudados não tenham alterado significativamente os teores de Vitamina C nos frutos, os morangos tratados pré-colheita apresentaram maior teor de Vit. C do que aqueles tratados pós-colheita, observando inclusive elevação nesse teor durante e ao final do armazenamento (TABELA 2).

Como o teor de cálcio ligado foi maior nos morangos tratados pré-colheita e não variaram durante o armazenamento, uma explicação para os resultados encontrados neste trabalho seria o efeito do cálcio sobre a manutenção da compartimentalização celular e manutenção da taxa respiratória baixa nos frutos.

A literatura comenta que independente da época de aplicação e do período de armazenamento, o cálcio eleva o conteúdo de Vitamina C dos frutos. Assim, pulverizações de cálcio pré-colheita em pêssegos ou infiltração pós-colheita em maçãs, reduziram significativamente a perda de peso e a respiração durante o armazenamento dos frutos, aumentando o teor de ácido ascórbico e conseqüentemente o de vitamina C (Singh, Gupta e Ghauhan, 1982; Poovaiah, 1986; Glenn, Reddy e Poovaiah, 1988).

TABELA 2: Valores médios de Vitamina C (mg/100g) obtidos para morangos tratados por duas épocas de aplicação de  $\text{CaCl}_2$  e 6 dias de armazenamento.

Época	Época				Média
	0	2	4	6	
Pré-colheita	128,17 Aa	123,13 Ba	109,14 Ba	134,94 Aa	123,84
Pós-colheita	99,82 Bb	112,41 Aa	116,19 Aa	111,39 Ab	109,95
Média	113,72	117,77	112,66	129,17	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey em ( $P < 0,05$ )

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna são estatisticamente iguais pelo teste F em ( $P < 0,05$ )

Os teores médios de Vitamina C encontrados neste estudo (99.82 - 134.94 mg/100g), comprovam a idéia de que o teor dessa vitamina é variável, encontrando-se porém na média observada pela literatura para diferentes cultivares de morango.

### 3.4 CONCLUSÕES

- Os morangos tratados pré-colheita apresentaram maiores porcentagem de cálcio ligado à parede celular, grau de esterificação e conteúdo de vitamina C e menor solubilização de pectinas.
- A maior atividade da poligalacturonase, não resultou em maior solubilização das pectinas.
- A concentração de 2% de  $\text{CaCl}_2$  independente da época de aplicação, produziu frutos com maiores porcentagens de cálcio ligado à parede celular, grau de esterificação e atividade de poligalacturonase, e menor solubilização das pectinas.
- A porcentagem de celulose reduziu com os tratamentos de cálcio, enquanto o conteúdo de vitamina C não sofreu variação com esse tratamento.

#### **4- RESÍDUOS DE BENOMIL EM MORANGO**

## **RESUMO**

### **RESÍDUOS DE BENOMIL EM MORANGOS**

Morangos foram tratados com Benomil (0, 600 e 1200 ppm) pré-colheita por aplicação no solo e pós-colheita por imersão . Os frutos foram colhidos no estágio de maturação 3/4 vermelho , armazenados à 4°C sob atmosfera modificada e analisados quanto aos resíduos de Benomil durante o armazenamento. Os morangos tratados com ambas dosagens de Benomil apresentaram resíduos dentro do LMR recomendado pela legislação. Os resíduos de Benomil não variaram significativamente durante o período experimental.

## **ABSTRACT**

### **RESIDUES OF BENOMYL IN STRAWBERRIES**

Preharvested strawberries were treated with Benomyl (0, 600 and 1200 ppm) applied on the soil and postharvesting immersion. Fruits were harvest in 3/4 red maturation stage and stored in 4°C under modified atmosphere and evaluated for residues of Benomyl during storage. The strawberries treated with both dosages of Benomyl presented residues within the RML recommended by legislation. The residues of Benomyl did not change significantly during the experimental period.

## 4.1 INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos na agricultura tem ajudado a manter o baixo custo e a alta qualidade do suprimento alimentar, aumentando a produção agrícola, reduzindo perdas pré e pós-colheita e doenças transmitidas por vetores. Entretanto, eles constituem fator de risco para o meio ambiente e para a saúde pública, uma vez que podem causar contaminação do solo, das águas superficiais e subterrâneas, a extinção de insetos úteis e a contaminação das cadeias alimentares (Pereira, 1987; Toledo, 1993).

Assim, nos últimos anos, essa contribuição positiva tem sido questionada pela população, ressaltando que, em alguns casos, os efeitos negativos dos agrotóxicos sobre o meio ambiente, superam seus benefícios para com a sociedade (James, Tweedy e Newby, 1993).

O interesse público sobre os resíduos de agrotóxicos nos alimentos tem crescido continuamente, o que tem pressionado as agências e órgãos reguladores a fiscalizar e demonstrar que os alimentos oferecidos à venda apresentam níveis residuais dentro dos limites de tolerância.

Estudos sobre o comportamento residual de pesticidas aplicados pós-colheita em frutos e hortaliças frescos, especialmente durante o armazenamento em atmosfera normal, modificada, controlada ou sob resfriamento, têm sido apresentados somente para poucos compostos e limitado número de frutos e hortaliças (Papadopolou-Mourkidou, 1991).

Um levantamento nacional verificou que 75% dos consumidores estão mais interessados nos resíduos de agrotóxicos nos alimentos, porcentagem esta, que é muito maior do que aqueles interessados nos níveis de colesterol, óleos, aditivos ou outros contaminantes alimentares. O maior fator contribuinte para esse interesse é o possível efeito deletério à saúde devido à exposições por períodos prolongados aos traços de resíduos na dieta (Yoshikawa e Chiba, 1991).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis residuais de Benomil aplicado pré e pós-colheita em morangos sob condições de armazenamento em atmosfera modificada à baixa temperatura.

## **4.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1 Procedência dos morangos**

Os morangos da cultivar Campineiro foram cultivados no Sítio Rio do Peixe, Rodovia 381 Km 12, Município de Cambuí, Minas Gerais. A região se localiza numa altitude de 900 m, a 22° 36' 50" de latitude Sul e 46° 03'40" de longitude W. A região apresenta temperatura e umidade relativa de 20,7° C e 80% com regime pluviométrico em torno de 1436,3 mm e insolação média de 2314,5 horas/ano.

### **4.2.2 Tratamentos**

#### **Pré-colheita:**

Os morangos foram tratados no campo com duas concentrações de Benomil comercial 600 e 1200 ppm e os frutos não tratados serviram como testemunha. O tratamento consistiu em regar o solo ao redor de cada muda de morangueiro com 150 ml da suspensão de Benomil. Foram realizadas 4 aplicações após o pegamento das mudas: duas durante o desenvolvimento vegetativo, uma durante a floração e uma um dia antes da colheita dos frutos.

**Pós-colheita:**

Os morangos não submetidos à aplicação de Benomil durante o seu cultivo, foram imersos pós-colheita em suspensão de 600 e 1200 ppm de Benomil com Tween 0,1% durante 5 minutos, e os frutos testemunha, imersos apenas em água.

Após secagem dos frutos ao ar, eles foram distribuídos em bandejas de isopor de 12 x 12 cm. As bandejas contendo 8 frutos cada, foram revestidas com filme auto adesivo de polietileno (Rollopac), em seguida armazenadas em câmara fria à 4°C e UR  $\pm$ 90%, durante 6 dias. Em ambos tratamentos, os frutos foram colhidos no estágio de maturação  $\frac{3}{4}$  vermelho

**4.2.3 Delineamento estatístico**

O experimento foi conduzido em esquema fatorial 2 (aplicação pré e pós-colheita) x 3 (concentrações) x 4 (épocas de armazenamento) em Delineamento Inteiramente Casualizado, com 2 repetições.

Os resultados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio do programa SANEST- Sistema de Análise Estatística, de autoria de Elio Paulo Zonta e Amauri Almeida Machado, do Instituto Agrônômico de Campinas.

## **4.2.4 Análise de resíduo de Benomil**

### **4.2.4.1 Tratamento das vidrarias**

Antes do uso, as vidrarias foram submetidas à seguinte sequência de limpeza:

- 1- A vidraria permaneceu em imersão por pelo menos 2 horas em solução de extrato alcalino;
- 2- Lavagem e cinco enxagues em água de torneira;
- 3- Lavagem em água bidestilada;
- 4- Secagem das vidrarias e lavagem com acetona p.a
- 5- Após evaporação da acetona, as vidrarias foram protegidas com papel alumínio e guardadas até sua utilização.

### **4.2.4.2 Metodologia**

Utilizou-se o método modificado de Bardalaye e Wheeler (1985) seguindo as seguintes etapas.

- 1- 10 g de polpa foram trituradas em homogeneizador de tecidos TEKMAR, modelo Tissumizer, com 100 ml de acetato de etila durante 2 minutos. O homogenato foi filtrado em papel de filtro Whatman nº5. A vidraria e o resíduo foram lavados 2 vezes com 50 ml de acetato de etila. Ao filtrado adicionou-se 2,5 ml de HCl 1M.

2- O filtrado acidificado foi colocado em funil de separação de 500 ml onde foi lavado 2 vezes com 50 ml de HCl 2M, agitando vigorosamente durante 2 minutos deixando separar as fases orgânica e aquosa, descartando a fase orgânica superior, constituída pelo acetato de etila.

3- A fase ácida foi então particionada 2 vezes com 50 ml de clorofórmio, descartando-o após agitação.

4- O pH da solução ácida foi ajustado para aproximadamente 11,5 com NaOH 10M.

5- Novamente no funil de separação, a solução alcalina foi vigorosamente agitada e particionada com 3 porções de 50 ml clorofórmio, combinando em balão de 250 ml, as fases inferiores constituídas pelo clorofórmio após eluição em sulfato de sódio anidro muflado à 400°C.

6- A amostra foi evaporada em rotavapor à  $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$  até aproximadamente 10 ml.

7- O resíduo de Carbendazim foi retomado no balão com clorofórmio, transferido com auxílio de pipeta de Pasteur para um tubo de centrifuga graduado, evaporado em ar comprimido e retomado o volume para 1 ml com a fase móvel da corrida cromatográfica.

8- As amostras foram filtradas com filtro ISO-DISC P-254 de 25mm diâmetro, membrana 0,45 micrômetro da SUPELCO.

A quantificação foi realizada em Cromatógrafo Líquido LC Star Varian, e os resultados expressos em mg/Kg.

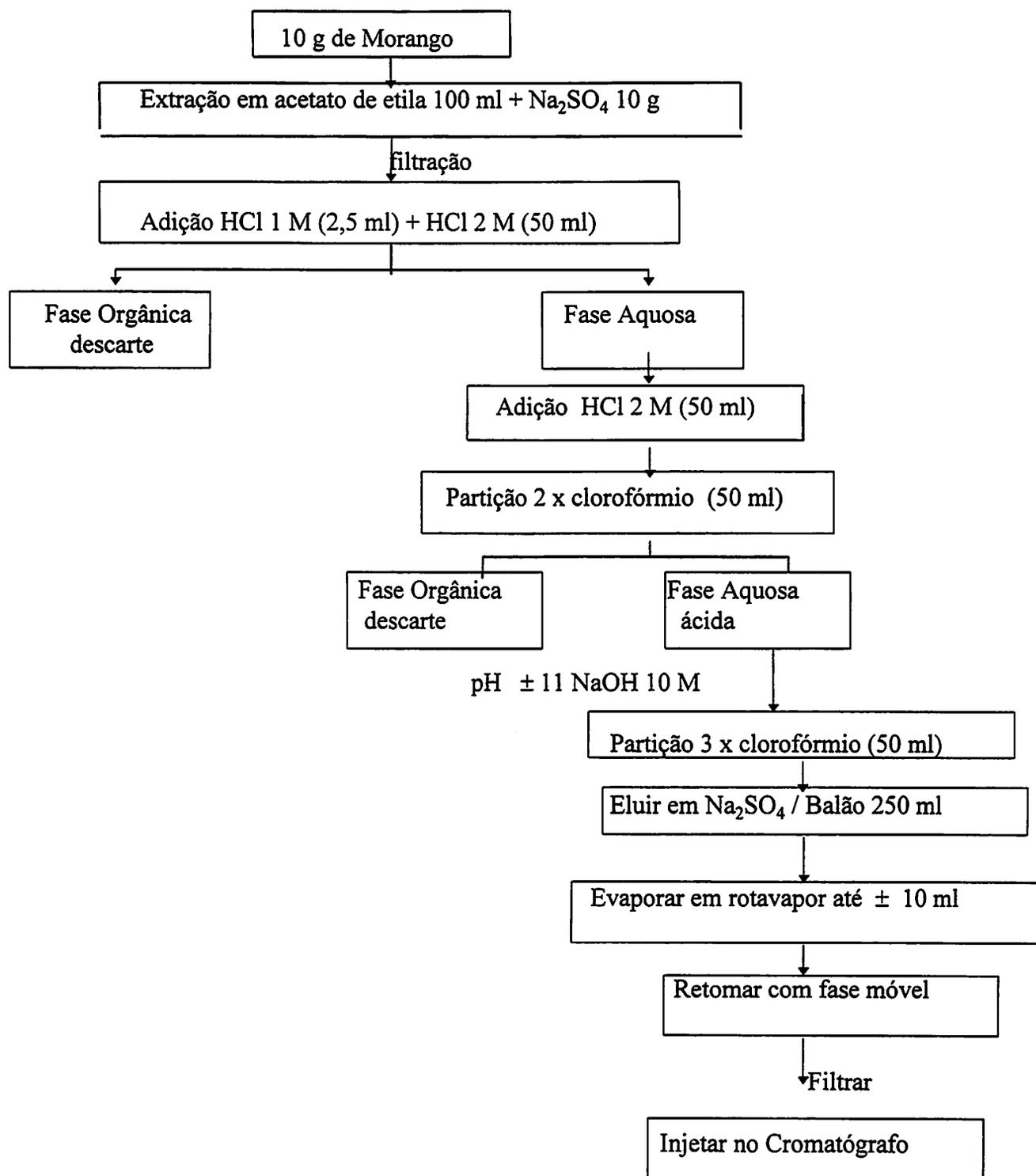


FIGURA 10 : Esquema de extração e *cleanup* de resíduo de Benomil para quantificação em HPLC

#### 4.2.4.3 Condições cromatográficas

- Fase móvel: 250 ml de Metanol : 750 ml Nitrato de Metilamônio 0,025M + ácido nítrico 0,025M (1:1)
- Coluna: Lichrospher 100 RP-18 5 micrômetros; 12,5 cm comprimento x 4 mm diâmetro interno (Merck 50943)
- Fluxo: 0,5 ml/minuto
- Pmax: 200 atm; Pmin: 6 atm
- Atenuação: 0,1 RCDR/AUFS
- Injetor: 10 µl
- Comprimento de onda 286 nm

#### 4.2.4.4 Recuperação de Benomil

Para avaliação da metodologia modificada de Badalaye e Wheeler, 1985, determinou-se antes do início da quantificação das amostras a porcentagem de recuperação. Assim em 10 g da amostra testemunha, livre de Benomil, adicionou-se 1 ml das soluções padrões nas concentrações de 5,0 e 10 mg /Kg de Benomil.

Em seguida, os procedimentos da FIGURA 11 foram seguidos para extração e *cleanup*, e posterior quantificação.

#### 4.2.4.5 Cálculo da concentração

Utilizou-se o método do padrão externo, na faixa de linearidade do Benomil. Para cálculo da concentração de Carbendazim na amostra empregou-se a seguinte equação:

$$C = \frac{Aa \times Va \times Cp \times Vip}{ma \times Via \times Ap} \quad (\text{mg/kg})$$

Onde:

- C = Concentração da amostra (mg/Kg)
- Aa = área do pico da amostra (mm<sup>2</sup>)
- Va = volume da amostra no tubo concentrador (ml)
- ma = massa da amostra submetida à extração (g)
- Via = volume injetado da amostra (microlitros)
- Cp = concentração do padrão (mg/ml)
- Vip = volume injetado do padrão (microlitros)
- Ap = área do pico do padrão (mm<sup>2</sup>)

A concentração de Carbendazim em mg/Kg foi multiplicada por 1,52, que representa a relação entre a massa do Benomil/ massa do Carbendazim, obtendo-se assim, a concentração de Benomil.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes da determinação dos resíduos de Benomil, as vidrarias foram submetidas a lavagem adequada e os reagentes, papéis de filtro e solventes, a tratamento de purificação. Estas providências são necessárias em virtude da possibilidade dos cromatogramas apresentarem picos de substâncias estranhas oriundas de vidrarias contaminadas ou de reagentes, papéis de filtro e solventes não purificados. Estas substâncias interferentes, em geral, podem dificultar a interpretação correta dos cromatogramas, induzindo a erros.

Adaptações da metodologia original de extração do Benomil tornaram-se necessárias, uma vez que foi observado uma série de interferentes no mesmo tempo de retenção do Carbendazim, além do extrato ter se apresentado bastante turvo, o que poderia alterar os resultados.

A extração passou a ser feita somente com acetato de etila. A partição com hexano além de onerosa, não foi satisfatória, pois os interferentes permaneceram na amostra. Assim, adotou-se a partição com clorofórmio segundo Cano, de la Plaza e Muñoz-Delgado (1987), obtendo-se um extrato completamente limpo.

A fase móvel constituída por acetonitrila:água (70:30) foi substituída por [nitrito de tetrametilamônio:ácido nítrico (0,023N : 0,025N)] : [metanol] (75:25) segundo recomendação de

Kirkland, Holt e Pease (1973) e Spittler, Marafioti e Lahr (1984). Assim, ao retomar a amostra no tubo de centrífuga, esta apresentou-se límpida e mais adequada para ser injetada no cromatógrafo.

O método analítico desse trabalho baseou-se na química usada por vários pesquisadores, na qual ocorre a conversão em meio ácido de Benomil para Carbendazim com subsequente determinação desse (Kirkland, Holt e Pease, 1973; Cline, Felsot e Wei, 1981; Spitter, Marafiot e Lahr, 1984; Bardalaye e Wheeler, 1985; Liu et al., 1990; Kiigemegi et al., 1991).

A elevação do pH para aproximadamente 11,0 favoreceu o “cleanup” uma vez que, em meio básico, o carbendazim permanece na fase orgânica.

Quanto às recuperações, os valores encontrados (70% - 106%) (TABELA 3), encontram-se na faixa daqueles determinados por outros pesquisadores para frutos em geral (Kirkland, Holt e Pease, 1973; Bardalaye e Wheeler, 1985; Liu et al., 1990; Kiigemagi et al., 1991). O limite de quantificação foi de 0,5 mg/Kg.

TABELA 3: Recuperações dos resíduos de Benomil em morangos.

Morango massa (g)	Fortificação (mg/Kg)	Recuperação (%)
10	1.0	90
10	1.0	80
10	1.0	70
10	0.5	106
10	0.5	97
10	0.5	85

O resíduo de Benomil variou apenas com a época de aplicação e entre as concentrações aplicadas, havendo efeito da interação entre esses dois fatores (Quadro 3 - Anexo e TABELA 4).

Não houve variação nos níveis residuais de Benomil durante o período de armazenamento estudado. A literatura apresenta resultados comprovando redução considerável dos resíduos de Benomil em morangos e maçãs armazenados a baixa temperatura, embora o período de armazenamento estudado tenha sido mais longo (Kepczynska citado por Papadopoulou-Mourkidou, 1991; Cano, de la Plaza e Muñoz-Delgado, 1987). Entretanto essa redução foi bem menor quando os frutos eram armazenados sob atmosfera modificada.

Kiigemagi et al (1991), tratando pêras pós-colheita com Benomil com e sem cera e armazenando os frutos à 1°C por 6 meses, observaram que nos frutos tratados com cera, não houve variação nos resíduos de Benomil durante o armazenamento, entretanto nos frutos sem cera, os resíduos aumentaram mais de duas vezes do valor inicial, provavelmente devido à desidratação dos frutos, o que levou à concentração dos resíduos.

Papadopoulou-Mourkidou (1991) observou em suas revisões, que a degradação dos resíduos de Benomil, Thiabendazol, Thiofanato-metilico, Carbendazim, Vinclozolim e Captan aplicados pós-colheita, é maior em maçãs armazenadas sob atmosfera normal do que sob condições de atmosfera controlada.

Sabe-se que o Carbendazim é estável em pH ácido e que o pH do morango, também ácido, não variou durante o mesmo intervalo de tempo estudado neste trabalho e sob condições de atmosfera modificada, mantendo-se em valores médios de 3,5 (Scalon et al., 1995, 1996). Tais evidências, podem justificar a não variação dos resíduos deste agrotóxico durante o período experimental.

TABELA 4: Resíduos de Benomil (mg/Kg) em morangos submetidos a tratamentos pré e pós-colheita e armazenados por 6 dias.

Tratamento	Dias de armazenagem	Dose de aplicação (ppm)		
		0	600	1200
Pré-colheita	0	nd	0,654	1,809
	2	nd	0,870	2,014
	4	nd	0,870	1,908
	6	nd	0,900	1,730
Média		nd	0,823 Bb	1,866 Aa
Pós-colheita	0	nd	1,611	1,835
	2	nd	2,095	1,919
	4	nd	2,010	2,013
	6	nd	2,004	2,015
Média		nd	1,930 Aa	1,945 Aa

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna são estatisticamente iguais pelo teste F (P,0,05)

nd - não detectado (abaixo do limite de quantificação)

Os morangos tratados com Benomil pré-colheita, na forma de suspensão no solo, apresentaram menor resíduo que aqueles tratados por imersão pós-colheita.

O Benomil aplicado no solo é absorvido por ação sistêmica, via sistema radicular e vasos condutores (Nilchonsom et al., 1972; Siegel, 1973; Jordan, 1973; Ben-Aziz et al., 1974). Esse procedimento de aplicação deixa o agrotóxico exposto à ação do meio ambiente por um período prolongado sofrendo ação degradante de fatores bióticos e abióticos. Já na imersão dos frutos em suspensão do agrotóxico, este é absorvido por contato, sendo que, esta suspensão envolve o fruto por inteiro, e a absorção ocorre de maneira mais homogênea e mais rapidamente, não havendo interferência do meio ambiente.

Provavelmente estas diferenças de disponibilidade e absorção, possam explicar a diferença nos níveis residuais de Benomil nos morangos em função da época de aplicação.

Os efeitos da interação entre época de aplicação e concentração de Benomil aplicados, mostram que os resíduos do agrotóxico aplicado no campo foram proporcionais às concentrações aplicadas. Entretanto, nos frutos tratados por imersão, não houve diferença residual entre as concentrações.

O Benomil formulado em pó-molhável forma uma suspensão em água. Assim, pode ter havido diferença na concentração do produto provocada por precipitação do Benomil no recipiente de imersão, levando a uma concentração menor do que a esperada. A suspensão 600 ppm por ser menor que a de 1200 ppm, poderia estar mais homogênea. Na aplicação no campo, a suspensão foi submetida a constante agitação, o que favoreceu manter a homogeneidade.

A boa prática agrícola recomenda uma concentração de 600 ppm de Benomil aplicado via pulverização foliar, para controlar uma série de doenças do morangueiro. Observamos neste trabalho que nos morangos tratados pré-colheita, exceto aos 2 dias de armazenamento, o nível residual encontrado nos frutos tratados com 1200 ppm está dentro do limite estabelecido pela legislação, a qual determina um limite máximo de resíduo (LMR) de 2 mg/Kg de Benomil em morango (Brasil, 1990). Entretanto, embora não tenha havido diferença significativa entre as épocas avaliadas, os morangos tratados por imersão apresentaram resíduos um pouco acima do LMR, após o 2º dia para 600 ppm e 4º dia para 1200 ppm.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, observa-se que a dosagem recomendada pelo receituário agrônômico para pulverizar a cultura do morangueiro, deixa resíduos nos frutos dentro do LMR mesmo quando o Benomil é aplicado no solo.

No tratamento pós-colheita, muitas vezes necessário como tratamento fitossanitário complementar, deveria ser utilizado uma concentração inferior àquela recomendada para pulverização, considerando que são necessárias aplicações de pesticidas no campo durante a produção, conforme observado neste trabalho, onde foram necessárias aplicações de ditiocarbamatos para controlar doenças fúngicas que surgiram nas parcelas não tratadas. Assim, aplicações de Benomil durante a produção e na pós-colheita, forneceriam níveis residuais cumulativos, que certamente iriam ultrapassar o LMR permitido.

#### **4.4 CONCLUSÕES**

Nas condições em que o experimento foi realizado, os resultados encontrados permitem concluir que:

- As concentrações de Benomil independente da época de aplicação, deixaram resíduos nos frutos dentro do limite recomendado pela legislação.
- Os frutos tratados com 600 ppm de Benomil aplicado pré-colheita apresentaram a metade dos resíduos encontrados naqueles tratados com 1200 ppm.
- Os resíduos de Benomil não variaram durante os 6 dias de armazenamento.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo procurou conciliar tratos culturais pré e pós-colheita e mecanismos bioquímicos, que regulam as principais alterações responsáveis pela degradação do fruto durante o amadurecimento. Como o morango é um fruto altamente perecível, recomenda-se o mínimo de manuseio pós-colheita afim de evitar injúrias e conseqüentemente, aceleração da maturação, que causam grandes perdas de produção.

Um aspecto importante a ser ressaltado é o fato de ter-se armazenado os frutos tratados com cálcio por apenas 6 dias, uma vez que, a literatura mostra ser possível armazenar morangos por até 28 dias. Entretanto, o objetivo deste estudo não foi prolongar a vida útil dos morangos, mas sim, relacionar o comportamento dos resíduos de Benomil e o efeito das aplicações de cálcio em morangos, sob condições de atmosfera modificada e à 4° C. Um prolongamento no período de armazenamento poderia impedir a detecção dos resíduos que segundo a literatura, reduzem durante o armazenamento dos frutos. Assim, sabendo-se o período mínimo para que os resíduos de Benomil alcancem valores permitidos, pode-se prolongar a vida útil dos frutos, garantindo sua qualidade toxicológica.

Como o comportamento da PME e PG não explicaram a solubilização de pectinas, estudos posteriores deveriam ser desenvolvidos com outras enzimas de parede celular visando conhecer melhor o processo de amaciamento do morango.

Visualmente os frutos tratados e testemunha não apresentaram diferenças após os 6 dias de armazenamento, embora química e bioquimicamente, tenha-se detectado diferenças significativas.

Considerando os altos custos despendidos nessa cultura e visando melhorar a qualidade e durabilidade dos frutos pós-colheita, os resultados obtidos mostraram que as aplicações de cálcio foram eficientes na alteração de alguns parâmetros envolvidos no amadurecimento dos frutos. Embora esse íon não seja dos mais onerosos, baseado nos resultados encontrados neste estudo, concentrações de 2% poderiam ser recomendadas e aplicadas via pulverização no campo, sem alterar significativamente os custos, principalmente levando em consideração a relação custos/benefícios trazida pela sua utilização.

Infelizmente, não foi possível realizar um estudo sobre a incidência de *Botrytis cinerea* nos morangos deste trabalho, uma vez que a produção sofreu grandes perdas no campo causada por outros patógenos, o que reduziu grandemente a disponibilidade de frutos. Assim, um estudo posterior relacionando os níveis residuais de Benomil em diferentes concentrações e incidência de doenças pós-colheita, seria necessário para se determinar a concentração desse pesticida recomendada para proteger os frutos, sem ultrapassar os LMR nos casos de efeito cumulativos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELES, F.B.; TAKEDA, F. Cellulase activity and Ethylene in Ripening Strawberry and Apple Fruits. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.42, p.269 - 275, 1990.
- ALONSO, J.; RODRIGUEZ, T.; CANET, W. Effect of calcium pretreatments on the texture of frozen cherries. Role of pectinesterase in the changes in the pectic materials. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington , v.43, n. 4, p.1011-1016, abr, 1995.
- ALVES, R.E. *Acerola (Malpighia emarginata D.C.): Fisiologia da maturação e armazenamento refrigerado sob atmosfera ambiente e modificada*. Lavras:ESAL, 1993. 99p. (Dissertação- Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- ANDERSON, J.L.; CAMPBELL, W.F. Calcium transport and ATPase activity in microsomal vesicle fraction from montmorency som cherry fruit. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.398, p.47-57, 1995.
- BACIC, A.; HARRIS, P.J.; STONE, B.A. Structure and function of plant cell walls. In: PREISS, J. (ed) **The biochemistry of plants: a comprehensive treatise**. Carbohydrates. Londres: Academic Press, 1988. v.14, p.297-371.
- BANGERT, F.; DIRLEY, D.R. ; DEWEY, D.H. Effect of postharvest calcium treatments on international breakdown and respiration of apple fruits. **Journal American for Horticultural Science**, Mount, v.97, n.5, p.679-682, set, 1972.
- BARDALAYE, P.C.; WHEELER, W.B. Simplified method for the cleanup and reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of Benomyl in Mangoes. **Journal Chromatographic**, Amsterdam, v.330, p.403 - 407, 1985.
- BARNES, M.F.; PATCHETT, B.J. Cell wall degrading enzymes and the softening of senescent strawberry fruit. **Journal of Food Science**, Chicago, v.41, n.6, p.1392 - 1395, 1976.
- BARRIT, B.H. Resistance of strawberry clones to *Botrytis* fruits rot. **Journal American Society Horticultural Science**, Alexandria, v.105, n. 2, p.160-64, mar, 1980.

- BARTLEY, I.M.  $\beta$ -Galactosidase activity in ripening apples. **Phytochemistry**, Oxford, v.13, n.8, p.2107-2111, aug, 1974.
- BATERMAN, D.F. ; LUMSDEN, R.D. Relation of calcium content and nature of the pectic substances in bean hypocotyls of different ages to susceptibility to an isolate of *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, St. Paul, v.55, p.734-738, 1965.
- BEN-AZZIZ, A.; AHARONSON, N. Dynamics of uptake, translocation, and disappearance of thiabendazole and methyl-2- benzimidazolecarbamate in pepper and tomato plants. **Pesticide Biochemistry and physiology**, London, v.4, n.2, p.120-126, jun, 1974.
- BEN-AZZIZ, A.; SACHS, M.; AHARONSON, N. ; IZSAK, F. Systemic fungicides in strawberry field control of fruit rot (*Botrytis cinerea* Pers.) and residue study. **Phytoparasitica**, Bel Dagan, v.2, n.2, p.135-139, 1974.
- BERBARI, S.A.G. **Avaliação da qualidade de algumas variedades de morango para o processo de congelação**. Piracicaba:ESALQ, 1992. 90p. (Dissertação - Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial)
- BIGGS, A.R.; INGLE, M., SOLIHATI, W.D. Control of *Alternaria* infection of fruit of apple cultivar Nittany with calcium chloride and fungicides. **Plant Disease**, St. Paul, v.77, n.10, p.976-980, 1993.
- BISSOLI JUNIOR, W. **Qualidade de mangas (*Mangifera indica* L. cv. "Tommy Atkins") sob influência da pulverização pré colheita dos frutos com cálcio e boro**. Lavras:ESAL, 1992, 95p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- BITENCOURT, A.L.; SCALON, S.P.Q.; CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. Aplicação pós-colheita de  $\text{CaCl}_2$  em morango (*Fragaria ananassa* Duch. cv. Sequóia): Avaliação da qualidade e da vida útil dos frutos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5, Lavras, 1995. **Resumos...** Lavras:UFLA, 1995.
- BLANKE, M.M.; LENZ, F. Fruit photosynthesis. **Plant cell & environment**, Oxford, v.12, p.31-46, 1989.
- BLEINROTH, E.W. Colheita, embalagem e conservação do morango. In: SIMPOSIO SOBRE A CULTURA DO MORANGUEIRO, 1, Cabreúva, 1986. **Anais...** Jaboticabal: FCAVJ/UNESP, 1986, p.89-103.
- BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. **Analytical Biochemistry**, New York, v.54, p.484-489, 1973.

- BRAMLAGE, W.Y.; DRAKE, M. ; LORD, W.Y. The influence of mineral nutrition on quality and storage performance of pome fruit grown in North American. *Acta Horticultural*, The Hague, v.92, p.29-39, 1980.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n.37 de 30 de Outubro de 1990. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 31 de Outubro de 1990. Seção I.
- BRETT, C.; WALDRON, K. **Physiology and biochemistry of plant cell walls**. London: Unwin Hyman, 1990. 193p.
- BRUNE, W.; BATISTA, C.M.; SILVA, D.O.; FORTES, J.M. & PINHEIRO, R.V.A. Sobre o teor de Vit C em mirtáceas. *Revista Ceres*, Viçosa, v.13, n.14, p.123-33, ago/set, 1966.
- BURNS, J.K. ; PRESSEY, R.  $Ca^{+2}$  in cell walls of ripening tomato and peach. *Journal Americam Society Horticultural Science*, v.112, n.5, p.785-787, set, 1987.
- CALMON, J.P.; SAYAG, D.R. Instability of Methyl 1(Butylcarbamoil)-2-Benzimidazolecarbamate (Benomyl) in various solvents. *Journal Agricultural Food Chemistry*, Washington, v.24, n.2, p.426-428, nov, 1976.
- CAMPBELL, W.F.; ANDERSON, J.L.; WALKER, D.R. Calcium uptake in sealed plasmalemma vesicles isolated from post-harvest  $CaCl_2$  treated sour cherries. *HortScience*, Alexandria, v.27, n.6, p.677- 680, jun, 1992.
- CANO, P.; DELA PLAZA; DELGADO, L.M. Determination and persistence of several fungicides in Postharvest-treated Apples during their cold storage. *Journal Agricultural Food Chemistry*., Washington, v.35, n.1, p.144-147, jan, 1987.
- CASTELLANE, P.D. Nutrição e adubação da cultura do morango (*Fragaria spp*). SIMPOSIO SOBRE A CULTURA DO MORANGUEIRO,1, Cabreúva, 1986. **Anais...** Jaboticabal: FCAVJ/UNESP, 1986. p.22-42.
- CASTELLANE, P.D. Nutrição e adubação do morangueiro. In: FERREIRA, M.E.; CASTELLANE, P.D.; CRUZ, M.C.P. **Nutrição e Adubação de Hortaliças**, Anais do Simpósio sobre Nutrição e Adubação de hortaliças. Jaboticabal, 1990. **Anais....**Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1993. p.261-279.
- CHEOUR, F.; WILLWMOT, C.; ARUL, J.; DESJARDINS, Y.; MAKHLOUF, J.; CHAREST, P.M. ; GOSSELIN, A. Foliar application of calcium chloride delays postharvest ripening of Strawberry. *Journal Americam Society Horticultural Science*., Alexandria, v.115, n.5, p.89-92, set, 1990.

- CHEOUR, F.; WILLWMOT, C.; ARUL, J.; MAKHLOUF, J. ; DESJARDINS, Y. Postharvest response of two Strawberry cultivars to foliar application of CaCl<sub>2</sub>. **Hortscience**, Alexandria, v. 26, n.91, p.1186-1188, nov, 1991.
- CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: Fisiologia e manuseio**. Lavras:ESAL/FAEPE, 1990. 320 p.
- CHUNG, H.D.; KANG, K.Y.; YUN, S.J.; KIN, B.Y. Effect of foliar application of calcium chloride on shelf-life and quality of strawberry fruits. **Journal of the Korean Society for Horticultural Science**, v.34, n.1, p.7-15, 1993.
- CLEMENS, G.P. ; SISLER, H.D. Formation of a fungitoxic derivative from benlate. **Phytopathology**, St. Paul, v.59, n. 5, p.705-706, may, 1969.
- CLINE, S.; FELSOT, A.; WEI, L. Determination of methyl 2-Benzimidazolylcarbamate in black walnut fruit. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v.29, n.5, p.1087-1088, set, 1981.
- CLINE, J.A.; HANSON, E.J. Relative humidity around apple fruit influences its accumulation of calcium. **Journal American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.117, n.4, p.542-546, jul, 1992.
- CONWAY, W.S. , SAMS, C.E. The effect of postharvest infiltration of calcium, magnesium, or strontium on decay, firmness, respiration, and ethylene production in apples. **Journal American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.112, n.3, p.300-303, may, 1987.
- CONWAY, W.S.; SAMS, C.E.; WATADA, A.E. Relationship between total and cell wall bound calcium in apples following postharvest pressure infiltration of calcium chloride. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.398, p.31-39, 1995.
- d' AMOUR, J.; GOSSELIN, C.; ARUL, J.; CASTAIGNE, F.; WILLEMOT, C. Gamma-Radiation affects cell wall composition of strawberries. **Journal of Food Science**, Chicago, v.58, n.1, p.182-185, jan, 1993.
- DISHE, Z. Color reaction of carboidrates. In: WHISTLER, R.L.; WOLFRAN, M.L. **Methods in carbohydrates chemistry**, New York: Academic Press, 1962. v.1, p.477-512.
- EL-ANSARY, M.M.; AYAAD, H.M.; EL-MORSHEDEH, F. The effect of spraying and postharvest treatment with calcium chloride on the fruit quality changes of " Anna" apples during cold storage at 4 °C. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.368, p.83-88, 1994.

- ECKERT, J.W. ; RATNAYAKE, M. Host-pathogen interactions in postharvest diseases. In: LIEBERMAN, M. (ed) **Post-harvest physiology and crops preservation**, New York, Academic Press, 1983. p.52-68.
- EL-ZOGHBI, M. Biochemical changes in some tropical fruits during ripening. **Food Chemistry**, Essex, v.49, p.33-37, 1994.
- EMPRESA DE ASSISTENCIA TECNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS. **Relatório anual de acompanhamento de safras**. Belo Horizonte,1993. 8p.
- FAUST,M.; SHEAR, C.B. The effect of calcium on respiration of apples. **Journal American Society for Horticultural Science**, Mount, v.97, n.4, p.437-439, jul, 1972.
- FILS-LYCAON, B.; BURET, M. Loss of firmness and changes in pectic fractions during ripening and overripening of sweet cherry. **HortScience**, Alexandria, v.25, n. 7, p. 777-778, jul, 1990.
- FISHER, M.; ARRIGONI, E.; AMADO, R. Canges in pectic substances of apples during development and postharvest ripening part 2: Analysis of the pectic fractions. **Carbohydrate Polymers**, London, v.25, p.167-175, 1994.
- FISHER, R.L.; BENNETT, A.B. Role of cell wall hydrolyses in fruit ripening. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.42, p.675-703, 1991.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Pesticide residues in food: 1984, Evaluations**. v.67, p.355- 373.
- FRY, S.C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.37, p.165-186, 1986.
- GARCIA, J.M.; HERRERA, S.; MORILLA, A. Effects of Postharvest Dips in Calcium Chloride on Strawberry. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v.44, n.1,p.30-33, jan, 1996.
- GARNIER, C.; AXELOS, M.A.V.; THIBAUT, J.F. Selectivity and cooperativity in the binding of calcium ions by pectins. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.256, p.71-81, 1994.
- GERASOPOULOS, D.; CHOULIARAS, V.; LIONAKIS,S. Effects of preharvest calcium chloride sprays on maturity and storability of Hayward kiwifruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.7, p.65-72, 1996.

- GIOVANNONI, J.J.; DELLPENNA, D.; BENNETT, A.B.; FISHER, R.L. Expression of a chimeric polygalacturonase gene in transgenic rin (ripening inhibitor) tomato fruit results in polyuronide degradation but not fruit softening. **The Plant Cell**, Rockville, v.1, n.1, p.53-63, Jan. 1989.
- GLENN, G.M.; REDDY, A.S.N.; POOVAIAH, B.W. Effect of calcium cell wall structure protein phosphorylation and protein profile in senescing apples. **Plant cell physiology**, Kyoto, v.29, n.4, p.565-572, jun, 1988.
- GOODENOUGH, P.H.; ATKIN, R.K. **Quality in stored and processed vegetables and fruit**. London: Academic Press, 1981. 51p.
- GROSS, K.C. Fractionation and partial characterization of cell walls from normal and ripening tomato fruit. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.62, n.1, p.25-32, Sept. 1984.
- GROSS, K.C. Recent developments on tomato fruit softening. **Postharvest News and information**, v.1, p.109-112, 1990.
- GROSS, K.C.; SAMS, C.E. Changes in cell wall neutral composition during fruit ripening: a species survey, **Phytochemistry**, Oxford, v.23, n.11, p.2457-2461, nov, 1984.
- GROSS, K.C; WALLNER, S.J. Degradation of cell wall polysaccharides during tomato fruit ripening. **Plant Physiology**, Baltimore, v.63, n.1, p.117-120, July 1979.
- GUAN, X.; DAVIS, M.R.; JIN, L.; BAILLIE, T.A. Identification of S-(n-Butylcarbamoyl)glutathione, a reactive carbamoylating agent, as biliary metabolite of benomyl in the rat. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v.42, n.12, p.2953-2957, dez, 1994.
- HARDENBURG, R.E. ; ANDERSON, R.E. Keeping qualities of "Stayman" and "Delicious" apples treated with calcium chloride, scald inhibitors and other chemicals. **Journal American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.106, n.6, p.776-779, dez, 1981.
- HEPPLER, P.K. ; WAYNE, R.O. Calcium and plant development. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v.36, p.397-439, 1985.
- HIMELRICK, D.G.; McDUFFIE, R.F. The calcium cycle: uptake and distribution in apples trees. **HortScience**, Alexandria, v.18, n.2, p.147-151, fev, 1983.
- HUBER, D.J. Polyuronide degradation and hemicelulose modifications in ripening tomato fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.108, n.3, p.405-409, May 1983a.

- HUBER, D.J. The role cell wall hydrolases in fruit softening. **Horticultural Reviews**, v.5,p.169-219, 1983b.
- HUBER,D.J. Strawberry fruit softening : The potential roles of polyuronides and hemiceluloses. **Journal of Food Science**, Chicago, v.49, n. 5, p.1310-1315,Sep/Oct. 1984.
- HULME, A.C. **The biochemistry of fruit and their products**. London: Academic Press, 1971.V.2, 780p.
- ISLAN, M.N.; COLON. T.; VARGAS, T. Effect of prolonged solar exposure on the vitamin C contents of tropical fruits. **Food Chemistry**, Essex, v.48, p.75-78, 1993.
- ITAK, J.A.; SELISKER, M.Y.; JOURDAN, S.W.; FLEEKER, J.R.; HERZOG, D.P. Determination of Benomyl (as carbendazim) and Carbendazim in Water, soil and fruit juice by Magnetic particle - based immunoassay. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v.41, n.12, p.2329-2332, dez, 1993.
- JAMES, V.R.; TWEEDY, B.G.; NEWBY, L.C. Efforts by industry to improve the environmental safety of pesticides. **Annual Review of Phytopathology**,St. Paul, v.31, p.423-439, 1993.
- JAVERI, H.; TOLEDO, R.; WICKER, L. Vacuole infusion of citrus pectinmethylesterase and calcium effects on firmness of peach. **Journal of Food Science**, Chicago,v.56, n.3, p.739-742, may, 1991.
- JEN, J.J. ; ROBINSON, M.L.P. Pectolytic enzymes in sweet bell peppers (*Capsicum annum L.*). **Journal Food Science**, Chicago, v.49,n.4, p.1045-1087, jul, 1984.
- JIMENEZ, J.J.; ATIENZA, J.; BERNAL, J.L.; TORIBIO, L. Determination of carbendazim in lettuce samples by HPLC , **Chromatographia**, New York, v.38, n.5/6, p.395-399, 1994.
- JOHN, M.A.; DEY, P.M. Postharvest changes in fruit cell wall. **Advances in Food Research**, Orlando, v.30, p.139-193, 1986.
- JORDAN, V.W.L. The modes of action of two benzimidazoles and thiophanate-methyl used for the control of *Verticillium* wilt of strawberry. **Annals of Applied Biology**, Essex, v.75, n.1, p.41, 1973.

- KAWAR, N.S.; BATISTA, G.C. de; GUNTHER, F.A. Pesticide stability in cold-stored plants parts, soils, and dairy products, and in cold-stored extractives solutions. In: GUNTHER, F. A.; GUNTHER, J.D., (eds). **Residue Reviews: residues of pesticides and other contaminants in the total environment**. New York: Spring-Verlag, 1973. v.48, p.45-77.
- KEEGTRA, K.; TALMADGE, K.W.; BAUER, W.D.; ALBERSHEIN, P. The structure of plant cell walls. 3. A model of the walls suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. **Plant Physiology**, California, v.51, n.1, p. 188, jan, 1973.
- KIIGEMAGI, U.; INMAN, R.D.; MELLENTHIN, W.M.; DEINZER, M.L. Residues of benomyl (determined as carbendazim) and captan in postharvest-treated pears in cold storage. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v.39, n.3, p. 400-403, mar,1991.
- KIRKLAND, J.J.; HOLT. R.F.; PEASE, H.L. Determination of Benomyl Residues in Soils and Plant Tissues by High-Speed Cation Exchange Liquid Chromatography. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v.21, n.3, p.368-371, mar, 1973.
- KNEE, M.; BARTLEY, I.M. Composition and metabolism of cell wall polysaccharides in ripening fruits. In: FRIEND, J.; RHODES, M.J.C. (ed). **Recent advance in the biochemistry of fruits and vegetables**. Londres: Academic Press, 1981. cap.7, p.131-146.
- KNEE,M.; SARGENT, J.A,; OSBORNE, D.J. Cell wall metabolism in developing strawberry fruits.**Journal Experimental Botany**, Londres, v.28, n.103, p.377-396, apr, 1977.
- LABAVITCH, J.M. Cell wall turnover in plant development. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.32, p.385-406, 1981.
- LESTER, G. Calcium alters senescence rate of postharvest muskmelon fruit disks. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.7, p.91-96, 1996.
- LIDSTER, P.D.; PORRITT, S.W.; TUNG, M.A. Texture modification of " Van" Sweet cherries by postharvest calcium treatments. **Journal American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.103, n. 4, p.527-530, jul, 1978.
- LIMA, L.C.O. **Bioquímica da parede celular de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill)cv. Santa clara: transformações e interações com o cálcio durante a maturação**. Lavras: ESAL, 1992, 100p. (Dissertação de Mestrado em Ciência dos Alimentos)
- LINK, H. Ca-uptake and translocation by plants with special regard to apple trees. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.45, p.53-64, 1974.

- LISBAO, R.S. **Diagnóstico e programa de pesquisa de hortaliça**. Campinas, Instituto Agrônômico de Campinas, 1991. p.53.
- LIU, C.H.; MATTERN, G.C.; YU, X.; ROSEN, J.D. Determination of Benomyl by High-Performance liquid chromatography, Mass spectrometry/Selected ion monitoring. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v.38, n.1, p.167-171, 1990.
- LUCAS, S. Morango - um negócio saboroso. **Guia Rural**, São Paulo, v.3, n.82, p.4-6, mar, 1989.
- LURIE, S.; LEVIN, A.; GREVE, C.; LABAVITCH, J.M. Pectic polymer changes in nectarines during normal and abnormal ripening. **Phytochemistry**, Oxford, v.36, n.1, p.11-17, jan, 1994.
- MAIN, G.L.; MORRIS, J.R.; WEHUNT, E.J. Effect of preprocessing treatments on the firmness and quality characteristics of whole and sliced strawberries after freezing and thermal processing. **Journal of Food Science**, Chicago, v.51, n.2, p.391-394, fev, 1986.
- MALIS-ARAD, S.; DIDI, S.; MIZRAHI, Y.; KOPELIOVITCH, E. Pectic substances: changes in soft and firm cultivars and in non-ripening mutants. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.58, n.1, p.111-116, 1983.
- MANESS, N.O.; RYAN, J.D.; MORT, A.J. Determination of the degree of methyl esterification of pectins in small samples by selective reduction of esterified galacturonic acid to galactose. **Analytical Biochemistry**, New York, v.185, p.346-352, 1990.
- MANGAS, J.J.; DAPENA, E.; RODRIGUEZ, M.S.; MORENO, J.; GUTIERREZ, M.D.; BLANCO, D. Changes in pectic fractions during ripening of cider apples. **HortScience**, Alexandria, v.27, n.4, p.328-330, apr, 1992.
- MANNING, G. Soft fruit. In: SEYMOUR, G.B.; TAYLOR, J.E.; TUCKER, G.A. (ed) **Biochemistry of fruit ripening**, Londres: Chapman & Hall, 1993, cap.12, p.347-378, 1993.
- MARKOVIK, O.; KOHN, R. Mode of pectin deesterification by *Trichoderma reesei* pectinesterase. **Experientia**, Basel v.40, p.842-843, 1984
- MENEZES, J.B. **Qualidade pós-colheita de melão tipo 'Galia' durante a maturação e o armazenamento**. Lavras:UFLA, 1996. (Tese doutorado em Ciência dos Alimentos)
- MENGUEL, K.; KIRKBY, E.A. **Principles of plant nutrition**. Worthangen-Bern:International Potash Institute, 1982. 576p.

- Mc COLLUM, T.G.; HUBER, D.J.; CANTALIFFE, D.J. Modification of polyuronides and hemicelluloses during muskmelon fruit softening. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.76, n.3, p.303-308, May 1989.
- McCREADY, R.M.; McCOMB, E.A. Extraction and determination of total pectic materials. **Analytical chemistry**, Washington, v.24, n.12, p.1586-1588, dez, 1952.
- MITCHAM, E.J.; GROSS, K.C.; NG, T.J. Ripening and cell wallsynthesis in normal and mutant tomato fruit. **Phytochemistry**, Oxford, v.30, n.6, p.1777-1780, jun, 1991.
- MOOTOO, A. Effect of post-harvest calcium chloride dips on ripening changes in julie mangoes. **Tropical Science**, Londres, v.31, n.3, p.243-48, aug, 1991.
- MORRIS, J.R.; MAIN, G.L. and SISTRUNK, W.A. Relationship of treatment of fresh Strawberries to the quality of frozen fruit and preserves. **Journal Food Quality**, Westport, v.14, n.6, p.467-479, dez, 1991.
- MORRIS, J.R.; SISTRUNK, W.A.; SIMS, C.A; MAIN, G.L.; WEHUNT, E.J. Effect of cultivar, postharvest storage, preprocessing dip treatments and style of pack on the processing quality of strawberries. **Journal Americam Society Horticultural Science**, Alexandria, v.110, n.2, p.172-177, mar, 1985.
- MOUSTACAS, A.; NARI, J.; BOREL, M.; NOAT, G.; RICARD, J. Pectin methylesterase, metal ions in plant cell-wall extension. **Biochemitry Journal**, London, v.279, p.351-354, 1991.
- NARI, J.; NOAT, G.; RICAD, J. Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-walls extension. **Biochemistry Journal**, London, v.279, p.343-350, 1991.
- NEAL, G.E. Changes occurring in the cell wall of strawberries during ripening. **Journal of the Science of Food and Agricultural**, Londres, v.16, p.604-611, Jul/Dez 1965.
- NELSON, N.A. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v.15, n.1, p.375-380, 1944.
- NOGATA, Y.; OHTA, H.; VORAGEN, A.G.J. Polygalacturonase in Strawberry fruit. **Phytochemistry**, Oxford, v.34, n.3, p. 617 - 620, oct, 1993.
- NICHOLSON, J.F.; SINCLAIR, J.B.; WHITE, J.C.; KIRKPATRIK, B.L. Upward and lateral translocation of benomil in strawberry. **Phytopathology**, St.Paul, v.62, n.10, p.1183-1185, oct, 1972.

- NUNES, L.A.L. Legislação nacional e internacional sobre pesticidas. In: YOKOMIZO, YURICO. **Seminário de resíduos de pesticidas**, Campinas: ITAL, 1989. p. 29-31.
- OCHEI, C.O.; BASIOUNY, F.M.; WOODS, F.M. Calcium-mediated postharvest changes in storageability and fruit quality of peaches. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Delan, v.106, p.266-269, oct, 1993.
- OLIVEIRA, J.J.V.; TOLEDO, M.C.F. Resíduos de Agrotóxicos em Morangos. **Pesticidas: Revista Técnico Científica**, Curitiba, v.5,p. 95-110, jan/dez, 1995.
- PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Postharvest-applied agrochemicals and their residues in fresh fruits and vegetables. **Journal Association official Analytical Chemistry**, v.74, n.5, p.745-65, 1991.
- PASSOS, F.A. Desenvolvimento de cultivares de morangueiro. In: SIMPOSIO SOBRE A CULTURA DO MORANGUEIRO, 1, Cabreúva, 1986. **Anais....** Campinas: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, 1986. p.1-14.
- PAULUS, A.O. Fungal diseases of strawberry. **Hortscience**, Alexandria, v.25, n.8, p.885-889, aug, 1990.
- PEREIRA, D.E.D. **Coleta de amostras para análise de resíduos de pesticidas**. Vitória: EMCAPA, 1987. 45p. (EMCAPA - documentos 39).
- PETERSON, C.A.; EDGINGTON, L. Transport of Benomyl into various plant organs. **Phytopathology**, St. Paul, v.61, n. 1, p.91-92, jan, 1971.
- PILNIK, W.; VORAGEN, A.G.J. Pectic substances and other uronides. In: HULME, A.C. (ed). **The biochemistry of fruit and their products**. New York:Academic Press, 1970. v.1, Cap.3, p.53-87.
- POOVAIAH, B.W. Role of calcium in prolonging storage life of fruits and vegetables. **Food Technology**, Chicago, v.16, n.1, p.86-89, jan, 1986.
- POWELL, D.A.; MORRIS, E.R.; GIDLEY, M.J.; REES, D.A. Conformation and interactions of pectins. II. Influence of residue sequence on chain association in calcium pectate gels. **Journal Molecular Biology**, New York, v.155, p.517-531, 1982.
- PRESSEY, R.  $\beta$ -Galactosidases in ripening tomatoes.**Plant Physiology**, Baltimore, v.71, n.1, p.132-135, May 1983.

- PRESSEY, R. ; AVANTS, J.K. Solubilization of cell walls by tomato polygalacturonase:role of pectinesterases. **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v.6, n.1, p.57-74, mar, 1973.
- PROCTOR, A.; MIESLE, T.J. Polygalacturonase and pectinmethylesterase activities in developing high bush blueberries. **Hortscience**, Alexandria, v.26, n.5, p. 579-581, may,1991.
- RAESE, J.T.; DRAKE, S.R.; STAIFF, D.C. Influence of different calcium materials and spray timing on mineral composition, yield, fruit quality, and control of fruit disorders of " Anjou" pears. **Journal of Plant Nutrition**, Monticello, v.16, n.4, p.823-838, apr,1993.
- REXOVA-BENKOVA, L.; MARKOVIK, O. Pectic enzymes. **Advances Carbohydrates Chemistry and Biochemistry**, New York, v.33,p.323-385, 1976.
- RICARDO, C.P.P. Aspectos da fisiologia do cálcio nas plantas. **Garcia de Orta, Série Estudos Agronomicos**, Lisboa, v.10, n. 1/2, p.65-76, may, 1983.
- RIGNEY, C.J.; WILLS, R.B.H. Calcium movement, a regulating factor in the initiation of tomato fruit ripening. **HortScience**, Alexandria, v.16, n.6, p.550-551, dec. 1981.
- ROE, B.; BRUEMMER, J. Change in pectic substances and enzymes during ripening and storage of Keit mangoes. **Journal Food Science**, Chicago,v.46,n.1, p.186-189, jan, 1981.
- SAMS, C.E.; CONWAY, W.S.; ABBOTT, J.A.; LEWIS, R.J.; BEN-SHALOM, N. Firmness and decay of apples following postharvest pressure infiltration of calcium and heat treatment. **Journal American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.118, n.5, p.623-627, sep, 1993.
- SARRUGE, J.R. ; HAAG, H.P. **Análise química de plantas**. Piracicaba: ESALQ. 1974. 56p.
- SCALON, S.P.Q.; BITTENCURT, A.L.; CHITARRA, A.B.; CHITARRA, M.I.F. Avaliação da qualidade e da vida útil de morangos (*Fragaria ananassa* Dutch.) cv. Sequóia submetidos à aplicação pós-colheita de CaCl<sub>2</sub> e armazenados à temperatura ambiente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.16, n.1, p.83-87, maio, 1996.
- SCALON, S.P.Q.; CHITARRA, A.B.; CHITARRA, M.I.F.; ABREU, M.S. Conservação de morangos (*Fragaria ananassa* Duch.) cv. Sequóia em atmosfera modificada. In: CONGRESSO DA POS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 8, Lavras, 1995. **Anais...** Lavras:UFLA, 1995. p.24-25.
- SCALON. S.P.Q.; LIMA, L.C.O.; ABREU, M.S. Efeito de mancozeb e iprodione sobre a qualidade de morangos (*Frāgaria ananassa* Duch.) cv. Lassen. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.38, n.3, p. 829-833, ago,1995.

- SEYMOUR, G.B.; LASSLET, Y.; TUCKER, G.A. Differential effects pectolytic enzymes on tomato polyuronides in vivo and in vitro. **Phytochemistry**, Oxford, v.26, n.12, p.3137-3139, dez, 1987.
- SHEAR, C.B. Calcium-related disorders of fruits and vegetables. **HortScience**, Alexandria, v.10, n.4, p.361-365, apr, 1975.
- SHEAR, C.B.; FAUST, M. Calcium transport in apple trees. **Plant Physiology**, California, v.45, n.6, p.670-674, jun, 1970.
- SIDDIQUI, S.; BANGERTH, F. Effect of pre-harvest application of calcium on flesh firmness and cell-wall composition of apples influence of fruit size. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.70, n.2, p.263-269, mar, 1995.
- SIEGEL, M.R. Distribution and metabolism of methyl 2- benzimidazole carbamate, the fungitoxic derivative of benomil, in strawberry plants. **Phytopathology**, St.Paul, v.63, n.7, p.890-96, jul, 1973.
- SINGH, R.P.; BRINDLE, I.D.; HALL, C.D.; CHIBA, M. Kinetic study of the decomposition of methyl [1-(Butylcarbamoil)-1H- Benzimidazol-2-yl]carbamate (Benomyl) to Methyl 1H- Benzimidazol- 2-ylcarbamate (MBC). **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v.38, n.8, p.1758-1762, aug, 1990.
- SINGH, B.P.; GUPTA, O.P.; GHANUHAN, K.S. Effect of pre-harvest calcium nitrate spray on peach on the storage life of fruits. **Indian Journal Agricultural Science**, India, v.52, n.4, p.235-239, 1982.
- SMITH, C.J.S; WATSON, C.F.; RAY, J.; BIRD, C.R.; MORRIS, P.C.; SCHUCH, W.; GRIERSON, D. Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. **Nature**, Londres, v.334, n.25, p.724-726, 1988.
- SOUZA, M.T. **Ação protetora e curativa dos compostos triadimenol e aldicarbe em mudas de cafeeiro no controle da ferrugem causada por *Hemileia vastatrix*** .Lavras:ESAL., 1991. 88p. (Dissertação de Mestrado em Fitopatologia)
- SPITTLER, T.D.; MARAFIOTI, R.A.; LAHR, L.M. Determination of Benomyl and its metabolites by catio-exchange high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.317, p.527-531, 1984.
- STOW, J. Effect of calcium ions on apple fruit softening during storage and ripening. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.3, p.1-9, 1993.

- STROHECKER, R.; HENNING, H.M. **Análises de vitaminas**. Madri:Paz Montalvo, 1967. 428p.
- TANG, C.S.; YANAGIHARA, K.; ZHANG, Y. 1Butyl Isocyanate from aqueous Benlate Formulations. **Archivos Environmental Contaminants Toxicological**, Chicago, v.23, p.270-272, 1992.
- TESSARIOLI NETO, J. **Avaliação do potencial produtivo e de seus componentes em diferentes clones de morangueiros**(*Fragaria X ananassa* Dutch). Piracicaba: ESALQ. 1991. 82p. (Dissertação de Mestrado em fitotecnia)
- TOBIAS, R.B.; CONWAY, W.S.; SAMS, C.E.; GROSS, K.C.; WHITAKER, B.D. Cell wall composition of calcium-treated apples inoculated with *Botrytis cinerea*. **Phytochemistry**, Oxford, v.32 n.1, p.35-39, jan.1993.
- TOLEDO, H.H.B. Resíduos de Pesticidas em Alimentos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.11, n.2, p.199-200, nov, 1993.
- TONG, C.B.S.; GROSS, K.C. Glycosil-linkage composition of tomato ruit cell wall hemicellulosic fractions during ripening. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.74, n.2, p.365-370, Oct. 1988.
- VASQUEZ-SALINAS, C.; LAKSHMINARAYANA, S. Compositional changes in mango fruit during ripening at different storage temperatures. **Journal Food Science**, Chicago, v.50, n.6,p.1646-1648, nov/dez, 1985.
- VANGOOR, B.J. The role of calcium and cell permeability in the disease blossom-end-rot of tomatoes. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.21, p.1110-21, 1968.
- VETTORAZI, G.; RADAELLI-BENVENUTI, B.M. **Internacional regulatory aspects for pesticide chemicals**. Boca Raton:Florida:CRC Press, 1982. V2.
- YOSHIKAWA, M.; CHIBA, H. Pesticide Residue in Foods. In: HUI, Y.H. **Encyclopedia of Food Science and Tecnology**, New York, v.3,p.2048-2054, 1991.
- ZAGORY, D.; KADER, A.A. Modified atmosphere packaging of fresh produce. **Food Technology**, Champaign,v.42, n.9, p.70-77, sep, 1988.
- WALLNER, S.J.; BLOOM, H.L. Characteristics of tomato cell wall degradation in vitro. Implications for the study of fruit softening enzymes. **Plant Physiology**, Baltimore, v.60, n.2, p.207-210, Aug. 1977.

## APÉNDICE

Quadro 1: Quadro de análise de variância para cálcio total, cálcio ligado,pectina total, solúvel, solubilização de pectinas de morangos.

Causa de variação	GL	Ca total	Ca ligado	PT	PS	Solubilização
Forma	1	*	*	*	*	NS
Cálcio	2	*	*	*	*	*
Época	3	NS	*	*	NS	*
F X C	2	*	NS	*	*	*
F X E	3	NS	NS	*	NS	*
C X E	3	NS	*	*	*	*
F X C X E	6	*	*	*	*	*
Resíduo	24					
CV (%)		6,06	7,22	7,91	8,91	7,65

Quadro 2: Quadro de análise de variância para atividade de poligalacturonase e pectinametilsterase, grau de esterificação, celulose e vitamina C de morangos.

Causa de variação	GL	PG	PME	GE	Celulose	Vit. C
Forma	1	*	*	*	Ns	*
Cálcio	2	*	*	*	*	NS
Época	3	*	*	*	NS	NS
F X C	2	*	*	NS	NS	NS
F X E	3	*	*	NS	NS	*
C X E	3	*	*	*	NS	NS
F X C X E	6	*	*	*	NS	NS
Resíduo	24					
CV (%)		7,16	3,86	13,24	13,44	11,04

Quadro 3: Quadro de análise de variância para Resíduo de Benomil em morangos.

Causa de variação	GL	Resíduo de Benomil
Forma	1	*
Cálcio	1	*
Época	3	NS
F x C	1	*
F x E	3	NS
C x E	3	NS
F x C x E	3	NS
Resíduo	16	
CV(%)		18,05

$\frac{dx}{dt}$   
 $\exp(Mx)$

$x^0$   
 $\exp(x)$

$\frac{dx}{dt} = 0$   
type

		1947	
1946	10		
1945	3	10	
1944	3	10	
1943	3	10	
1942	3	10	
1941	3	10	
1940	3	10	
1939	3	10	
1938	3	10	
1937	3	10	
1936	3	10	
1935	3	10	
1934	3	10	
1933	3	10	
1932	3	10	
1931	3	10	
1930	3	10	
1929	3	10	
1928	3	10	
1927	3	10	
1926	3	10	
1925	3	10	
1924	3	10	
1923	3	10	
1922	3	10	
1921	3	10	
1920	3	10	
1919	3	10	
1918	3	10	
1917	3	10	
1916	3	10	
1915	3	10	
1914	3	10	
1913	3	10	
1912	3	10	
1911	3	10	
1910	3	10	
1909	3	10	
1908	3	10	
1907	3	10	
1906	3	10	
1905	3	10	
1904	3	10	
1903	3	10	
1902	3	10	
1901	3	10	
1900	3	10	

THE U.S. GOVERNMENT PRINTING OFFICE: 1947