

**Contributo para o estudo da aplicação da tecnologia de  
alta pressão hidrostática na conservação do cogumelo  
Pleurotus ostreatus**

**Eduardo Castro Falcão Gonçalves Rosendo**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança  
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança  
Alimentar*

Orientado por

**Professora Doutora Maria de Fátima Alves Pinto Lopes da Silva**

**Bragança  
2014**



## **Agradecimentos**

A realização desta Dissertação de Mestrado apenas foi possível graças à colaboração e ao contributo, de forma direta ou indireta, de inúmeras pessoas às quais gostaria de expressar algumas palavras de agradecimento e de profundo reconhecimento.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Maria de Fátima Alves Pinto Lopes da Silva, da Escola Superior Agrária de Bragança do Instituto Politécnico de Bragança, por me ter motivado a realizar a presente tese, bem como por toda a ajuda prestada na realização do trabalho laboratorial e escrito, pelo constante incentivo e disponibilidade, pela sua grande paciência, pela confiança e acima de tudo por toda a amizade.

À Professora Doutora Maria Letícia Estevinho, pelos conhecimentos e sugestões transmitidas na parte da caracterização microbiológica, pela sua disponibilidade, apoio e esforço para garantir condições materiais e financeiras para o bom desenvolvimento do trabalho.

À Professora Doutora Paula Cristina Azevedo Rodrigues pela ajuda, simpatia e disponibilidade.

A todas as “meninas” do Laboratório de Agro-Indústrias, D<sup>a</sup> Céu, Teresa, Luana e do Laboratório de Microbiologia, Aline, Georgina e Adriane por todos os bons momentos passados, pelo apoio e grande amizade. Obrigado a todas pela boa companhia e ajuda prestada ao longo deste trabalho, que fez com que fosse mais fácil a conclusão do mesmo.

A todos os meus amigos que estado perto ou longe sempre demonstraram uma enorme amizade, apoio e companheirismo. Ao pessoal do “Gang 48” - Ricardo, Gil, Sílvia e Márcia - que apesar de já estarem longe, estão sempre perto e cujos momentos que passámos juntos nunca serão esquecidos. Ao Carlos e à Filipa pela amizade e diversão ao longo destes últimos dois anos. À Elsa e Susana pela boa disposição, entreatuda e companheirismo. Aos meus amigos de longa data de Oliveira pelos longos

anos de convívio e amizade e pela sempre maravilhosa recepção quando chegava à minha cidade natal.

À Sílvia, pelo companheirismo, apoio, compreensão e paciência em todos os momentos, pela enorme ajuda e contributo na realização deste trabalho, pelo carinho, amor e especialmente por nunca deixar de ser a pessoa mais especial e importante ao longo de todo este percurso académico.

Por fim agradeço a toda a minha família. Aos meus pais pelos esforços que fizeram para que chegasse aqui, pelo amor que me deram e porque lhes devo tudo o que sou hoje. À minha irmã Joana, por ser a melhor irmã do mundo, por todas as horas bem passadas, todas as brincadeiras e por toda a sua boa disposição. Aos meus avós por todo o carinho e compreensão. Aos meus animais de estimação (Spencer, Ozzy, Laureana, Elliot e Maggie) por todas as brincadeiras e bons momentos e porque apesar de não serem pessoas, são definitivamente parte da família.

A todos os amigos e familiares que não foram citados, mas que, de qualquer forma, me ajudaram e que torceram por mim e estão felizes por mais uma conquista.

A todos vós o meu mais sincero Obrigado

# Índice

<b>Resumo .....</b>	<b>vii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>ix</b>
<b>Capítulo 1</b>	
<b>Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1 Cogumelos comestíveis e seu interesse na alimentação .....	2
1.2 Aspectos comerciais, legais e normativos .....	4
1.3 Caracterização do cogumelo <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	7
1.3.1 Cultivo .....	7
1.3.2 Aspectos físicos e nutricionais .....	9
1.4 Aspectos de pós-colheita de cogumelos .....	10
1.4.1 Evolução fisiológica .....	10
1.4.2 Indicadores de qualidade .....	12
1.5 Tecnologia de Altas Pressões .....	17
1.5.1 Modo de ação .....	18
1.5.2 Efeitos genéricos nos alimentos .....	20
1.5.3 Efeitos na textura de hortofrutícolas .....	21
1.5.4 Efeitos na cor de hortofrutícolas .....	23
1.5.5 Efeitos sobre os microrganismos.....	25
1.5.5.1 Fatores intrínsecos relacionados com o alimento que influenciam a eficácia das altas pressões sobre os microrganismos.....	25
1.5.5.2 Fatores relacionados com os próprios microrganismos.....	26
1.6 Objetivos.....	28

**Capítulo 2**

<b>Material e Métodos.....</b>	<b>29</b>
2.1 Obtenção e preparação de amostras.....	30
2.2 Ensaio tecnológicos .....	32
2.3 Avaliação nutricional dos cogumelos frescos .....	33
2.3.1 Preparação da amostra.....	33
2.3.2 Humidade .....	34
2.3.3 Cinza bruta .....	34
2.3.4 Gordura bruta .....	34
2.3.5 Proteína total .....	35
2.3.6 Hidratos de carbono .....	35
2.3.7 Valor energético .....	35
2.4 Indicadores de qualidade físico-químicos dos cogumelos conservados...	36
2.4.1 Perda de massa .....	36
2.4.2 Cor.....	36
2.4.3 Textura .....	37
2.4.4 pH.....	37
2.4.5 Sólidos solúveis totais .....	38
2.5 Indicadores de qualidade microbiológica dos cogumelos conservados ...	38
2.5.1 Preparação das amostras.....	38
2.5.2 Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos.....	38
2.5.3 Contagem total de microrganismos aeróbios psicrófilos .....	39
2.5.4 Contagem total de bolores e leveduras.....	39
2.5.5 Contagem de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> .....	40
2.5.6 Pesquisa de esporos clostrídios sulfito-redutores.....	40
2.6 Análise estatística .....	41

**Capítulo 3**

<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>42</b>
3.1 Caracterização nutricional dos cogumelos <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	43
3.2 Indicadores físico-químicos da qualidade de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	44
3.2.1 Perda de massa na conservação convencional .....	44
3.2.2 Teor de Sólidos Solúveis Totais.....	46
3.2.3 pH.....	49
3.2.4 Cor.....	52
3.2.4.1 Luminosidade ( $L^*$ ).....	53
3.2.4.2 Coordenada $a^*$ .....	58
3.2.4.3 Coordenada $b^*$ .....	61
3.2.4.4 Variação Total de Cor ( $\Delta E^*$ ).....	65
3.2.5 Textura .....	68
3.1 Indicadores microbiológicos da qualidade de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	74

**Capítulo 4**

<b>Considerações finais.....</b>	<b>79</b>
----------------------------------	-----------

**Capítulo 5**

<b>Perspetivas Futuras.....</b>	<b>82</b>
---------------------------------	-----------

**Capítulo 6**

<b>Referências .....</b>	<b>84</b>
--------------------------	-----------

<b>Anexos.....</b>	<b>100</b>
--------------------	------------

Anexo I.....	101
--------------	-----

Anexo II.....	103
---------------	-----



## Resumo

Os cogumelos *Pleurotus ostreatus* devem a sua popularidade principalmente ao seu fácil método de cultivo, alto valor nutricional e sabor único. Em Portugal a principal forma de comercialização deste cogumelo é em fresco, embalado em bandejas de poliestireno envoltos numa película de policloreto de vinil (PVC), o que proporciona uma acelerada perda de qualidade, tendo um tempo de prateleira de poucos dias. Este facto está relacionado com a elevada taxa respiratória, elevada suscetibilidade à deterioração microbiana e relativa sensibilidade ao acastanhamento enzimático. As perdas económicas associadas refletem-se no preço final do produto, por isso, é necessário encontrar alternativas de conservação que as minimizem, prolongando o tempo de vida útil.

A tecnologia de altas pressões hidrostáticas, pelo desenvolvimento e implantação crescente que tem vindo a ter no âmbito alimentar, surge assim como uma possível alternativa tecnológica na preservação de cogumelos, em alternativa às técnicas convencionais. Este trabalho teve assim como objetivo estudar o efeito da tecnologia de Altas Pressões Hidrostáticas, isoladamente e em conjugação com o uso de uma solução de ácido cítrico (1%), em cogumelos *Pleurotus ostreatus* após processamento e durante o armazenamento (21 dias a 4° C).

Cogumelos frescos obtidos duas horas antes foram tratados com 600 MPa durante 10 minutos. Amostras não pressurizadas e embaladas de modo similar ao convencional (bandejas de poliestireno envoltos numa película de policloreto de vinil) foram utilizadas como controlo. Sobre todas as amostras realizaram-se ensaios físico-químicos – composição elementar, perda de massa, teor de sólidos solúveis totais, pH, parâmetros instrumentais de cor e textura – e parâmetros microbiológicos (mesófilos, psicrófilos, bolores e leveduras, coliformes totais e *E.coli* e esporos de clostrídios sulfito-redutores), ao dia inicial e aos dias 3, 7, 14 e 21 de conservação. Utilizaram-se dois lotes distintos de cogumelos.

A avaliação nutricional destes cogumelos frescos mostrou que são constituídos essencialmente por água ( $91,54 \pm 0,05$  – lote 1 e  $90,86 \pm 0,09$  - lote 2), tendo na matéria seca glúcidos ( $79,84 \pm 0,28$  - lote 1 e  $81,22 \pm 0,41$  - lote 2), minerais ( $9,98 \pm 0,32$  - lote 1 e  $8,78 \pm 0,24$  - lote 2) e proteínas ( $8,23 \pm 0,15$  - lote 1 e  $8,14 \pm 0,36$  - lote 2), sendo pobres em gordura ( $2,43 \pm 0,09$  - lote 1 e  $1,33 \pm 0,01$  - lote 2).

Durante a conservação dos cogumelos controlo, a perda de massa foi mais proeminente nos sete dias de conservação atingindo os  $8,44 \pm 2,68 \%$  e  $15,08 \pm 2,62 \%$ , no lote 1 e 2, respetivamente.

Relativamente aos ensaios tecnológicos, o estudo dos parâmetros físico-químicos revelaram que os valores de pH e do teor de sólidos solúveis totais registaram diferenças significativas entre todas as amostras. Nas amostras tratadas com altas pressões (P) e com altas pressões na presença de ácido cítrico (AP) registaram uma diminuição de pH em relação ao controlo (C) e à amostra conservada só com ácido cítrico (A). O teor de sólidos solúveis totais da amostra P aumenta em relação à amostra controlo, sendo o único tratamento em que isso sucede. Já os tratamentos que envolveram ácido cítrico reduziram de forma drástica o teor de SST dos cogumelos. Os tratamentos utilizando altas pressões (P e AP) comparados com o controlo (C) registaram um escurecimento (redução na luminosidade), bem como uma redução nas tonalidades vermelha (valor de  $a^*$ ) e amarela (valor de  $b^*$ ), embora nem sempre estas reduções tenham tido importância estatística.

Quanto a alterações no parâmetro de textura analisado os resultados obtidos parecem indicar que a tecnologia HPP, nas condições ensaiadas, não altera a força de corte a aplicar aos cogumelos relativamente aos cogumelos sem pressurização.

A principal modificação nos indicadores de qualidade testados foi uma redução drástica na carga microbiana inicial, especialmente de bolores e leveduras (reduções de 4 e 5  $\text{Log}_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ ). Esta tecnologia, nas condições ensaiadas apresentou excelentes resultados em termos microbiológicos, conseguindo manter ao longo dos 21 dias de conservação, os números de UFC/g em níveis bastante reduzidos, o que, comparando com os cogumelos embalados convencionalmente e considerando o prazo de validade destes (5 a 7 dias), a tecnologia de HPP consegue aumentar o prazo de validade em cerca de 15 dias relativamente ao embalamento convencional, considerando apenas os indicadores microbiológicos.

Aparentemente a presença de ácido cítrico (1%) não trouxe benefícios relevantes relativamente à qualidade dos cogumelos apenas pressurizados.

O presente estudo mostrou que o uso da tecnologia de altas pressões pode ser promissor para aumentar a vida útil deste cogumelo.

**Palavras-chave:** Cogumelos *Pleurotus ostreatus*, High Pressure Processing, Tecnologia de Altas Pressões Hidrostáticas, microrganismos, cor, teor de sólidos solúveis totais, pH, textura.

## Abstract

*Pleurotus ostreatus* mushrooms owns his popularity mainly to a relatively simple method of cultivation, high nutritional value and unique flavour. In Portugal the main way of commercialization of this mushroom is in his fresh form, packaged in polystyrene trays and overwrapped with polyvinyl chloride (PVC) film, who causes a rapidly loss of quality, having a short life shelf, due to his high respiration rate, microbiological susceptibility and enzymatic browning sensibility. The economic losses associated with this mushrooms are reflected in his final cost, so it is necessary to find new ways of commercialization, enhancing the shelf life of the product.

Because of the growing use and development that High Pressure Processing technology is gaining in food industry, this technology emerge as a viable alternative conservation technique of mushrooms. The objective of this work was to study, the isolated effect and the combined effect with citric acid (1%) that HPP technology has on *Pleurotus* mushrooms immediately after processing and during storage (21 days at 4°C).

Fresh mushrooms obtained two hours before, were processed with 600 MPA during 10 minutes. No pressurized samples and packaged conventionalloy (polystyrene trays and overwrapped with polyvinyl chloride) were used as control. Physico-chemical tests - nutritional composition, weight loss, soluble solids content (SSC), pH, instrumental parameters of colour and texture – and microbiological quality indexes (aerobic mesophilic, psychophilic, yeasts and molds, total coliforms, *E.coli* and spores from sulfite-reducing clostridia were done in all samples, in initial day and in day 3, 7, 14, e 21. Two different batches of mushrooms were used.

The nutritional evaluation of fresh mushrooms showed that they are made primarily by water ( $91,54 \pm 0,05$  - batch 1 and  $90,86 \pm 0,09$  - batch 2), having in the content of dry matter, carbohydrates ( $79,84 \pm 0,28$  - batch 1 and  $81,22 \pm 0,41$  - batch 2), minerals ( $9,98 \pm 0,32$  – batch 1 and  $8,78 \pm 0,24$  - batch 2) and proteins ( $8,23 \pm 0,15$  – batch 1 and  $8,14 \pm 0,36$  – batch 2), but they are low in fat ( $2,43 \pm 0,09$  - batch 1 and  $1,33 \pm 0,01$  - batch 2).

During the conservation of mushrooms of the control sample, the weight loss was more prominent in the first seven days, reaching  $8,44 \pm 2,68$  and  $15,08 \pm 2,62$  in batch 1 and 2 respectively.

Regarding the technology tests, the physico-chemical parameters demonstrate that pH and SSC contents have significant differences between all samples. Samples treated with high pressure (P) and with high pressure and citric acid (AP) experienced a decrease in pH compared to control (C) and to the sample conserved only with citric acid (A). The content of SSC in P samples increase regarding to control samples, being the only treatment that this happens. The treatments that involve citric acid reduced significantly the SSC of mushrooms. Concerning the colour measurements, all treatments shown a darkening of the samples (reduction in lightness,  $L^*$ ), as well as a reduction in red tonality ( $a^*$  value) and in yellow tonality ( $b^*$  value), although not always these reductions have statistical significance. The Texture results seem to indicate that the HPP technology, in the tested conditions, does not alter the shear force needed to be applied in mushrooms compared to unpressurized mushrooms.

The main change in the tested quality indicators is a drastic reduction of the initial microbial load, especially yeast molds (4 and 5  $\text{Log}_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> reduction). This technology, in tested conditions, showed excellent results in microbiological terms, reducing the initial microbial load and be able to maintain throughout the 21 days of storage the numbers of CFU/g at very low levels, which, comparing to the mushrooms packaged conventionally and considering the period of validity of (5-7 days), HPP technology can increase the shelf life about 15 days comparing to conventional packaging, considering only microbiological indicators.

Apparently the presence of citric acid (1%) does not bring relevant benefits in the quality of pressurized mushrooms.

The present study shown that HPP can be a promising regarding the enhance of shelf life of this mushrooms, although it was not possible to establish a clear pattern of variation in some indicators of physical and chemical quality, since the variability of the two batches is quite sharply between them.

**Key-words:** *Pleurotus ostreatus* mushrooms, High Pressure Processing, microorganisms, colour, soluble solids content, pH, texture.

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Aminoácidos essenciais presentes em cogumelos <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	9
<b>Tabela 2.</b> Teor de minerais da espécie <i>Pleurotus ostreatus</i> . .....	10
<b>Tabela 3.</b> Composição elementar dos dois lotes de amostras estudadas (valores médios $\pm$ desvio padrão). .....	44
<b>Tabela 4.</b> Resultado da ANOVA a três fatores para verificar a existência de efeitos significativos de cada fator e interação entre eles para o valor de Sólidos Solúveis Totais. ....	46
<b>Tabela 5.</b> Resultado da ANOVA a três fatores para verificar a existência de efeitos significativos de cada fator e interação entre eles para o valor de pH.....	50
<b>Tabela 6.</b> Resultado da ANOVA a três fatores para verificar a existência de efeitos significativos em cada fator e interação entre eles para os parâmetros cromáticos. ....	53
<b>Tabela 7.</b> Valores médios $\pm$ desvio padrão de Luminosidade ( $L^*$ ) determinados no chapéu para os diferentes tratamentos de conservação aos dias de análise estabelecidos.....	54
<b>Tabela 8.</b> Valores médios $\pm$ desvio padrão de Luminosidade ( $L^*$ ) determinados no pé para os diferentes tratamentos de conservação aos dias de análise estabelecidos.....	57
<b>Tabela 9.</b> Valores do parâmetro $a^*$ (média $\pm$ desvio padrão) determinados no chapéu para os diferentes tratamentos de conservação aos dias de análise estabelecidos.....	58
<b>Tabela 10.</b> Valores do parâmetro $a^*$ (média $\pm$ desvio padrão) determinados no pé para os diferentes tratamentos de conservação aos dias de análise estabelecidos.....	60
<b>Tabela 11.</b> Valores do parâmetro $b^*$ (média $\pm$ desvio padrão) determinados no chapéu para os diferentes tratamentos de conservação aos dias de análise estabelecidos.....	62
<b>Tabela 12.</b> Valores do parâmetro $b^*$ (média $\pm$ desvio padrão) determinados no pé para os diferentes tratamentos de conservação aos dias de análise estabelecidos.....	64
<b>Tabela 13.</b> Valores do parâmetro $\Delta E^*$ (média $\pm$ desvio padrão) determinados no chapéu para os diferentes tratamentos de conservação aos dias de análise estabelecidos.....	65
<b>Tabela 14.</b> Valores do parâmetro $\Delta E^*$ (média $\pm$ desvio padrão) determinados no pé para os diferentes tratamentos de conservação aos dias de análise estabelecidos.....	67
<b>Tabela 15.</b> Resultado da ANOVA a três fatores para verificar a existência de efeitos significativos em cada fator e interação entre eles para a Textura. ....	69
<b>Tabela 16.</b> Contagens de Coliformes Fecais ( <i>E.coli</i> ) nas amostras de cogumelos <i>Pleurotus ostreatus</i> . .....	78

<b>Tabela 17.</b> Análises à presença de esporos de Clostrídios sulfito redutores nas amostras de cogumelos <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	78
<b>Tabela 18.</b> Valores médios $\pm$ desvio padrão para o parâmetro SST ( $^{\circ}$ Brix) determinados para os diferentes tratamentos de conservação aos dias de análise estabelecidos.....	103
<b>Tabela 19.</b> Valores médios $\pm$ desvio padrão para o parâmetro pH determinado para os diferentes tratamentos de conservação aos dias de análise estabelecidos. ....	103
<b>Tabela 20.</b> Valores médios $\pm$ desvio padrão de Textura determinados no chapéu para os diferentes tratamentos e ao longo dos diferentes dias. ....	104
<b>Tabela 21.</b> Valores médios $\pm$ desvio padrão de textura (kgf) determinados no pé para os diferentes tratamentos e ao longo dos diferentes dias. ....	104

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estrutura de um cogumelo (Kalač, 2009). .....	2
<b>Figura 2.</b> Evolução da produção mundial de cogumelos, em milhões de toneladas (FAOSTAT, 2014). .....	4
<b>Figura 3.</b> Média da produção mundial por principais continentes produtores, desde 1993 até 2012 (FAOSTAT, 2014). .....	5
<b>Figura 4.</b> Mapa representativo da produção mundial (FAOSTAT, 2014). .....	5
<b>Figura 5.</b> Evolução da produção de cogumelos em Portugal (USDA, 2014). .....	6
<b>Figura 6.</b> Ciclo de vida generalizado de um fungo basidiomiceta .....	8
<b>Figura 7.</b> Coordenadas cartesianas e cilíndricas do espaço de cor (CIELAB). .....	16
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática dum equipamento de Altas Pressões Hidrostáticas usado para o tratamento de alimentos (adaptado de Singh (2001)). .....	18
<b>Figura 9.</b> Grupos de amostras estabelecidos para os ensaios de conservação. ....	30
<b>Figura 10.</b> Cogumelos embalados e sujeitos à tecnologia de altas pressões: amostra P (à esquerda) e amostra AP (à direita). .....	31
<b>Figura 11.</b> Equipamento de Altas Pressões Hidrostáticas utilizado. ....	33
<b>Figura 12.</b> Cogumelos liofilizados, triturados e crivados. ....	33
<b>Figura 13.</b> Perda de massa (%) dos cogumelos frescos (Média $\pm$ Desvio Padrão) conservados em cuvetes de poliestireno envolvidas com película PVC a 4°C aos dias 0, 3, 7, 14 e 21. ....	45
<b>Figura 14.</b> Teor de Sólidos Solúveis Totais determinados para os diferentes tratamentos de conservação aos dias analisados (Lote 1). ....	47
<b>Figura 15.</b> Teor de Sólidos Solúveis Totais determinados para os diferentes tratamentos de conservação aos dias analisados (Lote 2). ....	47
<b>Figura 16.</b> Valores de pH determinados para os diferentes tratamentos de conservação aos dias analisados (Lote 1). .....	50
<b>Figura 17.</b> Valores de pH determinados para os diferentes tratamentos de conservação aos dias analisados (Lote 2). .....	51
<b>Figura 18.</b> Valores de dureza determinados no chapéu para os diferentes tratamentos de conservação aos dias analisados (Lote 1). .....	69
<b>Figura 19.</b> Valores de dureza determinados no chapéu para os diferentes tratamentos de conservação aos dias analisados (Lote 2). .....	70

<b>Figura 20.</b> Valores de dureza determinados no pé para os diferentes tratamentos de conservação aos dias analisados (Lote 1). .....	72
<b>Figura 21.</b> Valores de dureza determinados no pé para os diferentes tratamentos de conservação aos dias analisados (Lote 2). .....	72
<b>Figura 22.</b> Evolução ao longo do tempo da população ( $\text{Log}_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ ) de Mesófilos das diferentes amostras de cogumelos <i>Pleurotus ostreatus</i> (dos dois lotes) armazenados a 4 °C. ....	75
<b>Figura 23.</b> Evolução ao longo do tempo da população ( $\text{Log}_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ ) de Psicrófilos das diferentes amostras de cogumelos <i>Pleurotus ostreatus</i> (dos dois lotes) armazenados a 4 °C. ....	76
<b>Figura 24.</b> Evolução ao longo do tempo da população ( $\text{Log}_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ ) de Bolores e Leveduras das diferentes amostras de cogumelos <i>Pleurotus ostreatus</i> (dos dois lotes) armazenados a 4 °C. ....	77
<b>Figura 25.</b> Evolução ao longo do tempo da população ( $\text{Log}_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ ) de Coliformes Totais das diferentes amostras de cogumelos <i>Pleurotus ostreatus</i> (em ambos os lotes) armazenados a 4 °C. ....	77

## Lista de Abreviaturas

<b>% b.s</b>	Percentagem em base seca
<b>% m/m</b>	Percentagem em massa/massa
<b>%</b>	Percentagem
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>AOAC</b>	Association of Official Analytical Chemists
<b>a<sub>w</sub></b>	Atividade da água
<b>cm</b>	Centímetros
<b>DRBC</b>	Dichloran Red Bengal Choramphenicol
<b>FAOSTAT</b>	Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database
<b>g</b>	Gramas
<b>g/100g</b>	Grama por cem gramas
<b>HPP</b>	High Pressure Processing
<b>ISSO</b>	International Organization for Standardization
<b>Kcal</b>	Quilocalorias
<b>kgf</b>	Quilograma-Força
<b>kGy</b>	Quilogray
<b>Log<sub>10</sub></b>	Logaritmo base 10
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mg/100g</b>	Miligrama por cem gramas
<b>mg/g</b>	Miligrama por grama
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mm</b>	Milímetros
<b>MPa</b>	Megapascal
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>NP</b>	Norma Portuguesa
<b>PCA</b>	Plate Count Agar
<b>PG</b>	Poligalacturonase
<b>PME</b>	Pectinametilsterase
<b>POD</b>	Peroxidase
<b>PPO</b>	Polifenoloxidase
<b>PVC</b>	Policloreto de Vinil
<b>RCA</b>	Reinforced Clostridial Agar

<b>SST</b>	Sólidos Solúveis Totais
<b>UFC.g<sup>-1</sup></b>	Unidades formadoras de Colónias por Grama
<b>USDA</b>	United States Department of Agriculture

# Capítulo 1

## Introdução

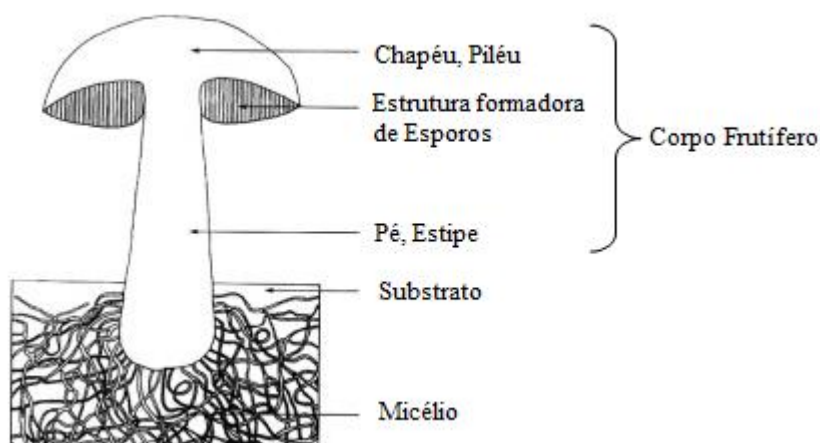


## 1.1 Cogumelos comestíveis e seu interesse na alimentação

Os fungos são seres vivos que apresentam uma grande multiplicidade de formas, tamanhos e aspetos, que inclui organismos unicelulares (leveduras) ou pluricelulares filamentosos que se caracterizam por serem organismos não-móveis, desprovidos de clorofila, formados por filamentos com crescimento apical denominados de hifas, como reprodução sexuada e assexuada e ainda possuem nutrição heterotrófica, alimentando-se de compostos orgânicos vivos (parasitas) ou já em decomposição (saprófitos). A sua parede é composta por quitina e glucanos (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Tendo em conta a sua estrutura, é frequente separar os fungos em dois conjuntos: os unicelulares e os filamentosos. Estes últimos, são os que existem na natureza em maior número, e neles a parte vegetativa é formada por filamentos (hifas) que crescem quase continuamente no interior ou sobre o substrato (Martins, 2004). Através de ramificações, e em algumas espécies, por meio de anastomose ou fusão de hifas, é formada uma rede desses filamentos à qual se dá o nome de micélio (Chang & Miles, 2004). Após um período de crescimento, e em condições favoráveis, o micélio estabelecido produz a estrutura de frutificação, à qual chamamos cogumelo (Chang & Miles, 2004).

O tipo mais comum de cogumelo é em forma de guarda-chuva, com píleo e estipe, e algumas espécies têm adicionalmente um anel, uma volva, ou ambos (Figura 1).



**Figura 1.** Estrutura de um cogumelo (Kalač, 2009).

Por baixo do chapéu apresentam uma superfície de consistência mole, o himénio, (que pode apresentar diferentes formas: lâminas ou lamelas, tubos ou poros, pregas mais

ou menos definidas, superfícies lisas, entre outras), onde se produzem os esporos (Martins, 2004).

Contudo, esta estrutura não se aplica a todas as espécies, existindo uma incontável variedade de formas (Chang & Miles, 2004).

Conhecem-se aproximadamente 2000 espécies de cogumelos comestíveis. Destas, 25 são produzidas em cultivo, designadamente *Agaricus bisporus*, *Agaricus campestris*, *Auriculária auriculajudae*, *Lentinus edodes* e *Pleurotus ostreatus*, sendo posteriormente comercializadas (Furlani & Godoy, 2007).

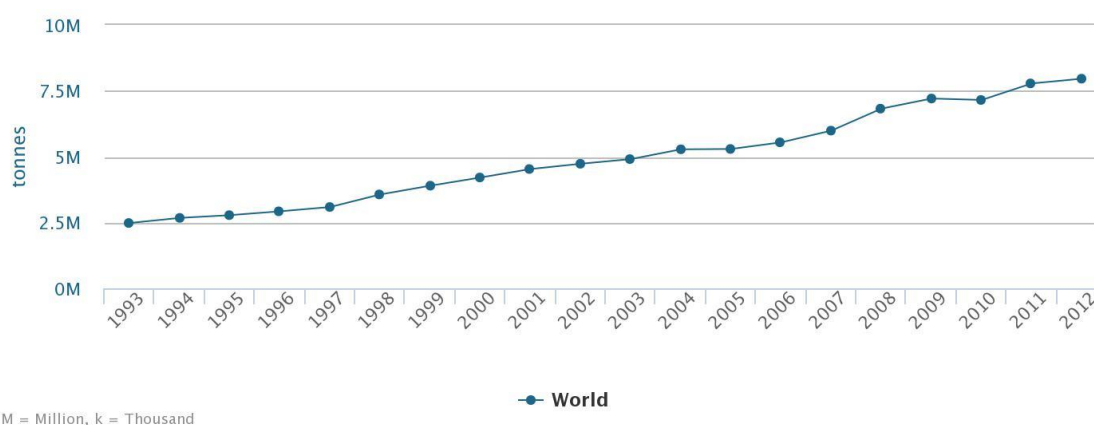
Atualmente os cogumelos são muito apreciados e comercializados por todo o globo, muito devido quer ao seu valor gastronómico, como também devido às suas propriedades nutricionais (Ferreira, Barros, & Abreu, 2009; Ferreira, *et al.*, 2010). Quando comparados com os produtos de origem vegetal, os cogumelos são mais ricos em proteínas, incluindo a presença de todos os aminoácidos essenciais e têm teores equilibrados de vitaminas e minerais, para além de terem um conteúdo de água extremamente elevado (Furlani & Godoy, 2007; Rai & Paul 2007; Grangeia *et al.*, 2011; Kalač, 2009; Ouzouni, *et al.*, 2009; Heleno *et al.*, 2011). Constituem ainda uma fonte considerável de fósforo, potássio, zinco e cobre e contêm um elevado teor de fibras alimentares (Grangeia *et al.*, 2011; Heleno *et al.*, 2011; Kalač, 2009; Ouzouni *et al.*, 2009; Furlani & Godoy, 2007; Tao *et al.*, 2006). Adicionalmente são pobres em calorias, lípidos e sal, são isentos de açúcar, amido e colesterol, o que os torna um suplemento nutricional e dietético ideal (Rai & Paul, 2007).

Para além disso os cogumelos têm vindo a ser considerado alimentos terapêuticos e funcionais (Tsai *et al.*, 2007; Vaz *et al.*, 2011), úteis na prevenção e tratamento de diversas doenças. Ao longo dos anos estes macrofungos foram utilizados primeiramente como agentes antibióticos (penicilina, cefalosporina) e posteriormente como antifúngico, antidiabético, anti-hemorragico, anti-tumoral e imunossupressor. Possuem ainda boas propriedades antioxidantes, e o seu consumo também ajuda no controlo da tensão arterial e do colesterol (Martins, 2004; Manzi *et al.*, 2001; Çaglarirmak, 2007; Barros *et al.*, 2007).

## 1.2 Aspectos comerciais, legais e normativos

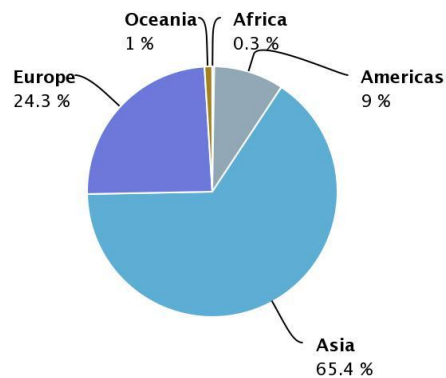
Os cogumelos têm importância à escala global e o seu cultivo tem emergido como um empreendimento agrícola, independente do solo, e promissor. De todos os cogumelos produzidos, somente 45% são consumidos na forma fresca. Os restantes 55% são processados, sendo que 5% destes são na forma desidratada e 50% na forma *appertizada*. Estes valores encontram explicação no facto de os cogumelos terem um tempo de prateleira diminuto na forma fresca e desta forma são comercializados no mercado mundial na forma processada (Singh *et al.*, 2010).

A importância dos cogumelos na indústria alimentar está bem vincado nos dados estatísticos sobre a produção de cogumelos e trufas, que em 2012 ascendeu a 7.959.979 toneladas, ocupando uma área total de 21.644 hectares (ha) (FAOSTAT, 2014). Pela observação da Figura 2, pode-se inferir o efetivo incremento contínuo da sua produção a nível mundial entre 1993 e 2012.



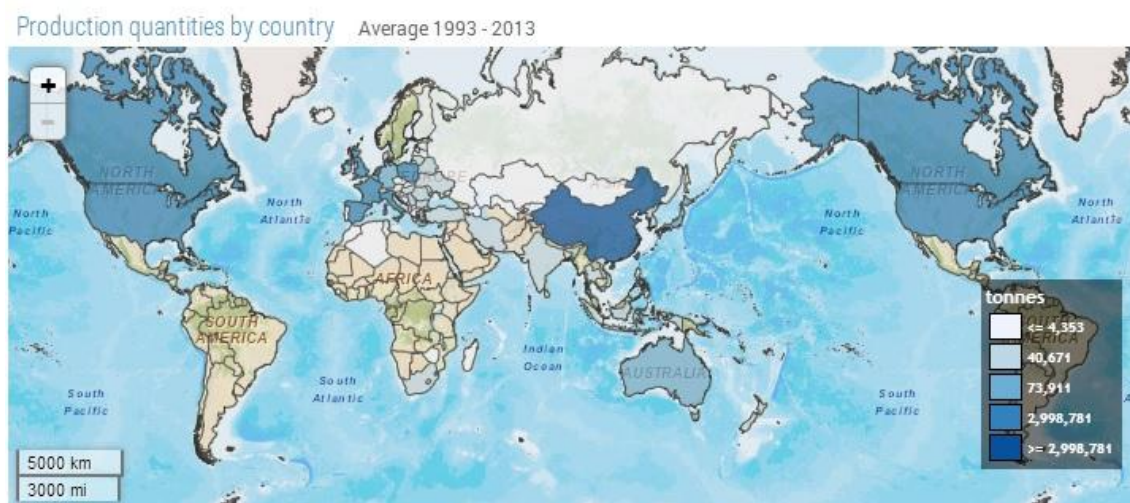
**Figura 2.** Evolução da produção mundial de cogumelos, em milhões de toneladas (FAOSTAT, 2014).

A média da distribuição da produção mundial desde 1993 até 2012, por regiões, está representada na Figura 3 e tem sido liderada pela China, que contabiliza mais de 50% da produção mundial ao longo destes anos. A Europa vem em segundo lugar com uma média de produção a rondar os 24%.



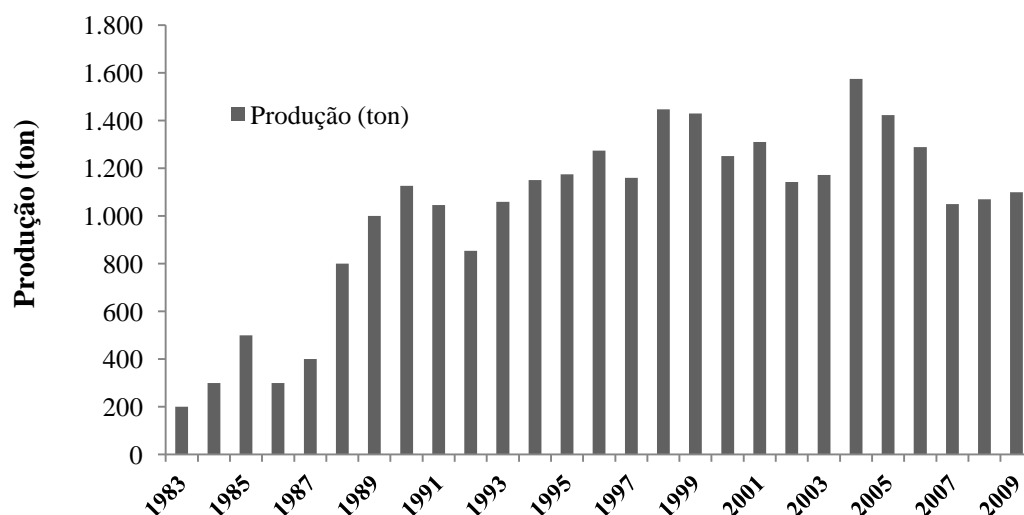
**Figura 3.** Média da produção mundial por principais continentes produtores, desde 1993 até 2012 (FAOSTAT, 2014).

A figura 4 é uma representação esquemática da produção mundial de cogumelos, onde os países pintados com as cores mais claras têm uma produção mais baixa, enquanto que os países em tons de azul apresentam uma produção mais elevada.



**Figura 4.** Mapa representativo da produção mundial (FAOSTAT, 2014).

Segundo dados da USDA, em Portugal os dados começaram a ser contabilizados a partir de 1983, e a evolução da produção de cogumelos no nosso país está ilustrada na Figura 5. Esta fonte refere que em Portugal, em 2009 se produziram 1.100 toneladas, o que correspondeu, relativamente a 2008 um incremento de 30 toneladas produzidas.



**Figura 5.** Evolução da produção de cogumelos em Portugal (USDA, 2014).

No sentido de promover a qualidade e a segurança alimentar, deve-se assegurar que a produção e comercialização são controladas e que o que chega à mesa do consumidor é o mais semelhante possível ao que sai das instalações do produtor.

A pesquisa efetuada no âmbito deste trabalho revelou que em Portugal, em termos de legislação aplicável aos cogumelos de cultura, o enquadramento é feito pelo Regulamento CE N° 1863/2004 da Comissão de 26 de Outubro de 2004. Este Regulamento estabelece as normas de comercialização aplicáveis apenas aos cogumelos de cultura da espécie *Agaricus*. Sendo assim, na ausência de legislação aplicável aos cogumelos da espécie *Pleurotus*, ir-se-á aqui fazer referência meramente a título informativo e de forma generalizada aos aspetos mais relevantes deste diploma.

Este Regulamento aplica-se a todos os estádios de comercialização, permitindo orientar a produção de forma a satisfazer as exigências dos consumidores, facilitar as relações comerciais, promovendo lealdade na concorrência e também eliminar do mercado os produtos de qualidade inferior e insatisfatória. Segundo este documento os cogumelos são classificados em três categorias distintas – Extra, I e II - consoante o grau de exigência qualitativa. De igual modo, inclui disposições relativas à calibragem determinadas pelo diâmetro do piléu e pelo comprimento do pé. O mesmo sucede relativamente às tolerâncias de qualidade, de estágios de desenvolvimento e de calibre admitidas nas três categorias. Além disso neste Regulamento são definidas as diretrizes de apresentação - nomeadamente ao nível da homogeneidade da embalagem e do

acondicionamento do produto - e de marcação - identificação, natureza, origem e características comerciais do produto (Azevedo, 2010).

No que toca a disposições de qualidade quando acondicionados e embalados, estes cogumelos deverão apresentar determinadas características mínimas. Deverão encontrar-se:

- inteiros ou, se cortados, o corte deverá ser liso;
- são (excluindo-se os que apresentam podridões ou cor acastanhada intensa no pé);
- limpos (isentos de matérias estranhas visíveis, à exceção da terra);
- com aspeto fresco, tendo e conta a cor característica da estirpe;
- praticamente isentos de parasitas, de humidades exteriores anormais e de odores e/ou sabores estranhos.

Para além disso, o seu desenvolvimento e estado devem permitir-lhes suportar o transporte e as outras movimentações a que sejam eventualmente sujeitos e chegar ao local de destino em condições satisfatórias.

### **1.3 Caracterização do cogumelo *Pleurotus ostreatus***

#### **1.3.1 Cultivo**

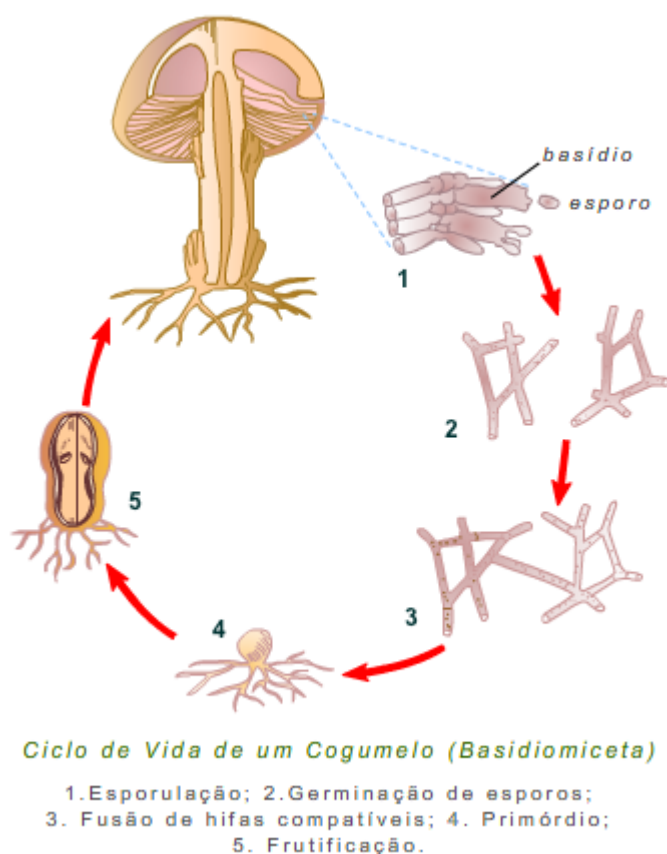
O cogumelo da espécie *Pleurotus ostreatus*, também conhecido como cogumelo-ostra (*oyster mushroom*), é um cogumelo comestível pertence à classe *Basidiomycota* e à família *Agaricaceae*.

Estão descritas mais de 1.000 espécies de *Pleurotus* no mundo (Guzman, 2000), e por ser um cogumelo de fácil cultivo e com ampla adaptabilidade ao meio em que cresce, esta espécie é cultivada um pouco por todo o mundo e a sua produção tem vindo a aumentar em anos recentes (Chang & Miles, 2004).

*P. ostreatus* consegue crescer em ambientes com grandes amplitudes térmicas (entre 15°C e 31°C), frutificando entre 15°C e 20°C. Esta espécie é capaz de segregar uma grande variedade de enzimas, que conseguem degradar as três categorias chave de polissacarídeos existentes na biomassa das florestas e dos resíduos provenientes da agricultura: lenhina, hemicelulose e celulose (Chang & Miles, 2004). São, portanto, capazes de colonizar uma vasta gama de resíduos, tais como bagaços de cana-de-açúcar,

serraduras, resíduos de café, madeiras florestais, palhas, e folhagens de banana, entre outros (Martins, 2004; Castro *et al.*, 2004; Daba *et al.*, 2008; Webster & Weber, 2007).

O cultivo de *P.ostreatus* para fim de comercialização apresenta um ciclo de produção relativamente rápido com um custo e tecnologia de produção baixos, sendo necessário menos de 30 dias desde o início de seu crescimento vegetativo até à primeira colheita, num total de três ciclos de produção (Stamets, 2000; Mandeel *et al.*, 2005) (Figura 6).



**Figura 6.** Ciclo de vida generalizado de um fungo basidiomiceta

(Fonte: <http://mykes.lifeme.net/t2-introducao-a-micologia>).

O crescimento e a frutificação são afetados por uma diversidade de fatores físicos e químicos, como a humidade relativa, a temperatura, a luz, o pH, teor de água e o tamanho das partículas no substrato, a temperatura, a concentração de oxigénio e de dióxido de carbono, a presença de fenóis, celulose, hemicelulose e a natureza do substrato (Azevedo, 2010).

### 1.3.2 Aspetos físicos e nutricionais

Os corpos frutíferos da espécie *Pleurotus ostreatus* caracterizam-se por caules excêntricos (os quais podem ser longos, curtos, ou até porventura ausentes) e pela ausência de anéis e vulvas. Possui um chapéu excêntrico convexo, aveludado e com a margem um pouco enrolada, no que respeita à cor, esta é uma característica deveras variável. Podem apresentar uma coloração branca, bege, acastanhados, castanhos-escuros ou castanhos-claros, cinzentos ou azulados. Podem apresentar um tamanho compreendido entre 2 cm (mínimo) e 20 cm (máximo), consoante as condições climáticas e nutricionais da cultura; as suas lâminas são esbranquiçadas e bastante estreitas; a sua carne é esbranquiçada, não muda de cor, de aroma agradável e sabor suave (Garnweidner *et al.*, 1999).

Tal como a grande maioria dos cogumelos comestíveis, *Pleurotus ostreatus* possui um baixo valor calórico (1510 kJ kg<sup>-1</sup> parte edível), tornando-o adequado para o seu consumo numa dieta saudável (Jaworska & Bernas, 2009; Manzi *et al.*, 2001).

**Tabela 1.** Aminoácidos essenciais presentes em cogumelos *Pleurotus ostreatus*.

Aminoácidos	Unidades			
	g/100g (proteína bruta corrigida)	mg/g (peso seco)	g/100g cogumelo	mg/100g (peso fresco)
Leucina	6,8	12,2	6,54	139
Histidina	1,7	15,0	3,77	65
Arginina	5,3	12,1	10,94	176
Valina	5,5	10,7	4,36	112
Lisina	4,5	9,7	6,30	126
Treonina	4,6	8,5	4,98	106
Isoleucina	4,2	6,6	4,06	82
Fenilalanina	3,7	7,2	4,16	111
Tirosina	3,0	6,0	3,55	219
Metionina	1,5	4,6	1,54	35
Cisteína	0,4	2,8	1,23	28
Referência	Bano & Rajarathnam, 1988	Hadar & Cohen- Azari., 1986	Manzi <i>et al.</i> , 1999	Mattila <i>et al.</i> , 2002

Este cogumelo faz parte do grupo de fungos comestíveis que são considerados como alimentos funcionais (Bernaś *et al.*, 2006). Para além do seu elevado teor em proteínas, estando presente a totalidade dos aminoácidos essenciais (Tabela 1) – dos quais se destacam a leucina, a arginina, a valina e a lisina – vitaminas e sais minerais, com particular relevo para a os elevados teores de Potássio (274,42 % m/m) e Fósforo (158,23 % m/m). Também se tem constatado a presença nestes cogumelos de um grande teor em fibras alimentares, em particular  $\beta$ -glucanos com ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3),  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) e  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6), que têm propriedades anticancerígenas e ajudam a manter o colesterol em níveis baixos (Jaworska *et al.*, 2011).

**Tabela 2.** Teor de minerais da espécie *Pleurotus ostreatus*.

Teor de Minerais	% m/m, em base seca
Ferro	2,16
Manganês	0,29
Zinco	1,66
Cobre	0,45
Potássio	274,42
Magnésio	13,43
Fósforo	158,23
Sódio	27,58
Cálcio	7,63
Referência	Helm <i>et al.</i> , 2009

## 1.4 Aspetos de pós-colheita de cogumelos

### 1.4.1 Evolução fisiológica

O cogumelo fresco é um alimento perecível e, de modo a prolongar o seu tempo de vida útil, é obrigatório compreender a sua fisiologia após a colheita.

A deterioração do cogumelo começa logo a partir do momento em que o cacho é cortado, e durante a conservação, dá-se a perda progressiva de qualidade e, consequentemente, de valor comercial. Para isto, contribuem quer fatores físico-químicos, quer fatores fisiológicos. Segundo Aguirre *et al.* (2009) e Sapata *et al.* (2006), os fatores que influenciam esta perda de qualidade nos cogumelos podem ser o aumento

da taxa respiratória, reações de oxidação, perda de massa do cogumelo, formação de exsudado, alterações da textura, acastanhamento, descoloração, e desenvolvimento de odores estranhos e desagradáveis.

O reduzido tempo de vida útil dos cogumelos frescos – entre 3 e 4 dias à temperatura ambiente - deve-se sobretudo ao facto de não possuírem cutícula que os proteja, o que os torna mais vulneráveis e com maior propensão a sofrerem perdas de água, danos fisiológicos e ataques microbianos (Aguirre *et al.*, 2008, 2009; Tao *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2010). Quando *Pleurotus ostreatus* é submetido a refrigeração, o período de armazenamento poderá ser alargado por alguns dias (Cuppert *et al.*, 1998). Findo esse tempo, a taxa respiratória, a atividade da polifenoloxidase (PPO) e a microflora associada à deterioração aumentam, ao passo que o teor em água e o teor em hidratos de carbono diminuem (Cuppert *et al.*, 1998).

A perda de humidade é a principal causa da perda de massa nos cogumelos frescos (Aguirre *et al.*, 2008, Singh *et al.*, 2010). O elevado teor de água dos corpos frutíferos predispõe-lhos à desidratação quando estão expostos à temperatura ambiente. O teor de água afeta a quantidade de nutrientes dos cogumelos e poderá variar em função das condições de cultivo dos mesmos (Mattila *et al.*, 2001).

A atividade das enzimas associadas ao acastanhamento enzimático é outra das razões da deterioração dos cogumelos, sendo este fenómeno causado por enzimas globalmente denominadas polifenoloxidases (PPO) e peroxidases (POD). Estas enzimas afetam a cor (PPO), sabor e odor (POD) (Eissa *et al.*, 2009) e a atividade destas em cogumelos expostos à temperatura ambiente é praticamente o dobro da atividade observada para cogumelos conservados a 5°C (Eissa *et al.*, 2009).

Usualmente, as reações de acastanhamento enzimático ocorrem quando, na presença de O<sub>2</sub>, as membranas celulares se desintegram e a sua compartimentalização se perde, permitindo que as enzimas e os substratos se misturem (Sapers *et al.*, 2001; Jolivet *et al.*, 1998; Li-Qin *et al.*, 2009).

O acastanhamento enzimático pode ser consequência de danos fisiológicos, de lesões pré ou pós-colheita, mas também de alterações dos tecidos resultantes do ciclo de congelação/descongelação ou do crescimento bacteriano (Sapers *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 1999).

De modo a maximizar o tempo de prateleira dos cogumelos e a diminuir as perdas é necessário limitar a perda de água, reduzir a taxa respiratória, evitar a exposição ao oxigénio atmosférico e/ou adotar outras medidas para minimizar a atividade da PPO e

da POD, bem como evitar a contaminação e a propagação da carga microbiana (Bano & Rajarathnam, 1988).

Não são pois conhecidas respostas simples, nem tratamentos ímpares para limitar a deterioração generalizada da qualidade dos cogumelos frescos. As condições de pré e pós-colheita, além da fase de desenvolvimento em que se encontra o cogumelo, são alguns dos fatores primordiais que influenciam a qualidade dos mesmos (Manzi *et al.*, 2001; Sapata *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2010).

A cadeia de frio reduz os danos fisiológicos e microbiológicos associados à degradação dos cogumelos, mas a maior parte das vezes as condições de transporte de 1 a 2 dias a 2°C e de comercialização acabam por determinar um tempo de vida útil muito curto (Singh *et al.*, 2010; Lopez Briones *et al.*, 1992).

É de salientar ainda que as técnicas de apoio à pós-colheita visam a manutenção da qualidade intrínseca original do produto, nunca conseguindo melhorá-la, ou seja, a tecnologia pós-colheita não acrescenta qualidade ao produto, apenas tenta preservar no tempo os atributos de qualidade endógenos do cogumelo.

#### **1.4.2 Indicadores de qualidade**

Os consumidores estão cada vez mais exigentes, e dão mais atenção à qualidade dos produtos quando tomam a decisão de os comprar.

No que diz respeito à qualidade do cogumelo fresco, esta é avaliada em função quer de fatores extrínsecos, quer de fatores intrínsecos ao próprio cogumelo. Esses fatores variam em função da experiência e das expectativas do consumidor (Hewett, 2006).

Os fatores extrínsecos estão relacionados com o método de produção e os sistemas de distribuição (Modo de Produção Biológica, químicos utilizados durante a produção), tipos de embalagem e sua reciclagem, sustentabilidade da produção e distribuição em relação à utilização de energia. Estes fatores influenciam frequentemente a decisão do consumidor, apesar de não estarem sempre diretamente relacionados com a qualidade efetiva do produto (Hewett, 2006).

Por sua vez, os atributos intrínsecos compreendem atributos inerentes ao próprio alimento: atributos externos tais como a cor, a forma, o tamanho e a ausência de imperfeições, e atributos internos, como a textura, a suavidade, a acidez, o aroma, o sabor, o tempo de vida útil e o valor nutricional. Estes constituem aspetos importantes aquando da compra por parte do consumidor (Hewett, 2006; Abbott, 1999).

De modo a controlar a qualidade, devemos conseguir medir os atributos relativos a essa qualidade (Abbott, 1999).

### **Indicadores microbiológicos e enzimáticos**

Os indicadores microbiológicos são um parâmetro deveras essencial para determinar a qualidade dos cogumelos. Devido ao facto de os cogumelos serem alimentos com elevado teor em água, com uma atividade da água perto de 0,98 ou superior e um pH neutro, ou próximo da neutralidade, são um excelente meio para o crescimento microbiano (Martínez-Carrera *et al.*, 1998; Venturini *et al.*, 2011). Já foi demonstrado que os cogumelos frescos e são contêm uma população de microrganismos bastante elevada. Beelman *et al.* (1989) – citado por Venturini *et al.* 2011, determinou que a presença de uma elevada carga bacteriana é um fator importante que diminui significativamente a qualidade, causando uma aparência escura e manchada, e que a deterioração e perda de qualidade pós-colheita de cogumelos frescos está diretamente relacionada com a carga microbiana inicial do produto.

Segundo Doores *et al.* (1987) - citado por Venturini *et al.* (2011), a população de bactérias pode evoluir de 7 UFC/g para 11 UFC/g durante um período de armazenamento de 10 dias a uma temperatura de 13°C.

Microrganismos gram-negativo, tais como *Pseudomonas tolaasii*, *Pseudomonas fluorescens*, e leveduras como, por exemplo, *Candida sake*, têm sido indicados como sendo dos principais responsáveis pela deterioração de cogumelos frescos (Masson *et al.*, 2002).

Vários autores têm-se debruçado sobre métodos e técnicas de conservação a aplicar em cogumelos frescos. O tratamento de cogumelos com uma solução inibidora de acastanhamento com peróxido de hidrogénio e eritorbato de sódio torna o produto menos suscetível a sofrer fenómenos de escurecimento (Sapers *et al.*, 2001; Venturini *et al.*, 2011). Mais recentemente Simón *et al.* (2010) determinou que a lavagem de cogumelos *A. bisporus* com ácido cítrico reduziu a contagem de *Pseudomonas* em 2,5 ciclos logarítmicos, em cogumelos armazenados durante 17 dias a uma temperatura de 5°C e que, deste modo, se evitou o escurecimento provocado por esta espécie de bactérias. Nesta mesma espécie de cogumelos outro estudo foi feito demonstrando que uma dose de radiação de 2 kGy é suficiente para reduzir o crescimento microbiano e aumentar o tempo de prateleira de 2 para 10 dias.

Cogumelos frescos também são um alimento propenso a conterem uma carga microbiana patogénica intrínseca elevada que pode provir de diferentes fontes. Nos cogumelos cultivados a contaminação por parte de microrganismos patogénicos pode ocorrer durante as etapas de crescimento, colheita e seleção, bem como do substrato onde os cogumelos crescem (Venturini *et al.*, 2011). Devido a este facto, é prática comum fazer-se uma pasteurização térmica do substrato de modo a reduzir a microflora natural do solo e conseqüentemente os microrganismos patogénicos que possam estar lá presentes (Venturini *et al.*, 2011).

No que toca a cogumelos selvagens, estes têm uma maior probabilidade de sofrerem contaminações por parte de microrganismos patogénicos, pelo facto destes serem colhidos de ecossistemas florestais e bosques, em que certos animais costumam pastar. Estes ecossistemas suportam também uma grande diversidade de organismos invertebrados e vertebrados, como insetos, lesmas, aves, répteis, anfíbios ou pequenos mamíferos. Por conseguinte a contaminação de cogumelos selvagens com bactérias causadoras de doenças de origem alimentar pode ocorrer quer diretamente, quer indiretamente através de animais ou insetos (Venturini *et al.*, 2011).

No entanto, não é comum serem reportados surtos de doenças de origem alimentar atribuídos a cogumelos frescos contaminados com microrganismos patogénicos (Venturini *et al.*, 2011).

Apesar de serem considerados um produto seguro, já foram reportadas ocorrências de bactérias patogénicas em amostras de cogumelos frescos e alguns estudos foram levados a cabo para determinar a capacidade destas resistirem e crescerem durante a comercialização deste alimento (Venturini *et al.*, 2011). Johannessen *et al.* (2002) encontrou *Staphylococcus* spp. em 22,4% das amostras de cogumelos que analisou, embora em apenas 4 amostras tenha sido identificado *Staphylococcus aureus*. Em outro estudo detetou-se *Listeria monocytogenes* em 5% das amostras recolhidas e analisadas (Samadpour *et al.*, 1999). Martin & Beelman (1996) levaram a cabo ensaios onde notaram que a composição do gás (baixo teor de oxigénio e elevado teor em dióxido de carbono) dentro de embalagens de PVC favorecia o crescimento de microrganismos anaeróbios facultativos, como é o caso de *S. aureus*. Também foi reportado que produtos embalados em atmosfera modificada acondicionados a uma temperatura a 4°C e 10°C permitiam o crescimento e proliferação de *Listeria monocytogenes* (González-Fandos *et al.*, 2001).

Por último, os indicadores enzimáticos, embora não sendo objeto deste estudo são aqui referenciados por também serem indicadores importantes na avaliação da qualidade dos cogumelos.

Existem diversas oxidases que conseguem utilizar os substratos fenólicos presentes nos cogumelos. Entre elas encontra-se a tirosinase, a lacase e a peroxidase, maioritariamente responsáveis pelo acastanhamento dos mesmos. Destas três, a tirosinase é provavelmente a que se encontra em maiores quantidades nos cogumelos (Zhang & Flurkey, 1997), mas a maneira como cada uma destas enzimas se comporta face a diferentes substratos poderá diferir.

### **Indicadores físico-químicos**

O indicador físico utilizado para melhor caracterizar o estado de frescura dos cogumelos é a perda de massa (Azevedo, 2010). No cogumelo, a perda de massa é maioritariamente devida à perda de água e este facto, aliado à falta de uma capa epitelial específica que o proteja desta perda de água, faz com que acabe por perder rapidamente humidade (Sanchez & Royse, 2001).

O Teor de Sólidos Solúveis (expresso como °Brix) e o *pH* são parâmetros geralmente utilizados na avaliação da qualidade de hortofrutícolas frescos e dos seus derivados.

A textura é um parâmetro de primordial importância para o consumidor como critério de qualidade de um produto, que pode ser afetada por tratamentos físico-químicos efetuados nos cogumelos (Matser *et al.*, 2000b). A textura é uma propriedade de difícil definição, no entanto pode ser definida como “o conjunto de propriedades mecânicas, geométricas e de superfície de um produto, detetáveis pelos recetores mecânicos e táteis e, eventualmente pelos recetores visuais e auditivos” (Norma ISO 1992).

Nos cogumelos a textura é um dos parâmetros frequentemente avaliados em estudos que visam aprofundar e desenvolver novas técnicas e metodologias de conservação e extensão do prazo de validade destes.

Kotwaliwale *et al.* (2007) monitorizou o efeito na textura da secagem e subsequente reidratação de *Pleurotus* spp. Segundo estes autores ambos estes processos afetaram a textura dos cogumelos. A dureza e a mastigabilidade dos cogumelos aumentaram, enquanto a coesividade e a elasticidade aumentaram inicialmente e acabaram por

decrecer nas etapas finais da secagem. Altas temperaturas de secagem causaram dureza em cogumelos secos enquanto a coesividade diminuiu. Notaram ainda que o branqueamento também deteriora a textura dos cogumelos secos. Narvaiz (1994) utilizou 3 kGy na irradiação de cogumelos *A. campestris*, armazenados a 10°C durante 17 dias. O autor verificou uma redução gradual dos parâmetros da textura ao longo do tempo.

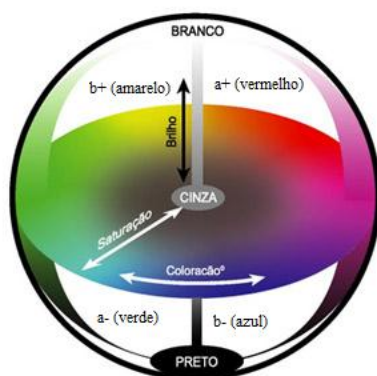
A cor é outra das características sensoriais mais importantes para a aceitabilidade de um produto, constituindo um critério importante para a compra, já que serve como indicador instantâneo da qualidade do mesmo (Aguirre *et al.*, 2009).

A cor é definida como a percepção visual resultante da detecção da luz após interação com um objeto. Não é uma característica do objeto, mas sim um conceito subjetivo que consiste na interpretação que o cérebro faz dos diferentes comprimentos de onda da luz recebida (Azevedo, 2010). Segundo Abbott (1999), o olho humano possui três recetores de cor - vermelho, verde e azul - e todas as cores são, efetivamente, combinações destas.

Para medir e quantificar a cor, utiliza-se mais vulgarmente o espaço de cor CIE (*Comission International de l'Eclairage*) 1976 - ( $L^* a^* b^*$ ), conhecido como CIELAB. Este sistema define a sensação de cor recorrendo a três coordenadas cilíndricas: a luminosidade ( $L^*$ ), a tonalidade ( $h$ ) e a saturação ( $C^*$ ) (Figura 7).

A luminosidade, expressa pela variável  $L^*$ , é o atributo através do qual é possível discernir se a cor é mais clara ou mais escura. O parâmetro  $L^*$  é o que melhor se correlaciona com o valor de mercado dos cogumelos.

A variável  $C^*$  expressa a saturação (*Chroma*), sendo através deste atributo que é possível determinar um maior ou menor grau de pureza ou de intensidade da cor relativamente a uma cor neutra como o cinzento.



**Figura 7.** Coordenadas cartesianas e cilíndricas do espaço de cor (CIELAB).

A variável  $h$  (hue), expressa a tonalidade, é o atributo que permite distinguir se a cor é vermelha, verde, etc., em função do seu comprimento de onda dominante e independente da luminosidade (Azevedo, 2010).

Estas três coordenadas permitem determinar a localização exata de uma cor específica. Porém, para esse mesmo efeito, e embora de modo menos intuitivo, utiliza-se mais usualmente as coordenadas cartesianas  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , em que  $a^*$  define se a cor é mais vermelha ( $+a^*$ ) ou mais verde ( $-a^*$ ) e  $b^*$  define se a cor é mais amarela ( $+b^*$ ) ou mais azul ( $-b^*$ ) (Abbott, 1999).

## 1.5 Tecnologia de Altas Pressões

As principais técnicas de preservação de alimentos usadas atualmente assentam em um dos seguintes pressupostos: (1) impedir o acesso dos microrganismos ao alimento, (2) inativá-los assim que consigam acesso ao alimento, ou (3) evitar ou reduzir o seu crescimento assim que entrem em contacto com o alimento e que não seja possível a sua inativação (Lund, *et al.*, 2000).

A pasteurização é o meio mais comum de preservar os alimentos (Huppertz *et al.*, 2002). Esta tecnologia reduz os níveis de microrganismos presentes nos alimentos. No entanto, os alimentos submetidos a este tipo de processo tendem a sofrer efeitos indesejados, tais como, perdas de valor nutricional, de sabor, de textura, de cor ou de aroma, que conduzem a um decréscimo da qualidade final do produto. (Hogan *et al.*, 2005, Murcia *et al.*, 2000).

Hoje em dia os consumidores estão mais interessados e dispostos a pagar por produtos com processamento mínimo, que tenham um mínimo possível de conservantes químicos ou que tenham sido sujeitos a um tratamento térmico suave, objetivo este que é possível recorrendo à tecnologia de Altas Pressões Hidrostáticas (Terefe *et al.*, 2013).

O uso desta tecnologia de Altas Pressões nos alimentos, em inglês *High Pressure Processing* (HPP), com o intuito de reduzir ou destruir o número de microrganismos presentes, remonta ao ano de 1884. Em 1889, Hite usou a tecnologia de altas pressões com sucesso na preservação da qualidade do leite, e em 1914 este mesmo autor demonstrou a suscetibilidade às altas pressões de organismos presentes em vegetais (Jay, 2000). No entanto, constrangimentos tecnológicos impediram a comercialização de produtos com a tecnologia HPP (Lund *et al.*, 2000), até, finalmente, em 1990, uma

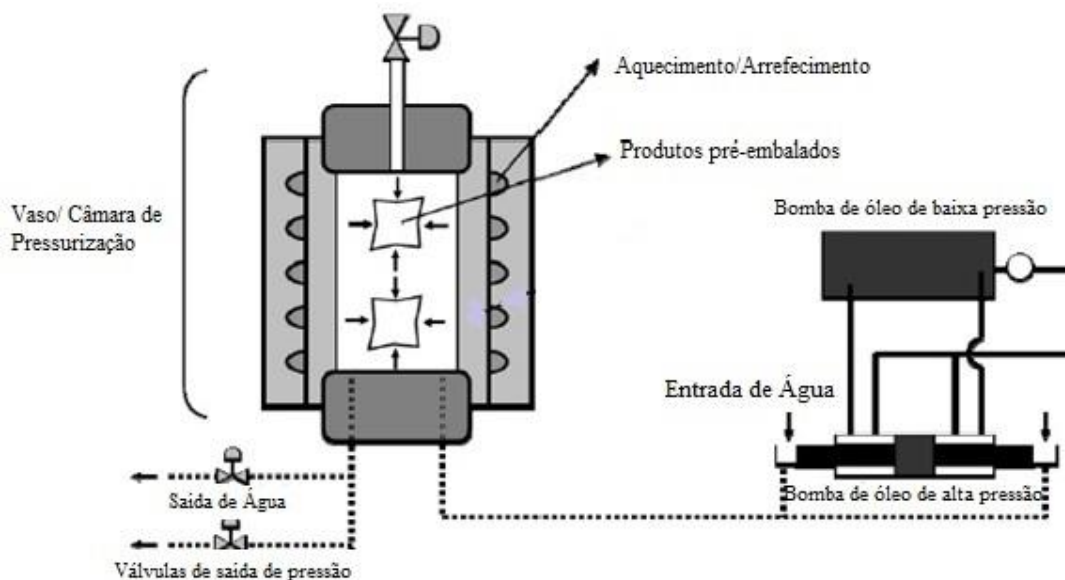
geleia foi posta à venda como sendo o primeiro produto com tecnologia HPP a ser comercializado (Huppertz *et al.*, 2002).

A tecnologia HPP oferece enormes vantagens em relação aos tratamentos térmicos convencionais. Este tratamento pode ser aplicado à temperatura ambiente e, com exceção de alguns vegetais, a cor, a forma e os nutrientes da maioria dos alimentos não são afetados (Jay, 2000).

### 1.5.1 Modo de ação

A tecnologia de Altas Pressões Hidrostáticas (HPP) é um tratamento não térmico, onde os alimentos são submetidos a pressões geralmente compreendidas entre 100-600 MPa, embora níveis de pressão mais altos, até 900 MPa também possam ser usados (Patterson, 2005).

Um equipamento de altas pressões consiste num compartimento onde o alimento é colocado e sujeito a altas pressões e um sistema gerador de pressão. A Figura 8 traduz uma representação esquemática de um equipamento de HPP.



**Figura 8.** Representação esquemática dum equipamento de Altas Pressões Hidrostáticas usado para o tratamento de alimentos (adaptado de Singh (2001)).

O uso da alta pressão na preservação dos alimentos envolve a aplicação de pressão isostática, ou seja, a pressão é exercida instantaneamente e de igual forma ao longo de todo o alimento, independentemente da sua forma, tamanho ou composição (Lund, *et al.*, 2000; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2012).

Outra característica fundamental subjacente à tecnologia de HPP prende-se com o princípio de Le Chatelier, que indica que se for imposta uma alteração de concentração ou de temperatura, a um sistema químico em equilíbrio, a composição do sistema deslocar-se-á no sentido de contrariar a alteração a que foi sujeita. De acordo com o princípio de Le Chatelier, as reações que envolvem a diminuição de volume, como mudanças na configuração molecular, reações e reatividade química, são favorecidas pela pressão, enquanto os processos que envolvem aumento de volume são inibidos pela pressão. Deste modo, a aplicação da pressão num sistema em equilíbrio, irá evoluir no sentido de redução de volume, minimizando o efeito da pressão. Ou seja, qualquer fenómeno que é acompanhado por uma diminuição de volume é favorecido com o acréscimo da pressão e vice-versa. Assim sendo, as ligações por pontes de hidrogénio são favorecidas pela aplicação de pressão, enquanto que algumas das outras ligações mais fracas (encontradas nas proteínas) são destabilizadas (Patterson *et al.*, 2006; Aymerich *et al.*, 2008).

Em geral, os alimentos já embalados são colocados num compartimento cilíndrico que é fechado, e após a remoção completa do ar, um líquido de baixa compressibilidade (por exemplo, água ou uma mistura de água e óleo) é bombeado de um reservatório para dentro do cilindro até se atingir o nível desejado de pressão (Fellows, 2000; Patterson *et al.*, 2007; Jay, 200). Seguidamente todas as válvulas são fechadas, cessa-se o bombeamento do líquido e a pressão pode ser mantida durante o tempo que se desejar (Patterson *et al.*, 2007).

Com o aumento da pressão, os alimentos reduzem o seu tamanho em proporção com a pressão aplicada (por exemplo, a água reduz o seu volume em aproximadamente 15% a uma pressão de 600 MPa), mas mantêm a sua forma original. As embalagens usadas nos ensaios de altas pressões também têm que ser adequadas ao uso de pressão, devido às forças de *stress*, distorção e redução de volume a que são sujeitas (Fellows, 2000).

Devido à compressão existente durante os tratamentos de HPP também ocorre um aumento de temperatura durante o processo, chamado de aquecimento adiabático. Este aumento de temperatura varia de acordo com a composição do produto (normalmente entre 3°C a 9°C por 100 MPa) (Patterson *et al.*, 2007).

### 1.5.2 Efeitos genéricos nos alimentos

Esta tecnologia vem despertando bastante interesse como modo de processamento e preservação de alimentos, devido à sua capacidade de redução do número de microrganismos, de melhorar propriedades funcionais e de reter melhor as características nutricionais e organolépticas dos alimentos (Patterson *et al.*, 2007; Chapleau & Lamballerie-Anton, 2003).

Esta técnica é reconhecida por afetar as ligações não-covalentes das moléculas, induzindo assim modificações na água, proteínas, polissacarídeos e lípidos (Cheret *et al.*, 2005). No entanto as ligações por pontes de hidrogénio não são afetadas (Jay, 2000).

Ao submeter alimentos à tecnologia de HPP, o principal objetivo é reduzir o número de microrganismos que possam estar presentes nestes, mantendo a qualidade e segurança dos produtos. A eficácia na destruição dos microrganismos depende de diversos fatores que têm que ser tidos em conta quando se procede à otimização de tratamentos com base nas altas pressões (Patterson *et al.*, 2007). Existe um valor de pressão específico para cada microrganismo, abaixo do qual não ocorre a inativação, e acima do qual o efeito letal da tecnologia HPP tende a aumentar à medida que o nível de pressão aumenta (Patterson *et al.*, 2006).

A aplicação de HPP também pode ser usada para modificar as propriedades das proteínas, controlar as enzimas relacionadas com a deterioração dos alimentos (Messens *et al.*, 1997; Hendrickx *et al.*, 1998) ou para alterar as propriedades físicas destes (Matser *et al.*, 2000a). As enzimas variam muito na sua barossensibilidade: algumas são inativadas à temperatura ambiente por pressões de poucos MPa, ao passo que outras conseguem resistir a pressões de 1000 MPa, ou, por vezes, ainda tendem a ter a sua atividade aumentada (Fellows, 2000). Tanto a ativação como a inativação das enzimas é fortemente dependente do valor de temperatura, de pH e da composição do substrato (Fellows, 2000).

Nos produtos de origem vegetal normalmente um tratamento térmico como o branqueamento por água a ferver é usado para estender o tempo de prateleira, visto que o branqueamento reduz o número de microrganismos e inativa enzimas responsáveis pela deterioração destes produtos (Bahçeci *et al.*, 2005; Olivera *et al.*, 2008; Volden *et al.*, 2009). Contudo, os tratamentos térmicos podem provocar perdas de componentes importantes devido à degradação térmica provocada pelo aquecimento (Rungapamestry *et al.*, 2007; Olivera *et al.*, 2008; Volden *et al.*, 2008, 2009).

A cor, o sabor e a textura são características importantes na qualidade de frutas e hortofrutícolas, e apresentam-se como os principais fatores que afetam a aceitação e escolha destes produtos por parte dos consumidores. Pelo facto das suas delicadas qualidades sensoriais serem influenciadas adversamente pelos tratamentos térmicos convencionais, a tecnologia de altas pressões possui o potencial necessário para ser utilizada neste tipo de alimentos (Basak & Ramaswamy 1998). O processamento por HPP pode preservar o valor nutricional (Oey *et al.*, 2007; Sancho *et al.*, 1999) e as propriedades organoléticas de vegetais devido ao seu efeito limitado nas ligações covalentes entre compostos de reduzida massa molecular (Oey *et al.*, 2008; Ahmed & Ramaswamy, 2006; Basak & Ramaswamy 1998).

No entanto, os alimentos são matrizes complexas e onde os vários componentes que fazem parte da sua constituição estão em constante coexistência e interação. Assim sendo, vários fenómenos podem ocorrer em simultâneo ou separadamente quando se submetem os vegetais à tecnologia HPP, tais como: rutura das paredes e membranas celulares, processos de degradação por parte de enzimas, diversos tipos de reações químicas e modificação de componentes, como inativação de enzimas ou desnaturação de proteínas (Oey *et al.*, 2008).

Para obter o efeito desejado na textura e na cor dos alimentos, diferentes combinações de pressão/temperatura podem ser usadas. Não obstante a qualidade dos produtos submetidos à tecnologia de Altas Pressões Hidrostáticas, esta pode-se alterar ao longo do tempo de armazenamento, devido à existência de possíveis reações químicas, tais como, oxidações e reações bioquímicas com enzimas ou microrganismos endógenos que não tenham sido completamente inativados (Oey *et al.*, 2008).

### **1.5.3 Efeitos na textura de hortofrutícolas**

As alterações que ocorrem em hortofrutícolas podem ser associadas a alterações e transformações nos polímeros que fazem parte da composição da parede celular, que ocorrem devido a reações enzimática e reações não enzimáticas (Sila *et al.*, 2008; Oey *et al.*, 2008). Devido à rutura das células, as altas pressões facilitam a ocorrência deste tipo de reações, os substratos, os iões e enzimas que de outro modo estariam localizados em diferentes compartimentos celulares são libertados e interagem uns com os outros durante os tratamentos HPP (Oey *et al.*, 2008).

A interação entre os componentes estruturais de vegetais e as mudanças de transiente envolvidas durante o armazenamento e/ou o processamento é extremamente importante no que diz respeito a eventuais alterações na textura deste tipo de produtos (Sila *et al.*, 2008).

O impacto da tecnologia de Altas Pressões Hidrostáticas (100-400 MPa/5-60 min/temperatura ambiente) em diferentes frutas e legumes, tais como maçã, pêra, laranja, cenoura, ananás, aipo e pimento foi estudado Basak & Ramaswamy (1998). Estes autores notaram uma rápida perda de textura logo no início do tratamento, ao passo que no decorrer do tempo em que os alimentos estiveram sujeitos à pressão, a firmeza ou decrescia mais ou então verificava-se uma recuperação gradual desta. A perda inicial de textura destes vegetais era mais acentuada a pressões mais elevadas, ao passo que a recuperação parcial da textura foi mais evidenciada a pressões reduzidas. A 100 MPa a pêra foi o fruto que mais foi influenciado pela pressão, ao passo que a uma pressão de 200 MPa a maçã foi mais sensível que a pêra.

Um amolecimento devido ao uso da pressão foi também observado em tomate cereja (Tangwongchai *et al.*, 2000). Pressões entre 200 a 400 MPa (20°C durante 20 minutos) resultou num aumento dos danos na textura, enquanto que, pressões superiores a 400 MPa (500 e 600 Mpa/20°C/20 minutos) conduziram a um menor dano na textura dos tomates. O amolecimento dos tomates cereja tratados com altas pressões de 200 a 400 MPa pôde dever-se à atividade simultânea da enzima pectinametilesterase (PME) e da poligalacturonase (PG).

O efeito da variedade também se fez sentir. Boynton *et al.* (2012) submeteu duas espécies de manga (*Tommy atkins* e *Keitt*) a tratamentos de altas pressões (300/600 MPa durante 1 minuto). Os resultados mostraram que houve uma redução da firmeza das mangas da espécie *Tommy atkins*, mas não na espécie *Keitt*.

Por sua vez Clariana *et al.* (2011) observaram que após o processamento de nabos por altas pressões (200, 400 e 600 MPa durante 5 minutos a 20°C ou 40°C) houve um decréscimo da sua dureza em todos os tratamentos efetuados. Ensaios de 200 MPa a 40°C obtiveram melhores resultados em termos de retenção da dureza do que os restantes ensaios, em contraste com a pressão de 400 MPa foi a que apresentou uma maior redução da textura.

As propriedades reológicas de produtos como purés, polpas e sumos de frutas e vegetais podem também ser influenciadas pelos tratamentos HPP. Os efeitos observados dependem das condições dos ensaios, bem como do tipo de fruta ou vegetal que é usado

(Oey *et al.*, 2008). A viscosidade de mangas foi estudada e verificou-se que era aumentada após tratamentos HPP a 100 ou a 200 MPa (20°C/ 15 ou 30 minutos), enquanto que uma redução da viscosidade foi observada após o tratamento a 300 e 400 MPa (20°C/ 15 ou 30 minutos) (Ahmed *et al.*, 2005).

Segundo diversos autores (Plaza *et al.*, 2003; Sánchez-Moreno *et al.*, 2006; Verlent *et al.*, 2006) a viscosidade de polpa de tomate apresentou um decréscimo acentuado a pressões menores que 400 MPa, mas é aumentada a níveis altos de pressão, como a 500 MPa combinados com temperaturas até 60°C.

#### 1.5.4 Efeitos na cor de hortofrutícolas

O tratamento com altas pressões (a temperaturas baixas ou moderadas) tem um efeito reduzido nos pigmentos responsáveis por conferir cor às frutas e vegetais (clorofila, carotenoides, antocianinas, entre outros). Todavia durante o tempo de armazenamento, estes pigmentos podem sofrer alterações devido à incompleta inativação de certas enzimas e microrganismos, que podem levar a que ocorram reações químicas (enzimáticas ou não enzimáticas) indesejadas nos alimentos (Oey *et al.*, 2008).

As clorofilas *a* e *b* têm diferentes tipo de estabilidade em relação à pressão e temperatura. À temperatura ambiente tanto a clorofila *a* e *b* exibem uma grande estabilidade em relação à pressão; no entanto, a temperatura superiores a 50°C, as altas pressões afetam a sua estabilidade, sendo que a clorofila *a* é a é mais sensível ao aumento de temperatura. (Oey *et al.*, 2008).

O tratamento de vegetais verdes com altas pressões à temperatura ambiente ou a temperaturas moderadas resulta em reduzidas alterações na cor destes. Em muitos casos, a cor verde torna-se por vezes ainda mais intensa (redução dos valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ), como observou Krebbers *et al* (2002) quando submeteu feijão-verde a um tratamento HPP de 500 MPa à temperatura ambiente durante 1 min. Este fenómeno pode ser resultante do rompimento da parede celular das células durante o tratamento, o que leva a que a clorofila migre para o espaço intercelular produzindo assim uma cor verde mais intensa e brilhante aos vegetais (Oey *et al.*, 2008). Durante o tempo de armazenamento a cor verde dos vegetais tratados com altas pressões à temperatura ambiente altera-se para uma coloração amarela pálida (decrécimo nos valores de  $a^*$ ), provavelmente devido a reações de oxidação. Os vegetais pressurizados a elevadas temperaturas não

apresentaram alterações na sua coloração durante o armazenamento, em resultado da inativação de determinadas enzimas (Oey *et al.*, 2008).

Por sua vez, os carotenóides são bastantes estáveis quando submetidos a pressões elevadas (Oey *et al.*, 2008).

As antocianinas são estáveis durante tratamentos HPP a temperaturas moderadas, como observou Garcia-Palazon *et al.* (2004) em framboesas e morangos submetidos a pressões de 800 MPa (18-22°C/15 minutos). No entanto, durante o armazenamento em produtos de origem vegetal submetidos a tratamentos com altas pressões observou-se que estes pigmentos não são estáveis durante esse período. Kouniaki *et al.* (2004) observou que diferentes tipos de antocianinas presentes em groselhas armazenadas durante 7 dias a diferentes condições de armazenamento (5, 20 e 30°C) tiveram diferentes tipos de estabilidade. Existem diversas hipóteses para os mecanismos que levam à degradação de antocianinas presentes em vegetais e frutas sujeitos à tecnologia de altas pressões hidrostáticas. Além da instabilidade dos pigmentos, o escurecimento desempenha um papel fundamental na descoloração de alimentos submetidos às altas pressões. Em produtos à base de fruta, não se verificou diferenças visuais de cor (baseadas nos valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ) imediatamente a seguir a tratamentos HPP, por exemplo em sumos de uva submetidos a diferentes tratamentos de altas pressões (Daoudi *et al.*, 2002) ou em polpa de mangas (Ahmed *et al.*, 2005).

Durante o armazenamento, ocorre a descoloração de alimentos pressurizados devido ao acastanhamento enzimático (Oey *et al.*, 2008). Diversos autores corroboram esta afirmação, sendo no entanto de salientar que a adição de ácido ascórbico e cisteína inibe a ação da polifenoloxidase, o que resulta num menor acastanhamento.

A estrutura e a pigmentação dos alimentos interagem entre si e afetam tanto a cor como a translucidez/opacidade destes. As alterações na cor em hortofrutícolas pressurizados podem ser relacionadas com modificações nas suas propriedades texturais (Oey *et al.*, 2008). Este fenómeno foi observado em polpa de tomate, sujeita a tratamentos de altas pressões (400 MPa/25°C/15 min) que resultaram num aumento no valor de  $L^*$ , que indica uma mudança na cor observada na superfície da polpa de tomate, tornando-a mais clara (Sánchez-Moreno *et al.*, 2006).

### 1.5.5 Efeitos sobre os microrganismos

A membrana dos microrganismos é constituída por uma bicamada, uma externa ou hidrofílica (formada por ácidos gordos) e uma interna ou hidrofóbica (formada por glicerol). A pressão exercida sobre a célula microbiana leva a uma redução do volume, afetando assim a permeabilidade desta e originando danos ou morte celular (Patterson *et al.*, 2006).

A pressão não inibe, nem destrói uma função celular específica mas interfere numa combinação de processos, que são reversíveis a baixas pressões (< 200MPa) mas irreversíveis a altas pressões (> 300MPa). Assim, a morte celular resulta de múltiplos danos que ocorrem no interior da célula, como a destabilização estrutural e a integridade funcional da membrana citoplasmática, a desnaturação das proteínas e a inibição de mecanismos genéticos (Hugas *et al.*, 2002; Wells-Bennik *et al.*, 2008).

A membrana celular é o componente da célula mais afetado pelas altas pressões (Hugas *et al.*, 2002; Patterson, 2005; Aymerich *et al.*, 2008). A sua flexibilidade tem grande importância na inativação por pressão, verificando-se que, quanto mais rígida é a membrana, maior é a resistência à pressão (Téllez-Luis *et al.*, 2001; Wells-Bennik *et al.*, 2008).

Por outro lado, a tecnologia de altas pressões provoca alterações do funcionamento de enzimas responsáveis pelo crescimento de microrganismos, diferindo as enzimas na sua capacidade de suportar a pressão (Pereda *et al.*, 2004; Patterson, 2005; Rendueles *et al.*, 2011).

No entanto, um tratamento de alta pressão nem sempre inativa completamente os microrganismos presentes no substrato, podendo alterar uma porção de bactérias, que se podem recuperar após o tratamento (Patterson, 2005).

#### 1.5.5.1 Fatores intrínsecos relacionados com o alimento que influenciam a eficácia das altas pressões sobre os microrganismos

A barotolerância dos microrganismos presentes num determinado alimento depende do pH, da  $a_w$  e da presença de outros constituintes, como o sal e o açúcar.

O pH dos alimentos é um dos fatores que afeta o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos, tendo em conta que todos os microrganismos têm um pH ótimo, favorável ao seu crescimento (Norton & Sun, 2008). O tratamento por altas pressões é

caracterizado por alterar o pH do meio, diminuindo-o, uma vez que favorece a ionização de ácidos orgânicos (agentes inibidores do crescimento microbiano) presentes na forma dissociada (Smelt, 1998; Téllez-Luis *et al.*, 2001; Diez *et al.*, 2008).

O pH do meio não só garante a inativação da flora microbiana durante o tratamento com altas pressões, como inibe o crescimento das células danificadas pela pressão (Smelt, 1998; Patterson, 2005).

Em geral, constata-se que um pH ácido aumenta a sensibilidade dos microrganismos às altas pressões, ainda que haja que ter em conta que bolores e leveduras são resistentes a baixo pH e dificilmente são inativados pela pressão a pH <4,0 (Smelt, 1998; Pereda *et al.*, 2004). As altas pressões combinadas com um baixo pH permitem a diminuição da viabilidade de células pressurizadas de muitos patogénicos, como a *Listeria monocytogenes* (Ritz *et al.*, 2000).

A redução da atividade da água tem um efeito baroprotetor sobre os microrganismos, ou seja, baixos valores de  $a_w$  conferem proteção das células microbianas contra a tecnologia de altas pressões (Garriga *et al.*, 2004; Patterson *et al.*, 2006; Aymerich *et al.*, 2008; Yordanov & Angelova, 2010; Demazeau & Rivalain, 2011). Um valor de  $a_w$  reduzido provoca uma atrofia celular e um espessamento da membrana celular, reduzindo o tamanho da célula com o consequente aumento da tolerância (Wells-Bennik, *et al.*, 2008). Assim, valores inferiores a 0,90 conferem um efeito protetor relativamente à pressão, independentemente dos solutos (sacarose, glucose ou NaCl) que sejam utilizados para reduzir a  $a_w$  do produto (Rendueles *et al.*, 2011).

A composição química do substrato influencia a resposta dos microrganismos à pressão a que estão sujeitos, apresentando comportamentos distintos em diferentes alimentos (Patterson *et al.*, 2006).

Alimentos contendo altos teores de hidratos de carbono, proteínas e lípidos têm um efeito protetor na inativação bacteriana, aumentando a resistência microbiana à pressão (Patterson, 2005; Rendueles *et al.*, 2011).

#### **1.5.5.2 Fatores relacionados com os próprios microrganismos**

Relativamente aos próprios microrganismos, verifica-se que as bactérias gram-positivas são mais resistentes à pressão em comparação com as bactérias gram-negativas, fungos e leveduras. Os esporos são as formas mais resistentes pois apenas são

inativados a pressões superiores a 1000 MPa. No caso dos vírus, por serem um grupo de organismos muito heterogêneos, a sua resistência à pressão varia consideravelmente (Fonberg-Broczel *et al.*, 2005; Rubio *et al.*, 2007; Marcos *et al.*, 2007; Latorre-Moratalla, 2007; Diez *et al.*, 2008; Escriu & Mor-Mur, 2009; Ananou *et al.*, 2010 e Clariana *et al.*, 2011).

A suscetibilidade aos agentes externos (ex: altas pressões) por parte das bactérias gram-negativas pode ser explicada pelo facto de estas possuírem uma maior complexidade da membrana celular, tornando-os mais suscetíveis a mudanças ambientais causadas pela pressão (Murchie *et al.*, 2005; Aymerich *et al.*, 2008).

Também as diferenças na composição química e nas propriedades estruturais da membrana celular dos microrganismos determinam as diferenças na resistência a altas pressões (Rendueles *et al.*, 2011). A pressão, também afeta outros constituintes da célula, como mitocôndrias e o citoplasma (Smelt, 1998).

Os organismos com maior grau de organização e complexidade estrutural são mais sensíveis à ação das altas pressões. Assim, os procariotas são normalmente mais resistentes à pressão que estruturas eucariotas. As leveduras estão entre os organismos mais sensíveis (Patterson, 1999).

Os microrganismos psicotróficos, que crescem a baixas temperaturas e contêm elevados níveis de ácidos gordos polinsaturados, são, regra geral, mais resistentes à pressão, devido ao facto do fluido da membrana, rico em ácidos gordos insaturados, ser responsável pela resistência a efeitos letais da tecnologia de altas pressões (Rendueles *et al.*, 2011).

A flora microbiana endógena dos alimentos é, também, mais resistente à pressão do que os microrganismos utilizados como *starters* (López-Caballero, 2002).

Quase todos os microrganismos podem crescer até valores de 20-30 MPa e podem ser agrupados em diferentes grupos consoante os níveis de pressão a que estes resistem. Os que sobrevivem a pressões mais altas (40-50 MPa) são denominados de barófilos, sendo os barófobos incapazes de crescer a pressões de 30-40 MPa. Os microrganismos euribáricos crescem num intervalo 1-50 MPa, ao passo que os barodúricos sobrevivem a pressões de 50-200 MPa (Télliez-Luis *et al.*, 2001).

Segundo Pereda *et al.* (2004) e Cheftel & Culioli (1997) as altas pressões produzem danos sub-letais nas células microbianas que após um período de adaptação podem-se recuperar e multiplicar de novo no alimento, o que tem importância na eficácia do tratamento.

## 1.6 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar os efeitos da tecnologia de altas pressões hidrostáticas (HPP) nos atributos de qualidade do cogumelo *Pleurotus ostreatus*, bem como, estudar a eficácia de tratamentos com base na tecnologia HPP como alternativas viáveis para o aumento do tempo de vida útil destes cogumelos.

Para tal, levou-se a cabo um plano de trabalhos que incluiu a utilização de técnicas analíticas microbiológicas e técnicas de avaliação instrumental de parâmetros físicos e químicos em cogumelos *P. ostreatus* submetidos a diferentes combinações de tratamentos pós-colheita:

- a) Cogumelos frescos sem qualquer tratamento (Controlo);
- b) Cogumelos frescos sujeitos a um tratamento HPP;
- c) Cogumelos frescos sujeitos a um tratamento com ácido cítrico;
- d) Cogumelos frescos sujeitos a um tratamento combinado (ácido cítrico + HPP)



# **Capítulo 2**

## **Material e Métodos**



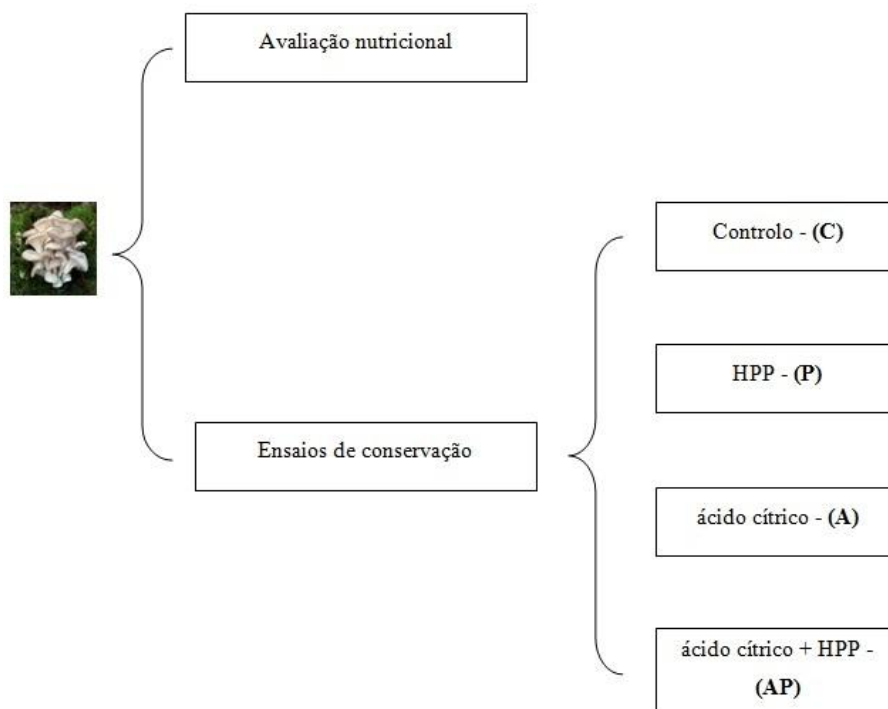
## 2.1 Obtenção e preparação de amostras

Os cogumelos *Pleurotus ostreatus* foram adquiridos num entreposto industrial de produção e comercialização de cogumelos localizado em Paredes (distrito de Porto, Portugal). Assegurou-se a obtenção de cogumelos ainda incorporados nos respetivos cachos recém-colhidos.

Os cachos foram colocados e transportados em caixas térmicas com acumuladores de frio durante a deslocação até às instalações onde foram efetuados os ensaios de alta pressão (Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal).

Uma vez nestas instalações, procedeu-se a uma inspeção visual dos cachos, e a partir daqueles com melhor aparência (mais íntegros e mais frescos) escolheram-se e destacaram-se os corpos frutíferos intactos que se mostravam relativamente uniformes e em dimensão e cor. O destaque foi feito com um único corte, por faca afiada e desinfetada com álcool a 96%.

Depois fez-se a distribuição aleatória dos cogumelos pelos grupos previamente estabelecidos (Figura 9).



**Figura 9.** Grupos de amostras estabelecidos para os ensaios de conservação.

Uma parte dos cogumelos foi separada para fazer a avaliação nutricional dos cogumelos frescos, tendo sido transportados até ao laboratório em arcas térmicas com acumuladores de frio.

Os restantes cogumelos destinaram-se aos ensaios de conservação, tendo sido distribuídos em quatro grupos, identificados com as siglas C, P, A, AP:

C – grupo de controlo, que pretendeu simular as condições de conservação convencional para este tipo de cogumelos em fresco, pelo que se colocaram quatro cogumelos em cada cuvette de poliestireno, que depois foram envoltas numa película de policloreto de vinil (PVC);

P – grupo de cogumelos que foram submetidos a um tratamento e altas pressões, sem mais nenhum tratamento adicional;

A – grupo constituído por cogumelos imersos numa solução de ácido cítrico (1%), sem mais nenhum tratamento adicional. A proporção ácido:cogumelo foi aproximadamente 7:1;

AP – grupo de cogumelos sujeitos ao mesmo tratamento de altas pressões que o grupo P, mas imersos na solução de ácido cítrico na proporção 7:1 (ácido:cogumelo).

As amostras dos grupos P, A e AP foram colocados dentro de sacos de poliamida/polietileno de baixa permeabilidade (PA/PE-90, Albipack, Águeda, Portugal) (Figura 10).



**Figura 10.** Cogumelos embalados e sujeitos à tecnologia de altas pressões: amostra P (à esquerda) e amostra AP (à direita).

Em cada saco e em cada cuvete eram colocados quatro cogumelos. As amostras P eram seladas a vácuo e às amostras A e AP era retirado o excesso de ar e seguidamente termoseladas.

Nas amostras C, P, A e AP foram feitas determinações instrumentais de cor e textura, separadamente no pé e no chapéu de cada cogumelo individualmente, de pH e de Sólidos Solúveis Totais, bem como avaliação microbiológica.

Nas amostras controlo houve quatro cuvetes com cogumelos embalados na forma convencional que foram monitorizados individualmente relativamente à cor e perda de massa durante o período de 21 dias.

Esta amostragem foi feita por duas vezes, correspondendo a dois lotes distintos de dois fluxos diferentes de frutificação.

Após preparadas todas as amostras, estas foram conservadas em refrigeração durante 21 dias, tendo sido retiradas para as análises previstas aos dias 3, 7, 14 e 21 além do dia inicial.

## **2.2 Ensaios tecnológicos**

Os ensaios de altas pressões foram feitos por pressão hidrostática (Hiperbaric 55, Hiperbaric, Burgos, Espanha). Este equipamento tem um vaso com 200 mm de diâmetro interno e 2000 mm de comprimento, tendo uma pressão de trabalho máxima de 600 MPa (Figura 11).

O equipamento encontra-se ligado a uma unidade de refrigeração (RMA KH 40 LT, Ferroli, San Bonifacio, Itália) que permite controlar a temperatura da água de entrada que servirá como fluido de compressão, contudo definiram-se os ensaios com água à temperatura ambiente.

As amostras de cogumelos foram tratadas a 600 MPa durante 10 minutos.



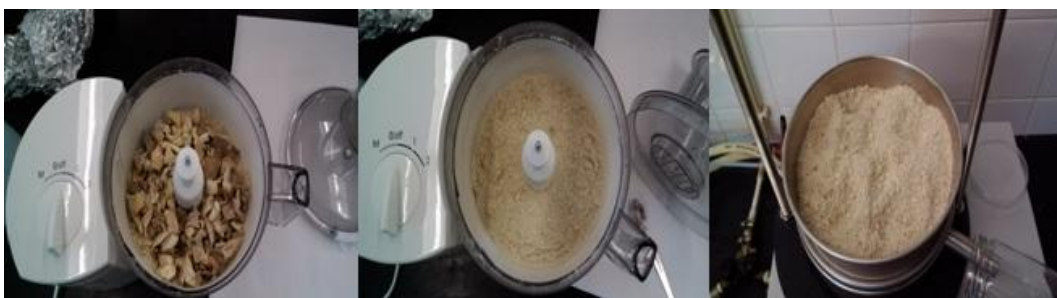
**Figura 11.** Equipamento de Altas Pressões Hidrostáticas utilizado.

## 2.3 Avaliação nutricional dos cogumelos frescos

### 2.3.1 Preparação da amostra

No próprio dia de colheita e da desmancha dos cachos, os cogumelos frescos (chapéu e pé) foram cortados em pedaços mais pequenos e divididos em dois grupos.

Um deles foi imediatamente congelado (-21 °C) e subsequentemente liofilizado. Após a liofilização os cogumelos foram triturados e passados por um crivo de 1mm para selecionar somente as partículas de menores dimensões (Figura 12).



**Figura 12.** Cogumelos liofilizados, triturados e crivados.

Após este processo a amostra foi armazenada à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, até posterior análise para determinação dos teores de gordura bruta e proteína bruta.

O outro grupo foi de imediato homogeneizado num homogeneizador IKA-Ultra-Turrax T25 Basic e utilizado para a determinação dos teores de humidade e cinza bruta.

### 2.3.2 Humidade

O conteúdo em humidade dos cogumelos foi determinado pelo método gravimétrico por secagem em estufa a  $105 \pm 2$  °C até peso constante, segundo método AOAC (1995).

Os ensaios foram feitos em triplicado e o teor de humidade foi expresso em percentagem e calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Teor de Humidade} = \frac{Pf - Ps}{\text{Toma de Amostra}} \times 100$$

Sendo:

Pf= Peso do pesa-filtros com amostra fresca

Ps= Peso final do cadinho com amostra seca

### 2.3.3 Cinza bruta

O teor em cinzas dos cogumelos foi obtido por cálculo gravimétrico, de acordo com o método AOAC (2000), mediante incineração em mufla a  $550 \pm 15$ °C.

Os ensaios foram elaborados em triplicado e o resultado do teor em cinzas foi expresso em percentagem em base seca.

### 2.3.4 Gordura bruta

A quantificação dos lípidos foi feita pela extração com éter de petróleo, de uma massa conhecida da amostra liofilizada, usando um aparelho de Soxhlet.

Após a extração e recolha do solvente os balões foram colocados numa estufa  $100 \pm 2$  °C e foram feitas pesagens até o peso estabilizar.

Os resultados foram expressos em percentagem em base seca.

### 2.3.5 Proteína total

O conteúdo em proteína bruta foi estimado segundo o método Kjeldahl. Pesou-se 1 g de amostra para tubo de Kjeldahl, de seguida adicionou-se duas pastilhas de catalisador e 15 mL ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado).

Posteriormente procedeu-se à digestão completa num bloco digestor a uma temperatura de 400 ± 50 °C. Deixaram-se arrefecer as amostras e levaram-se ao sistema de destilação/titulação de Kjeldahl (Velp Scientifica UDK 152), obtendo-se assim os valores percentuais de azoto, convertidos depois em proteína bruta pela utilização do fator de conversão utilizado para cogumelos (4,38).

Os resultados foram expressos em percentagem em base seca.

### 2.3.6 Hidratos de carbono

Após a determinação do teor em água, cinzas, proteína e gordura fez-se a estimativa do teor de hidratos de carbono através da seguinte equação:

$$\text{Teor de Hidratos de Carbono (\% b.s.)} = 100\% \text{ Matéria Seca} - [\text{Gordura (\% b.s.)} + \text{Proteína (\% b.s.)} + \text{Cinza (\% b.s.)}]$$

### 2.3.7 Valor energético

Após as determinações dos teores dos dos nutrientes energéticos fez-se a estimativa do valor energético expresso, em kcal/100 g de matéria seca, através da seguinte equação:

$$\text{Valor energético (kcal/100g m.s.)} = 4 \times (\text{Hidratos de Carbono (g/100g m.s.)} + \text{Proteína (g/100g m.s.)}) + 9 \times \text{Gordura (g/100g m.s.)}$$

## 2.4 Indicadores de qualidade físico-químicos dos cogumelos conservados

### 2.4.1 Perda de massa

Fez-se a monitorização da perda de massa ao longo do período de conservação num conjunto de cogumelos distribuídos por quatro cuvetes, envoltos por película aderente e armazenados no frigorífico a 4 °C, simulando as condições comerciais de conservação. A perda de massa foi determinada pesando os cogumelos inteiros, separadamente em cada dia de amostragem. A perda de massa foi expressa em percentagem de perda de peso em relação ao peso inicial do cogumelo.

$$\text{Perda de massa (\%)} = \left[ \frac{P_i - P_n}{P_i} \right] \times 100$$

Sendo:

P<sub>i</sub>= Peso inicial do cogumelo (dia 0)

P<sub>n</sub>= Peso do cogumelo ao dia especificado

### 2.4.2 Cor

Realizou-se a análise da cor utilizando um colorímetro Minolta CR-400, no espaço de cor CIELab através das coordenadas L\*, a\*, b\*, C\* usando o software Spectra Magic Nx (versão CM-S100W 2.03.0006, Konica Minolta Company, Japão) e recolheram-se os valores correspondentes às coordenadas cromáticas L\*, a\*, b\* do espaço de cor CIELAB, correspondendo o parâmetro L\* à luminosidade, o a\* ao conteúdo de vermelho a verde, e o b\* ao conteúdo de amarelo a azul.

Além destes ensaios também se realizou em paralelo ensaios noutra grupo de oito cogumelos. Estes cogumelos eram armazenados em cuvetes envoltos com película aderente e armazenados no frigorífico a 4°C. Os ensaios deste grupo serviram para ver a evolução da cor ao longo do tempo e nos mesmos cogumelos, servindo assim este grupo de controlo da cor como um indicador do comportamento da cor para comparação com as diferentes condições de armazenamento.

As medições de cor foram realizadas em quatro pontos da face superior do chapéu do cogumelo; num quadrante escolhia-se um ponto do chapéu e no quadrante oposto

escolhia-se um ponto mais interior. Obtiveram-se 4 leituras por cogumelos, e cada amostra continha quatro cogumelos, pelo que se obtiveram valores médios de 16 leituras para cada parâmetro medido no chapéu ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ). No pé de cada cogumelo foi feita uma leitura, pelo que os resultados em cada amostra são expressos como média de 4 valores.

A fim de analisar a variação de cor, foi calculado também a variação total de cor ( $\Delta E^*$ ) pela seguinte equação (Clariana *et al.*, 2011):

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

### 2.4.3 Textura

Na avaliação instrumental da textura dos cogumelos utilizou-se um teste de corte, usando-se para o efeito um texturómetro INSTRON equipado com uma célula de corte Warner-Bratzler. O parâmetro de textura determinado foi a dureza experimental, que foi definida como a força máxima necessária para cortar a amostra.

Para estes ensaios seguiu-se a metodologia realizada por Yurttas *et al.* (2014), com algumas alterações. Em primeiro lugar, fazia-se a separação dos pés de cada cogumelo do respetivo chapéu, já que cada parte do cogumelo era testada individualmente. Para os ensaios efetuados no chapéu, duas rodela de aproximadamente 2 cm de diâmetro eram obtidas através do corte com um cortador de rolhas no chapéu de cada cogumelo e colocada sobre a outra.

Para cada cogumelo obteve-se assim um par de valores correspondente à força de corte do pé e a força de corte do chapéu desse mesmo cogumelo, tendo sido testados quatro cogumelos por tratamento de conservação, por dia de análise.

Os resultados foram expressos em kgf.

### 2.4.4 pH

Para estes ensaios, as amostras de cogumelos frescos foram homogeneizadas (IKA-Ultra-Turrax T25 Basic) e o pH medido num potenciómetro (HI 8417 Hanna Instruments) previamente calibrado, imergindo-se o eléctrodo do potenciómetro no homogeneizado da toma de amostra e procedendo-se à leitura.

Foram feitas medições em triplicado para cada condição de conservação em cada dia de análise.

#### **2.4.5 Sólidos solúveis totais**

Para a determinação do teor de sólidos solúveis totais (SST), utilizou-se como base o protocolo referenciado no Regulamento (CEE) N° 558/93. Uma toma da amostra homogeneizada (mesmo homogeneizado em que se mediu o pH) foi feita passar através de uma gaze seca dobrada em quatro, e após se ter separado as primeiras gotas do filtrado, faz-se a determinação a partir do produto filtrado num refratómetro de bancada (ABBE Refractometer Optic Ivymen ® system).

#### **2.5 Indicadores de qualidade microbiológica dos cogumelos conservados**

Com o objetivo de avaliar a qualidade microbiológica dos cogumelos sujeitos aos quatro diferentes tratamentos de conservação, foram avaliados microrganismos indicadores de qualidade comercial (aeróbios mesófilos e psicrófilos, bolores e leveduras), de qualidade sanitária (coliformes totais e fecais) e segurança (esporos de clostrídios sulfito-redutores).

A avaliação da qualidade microbiológica foi feita em duplicado e de acordo com Normas Portuguesas, Internacionais e por kits rápidos que são métodos oficiais da AOAC.

Foi usado material de uso comum de laboratório de microbiologia, sendo todo ele lavado, passado por água destilada, seco na estufa e esterilizado por calor húmido (autoclave a 121°C durante uma hora).

##### **2.5.1 Preparação das amostras**

A preparação das amostras foi efetuada de acordo com a NP-1829:1982.

A preparação e composição dos vários meios de cultura utilizados encontram-se descritas no anexo I.

##### **2.5.2 Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos**

Na contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos utilizou-se a norma portuguesa NP-3788:2002 com sementeira por incorporação de 1 mL de cada diluição decimal (dependendo da carga microbiana que se suspeitou que estivesse presente nas

amostras em cada dia de análise) para placas de Petri contendo meio de cultura Plate Count Agar (PCA). A contagem das colónias foi efetuada após incubação das placas a 30°C durante 72 horas, sendo os resultados expressos em unidades formadoras de colónias por grama de produto analisado (UFC/g), utilizando-se para o cálculo a seguinte fórmula:

$$\text{UFC/g} = \frac{\sum c}{[V \times (n_1 + 0,1n_2) \times d]}$$

Onde:

$\Sigma C$ - soma das colónias em todas as placas contadas

V- volume de inóculo semeado em cada placa

$n_1$ - número de placas da primeira diluição contada

$n_2$ - número de placas da segunda diluição contada.

d- diluição a partir da qual se obtiveram as primeiras contagens

Os resultados foram então convertidos em base logarítmica do número de UFC/g de amostra e são apresentados em  $\text{Log}_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ .

### 2.5.3 Contagem total de microrganismos aeróbios psicrófilos

Na contagem total de microrganismos aeróbios psicrófilos utilizou-se a norma portuguesa NP-2307:1987.

Procedeu-se à sementeira por espalhamento de 0,1 mL de cada diluição decimal (dependendo da carga microbiana que se suspeitou que estivesse presente nas amostras em cada dia de análise) para placas de Petri contendo meio de cultura Plate Count Agar (PCA).

As placas foram incubadas a 7°C durante 7 dias, e o cálculo das UFC/g e a apresentação dos resultados foram efetuados da mesma forma que a usada para os aeróbios mesófilos.

### 2.5.4 Contagem total de bolores e leveduras

Para se efetuar a contagem total de bolores e leveduras utilizou-se o meio DRBC (Dichloran Red Bengal Chloramphenicol), sendo este meio apropriado para produtos com elevada atividade de água (ISO 21527-1:2008), como é o caso dos cogumelos.

Procedeu-se à sementeira por espalhamento de 0,1 mL de cada diluição decimal, dependendo da carga microbiana que se suspeitou que estivesse presente nas amostras em cada dia de análise, para placas de Petri contendo o referido meio de cultura.

A incubação das placas foi feita a 25°C e a observação destas foi efetuada passados 3, 5 e 7 dias, sendo os resultados expressos em Log<sub>10</sub> UFC.g<sup>-1</sup>.

### **2.5.5 Contagem de coliformes totais e *Escherichia coli***

Na quantificação de coliformes totais e de *Escherichia coli* foi utilizado o sistema Simplate (Simplat®e, Bio Control).

O meio de cultura fornecido foi hidratado previamente em 9 mL de água destilada, inoculado com 1 mL da solução mãe e homogeneizado com auxílio do vórtex, seguindo as recomendações do fabricante. Procedeu-se de igual modo para as várias diluições.

O conteúdo foi vertido para placas contendo 84 poços. O líquido foi uniformemente espalhado pelos poços com movimentos circulares a baixa velocidade e por fim o excesso foi removido. As placas foram incubadas a 35°C durante 24 a 48 horas. A enumeração dos coliformes totais foi realizada através da contagem do número de poços em que ocorreu mudança de cor do meio de cultura. A enumeração da *E. coli* foi realizada através da contagem do número de poços em que se observou fluorescência, após a exposição da placa a uma lâmpada de radiação ultravioleta (UV) a 365 nm. O número de coliformes presentes na amostra foi calculado de acordo com a tabela fornecida pelo fabricante.

### **2.5.6 Pesquisa de esporos clostrídios sulfito-redutores**

A quantificação de esporos de clostrídios sulfito-redutores foi efetuada segundo a norma portuguesa NP-2262:1986.

Colocaram-se 1, 5 e 10 mL da suspensão mãe em tubos de ensaio. Os tubos foram aquecidos em banho-maria a 80°C, durante 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram distribuídas pelas placas de Petri contendo meio de cultura Reinforced Clostridial Agar (RCA) com sulfito de sódio e citrato de ferro. De seguida adicionou-se mais uma camada de meio à placa e selou-se com parafilme. Após solidificação, as placas incubaram-se numa estufa a 37°C durante 72 horas. O aparecimento de colónias negras nas placas considerou-se como resultado positivo.

## 2.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram executadas no *software* SPSS (v.22, 2013, SPSS Inc, Chicago, IL) e consideraram-se estatisticamente significativos os efeitos cujos valores de  $p$  foram inferiores ou iguais a 0,05. A ANOVA a três fatores foi utilizada para averiguar o efeito, dos três fatores (lote, tratamento, dia), bem como a interação entre eles nos diferentes parâmetros estudados.

Para avaliar se existiam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos e averiguar se ocorriam diferenças estatísticas ao longo dos dias analisados recorreu-se à ANOVA *one-way*, seguida do teste *post-hoc* HSD de Tukey quando os pressupostos da normalidade e homogeneidade de variâncias eram cumpridos, ou com correção de Welch, no caso do requisito da homogeneidade de variâncias não se verificar, como descrito em Maroco (2003). Nesta situação, quando se observou um efeito significativo ( $p < 0,05$ ) foi aplicado o teste de Dunnett T3's.

O pressuposto da distribuição normal da variável dependente foi avaliado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors (se  $n > 50$ ) ou pelo teste de Shapiro-Wilk (se  $n < 50$ ). O pressuposto da homogeneidade de variâncias foi validado pelo teste de Levene.

# Capítulo 3

## Resultados e Discussão



### 3.1 Caracterização nutricional dos cogumelos *Pleurotus ostreatus*

A Tabela 3 mostra os resultados da caracterização elementar dos cogumelos frescos dos dois lotes estudados.

A água é o componente maioritário dos cogumelos, tendo o lote 1 e o lote 2 um conteúdo em água de  $91,54 \pm 0,05\%$  e  $90,86 \pm 0,09\%$ , respetivamente. Estes valores estão dentro da gama obtida por Chang & Miles (2004).

Depois da água, os hidratos de carbono são o componente mais abundante, representando  $79,84 \pm 0,28\%$  e  $81,22 \pm 0,41\%$  do teor de matéria seca presente nos cogumelos do lote 1 e lote 2, respetivamente. Estes valores também vão de encontro aos descritos por Chang & Miles (2004), que descrevem valores de hidratos de carbono em cogumelos *P. ostreatus* compreendidos entre 57,60 e 81,80 g/100g de matéria seca. No entanto, são um pouco superiores aos descritos por Furlani & Godoy (2007) e Yang *et al.* (2001), com valores médios de  $65,82 \pm 7,86$  e  $61,1 \pm 1,90$  g/100g de matéria seca, respetivamente.

Os cogumelos são considerados uma boa fonte de proteínas, mas o teor proteico depende, entre outros fatores, da composição do substrato, do tamanho do píleo, do tempo de cultivo e da espécie fúngica (Holtz *et al.*, 2009). Para a grande maioria dos alimentos, no cálculo do teor de proteína é usado um fator de conversão geral. Este valor (6,25) assume que as proteínas contêm 16% de azoto e que são totalmente digeríveis. Esse fator despreza quantidades de compostos azotados não proteicos presentes em alimentos e que são, na sua grande maioria, insignificantes. Os cogumelos, porém, possuem uma significativa quantidade de compostos azotados não proteicos, na forma de quitina, nas suas paredes celulares e tais compostos não são digeríveis. Para não correr o risco de sobreavaliação do conteúdo proteico de cogumelos adota-se habitualmente o fator 4,38. Este valor assume que apenas 70% dos compostos azotados existentes no cogumelo sejam digeríveis pelo organismo humano ( $0,70 \times 6,25 = 4,38$ ) (Furlani & Godoy, 2005). No que diz respeito ao teor em proteína total obtido, verificou-se que o lote 1 apresentou um valor ligeiramente mais elevado deste constituinte, com  $8,23 \pm 0,15\%$ , em relação ao lote 2, que obteve um valor de  $8,1 \pm 0,36\%$ .

Os cogumelos são muito pobres em lípidos, variando em cogumelos do género *Pleurotus* entre 1,6 e 2,2% em base seca, segundo dados compilados por Chang & Miles (2004). Por sua vez Yang *et al.* (2001) determinaram também em cogumelos *Pleurotus*

*ostreatus* valores médios de gordura na ordem dos 2,16% (em base seca). Os resultados obtidos neste estudo (Tabela 3) vêm de encontro aos destes autores, com valores médios entre 1,33 e 2,43% (base seca).

As cinzas representaram 9,98% do conteúdo em base seca do lote 1 e 8,78% no lote 2, valores que estão de acordo aos descritos para este cogumelo, por Chang & Miles (2005) e por Yang *et al.* (2001).

Por sua vez os valores energéticos obtidos estão um pouco abaixo da gama de valores compreendidos entre 345 e 367 Kcal/100g de matéria seca, descritos por Chang & Miles (2005) para *Pleurotus ostreatus*.

**Tabela 3.** Composição elementar dos dois lotes de amostras estudadas (valores médios  $\pm$  desvio padrão).

Lote	Humidade (% b.h)	Cinzas (% b.s)	Gordura (% b.s)	Proteínas (% b.s)	Hidratos de Carbono (% b.s)	Valor Energético (kcal/100g matéria seca)
1	91,54 $\pm$ 0,05	9,98 $\pm$ 0,32	2,43 $\pm$ 0,09	8,23 $\pm$ 0,15	79,84 $\pm$ 0,28	303,89 $\pm$ 1,49
2	90,86 $\pm$ 0,09	8,78 $\pm$ 0,24	1,33 $\pm$ 0,01	8,14 $\pm$ 0,36	81,22 $\pm$ 0,41	335,18 $\pm$ 3,01

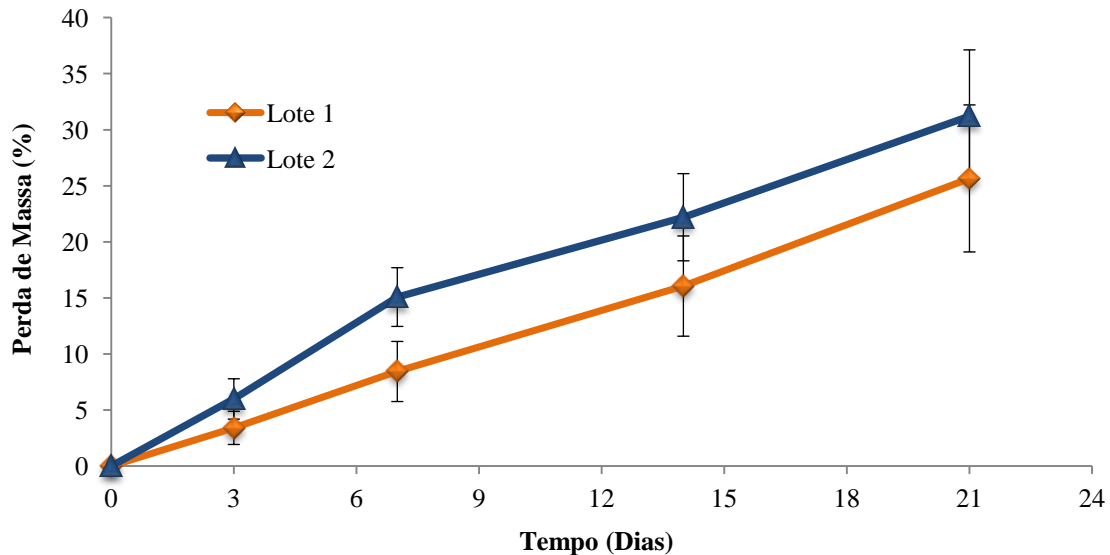
Em resumo, este cogumelo, em fresco, é constituído essencialmente por água (mais de 90%), e apresenta na matéria seca predominantemente hidratos de carbono, cerca de 80%, dos quais uma parte importante serão indigeríveis (fibra alimentar), com principal relevo para a quantidade de  $\beta$ -glucanos (Jaworska *et al.*, 2011), mas também sais minerais (9-10%) e proteínas (8%), sendo muito pobre em gordura (inferior a 3% da matéria seca). Relativamente a outros géneros alimentícios, é de destacar a sua riqueza em sais minerais, com destaque para o potássio e fósforo (Helm *et al.*, 2009).

## 3.2 Indicadores físico-químicos da qualidade de *Pleurotus ostreatus*

### 3.2.1 Perda de massa na conservação convencional

A Figura 13 retrata a perda percentual de massa durante 21 dias a 4°C, simulando as condições comerciais de embalagem e conservação. Como se esperava, durante o tempo de armazenamento os cogumelos foram perdendo progressivamente massa. Esta terá decorrido em consequência do processo respiratório próprio dos cogumelos e

também da desidratação resultante da presença dos cogumelos num ambiente cuja humidade não era controlada e que era inferior à humidade relativa de equilíbrio dos próprios cogumelos.



**Figura 13.** Perda de massa (%) dos cogumelos frescos (Média ± Desvio Padrão) conservados em cuvetes de poliestireno envolvidas com película PVC a 4°C aos dias 0, 3, 7, 14 e 21.

O lote 2 teve sempre maiores perdas de massa que o lote 1. Verificou-se uma perda de massa mais drástica nos sete primeiros dias. Ao dia 3 as amostras do lote 1 perderam  $3,41 \pm 1,48\%$  da sua massa inicial e o lote 2 perdeu  $5,99 \pm 1,80\%$ . No dia 7 as perdas foram de  $8,44 \pm 2,68$  e  $15,08 \pm 2,62$  no lote 1 e 2, respetivamente (Figura 13). Dada a amplitude das diferenças entre os lotes de cogumelos submetidos exatamente às mesmas condições de pós-colheita, parece ser evidente que o lote influencia a perda de massa.

Os cogumelos são muito suscetíveis relativamente a variações no nível de humidade do ambiente em que se encontram. Se o nível de humidade for muito elevado o crescimento microbiano e os processos de descoloração são favorecidos, ao passo que níveis baixos de humidade resultam em modificações de textura indesejáveis e perdas de massa, com a consequente redução do valor económico. Os cogumelos respiram, libertando grandes quantidades de vapor de água (Singh *et al.*, 2010), sendo protegidos apenas por uma estrutura epidermal porosa e fina, que não evita que ocorra uma desidratação superficial rápida que causa perdas de qualidade importantes (Ares *et al.*, 2007). Humidades relativas baixas na atmosfera envolvente resultam numa perda de água excessiva, que não só degrada a textura, mas também pode resultar no declínio da pressão na célula, fecho dos poros, redução da taxa respiratória e incremento da

atividade enzimática, acelerando assim a desagregação celular (Singh *et al.*, 2010). Jayathunge & Illeperuma (2005) constataram que uma temperatura de 0°C e 95% de humidade relativa constituíram a condição ideal para prolongar o tempo de prateleira de cogumelos *P. ostreatus*. Bernas *et al.* (2006), por seu lado, afirmaram que as condições de armazenamento mais favoráveis para este tipo de cogumelos se encontram entre 0°C e 2°C com uma humidade relativa de 90%.

Nesta espécie, Villaescusa & Gil (2003) constataram que a perda de massa aumenta com a temperatura e que se acentua com o tempo de armazenamento, indo ao encontro de resultados de outros autores noutros tipos de cogumelos. Adiantam ainda que, pese embora tenham feito circular no ambiente de conservação dos cogumelos ar bastante húmido, as perdas de massa tinham sido superiores ao que esperavam, tendo atribuído isso ao elevado teor de humidade do cogumelo *Pleutorus ostreatus* e à sua elevada área específica. A perda de massa em cogumelos *P. ostreatus* foi estudada por Azevedo (2010), tendo constatado que após 4 dias de armazenamento a 2 e 10°C os cogumelos tinham perdido, em média 7% de massa. Ao longo dos quatro dias de armazenamento também foi observada uma contínua perda de massa por parte dos cogumelos.

### 3.2.2 Teor de Sólidos Solúveis Totais

De modo a avaliar o efeito de cada um dos três fatores (Lote, Tratamento e Dia), bem como a interação entre os três fatores efetuou-se uma ANOVA Multifatorial com 3 fatores. Os resultados deste tratamento estatístico estão indicados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Resultado da ANOVA a três fatores para verificar a existência de efeitos significativos de cada fator e interação entre eles para o valor de Sólidos Solúveis Totais.

	Fatores			Interação			
	Lote (Fator 1)	Tratamento (Fator 2)	Dia (Fator 3)	F1 × F2	F1 × F3	F2 × F3	F1 × F2 × F3
<b>SST (°Brix)</b>	***	***	***	***	***	***	***

n.s.- não significante;

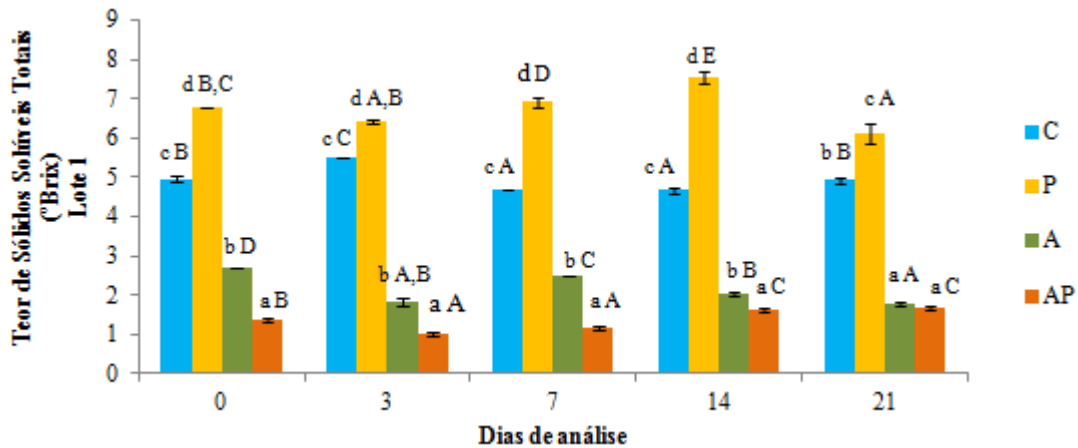
\*\*  $p \leq 0,01$  – correlação muito significativa;

\*  $p \leq 0,05$  – correlação significativa;

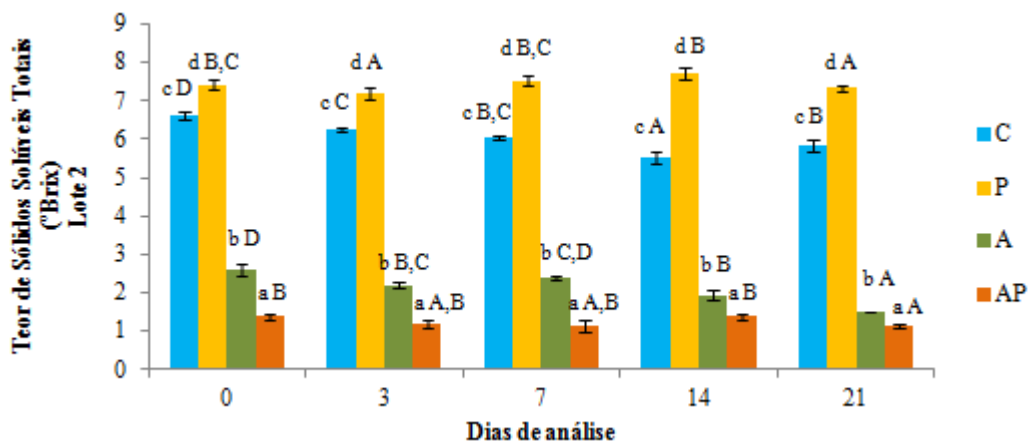
\*\*\*  $p \leq 0,001$  – correlação extremamente significativa.

Com base nesta tabela observa-se que os três fatores, bem como as interações entre eles são extremamente significativas ( $p < 0,001$ ). Pode-se assim afirmar que todos os fatores influenciam significativamente nos resultados de SST obtidos neste estudo.

Os resultados obtidos para o Teor de Sólidos Solúveis Totais para as diferentes amostras analisadas utilizando a ANOVA a um fator estão indicados nas Figura 14 e 15.



**Figura 14.** Teor de Sólidos Solúveis Totais determinados para os diferentes tratamentos de conservação aos dias analisados (Lote 1).



**Figura 15.** Teor de Sólidos Solúveis Totais determinados para os diferentes tratamentos de conservação aos dias analisados (Lote 2).

Olhando aos resultados obtidos na amostra C constata-se que os valores mais baixos de SST,  $4,67 \pm 0,06$  °Brix – lote 1 e  $5,53 \pm 0,15$  °Brix – lote 2, foram obtidos no dia 14, enquanto que o valor maior de SST no lote 1 ( $5,50 \pm 0,01$  °Brix) foi obtido no dia 3 e no lote 2 ( $6,63 \pm 0,12$  °Brix) foi registrado ao dia 0 (material suplementar apresentado na Tabela 18 do Anexo II). Ao analisar estatisticamente o valor de SST verifica-se que, na generalidade, houve diferenças significativas ao longo do tempo de

armazenamento, que podem estar associadas principalmente ao desdobramento dos hidratos de carbono presentes nos cogumelos (quebrando os polissacarídeos em monossacarídeos) e à desidratação progressiva devido à diferença de potencial químico entre a atmosfera e o produto (Cortés *et al.*, 2011; Fito *et al.*, 2001).

Cortés *et al.* (2011) estudou o efeito de diferentes tipos de embalagem nas propriedades físico-químicas do *Pleurotus ostreatus* e observaram que os valores de SST deste cogumelo, quando embalado convencionalmente, oscilaram entre  $4,3 \pm 0,1$  °Brix (dia 0) e  $7,0 \pm 0,2$  °Brix (dia 6). Relativamente aos resultados obtidos neste estudo os valores são da mesma ordem de grandeza aos descritos por estes autores.

No que toca aos valores obtidos para a amostra processada por HPP (P), foram encontradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para os diferentes dias. No lote 1 obtiveram-se valores compreendidos entre  $7,57 \pm 0,15$  °Brix (dia 14) e  $6,13 \pm 0,25$  °Brix (dia 21). Os valores do lote 2 variaram entre  $7,73 \pm 0,15$  °Brix (dia 14) e  $7,20 \pm 0,17$  °Brix (dia 3).

A amostra A apresentou ao dia 0 o valor mais alto em ambos os lotes, enquanto que o valor mais reduzido de °Brix foi obtido no dia 21. Esta amostra apresenta diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo de armazenamento, onde os valores vão, em geral, diminuindo progressivamente ao longo do tempo.

Por sua vez os resultados obtidos para a amostra AP mostram que o valor de SST mais elevado foi obtido ao dia 14 ( $1,63 \pm 0,06$  °Brix – lote 1 e  $1,37 \pm 0,06$  °Brix – lote 2) ao passo que no lote 1 foi no dia 3 que o resultado obtido foi mais diminuto ( $1,03 \pm 0,06$  °Brix). No lote 2 os valores menores de SST foram obtidos ao dia 7 e dia 21, com um valor de  $1,13$  °Brix em ambos os dias. Ao longo do tempo verificaram-se diferenças significativas entre alguns dos dias analisados.

Em todos os dias de análise a amostra que apresentou valores de SST superiores foi a amostra P, seguida pela amostra C, pela amostra A e, por fim, pela amostra AP. Ao longo dos dias observou-se que existiram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos em todos os dias em que as amostras foram analisadas, o que indica que o tratamento de altas pressões influencia bastante este indicador.

Visto que na bibliografia não se encontram registo do efeito da tecnologia HPP no teor de Sólidos Solúveis Totais em cogumelos, optou-se por comparar os efeitos obtidos por esta tecnologia em outros produtos hortofrutícolas. O facto do tratamento HPP afetar significativamente ( $p < 0,05$ ) o Teor de Sólidos Solúveis Totais vai de encontro ao obtido por outros autores em diferentes matrizes alimentares, como Boynton *et al.*

(2002), Vázquez-Gutiérrez *et al.* (2011) e Ríos-Romero *et al.* (2012) que verificaram diferenças no SST provocadas pelo tratamento com altas pressões hidrostáticas em mangas, dióspiros e romãs, respetivamente. A tecnologia HPP pode fazer com que os produtos vegetais sofram ruturas e desarranjos nas suas paredes e membranas celulares (Préstamo & Arroyo, 1998) o que leva à libertação da água no interior das células, conduzindo, a um aumento de SST. Possivelmente será esta a explicação para o aumento deste indicador nos cogumelos processados com altas pressões.

A amostra A possui um valor de SST bastante baixo comparativamente às amostras C e P, o que pode ser explicado pelo facto de esta amostra estar imersa numa solução de ácido cítrico a 1% pouco concentrada, o que faz com que haja a difusão de solutos do interior das células para o meio exterior, a favor do gradiente de concentração, onde os sais e açúcares presentes no meio mais concentrado (células do cogumelo) migram para o meio menos concentrado (solução ácido cítrico) até se atingir um equilíbrio (Raven *et al.*, 2001).

Comparativamente às restantes, a amostra AP obteve ao longo dos diferentes dias sempre o valor mais baixo de entre todas as amostras e foi a que apresentou mais diferenças relativamente ao controlo. Estes resultados podem ser consequência da migração de solutos para o meio envolvente (solução ácido cítrico) menos concentrado, ter sido ainda mais favorecida pelos efeitos da tecnologia de HPP nas paredes e membranas celulares das células do cogumelo, isto é, a alta pressão favoreceu a difusão do interior das células para o exterior pelo rompimento e distúrbio das membranas e paredes celulares das células dos cogumelos.

O efeito da presença do ácido cítrico (1%) em contacto com o cogumelo diminuiu drasticamente o teor de SST.

Já o efeito da tecnologia de altas pressões isoladamente é de aumentar os valores de SST, mas em cogumelos imersos no ácido cítrico a 1%, acentuou a difusão dos solutos celulares para o meio exterior.

### 3.2.3 pH

Para se observar o efeito de cada um dos três fatores (Lote, Tratamento e Dia), bem como a interação entre eles optou-se pela elaboração de uma ANOVA Multifatorial a 3 fatores, estando os resultados representados na Tabela 5.

Tendo em conta os resultados da ANOVA Multifatorial, os três fatores e as suas interações são significativas a um nível de 0,1%. Pode-se assim afirmar que todos os fatores têm uma influência grande nos valores de pH medidos.

**Tabela 5.** Resultado da ANOVA a três fatores para verificar a existência de efeitos significativos de cada fator e interação entre eles para o valor de pH.

pH	Fatores			Interação			
	Lote	Tratamento	Dia	F1 × F2	F1 × F3	F2 × F3	F1 × F2 × F3
	(Fator 1)	(Fator 2)	(Fator 3)				
	***	***	***	***	***	***	***

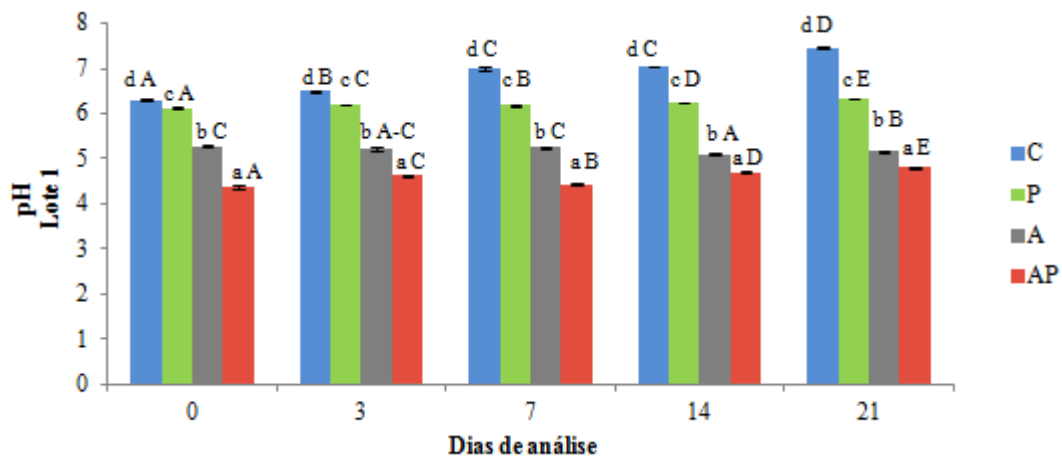
n.s.- não significante;

\*\*  $p \leq 0,01$  – correlação muito significativa;

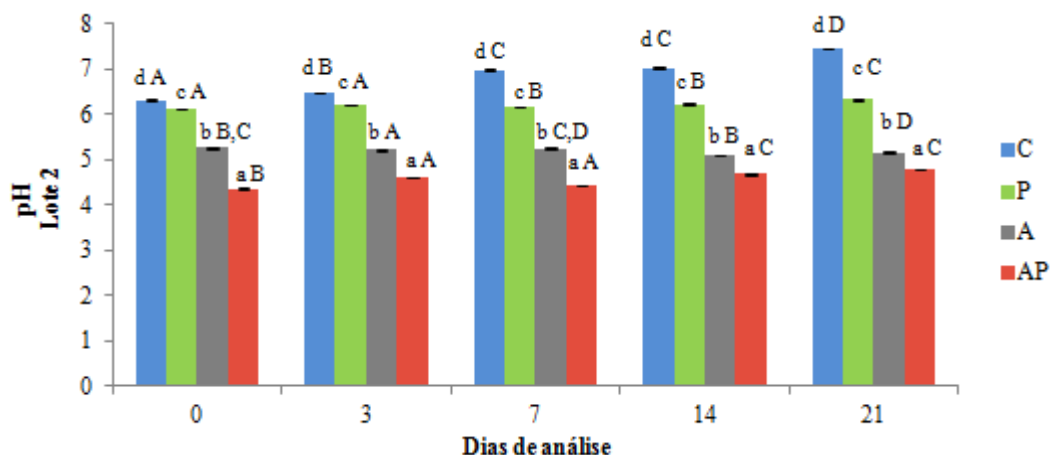
\*  $p \leq 0,05$  – correlação significativa;

\*\*\*  $p \leq 0,001$  – correlação extremamente significativa.

Nas Figuras 16 e 17 apresentam-se os resultados relativos à determinação do pH para os diferentes tratamentos.



**Figura 16.** Valores de pH determinados para os diferentes tratamentos de conservação aos dias analisados (Lote 1).



**Figura 17.** Valores de pH determinados para os diferentes tratamentos de conservação aos dias analisados (Lote 2).

Numa primeira análise aos gráficos verificou-se que na amostra controlo houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para a maioria dos casos no pH, na maioria dos casos, ao longo do tempo em ambos os lotes. Verificou-se que o valor de pH para o controlo variou entre os valores de  $7,46 \pm 0,01$  (lote 1) e  $7,37 \pm 0,01$  (lote 2) no dia 21 e  $6,31 \pm 0,01$  (lote 1) e  $6,66 \pm 0,02$  (lote 2) no dia 0 (material suplementar apresentado na Tabela 19 do Anexo II). Os valores de pH obtidos inicialmente estão bastante próximos dos valores obtidos por Villaescusa & Gil (2000) e Córtes *et al.* (2011) que obtiveram um valor inicial de pH em *Pleurotus ostreatus* de 6,4 e 6,47, respetivamente.

Na amostra processada com alta pressão (amostra P), o pH também foi aumentando de forma significativa ( $p < 0,05$ ) ao longo dos vinte e um dias, apenas no lote 1.

Em termos gerais, no que toca à amostra A esta apresentou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) ao longo dos dias de armazenamento em ambos os lotes e obtiveram-se valores compreendidos entre  $5,10 \pm 0,01$  no lote 1 e  $5,31 \pm 0,01$  no lote 2 obtidos ao dia 14 e dia 3, respetivamente e  $5,27 \pm 0,02$  (lote 1) e  $5,47 \pm 0,01$  (lote 2) registados ao dia 0 e dia 7.

Relativamente aos valores de pH da amostra AP, os valores mais elevados de pH foram ambos determinados no último dia de análise. Verificaram-se diferenças entre alguns dias de armazenamento, podendo estes resultados indicar que o tempo de armazenamento é um aspeto que influencia o pH.

Constata-se que o tipo de tratamento de conservação teve um efeito significativo no pH das amostras, tendo-se obtido diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) em todos os dias de análise.

A amostra P apresenta um decréscimo de pH em relação ao obtido para o controlo, o que vem de encontro ao encontrado na bibliografia, onde comumente se reporta que a tecnologia de altas pressões tem o efeito de diminuir o pH, uma vez que favorece a ionização de ácidos orgânicos (agentes inibidores do crescimento microbiano) presentes na forma dissociada (Smelt, 1998; Téllez-Luis *et al.* 2001; Diez *et al.*, 2008; Boynton *et al.*, 2012).

Os valores de pH registados para a amostra A apresentam-se mais baixos que os observados para as amostras C e P, sendo esta diferença expectável, uma vez que esta amostra foi mantida na solução de ácido cítrico (1%), o que, sendo um acidulante confere um gosto e sabor mais ácido aos alimentos, além de ter uma função antioxidante nos alimentos (Msagati, 2013).

Já a amostra AP foi a que obteve valores mais reduzidos de pH, o que também era de prever, visto que esta amostra é sujeita a dois tratamentos reconhecidos por reduzir o valor pH (solução de ácido cítrico e HPP).

### 3.2.4 Cor

A cor de um alimento é o primeiro ponto de contacto do produto com o consumidor. Na elaboração de um género alimentício deve ter-se em conta este parâmetro, de forma a torná-lo o mais atrativo para o consumidor e deste modo incentivá-lo para a compra do produto em questão. Como o piléu e a estipe dos cogumelos podem por vezes apresentar diferenças na cor decidiu-se fazer a sua determinação no chapéu e no pé separadamente, sendo assim os dados recolhidos irão ser dispostos em tabelas diferentes para estes dois constituintes.

Em primeiro lugar realizou-se uma ANOVA Multifatorial a 3 fatores. Os resultados desta análise estatística estão apresetados na Tabela 6.

Segundo esta tabela houve diferentes resultados consoante o constituinte que se analisou (chapéu e pé) e entre os diferentes parâmetros avaliados. Em termos gerais os fatores individuais tiveram efeito significativos sobre os parâmetros da cor, com exceção do Lote para o valor de  $L^*$  no pé e para os valores de  $b^*$  medidos no chapéu. No que toca às interações entre os fatores, onde se registou mais efeitos significativos

foi na interação entre o Lote e o Tratamento. Somente dois parâmetros cromáticos é que não obtiveram uma correlação significativa entre estes fatores. Na interação entre o Lote e o Dia somente dois parâmetros é que obtiveram efeitos significativos.

As Tabelas 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14 são os resultados de ANOVAs a um fator para os diferentes atributos da cor com o intuito de se verificar quais os tratamentos que efetivamente diferem entre si e quais os dias em que se registam diferenças dentro de cada tratamento.

**Tabela 6.** Resultado da ANOVA a três fatores para verificar a existência de efeitos significativos em cada fator e interação entre eles para os parâmetros cromáticos.

	Fatores			Interação			
	Lote (Fator 1)	Tratamento (Fator 2)	Dia (Fator 3)	F1 × F2	F1 × F3	F2 × F3	F1 × F2 × F3
<b><i>L*</i></b>	***	***	***	***	n.s.	***	n.s.
<b>Chapéu</b>							
<b><i>L* Pé</i></b>	n.s.	***	***	***	n.s.	n.s.	*
<b><i>a*</i></b>	***	***	**	***	n.s.	***	*
<b>Chapéu</b>							
<b><i>a* Pé</i></b>	*	***	***	n.s.	n.s.	***	n.s.
<b><i>b*</i></b>	n.s.	***	***	***	*	***	n.s.
<b>Chapéu</b>							
<b><i>b* Pé</i></b>	**	***	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b><math>\Delta E^*</math></b>	***	***	***	***	**	***	n.s.
<b>Chapéu</b>							
<b><math>\Delta E^*</math> Pé</b>	***	***	***	***	n.s.	n.s.	**

n.s.- não significante;

\*\*  $p \leq 0,01$  – correlação muito significativa;

\*  $p \leq 0,05$  – correlação significativa;

\*\*\*  $p \leq 0,001$  – correlação extremamente significativa.

### 3.2.4.1 Luminosidade ( $L^*$ )

#### Chapéu

Ao analisar os valores do parâmetro  $L^*$  medidos no chapéu para as diferentes amostras ao longo dos diferentes dias de armazenamento constatou-se que na amostra controlo do lote 1 não se observaram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) durante o tempo de armazenamento, tendo os valores variado entre  $58,22 \pm 1,88$  e  $64,75$

$\pm 2,64$ , observados ao dia 14 e dia 21, respetivamente. Contudo no lote 2 já se verificou uma redução gradual do valor de luminosidade, constatado pelas diferenças significativas observadas em geral ao longo dos dias de armazenamento (Tabela 7).

**Tabela 7.** Valores médios  $\pm$  desvio padrão de Luminosidade ( $L^*$ ) determinados no chapéu para os diferentes tratamentos de conservação aos dias de análise estabelecidos.

<b><math>L^*</math> – Chapéu – Lote 1</b>					
<b>Dias de Análise</b>					
	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>
<b>C</b>	60,79 $\pm$ 1,11	60,95 $\pm$ 2,89 <sup>b</sup>	61,95 $\pm$ 7,03 <sup>b</sup>	58,22 $\pm$ 1,88 <sup>c</sup>	64,75 $\pm$ 2,64 <sup>c</sup>
<b>P</b>	55,76 $\pm$ 4,45 <sup>B</sup>	55,92 $\pm$ 1,21 <sup>a,bB</sup>	50,43 $\pm$ 2,36 <sup>aA,B</sup>	47,45 $\pm$ 2,85 <sup>aA</sup>	46,22 $\pm$ 2,79 <sup>aA</sup>
<b>A</b>	57,14 $\pm$ 7,01	53,08 $\pm$ 3,04 <sup>a</sup>	52,11 $\pm$ 3,47 <sup>a</sup>	53,06 $\pm$ 1,33 <sup>b</sup>	55,71 $\pm$ 2,43 <sup>b</sup>
<b>AP</b>	61,76 $\pm$ 2,63 <sup>B</sup>	57,19 $\pm$ 4,04 <sup>a,bA,B</sup>	52,60 $\pm$ 2,47 <sup>aA</sup>	53,27 $\pm$ 2,55 <sup>bA</sup>	51,12 $\pm$ 2,21 <sup>a,bA</sup>

<b><math>L^*</math> – Chapéu – Lote 2</b>					
<b>Dias de Análise</b>					
	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>
<b>C</b>	77,51 $\pm$ 1,46 <sup>cA,B</sup>	78,61 $\pm$ 2,15 <sup>bB</sup>	74,12 $\pm$ 0,62 <sup>cA,B</sup>	74,74 $\pm$ 2,06 <sup>cA,B</sup>	73,25 $\pm$ 3,68 <sup>cA</sup>
<b>P</b>	62,69 $\pm$ 1,88 <sup>aB</sup>	61,55 $\pm$ 2,44 <sup>aB</sup>	59,31 $\pm$ 2,08 <sup>aB</sup>	52,71 $\pm$ 0,96 <sup>aA</sup>	53,88 $\pm$ 2,56 <sup>aA</sup>
<b>A</b>	66,94 $\pm$ 1,68 <sup>b</sup>	62,25 $\pm$ 4,38 <sup>a</sup>	65,14 $\pm$ 4,24 <sup>b</sup>	63,30 $\pm$ 2,48 <sup>b</sup>	62,78 $\pm$ 1,62 <sup>b</sup>
<b>AP</b>	67,42 $\pm$ 1,83 <sup>bB</sup>	64,92 $\pm$ 2,78 <sup>aA,B</sup>	64,05 $\pm$ 1,67 <sup>a,bA,B</sup>	60,60 $\pm$ 3,00 <sup>bA</sup>	62,14 $\pm$ 1,54 <sup>bA</sup>

<sup>a-d</sup> Média com letras diferentes indicadas em cada uma das colunas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

<sup>A-D</sup> Média com letras diferentes indicadas em cada uma das linhas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

Esta redução nos valores de  $L^*$  ao longo do tempo de armazenamento está de acordo com o obtido por Villaescusa & Gil (2003) e por Cortés *et al.* (2011), que constatarem um decréscimo na luminosidade de *Pleurotus ostreatus* com o decorrer do tempo de armazenamento. Contudo os valores medidos no dia inicial neste estudo, foram menores que os observados por outros autores (Villaescusa & Gil, 2003; Cortés *et al.*, 2011; Matser *et al.*, 2000b). Também é de salientar que a amostra C que foi estudada no lote 1 apresenta valores mais baixos de luminosidade em relação à amostra do lote 2, o que indica que os cogumelos do lote 1 eram substancialmente mais escuros

que os do lote 2, o que foi constatado visualmente, ou seja, o fator lote contribuiu claramente para esta variabilidade.

Quanto à amostra P, esta obteve resultados que oscilaram entre  $55,76 \pm 4,45$  e  $46,22 \pm 2,79$  no lote 1 e entre  $62,69 \pm 1,88$  e  $52,71 \pm 0,96$  no lote 2. Verifica-se que houve um decréscimo gradual da luminosidade nesta amostra, exceção feita ao registrado no dia 21 do lote 2 em que houve uma ligeira subida no valor de  $L^*$ , embora sem importância estatística relativamente ao dia anterior. O tempo de armazenamento foi um fator importante a ter em conta na luminosidade desta amostra, visto que se verificaram diferenças estatísticas entre alguns dos dias analisados em ambos os lotes.

O tempo de armazenamento, no entanto não foi um fator a ter em conta na luminosidade da amostra A, pois não existiram diferenças significativas entre os dias ensaiados. Estes resultados parecem indicar que o ácido cítrico proporcionou uma espécie de proteção sobre os cogumelos no que diz respeito à luminosidade, impedindo grandes variações desta ao longo do tempo.

Contudo nas amostras tratadas com ácido cítrico e tratadas a altas pressões (AP) registaram-se diferenças significativas nos valores de  $L^*$ , sendo que os valores vão de forma geral diminuindo com o passar do tempo. Mais uma vez se observou que os valores de luminosidade do lote 1 são inferiores aos registados para o lote 2, o que indica que os cogumelos do primeiro lote eram mais escuros que os do segundo.

O tratamento foi um fator que influenciou de sobremaneira a luminosidade, visto que se verificaram diferenças significativas em praticamente todos os dias de análise. Em ambos os lotes verificou-se um decréscimo nos valores de luminosidade em todos os tratamentos relativamente à amostra C (exceto ao dia 0 - lote 1), o que indica que todos os tratamentos tiveram um efeito na luminosidade, fazendo com que ocorresse um escurecimento das amostras.

O tratamento que alterou mais pronunciadamente a luminosidade foi o tratamento das altas pressões hidrostáticas principalmente no lote 2. A redução nos valores de  $L^*$  em alimentos pressurizados já tinha sido descrito e observado por outros autores em cogumelos (Matser *et al.*, 2000b) e em outras matrizes alimentares como melão (Wolbang *et al.*, 2008), nectarinas (Miguel-Pintado *et al.*, 2013), nabos (Clariana *et al.*, 2011) ou couves (Alvarez-Jubete *et al.*, 2014). Danos na textura e modificações nas propriedades estruturais podem ser relacionados com modificações na cor de frutas e vegetais (Oey *et al.*, 2008). Segundo MacDougall (2002), modificações na textura podem resultar em mudanças na natureza e extensão da luz espalhada internamente e a

distribuição de reflectância de superfície, que por sua vez pode produzir mudanças na luminosidade e brilho dos alimentos.

Matser *et al.* (2000b) também sujeitou cogumelos a um pré-tratamento de reidratação a vácuo com ácido cítrico e com sulfito de sódio. Constataram que os cogumelos reidratados tinham uma redução no valor de  $L^*$  em relação aos cogumelos frescos sem qualquer tratamento e que nas amostras reidratadas e pressurizadas, apesar de se continuar a registar uma diminuição em relação aos cogumelos frescos, o valor de  $L^*$  era superior ao observado para os cogumelos reidratados.

Já no presente estudo com as amostras A (ácido cítrico) e AP (ácido cítrico + HPP) pretendia-se tentar estudar o efeito conjunto do ácido cítrico com as altas pressões nos cogumelos e verificar se a adição deste agente pode ser benéfica. A redução dos valores de  $L^*$  da amostra A logo após o tratamento HPP está de acordo com o observado por aquele autor. Os valores medidos de  $L^*$  foram de 57,14 e de 66,94, no lote 1 e 2, respetivamente, valores que se aproximam (principalmente o do lote 2) dos obtidos pelo autor citado em cima, que obteve um valor de luminosidade na ordem dos 67,5. Quanto à amostra AP a melhoria da luminosidade em relação à amostra A, como a observada por Matser *et al.* (2000b) entre os cogumelos reidratados e os cogumelos reidratados e pressurizados não foi registada, facto suportado pela inexistência de diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) em qualquer dos dias de análise.

## **Pé**

Os valores de  $L^*$ , correspondentes à luminosidade das amostras, estão expressos na Tabela 8.

Os valores da amostra Controlo aqui registados parecem não seguir nenhuma tendência específica, não se observando diferenças significativas na amostra controlo do lote 1, ao passo que no lote 2 estas diferenças apesar de se verificarem são diminutas, só ocorrem ao dia 21 em relação aos restantes dias. Sendo assim estes resultados parecem indicar que o tempo de armazenamento não afetou o valor de luminosidade no pé dos cogumelos. Os valores máximos registados foram de  $80,63 \pm 3,96$  no lote 1 e  $86,29 \pm 5,92$  no lote 2. Por sua vez os valores mínimos foram  $78,33 \pm 8,87$  e  $71,00 \pm 5,61$  obtidos no lote 1 e lote 2, respetivamente.

**Tabela 8.** Valores médios  $\pm$  desvio padrão de Luminosidade ( $L^*$ ) determinados no pé para os diferentes tratamentos de conservação aos dias de análise estabelecidos.

<b><math>L^*</math> – Pé – Lote 1</b>					
<b>Dias de Análise</b>					
	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>
<b>C</b>	n.d	78,33 $\pm$ 8,87 <sup>b</sup>	79,10 $\pm$ 2,74 <sup>b</sup>	80,63 $\pm$ 3,96 <sup>c</sup>	79,91 $\pm$ 3,23 <sup>c</sup>
<b>P</b>	n.d	70,63 $\pm$ 2,06 <sup>a,bB</sup>	63,44 $\pm$ 3,62 <sup>aA,B</sup>	62,13 $\pm$ 1,03 <sup>aA</sup>	63,72 $\pm$ 1,91 <sup>a,bA</sup>
<b>A</b>	n.d	68,43 $\pm$ 4,37 <sup>a,b</sup>	74,96 $\pm$ 2,07 <sup>b</sup>	69,89 $\pm$ 0,84 <sup>b</sup>	68,72 $\pm$ 5,72 <sup>b</sup>
<b>AP</b>	n.d	66,54 $\pm$ 1,48 <sup>aB</sup>	63,60 $\pm$ 0,95 <sup>aB</sup>	62,04 $\pm$ 2,78 <sup>aA,B</sup>	60,96 $\pm$ 0,32 <sup>aA</sup>
<b><math>L^*</math> – Pé – Lote 2</b>					
<b>Dias de Análise</b>					
	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>
<b>C</b>	85,21 $\pm$ 2,07 <sup>cB</sup>	86,29 $\pm$ 5,92 <sup>bB</sup>	80,22 $\pm$ 5,62 <sup>bA,B</sup>	82,07 $\pm$ 2,99 <sup>cB</sup>	71,00 $\pm$ 5,61 <sup>bA</sup>
<b>P</b>	66,60 $\pm$ 4,02 <sup>a</sup>	63,98 $\pm$ 6,09 <sup>a</sup>	60,99 $\pm$ 3,86 <sup>a</sup>	58,51 $\pm$ 2,59 <sup>a</sup>	61,69 $\pm$ 2,86 <sup>a</sup>
<b>A</b>	72,68 $\pm$ 1,78 <sup>b</sup>	73,95 $\pm$ 5,94 <sup>a,b</sup>	71,28 $\pm$ 8,99 <sup>a,b</sup>	70,02 $\pm$ 8,83 <sup>a-c</sup>	70,65 $\pm$ 4,25 <sup>b</sup>
<b>AP</b>	73,54 $\pm$ 2,84 <sup>b</sup>	73,60 $\pm$ 7,17 <sup>a,b</sup>	68,98 $\pm$ 3,96 <sup>a,b</sup>	70,11 $\pm$ 1,96 <sup>b</sup>	69,38 $\pm$ 2,22 <sup>a,b</sup>

<sup>a-d</sup> Média com letras diferentes indicadas em cada uma das colunas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

<sup>A-D</sup> Média com letras diferentes indicadas em cada uma das linhas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

<sup>n.d</sup> Valor não determinado

Ao longo do tempo de armazenamento registaram-se diferenças estatísticas na amostra P entre o dia 3 e os dois últimos dias de análise (dia 14 e 21). No entanto no lote 2 os valores medidos não se alteraram significativamente ao longo do tempo. Este comportamento também se observou na amostra AP, onde no segundo lote analisado não se obtiveram diferenças estatísticas entre os diferentes dias, ao passo que no lote 1, somente um dia difere dos demais.

A amostra A teve um comportamento semelhante nos dois lotes não apresentando diferenças ao longo do tempo, o que indica que o tempo de armazenamento não foi um fator determinante na luminosidade desta amostra, assim como se constatou para os chapéus.

Tal como ocorrido nos valores de luminosidade dos chapéus, os diferentes tratamentos fizeram com que houvesse um escurecimento do pé dos cogumelos,

traduzido numa redução dos valores de  $L^*$ , embora ao contrário do observado no chapéu dos cogumelos, esta diminuição não foi estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) na maioria dos dias analisados tanto no primeiro, como no segundo lote, ou seja, a redução dos valores de luminosidade foi mais acentuada nos chapéus que nos pés dos cogumelos.

### 3.2.4.2 Coordenada $a^*$

#### Chapéu

A Tabela 9 mostra a evolução no tempo do valor de  $a^*$  do chapéu nas amostras C, P, A e AP.

**Tabela 9.** Valores do parâmetro  $a^*$  (média  $\pm$  desvio padrão) determinados no chapéu para os diferentes tratamentos de conservação aos dias de análise estabelecidos.

$a^*$ – Chapéu – Lote 1					
Dias de Análise					
	0	3	7	14	21
<b>C</b>	3,97 $\pm$ 0,41 <sup>b A,B</sup>	3,78 $\pm$ 0,42 <sup>c A</sup>	3,79 $\pm$ 0,56 <sup>A,B</sup>	4,82 $\pm$ 0,20 <sup>b B</sup>	5,59 $\pm$ 1,28 <sup>c A,B</sup>
<b>P</b>	3,08 $\pm$ 1,34 <sup>b</sup>	3,15 $\pm$ 0,74 <sup>b,c</sup>	3,41 $\pm$ 0,67	3,04 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup>	3,46 $\pm$ 0,58 <sup>b,c</sup>
<b>A</b>	2,17 $\pm$ 0,76 <sup>a,b A,B</sup>	2,47 $\pm$ 0,14 <sup>a,b B</sup>	2,24 $\pm$ 1,17 <sup>A,B</sup>	2,19 $\pm$ 0,76 <sup>a A,B</sup>	1,58 $\pm$ 0,15 <sup>a A</sup>
<b>AP</b>	2,14 $\pm$ 0,70 <sup>a</sup>	1,88 $\pm$ 0,84 <sup>a</sup>	2,19 $\pm$ 0,81	2,23 $\pm$ 0,72 <sup>a</sup>	2,17 $\pm$ 0,40 <sup>a,b</sup>
$a^*$ – Chapéu – Lote 2					
Dias de Análise					
	0	3	7	14	21
<b>C</b>	1,39 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>	0,47 $\pm$ 0,34	1,26 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup>	1,31 $\pm$ 0,80 <sup>b</sup>	1,54 $\pm$ 0,47 <sup>b</sup>
<b>P</b>	-0,47 $\pm$ 0,69 <sup>a A</sup>	0,10 $\pm$ 0,48 <sup>A</sup>	0,09 $\pm$ 0,30 <sup>a A</sup>	1,41 $\pm$ 0,17 <sup>b B</sup>	1,58 $\pm$ 0,46 <sup>b B</sup>
<b>A</b>	-0,17 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>	-0,42 $\pm$ 0,58	-0,10 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>	-0,61 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup>	-0,82 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>
<b>AP</b>	0,90 $\pm$ 0,27 <sup>b A,B</sup>	0,20 $\pm$ 0,24 <sup>A</sup>	0,40 $\pm$ 0,66 <sup>a,b A,B</sup>	1,34 $\pm$ 0,50 <sup>a B</sup>	0,87 $\pm$ 0,47 <sup>b A,B</sup>

<sup>a-d</sup> Média com letras diferentes indicadas em cada uma das colunas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

<sup>A-D</sup> Média com letras diferentes indicadas em cada uma das linhas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

Pôde-se observar que a amostra controlo do lote 1 apresentou valores de  $a^*$  superiores aos observados para os cogumelos pertencentes ao lote 2, o que indica que os cogumelos do lote 1 possuíam uma coloração mais avermelhada. O tempo de armazenamento influenciou de forma diferente o grupo de controlo dos dois lotes, visto que enquanto o lote 1 apresentou diferenças significativas relativamente aos diferentes dias, os cogumelos do lote 2 não viram os seus valores de  $a^*$  alterarem-se significativamente ao longo do tempo. Os valores de  $a^*$  obtidos nestes ensaios são superiores aos registados por outros autores como Villaescusa & Gil (2003), Matser *et al.* (2000b) e Cortés *et al.* (2011), sendo no entanto os valores de  $a^*$  obtidos no lote 2 mais próximos dos observados por estes autores.

A amostra P também apresentou diferentes comportamentos nos dois lotes no que diz respeito ao valor de  $a^*$ . No lote 1 não se verificaram quaisquer diferenças significativas neste parâmetro ao longo dos diferentes dias em que se realizaram análises. Por sua vez, no lote 2 existiram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), embora somente a partir do dia 14. Também aqui os valores do lote 1 mostraram-se superiores aos obtidos no segundo lote.

Na amostra A os valores variam entre  $2,47 \pm 0,14$  e entre  $1,58 \pm 0,15$  no primeiro lote e entre  $-0,10 \pm 0,24$  e  $-0,82 \pm 0,24$  no lote 2. Os cogumelos do lote 1 apresentaram diferenças significativas durante o tempo de armazenamento, mas somente entre os dias 3 e 21. No lote 2 o tempo de armazenamento não foi um fator a ter em conta, dado que não se observaram diferenças entre os diferentes dias.

O tempo de armazenamento também não foi um fator determinante nos valores de  $a^*$  da amostra AP do lote 1. No entanto, no lote 2 já se registaram diferenças estatísticas entre 2 dias de análise, o dia 3 e o dia 14. Nesta amostra, em ambos os lotes os valores máximos foram obtidos ao dia 14 ( $2,23 \pm 0,72$  - lote 1 e  $1,34 \pm 0,50$  - lote 2). Os valores mínimos foram de  $1,88 \pm 0,84$  e  $0,20 \pm 0,24$  no lote 1 e 2 respetivamente, ambos obtidos ao dia 3.

No lote 1, as diferenças significativas que existiram entre os tratamentos P, A e AP em relação ao controlo (C) foram-se acentuando ao longo do tempo de conservação. Já no lote 2 esta evolução não foi tão notória. De qualquer forma, ao dia 14, em ambos os lotes, registaram-se diferenças significativas entre os cogumelos C e os cogumelos tratados com ácido cítrico (A e AP), o que também se veio a verificar no pé destes cogumelos (Tabela 10).

Em termos gerais a tecnologia HPP por si só (amostra P) não provocou grandes alterações no valor de  $a^*$ . Somente aos dias 14 do lote 1 e dia 0 e o dia 7 do lote 2 se registaram diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Clariana *et al.* (2011) também não observaram em nabos tratados com altas pressões, quaisquer diferenças no parâmetro  $a^*$  quando comparados com o controlo.

## Pé

Os valores do parâmetro  $a^*$  medidos no pé dos cogumelos *Pleurotus ostreatus* estão indicados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Valores do parâmetro  $a^*$  (média  $\pm$  desvio padrão) determinados no pé para os diferentes tratamentos de conservação aos dias de análise estabelecidos.

$a^*$ – Pé – Lote 1					
Dias de Análise					
	0	3	7	14	21
C	n.d	0,70 $\pm$ 1,26 <sup>b</sup>	0,17 $\pm$ 0,41 <sup>b</sup>	-0,44 $\pm$ 0,52	0,60 $\pm$ 1,23 <sup>b</sup>
P	n.d	-2,01 $\pm$ 1,22 <sup>aA</sup>	-1,12 $\pm$ 0,75 <sup>aA,B</sup>	-0,21 $\pm$ 1,01 <sup>A,B</sup>	0,76 $\pm$ 0,39 <sup>bB</sup>
A	n.d	-1,46 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>	-1,13 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	-0,65 $\pm$ 0,70	-0,90 $\pm$ 0,86 <sup>a,b</sup>
AP	n.d	-1,54 $\pm$ 0,93 <sup>a</sup>	-1,85 $\pm$ 0,44 <sup>a</sup>	-1,03 $\pm$ 1,03	-1,11 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>
$a^*$ – Pé – Lote 2					
Dias de Análise					
	0	3	7	14	21
C	-1,29 $\pm$ 0,22 <sup>aA</sup>	-0,49 $\pm$ 0,53 <sup>aA,B</sup>	-0,49 $\pm$ 0,15 <sup>B</sup>	-0,10 $\pm$ 0,48 <sup>bA,B</sup>	1,69 $\pm$ 2,05 <sup>A,B</sup>
P	-2,96 $\pm$ 1,65 <sup>a,bA</sup>	-2,82 $\pm$ 0,87 <sup>bA</sup>	-2,02 $\pm$ 1,42 <sup>A,B</sup>	0,03 $\pm$ 0,86 <sup>bB</sup>	0,51 $\pm$ 1,07 <sup>B</sup>
A	-2,00 $\pm$ 0,34 <sup>a,b</sup>	-2,13 $\pm$ 0,43 <sup>b</sup>	-1,43 $\pm$ 0,54	-1,92 $\pm$ 0,95 <sup>a</sup>	-1,11 $\pm$ 0,54
AP	-2,23 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup>	-2,47 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	-1,56 $\pm$ 0,68	-1,76 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	-1,00 $\pm$ 1,47

<sup>a-d</sup> Média com letras diferentes indicadas em cada uma das colunas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

<sup>A-D</sup> Média com letras diferentes indicadas em cada uma das linhas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

<sup>n.d</sup> Valor não determinado

O fator lote influenciou os resultados. Ao longo do tempo de armazenamento somente no lote 2 é que existiram diferenças significativas entre os dias. Por outro lado

os cogumelos do lote 2 possuíram valores de  $a^*$  negativos, o que indica que estes cogumelos tinham uma coloração mais “verde” que os do lote 1. Isto também já se tinha constatado nos respetivos chapéus, ou seja, os cogumelos do lote 1 tinham uma tonalidade mais “avermelhada” que os do lote 2. À medida que os dias foram passando, os pés de ambos os lotes foram ficando de uma forma geral, com um valor de  $a^*$  progressivamente maior, o que indica que ao longo do tempo os cogumelos foram ficando com uma tonalidade mais avermelhada ( $a+$ ), em detrimento da cor verde ( $a-$ ).

Em ambos os lotes verificou-se que os tratamentos A e AP não implicam alterações significativas nestes parâmetros de cor no pé ao longo dos vinte e um dias. Ao longo deste período as diferenças significativas foram registadas apenas nos cogumelos controlo (C) (lote 2) e nos cogumelos com tratamento de altas pressões (P) (lote 1 e 2), entre os dias 7 ou 14 e os restantes dias considerados no estudo.

Por outro lado, comparando os diferentes tratamentos de conservação os cogumelos do grupo C apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) dos cogumelos tratados com ácido cítrico.

### 3.2.4.3 Coordenada $b^*$

#### Chapéu

A coordenada do espaço de cor CIELAB  $b^*$  na amostra Controlo apresentou uma tendência marcada por um gradual aumento deste valor nos cogumelos ao longo do tempo, ou seja, há um progressivo amarelecimento dos cogumelos (Tabela 11).

Cortés *et al.* (2011) e Villaescusa & Gil (2003) também registaram um aumento nos valores de  $b^*$  em cogumelos *Pleurotus*, sendo que este fenómeno acontece devido principalmente à ação da enzima tirosinase (Sapata *et al.*, 2009). No lote 1 a coordenada  $b^*$  não apresentou diferenças significativas até ao dia 7 e no lote 2 até ao dia 3. Em ambos os lotes os maiores valores foram registados no dia 21 ( $29,31 \pm 1,77$  – lote 1;  $24,43 \pm 2,35$  – lote 2).

Ao longo do tempo de armazenamento a amostra P apresentou comportamentos distintos nos dois lotes. Enquanto que no segundo lote o valor de  $b^*$  não se alterou significativamente ao longo dos dias, no lote 1 verificaram-se diferenças significativas entre o dia 3 e o dia 14 e 21, embora não haja diferenças entre estes dois últimos. O dia 0 e o dia 7 não apresentaram diferenças relativamente aos restantes dias (Tabela 11).

**Tabela 11.** Valores do parâmetro  $b^*$  (média  $\pm$  desvio padrão) determinados no chapéu para os diferentes tratamentos de conservação aos dias de análise estabelecidos.

<b><math>b^*</math> – Chapéu – Lote 1</b>					
<b>Dias de Análise</b>					
	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>
<b>C</b>	20,52 $\pm$ 1,26 <sup>b A</sup>	20,22 $\pm$ 0,40 <sup>b A</sup>	23,28 $\pm$ 4,66 <sup>a,b A-C</sup>	24,11 $\pm$ 0,69 <sup>c B</sup>	29,31 $\pm$ 1,77 <sup>c C</sup>
<b>P</b>	19,31 $\pm$ 0,76 <sup>b A,B</sup>	20,25 $\pm$ 0,83 <sup>b B</sup>	19,10 $\pm$ 0,69 <sup>b A,B</sup>	17,95 $\pm$ 1,02 <sup>b A</sup>	17,62 $\pm$ 0,69 <sup>b A</sup>
<b>A</b>	15,55 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	14,68 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	14,72 $\pm$ 0,78 <sup>a</sup>	14,55 $\pm$ 1,25 <sup>a</sup>	15,56 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>
<b>AP</b>	13,34 $\pm$ 1,55 <sup>a</sup>	13,62 $\pm$ 1,07 <sup>a</sup>	12,35 $\pm$ 1,03 <sup>a</sup>	13,95 $\pm$ 1,30 <sup>a</sup>	14,28 $\pm$ 0,78 <sup>a</sup>

<b><math>b^*</math> – Chapéu – Lote 2</b>					
<b>Dias de Análise</b>					
	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>
<b>C</b>	17,77 $\pm$ 0,85 <sup>b A</sup>	18,89 $\pm$ 0,80 <sup>b A</sup>	22,21 $\pm$ 0,80 <sup>b B</sup>	23,66 $\pm$ 1,79 <sup>c B</sup>	24,43 $\pm$ 2,35 <sup>b B</sup>
<b>P</b>	20,50 $\pm$ 0,65 <sup>c</sup>	21,37 $\pm$ 0,59 <sup>c</sup>	21,70 $\pm$ 0,54 <sup>b</sup>	20,42 $\pm$ 0,87 <sup>b</sup>	21,10 $\pm$ 1,18 <sup>b</sup>
<b>A</b>	15,29 $\pm$ 0,91 <sup>a</sup>	13,34 $\pm$ 1,00 <sup>a</sup>	14,81 $\pm$ 1,18 <sup>a</sup>	14,17 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	13,70 $\pm$ 1,14 <sup>a</sup>
<b>AP</b>	15,23 $\pm$ 0,18 <sup>a B</sup>	12,77 $\pm$ 0,31 <sup>a A</sup>	13,95 $\pm$ 1,66 <sup>a A,B</sup>	15,83 $\pm$ 1,26 <sup>a A,B</sup>	15,79 $\pm$ 1,58 <sup>a A,B</sup>

<sup>a-d</sup> Média com letras diferentes indicadas em cada uma das colunas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

<sup>A-D</sup> Média com letras diferentes indicadas em cada uma das linhas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

No que toca aos resultados da amostra A verificou-se que esta amostra não apresentou diferenças ao longo dos dias em ambos os lotes. Estes resultados dão indicação que o ácido cítrico tem um efeito protetor ao longo do tempo de armazenamento no que toca ao valor de  $b^*$ , visto que o ácido cítrico tem um efeito antioxidante nos alimentos. No lote 1 o valor máximo observado foi de  $15,56 \pm 0,68$  e o valor mínimo de  $14,55 \pm 1,25$ , ao passo que no lote 2 estes valores cifraram-se em  $15,29 \pm 0,91$  e  $13,34 \pm 1,00$  como valores máximo e mínimo, respetivamente.

A amostra AP não apresentou nenhuma tendência evidente nos resultados e não se verificaram diferenças significativas em nenhum dos dias em que se efetuaram as análises relativamente ao lote 1. Quanto ao lote 2 apenas o dia 0 difere significativamente do dia 3.

Comparando os diferentes tratamentos verificou-se que em todos os dias analisados em ambos os lotes não se observaram diferenças entre as amostras A e AP, as quais

sempre diferiram de forma estatisticamente significativas do controlo. A redução nos valores da amostra A, indicando uma redução na cor amarela, vai de encontro ao obtido por Matser *et al.* (2000b) em que os cogumelos reidratados com ácido cítrico e sulfito de sódio tiveram resultados menores de  $b^*$ ; no entanto, os cogumelos reidratados e pressurizados obtiveram valores de  $b^*$  maiores do que os cogumelos reidratados, ao contrário do que sucedeu neste estudo.

Quanto à amostra P, processada apenas com alta pressão, foi a que apresentou menos diferenças relativamente à amostra controlo. No lote 1 apenas a partir do dia 14 se observaram diferenças no valor de  $b^*$  entre as duas amostras. No entanto no lote 2 nos dois primeiros dias registaram-se um aumento do valor de  $b^*$  da amostra pressurizada (P) em relação ao controlo. Matser *et al.* (2000b) também observou um aumento no valor de  $b^*$  logo após o tratamento de cogumelos *Agaricus bisporus* com altas pressões. Este aumento pode, segundo este autor, ser resultado da ação da polifenoxidase, que derivado ao aumento da permeabilidade da membrana celular causado pelas altas pressões, tenha levado a que houvesse interação entre a polifenoxidase e os fenóis e consequente aumento do amarelecimento da amostra (Matser *et al.*, 2000b).

## **Pé**

A Tabela 12 diz respeito aos valores de  $b^*$  observados ao longo do tempo de armazenamento no pé dos cogumelos *Pleurotus ostreatus* sujeitos aos diferentes tratamentos.

Ao analisar esta tabela constatou-se que o tempo de armazenamento não foi um fator determinante no valor de  $b^*$  do pé em todos os tratamentos, visto que somente a amostra controlo do lote 2 apresentou diferenças ao longo do tempo de armazenamento e somente no dia 21 é que existiu diferença significativa.

No pé verificou-se que os tratamentos não afetaram significativamente o valor de  $b^*$ , dado que em todos os dias de análise o valor de  $b^*$  observado no controlo foi semelhante ao valor de algum dos tratamentos.

**Tabela 12.** Valores do parâmetro  $b^*$  (média  $\pm$  desvio padrão) determinados no pé para os diferentes tratamentos de conservação aos dias de análise estabelecidos.

<b><math>b^*</math> – Pé – Lote 1</b>					
<b>Dias de Análise</b>					
	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>
<b>C</b>	n.d	16,94 $\pm$ 4,86 <sup>a,b</sup>	20,49 $\pm$ 3,56 <sup>b</sup>	20,60 $\pm$ 2,25 <sup>b,c</sup>	21,20 $\pm$ 2,64 <sup>b</sup>
<b>P</b>	n.d	24,53 $\pm$ 2,52 <sup>b</sup>	24,17 $\pm$ 0,83 <sup>b</sup>	25,19 $\pm$ 2,04 <sup>c</sup>	27,24 $\pm$ 1,04 <sup>c</sup>
<b>A</b>	n.d	14,29 $\pm$ 4,86 <sup>a,b</sup>	16,45 $\pm$ 4,11 <sup>a,b</sup>	15,71 $\pm$ 4,71 <sup>a,b</sup>	26,36 $\pm$ 4,50 <sup>a,b</sup>
<b>AP</b>	n.d	13,25 $\pm$ 7,93 <sup>a</sup>	10,12 $\pm$ 2,04 <sup>a</sup>	13,67 $\pm$ 3,02 <sup>a</sup>	13,38 $\pm$ 0,82 <sup>a</sup>

<b><math>b^*</math> – Pé – Lote 2</b>					
<b>Dias de Análise</b>					
	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>
<b>C</b>	13,89 $\pm$ 3,34 <sup>a A</sup>	12,71 $\pm$ 3,69 <sup>a A</sup>	17,03 $\pm$ 3,37 <sup>a,b A</sup>	15,57 $\pm$ 3,33 <sup>a,b A</sup>	26,18 $\pm$ 2,09 <sup>b B</sup>
<b>P</b>	21,71 $\pm$ 2,86 <sup>b</sup>	23,33 $\pm$ 3,58 <sup>b</sup>	20,18 $\pm$ 2,96 <sup>b</sup>	22,41 $\pm$ 3,06 <sup>b</sup>	24,10 $\pm$ 2,00 <sup>b</sup>
<b>A</b>	11,64 $\pm$ 1,01 <sup>a</sup>	12,85 $\pm$ 2,02 <sup>a</sup>	12,41 $\pm$ 3,82 <sup>a</sup>	12,42 $\pm$ 5,86 <sup>a</sup>	15,85 $\pm$ 2,11 <sup>a</sup>
<b>AP</b>	11,67 $\pm$ 1,81 <sup>a</sup>	11,89 $\pm$ 1,54 <sup>a</sup>	10,82 $\pm$ 1,81 <sup>a</sup>	11,13 $\pm$ 2,09 <sup>a</sup>	13,72 $\pm$ 4,54 <sup>a</sup>

<sup>a-d</sup> Média com letras diferentes indicadas em cada uma das colunas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

<sup>A-D</sup> Média com letras diferentes indicadas em cada uma das linhas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

<sup>n.d</sup> Valor não determinado

No lote 1 o tratamento que teve um maior efeito foi o tratamento AP devido ao facto que, somente no dia 3 não se registou diferenças estatísticas entre o controlo e esta amostra. No lote 2, por sua vez, foi o tratamento P que obteve um efeito mais pronunciado, com os dois primeiros dias a mostrarem diferenças entre este tratamento e a amostra C.

Da mesma forma que o observado para os chapéus, nos pés as amostras A e AP não exibem diferenças estatísticas entre si, em nenhum dos lotes.

### 3.2.4.4 Variação Total de Cor ( $\Delta E^*$ )

#### Chapéu

O parâmetro da Variação Total de Cor ( $\Delta E^*$ ) foi usado para expressar o grau de alteração da cor ideal induzidas pelos diferentes processamentos (C, P, A, AP) e como a cor evoluiu ao longo do tempo nos diferentes grupos.

No que diz respeito ao chapéu os resultados de  $\Delta E^*$  estão discriminados na Tabela 13.

**Tabela 13.** Valores do parâmetro  $\Delta E^*$  (média  $\pm$  desvio padrão) determinados no chapéu para os diferentes tratamentos de conservação aos dias de análise estabelecidos.

$\Delta E^*$ – Chapéu – Lote 1					
Dias de Análise					
	0	3	7	14	21
C	-	3,12 $\pm$ 0,67 <sup>aA</sup>	4,39 $\pm$ 1,47 <sup>aA</sup>	6,03 $\pm$ 1,46 <sup>aA</sup>	10,52 $\pm$ 1,94 <sup>a,bB</sup>
P	6,28 $\pm$ 3,47 <sup>A</sup>	5,32 $\pm$ 0,78 <sup>aA</sup>	10,57 $\pm$ 2,29 <sup>bA,B</sup>	13,69 $\pm$ 2,91 <sup>bB</sup>	14,93 $\pm$ 2,74 <sup>bB</sup>
A	9,16 $\pm$ 2,14	10,16 $\pm$ 2,11 <sup>b</sup>	11,03 $\pm$ 2,34 <sup>b</sup>	10,56 $\pm$ 0,71 <sup>b</sup>	8,02 $\pm$ 1,74 <sup>a</sup>
AP	8,45 $\pm$ 1,18 <sup>A</sup>	9,04 $\pm$ 1,49 <sup>bA,B</sup>	12,25 $\pm$ 0,92 <sup>bC</sup>	10,72 $\pm$ 1,11 <sup>bA-C</sup>	11,87 $\pm$ 2,06 <sup>a,bB,C</sup>
$\Delta E^*$ – Chapéu – Lote 2					
Dias de Análise					
	0	3	7	14	21
C	-	4,08 $\pm$ 1,40 <sup>aA</sup>	6,26 $\pm$ 0,45 <sup>aA,B</sup>	7,20 $\pm$ 2,15 <sup>aA,B</sup>	9,21 $\pm$ 2,04 <sup>aB</sup>
P	15,29 $\pm$ 1,76 <sup>bA</sup>	16,48 $\pm$ 2,31 <sup>bA</sup>	18,80 $\pm$ 1,94 <sup>cA,B</sup>	24,80 $\pm$ 0,96 <sup>cC</sup>	23,43 $\pm$ 3,59 <sup>cB,C</sup>
A	11,08 $\pm$ 1,58 <sup>a</sup>	16,10 $\pm$ 4,24 <sup>b</sup>	12,90 $\pm$ 4,28 <sup>b</sup>	14,84 $\pm$ 2,30 <sup>b</sup>	15,56 $\pm$ 1,49 <sup>b</sup>
AP	10,49 $\pm$ 1,73 <sup>aA</sup>	13,72 $\pm$ 2,36 <sup>bA,B</sup>	14,11 $\pm$ 1,90 <sup>b,cA,B</sup>	17,11 $\pm$ 3,05 <sup>bB</sup>	15,60 $\pm$ 1,58 <sup>bB</sup>

<sup>a-d</sup> Média com letras diferentes indicadas em cada uma das colunas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

<sup>A-D</sup> Média com letras diferentes indicadas em cada uma das linhas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

Constatou-se que o valor de  $\Delta E^*$  vai na generalidade aumentando ao longo do tempo de armazenamento, ainda que nos tratamentos com ácido estes aumentos não tenha tido relevância estatística em ambos os lotes.

O valor menor de  $\Delta E^*$  para a amostra C foi obtida ao dia 3 em ambos os lotes ( $3,12 \pm 0,67$  – lote 1;  $4,08 \pm 1,40$  – lote 2), enquanto o valor maior foi obtido no dia 21 nos dois lotes ( $10,52 \pm 1,94$  – lote 1;  $9,21 \pm 2,04$  – lote 2), o que mostra que os valores de  $\Delta E^*$  são sempre crescentes ao longo dos 21 dias. Estes resultados vão de encontro aos resultados obtidos por Azevedo *et al.* (2009), que constataram que em *Pleurotus ostreatus* frescos o valor de  $\Delta E^*$  apresentou aumentos ao longo do tempo de armazenamento.

Para a amostra P, tendo em conta a análise estatística, pôde-se observar que em ambos lotes não houve diferenças significativas entre os valores de  $\Delta E^*$  obtidos no dia 0 e os valores medidos nos dias 3 e 7, o mesmo se passando entre o dia 14 e o dia 21. Os valores de  $\Delta E^*$  nesta amostra variaram entre  $14,93 \pm 2,74$  e  $5,32 \pm 0,78$  no lote 1, e entre  $24,80 \pm 0,96$  e  $15,19 \pm 1,76$  obtidos no lote 2, mostrando a influência do lote nestes resultados.

Olhando os resultados da ANOVA nota-se que os cogumelos imersos no ácido (A) não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo (Tabela 13) em ambos lotes. Estes resultados mostram que o ácido cítrico ajudou a preservar a cor dos cogumelos ao longo do tempo, protegendo-os de grandes alterações e modificações na sua cor inicial.

Quanto à amostra AP, os resultados diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) ao longo dos diferentes dias de armazenamento em ambos lotes. Os valores mais elevados de  $\Delta E^*$  registados nesta amostra cifraram-se em  $12,25 \pm 0,92$  (dia 7) no lote 1 e para o lote 2 em  $17,11 \pm 3,05$  (dia 14). Os valores mais baixos foram obtidos no dia 0.

Em termos de diferenças entre o controlo e os restantes tratamentos, todos os dias o controlo diferiu das restantes amostras, excepto no dia 21 no lote 1.

A amostra somente pressurizada (P) foi na maioria dos dias a que apresentou valores superiores de  $\Delta E^*$ , o que pode indicar que o tratamento unicamente com as altas pressões foi o que alterou mais a cor dos cogumelos em relação à sua cor inicial.

A amostra controlo foi a que apresentou menor variação de cor em relação à cor original dos cogumelos (controlo dia 0).

Tanto num lote como no outro as amostras A e AP não manifestaram diferenças significativas entre si ao longo do tempo de armazenamento.

## Pé

Relativamente aos aspetos da cor observados no pé os resultados da Variação Total de Cor ( $\Delta E^*$ ) estão descritos na Tabela 14.

**Tabela 14.** Valores do parâmetro  $\Delta E^*$  (média  $\pm$  desvio padrão) determinados no pé para os diferentes tratamentos de conservação aos dias de análise estabelecidos.

$\Delta E^*$ – Pé – Lote 1					
	Dias de Análise				
	0	3	7	14	21
<b>C</b>	n.d	-	5,05 $\pm$ 2,07 <sup>a</sup>	5,92 $\pm$ 0,97 <sup>a</sup>	5,88 $\pm$ 0,70 <sup>a</sup>
<b>P</b>	n.d	11,43 $\pm$ 1,91 <sup>A</sup>	16,74 $\pm$ 3,28 <sup>b A,B</sup>	18,28 $\pm$ 1,59 <sup>c B</sup>	17,95 $\pm$ 1,23 <sup>b B</sup>
<b>A</b>	n.d	11,62 $\pm$ 2,77	5,48 $\pm$ 1,10 <sup>a</sup>	9,54 $\pm$ 1,30 <sup>b</sup>	10,69 $\pm$ 5,32 <sup>a,b</sup>
<b>AP</b>	n.d	14,23 $\pm$ 2,58	16,49 $\pm$ 1,63 <sup>b</sup>	17,00 $\pm$ 2,17 <sup>c</sup>	17,84 $\pm$ 0,48 <sup>b</sup>

$\Delta E^*$ – Pé – Lote 2					
	Dias de Análise				
	0	3	7	14	21
<b>C</b>	-	6,12 $\pm$ 1,79 <sup>a A</sup>	6,89 $\pm$ 5,19 <sup>a A</sup>	4,41 $\pm$ 3,62 <sup>a A</sup>	19,14 $\pm$ 5,84 <sup>a,b B</sup>
<b>P</b>	20,54 $\pm$ 3,41 <sup>b A</sup>	23,84 $\pm$ 3,74 <sup>b AB</sup>	25,24 $\pm$ 3,49 <sup>b A,B</sup>	28,20 $\pm$ 2,49 <sup>c B</sup>	25,86 $\pm$ 1,63 <sup>b A,B</sup>
<b>A</b>	12,80 $\pm$ 1,59 <sup>a</sup>	11,46 $\pm$ 5,99 <sup>a</sup>	14,29 $\pm$ 9,23 <sup>a,b</sup>	15,80 $\pm$ 9,55 <sup>a-c</sup>	14,85 $\pm$ 4,10 <sup>a</sup>
<b>AP</b>	12,05 $\pm$ 2,70 <sup>a</sup>	11,97 $\pm$ 7,04 <sup>a</sup>	16,61 $\pm$ 3,92 <sup>a,b</sup>	15,47 $\pm$ 1,97 <sup>b</sup>	16,41 $\pm$ 1,70 <sup>a</sup>

<sup>a-d</sup> Média com letras diferentes indicadas em cada uma das colunas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

<sup>A-D</sup> Média com letras diferentes indicadas em cada uma das linhas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

<sup>n.d</sup> Valor não determinado

Consultando esta tabela constatou-se que no lote 1 não há diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) no controlo ao longo dos diferentes dias, sendo que neste lote ao dia 14 se verificou o valor de  $\Delta E^*$  mais elevado (5,92  $\pm$  0,97), ao passo que o valor mais diminuto, que se fixou em 5,05  $\pm$  2,07 (dia 7). Para o lote 2 os valores de  $\Delta E^*$  oscilaram entre 4,41  $\pm$  3,62 e 19,14  $\pm$  5,84, registados aos dias 14 e 21, respetivamente. No que diz respeito à análise estatística determinada pela ANOVA neste lote verificou-se que apenas o dia 21 diferiu dos restantes.

O valor mais reduzido de  $\Delta E^*$  da amostra P foi de  $11,43 \pm 1,91$  para o lote 1 e de  $20,54 \pm 3,41$  no lote 2. Quanto aos valores mais altos, estes foram observados em ambos os lotes ao dia 14 ( $18,28 \pm 1,59$  – lote 1;  $28,20 \pm 2,49$  – lote 2). Até ao dia 14 os valores de  $\Delta E^*$  vão aumentando, ao passo que no dia de análise seguinte (dia 21) este valor já sofreu uma redução, embora esta redução não seja estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Nesta amostra foram verificadas diferenças significativas ao longo do tempo de conservação.

Quanto às amostras A e AP em nenhum dos lotes existiram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) ao longo da conservação, tal como já se tinha verificado no chapéu.

Somente no dia 14 do lote 1 é que o controlo diferiu completamente dos restantes tratamentos. O tratamento que difere estatisticamente ( $p < 0,05$ ) em mais dias do controlo é o tratamento com altas pressões (amostra P). Esta amostra à semelhança do que aconteceu no chapéu foi a que provocou maior variação na cor inicial dos cogumelos, visto ter sido sempre (com exceção do dia 3 - lote 1) a que apresentou valores maiores de  $\Delta E^*$ .

No lote 1 as amostras P e AP nunca diferiram estatisticamente entre si ao longo do armazenamento, no entanto, no lote 2, a amostra AP apresentou mais semelhanças com a amostra A, uma vez que estas duas amostras em nenhum dia deste lote apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

### 3.2.5 Textura

Devido ao facto de nos cogumelos *Pleurotus ostreatus* se poder consumir tanto a parte do chapéu, como do pé, optou-se por se fazer a determinação da textura em separado no chapéu e no pé.

A ANOVA Multifatorial (Tabela 15) foi usada para determinar tanto o efeito isolado dos diferentes fatores, como as interações entre estes nos valores de Textura medidos no chapéu e no pé. Os resultados da Tabela 15 mostram que todos os fatores, bem como a interação entre eles tiveram influência nos valores de textura medidos no Chapéu, embora com graus diferentes de significância. No que toca à textura medida nos pés dos cogumelos analisados, o Lote, a interação do Lote com o Tratamento, bem como a interação entre os três fatores não foram significativos.

**Tabela 15.** Resultado da ANOVA a três fatores para verificar a existência de efeitos significativos em cada fator e interação entre eles para a Textura.

	Fatores			Interação			
	Lote (Fator 1)	Tratamento (Fator 2)	Dia (Fator 3)	F1 × F2	F1 × F3	F2 × F3	F1 × F2 × F3
<b>Textura Chapéu</b>	***	***	***	*	***	***	*
<b>Textura Pé</b>	n.s.	***	***	n.s.	***	**	n.s.

n.s.- não significante;

\*\*  $p \leq 0,01$  – correlação muito significativa;

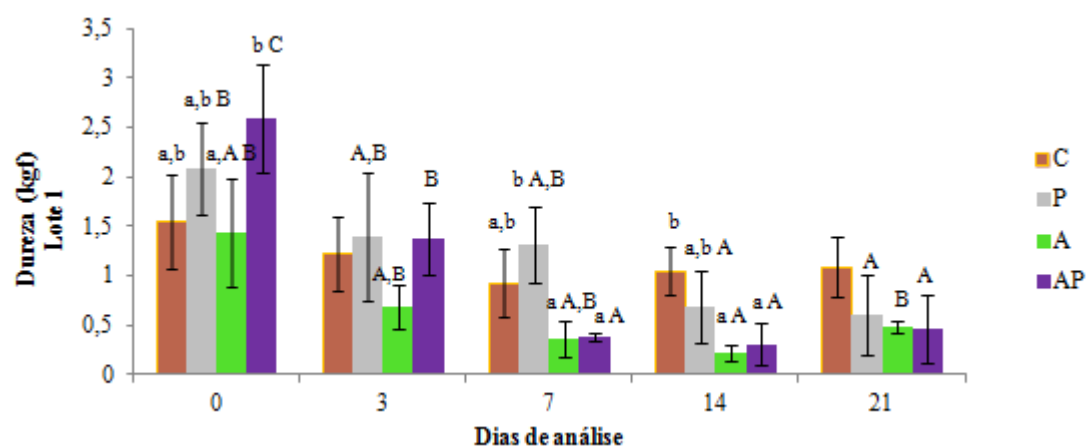
\*  $p \leq 0,05$  – correlação significativa;

\*\*\*  $p \leq 0,001$  – correlação extremamente significativa.

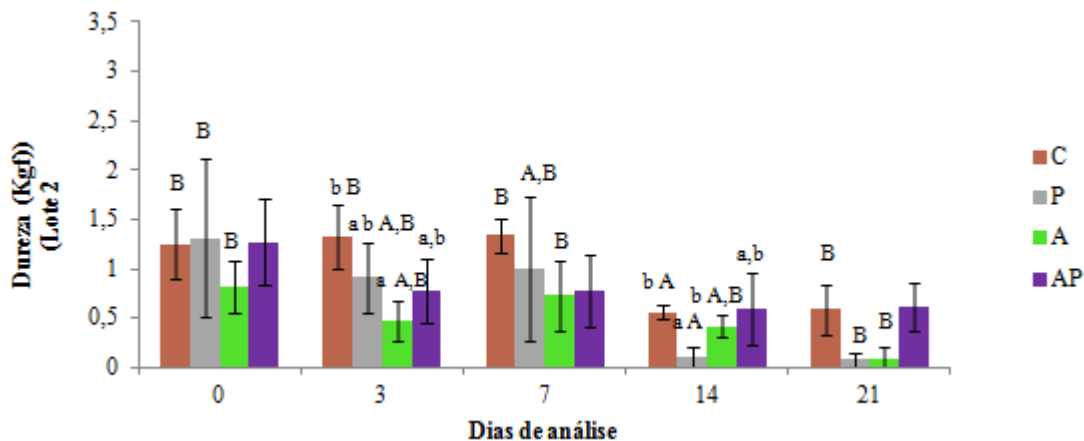
### Chapéu

Os resultados da determinação da Textura no chapéu dos cogumelos *Pleurotus ostreatus* sujeitos aos quatro tipos diferentes de tratamentos estão sumariados nas Figuras 18 e 19.

A dureza da amostra de controlo variou entre 0,93 kgf  $\pm$  0,35 (dia 7) e 1,55 kgf  $\pm$  0,47 (dia 0) e entre 0,56 kgf  $\pm$  0,07 (dia 14) e 1,34 kgf  $\pm$  0,17 (dia7), para os lotes 1 e 2, respetivamente (material suplementar apresentado na Tabela 20 do Anexo II). Em termos de análise estatística o primeiro lote não apresentou diferenças significativas entre os diferentes dias de análise, enquanto que no lote 2 não existiram diferença entre os resultados ao dia 0, 3 e 7 e também não se verificaram diferenças entre o dia 14 e o dia 21. No entanto observaram-se diferenças estatísticas entre estes dois conjuntos de dias.



**Figura 18.** Valores de dureza determinados no chapéu para os diferentes tratamentos de conservação aos dias analisados (Lote 1).



**Figura 19.** Valores de dureza determinados no chapéu para os diferentes tratamentos de conservação aos dias analisados (Lote 2).

De acordo com Villaescusa & Gil (2003) as principais causas da degradação pós-colheita de cogumelos *Pleurotus ostreatus* são mudanças na cor (devido à ocorrência de reações de acastanhamento enzimático) e alterações na textura, tornando os cogumelos macios e esponjosos. Estas alterações de textura ocorrem devido ao crescimento celular e a fenômenos de migração de água. Os resultados obtidos neste estudo não corroboram as afirmações feitas por este autores, que detetaram grandes perdas de textura em cogumelos armazenados a uma temperatura de conservação de 4°C durante 7 dias. No entanto estes mesmos autores não observaram diferenças significativas nos valores de textura de cogumelos ao longo de sete dias mantidos a 0°C, o que vai de encontro ao obtido neste estudo.

Quanto à amostra P os dias 14 e 21 não apresentaram diferenças significativas entre si ( $p > 0,05$ ), mas manifestaram diferenças em relação ao dia 0. Por sua vez os dias 3 e 7 têm semelhanças em termos de dureza com o dia 0 e também com o dia 14 e 21, semelhança esta exibida pela inexistência de diferenças estatísticas entre estes dias e os restantes. Em ambos os lotes há um decréscimo continuado do valor medido de dureza para esta amostra, excetuando a análise do dia 7 do lote 2, onde se obteve um valor superior ao obtido no dia 3.

A amostra A por sua vez apresentou valores mais baixos de dureza. Em termos estatísticas o dia 0 do lote 1 exibiu diferenças ( $p < 0,05$ ) em relação aos dias 14 e 21, embora estes não diferiram entre si. O dia 3 e 7 são uma espécie de dias intermédios, não apresentando diferenças significativas para qualquer um dos outros dias de análise.

Relativamente ao lote 2, o dia 21 mostrou diferenças estatísticas em relação ao dia 0 e o dia 7, contudo estes dois dias não diferiram entre si. É possível verificar que, à exceção do dia 14 do segundo lote, esta amostra é a que apresentou valores de dureza mais reduzidos, o que leva a concluir que o ácido cítrico é um fator que afeta a dureza dos cogumelos tornando-os menos duros.

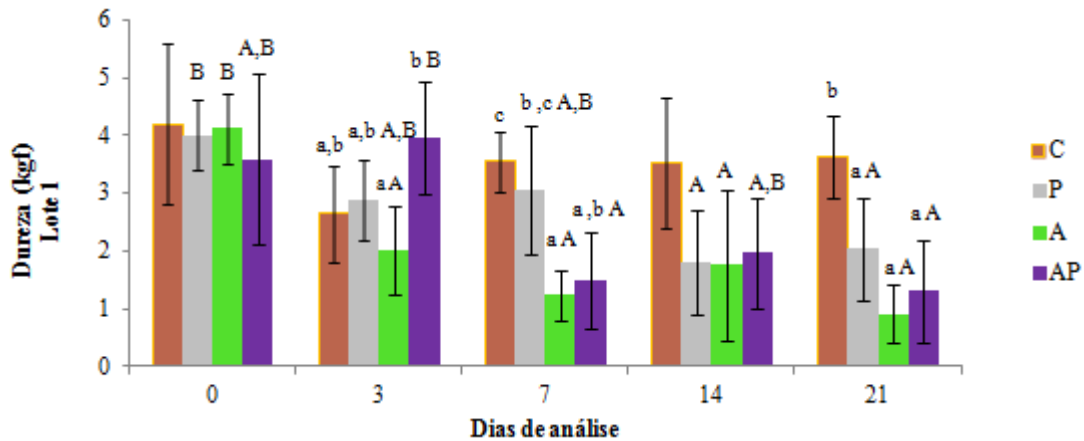
Além disso também se verificou que os valores vêm continuamente a reduzir ao longo dos dias, exceção feita ao dia 21 no lote 1 e ao dia 7 no lote 2. Os valores mais elevados foram observados ao dia 0 em ambos os lotes (1,43 kgf  $\pm$  0,55 – lote 1; 0,82 kgf  $\pm$  0,26 – lote 2), enquanto que os valores mais reduzidos registaram-se no dia 14 do lote 1 e ao dia 21 do lote 2.

Os valores de dureza observados para a amostra AP não variaram ao longo dos diferentes dias de armazenamento no lote 2, contudo isso não se verificou no lote 1, onde o dia 0, onde se registou o valor mais elevado (2,60 kgf  $\pm$  0,55), difere estatisticamente dos restantes dias. O dia 3 também apresentou diferenças relativamente aos outros dias, ao passo que o dia 7, 14 (dia com valor mais baixo - 0,31 kgf  $\pm$  0,21) e 21 apesar de não diferirem entre si, apresentando em termos estatísticos diferenças com os demais.

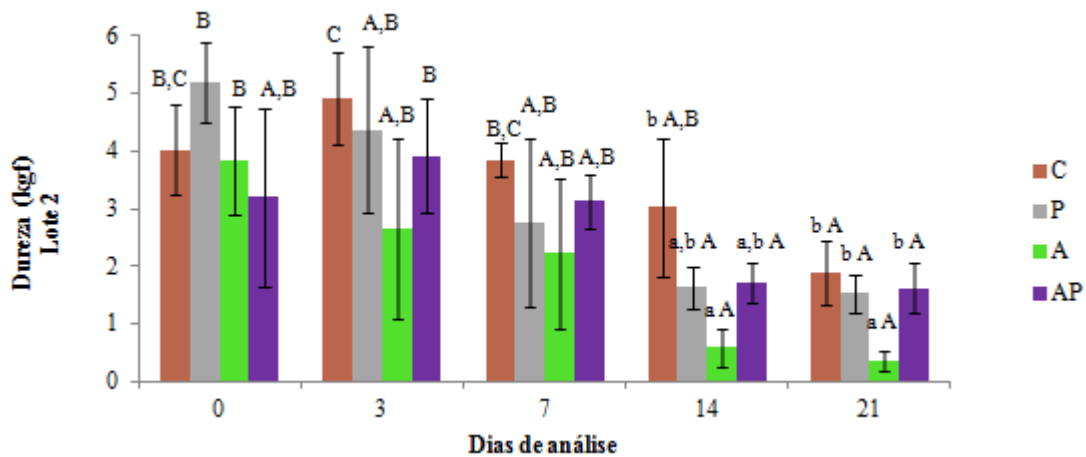
O tratamento de altas pressões (P) não afetou a dureza dos cogumelos relativamente ao controlo, visto que somente ao dia 14 do segundo lote é que se verificaram diferenças significativas entre as duas amostras.

## **Pé**

Os valores de dureza medidos no pé dos cogumelos *Pleurotus ostreatus* sujeitos aos diferentes tratamentos estão descritos nas Figuras 20 e 21 (material suplementar apresentado na Tabela 21 do Anexo II).



**Figura 20.** Valores de dureza determinados no pé para os diferentes tratamentos de conservação aos dias analisados (Lote 1).



**Figura 21.** Valores de dureza determinados no pé para os diferentes tratamentos de conservação aos dias analisados (Lote 2).

No lote 1 não se verificaram diferenças na dureza do pé dos cogumelos da amostra Controlo. Já no lote 2 o tempo de armazenamento foi um fator que influenciou a dureza desta amostra, facto que é comprovado pelas diferenças significativas entre os diferentes dias de análise. No lote 1 o controlo teve um valor máximo de dureza observado ao dia 0, enquanto que o valor mínimo foi obtido ao dia 3. No lote 2 obtiveram-se o valor máximo e mínimo ao dia 3 e 21, respetivamente.

Quanto à amostra P esta registou, no lote 1 valores compreendidos entre  $4,01 \pm 0,62$  e  $1,80 \pm 0,91$  e no lote 2 a dureza no pé dos cogumelos variou entre  $5,19 \pm 0,71$  e  $1,53 \pm 0,32$ . Em ambos os lotes se verificaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo de armazenamento.

Estas diferenças entre os diferentes dias em que se realizaram as análises também se fizeram sentir na amostra A. Os valores mostram uma tendência de redução da dureza ao longo do tempo de armazenamento nesta amostra, com exceção do dia 14 correspondente ao lote 1, sendo que em ambos os lotes os valores máximos de dureza foram medidos no primeiro dia de análise ( $4,12 \pm 0,62$  – lote 1;  $3,82 \pm 0,94$  – lote 2) e os valores mais baixos foram obtidos no dia 21 ( $0,91 \pm 0,50$  – lote 1;  $0,37 \pm 0,17$ ).

Por sua vez na amostra AP foram também observadas diferenças significativas ao longo do tempo de armazenamento. No primeiro lote não parece haver nenhuma tendência marcada nos resultados, ao contrário do que se passa no lote 2, em que à exceção do aumento registado no dia 3 em relação ao dia 0, a partir do dia 3 existe uma diminuição gradual e progressiva dos valores de dureza registado no pé dos cogumelos da amostra AP.

Relativamente a diferenças entre os tratamentos, estas não se fizeram sentir logo após o tratamento (dia 0) e no lote 2 estas diferenças estiveram ausentes só se verificaram nos últimos dois dias de análise, o que pode indicar que a dureza não foi muito afetada pelos tratamentos.

Ao contrário do que seria expectável, a amostra pressurizada não teve grandes alterações de dureza em relação ao Controlo, só se verificando diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) ao dia 21 do lote 1.

A amostra que mais se destacou do controlo foi a amostra A, visto ter sido onde em mais dias se registaram diferenças significativas para a amostra C.

### 3.1 Indicadores microbiológicos da qualidade de *Pleurotus ostreatus*

Durante a colheita, limpeza, armazenamento e comercialização de cogumelos frescos, se não existirem Boas Práticas de Higiene, este produto pode ser contaminado por uma grande variedade de microrganismos. Os cogumelos comestíveis são um produto que carece de uma legislação específica no que toca aos critérios microbiológicos, onde estejam descritos os limites máximos de microrganismos permitidos para que este produto possa ser considerado seguro para o consumidor.

Tendo em conta o descrito no documento referente aos fungos comestíveis e produtos derivados de fungos do *Codex Alimentarius* (Codex Stan 38-1981), os cogumelos frescos devem “ser manuseados de acordo com o descrito e aconselhado no Código Internacional Recomendado de Práticas - Princípios Gerais de Higiene dos Alimentos do *Codex Alimentarius* (CAC/RCP 1-1969)”. Estes “devem estar livres de microrganismos em quantidades que possam representar um perigo para a saúde” e “não devem conter qualquer substância proveniente de microrganismos em quantidades que possam representar um perigo para a saúde”, embora não esteja especificado qualquer limite ou quantidade máxima de microrganismos ou de compostos produzidos por estes.

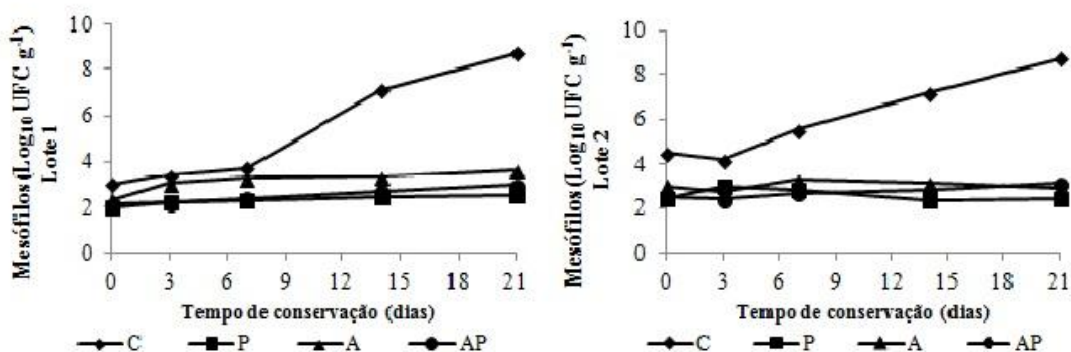
A presença de elevadas populações de bactérias em cogumelos frescos é a causa principal da diminuição da qualidade dos mesmos. A taxa de deterioração pós-colheita tem sido diretamente relacionada com a carga microbiana inicial presente nos cogumelos (Singh *et al.*, 2010), pelo que é de extrema importância que os parâmetros microbiológicos sejam monitorizados. Como qualquer técnica de conservação de alimentos, a eficácia e utilidade da tecnologia HPP é medida tendo em conta principalmente o efeito destruidor que este tratamento provoca nas populações de microrganismos, o que permite um aumento substancial no tempo de vida útil e melhora a segurança do alimento (Rendueles *et al.*, 2011).

A diferente composição e propriedades estruturais da membrana celular de microrganismos gram-positivo e gram-negativo resultam em diferentes graus de resistência às altas pressões. As bactérias gram-positivo são em geral mais resistentes que as gram-negativo (Rendueles *et al.*, 2011).

Em ambos os lotes, a população de mesófilos (Figura 22) apresentou valores mais elevados na amostra C, seguida da amostra A. No controlo o  $\text{Log}_{10} \text{UFC.g}^{-1}$  aumentou gradualmente ao longo do tempo de armazenamento, embora este aumento seja verificado em maior escala a partir do dia 7 e dia 3 nos lotes 1 e 2, respetivamente. Os

valores obtidos inicialmente para os cogumelos *Pleurotus ostreatus* na amostra controlo são menores que os registados por Venturini *et al.* (2011), que determinou valores de microrganismos mesófilos na ordem dos 5.3 Log<sub>10</sub> UFC.g<sup>-1</sup>. Na amostra A verificou-se um aumento do número de microrganismos mesófilos até ao dia 7, sendo que a partir deste dia o valor de Log<sub>10</sub> UFC.g<sup>-1</sup> se manteve praticamente constante. Nas outras amostras não se verificou praticamente evolução ao longo do tempo de conservação.

Todos os tratamentos tiveram assim um efeito importante na redução do número de microrganismos mesófilos nos cogumelos, reduzindo entre 1 a 2 Log<sub>10</sub> UFC.g<sup>-1</sup> em relação ao registado na amostra C no dia 0. A maior diferença foi obtida ao dia 21, onde na amostra com tratamento HPP o número de UFC.g<sup>-1</sup> em base logarítmica foi cerca de 7 vezes inferior ao obtido para o controlo. Verificou-se também em ambos os lotes que o tratamento mais eficaz foi o de HPP sem a solução de ácido cítrico. Aparentemente a presença do líquido tem um efeito ligeiramente protetor dos mesófilos no saco.

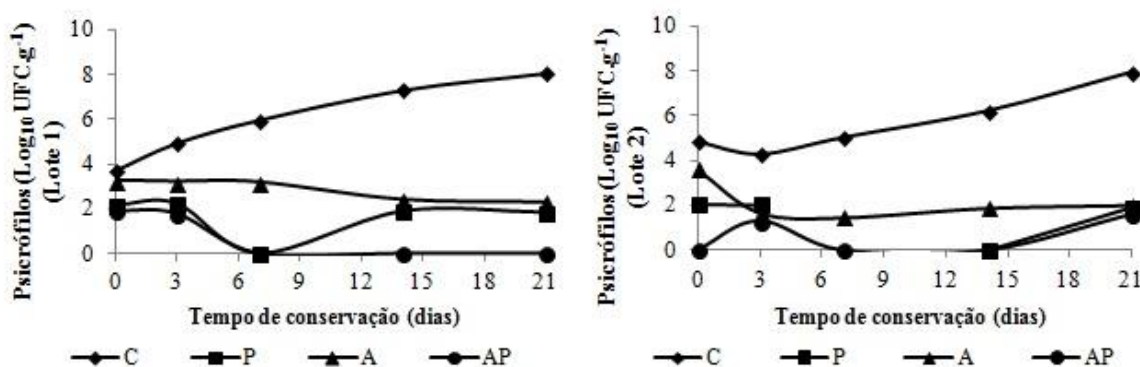


**Figura 22.** Evolução ao longo do tempo da população (Log<sub>10</sub> UFC.g<sup>-1</sup>) de Mesófilos das diferentes amostras de cogumelos *Pleurotus ostreatus* (dos dois lotes) armazenados a 4 °C.

A Figura 23 diz respeito ao número de microrganismos psicrófilos e à sua evolução ao longo do tempo nas diferentes amostras. Observa-se mais uma vez, e como era de esperar que a amostra Controlo foi a que, em ambos os lotes e em todos os dias em que procederam às análises microbiológicas, a que apresentou um maior Log<sub>10</sub> UFC.g<sup>-1</sup>. A amostra AP foi a que apresentou uma redução maior no número de microrganismos psicrófilos na maioria dos dias, sendo que este efeito superior se pode dever ao facto de esta amostra estar submersa numa solução de pH ácido, o que não só garante a inativação da flora microbiana durante o tratamento com altas pressões, como inibe o crescimento das células danificadas pela pressão (Smelt, 1998; Patterson, 2005). Por sua vez a amostra P mostrou um aumento do número de microrganismos psicrófilos ao dia 14, o que pode ser resultado do fim do período de adaptação e da consequente

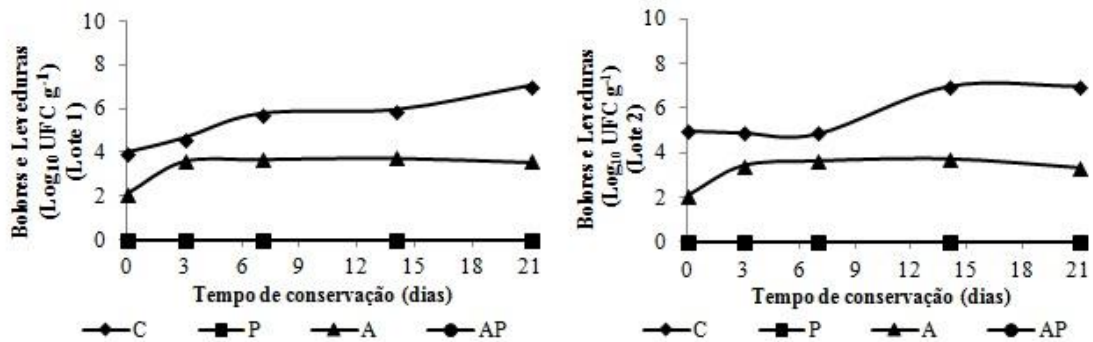
recuperação e proliferação de novo nos cogumelos. Este fenómeno ocorre devido às altas pressões produzirem danos sub-letais nas células microbianas, o que faz com que elas se possam recuperar mais tarde e voltar a multiplicar-se. Os tratamentos ensaiados reduziram de forma importante os níveis de psicrófilos no produto inicial, especialmente os tratamentos com HPP.

Ao fim de 21 dias de conservação, os cogumelos ainda apresentavam níveis de psicrófilos bastante reduzidos face ao controlo.



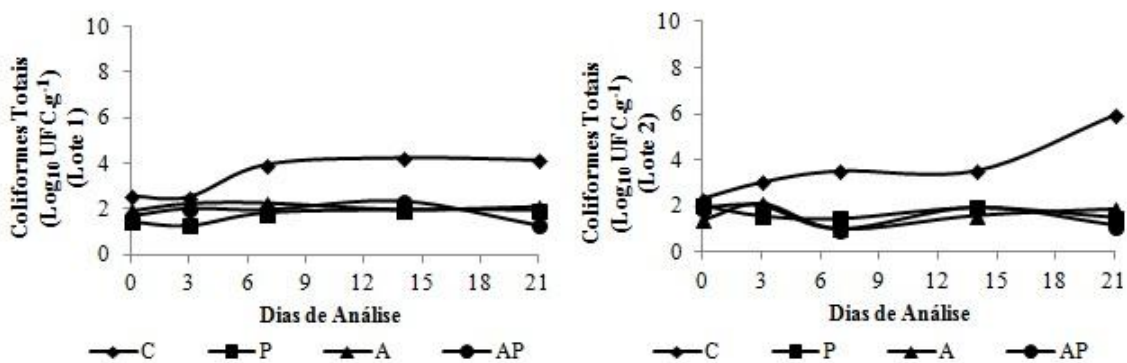
**Figura 23.** Evolução ao longo do tempo da população ( $\text{Log}_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ ) de Psicrófilos das diferentes amostras de cogumelos *Pleurotus ostreatus* (dos dois lotes) armazenados a 4 °C.

Relativamente às análises microbiológicas de pesquisa de bolores e leveduras que estão expressas na Figura 24, não foram contabilizadas colónias viáveis deste tipo de microrganismos nas amostras P e AP. Estes resultados são suportados também por Miguel-Pintado *et al.* (2013) e por González-Cebrino *et al.* (2012) que não detetaram quaisquer colónias viáveis de bolores e leveduras em nectarinas e em puré de ameixa após a utilização da tecnologia das altas pressões. A amostra C apresentou os valores mais elevados de bolores e leveduras e o seu número foi aumentando ao longo do tempo de armazenamento, como seria de esperar. Os valores mínimos nesta amostra foram de 4 e 5  $\text{Log}_{10}$  de  $\text{UFC.g}^{-1}$  (lote 1 e 2, respetivamente) registados no dia 0, ao passo que o valor máximo obtido foi auferido no último dia de análises, com um valor de 7  $\text{Log}_{10}$  de  $\text{UFC.g}^{-1}$ . Os valores obtidos ao dia 0 são superiores aos descritos por Eissa *et al.* (2009). Pode-se observar que os três tratamentos ensaiados diferem bastante quanto à eficácia na redução de bolores e leveduras. Em particular, a ação do tratamento de altas pressões, e deste conjugado com a ação do ácido cítrico são drásticas para estes microrganismos.



**Figura 24.** Evolução ao longo do tempo da população (Log<sub>10</sub> UFC.g<sup>-1</sup>) de Bolores e Leveduras das diferentes amostras de cogumelos *Pleurotus ostreatus* (dos dois lotes) armazenados a 4 °C.

Os resultados obtidos no presente trabalho para a contagem de coliformes totais estão discriminados na Figura 25. Não se verificou uma diminuição inicial tão grande das amostras P, A e AP em relação ao controle como o presenciado nas análises aos restantes tipos de microrganismos. Como esperado o Controle continuou a ser a amostra que apresentou as maiores contagens de coliformes totais. Pôde-se constatar que os três tratamentos ensaiados não diferiram praticamente em termos de eficácia na redução da carga de coliformes totais.



**Figura 25.** Evolução ao longo do tempo da população (Log<sub>10</sub> UFC.g<sup>-1</sup>) de Coliformes Totais das diferentes amostras de cogumelos *Pleurotus ostreatus* (em ambos os lotes) armazenados a 4 °C.

Nas análises efetuadas às diferentes amostras não foram contabilizadas colônias viáveis de *E.coli* (Tabela 16), o que sugere boas condições de higiene ao longo do processamento dos cogumelos (produção e manipulação), uma vez que estes microrganismos são considerados indicadores de contaminação fecal.

Em relação aos esporos de clostrídios sulfito redutores (Tabela 17), também não foram contabilizadas colónias viáveis. A pesquisa deste grupo de microrganismos, anaeróbios e esporulados, em alimentos torna-se importante uma vez que nos pode fornecer uma indicação simples e rápida da potencial presença de *C. perfringens* e *C. botulinum*, duas espécies capazes de causar doenças de origem alimentar.

**Tabela 16.** Contagens de Coliformes Fecais (*E.coli*) nas amostras de cogumelos *Pleurotus ostreatus*.

	Amostra	Dia 0	Dia 3	Dia 7	Dia 14	Dia 21
	<b>Lote 1</b>	<b>C</b>	<10	<10	<10	<10
<b>P</b>		<10	<10	<10	<10	<10
<b>A</b>		<10	<10	<10	<10	<10
<b>AP</b>		<10	<10	<10	<10	<10
	Amostra	Dia 0	Dia 3	Dia 7	Dia 14	Dia 21
	<b>Lote 2</b>	<b>C</b>	<10	<10	<10	<10
<b>P</b>		<10	<10	<10	<10	<10
<b>A</b>		<10	<10	<10	<10	<10
<b>AP</b>		<10	<10	<10	<10	<10

**Tabela 17.** Análises à presença de esporos de Clostrídios sulfito redutores nas amostras de cogumelos *Pleurotus ostreatus*.

	Amostra	Dia 0	Dia 3	Dia 7	Dia 14	Dia 21
	<b>Lote 1</b>	<b>C</b>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<b>P</b>		Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<b>A</b>		Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<b>AP</b>		Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Amostra	Dia 0	Dia 3	Dia 7	Dia 14	Dia 21
	<b>Lote 2</b>	<b>C</b>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<b>P</b>		Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<b>A</b>		Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<b>AP</b>		Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

# **Capítulo 4**

## **Considerações finais**



Relativamente ao estudo da composição química e nutricional dos cogumelos frescos *Pleurotus ostreatus*, os valores obtidos encontraram-se um modo geral em concordância com descritos na bibliografia, com exceção do teor de proteína e do valor energético calculado. A perda de massa observada nos cogumelos foi, como esperado e descrito por outros autores, aumentando ao longo do tempo de armazenamento, especialmente nos sete primeiros dias de conservação.

O estudo dos parâmetros físico-químicos revelou algumas mudanças em algumas propriedades dos cogumelos *Pleurotus ostreatus* sujeitos ao tratamento com altas pressões. Os valores de pH e do teor de sólidos solúveis registaram diferenças significativas entre todas as amostras. As amostras tratadas com altas pressões (P e AP) registaram uma diminuição de pH em relação ao controlo e à amostra A. O SST da amostra P aumentou em relação à amostra controlo, sendo o único tratamento em que isso sucedeu. Os tratamentos com ácido cítrico reduziram o SST. No que diz respeito aos parâmetros da cor, estes também foram afetados pelas altas pressões, bem como pela ação do ácido cítrico. Os tratamentos utilizando altas pressões (P e AP) comparados com o controlo (C) registaram um escurecimento (redução na luminosidade), bem como uma redução nas tonalidades vermelha (valor de  $a^*$ ) e amarela (valor de  $b^*$ ), embora nem sempre estas reduções tenham tido importância estatística.

Quanto a alterações no parâmetro de textura analisado (força de corte), os resultados obtidos parecem indicar que não houve diferenças significativas na maioria dos dias analisados entre as amostras pressurizadas (P e AP) e não pressurizadas (C e A), ou seja, a tecnologia HPP nas condições ensaiadas não altera a força de corte a aplicar aos cogumelos relativamente aos cogumelos sem pressurização.

Este estudo mostrou bons resultados na preservação de cogumelos frescos *Pleurotus ostreatus* utilizando a tecnologia HPP, visto ter inativado, destruído ou mantido em níveis reduzidos a flora microbiana, bem como os microrganismos patogénicos. A contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos inicial logo após os tratamentos de pressurização foi reduzida em cerca de 1 a 2  $\text{Log}_{10}$  UFC/g, não se registando diferenças entre as amostras de cogumelos pressurizados e as amostras pressurizadas e submersas em ácido cítrico. Em todos os dias de análises as contagens de mesófilos totais nas amostras sujeitas a altas pressões (P e AP) foram menores que as registadas para a amostra C. A contagem de bolores e leveduras mostrou uma redução de 4 e 5  $\text{Log}_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> - no lote 1 e 2, respetivamente - nas amostras pressurizadas, que

estiveram abaixo do limite de detecção, mantendo-se inalteradas durante o armazenamento, enquanto as amostras não pressurizadas tiveram um crescimento continuado ao longo do tempo. Quanto aos microrganismos psicrófilos, estes mostraram uma redução de 2 e 5  $\text{Log}_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> na amostra AP e de 5 e 3  $\text{Log}_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> na amostra P relativamente ao controlo, sendo que em ambos os lotes e em todos os dias de análise a amostra que foi sujeita à tecnologia das altas pressões conjugada com o efeito do ácido cítrico foi a que teve as contagens de psicrófilos mais baixas entre todas as amostras. Na detecção de coliformes totais embora se registre um decréscimo na carga microbiana foi onde se registaram menos diferenças iniciais entre as amostras de controlo e as amostras pressurizadas. No entanto a amostra controlo apresentou sempre ao longo do tempo os maiores valores, e nas restantes amostras os valores medidos são de aproximadamente 1 ou 2  $\text{Log}_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> e mantêm-se aproximadamente constantes ao longo dos dias analisados. Os valores de coliformes fecais mantiveram-se sempre abaixo do limite de detecção ao longo do tempo em todas as amostras e também não foram observadas quaisquer colónias típicas de Clostrídios sulfito-redutores em todas as amostras.

Tendo em conta os resultados obtidos no presente estudo pode-se afirmar que o uso de altas pressões pode induzir algumas modificações nos parâmetros de qualidade de cogumelos *Pleurotus ostreatus*, ainda que não se consiga estabelecer um padrão claro de variação, visto a variabilidade ser bastante acentuada entre os dois lotes.

A principal modificação nos indicadores de qualidade testados é uma redução drástica da carga microbiana inicial, especialmente de bolores e leveduras. Esta tecnologia, nas condições ensaiadas apresentou excelentes resultados em termos microbiológicos, conseguindo manter ao longo dos 21 dias de conservação, os números de UFC/g em níveis bastante reduzidos, o que comparando com os cogumelos embalados convencionalmente e considerando o prazo de validade destes de 5 a 7 dias, a tecnologia de HPP consegue aumentar o prazo de validade em cerca de 15 dias relativamente ao embalamento convencional.

Aparentemente a presença de ácido cítrico não trouxe benefícios relevantes relativamente à qualidade dos cogumelos apenas pressurizados.

# **Capítulo 5**

## **Perspetivas Futuras**



Considerando todos os resultados obtidos neste estudo, é claro que, sendo um estudo exploratório, existem aspetos que necessitam de uma investigação mais aprofundada, a fim de esclarecer os efeitos da tecnologia das altas pressões hidrostáticas em certos parâmetros de cogumelos.

Uma das próximas abordagens a um estudo deste género será testar a influência de diferentes condições de tempo, combinados com distintos níveis de pressão de modo a estudar qual a melhor combinação tempo-pressão na conservação de cogumelos de modo a alterar ao mínimo possível os parâmetros de qualidade avaliados.

Será também importante explorar os efeitos das altas pressões tanto no teor de compostos fenólicos, como na capacidade antioxidante dos cogumelos, já que estes têm sido indicadores químicos importantes na valorização comercial deste produto.

Era também benéfico conhecer o efeito da tecnologia HPP na atividade de certas enzimas e na libertação de compostos voláteis. Um estudo mais aprofundado das consequências do uso desta tecnologia nas propriedades reológicas também se reveste de extrema importância para se avaliar a sua influência na firmeza, coesividade, adesividade, elasticidade e gomosidade de cogumelos.

Indispensável será fazer um estudo de avaliação sensorial de cogumelos pressurizados, de modo a determinar os atributos que os consumidores mais valorizariam neste produto e a sua aceitabilidade, ao mesmo tempo que se poderá estudar a relação entre a avaliação feita pelo painel de provadores com os resultados do estudo das propriedades reológicas e de cor medidas instrumentalmente.

Também seria útil fazer análises microbiológicas a alguns microrganismos patogénicos, tais como *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* para ver o efeito das altas pressões neste tipo de microrganismos.



# Capítulo 6

## Referências



- ❖ Abbott, J. (1999). Quality measurements of fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, **15**, 207-225.
- ❖ Aguirre, L., Frias, J.M., Barry-Ryan, C., & Grogan, H. (2008). Assessing the effect of product variability on the management of the quality of mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Postharvest Biology and Technology*, **49**, 247-254.
- ❖ Aguirre, L., Frias, J.M., Barry-Ryan, C., & Grogan, H. (2009). Modelling browning and Brown spotting of mushrooms (*Agaricus bisporus*) stored in controlled environmental conditions using image analysis. *Journal of Food Engineering*, **91**, 280-286.
- ❖ Ahmed, J., & Ramaswamy, H.S. (2006). Changes in colour during high pressure processing of fruits and vegetables. *Stewart Postharvest Review*, **5** (9), 1–8.
- ❖ Ahmed, J., Ramaswamy, H.S., & Hiremath, N. (2005). The effect of high pressure treatment on rheological characteristics and colour of mango pulp. *International Journal of Food Science and Technology*, **40**, 885-895.
- ❖ Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., & Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology*. John Wiley and Sons editors, 4<sup>th</sup> ed., New York, USA, 868.
- ❖ Alvarez-Jubete, L., Valverde, J., Patras, A., Mullen, A.M., & Marcos, B. (2014). Assessing the impact of High-Pressure Processing on selected physical and biochemical attributes of white cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata alba*). *Food Bioprocess Technol*, **7**, 682-692.
- ❖ Ananou, S., Garriga, M., Jofré, A., Aymerich, T., Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., & Valdivia, E. (2010). Combined effect of enterocin AS-48 and high hydrostatic pressure to control food-borne pathogens inoculated in low acid fermented sausages. *Meat Science*, **84**, 594-600.
- ❖ AOAC (1995). *Official methods of analysis* (16<sup>th</sup> Ed.). Arlington VA, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- ❖ Ares, G., Lareo, C., & Lema, P. (2007). Modified atmosphere packaging for postharvest storage of mushrooms. A review. *Fresh Produce*, **1** (1), 32-40.
- ❖ Aymerich, T., Picouet, P.A., & Monfort, J.M. (2008). Decontamination technologies for meat products, *Meat Science*, **78**, 114-129.
- ❖ Azevedo, G. (2010) “Contributos para a Avaliação de Diferentes Indicadores da Qualidade de Cogumelos Frescos *Pleurotus ostreatus*”. Dissertação de mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar. Instituto Politécnico de Bragança.

- ❖ Azevedo, S., Cunha, L.M., Amaral, C., & Fonseca, S.C. (2009). Influência do tempo e da temperatura de armazenamento em atributos da qualidade de cogumelos do género *Pleurotus* (*Pleurotus ostreatus*) obtidos em modo de produção biológico.
- ❖ Bahceci, K.S., Serpen, A., Gokmen, V., & Acar, J. (2005). Study of lipoxygenase and peroxidase as indicator enzymes in green beans: change of enzyme activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage. *Journal of Food Engineering*, **66** (2), 187-192.
- ❖ Bano, Z., & Rajarathnam, S. (1988). *Pleurotus* mushrooms. Part II. Chemical composition, nutritional value, post-harvest physiology, preservation and role as human food. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **27**, 87-158.
- ❖ Barros, L., Ferreira, M.J., Queirós, B., Ferreira, I.C.F.R., & Baptista, P. (2007). Total phenols, ascorbic acid, carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidante activities. *Food Chemistry*, **103**, 413-419.
- ❖ Basak, S., & Ramaswamy, H.S (1998). Effect of high pressure processing on the texture of selected fruits and vegetables. *Journal of Texture Studies*, **29**, 587-601.
- ❖ Bernas, E., Jaworska, G. & Kmiecik, W. (2006). Storage and processing of edible mushrooms. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*, **5** (2), 5-23.
- ❖ Bononi, V. L., Capelari, M., Maziero, R., & Trufem, S. F. B. (1999). *Cultivo de cogumelos comestíveis*. 2ª edição. Icone editora, Portugal.
- ❖ Boynton, B.B., Sims, C.A., Sargent, S., Balaban, M.O., & Marshall, M.R. (2012). Quality and stability of precut Mangos and Carambolas subjected to high-pressure processing. *Journal of Food Science*, **67** (1), 409-415.
- ❖ Çaglarirmak, N. (2007). The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotus* species) and estimated approach to the volatile compounds. *Food Chemistry*, **105**, 1188-1194
- ❖ Castro, A.L.A., Paiva, P.C., Dias, E., & Santos, J. (2004). Avaliação das alterações bromatológicas e de degradabilidade do resíduo de lixadeiras do algodão após tratamento biológico com *Pleurotus sajor-caju*. *Ciênc. Agrotec*, **28**, 608-613.
- ❖ Chang, S.T., & Miles P.G. (2004). Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact –2<sup>nd</sup> ed., 1-10, 27-35, 40-47.

- ❖ Chapleau, N.J., & Lamballerie-Anton, M.I.d. (2003). Changes in myofibrillar proteins interactions and rheological properties induces by high-pressure processing. *European Food Research and Technology*, **216** (6), 470-476.
- ❖ Cheftel, J.D., & Culioli, J. (1997). Effects of High Pressure on meat: A review. *Meat Science*, **46**, 211-236.
- ❖ Chéret, R., Chapleau, N., Belbarre-Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., & Lamballerie, M.d. (2005). Effects of high pressure on texture and microstructure of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) fillets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 3969-3973.
- ❖ Chikthimmah, N. (2006). Microbial Ecology of Mushroom Casing Soils and Preharvest Strategies to Enhance Safety and Quality of Fresh Mushrooms, PhD Thesis, The Pennsylvania State University, University Park, PA.
- ❖ Clariana, M., Valverde, J., Wijngaard, H., Mullen, A.M., & Marcos, B. (2011). High pressure processig of swede (*Brassica napus*): Impact on quality properties. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **12**, 85-92.
- ❖ Codex Alimentarius (2014). Codex General Standard for Edible Fungi and Fungus Products (CODEX STAN 38-1981).
- ❖ Codex Alimentarius (2014). Código Internacional Recomendado de Práticas - Princípios Gerais de Higiene dos Alimentos do *Codex Alimentarius* (CAC/RCP 1-1969).
- ❖ Cortés, M., Ruiz, M., Henrique, L. (2011). Influencia del empaque y envasado sobre las propiedades fisicoquímicas del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. *Revista MVZ Córdoba*, **16** (2), 2593-2604.
- ❖ Crisan, E.V. & Sands, A., Nutritional value, in *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*, Chang, S.T. and Hayes, W.A., Eds., Academic Press, New York, 137-168, 1978.
- ❖ Cuppett, S.L., Parkhurst, A.M., Chung, W., Weyner, M., & Bullerman, L.B. (1998). Factors affecting sensory attributes of oyster mushrooms. *Journal of Food Quality*, **21**, 383-395.
- ❖ Daba, A.S., Kabeil, S.S., Botros, A.W., & El-Saadani, M.A. (2008). Production of Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in Egypt as a Source of Nutritional and Medicinal Food. *World Journal of Agricultural Sciences*, **4** (5), 630-634.

- ❖ Daoudi, L., Quevedo, J.M., Trujillo, A.J., Capdevila, F., Bartra, E., Mínguez, S., & Guamis, B. (2002). Effects of high-pressure treatment on the sensory quality of white grape juice. *High Pressure Research*, **22**, 705-709.
- ❖ Demazeau, G., & Rivalain, N. (2011). The development of High Hydrostatic pressure processes as an alternative to other pathogen reduction method. *Journal of Applied Microbiology*, **110**, 1359 - 1369.
- ❖ Diez, A.M., Santos, E.M., Jaime, I., & Rovira, J. (2008). Application of organic acid salts and high-pressure treatments to improve the preservation of blood sausage. *Food Microbiology*, **25**, 154-161.
- ❖ Eissa, H.A., Fouad, G.M., & Shouk, A.E.A. (2009). Effect of some thermal and chemical pretreatments on smoked oyster mushrooms quality. *International Journal of Food Science and Technology*, **44**, 251-261.
- ❖ Escriu, R., & Mor-Mur, M. (2009). Role of quantity and quality of fat in meat models inoculated with *Listeria innocua* or *Salmonella typhimurium* treated by high pressure and refrigerated stored. *Food Microbiology*, **26**, 834-840.
- ❖ FAOSTAT (2014). <http://faostat3.fao.org/home/E> (accedido em Agosto de 2014).
- ❖ Fellows, P.J. (2000). *Food processing technology: principles and practice* (2 ed). Woodhead Publishing in Food Science and Technology, CRC Press, England.
- ❖ Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., & Abreu, R.M.V. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, **16**, 1543-1560.
- ❖ Ferreira, I.C.F.R., Vaz, J.A., Vasconcelos, M.H., & Martins, A. (2010). Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **10**, 424-436.
- ❖ Fito, P., Andrés A., Barát J., & Abors A. (2001). Introducción al secado de alimentos por aire caliente. España: Editorial Universidad Politécnica de Valencia.
- ❖ Fonberg-Brockek, M., Windyga, B., Szczawinski, J., Szczawinska, M., Pietrzak, D., & Prestamo, G. (2005). High Pressure for food safety. *Acta Biochimica Polonica*, **52**, 721-724.
- ❖ Furlani, R & Godoy, H. (2007). Valor nutricional de cogumelos comestíveis. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, **27** (1): 154-157.
- ❖ Furlani, R.P.Z., & Godoy, H.T. (2005). Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. *Ver. Inst. Adolfo Lutz*, **64** (2), 149-154.

- ❖ Garcia-Palazon, A., Suthanthangjai, W., Kajda, P., & Zabetakis, I. (2004). The effects of high hydrostatic pressure on  $\beta$ -glucosidade, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Food Chemistry*, **88**, 7-10.
- ❖ Garnweidner, E., Jankovics, G., & Vasconcelos, M. (1999). Cogumelos: como identificar, classificar e apanhar cogumelos. Guia de cogumelos venenosos comestíveis. Rio de Mouro: Everest. ISBN 973-750-418-3.
- ❖ Garriga, M., Grébol, N., Aymerich, M.T., Monfort, J.M., & Hugas, M. (2004). Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial meat products over its shelf life. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **5**, 451-457.
- ❖ González-Cebino, F., García-Parra, J., Contador, R., Tabla, R., & Ramírez, R. (2012). Effect of High-Pressure Processing and Thermal Treatment on quality attributes and nutritional compounds of “Songold” plum Purée. *Journal of Food Science*, **77** (8), 866-873.
- ❖ González-Fandos, E., Olarte, C., Giménez, M., Sanz, S., & Simón, A. (2001). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in packaged fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Journal of Applied Microbiology*, **91** (5), 795-805.
- ❖ Grangeia, C., Heleno, S.A., Barros, L., Martins, A., & Ferreira, I.C.F.R. (2011). Effects of trophism on nutritional and nutraceutical potential of wild edible mushrooms. *Food Research International*, **44**, 1029-1035.
- ❖ Guzman, G. Genus *Pleurotus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetidae): Diversity, Taxonomic Problems, and Cultural and Traditional Medicinal Uses. *Internacional Journal of Medicinal Mushrooms*, **2** (29), 2000.
- ❖ Heleno, S.A., Barros, L., Sousa, M.J., Martins, A., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I.C.F.R. (2011). Targeted metabolites analysis in wild *Boletus* species. *Food Research International*, **44**, 1343-1348.
- ❖ Helm, C., Coradin, J., Kestring, D. (2009). Avaliação da Composição Química de Cogumelos Comestíveis *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Agaricus bisporus portobello*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus*. ISSN 1517-5030 Colombo: Embrapa Florestas.
- ❖ Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Broeck, I.V.d., Weemaes, C. (1998). Effects of high pressure on enzyme related to food quality. *Trends in Food Science & Technology*, **9** (5), 197-203.

- ❖ Hewett, E.W. (2006). Na overview of preharvest factors influencing postharvest quality of horticultural products. *International Journal of Postharvest Technology and Innovation*, **1**, 4-15.
- ❖ Hogan, E., Kelly, A.L., & Sun, D.W. (2005). High pressure processing of foods: An overview. *Emerging technologies for food processing*. 3-32.
- ❖ Holtz, M., Borges, G.M., Furlani, S.A., & Wisbeck, E. (2009). Cultivo de *Pleurotus ostreatus* utilizando resíduos de algodão da indústria têxtil. *Revista de Ciências Ambientais*, **3** (1), 37-51.
- ❖ Hugas, M., & Monfort, J.M. (2002). New mild technologies in meat processing: high pressure as a novel technology. *Meat Science*, **62**, 359-371.
- ❖ Huppertz, T., Kelly, A.L., & Fox, P.F. (2002). Effects of high pressure on constituents and properties of milk. *International Dairy Journal*, **12** (7), 561-572.
- ❖ ISO 21527-1 (2008) - Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs — Horizontal Method for the Enumeration of Yeasts and Moulds — Part 1: Colony Count Technique in Products with Water Activity Greater Than 0.95. *International Standards Organization: Winterthur, Switzerland*.
- ❖ Jaworska, G., & Bernas, E. (2009). Qualitative changes in *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. mushrooms resulting from different methods of preliminary processing and periods of frozen storage. *Society of Chemical Industry J Sci Food Agric*, **89**, 1066–1075.
- ❖ Jaworska, G., Bernas, E., & Mickowska, B. (2011). Effect of production process on the amino acid content of frozen and canned *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *Food Chemistry*, **125**, 936-943.
- ❖ Jay, J.M. (2000). *Modern Food Microbiology*. AN Asper Publication, 6<sup>th</sup> ed, 375-379.
- ❖ Jayathunge, L., & Illeperuma, C. (2005). Extension of Postharvest Life of Oyster Mushroom by Modified Atmosphere Packaging Technique. *Journal of Food Science*, **70** (9), 573-578.
- ❖ Johannessen, G.S., Loncarevic, S., & Kruse, H. (2002). Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. *International Journal of Food Microbiology*, **77** (3), 199-204.

- ❖ Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., & Pellon, G. (1998). *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycology Research*, **102**, 1459-1483.
- ❖ Kalač, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry*, **113**, 9-16.
- ❖ Kim, K.M., Ko, J.A., Lee, J.S., Park, H.J., & Hanna, M.A. (2006). Effect of modified atmosphere packaging on the shelf-life of coated, whole and sliced mushrooms. *LWT*, **39**, 364-371.
- ❖ Kotwaliwale, N., Bakane, P., & Verma, A. (2007). Changes in textural and optical properties of oyster mushroom during hot air drying. *Journal of Food Engineering*, **78**, 1207-1211.
- ❖ Kouniaki, S., Kajda, P., & Zabetakis, I. (2004). The effect of high hydrostatic pressure on anthocyanins and ascorbic acid in blackcurrants (*Ribes nigrum*). *Flavour and Fragrance Journal*, **19**, 281-286.
- ❖ Krebbers, B., Matser, A.M., Koets, M., & Van den Berg, R.W. (2002). Quality and storage-stability of high-pressure preserved green beans. *Journal of Food Engineering*, **54**, 27-33.
- ❖ Latorre-Moratalla, M.L., Bover-Cid, S., Aymerich, T., Marcos, B., Vidal-Carou, M.C., & Garriga, M. (2007). Aminogenesis control in fermented sausages manufactured with pressurized meat batter and starter culture. *Meat Science*, **75**, 460-469.
- ❖ Li-Qin, Z., Jie, Z., Shu-Hua, Z., & Lai-Hui, G. (2009). Inhibition of browning on the surface of peach slices by short-term exposure to nitric oxide and ascorbic acid. *Food Chemistry*, **114**, 174-179.
- ❖ Lopez Briones, G., Varoquaux, P., Chambroy, Y., Bouquant, J., Bureau, G., & Pascat, B. (1992). Storage of common mushroom under controlled atmospheres. *International Journal of Food Science and Technology*, **27**, 493-505.
- ❖ López-Caballero, M.E., Carballo, J., Solas, M.T., & Colmenero, J. (2002). Responses of *pseudomonas fluorescens* to combined high pressures/temperature treatments. *European Food Research Technologies*, **214**, 511-515.
- ❖ Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., & Gould, G.W. (2000). The Microbiological safety and Quality of Food, Volume I, 277-283.
- ❖ MacDougall, D. B. (Ed.). (2002). Colour in food. Improving quality. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.

- ❖ Mandeel, Q. A.; Al-Laith, A. A.; Mohamed, S. A. (2005). Cultivation of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) on various lignocellulosic wastes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **21**, 601-607.
- ❖ Manzi, P., Altero, A., & Pizzoferrato, L. (2001). Nutritional values of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry*, **73**, 321-325.
- ❖ Manzi, P., Gambelli, L., Marconi, S., Vivanti, V., & Pizzoferrato, L. (1999). Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. *Food Chemistry*, **65**, 477-482.
- ❖ Marcos, B., Aymerich, T., Guardia, M.D., Garriga, M. (2007). Assessment of High Hydrostatic Pressure and *starter* cultura on the quality properties of low acid fermented sausages. *Meat Science*, **76**, 46-53.
- ❖ Maroco, J. (2003). Análise Estatística com utilização do SPSS (2<sup>th</sup> ed.). Portugal, Lisboa: Edições Sílabo.
- ❖ Martin, S.T., & Beelman, R.B. (1996). Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in fresh packaged mushroom (*Agaricus bisporus*). *Journal of Food Protection*, **59** (8), 819-826.
- ❖ Martínez-Carrera, D., Sobal, M., Aguilar, A., Navarro, M., Bonilla, M., & Larqué-Saavedra, A. (1998). Canning technology as an alternative for management and conservation of wild edible mushrooms in Mexico. *Micología Neotropical Aplicada*, **11**, 35-51.
- ❖ Martínez-Rodríguez, Acosta-Muñiz, Y., C., Olivas, G.I., Guerrero-Beltrán, J., Rodrigo-Aliaga, D., & Sepúlveda, D.R. (2012). High Hydrostatic Pressure Processing of Cheese. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **11** (4), 399-416.
- ❖ Martins, X.F. (2004). Cogumelos – Património Natural Transmontano. João Azevedo Editor, Portugal, Vol. 1, 19-101.
- ❖ Masson, Y., Ainsworth, P., Fuller, D., Bozkurt, H., Ibanoglu, Ş. (2002). Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Candida sake* in homogenized mushrooms under modified atmosphere. *Journal of Food Engineering*, **54**, 125-131.
- ❖ Matser, A.M., Stegeman, D., Kals, J., & Bartels., PV. (2000a) Effects of high pressure on colour and texture of fish. *High Pressure Research: Na international Journal*, **19** (1), 109-105.

- ❖ Matser. A.M., Knott, E.R., Teunissen, P.G.M., & Bartels, P.V. (2000b). Effects of high isostatic pressure on mushrooms. *Journal of Food Engineering*, **45**, 11-16.
- ❖ Mattila, P., Könkö, K., Euroba, M., Pihlava, J.M., Astola, J., Vahteristo, L., Hietaniemi, V., Kumpulainen, J., Valtonen, M., & Piironen, V. (2001). Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 2343-2348.
- ❖ Mattila, P., Salo-Väänänen, P., Könkö, K., Aro, H., & Jalava, T. (2002). Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 6419-6422.
- ❖ Messens, W., Camp, J.V., Huyghebaert, A. (1997). The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. *Trends in Food Science & Technology*, **8** (4), 107-112.
- ❖ Miguel-Pintado, C., Nogales, S., Fernández-León, A.M., Delgado-Adámez, J., Hernández, T., Lozano, M., Cañada-Cañada, F., & Ramírez, R. (2013). Effect of hydrostatic high pressure processing on nectarine halves pretreated with ascorbic acid and calcium during refrigerated storage. *LWT-Food Science and Technology*, **54**, 278-284.
- ❖ Msagati, T. A. M.; Chemistry of food additives and preservatives; Wiley-Blackwell; 1º edição; ISBN 978-1-118-27414-9.
- ❖ Murchie, L.W., Cruz-Romero, M., Kerry, J.P., Linton, M., Patterson, M.F., Smiddy, M., & Kelly, A.L. (2005). High pressure processing of Shellfish: A review of microbiological and other quality aspects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **6**, 257-270.
- ❖ Murcia, M.A., Lopez-Ayerra, B., Martinez-Tomé, M., Vera, A.M., & García-Carmona, F. (2000). Evolution of ascorbic acid and peroxidase during industrial processing of broccoli. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, 1882-1886.
- ❖ Narvaiz, P. (1994). Some physicochemical measurements of mushrooms (*A. Campestris*) irradiated to extend shelf-life. *Food Science and Technology*, **27**, 7-10.
- ❖ Nielson, S.S. (2007). *Análisis de los Alimentos. Manual de laboratorio*. 1ª Edição, Editorial Acribia, S.A.
- ❖ Norton, T., & Sun, D-W. (2008). Recent Advances in the Use of High pressure as a effective processing technique in the food industry. *Food Bioprocess technology*, **1**, 2-34.

- ❖ Norma Portuguesa (NP) 1829:1982 – Microbiologia Alimentar – Preparação da amostra para análise microbiológica. Instituto Português de Qualidade (IPQ), Portugal.
- ❖ Norma Portuguesa (NP) 2079:1989 – Microbiologia Alimentar – Regras gerais para análise microbiológica. Instituto Português de Qualidade (IPQ), Portugal.
- ❖ Norma Portuguesa (NP) 2262:1986 – Microbiologia Alimentar – Regras gerais para a pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores. Instituto Português da Qualidade (IPQ), Portugal.
- ❖ Norma Portuguesa (NP) 2307:1987 – Microbiologia Alimentar – Regras gerais para contagem de microrganismos psicotróficos. IPQ, Portugal.
- ❖ Norma Portuguesa (NP) 3005:1985 – Microbiologia Alimentar – Preparação de diluições para análise microbiológica. Instituto Português da Qualidade (IPQ), Portugal.
- ❖ Norma Portuguesa (NP) 3788:2002 – Microbiologia Alimentar – Regras gerais para contagem de microrganismos a 30°C. Instituto Português de Qualidade (IPQ), Portugal.
- ❖ Oey, I., Martina, L., Loey, A. V., & Hendrickx, M. (2008). Effect of high pressure processing on colour, texture and flavour of fruit and vegetable-based food products: a review. *Trends in Food Science & Technology*, **19**, 320-328.
- ❖ Oey, I., Van der Plancken, I., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2007). Does high pressure processing influence nutritional aspects of plant based food systems? *Trends in Food Science and Technology*, **19**, 300-308.
- ❖ Olivera, D.F., Vina, S.Z., Marani, C. M., Ferreyra, R.M., Mugridge, A., Chaves, A.R., & Mascheroni, R.H. (2008). Effect of blanching on the quality of brussels sprouts (*Brassica oleracea* L. Gemmifera dc) after frozen storage. *Journal of Food Engineering*, **84** (1), 148-155.
- ❖ Ouzouni, P.K., Petridis, D., Koller, W.-D., & Riganakos, K.A. (2009). Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece. *Food Chemistry*, **115**, 1575-1580.
- ❖ Patterson, M.F. (2005). Microbiology of pressure-treated foods. *Journal of Applied Microbiology*, **98** (6), 1400-1409.

- ❖ Patterson, M.F., Ledward, D.A., & Rogers, N. (2006). High Pressure Processing, *in: Brennan, J.G. (Ed.), Food Processing Handbook*. Wiley, Weinheim, Germany, pp. 173-200.
- ❖ Patterson, M.F., Linton, M., & Doona, C.J. (2007). Introduction to high pressure processing of foods, *in: Doona, C.J., Feeherry, F.E. (Eds.), High pressure processing of foods*. Blackwell Publishing and the Intitute of Food Technologies, Ames, USA, pp 1-14.
- ❖ Pereda, J.A.O., Cosano, G.Z., Navarro, A.B., Carballeira, A.O., & López, B.G. (2004). La aplicación de altas presiones en la carne, *Revista del Comité*, 36-71.
- ❖ Plaza, L., Muñoz, M., de Ancos, B., & Pilar Cano, M. (2003). Effect of combined treatments of high-pressure, citric acid and sodium chloride on quality parameters of tomato puree. *European and Food Research and Technology*, **216**, 514-519.
- ❖ Préstamo, G., & Arroyo, G. (1998). High Hydrostatic Pressure effects on vegetable structure. *Journal of Food Science*, **63** (5), 1-4.
- ❖ Rai, D. R. & Paul, S. (2007). Transient state in-pack respiration rates of mushroom under modified atmosphere packaging based on enzyme kinetics. *Biosystems Engineering*, **98**, 310-326.
- ❖ Raven. P.H., Everest, R.F., & Eichhorn, S.E. (2001). *Biologia Vegetal*. Guanabara Koogan S.A., 6ª Edição, Rio de Janeiro, Brasil.
- ❖ Regulamento (CE) N° 1863/2004 da Comissão de 26 de Outubro de 2004. *Jornal Oficial da União Europeia*.
- ❖ Regulamento (CEE) n° 558/93 da Comissão, de 10 de Março de 1993. *Jornal Oficial da União Europeia*.
- ❖ Rendueles, E., Omer, M.K., Alvseike, O., Alfonso-Calleja, C., Capita, R., & Prieto, M. (2011). Microbiological food safety assessment of High Hydrostatic pressure processing: A review, *LWT, Food Science and Technology*. **44**, 1251-1260.
- ❖ Reyes, A., Mahn, A., & Vásquez. (2014). Mushrooms dehydration in a hybrid-solar dryer, using a phase change material. *Energy Convrsion and Management*, **83**, 241-248.
- ❖ Riós-Romero, E., Tabilo-Munizaga, G., Morales-Castro, J., Reyes, J.E., Pérez-Won, M., & Ochoa-Martínez, L.A. (2012). Efecto de la aplicación de alta presión hidrostática sobre la inactivación microbiana y las propiedades fisicoquímicas de arilos de granada. *CyTA – Journal of Food*, **10** (2), 152-159.

- ❖ Ritz, M., Jugiau, F., Rama, F., Courcoux, P., Semenou M., & Federighi, M. (2000). Inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure: effects and interactions of treatment variables studied by analysis of variance. *Food Microbiology*, **17**, 375-382.
- ❖ Rubio, B., Martínez, B., García-Cachán M.D., Rovira, J., & Jaime, I. (2007). Effect of High pressure preservation on quality of dry cured beef “Cecina de Leon”. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **8**, 102- 110.
- ❖ Rungapamestry, V., Duncan, A.J., Fuller, Z., & Ratcliffe, B. (2007). Effect of cooking brassica vegetables on the subsequent hydrolysis and metabolic fate of glucosinolates. *Proceedings of the Nutrition Society*, **66** (1), 69-81.
- ❖ Samadpour, M.P., Barbour, M.W., Nguyen, T., Cao, T.M., Buck, F., Depavia, G.A., Mazengia, E., Yang, P., Alfi, D., Lopes, M., & Stopforth, J.D. (1999). Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 and other Shigalike toxin-producing *E. coli* in retail fresh ground beef, bean sprouts and mushrooms. In: 86th Annual Meeting of the International Association of Food and Environmental Sanitarians, Dearborn, MI. August 2.
- ❖ Sanchez, J., & Royse., D. (2001). *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* 1ª Edición, Uteha, Noriega Editores. San Cristóbal de las Casas, México.
- ❖ Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., De Ancos, B., & Cano, M.P. (2006). Impact of high-pressure and traditional thermal processing of tomato puree on carotenoids, vitamin C and antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **86** (2), 171-179.
- ❖ Sancho, F., Lambert, Y., Demazeau, G., Largeteau, A., Bouvier, J.M., & Narbonne, J.F. (1999). Effect of ultra-high hydrostatic pressure on hydrosoluble vitamins. *Journal of Food Engineering*, **39** (3), 247–253.
- ❖ Sapata, M., Ramos, A., Ferreira, A., Andrada, L., & Candeias, M. (2009). Changes of quality of *Pleurotus* SSP. Carpophores in modified atmosphere packaging. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*, **8** (1), 17-22.
- ❖ Sapata, M.M., Ramos, A.C., Ferreira, A., Andrada, L., & Candeias, M. (2006). Conservação de cogumelos frescos do género *Pleurotus* em atmosfera modificada. *Anais da Associação Micológica A Pantorra*, **6**, 125-131.
- ❖ Sapers, G.M., Hicks, K.B., & Miller, R.L. (2001). *Food Aditives*. CRC Press. Wyndmoor, Pennsylvania.

- ❖ Sila, D., Duvetter, T., Roeck, A.D., Verlent, I., Smout, C., Moates, G.K., Hills, B.P., Waldron, K.K., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2008). Texture changes of processed fruit and vegetables: potential use of high-pressure processing. *Trends in Food Science & Technology*, **19**, 309-319.
- ❖ Simón, A., González-Fandos, E., & Vázquez, M. (2010). Effect of washing with citric acid and packaging in modified atmosphere on the sensory and microbiological quality of sliced mushrooms (*Agaricus bisporus* L.). *Food Control*, **21** (6), 851-856.
- ❖ Singh, P., Langowski, H.C., Wani, A.A., & Saengerlaub, S. (2010). Recent advances in extending the shelf life of fresh *Agaricus* mushrooms: a review. *Journal of Science and Food Agriculture*, **90**, 1393-1402.
- ❖ Singh, R.P. (2001). Part I: Technical elements, Technical elements of new and emerging non-thermal food Technologies. *Food and Agriculture Organization*, Rome, Italy.
- ❖ Smelt, J.P.P.M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Food Science & Technology*, **9**, 152-158.
- ❖ Stamets, P. Growing gourmet and medicinal mushrooms. 3<sup>rd</sup>. ed. Berkeley, Calif.: Ten Speed Press, 2000.
- ❖ Stamets, P.; Chilton, J. S. The mushroom cultivator: a practical guide to growing mushrooms at home. Olympia, Wash: Agarikon Press; Western distribution by Homestead Book Co., 1983.
- ❖ Tangwongchai, R., Ledward, D.A., & Ames, J.M. (2000). Effect of high-pressure treatment on the texture of cherry tomato. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **48**, 1434-1441.
- ❖ Tao, F., Zhang, M. Hangqing, Y., & Jincai, S. (2006). Effects of diferente storage conditions on chemical and physical properties of white muhsrooms after vacuum cooling. *Jornal of Food Engineering*, **77**, 545-549.
- ❖ Téllez-Luis, S.J., Ramírez, J.A., Pérez-Lámela, C., Vázquez, M., & Simal-Gándarra, J. (2001). Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, **3**, 66-80.
- ❖ Terefe, N.S., Kleintschek, T., Gamage, T., Fanning, K.J., Netzel, G., Versteeg, C., & Netzel, M. (2013). Comparative effects of thermal and high pressure processing on phenolic phytochemicals in different strawberry cultivars. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **19**, 57-65.

- ❖ Tsai, S.-Y., Tsai, H.-L., & Mau, J.-L. (2007). Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. *LWT*, **40**, 1392-1402.
- ❖ USDA (2014), <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome> (acedido em Agosto 2014).
- ❖ Vaz, J.A., Barros, L., Martins, A., Morais, J.S., Vasconcelos, M.H., & Ferreira, I.C.F.R. (2011). Phenolic profile of seventeen Portuguese wild mushrooms. *LWT-Food Science and Technology*, **44**, 343-346.
- ❖ Venturini, M.E., Reyes, J.E., Rivera, C.S., Oria, R., & Blanco, D. (2011). Microbiological quality and safety of fresh cultivated and wild mushrooms commercialized in Spain. *Food Microbiology*, **28**, 1492-1498.
- ❖ Verlent, I., Hendrickx, M., Rovere, P., Moldenaers, P., & Van Loey, A. (2006). Rheological properties of tomato-based products after thermal and high-pressure treatment. *Journal of Food Science*, **71** (3), 243-248.
- ❖ Villaescusa, R., & Gil, M.I. (2003). Quality improvement of *Pleurotus* mushrooms by modified atmosphere packaging and moisture absorbers. *Postharvest Biology and Technology*, **28**, 169-179.
- ❖ Volden, J., Borge, G.I.A., Bengtsson, G. B., Hansen, M., Thygesen, I.E., & Wicklund, T. (2008). Effect of thermal treatment on glucosinolates and antioxidant-related parameters in red cabbage (*Brassica oleracea* L. ssp *capitata* f. *Rubra*). *Food Chemistry*, **109** (3), 595-605.
- ❖ Volden, J., Borge, G.I.A., Hansen, M., Wicklund, T., & Bengtsson, G.B. (2009). Processing (blanching, boiling, steaming) effects on the content of glucosinolates and antioxidant-related parameters in cauliflower (*Brassica oleracea* L. ssp *botrytis*). *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **42** (1), 63-73.
- ❖ Webster, J., & Weber, R.W.S. 2007. Introduction to Fungi, 3rd Edition. Cambridge University Press, United Kingdom.
- ❖ Wells-Bennik, M., Karatzas, K.A., Moezelaar, R., & Abee, T. (2008). *Listeria monocytogenes* High hydrostatic Pressure. Resistance and Survival Strategies. In Michielis, C., Bartlett, D.M., Aertsen, A, *High-Pressure Microbiology*, (pp.101-115). Washigton, E.U.A: ASM Press.
- ❖ Wolbang, C.M., Fitos, J.L., & Treeby, M.T. (2008). The effect of high pressure processing on nutritional value and quality attributes of *Cucumis melo* L. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **9**, 196-200.

- ❖ Yang, J.-H., Lin, H.-C., & Mau, J.-L. (2001). Non-volatile taste components of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*, **72**, 465-471.
- ❖ Yordanov, D.G., & Angelova, G.V. (2010). High pressure processing for foods preserving. *Biotechnol. & Biotechnol.*, **24**, 1940-1945.
- ❖ Yurttas, Z.S., Moreira, R.G., & Castell-Perez, E. (2014). Combined vacuum impregnation and Electron-Beam irradiation treatment to extend the storage life of sliced white mushrooms. *Journal of Food Science*, **79** (1), 39-46.
- ❖ Zhang, X. & Flurkey, W.H. (1997). Phenoloxidases in *Portabella* mushrooms. *Journal of Food Science*, **62**, 97-100.
- ❖ Zhang, X., Van Leeuwen, J., Wichers, H.J., & Flurkey, W. H. (1999). Characterization of tyrosinase from the cap flesh of *Portabella* mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 374-378.



# **Anexos**



**Anexo I**

Meios de cultura utilizados na análise microbiológica

**1. Plate Count Agar (PCA) – Meio para pesquisa de microrganismos aeróbios mesófilos e psicrófilos**

Triptona – 5g

Extrato de levedura – 2.50g/L

Dextrose – 1.00g/L

Agar – 15.00g/L

Água – 1000mL

pH final (25°C) –  $7.0 \pm 0.2$

Dissolveram-se 23.5g de meio em 1000 mL de água destilada. Ferveu-se para uma completa dissolução e esterilizou-se na autoclave a uma pressão de 15lbs a 121°C durante 15 minutos. Após arrefecer e agitar verteu-se nas placas.

**2. Dichloran Red Bengal Chloramphenicol (DRBC) – Meio para pesquisa de bolores e leveduras**

Peptona – 5.00g/L

Glucose – 10.00g/L

Fosfato monopotássico – 1.0g/L

Sulfato de Magnésio – 0,5 g/L

Dicloran – 0.002 g/L

Rosa-bengal – 0.025g/L

Agar – 15.00g/L

Cloranfenicol – 1.00g/L

pH final (25°C) –  $5.6 \pm 0.2$

Dissolveram-se 15,75g de meio e 0,05g de Cloranfenicol em 500 mL de água destilada. Ferveu-se para uma completa dissolução e esterilizou-se na autoclave a uma pressão de 15lbs a 121°C durante 15 minutos. Após arrefecer e agitar verteu-se nas placas.

### **3. Meio para pesquisa de esporos de Clostrídios sulfito redutores**

Agar – 30g

Solução de sulfito de ferro a 8% - 10 mL

Solução de glicose sulfito – 150 mL

Solução de sulfato de sódio a 8% - 20 mL

Alúmen de ferro – 20 gotas

Água destilada – 1000 mL

pH final (25°C) –  $7.6 \pm 0.1$

Dissolveram-se 30g de Agar em 10 mL de solução de sulfato de ferro em 1000 mL de água destilada e ferver. Após ebulição, adicionaram-se 150 mL de solução de glicose sulfito, previamente preparada. Ao meio fundido, juntaram-se 20 mL da solução de sulfato de sódio e 20 gotas de alúmen de ferro.

## Anexo II

**Tabela 18.** Valores médios  $\pm$  desvio padrão para o parâmetro SST ( $^{\circ}$ Brix) determinados para os diferentes tratamentos de conservação aos dias de análise estabelecidos.

Teor de Sólidos Solúveis ( $^{\circ}$ Brix) – Lote 1					
	Dias de Análise				
	0	3	7	14	21
C	4,97 $\pm$ 0,06 <sup>cB</sup>	5,50 $\pm$ 0,01 <sup>cC</sup>	4,70 $\pm$ 0,01 <sup>cA</sup>	4,67 $\pm$ 0,06 <sup>cA</sup>	4,93 $\pm$ 0,06 <sup>bB</sup>
P	6,80 $\pm$ 0,01 <sup>dB,C</sup>	6,43 $\pm$ 0,06 <sup>dA,B</sup>	6,93 $\pm$ 0,12 <sup>dD</sup>	7,57 $\pm$ 0,15 <sup>dE</sup>	6,13 $\pm$ 0,25 <sup>cA</sup>
A	2,70 $\pm$ 0,01 <sup>bD</sup>	1,83 $\pm$ 0,12 <sup>bA,B</sup>	2,50 $\pm$ 0,01 <sup>bC</sup>	2,03 $\pm$ 0,06 <sup>bB</sup>	1,77 $\pm$ 0,06 <sup>aA</sup>
AP	1,37 $\pm$ 0,06 <sup>aB</sup>	1,03 $\pm$ 0,06 <sup>aA</sup>	1,17 $\pm$ 0,06 <sup>aA</sup>	1,63 $\pm$ 0,06 <sup>aC</sup>	1,67 $\pm$ 0,06 <sup>aC</sup>

Teor de Sólidos Solúveis ( $^{\circ}$ Brix) – Lote 2					
	Dias de Análise				
	0	3	7	14	21
C	6,63 $\pm$ 0,12 <sup>cD</sup>	6,27 $\pm$ 0,06 <sup>cC</sup>	6,03 $\pm$ 0,06 <sup>cB,C</sup>	5,53 $\pm$ 0,15 <sup>cA</sup>	5,83 $\pm$ 0,15 <sup>cB</sup>
P	7,43 $\pm$ 0,12 <sup>dB,C</sup>	7,20 $\pm$ 0,17 <sup>dA</sup>	7,53 $\pm$ 0,12 <sup>dB,C</sup>	7,73 $\pm$ 0,15 <sup>dB</sup>	7,33 $\pm$ 0,06 <sup>dA</sup>
A	2,60 $\pm$ 0,17 <sup>bD</sup>	2,20 $\pm$ 0,10 <sup>bB,C</sup>	2,37 $\pm$ 0,06 <sup>bC,D</sup>	1,93 $\pm$ 0,12 <sup>bB</sup>	1,50 $\pm$ 0,01 <sup>bA</sup>
AP	1,37 $\pm$ 0,06 <sup>aB</sup>	1,20 $\pm$ 0,10 <sup>aA,B</sup>	1,13 $\pm$ 0,15 <sup>aA,B</sup>	1,37 $\pm$ 0,06 <sup>aB</sup>	1,13 $\pm$ 0,06 <sup>aA</sup>

<sup>a-d</sup> Média com letras diferentes indicadas em cada uma das colunas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

<sup>A-D</sup> Média com letras diferentes indicadas em cada uma das linhas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 19.** Valores médios  $\pm$  desvio padrão para o parâmetro pH determinado para os diferentes tratamentos de conservação aos dias de análise estabelecidos.

pH – Lote 1					
	Dias de Análise				
	0	3	7	14	21
C	6,31 $\pm$ 0,01 <sup>dA</sup>	6,49 $\pm$ 0,02 <sup>dB</sup>	6,99 $\pm$ 0,04 <sup>dC</sup>	7,04 $\pm$ 0,01 <sup>dC</sup>	7,46 $\pm$ 0,01 <sup>dD</sup>
P	6,13 $\pm$ 0,01 <sup>cA</sup>	6,21 $\pm$ 0,01 <sup>cC</sup>	6,18 $\pm$ 0,01 <sup>cB</sup>	6,24 $\pm$ 0,01 <sup>cD</sup>	6,33 $\pm$ 0,01 <sup>cE</sup>
A	5,27 $\pm$ 0,02 <sup>bC</sup>	5,22 $\pm$ 0,05 <sup>bA-C</sup>	5,25 $\pm$ 0,01 <sup>bC</sup>	5,10 $\pm$ 0,01 <sup>bA</sup>	5,17 $\pm$ 0,02 <sup>bB</sup>
AP	4,37 $\pm$ 0,03 <sup>aA</sup>	4,62 $\pm$ 0,02 <sup>aC</sup>	4,44 $\pm$ 0,01 <sup>aB</sup>	4,70 $\pm$ 0,02 <sup>aD</sup>	4,80 $\pm$ 0,01 <sup>aE</sup>

pH – Lote 2					
	Dias de Análise				
	0	3	7	14	21
C	6,66 $\pm$ 0,02 <sup>dA</sup>	6,73 $\pm$ 0,01 <sup>dB</sup>	6,95 $\pm$ 0,01 <sup>dC</sup>	6,97 $\pm$ 0,02 <sup>dC</sup>	7,37 $\pm$ 0,01 <sup>dD</sup>
P	6,46 $\pm$ 0,01 <sup>cA</sup>	6,45 $\pm$ 0,01 <sup>cA</sup>	6,53 $\pm$ 0,01 <sup>cB</sup>	6,51 $\pm$ 0,01 <sup>cB</sup>	6,55 $\pm$ 0,01 <sup>cC</sup>
A	5,48 $\pm$ 0,01 <sup>bB,C</sup>	5,31 $\pm$ 0,01 <sup>bA</sup>	5,51 $\pm$ 0,02 <sup>bC,D</sup>	5,47 $\pm$ 0,01 <sup>bB</sup>	5,52 $\pm$ 0,01 <sup>bD</sup>
AP	4,54 $\pm$ 0,01 <sup>aB</sup>	4,40 $\pm$ 0,01 <sup>aA</sup>	4,38 $\pm$ 0,02 <sup>aA</sup>	4,58 $\pm$ 0,02 <sup>aC</sup>	4,61 $\pm$ 0,01 <sup>aC</sup>

<sup>a-d</sup> Média com letras diferentes indicadas em cada uma das colunas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

<sup>A-D</sup> Média com letras diferentes indicadas em cada uma das linhas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 20.** Valores médios  $\pm$  desvio padrão de Textura determinados no chapéu para os diferentes tratamentos e ao longo dos diferentes dias.

Textura (kgf) – Chapéu – Lote 1					
Dias de Análise					
	0	3	7	14	21
C	1,55 $\pm$ 0,47 <sup>a,b</sup>	1,22 $\pm$ 0,37	0,93 $\pm$ 0,35 <sup>a,b</sup>	1,05 $\pm$ 0,25 <sup>b</sup>	1,09 $\pm$ 0,30
P	2,09 $\pm$ 0,47 <sup>a,b</sup>	1,39 $\pm$ 0,65 <sup>A,B</sup>	1,32 $\pm$ 0,38 <sup>b A,B</sup>	0,69 $\pm$ 0,36 <sup>a,b A</sup>	0,61 $\pm$ 0,40 <sup>A</sup>
A	1,43 $\pm$ 0,55 <sup>a A,B</sup>	0,68 $\pm$ 0,22 <sup>A,B</sup>	0,36 $\pm$ 0,18 <sup>a A,B</sup>	0,22 $\pm$ 0,08 <sup>a A</sup>	0,49 $\pm$ 0,06 <sup>B</sup>
AP	2,60 $\pm$ 0,55 <sup>b C</sup>	1,38 $\pm$ 0,36 <sup>B</sup>	0,39 $\pm$ 0,04 <sup>a A</sup>	0,31 $\pm$ 0,21 <sup>a A</sup>	0,46 $\pm$ 0,35 <sup>A</sup>

Textura (kgf) – Chapéu – Lote 2					
Dias de Análise					
	0	3	7	14	21
C	1,25 $\pm$ 0,36 <sup>B</sup>	1,32 $\pm$ 0,32 <sup>b B</sup>	1,34 $\pm$ 0,17 <sup>B</sup>	0,56 $\pm$ 0,07 <sup>b A</sup>	0,59 $\pm$ 0,25 <sup>A</sup>
P	1,31 $\pm$ 0,80 <sup>B</sup>	0,91 $\pm$ 0,35 <sup>a,b A,B</sup>	1,00 $\pm$ 0,73 <sup>A,B</sup>	0,11 $\pm$ 0,10 <sup>a A</sup>	0,08 $\pm$ 0,07 <sup>A</sup>
A	0,82 $\pm$ 0,26 <sup>B</sup>	0,47 $\pm$ 0,21 <sup>a A,B</sup>	0,73 $\pm$ 0,35 <sup>B</sup>	0,42 $\pm$ 0,11 <sup>b A,B</sup>	0,09 $\pm$ 0,11 <sup>A</sup>
AP	1,27 $\pm$ 0,43	0,78 $\pm$ 0,32 <sup>a,b</sup>	0,78 $\pm$ 0,36	0,59 $\pm$ 0,36 <sup>a,b</sup>	0,61 $\pm$ 0,24

<sup>a-d</sup> Média com letras diferentes indicadas em cada uma das colunas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

<sup>A-D</sup> Média com letras diferentes indicadas em cada uma das linhas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 21.** Valores médios  $\pm$  desvio padrão de textura (kgf) determinados no pé para os diferentes tratamentos e ao longo dos diferentes dias.

Textura – Pé – Lote 1					
Dias de Análise					
	0	3	7	14	21
C	4,19 $\pm$ 1,39	2,64 $\pm$ 0,84 <sup>a,b</sup>	3,55 $\pm$ 0,53 <sup>c</sup>	3,53 $\pm$ 1,13	3,64 $\pm$ 0,71 <sup>b</sup>
P	4,01 $\pm$ 0,62 <sup>B</sup>	2,87 $\pm$ 0,70 <sup>a,b A,B</sup>	3,06 $\pm$ 1,12 <sup>b,c A,B</sup>	1,80 $\pm$ 0,91 <sup>A</sup>	2,03 $\pm$ 0,88 <sup>a A</sup>
A	4,12 $\pm$ 0,62 <sup>B</sup>	2,00 $\pm$ 0,76 <sup>a A</sup>	1,23 $\pm$ 0,42 <sup>a A</sup>	1,76 $\pm$ 1,30 <sup>A</sup>	0,91 $\pm$ 0,50 <sup>a A</sup>
AP	3,59 $\pm$ 1,49 <sup>A,B</sup>	3,97 $\pm$ 0,97 <sup>b B</sup>	1,49 $\pm$ 0,85 <sup>a,b A</sup>	1,96 $\pm$ 0,96 <sup>A,B</sup>	1,30 $\pm$ 0,90 <sup>a A</sup>

Textura – Pé – Lote 2					
Dias de Análise					
	0	3	7	14	21
C	4,02 $\pm$ 0,78 <sup>B,C</sup>	4,91 $\pm$ 0,81 <sup>C</sup>	3,84 $\pm$ 0,30 <sup>B,C</sup>	3,02 $\pm$ 1,19 <sup>b A,B</sup>	1,88 $\pm$ 0,56 <sup>b A</sup>
P	5,19 $\pm$ 0,71 <sup>B</sup>	4,37 $\pm$ 1,44 <sup>A,B</sup>	2,76 $\pm$ 1,46 <sup>A,B</sup>	1,63 $\pm$ 0,36 <sup>a,b A</sup>	1,53 $\pm$ 0,32 <sup>b A</sup>
A	3,82 $\pm$ 0,94 <sup>B</sup>	2,65 $\pm$ 1,57 <sup>A,B</sup>	2,22 $\pm$ 1,31 <sup>A,B</sup>	0,59 $\pm$ 0,32 <sup>a A</sup>	0,37 $\pm$ 0,17 <sup>a A</sup>
AP	3,20 $\pm$ 1,44 <sup>A,B</sup>	3,92 $\pm$ 1,00 <sup>B</sup>	3,13 $\pm$ 0,46 <sup>A,B</sup>	1,71 $\pm$ 0,34 <sup>a,b A</sup>	1,62 $\pm$ 0,44 <sup>b A</sup>

<sup>a-d</sup> Média com letras diferentes indicadas em cada uma das colunas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

<sup>A-D</sup> Média com letras diferentes indicadas em cada uma das linhas diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).