



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**



**Avaliação de compostos voláteis em morangos (*Fragaria x ananassa*) contaminados por fungo *Botrytis cinerea***

**Graduanda: Maria Eduarda de Almeida Astolfo**

**Orientador: Prof. Dr. Stanislau Bogusz Junior**

**São Carlos**

**2024**

Maria Eduarda de Almeida Astolfo

**Avaliação de compostos voláteis em morangos (*Fragaria x ananassa*) contaminados por fungo *Botrytis cinerea***

Monografia apresentada ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC) da Universidade de São Paulo (USP) como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química com Habilitação Tecnológica - Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Stanislaw Bogusz Junior

**São Carlos**

**2024**

## Resumo

O morango é uma fruta não climatérica caracterizada por apresentar sabor único, ser altamente desejável e ser uma fonte relevante de compostos bioativos devido aos altos níveis de vitamina C, vitamina E e compostos fenólicos, assim como antocianinas, pigmentos que conferem cor vermelha ao morango e estão relacionadas a benefícios para a saúde. Além disso, os morangos são frutas altamente sensíveis a temperatura, choques mecânicos e doenças, sendo que as doenças pós-colheita causadas por patógenos fúngicos são um dos fatores mais importantes que causam perdas econômicas, sendo que o fungo *Botrytis cinerea* é um dos principais agentes patogênicos de armazenamento observados nesta fruta. O trabalho desenvolvido e apresentado nesta monografia consiste na análise do perfil de voláteis de morangos sadios e expostos a contaminação por *B. cinerea* durante o armazenamento, a fim de avaliar a presença ou não de possíveis marcadores voláteis que permitam identificar, de forma precoce, a contaminação fúngica de morangos. O projeto foi desenvolvido sob a orientação do Prof. Dr. Marcos David Ferreira (Embrapa Instrumentação) e do Prof. Dr. Stanislaw Bogusz Junior (Instituto de Química de São Carlos – (IQSC/USP)). Os resultados obtidos permitiram a observação de alterações nos parâmetros físico-químicos e no perfil de voláteis dos frutos sadios e contaminados, indicando a possibilidade da continuação deste estudo para explorar os marcadores voláteis encontrados em tecnologias de conservação pós-colheita de frutas.

**Palavras-chave:** Voláteis, frutos não-climatéricos, fungos, pós-colheita, morangos.

## Abstract

The strawberry is a non-climacteric fruit characterized by its unique flavor, high desirability, and significant source of bioactive compounds like vitamin C, vitamin E, phenolic compounds, and anthocyanins. These fruits are very sensitive to temperature, mechanical shocks and diseases, and post-harvest diseases caused by fungal pathogens are among the most important factors leading to strawberry economic losses, with the fungus *Botrytis cinerea* being one of the main storage pathogens observed in this fruit. The work developed and presented in this text consists of analyzing the volatile profile of healthy strawberries and those exposed to *B. cinerea* contamination during storage to assess the presence of potential volatile markers for the early identification of fungal contamination in strawberries. The project was conducted under the guidance of Prof. Dr. Marcos David Ferreira (Embrapa Instrumentation) and under the guidance of Prof. Dr. Stanislaw Bogusz Junior (Institute of Chemistry of São Carlos (IQSC/USP)). The results obtained allowed the observation of changes in the physicochemical parameters and volatile profile of healthy and contaminated fruits, indicating the possibility of explore in new researches the volatile markers found in post-harvest fruit preservation technologies.

**Keywords:** Volatiles, non-climacteric fruits, fungi, post-harvest, strawberries.

## **Agradecimentos**

Agradeço imensamente a Deus pelo dom da vida e pelas oportunidades que a mim são confiadas ao longo de minha trajetória. Agradeço toda a dedicação e apoio incondicional da minha família, meus pais, Marcelo e Adriana, e meu irmão, Matheus, que estão ao meu lado em todas as etapas de minha vida estudantil, não medindo esforços para contribuir na realização dos meus sonhos.

De modo especial, também agradeço ao meu noivo, Diego, que está ao meu lado em todos os momentos, me motivando e incentivando a alcançar meus objetivos; sempre com o apoio e acolhimento tão necessários. Ao meu tio Marcos, deixo meu agradecimento pelo suporte dedicado a mim durante estes anos, como também agradeço aos meus amigos, que tornaram cada momento ainda mais especial nesta trajetória.

Agradeço à Universidade de São Paulo, especialmente ao corpo docente do Instituto de Química de São Carlos, por tantos ensinamentos importantes para minha formação acadêmica e, em especial, agradeço ao Prof. Dr. Stanislau Boguz Junior pelos preciosos conhecimentos que norteiam meus objetivos profissionais e pela excelente orientação na elaboração deste trabalho.

Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Embrapa Instrumentação pela oportunidade do desenvolvimento deste projeto e ao Prof. Dr. Marcos David Ferreira pela orientação em minha Iniciação Científica. Por fim, agradeço a todos os colegas de laboratório no IQSC e na Embrapa que contribuíram para meu desenvolvimento profissional no decorrer da execução deste projeto.

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>7</b>
1.1 Enunciado do problema .....	7
1.2 Morango .....	9
1.3 Infecção por <i>Botrytis cinerea</i> .....	10
1.4 SPME aplicada à análise de alimentos.....	12
1.5 Compostos orgânicos voláteis em morangos .....	14
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>16</b>
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos específicos .....	16
<b>3. Metodologia .....</b>	<b>16</b>
3.1 Análise microbiológica: cultivo do fungo, suspensão de esporos e inoculação .....	16
3.2 Análises Físico-químicas .....	21
3.3 Análise do perfil de voláteis .....	22
<b>4. Resultados e discussão .....</b>	<b>23</b>
4.1 Análises físico-químicas .....	23
4.2 Análise do perfil de voláteis e acompanhamento visual .....	25
<b>5. Conclusão .....</b>	<b>33</b>
<b>6. Referências.....</b>	<b>33</b>

## **1. Introdução**

### **1.1 Enunciado do problema**

Mesmo tratando-se de um antigo problema global, a fome ainda é considerada uma grave questão humanitária. Segundo dados da *Food and Agriculture of the United Nations* (FAO), 9,3% da população mundial encontra-se em situação de fome crônica, estimando-se que, em média, 735 milhões de pessoas foram afetadas pela fome apenas no ano de 2022 (FAO, 2023). Esses são dados chocantes, principalmente quando associados aos valores de alimentos perdidos e desperdiçados, o que corresponde a aproximadamente 30% dos alimentos produzidos em nível mundial; o equivalente a 1,3 bilhão de toneladas (Perez *et al.*, 2024). Grande parcela dessa perda de alimentos está associada à perda pós-colheita dos produtos vegetais, que, no Brasil, é estimada em torno de 40% de tudo que é produzido (Perez *et al.*, 2024).

Os elevados valores de perdas pós-colheita estão associados ao fato de que os tecidos vegetais possuem processos metabólicos ativos, como respiração celular, mesmo após o processo de colheita, sendo, então, considerados tecidos vivos. Em decorrência disso, é necessário que se desenvolvam técnicas e estratégias que colaborem com a preservação pós-colheita desses produtos durante toda a cadeia produtiva, desde os produtores até os consumidores finais, passando também pelos transportadores e varejistas (Bertolo, 2024).

As causas dessas perdas estão associadas a três fatores principais, sendo eles: as doenças causadas por fungos e bactérias que acometem as frutas e hortaliças; as desordens fisiológicas, como a colheita fora do período ideal de maturação e os danos físicos ocasionados por insetos ou pela má manipulação durante a colheita, transporte, armazenamento e distribuição dos produtos (Kader, Rolle, 2004; Panahirad *et al.*, 2021). Sendo assim, existe uma demanda pelo desenvolvimento de tecnologias capazes de contornar tais problemas, de modo a se obter uma maior conservação das frutas e hortaliças, possibilitando que tais produtos cheguem a lugares mais distantes dos cultivos, reduzindo a grande problemática atual da perda e desperdício de alimentos.

Durante o processo de colheita diversos erros podem ser cometidos, os quais ocasionam a redução da qualidade dos produtos e o tempo de vida de prateleira, como, por exemplo, a colheita realizada antes do estágio ideal de maturação, o que acarreta a maior vulnerabilidade

de frutas a danos mecânicos devido ao elevado nível de acidez e baixo teor de açúcares em sua composição. Em contrapartida, as frutas que são colhidas após o estágio de maturação ideal apresentam um tempo de vida de prateleira reduzido (Bertolo, 2024).

As perdas associadas ao transporte de produtos vegetais estão diretamente ligadas à falta de boas práticas na manipulação dos alimentos e na ausência de uma adequada cadeia de frio, sendo responsáveis por aproximadamente 50% das perdas pós-colheita no Brasil (Elik *et al.*, 2019; Onu Verde, 2015). O manuseio inadequado dos hortifrutis durante a carga e descarga acabam causando danos mecânicos nos mesmos, que além de favorecer a entrada de contaminantes, como patógenos fúngicos, que desqualificam o produto quanto as exigências do mercado em relação a aparência dos frutos.

A etapa de armazenamento de frutas e hortaliças é crucial para que tais produtos cheguem ao consumidor em condições próprias de consumo. O período de acondicionamento pode variar de horas até meses (dependendo de cada tipo de fruta ou hortaliça) e, é isso que permite que vários produtos perecíveis sejam oferecidos no mercado o ano todo, mesmo fora do período de produção no campo. Algumas estratégias podem ser utilizadas para que esta etapa da cadeia produtiva seja mais eficiente na manutenção da qualidade de frutas e hortaliças, entre elas o controle de umidade relativa, da temperatura, o uso de atmosfera controlada, de atmosfera modificada e uma adequada cadeia de frio (Elik *et al.*, 2019; Luis, 2022). A aplicação de uma cadeia de frio contínua que abranja desde o armazenamento do produto até a distribuição do mesmo é capaz de reduzir a velocidade das reações metabólicas e a respiração dos hortifrutis, aumentando, assim, a vida útil desses alimentos. Toda via, a aplicação desta técnica precisa considerar as características de cada produto, pois algumas frutas e hortaliças são mais sensíveis e podem sofrer injúrias pelo frio, tornando-as impróprias para o consumo (Chitarra, 2005; Elik *et al.*, 2019).

Devido aos elevados índices de perdas pós-colheita de morangos, observa-se a necessidade do desenvolvimento de tecnologias capazes de reduzir as perdas, como, por exemplo, técnicas capazes de realizar a identificação precoce da contaminação fúngica e o uso controlado de agentes antimicrobianos alternativos, como óleos essenciais, compostos fenólicos e extratos vegetais ativos (Abd-Elkader *et al.*, 2021).



## 1.2 Morango

O morango é uma fruta não climatérica altamente desejada e popular devido ao seu sabor característico, à sua composição rica em bioativos, como vitamina C ( $63,6 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ ), pectina total ( $754,54 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ ),  $\beta$ -caroteno ( $7,75 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ), compostos fenólicos, antocianinas e minerais como o cálcio ( $11 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ ) e o magnésio ( $10 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) além de seu baixo teor calórico (Singh, *et al.*, 2011; Abd-Elkader *et al.*, 2021; Guiné *et al.*, 2020; Françoso *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2017). Na América do Sul, o Brasil é o país que lidera o cultivo de morangos, com uma produção de cerca de 165.000 toneladas de frutos por ano, correspondente a 4.500 hectares de cultivo (Bertolo, 2024). Os estados líderes de produção são Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo, com uma produtividade média anual maior que 30 toneladas/hectare (Bertolo, 2024). Mesmo que o Brasil seja o maior produtor de morangos da América do Sul, as perdas associadas à pós-colheita destes frutos são altas, estando na posição de terceiro item da lista de maiores perdas em valor de frutas, legumes e verduras, atrás somente do tomate e da batata (Abras, 2021).

Mesmo não se tratando de uma fruta climatérica, a maturação do morango é relacionada com a presença do fitohormônio etileno e, as suas características como a alta taxa respiratória, a textura macia e a sensibilidade à temperatura, choques mecânicos, vibrações e contaminações fúngicas, que caracterizam os morangos como frutas de curta vida útil pós-colheita (Tosetti *et al.*, 2020; Barikloo, Ahmadi, 2018). Em temperaturas acima de  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  o tempo de vida de prateleira para morangos é de somente 2 dias; enquanto que, em condições de armazenamento em temperaturas inferiores a  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , a sua vida de prateleira pode chegar até 7 dias (Ikegaya *et al.*, 2020). As características físico-químicas do fruto estão altamente relacionadas com a baixa durabilidade dos mesmos. A atividade de água ( $a_w$ ) dos morangos é igual ou maior que 0,98; enquanto seu pH varia de 3,0 a 3,9; características estas que o tornam propício para o desenvolvimento de patógenos fúngicos, que acarretam na acelerada deterioração microbiológica dos morangos (Gil-Giraldo; Duque-Cifuentes; Quintero-Castaño, 2018).

Os patógenos fúngicos são os principais causadores de perdas econômicas, por causarem danos severos aos frutos (Fedele *et al.*, 2020; Notte *et al.*, 2021; Rhouma, 2022). Nos morangos, a principal infecção fúngica é o popularmente conhecido mofo cinzento, causado pelo patógeno fúngico necrotrófico *Botrytis cinerea*, que é o responsável pelo maior impacto

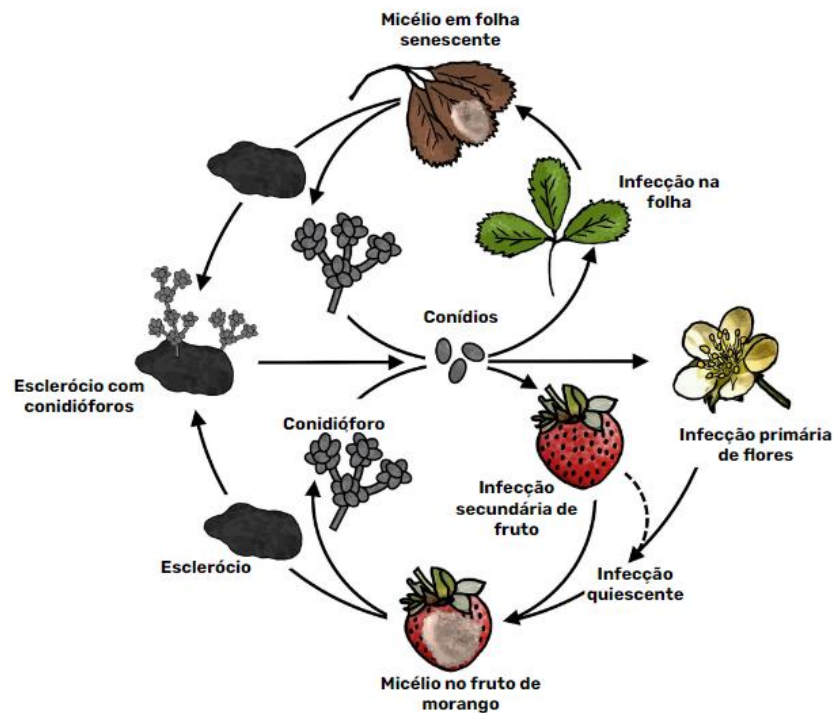
sobre a viabilidade econômica dos frutos, afetando diretamente a perda de peso, desbotamento da cor, amaciamento acelerado dos tecidos e redução da vida de prateleira, acarretando em grandes perdas econômicas (Zhang *et al.*, 2022).

### **1.3 Infecção por *Botrytis cinerea***

O *B. cinerea* é um fungo capaz de infectar mais de 1.000 espécies de plantas (Zhao *et al.*, 2023; Petrasch *et al.*, 2019), sendo considerado o principal patógeno dos morangos em todo o mundo, ocasionando perdas econômicas altamente relevantes para o mercado de morangos. O mofo cinzento, como é popularmente conhecido, é classificado como uma espécie necrotrófica, ou seja, apresenta preferência de infecção em tecidos danificados e senescentes, porém, também é capaz de afetar tecidos vegetativos e, em condições favoráveis (umidade maior que 80%) pode ser letal para os morangueiros se não houver a pulverização de fungicidas. Nos vários tipos de infecção possíveis é possível observar que, no ciclo inicial da doença, ocorre uma curta fase biotrófica, assintomática (Veloso e Van Kan, 2018), que é sucedida pela necrotrófica agressiva, quando os órgãos das plantas iniciam o processo de senescência ou amadurecimento; sendo nessa fase que ocorre a rápida deterioração dos tecidos infectados (Petrasch *et al.*, 2019).

A infecção por *B. cinerea* em morangos pode ocorrer em flores abertas, que é a chamada infecção primária, quando o fungo afeta os órgãos florais durante ou logo após a floração, de modo que as hifas se desenvolvam no receptáculo, conforme apresentado na Figura 1, sendo que as fontes de inóculo primário podem variar de escleródios até conídios e micélio de plantas vizinhas. Outra forma de infecção pode acontecer pela penetração nos tecidos receptáculos dos frutos, caracterizando-se como infecção secundária. Nesse tipo de infecção a fase necrotrófica é iniciada sem a quiescência e as fontes de infecção podem variar desde folhas senescentes até frutos infectados, como apresentado na Figura 1, sendo que os conídios de partes de flores infectadas são as principais fontes de inóculo secundário. As partes senescentes de flores de morangos, em contraposto a outras frutas, se aderem aos frutos retendo partículas de água, por pelo menos 8 horas, tempo suficiente para germinação de conídios de *B. cinerea* (Petrasch *et al.*, 2019).

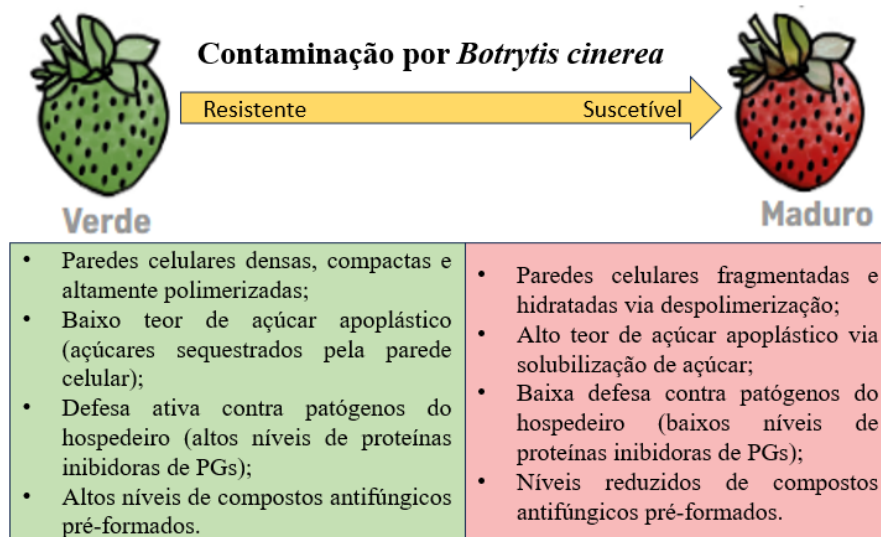
Figura 1 – Ciclo da doença do mofo cinzento causada pelo fungo *B. cinerea* em morango. Fontes de inóculo incluem folhas infectadas e escleródios. As infecções podem se dar de forma primária em flores e/ou infecções secundárias nos frutos.



Fonte: Adaptado de Petrasch *et al.*, 2019.

Os mecanismos específicos responsáveis por infecções quiescentes (isto é, infecções seguidas por um período de dormência para o fungo) não são completamente compreendidos, até o momento, mas, estudos demonstram que a partir da infecção do receptáculo verde por *B. cinerea*, observa-se a interrupção do crescimento do fungo, iniciando uma fase quiescente assintomática, que parece ser induzida pela presença de proantocianinas (PAs) que restringem a atividade das poligalacturonases (PGs), enzimas fúngicas necessárias para infecção agressiva dos hospedeiros (50% de inibição em frutas imaturas e 8% de inibição em frutas maduras) (Petrasch *et al.*, 2019). Além disso, os compostos fenólicos característicos da coloração dos morangos, as antocianinas, podem atuar também no retardo da infecção ou causar a quiescência (Harshman *et al.*, 2014; Bassolino *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Petrasch *et al.*, 2019).

Figura 2 – Representação dos processos de amadurecimento que influenciam as infecções por *B. cinerea* em morangos. Frutos verdes apresentam condições pouco favoráveis para infecção, enquanto que frutos maduros apresentam um ambiente favorável para o crescimento do patógeno.



Fonte: Adaptado de Petrasch *et al.*, 2019.

Sendo assim, o fungo volta a se desenvolver apenas quando os frutos estiverem maduros. Isso é justificado pelo fato do amadurecimento estar diretamente associado à quebra das moléculas de polissacarídeos constituintes da parede celular dos frutos, acarretando no acúmulo de açúcares simples que são ótimas fontes de nutrientes para os fungos, como também ao aumento do conteúdo solúvel em água (isto é, enriquecido em pectinas), afetando o grau de solubilização e despolimerização da pectina que está altamente relacionado à firmeza do morango, conforme ilustrado na Figura 2. Embora o conteúdo de PA na fruta permaneça constante durante o amadurecimento, o aumento da polimerização desses compostos leva a uma menor atividade inibitória na fruta madura (Petrasch *et al.*, 2019).

#### 1.4 SPME aplicada à análise de alimentos

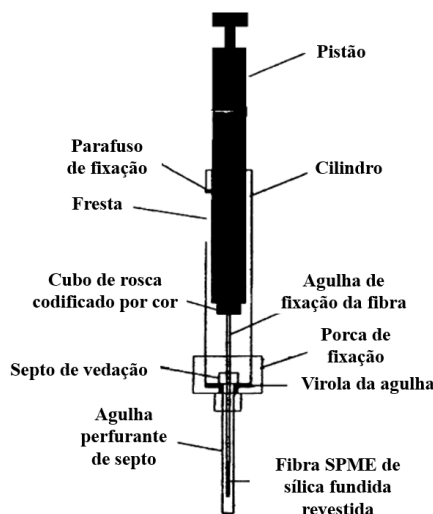
Um dos grandes desafios relacionados à análise de alimentos refere-se ao desenvolvimento de procedimentos analíticos que sejam rápidos, eficientes e que exijam menos mão de obra. Porém, a grande variedade de espécies químicas presente na composição dos alimentos torna isso uma missão difícil. Nesse contexto, a microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica

em evolução, que é capaz de reduzir o tempo de análise pela extração mais rápida da amostra, o que tem se mostrado eficiente, inclusive, para análises *in vivo* (Fang *et al.*, 2023). O dispositivo empregado nesta técnica tem o manuseio semelhante ao de uma seringa, conforme ilustrado na Figura 3, sendo, portanto, considerado de fácil manipulação. A eficaz e rápida amostragem proporcionada pelo método é adequada na investigação de vias de biodegradação de compostos químicos, porém, a complexidade da matriz da amostra e os analitos de interesse determinam a dificuldade da extração (Balasubramanian *et al.*, 2011).

O princípio envolvido na técnica de extração por SPME consiste na exposição de uma superfície pré-revestida à matriz da amostra de interesse. Esse revestimento é capaz de extrair o(s) composto(s) de interesse da amostra por meio de adsorção. Diferentes adsorventes comerciais têm sido usados em processos de SPME, como polietilenoglicol (PEG), polidimetilsiloxano (PDMS), divinilbenzeno (DVB), poliacrilato (PA), material C18 e carboxeno (CAR). Esses materiais têm algumas limitações, que são dependentes da temperatura, instabilidade e decapagem (Jagirani *et al.*, 2020). Quando o equilíbrio entre a matriz e o revestimento é atingido, os compostos extraídos são transferidos para um dispositivo de extração, que no caso deste trabalho é o cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS). Esse método promove uma extração rápida, mas não exaustiva, sendo assim, mesmo com a exposição da fibra por um tempo maior, não ocorre o aumento da quantidade de voláteis extraídos (Balasubramanian *et al.*, 2011).

Um dos modos mais difundidos de aplicação de SPME é o *headspace*-SPME (HS-SPME), técnica na qual a extração é realizada na atmosfera equilibrada com a amostra dentro de um frasco. Trata-se de uma alternativa muito eficiente para a análise de compostos orgânicos voláteis (VOC) e semivoláteis (SVOC), além de favorecer a durabilidade das fibras, pois não há contato direto com a amostra durante a extração, o que também reduz a interferência da matriz por adsorção inespecífica. A aplicação desses recursos, juntamente com o acoplamento à cromatografia gasosa (GC) que proporciona a dessorção térmica, são capazes de eliminar o uso de solventes, permitindo extração e pré-concentração rápidas e diretas da amostra. Esse melhoramento do procedimento analítico não apenas melhora a aplicabilidade do HS-SPME, mas também reduz o número de etapas de preparação da amostra, diminuindo o erro geral da determinação (Lancioni *et al.*, 2022).

Figura 3 – Dispositivo de SPME.



Fonte: Adaptado de Balasubramanian *et al.*, 2011.

### 1.5 Compostos orgânicos voláteis em morangos

O sabor característico e desejável do morango se dá pela complexa combinação de diferentes VOCs presentes no fruto. A combinação característica de VOCs de cada variedade de morango depende de vários fatores, como: genótipo da cultivar, estágio de maturação e fatores do ambiente pedoclimático. Estudos desenvolvidos entre os anos de 2018 a 2023 resultaram em 9 artigos que descreveram espécies de compostos voláteis presentes em morangos vermelhos frescos (*Fragaria* × *ananassa*) de diferentes cultivares, totalizando a caracterização de 181 espécies químicas, distribuídas em diferentes classes, entre elas: ésteres (78 compostos), terpenos (21 compostos) e ácidos (20 compostos), seguidos por álcoois (19 compostos), hidrocarbonetos (13 compostos), aldeídos (9 compostos), cetonas (5 compostos), furanonas (5 compostos), lactonas (7 compostos) e compostos aromáticos (4 compostos); sendo que 31 desses compostos foram identificados em pelo menos 10 cultivares, somando 10 ésteres, 7 ácidos, 5 terpenos, 4 aldeídos, 2 furanonas, 2 lactonas e 1 cetona (Abouelenein *et al.*, 2023).

Entre os VOCs presentes no morango, os mais recorrentes são: linalol, hexanoato de metila, nerolidol, ácido 2-metil butanóico, ácido hexanóico, hexanoato de etila,  $\gamma$ -decalactona, 2-hexenal, butanoato de etila, butanoato de metila, ácido nonanóico, ácido

octanóico, benzaldeído, ácido decanóico, terpineol, ácido acético, hexanal, nonanal, acetato de 2-hexen-1-ol, acetato de benzila, acetato de hexila, furanol, mesifurano,  $\gamma$ -dodecalactona, ácido butanóico, acetato de butila, hexanoato de hexila, farneseno, geraniol, éster dietílico do ácido 1,2-benzenodicarboxílico e benzofenona. (Almenar; Hernández-Muñoz; Gavara, 2009; *et al.*, 2022; Bertolo, 2024; Abouelenein *et al.*, 2023).

Considerando-se a extração dos voláteis de morangos pela técnica de HS-SPME, é válido destacar que fibras com diferentes recobrimentos apresentam diferentes resultados de extração. Estudos anteriores compararam a extração de voláteis de morangos por fibras com diferentes recobrimentos, sendo elas: PDMS, CAR-PDMS, DBV-CAR-PDMS, DVB-PDMS e PA. Entre essas, a fibra DVB-CAR-PDMS apresentou melhor desempenho em relação ao número de compostos extraídos. Isso demonstra que a combinação dos três tipos de materiais de revestimento: divinilbenzeno, carboxeno e polidimetilsiloxano, em uma única fibra é capaz de extrair um número maior de VOCs, possivelmente pela sua polaridade intermediária em relação às demais fibras utilizadas (ordem de polaridade: PDMS < CAR-PDMS < DVB-CAR-PDMS < DVB-PDMS < PA). Os compostos voláteis identificados no morango utilizando-se a fibra DBV-CAR-PDMS segundo estudos anteriores foram: 1-metil acetato, 1-metil butanoato, 1-metilpropil etanoato, 2-etilhexil acetato, 2-metilbutil butanoato, benzil acetato, butil acetato, butil butanoato, *cis*-3-hexenil-1-acetato, etil 2-metilbutanoato, etil 3-metilbutanoato, etil butanoato, etil etanoato, etil hexanoato, etil isobutanoato, etil octanoato, hexil atanoato, hexil formato, isobutil butanoato, isopropil 3-metilbutanoato, isopropil caproato, metil butanoato, metil hexanoato, metil isohexanoato, metil isopentanoato, metil octanoato, *n*-octil acetato, pentil acetato, *trans*-2-hexenil acetato,  $\gamma$ -decalactona, mesifurano, 2,3-octadiona, 2-metil-6-heptenona, 2-octenal, *cis*-2-heptenal, heptenal, *n*-decanal, *n*-nonanal, *n*-pentanal, *trans*-2-pentenal, *trans*-non-2-enal, linalol,  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -muuruleno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -mirceno,  $\beta$ -ocimeno, pineno, eucaliptol, limoneno, nerolidol, paracimeno, óxido de *trans*-linalol, 2-metil-butan-1-ol, etilhexanol, *n*-hexanol, octanol, pentanol, *trans*-2-hexenol (Bertolo, 2024).

Com base nesses resultados obtidos por estudos anteriores que decidiu-se proceder com o uso da fibra DVB-CAR-PDMS neste trabalho.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Este trabalho teve como objetivo a identificação de possíveis voláteis marcadores da contaminação microbiana por *Botrytis cinerea* em morangos (*Fragaria x ananassa*) para se conhecer a contaminação antes que esta se torne visível de modo a reduzir perdas no pós-colheita de morangos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- a) Avaliação das alterações físico-químicas (respiração, pH, acidez titulável e °BRIX) em morangos saudáveis e contaminados pelo fungo *B. cinerea* durante o armazenamento.
- b) Avaliação do perfil de voláteis de morangos saudáveis e contaminados pelo fungo *B. cinerea* durante o armazenamento, com a finalidade de identificar possíveis voláteis marcadores da contaminação microbiana.

## **3. Metodologia**

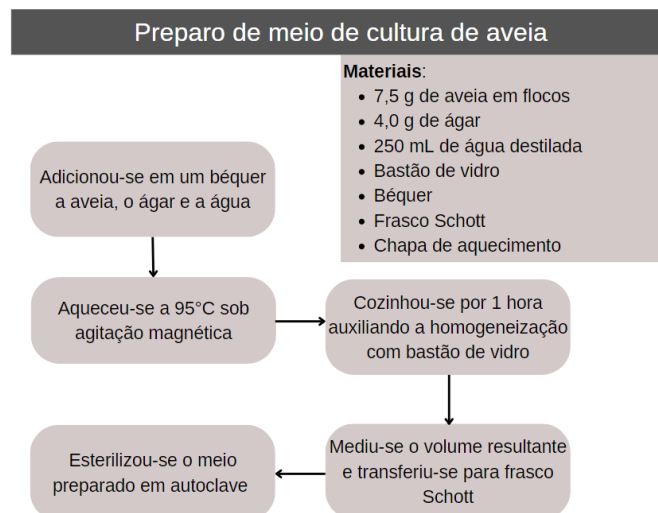
### **3.1 Análise microbiológica: cultivo do fungo, suspensão de esporos e inoculação**

Inicialmente realizou-se o repique de novas placas do fungo *B. cinerea* CMAA1123, o qual fora isolado da flor cíclame de um cultivo comercial de Holambra/SP na data de 01 de julho de 1990, a uma elevação de 600 metros em relação ao nível do mar, nas coordenadas 22°37'59"S e 47°036'20"W, por Raquel Ghini e, o isolamento foi feito em meio BDA (Batata Dextrose Ágar). O fungo em questão foi incorporado ao banco da Embrapa Meio Ambiente, configurando assim acesso ao Patrimônio Genético Nacional e foi enviado à Embrapa Instrumentação no ano de 2022.

Para o repique foi utilizado meio de cultura de aveia, o qual proporciona boa produção de esporos para o preparo da suspensão, e fora preparado conforme o descrito na figura a seguir:



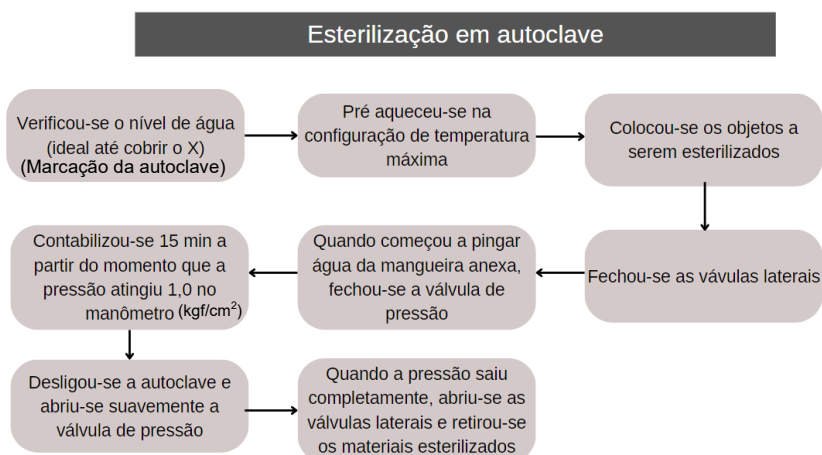
Figura 4 – Fluxograma referente ao preparo do meio de cultura de aveia.



Fonte: Autoria própria.

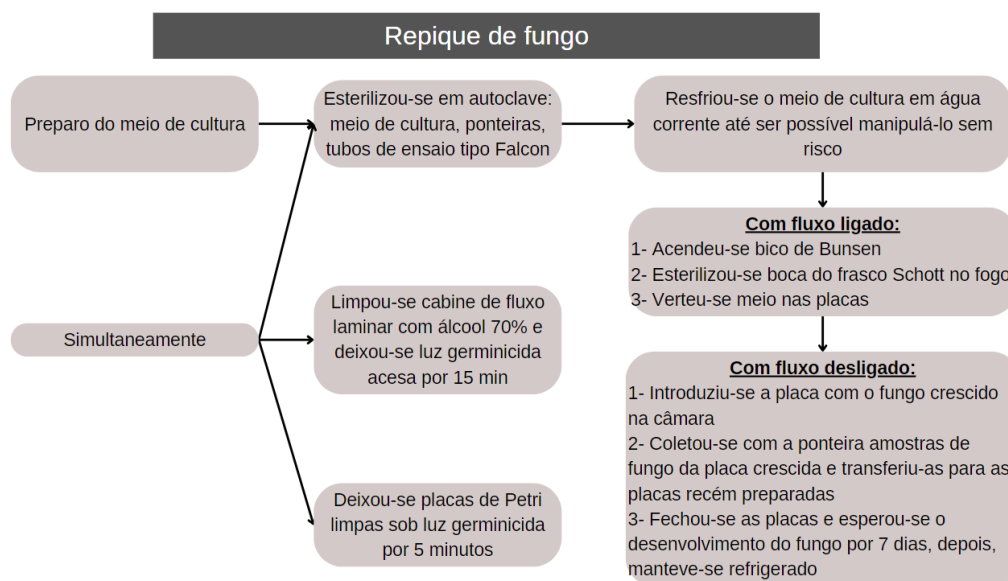
Após finalizado o preparo do meio de cultura, procedeu-se com a esterilização dos materiais utilizados em autoclave e, em seguida, com o procedimento de repique, os quais estão representados nas figuras abaixo.

Figura 5 – Fluxograma referente ao processo de esterilização de materiais em autoclave.



Fonte: Autoria própria.

Figura 6 – Fluxograma referente ao procedimento de repique do fungo.



Fonte: Autoria própria.

Para o preparo da suspensão de esporos do fungo *B. cinerea* separou-se tubos Falcon de 50 mL e de 15 mL, solução aquosa de cloreto de sódio (NaCl) 0,9% com adição de 0,01% de Tween 80, ponteiros amarelos e azuis, materiais esses que foram esterilizados em autoclave. Para facilitar a esterilização dos materiais menores, os mesmos foram colocados em um béquer e cobertos com papel Kraft, já as ponteiros foram levadas à autoclave em suas caixas apropriadas revestidas de papel Kraft.

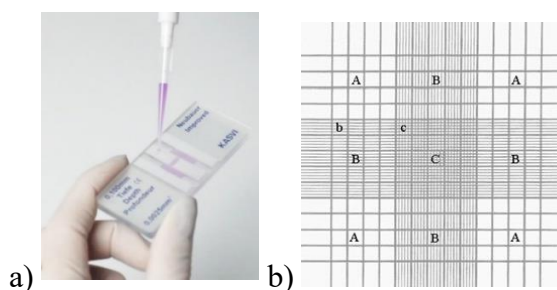
Após a devida esterilização dos materiais e limpeza da cabine de segurança biológica, os materiais foram colocados na cabine, com a chama do bico de Bunsen acesa. Além dos materiais, uma placa com o fungo crescido e esporulado, duas micropipetas (uma de 100 µL e outra de 1000 µL), uma alça de metal, um borrifador contendo álcool 70% e um béquer para descarte também foram colocados na cabine. Para a realização deste procedimento o fluxo da cabine foi mantido desligado para que se evitasse a dispersão de esporos.

Estando os materiais devidamente preparados, a placa com o fungo cultivado foi aberta e pipetou-se 6 mL da solução esterilizada de NaCl sobre o meio de cultura coberto pelo fungo. Após isso, com o auxílio da alça de metal, já flambada, a placa foi raspada com o propósito de desprender os esporos do fungo. Da suspensão concentrada obtida, coletou-se 1 mL, que foi transferido para um tubo Falcon de 50 mL, que teve metade de seu volume completado com a

solução de NaCl. Desse tubo Falcon foi retirada uma alíquota que fora transferida para um tubo pequeno de 15 mL, alíquota essa que foi levada ao microscópio para contagem de esporos.

Para a etapa de contagem de esporos utilizou-se a câmara de Neubauer. Inicialmente, colocou-se a placa de vidro sobre a câmara de Neubauer e, com auxílio de uma micropipeta preencheu-se completamente as canaletas da câmara com a suspensão de esporos. A Figura 7 apresenta o modelo de câmara de Neubauer usada para a contagem de esporos, como também os seus quadrantes que são identificados pela observação microscópica.

Figura 7 – a) Representação da câmara de Neubauer utilizada; b) Representação dos quadrantes da câmara de Neubauer observados sob microscópio ótico.



Fonte: Adaptado de Kasvi, 2024.

Com as canaletas completamente preenchidas, ajustou-se a câmara no microscópio, e então realizou-se o ajuste grosso e ajuste fino das lentes até que fosse possível observar claramente os quadrantes presentes na câmara, no aumento de 40 vezes.

Com a visualização clara dos quadrantes, ajustou-se o microscópio de modo a se observar os pequenos quadrantes dentro do quadrante C maior. A contagem dos esporos foi realizada nos quadrantes pequenos das extremidades e do meio do quadrante C maior. Em cada um desses pequenos quadrados contou-se o número de esporos dentro deles e sobre a linha delimitante e, após isso, realizou-se a média dos valores contados. Esse valor é relacionado com o volume da seguinte maneira:

$$\begin{array}{rcl} \text{N}^\circ \text{ médio de esporos em C} \times 25 & \text{-----} & 0,0001 \text{ cm}^3 \\ \text{x esporos} & \text{-----} & 1 \text{ cm}^3 \end{array}$$

Ou seja, o número médio de esporos em C é multiplicado por  $2,5 \times 10^5$ . O valor obtido com esse cálculo é inserido em um cálculo de diluição, de modo a se obter uma solução de esporos de concentração  $2,5 \times 10^5$  esporos/mL, para um volume final de 3 mL.

Com a suspensão de esporos já pronta, o próximo passo relacionou-se à inoculação dos frutos. Inicialmente procedeu-se com a higienização dos frutos, a qual foi realizada utilizando-se uma solução sanitizante comercial de Dióxido de Cloro estabilizado a 8%, de nome comercial Veromax 80. A solução foi preparada conforme indicado no rótulo do produto, sendo diluídos 2,4 mL de produto para 1 L de água, resultando em uma concentração de cloro ativo de 192 ppm (Monteiro *et al.*, 2022). Com a solução preparada, os frutos foram submersos pelo tempo de 10 minutos, sendo posteriormente escorridos e secos com papel toalha. Destaca-se que foram utilizados morangos da variedade Albion, colhidos no dia 0 do ensaio.

Figura 8 – Morangos sendo higienizados com solução diluída de Veromax 80.



Fonte: Autoria própria.

Além disso, os frascos utilizados para o experimento foram também higienizados com álcool etílico 70%. Estando os morangos prontos para inoculação, separou-se uma pipeta de 100  $\mu$ L, a suspensão de esporos obtida, uma agulha exclusiva para essa finalidade e os morangos selecionados de acordo com o tamanho e aparência semelhantes. Antes da injeção da suspensão nos frutos realizou-se um pequeno furo na superfície dos frutos com a agulha, furo esse da profundidade de 8 mm. Sobre o furo realizado, pipetou-se 30 microlitros da suspensão de esporos e armazenou-se os frutos inoculados nos respectivos frascos.

Para os frutos saudáveis (controle), apenas selecionou-se a mesma quantidade de frutos higienizados (em massa) e armazenou-se os mesmos em um frasco igual ao frasco utilizado para os frutos com contaminação induzida.

### **3.2 Análises Físico-químicas**

Foram realizadas análises físico-químicas de taxa de respiração, pH, acidez titulável e °BRIX (teor de sólidos solúveis). Com a finalidade de se realizar as análises de pH, sólidos solúveis (SS) e acidez titulável, obteve-se a polpa dos morangos pelo processamento dos frutos, sem as folhas, em mixer doméstico, até a homogeneidade total da polpa. Para a análise de acidez titulável, 5 g da polpa obtida foram pesados em um béquer, ao qual adicionou-se 25 mL de água e realizou-se a homogeneização. Antes da acidez titulável, mediu-se o pH da polpa diluída, e aí então titulou-se essa polpa com solução NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, sob agitação magnética, até que se atingisse o pH de 8,1.

A análise de sólidos solúveis foi realizada por meio de um refratômetro digital Atago RX-5000cx. De forma resumida, colocou-se inicialmente algumas gotas de água sobre a lente do equipamento e analisou-se, como forma de calibração, aí então uma pequena quantidade da polpa obtida pelo processamento dos morangos foi depositada sobre a lente do equipamento e a amostra foi analisada. O resultado foi expresso em °Brix.

Já para a análise de respiração dos morangos, utilizou-se um respirômetro (modelo 6600, Illinois Instruments, Inc., EUA), para essa análise foram utilizadas as amostras preparadas de morangos saudáveis e inoculados em recipientes de vidro hermeticamente fechados com um septo de silicone na tampa. Em cada ponto de medição, as porcentagens de O<sub>2</sub> (sensor paramagnético) e CO<sub>2</sub> (sensor infravermelho) em relação à atmosfera do frasco foram avaliadas por meio da sucção de amostras da atmosfera de dentro dos recipientes.

Figura 9 – Análise de respiração dos morangos.



Fonte: Autoria própria.

### 3.3 Análise do perfil de voláteis

Para determinar o perfil de compostos voláteis dos morangos, foi desenvolvido um procedimento de microextração em fase sólida em *headspace* (HS-SPME). Os frascos preparados com os frutos tiveram o septo presente nas tampas perfurado com uma seringa pela qual foi exposta uma fibra DVB-CAR-PDMS (divinilbenzeno-carboxeno-polidimetilsiloxano) (Supelco®) ao *headspace* das amostras, sob as seguintes condições de extração: 22 °C, 30 min de extração. Após isso a fibra fora recolhida e imediatamente injetada no cromatógrafo. Para a separação e identificação dos voláteis foi utilizado um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS) GC-2010-PLUS (Shimadzu, Japão) dotado de um detector de espectrométrico de massas quadrupolar (MS). Foi empregada uma coluna capilar de sílica fundida DB-5MS (30m x 0,25 mm x 0,25 µm) e as seguintes condições cromatográficas: injetor: modo *split* por 1 minuto, a 250 °C, gás de arraste hélio a 1,0 mL min<sup>-1</sup>, rampa de temperatura do forno: 45 °C, com incremento de 3 °C min<sup>-1</sup> até 250 °C; temperatura de interface: 240 °C, fonte de ionização por elétrons +70eV, 35-350 m/z.

A identificação dos compostos voláteis separados por GC-MS foi realizada pela comparação dos espectros de massa obtidos na amostra com os espectros de massa da biblioteca NIST11 (*National Institute of Standards and Technology*, EUA), com similaridade de no mínimo 85% e comparação dos Índices Lineares de Temperatura Programada (LTPRI) com variação máxima de ± 10. Para os cálculos dos LTPRI foi utilizada uma série homóloga de alcanos C8-C20, determinando o índice de retenção (RI) de cada composto separado por meio

dos tempos de retenção (RT) dos alcanos em relação com os tempos de retenção dos analitos por meio da seguinte equação:

$$RI = (100 \cdot n) + \left( 100 \cdot \left[ \frac{T_x - T_n}{T_{n+1} - T_n} \right] \right) \quad (1)$$

Onde: n = número do alcano de referência anterior

$T_x$  = tempo de retenção do analito x

$T_n$  = tempo de retenção do alcano de referência que eluiu imediatamente anterior a x

$T_{n+1}$  = tempo de retenção do alcano de referência que eluiu imediatamente após x

A severidade das doenças no fruto foi determinada usando uma escala de pontuação de 0 a 5 (0 = ausência de sintomas; 1 = 1 a 20% de área afetada; 2 = 21 a 40%; 3 = 41-60%; 4 = 61-80%; e 5 = 81-100%) (Oliveira Filho *et al.*, 2021).

## 4. Resultados e discussão

### 4.1 Análises físico-químicas

Os resultados das análises físico-químicas dos morangos para os diferentes tratamentos podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados das análises físico-químicas dos morangos para os diferentes tratamentos.

Variáveis	Amostras		
	Controle Dia 0	Controle Dia 4	Contaminados Dia 4
<b>pH</b>	3,40 ± 0,05 <sup>B</sup>	3,42 ± 0,00 <sup>AB</sup>	3,49 ± 0,01 <sup>A</sup>
<b>Acidez titulável (% ác. cítrico)</b>	1,12 ± 0,07 <sup>A</sup>	0,91 ± 0,03 <sup>B</sup>	0,76 ± 0,02 <sup>C</sup>
<b>Sólidos solúveis (°BRIX)</b>	7,02 ± 0,58 <sup>A</sup>	5,08 ± 0,12 <sup>B</sup>	5,10 ± 0,02 <sup>B</sup>
<b>CO<sub>2</sub> (%)</b>	6,57 ± 0,21 <sup>C</sup>	25,27 ± 2,06 <sup>A</sup>	19,78 ± 2,37 <sup>B</sup>
<b>O<sub>2</sub> (%)</b>	14,53 ± 0,06 <sup>A</sup>	2,08 ± 0,03 <sup>C</sup>	7,49 ± 1,30 <sup>B</sup>

Valores seguidos de diferentes letras maiúsculas sobrescritas nas linhas são diferentes entre si estatisticamente segundo ANOVA e Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Fonte: Autoria própria.

Pelos resultados apresentados na Tabela 1, pôde-se observar que houve diferença significativa para os índices de acidez titulável entre todas as amostras analisadas. Para os controles era esperado observar essa diferença entre o dia 0 e o dia 4, visto que neste período

ocorrem transformações nos tecidos vegetais do morango devido ao processo de senescência. A variação observada entre o controle e os frutos contaminados no dia 4 pode ser explicada pelo fato da infecção por *B. cinerea* ser responsável por alterar os níveis de açúcar e de ácidos nos tecidos hospedeiros infectados, principalmente pela degradação e despolimerização de paredes celulares (Petrasch *et al.*, 2019).

Todavia, quanto ao teor de sólidos solúveis, notou-se que a variação significativa aconteceu apenas devido às transformações do tecido vegetal causadas pela senescência natural, ocorrida durante o armazenamento, ou seja, do dia 0 para o dia 4, pois entre os frutos contaminados e o controle no dia 4, não se observou diferença, descartando-se, então, a influência da contaminação nesse indicador.

Os valores de pH observados foram condizentes com o esperado, pois, durante o processo de maturação e senescência, os teores de ácidos orgânicos geralmente diminuem, devido à oxidação nos ciclos dos ácidos tricarboxílicos, em decorrência da respiração (Mendonça, 2016). Devido a isso, o pH tende a aumentar durante o armazenamento. Essa variação foi observada tanto entre os controles do dia 0 e 4, quanto entre o controle do dia 4 e os contaminados, o que também é justificado pelo fato da contaminação afetar os índices de ácidos dos frutos (Petrasch *et al.*, 2019).

Analisando-se as porcentagens de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> foi possível avaliar a variação do comportamento da respiração dos frutos ao longo do armazenamento e com exposição a contaminação. A taxa respiratória de morangos é afetada no período pós-colheita, principalmente com a alteração de temperatura, podendo aumentar em até 10 vezes se a temperatura de armazenamento aumentar de 0 °C para 20 °C (Flores Cantillano *et al.*, 2010). A variação nos níveis de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> entre os controles no dia 0 e dia 4 demonstraram como o armazenamento a 22 °C afetou a respiração, visto que no dia 4 os níveis de CO<sub>2</sub> foram significativamente maiores, como o esperado, devido ao aumento da taxa respiratória. Porém, entre o controle no dia 4 e os contaminados também há diferença significativa quanto às porcentagens desses gases na atmosfera dos frascos. Com isso, observou-se a influência da contaminação na taxa respiratória dos frutos, de modo que os frutos contaminados apresentaram menor porcentagem de CO<sub>2</sub> que o controle, e maior porcentagem de O<sub>2</sub> que o mesmo, indicando uma taxa respiratória reduzida dos frutos contaminados em relação ao controle. Isso é



explicado, pois, o contaminante é capaz de alterar o metabolismo do fruto graças a produção de hormônios vegetais ou análogos de hormônios que perturbam o metabolismo celular do hospedeiro (Petrasch *et al.*, 2019).

#### 4.2 Análise do perfil de voláteis e acompanhamento visual

Para a avaliação do perfil de voláteis dos frutos procedeu-se conforme o descrito no item 3.3, de modo que as análises foram realizadas nos dias 0, 1, 2, 3 e 4 para os frutos controle e contaminados, sendo que ambas as amostras ficaram expostas à atmosfera ambiente por, aproximadamente, 2 horas diárias, para que houvesse o desenvolvimento do fungo, considerando seu metabolismo aeróbico. Para essa exposição atmosférica os frascos foram mantidos em ambientes separados, com o propósito de evitar contaminação cruzada; além disso, os frascos ficaram armazenados a 22 °C, com fotoperíodo de 12 horas em média.

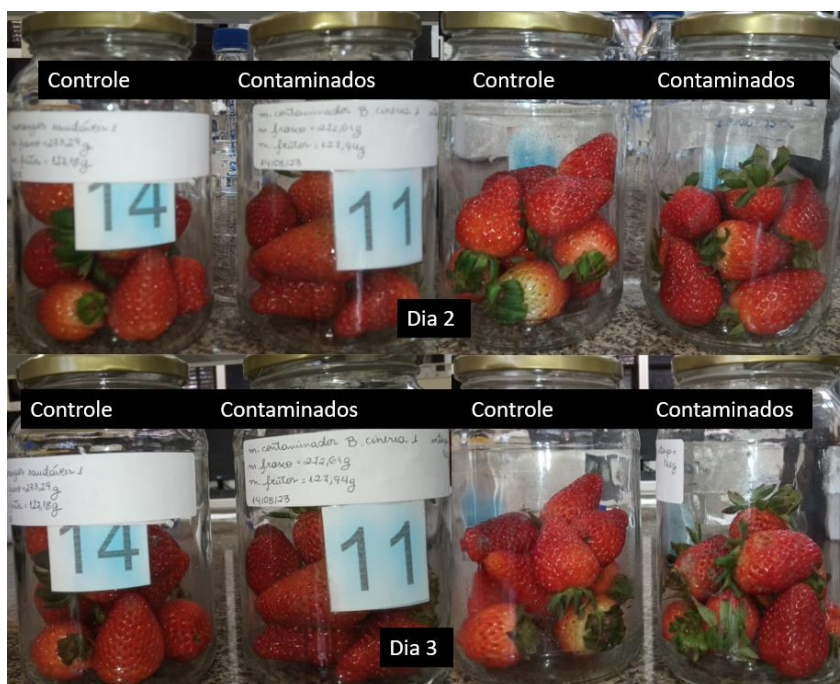
As análises cromatográficas foram realizadas em todos os dias do experimento com o propósito de acompanhar a evolução do perfil de voláteis e identificar possíveis alterações no mesmo. A seguir seguem as fotografias correspondentes ao acompanhamento visual dos frutos ao longo do experimento.

Figura 10 – Acompanhamento visual dos frutos controle e contaminados nos dias 0 e 1 do ensaio.



Fonte: Autoria própria.

Figura 11 – Acompanhamento visual dos frutos controle e contaminados nos dias 2 e 3 do ensaio.



Fonte: Autoria própria.

Figura 12 – Acompanhamento visual dos frutos controle e contaminados no dia 4.



Fonte: Autoria própria.

A partir do acompanhamento visual apresentado é possível estabelecer a severidade da doença conforme o decorrer do experimento. Para isso seguiu-se o descrito no procedimento experimental e os resultados observados encontram-se apresentados na Tabela 2 a seguir.

Tabela 2 - Incidência e severidade de contaminação fúngica nas amostras ao longo do armazenamento.

Dia	Incidência de Severidade	
	Controle	Contaminado
0	0	0
1	0	0
2	0	0
3	0	1
4	1	2

(0 = ausência de sintomas; 1 = 1 a 20% de área afetada; 2 = 21 a 40%; 3 = 41-60%; 4 = 61-80%; e 5 = 81-100%) (Oliveira Filho *et al.*, 2021).

Fonte: Autoria própria.

Pelos dados apresentados na Tabela 2 e pelo acompanhamento visual das amostras foi possível confirmar a presença de contaminação fúngica no grupo controle apenas no 4 dia, enquanto que no grupo contaminado, a presença de fungos já foi percebida no terceiro dia do experimento. Vale a pena destacar que não era esperado encontrar contaminação fúngica no grupo controle, no entanto esta pode ter se originado tanto a partir de alguma contaminação cruzada durante a realização dos experimentos, como devido a uma higienização ineficiente dos frutos, que não foi capaz de eliminar os esporos provenientes do campo.

A tabela abaixo apresenta a caracterização dos compostos voláteis identificados por SPME-GC-MS.

Tabela 3 – Caracterização dos compostos voláteis dos morangos controle e contaminados por *B. cinera* durante o armazenamento a 22 °C por 4 dias. Os voláteis em negrito destacam aqueles encontrados apenas nos morangos contaminados.

Composto	Controle					Contaminados				
	Dia 0 <sup>a</sup>	Dia 1 <sup>a</sup>	Dia 2 <sup>a</sup>	Dia 3 <sup>a</sup>	Dia 4 <sup>a</sup>	Dia 0 <sup>a</sup>	Dia 1 <sup>a</sup>	Dia 2 <sup>a</sup>	Dia 3 <sup>a</sup>	Dia 4 <sup>a</sup>
<b>Alcanos</b>										
Mesitileno	-	-	-	3,96	13,25	-	-	-	0,44	2,12
Nor-pristano	-	-	-	-	-	-	0,17	-	-	-
Pristano	-	0,45	0,68	0,59	0,65	-	0,38	0,59	0,55	0,62
Fitano	-	0,56	0,82	-	0,79	-	-	0,60	0,58	0,70
<b>Álcoois</b>										
4-Metilpentan-1-ol	-	-	-	0,15	0,14	-	-	0,04	0,12	0,07
(Z)-3-Hexen-1-ol	-	-	0,11	4,92	2,66	-	-	1,16	2,35	0,80
1-Hexanol	-	-	0,41	2,30	1,78	-	0,09	0,55	0,74	0,35
2-Etilhexan-1-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,10
<b>Cetona</b>										
Sulcatona	-	-	0,09	0,09	-	-	-	-	-	-

<b>Ésteres</b>										
butirato de isopropila	0,34	21,66	5,30	1,89	1,77	0,24	80,21	49,64	23,90	19,70
crotonato de etila	0,01	-	2,91	4,78	6,56	-	-	-	-	-
2-metil butanoato de etila	0,13	0,62	18,75	25,46	40,46	0,08	2,39	4,08	9,60	8,25
isovalerato de etila	0,14	0,30	14,54	18,20	24,95	0,08	1,29	2,25	6,95	5,97
<b>Crotonato de isopropila</b>	-	-	-	-	-	-	<b>1,28</b>	<b>2,28</b>	<b>1,96</b>	<b>1,92</b>
2-metil-2-butenato de metila	-	0,06	0,18	0,08	0,26	-	0,17	0,39	0,34	0,08
acetato de isopentila	0,11	3,77	16,44	31,34	37,17	0,08	4,86	12,10	13,21	9,87
acetato de 2-metilbutila	0,14	7,84	24,66	27,92	29,64	0,11	8,96	17,95	20,08	15,12
acetato de 4-pentenila	-	-	-	-	0,53	-	-	-	-	-
2-metil butanoato de isopropila	-	2,03	-	-	-	-	-	-	-	-
4-metil pentanoato de metila	0,04	0,95	0,30	0,71	0,95	0,02	0,64	0,19	-	-
3-metil butanoato de 2-propila	0,01	1,96	1,19	0,78	0,73	-	15,90	13,98	7,92	7,94
butirato de propila	0,03	0,20	0,43	0,52	0,61	0,01	1,07	0,52	0,48	0,57
acetato de amila	-	-	-	2,69	2,83	-	0,11	0,37	-	4,34
acetato de 3-metil-2-butenila	-	-	1,64	3,09	-	-	-	-	1,56	-
hexanoato de metila	0,67	14,05	4,90	3,30	7,82	0,42	8,81	6,70	3,44	0,04
3-hidroxibutanoato de etila	-	-	-	0,11	0,08	-	-	-	-	-
angelato de etila	-	-	8,36	14,46	27,34	-	-	0,88	3,35	2,33
2-metil butanoato de propila	-	-	0,11	0,39	0,72	-	-	-	0,30	0,10
isovalerato de propila	-	-	0,10	0,28	0,38	-	-	-	0,20	0,17
isobutirato de butila	-	-	-	-	0,07	-	-	-	-	-
butirato de isobutila	0,01	0,24	0,41	0,58	1,14	0,01	0,24	0,40	0,62	0,57
3-metil pentanoato de etila	-	-	0,19	0,40	0,91	-	-	-	-	-
4-metil pentanoato de etila	0,02	-	1,07	1,43	2,99	0,01	-	0,08	0,10	-
propionato de isopentila	-	-	-	-	-	-	-	0,02	-	-
<b>(E)-2-butenato de isobutila</b>	-	-	-	-	-	-	<b>2,18</b>	<b>2,62</b>	<b>1,52</b>	<b>1,31</b>
Butirato de butila	0,12	1,30	0,36	0,32	0,55	0,04	0,48	0,16	0,12	0,08
hexanoato de etila	0,52	0,81	35,62	59,97	52,98	0,28	1,82	1,94	3,58	1,86
2-metil butirato de isobutila	-	-	-	0,13	4,95	-	-	-	0,90	0,97
isovalerato de isobutila	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,74
acetato de 3-hexenila	-	0,29	5,77	28,96	22,59	0,02	1,72	6,54	6,59	2,06
acetato de hexila	0,14	1,60	6,62	22,54	25,26	0,03	2,40	3,84	2,45	1,03
acetato de (E)-2-hexenila	0,03	-	1,70	10,81	8,86	-	0,25	0,66	0,44	0,12
caproato de isopropila	0,03	2,80	0,95	-	1,88	-	27,47	5,84	1,68	1,15
éster 2-metil butil butanoico	-	-	0,17	0,35	1,09	0,01	0,05	-	0,07	0,13
2-hexenoato de etila	-	-	0,37	0,81	2,78	-	-	-	-	-
butirato de isopentila	0,02	1,21	0,80	0,99	2,11	-	0,77	1,12	0,65	0,50
caproato de propila	-	-	-	0,06	0,17	-	-	-	-	-
2-metil butilbutanoato	-	-	-	0,49	0,53	-	-	0,10	0,27	0,18
isovalerato de amila	-	-	0,10	0,21	0,39	-	-	0,17	0,21	0,26
acetato de heptila	-	-	-	0,18	0,33	-	-	-	-	-
octanoato de metila	-	-	0,11	-	0,11	-	0,12	-	0,07	-
etanoato de 2-etil-hexila	-	-	0,10	0,68	1,00	-	-	0,07	-	0,46
acetato de benzila	-	-	0,57	1,17	1,34	-	-	0,17	0,25	0,13
benzoato de etila	-	-	0,10	0,28	0,43	-	-	-	-	-
(Z)-3-butirato de hexila	-	-	-	-	0,03	-	-	-	-	-
octanoato de etila	-	-	-	-	0,08	-	-	-	-	-
acetato de octila	-	-	0,80	1,92	1,50	-	-	-	-	-
acetato de fenetila	-	0,39	0,73	0,84	1,24	-	0,27	0,23	0,12	-
butirato de isopropila	-	-	-	-	0,19	-	-	-	-	-
<b>Furanos</b>										
2-pentilfurano	-	-	-	0,11	0,20	-	-	-	-	-
Mesifurano	-	0,48	1,27	1,76	1,84	-	0,33	0,86	1,19	1,13
Óxido de linalol	-	-	-	0,37	-	-	-	-	0,12	0,14
<b>Lactona</b>										
γ-decalactona	0,02	0,49	0,21	-	-	-	-	-	-	-

<b>Monoterpenos</b>										
$\alpha$ -Pineno	-	0,40	-	-	-	-	-	-	-	-
p-Cimeno	-	-	-	-	0,77	-	-	-	-	-
Limoneno	0,04	0,79	1,34	1,73	2,23	0,03	0,79	0,65	0,39	0,44
$\beta$ -Ocimeno	-	0,13	0,20	0,18	-	-	0,13	0,19	0,16	0,14
Linalol	0,36	7,12	5,70	5,68	5,24	0,19	4,20	5,23	2,56	1,87
<b>Sesquiterpenos</b>										
$\beta$ -Faneseno	-	0,10	0,07	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Muuroleno	-	1,36	1,30	1,03	1,17	-	0,65	1,13	1,18	1,23
Trans-nerolidol	0,15	6,17	3,74	1,47	0,51	0,05	1,51	0,86	0,26	0,26

<sup>a</sup> Área bruta do pico obtida por GC-MS dividida por 10<sup>6</sup>.

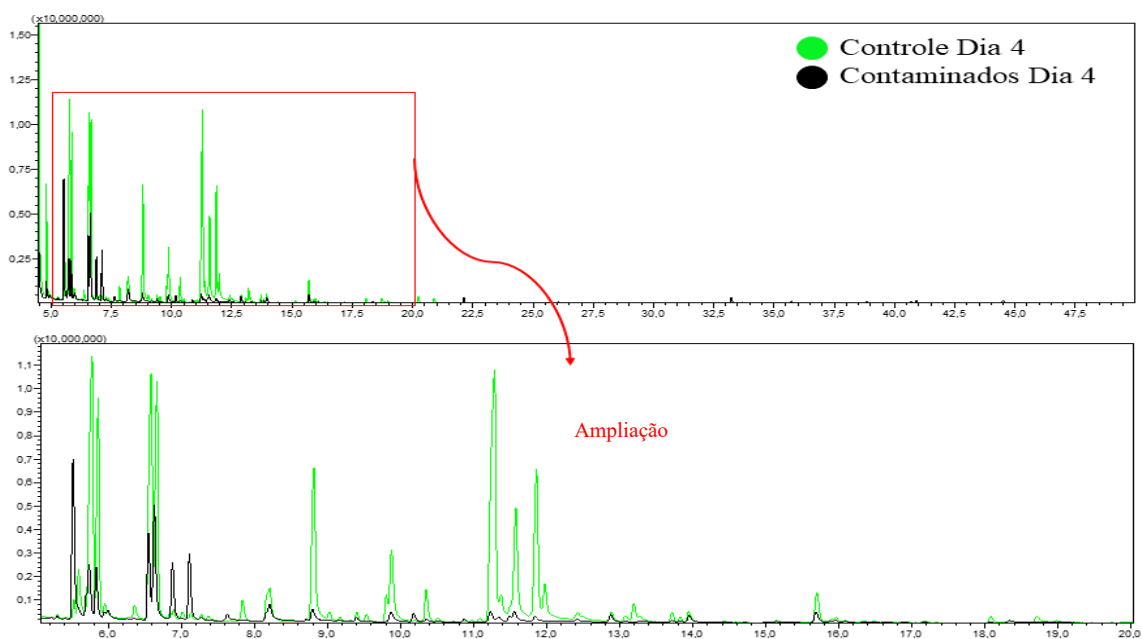
- = Não detectado.

Fonte: Autoria própria.

Pelos dados apresentados na Tabela 3, é possível observar que alguns compostos não foram identificados em todos os dias de análise. Notou-se, também, variações quanto às áreas dos picos de um mesmo composto no decorrer dos quatro dias do experimento, sendo que alguns apresentaram aumento da área do pico, enquanto outros demonstraram diminuição da área do pico, representando, então, a variação dos compostos voláteis produzidos pelo morango durante o período de armazenamento.

Comparando-se os valores brutos das áreas é perceptível a diferença quando se compara frutos Controle e Contaminados em um mesmo dia. A Figura 13 a seguir ilustra essa variação.

Figura 13 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos no dia 4 da análise cromatográfica para os frutos controle e contaminados.

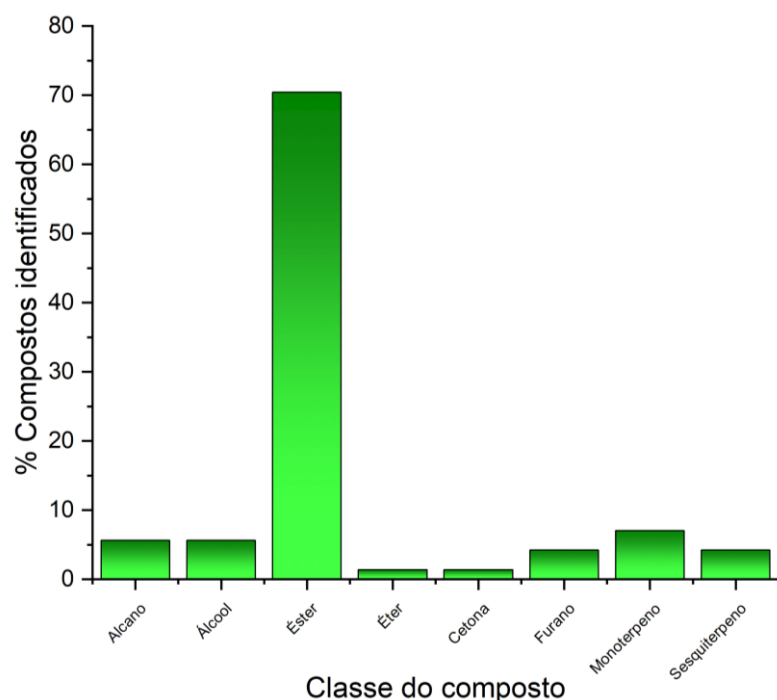


Fonte: Autoria própria.

Pela observação da ampliação dos picos do cromatograma na Figura 13 fica nítido que, de modo geral, os frutos Controle apresentaram picos com áreas significativamente maiores que os frutos Contaminados no dia 4 de análise, de modo que a somatória total das áreas dos picos dos frutos Contaminados correspondeu a 28% da área total dos picos identificados para os frutos Controle.

Outro fator interessante a se destacar é a composição desses compostos voláteis em relação a suas classes químicas, o que está apresentado na Figura 14.

Figura 14 – Gráfico das porcentagens das classes químicas dos voláteis dos morangos identificados por GC-MS.



Fonte: Autoria própria.

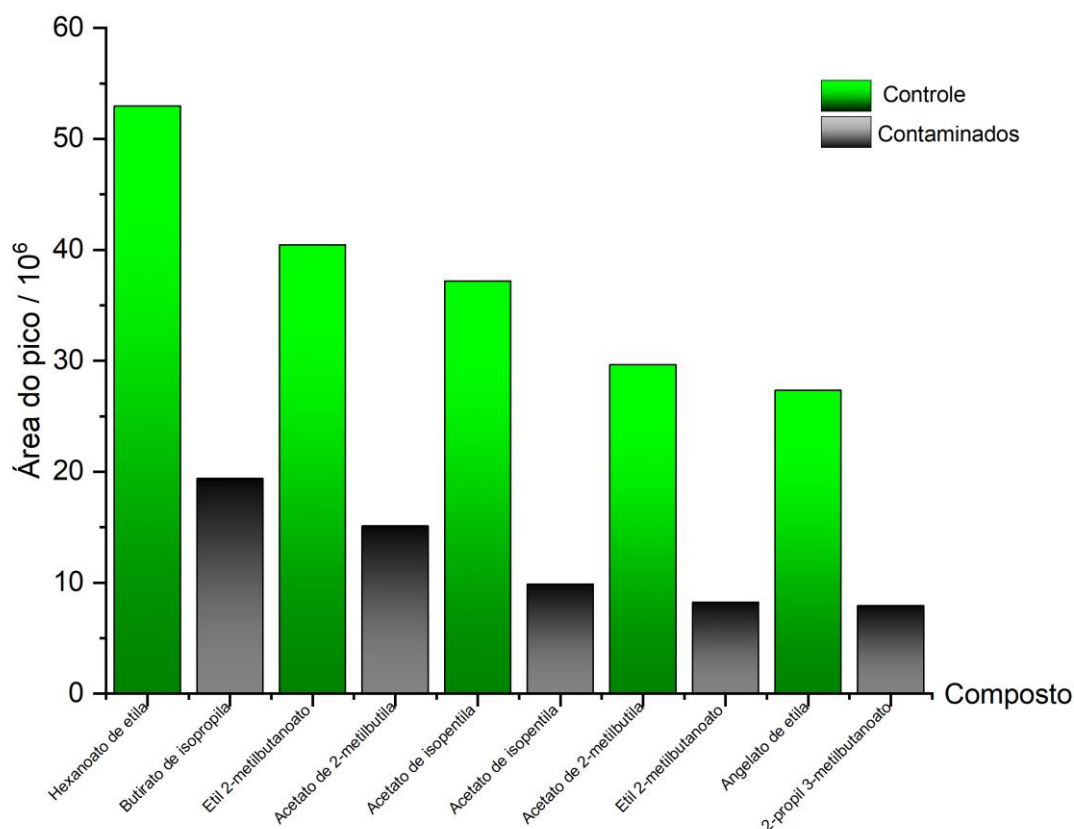
A classificação dos compostos voláteis caracterizados permite afirmar que a classe de voláteis predominante nos morangos foi a classe dos ésteres, o que já era esperado, pois os ésteres são compostos amplamente encontrados em frutos (Almenar; Hernández-Muñoz; Gavara, 2009; *et al.*, 2022). No metabolismo das frutas, a aciltransferase (AAT) catalisa a última etapa de formação de ésteres por transacilação de um acil-CoA a um álcool e a combinação entre diferentes álcoois e acil-CoAs resultarão na formação de uma variedade de ésteres em diferentes espécies frutíferas; sendo que a maioria dos prováveis precursores dos ésteres são lipídios e

aminoácidos e, por exemplo, no caso do morango, o aminoácido alanina já foi apontado em pesquisas anteriores, como um aminoácido importante para a formação de ésteres etílicos durante o amadurecimento de morangos (Beekwilder *et al.*, 2004). A presença de álcoois, como 1-hexanol, identificado nos últimos dias de análise, está associada ao processo de senescência do fruto, no qual ocorre a quebra da membrana celular nos frutos, o que leva a liberação de ácidos graxos, os quais aumentam a peroxidação lipídica e a consequente biossíntese de álcoois de seis átomos de carbono (Bertolo, 2024).

Além disso, é importante destacar a presença dos monoterpenos e sesquiterpenos, que por apresentarem estruturas terpênicas de menor massa molecular possuem alta volatilidade, sendo de grande importância para o aroma de produtos naturais, como frutas cítricas (Farkas e Mohácsi-Farkas, 2014). A formação desses compostos de aroma é consequência de duas rotas metabólicas, a via do mevalonato e a via do 1-desoxilulose 5-fosfato, que, por meio do isopentenil pirofosfato (IPP) ou de seu isômero dimetilalil pirofosfato (DMAPP) resultam na formação de terpenos, constituídos pela estrutura química em unidades de 5 carbonos, como os identificados nas amostras de morangos:  $\alpha$ -Pineno (aroma: frutado, doce, verde, amadeirado, pinho, cítrico, limão); p-cimeno (aroma: limão, frutado, combustível, doce, ervas, picante); limoneno (aroma: alcaçuz, verde, cítrico, etéreo, frutado);  $\beta$ -ocimeno (aroma: ervas, suave, cítrico, doce, laranja, limão); Linalol (aroma: muscat, doce, verde, floral, limão, salsa, lavanda, frutado);  $\beta$ -faneseno (aroma: oleoso, frutado, cítrico, amadeirado);  $\alpha$ -muuroleno (aroma: amadeirado) e trans-nerolidol (aroma: ceroso, floral) (Kitaoka *et al.*, 2015).

Conforme já destacado anteriormente, foi identificada uma grande variação nas áreas dos frutos Contaminados em relação aos frutos Controle no dia 4. Além disso, também se comparou as áreas dos compostos voláteis majoritários para as suas amostras como pode ser visualizado na Figura 15 a seguir.

Figura 15 – Gráfico das áreas dos voláteis majoritários identificados no dia 4 da análise cromatográfica para os frutos controle e contaminados.



Fonte: Autoria própria.

A primeira observação realizada a partir da Figura 15 foi quanto às áreas dos picos dos compostos majoritários que, em concordância com os resultados já discutidos, demonstra que os picos possuem área expressamente maior para os frutos Controle. Ademais, os voláteis majoritários dos frutos Controle apresentaram diferenças quanto aos majoritários dos frutos Contaminados. Para os frutos Controle no dia 4 o composto hexanoato de etila (aroma: frutado, morango, anis, goma de vinho, doce) destacou-se como majoritário, seguido do etil 2-metilbutanoato (aroma: doce, frutado, morango, amora, maçã verde), acetato de isopentila (aroma: fresco, banana, doce, frutado, pêra), acetato de 2-metilbutila (aroma: herbal, etéreo, rum, frutado fermentado, banana) e angelato de etila. Já os frutos Contaminados apresentaram



como majoritários o butirato de isopropila (aroma: pungente), acetato de 2-metilbutila, acetato de isopentila e 2-propil 3-metilbutanoato (aroma: maçã, abacaxi, frutado).

Por fim, identificou-se os compostos presentes apenas na amostra do grupo de morangos Contaminados, em mais de um cromatograma obtido, os quais foram destacados na Tabela 3, sendo eles: crotonato de isopropila e (E)-2butenoato de isobutila. Visto a presença exclusiva desses compostos na amostra de frutos contaminados por *B. Cinera* a partir do dia 1 de análise, os mesmos podem ser destacados como possíveis marcadores da contaminação fúngica.

## 5. Conclusão

Por meio do trabalho desenvolvido e da revisão bibliográfica realizada acerca de perdas pós-colheita e vida de prateleira do morango, conclui-se que a contaminação fúngica causada por *B. cinerea* é capaz de alterar parâmetros físico-químicos dos morangos hospedeiros, tais como redução da taxa respiratória dos frutos contaminados em relação ao controle e redução da acidez titulável. Tais alterações possivelmente ocorrem devido ao mecanismo de ação dos fungos, que, em geral, afeta o metabolismo do hospedeiro, levando a sua deterioração e sendo causa de grandes perdas econômicas.

Quanto à análise cromatográfica, foi possível observar que há uma grande predominância de ésteres na composição do perfil de voláteis de morangos e que a contaminação por *B. cinerea* afeta tal perfil, alterando seus compostos majoritários e a totalidade da área de picos identificados, já que para os frutos contaminados a somatória das áreas dos picos identificados corresponde a apenas 28% da área total dos picos dos voláteis dos frutos saudáveis. Além disso, identificou-se 2 compostos voláteis distintos presentes apenas nos frutos contaminados e ausentes nos frutos saudáveis, sendo eles crotonato de isopropila e (E)-2 butenoato de isobutila. Tais compostos podem ser indicadores precoces de contaminação fúngica em morangos por *B. cinérea*, o que deve ser confirmado em estudos futuros.

## 6. Referências

ABD-ELKADER, Doaa Y. et al. post-harvest enhancing and Botrytis cinerea control of strawberry fruits using low cost and eco-friendly natural oils. *Agronomy*, v. 11, n. 6, p. 1246, 2021.

ABOUELENEIN, Doaa et al. Volatile profile of strawberry fruits and influence of different drying methods on their aroma and flavor: A review. *Molecules*, v. 28, n. 15, p. 5810, 2023.

ABRAS. Fórum de prevenção de perdas. Brasil, 2021. Disponível em: <https://static.abras.com.br/pdf/perdas2021.pdf>. Acesso em: 09 mai 2024.

ALMENAR, Eva; HERNANDEZ-MUNOZ, Pilar; GAVARA, Rafael. Evolution of selected volatiles in chitosan-coated strawberries (*Fragaria* × *ananassa*) during refrigerated storage. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 57, n. 3, p. 974-980, 2009.

BALASUBRAMANIAN, Sundar; PANIGRAHI, Suranjan. Solid-phase microextraction (SPME) techniques for quality characterization of food products: a review. *Food and Bioprocess Technology*, v. 4, p. 1-26, 2011.

BASSOLINO, Laura et al. Accumulation of anthocyanins in tomato skin extends shelf life. *New Phytologist*, v. 200, n. 3, p. 650-655, 2013.

BARIKLOO, Hossein; AHMADI, Ebrahim. Shelf-life extension of strawberry by temperatures conditioning, chitosan coating, modified atmosphere, and clay and silica nanocomposite packaging. *Scientia Horticulturae*, v. 240, p. 496-508, 2018.

BEEKWILDER, Jules et al. Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. *Plant Physiology*, v. 135, n. 4, p. 1865-1878, 2004.

BERTOLO, Mirella Romanelli Vicente. Desenvolvimento e aplicação de novos materiais poliméricos à base de quitosana, gelatina e extrato de casca de romã (*Punica Granatum* L.) para revestimento e melhoria da qualidade pós-colheita de morangos (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). 2024. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BLANCO-ULATE, Barbara et al. Hitting the wall: plant cell walls during *Botrytis cinerea* infections. *Botrytis—the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*, p. 361-386, 2016a.

BLANCO-ULATE, Barbara et al. Ripening of tomato fruit and susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Botrytis—the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*, p. 387-412, 2016b.

CALDAS, Adriana Silva. Atualização da vida útil de morangos in natura na cadeia do "e; frio" e. 2022. Tese de Doutorado. [sn].

CHITARRA, Maria Isabel Fernandes. Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio. Universidade Federal de Lavras, 2005.

ELIK, Aysel et al. Strategies to reduce post-harvest losses for fruits and vegetables. *Strategies*, v. 5, n. 3, p. 29-39, 2019.

FANG, Shuting et al. Recent developments on solid phase microextraction (SPME) coatings for in vivo analysis. *Green Analytical Chemistry*, p. 100069, 2023.

FARKAS, J., MOHÁCSI-FARKAS, C. In: MOTAJERMI, Y. (ed). 1° Ed. Safety of foods and beverages: spices and seasonings. *Encyclopedia of Food Safety. Volume 3: Foods, Materials, Technologies and Risks*. Elsevier, 2014. p. 324-330.

FEDELE, Giorgia; BRISCHETTO, Chiara; ROSSI, Vittorio. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on grape berries as influenced by temperature and humidity. *Frontiers in Plant Science*, v. 11, p. 559208, 2020.

FRANÇOSO, Iara Luiza Tassim et al. Physical-chemical alterations in irradiated and stored strawberries (*Fragaria anassa* Duch.). *Food Science and Technology*, v. 28, p. 614-619, 2008.

FLORES CANTILLANO, R. F.; DA SILVA, Médelin Marques. *Manuseio pós-colheita de morangos*. 2010.

GIL-GIRALDO, Erica Yulieth; DUQUE-CIFUENTES, Alba Lucía; QUINTERO-CASTAÑO, Víctor Dumar. Obtaining minimally processed strawberry (*Fragaria x ananassa*) products and their physicochemical, microbiological, and sensory characterization by using edible coatings. *Dyna*, v. 85, n. 207, p. 183-191, 2018.

GUINÉ, Raquel de Pinho Ferreira et al. Evaluation of phenolic and antioxidant properties of strawberry as a function of extraction conditions. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 23, p. e2019142, 2020.

HARSHMAN, Julia M. et al. Resistance to *Botrytis cinerea* and quality characteristics during storage of raspberry genotypes. *HortScience*, v. 49, n. 3, p. 311-319, 2014.

IKEGAYA, Atsushi et al. Practical long-term storage of strawberries in refrigerated containers at ice temperature. *Food Science & Nutrition*, v. 8, n. 9, p. 5138-5148, 2020.

JAGIRANI, Muhammed Saqaf; SOYLAK, Mustafa. Microextraction technique based new trends in food analysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 52, n. 5, p. 968-999, 2022.

KADER, Adel A.; ROLLE, Rosa Sonya. The role of post-harvest management in assuring the quality and safety of horticultural produce. *Food & Agriculture Org.*, 2004.

KASVI, 2024. Como é realizada a Contagem de Células? Disponível em: [<https://kasvi.com.br/como-e-realizada-contagem-de-celulas/>]. Acesso em: 15 maio 2024.

KITAOKA, N., Lu, X., YANG, B., PETERS, R. J. The Application of Synthetic Biology to Elucidation of Plant Mono-, Sesqui-, and Diterpenoid Metabolism. *Molecular Plant*. v. 8, n°1, p. 6-16, 2015.

LANCIONI, Carlina et al. Headspace solid-phase microextraction: Fundamentals and recent advances. *Advances in Sample Preparation*, v. 3, p. 100035, 2022.

LI, Hua et al. The association between the susceptibility to *Botrytis cinerea* and the levels of volatile and non-volatile metabolites in red ripe strawberry genotypes. *Food Chemistry*, v. 393, p. 133252, 2022.

LIU, Yaowen et al. Fabrication and testing of PVA/Chitosan bilayer films for strawberry packaging. *Coatings*, v. 7, n. 8, p. 109, 2017.

LUÍS, Miguel José Santos. Avaliação da qualidade da 'Pera Rocha' durante a conservação em atmosfera controlada. 2022. Dissertação de Mestrado. Universidade de Évora.

MONTEIRO, Eduarda Rodrigues et al. Sanitização de frutas e hortaliças: uma revisão. 2022.

NOTTE, Ana-Maria et al. Molecular identification and characterization of *Botrytis cinerea* associated to the endemic flora of semi-desert climate in Chile. *Current Research in Microbial Sciences*, v. 2, p. 100049, 2021.

OLIVEIRA FILHO, Josemar Gonçalves et al. Essential oils as natural fungicides to control rhizopus stolonifer-induced spoiled of strawberries. *Biointerface Res. Appl. Chem*, v. 11, p. 13244-13251, 2021.

ONU VERDE. Produzidos e jamais consumidos: um guia visual sobre o desperdício de alimentos. Brasília, DF, 2015. Disponível em: <http://www.onuverde.org.br/Artigo/108/Produzidos-e-jamais-consumidos-um-guia-visual-sobre-o-desperdicio-de-alimentos>. Acesso em: 09 mai 2024.

PANAHIRAD, Sima et al. Applications of carboxymethyl cellulose-and pectin-based active edible coatings in preservation of fruits and vegetables: A review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 110, p. 663-673, 2021.

PEREZ, Jane Oliveira; MOREIRA, Andréa Nunes; SANTOS, Ana Elisa Oliveira dos. Pós-colheita de frutas e hortaliças: Coletânea de pesquisas. 2024.

PETRASCH, S., Knapp, S. J., & Blanco-Ulate, B. (2019). Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 20(6), 877-892. <https://doi.org/10.1111/mpp.12794>

RHOUMA, Abdelhak et al. Strawberry grey mould, a devastating disease caused by the airborne fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Egyptian Journal of Phytopathology*, v. 50, n. 2, p. 44-50, 2022.

SINGH, Akath et al. The genetic variability, inheritance and inter-relationships of ascorbic acid,  $\beta$ -carotene, phenol and anthocyanin content in strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). *Scientia horticulturae*, v. 129, n. 1, p. 86-90, 2011.

TOSSETTI, Roberta et al. Continuous exposure to ethylene differentially affects senescence in receptacle and achene tissues in strawberry fruit. *Frontiers in plant science*, v. 11, p. 515685, 2020.

VELOSO, Javier; VAN KAN, Jan AL. Many shades of grey in *Botrytis*–host plant interactions. *Trends in plant science*, v. 23, n. 7, p. 613-622, 2018.

WATANABE, M.; FABRIS, T. R. (Org.). FAO divulga dados sobre a fome no mundo em 2022. 2 ed. OBDESI/UNESC. Criciúma, 2023. Disponível em: <http://observatorio.unesc.net/informativo>.

YAN, Jiawei et al. The effect of the layer-by-layer (LBL) edible coating on strawberry quality and metabolites during storage. *Postharvest Biology and Technology*, v. 147, p. 29-38, 2019

ZHANG, Zibo et al. Jasmonate increases terpene synthase expression, leading to strawberry resistance to *Botrytis cinerea* infection. *Plant Cell Reports*, v. 41, n. 5, p. 1243-1260, 2022.

ZHANG, Yang et al. Anthocyanins double the shelf life of tomatoes by delaying overripening and reducing susceptibility to gray mold. *Current Biology*, v. 23, n. 12, p. 1094-1100, 2013.

ZHAO, Yijie et al. Early detection of *Botrytis cinerea* in strawberry fruit during quiescent infection using selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS). *International Journal of Food Microbiology*, v. 402, p. 110313, 2023.