

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PRESSÕES HIPERBÁRICAS NO CONTROLE DE MOFO
CINZENTO E DE MANCHA DE ALTERNARIA NA PÓS-
COLHEITA DE TOMATE DÉBORA**

**Vanessa Voigt Palaretti
Engenheira Agrônoma**

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PRESSÕES HIPERBÁRICAS NO CONTROLE DE MOFO
CINZENTO E DE MANCHA DE ALTERNARIA NA PÓS-
COLHEITA DE TOMATE DÉBORA**

Vanessa Voigt Palaretti

Orientador: Prof. Dr. Ben-Hur Mattiuz

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Inestroza-Lizardo

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Agronomia (Produção Vegetal).

P154p Palaretti, Vanessa Voigt
Pressões hiperbáricas no controle de mofo cinzento e de mancha de alternaria na pós-colheita de tomate Débora / Vanessa Voigt Palaretti. -- Jaboticabal, 2018
ix, 91 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
Orientador: Ben-Hur Mattiuz
Banca examinadora: Antonio de Góes, Eliane Aparecida Benato Rodrigues da Silva, Ricardo Alfredo Kluge, Rogério Falleiros Carvalho

Bibliografia

1. Atmosfera hiperbárica. 2. Enzimas antioxidantes. 3. Proteínas PR. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.9:635.64



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: PRESSÕES HIPERBÁRICAS NO CONTROLE DE MOFO CINZENTO E DE MANCHA DE ALTERNARIA NA PÓS-COLHEITA DE TOMATE DÉBORA

AUTORA: VANESSA VOIGT PALARETTI

ORIENTADOR: BEN-HUR MATTIUZ

COORIENTADOR: CARLOS ORLANDO INESTROZA LIZARDO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. BEN-HUR MATTIUZ
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Pesquisadora Dra. ELIANE APARECIDA BENATO RODRIGUES DA SILVA
Centro Experimental Central / Instituto Agronômico de Campinas / Campinas/SP

Prof. Dr. ANTONIO DE GÓES
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. RICARDO ALFREDO KLUGE
Departamento de Produção Vegetal / ESALQ / USP / Piracicaba/SP

Prof. Dr. ROGÉRIO FALLEIROS CARVALHO
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 04 de maio de 2018

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Vanessa Voigt Palaretti – nascida em Limeira, no dia 14 de setembro de 1984. Filha de Ademar Voigt e Elenira Silman Voigt. Iniciou o curso de Engenharia Agrônômica em janeiro de 2006, na Universidade Federal de São Carlos, que foi concluído em dezembro de 2010. Em janeiro de 2011 ingressou no curso de mestrado do Centro de Energia na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP) na área de Biologia na Agricultura e Meio Ambiente, o qual foi financiado pela CAPES. Recebeu o título de mestre em julho de 2013. Em agosto de 2014 iniciou o curso de Doutorado em Agronomia (Produção Vegetal) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, localizada na cidade de Jaboticabal - São Paulo, na linha de pesquisa em Pós-colheita, sendo bolsista da CAPES.

*Aos meus pais Ademar (in memória) e Elenira,
Que me ensinaram o valor da luta,
E a felicidade da conquista
Por não medirem esforços para a minha formação*

DEDICO

*Ao meu eterno companheiro, Luiz Fabiano,
Pela motivação e paciência nos momentos difíceis,
E ao nosso biscoito Laura,
Por ser a luz que ilumina minha vida*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

-À Deus e aos amigos do plano espiritual pelo auxílio e por sempre me guiarem pelo caminho do bem.

-À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior) por financiar a bolsa de doutorado.

-Ao professor Dr. Ben-Hur Mattiuz, por disponibilizar todos os recursos necessários para o desenvolvimento deste projeto.

-Aos colegas e amigos do Laboratório de Pós-colheita, especialmente a Vanessa Galati, Carol, Josi, João e Kelly, obrigado pela ajuda, convivência e aprendizado dentro e fora do Lab. Sucesso a vocês!

-Ao meu querido co-orientador Carlos Inestroza-Lizardo, por dividir essa difícil tarefa de trabalhar 'sob pressão'. Por toda a força e por ser aquele que sempre sabia do que estava falando. Por termos feito uma parceria nessa pesquisa e principalmente por toda a nossa vida. Serei eternamente grata a você!

-Aos meus Professores do curso de doutorado em Produção Vegetal, aos Funcionários da Seção de pós-graduação e do Departamento de Tecnologia, pelo auxílio e amizade.

-Aos meus queridos amigos, Larissa, Denise, Bia e Rogério pela amizade e pelos muitos momentos de alegria passados em Jabuka. Vocês são especiais, com certeza formamos uma família de coração!

-A minha tia Mila, por se fazer presente em todos os momentos, obrigada pela constante preocupação e apoio, e principalmente por todos os cuidados com a 'pequena falante'.

-A minha amada mãe, uma mulher incrível, um verdadeiro exemplo de bondade e doação pela família. Obrigada por toda a ajuda, apoio, compreensão e pelas muitas idas e vindas para cuidar do meu biscoito, e de nós também! Sua disposição é invejável! Vó, você é a melhor segunda mãe do mundo e a mais especial que a Laura poderia ter!

-Ao meu amado companheiro, Luiz Fabiano pelas sábias palavras de motivação, incentivo, paciência e conforto para eu cumprir esta etapa. E principalmente por compartilhar a sua vida comigo e dividir a responsabilidade de cuidar do anjinho que nos foi enviado. Todo o seu apoio na hora do banho, sono, comida e os intermináveis passeios sem a mamãe, foram fundamentais. Você é um Paizão de verdade! E meu eterno e verdadeiro companheiro, sem a sua ajuda nada disso seria possível! Admiro-te imensamente...e te amo cada dia mais.

-Ao meu biscoito falante, Laura, por encher meu coração de alegria e esperança todos os dias. Por me ensinar a amar incondicionalmente, ter mais e mais paciência e principalmente a ter fé acima de tudo. Seus incentivos finais (“Vanessa!, você está fazendo a sua tesinha?”) foram essenciais! Sou diariamente e extremamente grata por ter sua luz na minha vida! Você sempre será o meu maior amor!

-E àqueles que, embora não tenha citado os nomes, de uma forma ou de outra, contribuíram para tornar este momento possível.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Tomate	3
2.2 Doenças fúngicas na pós-colheita.....	5
2.2.1 Mofo cinzento - <i>Botrytis cinerea</i>	5
2.2.2 Mancha de <i>Alternaria</i> - <i>Alternaria</i> sp.	6
2.3 Controle de doenças na pós-colheita.....	7
2.3.1 Pressões hiperbáricas na pós-colheita.....	7
2.4 Mecanismos de ação envolvidos no controle de doenças na pós-colheita.....	10
2.4.1 Efeito direto	11
2.4.2 Efeito indireto ou indução de resistência.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Sistema hiperbárico.....	16
3.2 Isolados de <i>Alternaria</i> sp. e <i>Botrytis cinerea</i>	17
3.3 Material vegetal	19
3.4 Efeito de pressões hiperbárica no controle de <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Alternaria</i> sp. <i>in vitro</i>	19
3.5 Efeito de pressões hiperbáricas no controle de <i>Alternaria</i> sp. e <i>Botrytis cinerea</i> em	
tomates inoculados	20
3.5.1 Avaliações	21
3.6 Análise estatística	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Efeito de pressões hiperbáricas no controle de <i>Botrytis cinerea in vitro</i>	25
4.2 Efeito de pressões hiperbáricas no controle do mofo cinzento de tomates inoculados	
com <i>Botrytis cinerea</i>	27
4.3 Efeito de pressões hiperbáricas no controle de <i>Alternaria</i> sp. <i>in vitro</i>	53
4.4 Efeito de pressões hiperbáricas no controle da mancha de <i>alternaria</i> nos tomates	
inoculados com <i>Alternaria</i> sp.	56
5. CONCLUSÕES	80
6. REFERÊNCIAS.....	81

PRESSÕES HIPERBÁRICAS NO CONTROLE DE MOFO CINZENTO E DE MANCHA DE ALTERNARIA NA PÓS-COLHEITA DE TOMATE DÉBORA

RESUMO – As doenças fúngicas são as principais causas de perdas na pós-colheita do tomate, e são controladas por manejo cultural e fungicidas aplicados na pré-colheita. O tratamento hiperbárico na pós-colheita é um métodos físico, com potencial uso comercial na redução da deteriorização por fungos. Neste trabalho, a eficiência das pressões hiperbáricas para controlar o desenvolvimento das podridões de *Botrytis cinerea* e *Alternaria* sp. *in vitro* e em tomates ‘Débora’ foram avaliadas, bem como a atividade das enzimas antioxidantes e as relacionadas a defesa do vegetal. Os experimentos foram realizados em um sistema de pressão hiperbárica do Laboratório de Tecnologia Pós-colheita da FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, utilizando as pressões de 100 (controle), 200, 400, 600 e 800 kPa à temperatura de $23\pm 1^\circ\text{C}$, durante 3 e 6 dias. No ensaio *in vitro* as placas com os fungos permaneceram nas pressões e depois foram incubadas até que a colônia do controle atingisse a borda. No experimento *in vivo*, tomates inoculados com os fungos foram mantidos por 3 e 6 dias sob o tratamento nas pressões, com posterior armazenamento por mais 2 e 4 dias em condição de ambiente (23°C , 50% UR, 100 kPa) para simular a comercialização. Avaliou-se o crescimento micelial, a taxa de germinação dos conídios dos fungos, incidência e severidade das podridões nos frutos, o metabolismo antioxidante (teor de licopeno e polifenóis totais) e a atividade das enzimas relacionadas à defesa dos tomates (peroxidase (POD), fenilalanina-amônia-liase (PAL), β 1,3 glucanase (GLU), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). As pressões hiperbáricas não apresentaram efeito fungistático sobre os patógenos, entretanto, houve redução no crescimento micelial e na taxa de germinação de *B. cinerea* após 3 dias na pressão de 800 kPa. As pressões elevadas de 600 e 800 kPa durante 3 dias reduziram a incidência (25%) e a severidade do mofo cinzento (68%), após 4 dias de armazenamento (3+4 dias). Enquanto a incidência e severidade da mancha de *Alternaria* (*Alternaria* sp.) não tiveram redução expressiva em ambos os períodos. Na pressão de 800 kPa, os frutos inoculados com *B. cinerea* e *Alternaria* sp. apresentaram um retardo no amadurecimento, evidenciado pelo menor conteúdo de licopeno e menor atividade da enzima POD, a qual está relacionada à senescência dos frutos. As pressões elevadas (600 e 800 kPa) promoveram a atividade das enzimas PAL, GLU e CAT dos tomates inoculados de ambos os patógenos por 3 dias, mantendo tendência similar após as condições de ambiente. Os frutos tratados com as pressões elevadas apresentaram incremento no conteúdo de polifenóis totais em relação ao controle, durante os períodos de armazenamento. As pressões não influenciaram a atividade da enzima SOD dos tomates, após os períodos de tratamentos. As pressões hiperbáricas de 600 e 800 kPa foram eficientes na redução de doenças na pós-colheita de tomates e também podem ter induzido a atividade de enzimas envolvidas na resistência às doenças.

Palavras-chave: atmosfera hiperbárica, *Botrytis cinerea*, enzimas antioxidantes, proteínas PR, *Solanum lycopersicum* L.

HYPERBARIC PRESSURES IN THE CONTROL OF GRAY MOLD AND *ALTERNARIA* SPOT IN THE POSTHARVEST OF TOMATO DÉBORA

ABSTRACT – Fungal rots are one of the major causes of postharvest losses in tomatoes, and they are controlled by cultural management and fungicidal applied in preharvest. The postharvest hyperbaric treatment is a physical method that it have potential to be used in commercial for reducing fungal decay. In this work, the efficiency of hyperbaric pressures to control rot development of *Botrytis cinerea* and *Alternaria* sp. *in vitro* and ‘Debora’ tomatoes were evaluated, also the activity of antioxidant and defense-related enzymes. The experiments were carried out in a hyperbaric pressure system at FCAV-UNESP Postharvest Technology Laboratory, Campus de Jaboticabal, using the pressures of 100 (control), 200, 400, 600 and 800 kPa at a temperature of 23 ± 1 ° C for 3 and 6 days. *In vitro* assay the Petri dishes with the fungi were kept at pressures after they were incubated until the control colony reached the edge. *In vivo* assay, tomatoes inoculated with the fungus were kept at 3 and 6 days under the treatment pressures, after they were stored for more 2 and 4 days at ambient conditions (23 °C, 50% RH, 100 kPa) to simulate the commercialization. It was evaluated the mycelial growth, germination rate of fungal conidia, incidence and severity of fruit rot, antioxidant metabolism (lycopene content and total polyphenols) and activity of defence-related enzymes (peroxidase (POD), phenylalanine ammonia-lyase (PAL), β 1,3 glucanase (GLU), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT)). The hyperbaric pressures had no fungistatic effect on the pathogens, however, there was a reduction in mycelial growth and in the germination rate of *B. cinerea* after 3 days at 800 kPa. High pressures of 600 and 800 kPa for 3 days reduced the incidence (25%) and gray mold severity (68%) after 4 days of the storage (3 + 4 days). While the incidence and severity of black rot (*Alternaria* sp.) didn’t decrease significantly in both periods. At the pressure of 800 kPa, the fruits inoculated with *B. cinerea* and *Alternaria* sp. demonstrated a delay in ripening, as evidenced by the lower lycopene content and lower activity of the POD enzyme, which is related to fruit senescence. The high pressures (600 and 800 kPa) promoted the activity of the PAL, GLU and CAT enzymes of the tomatoes inoculated from both pathogens for 3 days, maintaining a similar trend after the ambient conditions. The fruits treated with high pressures demonstrated an increase in the total polyphenols content in relation to the control during storage periods. The pressures didn’t influence the activity of the SOD enzyme of the tomatoes, after the periods of treatments. Hyperbaric pressures of 600 and 800 kPa were efficient in reducing diseases in postharvest tomatoes and they must have induced the activity of enzymes involved in resistance to diseases.

Keywords: hyperbaric atmosphere, antioxidant enzymes, *Botrytis cinerea*, proteins RP, *Solanum lycopersicum* L.

1. INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das olerícolas mais cultivada e consumida no mundo (AZABOU et al., 2016). Possui elevado valor nutricional, principalmente por ser a principal fonte de licopeno e de outros compostos com atividade antioxidante, como vitamina A, C e flavonoides. Isso o torna um alimento funcional com importante papel na manutenção da saúde humana, associado especificamente à prevenção e combate a diversos tipos de câncer e de doenças cardiovasculares (DEL GIUDICE et al., 2015).

Os tomates da cv. Débora possuem excelentes características organolépticas, tornando-os preferidos para o consumo *in natura*, com consequente valoração comercial. Entretanto, os frutos desta cultivar apresentam a vida pós-colheita menor que os tomates 'longa vida', restrita a poucos dias. Além disso, por serem climatéricos, os frutos possuem atividade fisiológica acelerada, o que os tornam suscetíveis aos danos físicos e injúrias por patógenos e causam perdas de 25 a 42% na pós-colheita mundial de tomates (ZAPATA et al., 2008; ARAH et al., 2015).

Os principais patógenos na pós-colheita de tomates são o *Botrytis cinerea* e a *Alternaria* spp., os quais provocam o mofo cinzento e a macha de *Alternaria*, respectivamente, sendo consideradas as doenças mais severas (AHMED et al., 2016). O dano econômico atribuído a estes patógenos são enormes, incluindo perdas pré e pós-colheita em quantidade e qualidade, despesas com medidas de proteção de plantas nos campos e estufas e custos diretos e indiretos para varejistas e consumidores com resfriamento, para impedir o desenvolvimento nos fungos (DEAN et al., 2012).

Embora a aplicação de fungicidas químicos seja o método mais comum para controlar as podridões na pré-colheita dos tomates, seu uso na pós-colheita não é permitido em muitos países, inclusive no Brasil (MARI et al., 2014). Além disso, o aumento da resistência fúngica e a crescente preocupação dos consumidores com a saúde, meio ambiente e resíduo nos produtos frescos, tem impulsionado a busca por medidas alternativas no controle de doenças na pós-colheita com potencial uso comercial (ROMANAZZI et al., 2016).

A utilização de pressões hiperbáricas na pós-colheita (100 a 1000 kPa) é considerada uma técnica promissora, devido à eficiência na redução de infecções e danos causados por diversos patógenos. Em estudos prévios, Romanazzi et al. (2008) demonstraram que, em tomate cereja, a pressão hiperbárica de 150 kPa por 4 h à 20 °C reduziu a incidência da podridão marrom, mofo cinzento e azul, enquanto que em bagas de uva à pressão de 150 kPa por 24 h reduziu a incidência e severidade de *B. cinerea*. De acordo com Baba e Ikeda (2003), a pressão de 500 kPa por 5 dias controlou as podridões em pós-colheita de frutos de umê (*Prunus mume*). Liplap et al. (2014a) verificaram que a pressão de 850 kPa à 20 °C por 7 dias, inibiu o crescimento bacteriano de *Pseudomonas cichorii*, *P. carotovorum* e *P. marginalis*, porém a resposta foi dependente da espécie.

Além disso, as pressões hiperbáricas têm resultados promitentes no retardo dos mecanismos fisiológicos de amadurecimento e senescência de tomate (INESTROZA-LIZARDO et al., 2018), alface (LIPLAP et al., 2014), frutos de umê (BABA et al., 1999) e milho doce (LIPLAP et al., 2013a), possibilitando a manutenção da qualidade e um aumento da vida pós-colheita desses produtos.

A vantagem das pressões hiperbáricas, em relação aos demais métodos, é a homogeneidade de aplicação, pois agem de maneira instantânea e uniforme, independentemente do tamanho, forma ou composição do produto. Este processo utiliza apenas 2 a 6% da energia necessária na refrigeração, visto que a pressurização não precisa ser instantânea, necessitando de pouca energia para manter a pressão ao longo do armazenamento (GOYETTE et al., 2007, VIGNEAULT et al., 2012;).

Alguns pesquisadores têm sugerido que as pressões hiperbáricas podem afetar o crescimento dos patógenos pelo impacto direto da pressão elevada (SEGOVIA-BRAVO et al., 2012); e/ou provocar um estresse específico no vegetal, dando origem a respostas biológicas benéficas (*hormesis*), como o aumento da síntese de licopeno em tomates (Goyette et al., 2012b e Liplap et al., 2013b) e da produção de fitoalexinas, induzindo resistência contra patógenos, como o *B. cinerea* (ROMANAZZI et al., 2008).

Entretanto como as informações disponíveis sobre o efeito da pressão hiperbárica no crescimento de patógenos causadores de podridões em frutas e

hortaliças são limitadas, mais estudos são necessários para compreender os mecanismos fisiológicos e microbiológicos ligados à inativação dos patógenos, para confirmar a viabilidade dessa tecnologia para a aplicação comercial no controle de doenças na pós-colheita.

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência das pressões hiperbáricas no controle do crescimento de *B. cinerea* e *Alternaria* sp. *in vitro* e em tomates 'Débora', bem como os efeitos das pressões no conteúdo de licopeno e polifenóis totais, na atividade das enzimas relacionadas à defesa e enzimas antioxidantes desses tomates.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tomate

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das olerícolas de maior importância econômica e a segunda solanácea mais cultivada e consumida mundialmente, sendo apenas superada pela cultura da batata (AZABOU et al., 2016).

O Brasil ocupa a nona posição na produção mundial de tomates, detendo apenas 2,4% da produção global (FAOSTAT, 2018). Em 2016, o País produziu cerca de 4,15 milhões de toneladas de tomates, incluindo o segmento de indústria e de mesa, sendo os maiores produtores o estado de São Paulo e de Goiás, com respectivamente 20,8 e 32,0% de participação na produção nacional (AGRIANUAL, 2017). É o principal produto comercializado no Entrepasto do Terminal de São Paulo (ETSP-CEAGESP), liderando o *ranking* no setor de legumes, com 71 mil toneladas de tomates comercializados, o que corresponde a 33% do volume total de legumes no 1º trimestre do ano de 2017, com alta rentabilidade de R\$ 139,2 milhões (CEAGESP, 2018).

É uma olerícola que apresenta elevada aceitação pelos consumidores devido às diversas formas de preparo, podendo ser consumido em saladas, purês, molhos, doces, geleias ou sucos. Além disso, o tomate é benéfico à saúde, e seu consumo

está associado à diminuição no risco de diversas doenças como as cardiovasculares, os cânceres e o diabetes tipo 2. Os efeitos benéficos na manutenção da saúde são atribuídos à presença de compostos fitoquímicos, como os carotenoides (licopeno, β -caroteno e luteína), ácido ascórbico, flavonoides e ácidos fenólicos, os quais possuem alta atividade antioxidante, capaz de combater as lesões celulares provocadas pelos radicais livres (ABETE et al., 2013; DEL GIUDICE et al., 2015; NIRANJANA et al., 2015).

Do ponto de vista da conservação pós-colheita, o tomate é altamente perecível devido ao elevado conteúdo de água (90 a 95%) e por possuir a casca fina. Além disso, por serem frutos climatéricos, possuem elevada atividade metabólica, evidenciado pela taxa respiratória e produção de etileno, entrando em senescência rapidamente após a colheita (ZAPATA et al., 2008).

As principais perdas na qualidade dos tomates na pós-colheita estão associadas aos danos físicos, ao transporte e armazenamento inadequados e ação de agentes microbianos (CHITARRA; CHITARRA, 2005). O tomate é susceptível a vários patógenos, destacando-se o mofo cinzento e a mancha de alternaria, causadas por *Botrytis cinerea* e *Alternaria* sp. que são responsáveis por perdas econômicas consideráveis (WANG et al., 2010). Estes fungos estão entre os patógenos mais comuns e os responsáveis pela deterioração pós-colheita de tomates em todo o mundo (LIU et al., 2007; FAGUNDES et al., 2014).

Estes fatores influenciam negativamente a comercialização e causam perdas de qualidade de 25 a 42% na pós-colheita mundial de tomates (ARAH et al., 2015). Quando maduro, o tomate possui vida média de prateleira de 7 dias, com perdas variando entre 25% a 50%, enquanto que o fruto parcialmente maduro apresenta uma vida útil de até duas semanas, com 20% a 40% de perdas pós-colheita (CHIUMARELLI; FERREIRA, 2006).

Os tomates da cv. Débora possuem excelentes características organolépticas, tornando-os preferidos para o consumo *in natura*, com conseqüente valoração comercial. Entretanto, os frutos desta cultivar apresentam uma vida pós-colheita menor que os tomates 'longa vida', restrita a poucos dias.

2.2 Doenças fúngicas na pós-colheita do tomate

2.2.1 Mofo cinzento - *Botrytis cinerea*

O fungo *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. (Teleomorfo: *Botryotinia fuckeliana* de Bary, Whetz) é o agente causal do mofo cinzento, considerada uma das doenças mais comum e amplamente distribuída no mundo (AGRIOS, 2004). É responsável por perdas econômicas expressivas em mais de 200 espécies de plantas, principalmente quando são cultivadas em ambiente protegido (VAN-KAN, 2003).

Os principais sintomas causados por *B. cinerea* nos tomates são uma podridão mole, de coloração bege à cinzenta, que se desenvolve a partir do ápice do fruto ou do pedúnculo, geralmente coberta por um bolor cinzento. Outro sintoma do fungo é o aparecimento de “manchas fantasma”, que se caracterizam pela formação de um halo esbranquiçado com um ponto necrótico no centro (BAUTISTA-BAÑOS; MOLINA; BARRERA NECHA, 2014).

O fungo pode sobreviver saprofiticamente ou por meio de estruturas de repouso denominadas escleródios ou micélio dormentes. A esporulação abundante e a dispersão dos conídios pelo ar e pela água são uma constante ameaça para as culturas susceptíveis. Pode penetrar nos tecidos dos hospedeiros pela ação direta do apressório, mediada pela secreção de enzimas degradadoras da parede celular, ou por ferimentos (ELAD et al., 2015).

O fungo pode produzir infecções quiescentes, tornando-o não detectável durante a colheita, e assim tomates visualmente saudáveis, são armazenados e transportados em condições de temperatura entre 22 e 25 °C, as quais favorecem o seu desenvolvimento, tornando o controle deste patógeno um grande desafio para a pós-colheita dos tomates (TOLOFI et al., 2011, ELAD et al., 2015).

Por ser um patógeno necrotrófico, se estabelece e multiplica em tecidos mortos, colonizando posteriormente os tecidos vivos adjacentes, pela síntese de várias proteínas, envolvidas na degradação de diferentes estruturas e componentes celulares, e pela produção de espécies reativas de oxigênio, que causam danos nos componentes celulares. Porém, em resposta ao ataque do fungo, as plantas por meio da resposta de hipersensibilidade, induzem a produção de espécies reativas de

oxigênio (EROs) levando a morte celular, e assim favorecendo a infecção e colonização do fungo (CHOQUER et al., 2007; EL OIRDI et al., 2011).

2.2.2 Mancha de *Alternaria* - *Alternaria* sp.

A mancha de *Alternaria* é uma das doenças mais frequentes e importantes da cultura do tomateiro. É causada por fungos do gênero *Alternaria*, sendo a *Alternaria solani* e *Alternaria alternata* as espécies mais importantes e responsáveis por perdas econômicas consideráveis na pós-colheita de tomates, principalmente quando o período entre a colheita e o consumo for maior do que dois dias, e o produto for mantido em condição ambiente e sem refrigeração (OLIVEIRA et al., 2006).

Os sintomas típicos da doença nos frutos ocorrem no ponto de inserção do pedúnculo, como manchas escuras que se originam na região de ligação entre o cálice e os frutos. As manchas são geralmente de coloração marrom a preta, firmes, deprimidas e com a presença típica de anéis concêntricos. Plantas com deficiência em cálcio exibem frutos com lesões na região do pedúnculo, onde *Alternaria* sp. podem surgir, apodrecendo-os. De maneira geral, não se observam diferenças entre os sintomas causados pelas diferentes espécies de *Alternaria*, porém essas diferem quanto ao tamanho e morfologia dos conídios (OLIVEIRA et al., 2006; TÖFOLI et al., 2016).

O fungo pode sobreviver em restos culturais, matéria orgânica e em hospedeiros intermediários, por períodos prolongados. A disseminação ocorre essencialmente pela ação de insetos, vento, sementes e implementos agrícolas. (TÖFOLI et al., 2013). As condições de temperatura entre 28 °C e 30 °C e umidade relativa maior que 40 % favorecem o desenvolvimento do fungo, o qual penetra no hospedeiro através da cutícula ou parede celular após a formação do apressório, por meio de ferimentos e/ou pelos estômatos. A colonização é intercelular, invadindo tecidos do hospedeiro e provocando alterações em diversos processos fisiológicos, que se manifestam na forma de sintomas (KUROZAWA, PAVAN, 2005; TÖFOLI et al., 2013).

2.3 Controle de doenças na pós-colheita

Para reduzir a deteriorização de frutas e hortaliças na pós-colheita causados por patógenos (*B.cinerea* e *Alternaria* spp.), o controle químico, com a aplicação de fungicidas sintéticos na pré-colheita, ainda permanece como a principal medida para reduzir a incidência de doenças durante a pós-colheita. Este apresenta uma série de desvantagens, como elevação no custo de produção, perigos aos manipuladores, preocupação acerca de resíduos em alimentos, impacto negativo ao ambiente e na saúde humana, além da resistência dos patógenos (FELIZIANI et al., 2013).

Diante da preocupação pública destes riscos existe a necessidade de desenvolver métodos alternativos para controlar o mofo cinzento e a mancha de *Alternaria* na pós-colheita de frutas e hortaliças que sejam mais seguros, eficazes e econômicos, reduzindo o impacto sobre o meio ambiente e a saúde. Em geral, o controle de doenças na pós-colheita é um grande desafio para os pesquisadores. Como medida alternativa aos fungicidas sintéticos convencionais tem se estudado tratamentos físicos, químicos ou biológicos (PALOU et al., 2008).

Vários métodos alternativos já foram avaliados para o controle do desenvolvimento de *B. cinerea* e *A. solani* em tomates, dos quais incluem a aplicação de calor (ZHAO et al., 2014; WEI et al., 2017), uso de radiação ionizante (CHARLES et al., 2009), controle biológico (WANG et al., 2010), quitosana (GUERRA et al., 2015) e uso coberturas comestíveis com propriedades antifúngicas (FAGUNDES et al., 2014, 2015).

Porém, não há relatos sobre o uso de tratamento físico com pressões hiperbáricas no controle de doenças fúngicas na pós-colheita de tomates.

2.3.1 Pressões hiperbáricas na pós-colheita

Na pós-colheita, o uso de pressões hiperbáricas tem sido considerado um método físico promissor para a conservação de frutas e hortaliças. Esta técnica consiste em submeter os produtos frescos a pressão de 100 a 1000 kPa, utilizando-se para isto um fluxo constante de ar comprimido, por um período de algumas horas ou dias (GOYETTE et al., 2012a).

A principal vantagem da utilização das pressões hiperbáricas em relação aos demais métodos físicos (UV e calor), é que estas agem de maneira instantânea e uniforme em torno do produto, independente do seu tamanho, forma e composição, além de serem microbiologicamente seguras (VIGNEAULT et al., 2012). Além disso, são mais eficientes na utilização de energia, a qual é requerida somente durante a compressão e descompressão, permitindo que os produtos sejam estocados com um custo menor de energia e menor pegada de carbono, em relação à refrigeração convencional (BERMEJO-PRADA; OTERO, 2016).

Pesquisas recentes demonstraram que a pressão hiperbárica promoveu efeitos benéficos na fisiologia e na manutenção da qualidade de algumas frutas e hortaliças quando armazenados em temperatura ambiente (20 °C) e em ambiente refrigerado (< 13 °C). Baba et al. (2008) reportaram que os frutos de umezeiro (*Prunus mume* L.) mantidos a 500 kPa durante 10 dias à 4 °C apresentaram redução na perda de massa, um aumento nos danos pelo frio e na produção de etileno e CO₂. Porém, o mesmo tratamento (500 kPa) provocou um aumento nos distúrbios causados pelo frio, com um severo escurecimento das folhas de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) após 3 dias de armazenamento à 4 °C.

O tratamento hiperbárico foi proposto como alternativa para alfaces armazenadas por um curto período sem refrigeração (LIPLAP et al., 2014a). Os autores observaram que alfaces submetidas a 850 kPa durante 5 dias à 20 °C, apresentaram taxas respiratórias estáveis, maior turgescência, conteúdo de clorofila e qualidade visual, em relação aquelas não tratadas (100 kPa a 20 °C)

Tomates tratados com 900 kPa durante 15 dias a 13 °C, tiveram redução na taxa respiratória e no amadurecimento, porém os danos fisiológicos foram irreversíveis, quando comparados ao controle (100 kPa/13 °C). Já as pressões de 500 e 700 kPa por 10 dias à 13 °C influenciaram positivamente a qualidade dos tomates, devido a redução da perda de peso, manutenção da firmeza dentro dos critérios de comercialização, e ao aumento no conteúdo de licopeno (GOYETTE et al., 2012).

Resultados similares do efeito positivo na qualidade dos tomates submetidos a pressões hiperbáricas, em temperatura ambiente foi verificado por Liplap et al. (2013b). Os autores verificaram que tomates sob pressão de 700 a 900 kPa durante

4 dias à 20 °C, mesmo com taxas respiratórias maiores que ao tratamento usado comercialmente (100 kPa/13 °C), apresentaram respostas similares a este em alguns atributos de qualidade, como maior turgidez e um atraso no aparecimento da cor vermelha, devido a menor síntese de licopeno.

Estes resultados demonstraram que o tratamento hiperbárico aplicado a diferentes frutas e hortaliças pode ter uma complexa diversidade de respostas fisiológicas e as condições ideais para preservá-las podem ser diferentes, dependendo do produto. Além dos efeitos na qualidade de frutas e hortaliças, estudos recentes evidenciam que o crescimento dos microrganismos causadores de podridões nestes produtos também pode ser afetado pelas pressões hiperbáricas.

De acordo com Baba; Ikeda, (2003), a pressão de 500 kPa por 5 dias à 20 °C controlou as podridões em pós-colheita de frutos de umê (*Prunus mume*). Romanazzi et al. (2008) verificaram que o tratamento hiperbárico (150 kPa à 20 °C) aplicado em cerejas por 4 h reduziu em 38,4% a incidência de podridão marrom (*Monilinia laxa*), 81% o mofo cinzento (*B. cinerea*), 56,5% o mofo azul (*Penicillium expansum*) e 49,9% as podridões totais (mofo cinzento e azul, podridão marrom e podridões de *Alternaria*, *Rhizopus* e *Cladosporium*), em relação ao controle. No mesmo trabalho, bagas de uvas submetidas à mesma pressão por 24 h, e em seguida inoculadas com o fungo *B. cinerea*, apresentaram redução na percentagem de frutos infectados de 49% para 30,8%, e redução no diâmetro da lesão de 8,7 para 7,2 mm.

De acordo com LIPLAP et al. (2014a), o tratamento hiperbárico (200-850 kPa à 20 °C, por 7 dias) teve um efeito na inibição do crescimento bacteriano de *Pseudomonas cichorii* a *P. carotovorum* e *P. marginalis* isoladas de alface, em relação ao controle (100 kPa, 20 °C). No entanto, a resposta ao tratamento foi dependente da espécie de bactéria, sendo a *P. cichorii* a mais sensível, seguida da *P. carotovorum* e *P. marginalis*.

Neste sentido, o tratamento de frutas e hortaliças com pressões hiperbáricas pode ser considerado uma alternativa viável e promissora ao tratamento químico convencional contra patógenos na pós-colheita, uma vez que os consumidores estão cada vez mais preocupados com a segurança alimentar, preferindo alimentos livres

de resíduos químicos, agentes patogênicos e toxinas microbianas, além de trazer benefícios à saúde na forma de compostos funcionais (CHARLES et al., 2009).

Porém, os mecanismos de ação do tratamento hiperbárico sobre o crescimento de microrganismos não estão completamente elucidados. Em infecções naturais em morangos, Romanazzi et al. (1999) verificaram que a pressão de 150 kPa não controlou o mofo cinzento e a podridão de *Rhizopus* em morangos. Resultados semelhantes foram encontrados por Liplap et al. (2013), cujas pressões entre 300 e 900 kPa à 20 °C não tiveram na redução da população microbiana encontrada naturalmente na casca de abacate 'Hass' depois de 7 dias, quando comparadas com o tratamento controle (100 kPa à 5° C e 20 °C).

Alguns pesquisadores têm sugerido hipóteses dos mecanismos de ação das pressões hiperbáricas na redução do crescimento dos microrganismos: i) pelo impacto direto da pressão elevada nos microrganismos (SEGOVIA-BRAVO et al., 2012) e ii) pelo incremento na síntese de compostos de defesa nos hospedeiros, induzidos por um estresse benéfico (*hormesis*), semelhante ao que ocorre nos tratamentos de calor e UV (ROMANAZZI et al., 2016; USALL et al., 2016).

Como as informações disponíveis sobre o efeito da pressão hiperbárica no crescimento de fungos causadores de podridões em frutas e hortaliças são limitadas, estudos são cada vez mais necessários para compreender os mecanismos ligados à inativação dos mesmos, bem como as respostas em termos de fisiologia dos patógenos precisa ser explorada para confirmar as vantagens dessa tecnologia para a aplicação comercial.

2.4 Mecanismos de ação envolvidos no controle de doenças na pós-colheita

Alguns tratamentos empregados na pós-colheita de vegetais frescos são capazes de induzir condições de estresse específico ou benéfico (*hormesis*), capazes de estender o armazenamento e a vida útil.

Por isso, pesquisas recentes têm se preocupado com a compreensão dos mecanismos pelos quais os estresses abióticos e bióticos afetam a qualidade das frutas e hortaliças durante a pós-colheita (PEDRESCHI; LURIE, 2015).

Além disso, os diversos tratamentos físicos para o controle de doenças possuem diferentes mecanismos de ação. Alguns métodos afetam diretamente o patógeno ou o hospedeiro, enquanto outros podem atuar indiretamente, através do estímulo da resistência de defesa do hospedeiro. Esses dois modos de ação podem atuar simultaneamente.

2.4.1 Efeito direto

a) Efeito no patógeno

Liplap et al. (2014a) afirmaram que o tratamento hiperbárico tem potencial para reduzir diretamente o crescimento de bactérias causadoras de podridões na pós-colheita de frutas e hortaliças. Eles verificaram que três espécies bacterianas (*Pseudomonas cichorii*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas marginalis*) isoladas de alface tiveram redução no crescimento *in vitro* com o aumento da pressão (200-850 kPa) durante 7 dias a 20 °C, quando comparada com o controle (100 kPa). A pressão de 850 kPa foi considerada o melhor tratamento, permitindo a redução de 71% no crescimento de *P. cichorii*, 56% de *P. carotovorum* 43% de *P. marginalis*, indicando que a *P. cichorii* foi a mais afetada pela pressão. Além disso, após o tratamento hiperbárico, os autores avaliaram o crescimento bacteriano *in vitro* por 3 dias à 20° C (100 kPa), e verificaram que as bactérias *P. carotovorum* e *P. marginalis* não retomaram seu crescimento. Isto demonstra que o tratamento hiperbárico não só proporciona uma inibição direta no crescimento bacteriano, mas também pode ter um efeito fungistático, porém a magnitude é dependente da espécie bacteriana. Esse efeito pode ser atribuído aos danos às macromoléculas celulares vitais das bactérias causadas pelo excesso de EROs, que inibe permanentemente o crescimento de patógenos (PAIVA; BOZZA, 2014).

Outros métodos físicos têm sido amplamente investigados no controle de fungos e bactérias *in vitro* comuns na pós-colheita de tomates. Segundo Amer et al. (2013) a exposição de disco da colônia ao ar quente (48 °C por 72 h) inibiu diretamente o desenvolvimento de *B. cinerea* e *A. alternata*, enquanto que a germinação dos esporos foi inibida à 58 °C com 6 e 8 min de exposição,

respectivamente. De acordo com Zhao et al. (2010) o tratamento térmico à 38 °C por 24 h inibiu completamente o crescimento micelial de *B. cinerea* e reduziu o crescimento em 65% e 62%, respectivamente de *A. alternata* e *Rhizopus stolonifer*, com mudanças morfológicas visíveis em *R. Stolonifer*, como hifas e esporos enrugados, escassos e deformados, após o tratamento térmico.

b) Efeito no hospedeiro

As doenças na pós-colheita influenciam diretamente os processos fisiológicos e bioquímicos dos vegetais. Na maioria dos casos, os esporos fúngicos germinam nos frutos e hortaliças após uma diminuição da resistência endógena devido ao amadurecimento e a senescência (VILANOVA et al., 2014). Portanto, quaisquer atrasos nestes processos podem inibir o crescimento dos fungos, estendendo a vida útil de prateleira dos produtos vegetais.

Vários trabalhos consideram a aplicação do tratamento hiperbárico capaz de retardar o processo de amadurecimento e prolongar a vida útil de alguns vegetais. Em tomates, a taxa respiratória diminuiu com o aumento de pressão (300-900 kPa a 20 °C por 4 dias), causando atraso no processo de amadurecimento, confirmado pela menor perda de massa, maior firmeza, retenção da cor e menor teor de licopeno (LIPLAP et al., 2013b), portanto esse tratamento poderia reduzir a carga microbiana dos frutos.

Recentemente, estudos relatam resultados positivos na manutenção da qualidade do tomate com a utilização de outros métodos físicos, como a aplicação de luz UV-C, a qual foi capaz de adiar o início do pico de produção de etileno e diminuir a taxa respiratória, retardando assim o processo de amadurecimento de tomates (TIECHER et al., 2013). Além disso, este tratamento pode contribuir para a manutenção dos principais atributos de qualidade como cor, textura e conteúdo de licopeno, e consequentemente inativação/eliminação da carga microbiana dos tomates (CHARLES et al., 2009; PINHEIRO et al., 2015).

2.4.2 Efeito indireto ou indução de resistência

A indução de resistência de plantas consiste em evitar ou atrasar a entrada e/ou subsequente atividade do patógeno, pela ativação de barreiras físicas e/ou bioquímicas estimuladas por agentes indutores (WALTERS et al., 2013). Estes podem ser classificados quanto a sua origem em agentes bióticos (fungos, bactérias, vírus e insetos) e abióticos (químicos e físicos), podendo desencadear uma rápida ativação dos mecanismos inativos ou latentes, com uma expressão de resposta de defesa apropriada (PIETERSE et al., 2013).

Esta ativação da resistência pode ser por dois tipos: a resistência sistêmica adquirida (SAR) ou resistência sistêmica induzida (SIR), as quais diferem pela natureza do agente indutor, sítio de atuação (sinalização) e as respostas bioquímicas desencadeadas até o estabelecimento da resistência de caráter sistêmica, apresentando, contudo, respostas fenotípicas semelhantes (STANGARLIN et al., 2011). Em SAR ocorre o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (RP), pela via metabólica do ácido salicílico quando induzida por elicitores abióticos e bióticos. Por outro lado, na SIR não há o acúmulo das proteínas RP e sua indução parece estar associada à rota de sinalização do ácido jasmônico e do etileno, desencadeado por agentes bióticos (WALTERS et al., 2013; BOSTOCK et al., 2014).

Dentre os mecanismos relacionados à resistência sistêmica adquirida (SAR), estresses abióticos e o reconhecimento de um patógeno pela planta, pode ocasionar um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) (GILL; TUTEJA, 2010). Em altas concentrações as EROs, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}), reagem com importantes constituintes celulares, tais como ácidos nucleicos, fosfolipídios de membrana (camada bipolar) e proteínas, podendo causar a peroxidação lipídica, danos na membrana e inativação de enzimas chaves, resultando em diversos efeitos tóxicos às células (GONZALEZ-AGUILAR et al., 2010, PETROV et al., 2015).

Dessa forma, para evitar os danos causados pelo estresse oxidativo, as plantas desenvolveram um sistema de defesa que envolve compostos metabólicos não enzimáticos (flavonoides, ligninas, ácido ascórbico, α -tocoferol, betacaroteno,

licopeno e polifenóis) e enzimáticos como a superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT) e glutathione redutase (GR) (GONZALEZ-AGUILAR et al., 2010).

As peroxidases (POD) (EC 1.11.1.7) são enzimas envolvidas em diversas reações celulares, como a oxidação de compostos fenólicos, ligação de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético, de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, além de estarem fortemente relacionadas com mecanismos de defesa contra os patógenos e/ou a vários estresses abióticos (LEE et al., 2001). Nos processos de defesa, o papel da POD é reforçar a parede celular a partir da formação de lignina, suberina e polissacarídeos, aumentar a produção de EROs que apresentam ação antimicrobiana, bem como atuar na sinalização para a formação de fitoalexinas (MITTLER et al., 2002).

Outra enzima relacionada com estresse abiótico e infecção por patógenos é a fenilalanina amônia liase (PAL) (EC 4.1.3.5), podendo ser utilizada como um excelente indicador da resistência de plantas a estes estresses (VOGT, 2010). A PAL está envolvida na síntese de fenilpropanóides, que leva à conversão de fenilalanina em ácido trans-cinâmico com a eliminação de amônia, na regulação do acúmulo de lignina conferindo maior resistência à parede celular das plantas aos patógenos e na síntese de fenóis (LEWIS, et al., 1992; GONZALEZ-AGUILAR et al., 2010).

A superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) atua no início da defesa antioxidante nas células vegetais, catalisando a dismutação do íon superóxido ($O_2^{\cdot-}$), gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidrogênio molecular. Esta enzima tem papel importante na defesa contra as EROs no interior das células, pois atua na remoção do radical superóxido, reduzindo o risco de oxidação (MITTLER et al., 2002; BHATTACHARJEE, 2010).

A catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) é outra enzima importante do sistema de defesa em plantas. Como resposta antioxidativa esta enzima decompõe o H_2O_2 gerado nos peroxissomos durante a fotorrespiração, reduzindo-o à água e ao oxigênio. A atividade da CAT é efetiva principalmente em concentrações relativamente altas de H_2O_2 (mM), por isso são consideradas indispensáveis para a

desintoxicação de EROs, especialmente em condições de estresse severo, quando os níveis de H_2O_2 estão maiores (DUBEY, 2011).

As β -1,3 glucanases (E.C. 3.2.1.6) são enzimas que são capazes de catalisar a clivagem das ligações β -1,3-glucosídicas em β -1,3-glucano, composto esse, que juntamente com a quitina, são os principais constituintes estruturais da parede celular da maioria dos fungos. Além disso, as β -1,3 glucanases tem um efeito direto na defesa contra os fungos, pois a partir do momento que o fungo penetra na célula, a enzima acumulada nos vacúolos é liberada para a lamela média restringindo a ação do patógeno, pela hidrólise da parede celular (EL GHAOUTH et al., 2003).

Além disso, as β -1,3 glucanases tem um efeito indireto na defesa das plantas, devido a liberação de fragmentos glicosídicos, os quais podem atuar como elicitores de defesa do hospedeiro, ativando a produção de outras proteínas relacionadas a patogênese (PR) ou síntese de compostos antifúngicos, como as fitoalexinas (SHI et al., 2006, VAN LOON et al., 2006).

Os compostos fenólicos se originam do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além de atuarem como agente antimicrobiano e contribuírem para a pigmentação (NACZK, M.; SHAHIDI, 2004). O acúmulo de compostos fenólicos específicos é induzido em resposta ao estresse biótico e abiótico, e estes metabólitos são referidos como fitoalexinas, as quais possuem amplo espectro de ação contra os patógenos e sua acumulação em plantas pode promover a resposta de defesa do hospedeiro (ANTON et al., 2017). Nos tomates, os ácidos clorogênicos e compostos relacionados são os principais compostos fenólicos além dos flavonóides, os quais possuem uma série de propriedades benéficas para a saúde relacionadas à atividade antioxidante. De modo geral, os compostos fenólicos contribuem nas propriedades organolépticas, nutricionais e farmacológicas dos tomates (GÓMEZ-ROMERO et al., 2018).

Estudos recentes demonstram que o tratamento hipobárico (50 KPa por 4 h) é capaz de reduzir a severidade e incidência de doenças fúngicas em morango armazenados à 20 °C (HASHMI et al., 2013). Os autores demonstraram que o tratamento hipobárico não teve efeito direto nos patógenos (*B. cinerea* e *R. stolonifer*), no entanto, o aumento da atividade das enzimas relacionadas com a defesa, como PAL, quitinase e POD, indica que o possível mecanismo de ação do

tratamento hipobárico envolvido no controle da doença seja a indução de resistência.

Os mecanismos de ação do tratamento hiperbárico não estão completamente elucidados, mas sabe-se que este tratamento modificou o acúmulo de licopeno em tomates, reduzindo o durante o armazenamento e aumentando em 26% por ocasião do amadurecimento dos frutos (LIPLAP et al., 2013b).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Sistema hiperbárico

Os experimentos *in vitro* e *in vivo* foram conduzidos utilizando um sistema de pressão hiperbárica esquematizado por Goyette et al. (2011) e Liplap et al. (2013), representado na Figura 1. O equipamento é formado por seis câmaras de aço inox com um volume interno de 10,75 L, as quais são ligadas a um circuito aberto, pelo qual um fluxo constante de ar comprimido circula para manter as concentrações de oxigênio (21%) e de nitrogênio (78%) constantes. Durante a condução dos experimentos, o dióxido de carbono foi adsorvido pela passagem prévia do fluxo por uma câmara apropriada, contendo óxido de cálcio. Cada câmara foi vedada com uma tampa de aço parafusada, sendo que na entrada e saída de cada uma foi instalado um regulador de pressão e de fluxo de ar, respectivamente. Uma válvula de segurança também foi instalada na tampa para impedir qualquer excesso acidental de pressão. A entrada da câmara foi conectada a um tanque de ar comprimido com capacidade para 250 L (Schulz, mod. MSV 20 MAX, Joinville, SC) para fornecimento de ar.

Um fluxímetro foi utilizado para medir o fluxo de ar (Bronkhorst™, Ruurlo, Netherlands) com intervalo de medição de 5 a 2.000 mL min⁻¹ ±12 mL min⁻¹. Para medir a concentração de CO₂ foi utilizado um analisador infravermelho de gases (Guardian® Plus, Kirk-ton Campus, Livingston, England) com intervalo de medição de 0 a 2000 ppm ± 40 ppm.

O medidor de fluxo do ar, a válvula de controle e o analisador do gás CO₂, foram ligados a uma placa de controle e de aquisição de dados (Personnel DAQ 3000, Cleveland, OH, USA) de um computador portátil. O software (DasyLab®, Measurement Computing Corporation TM, Norton, MA, USA) foi usado para registrar a pressão, a taxa de fluxo de ar, o nível de CO₂, calculando assim, a taxa respiratória em tempo real.

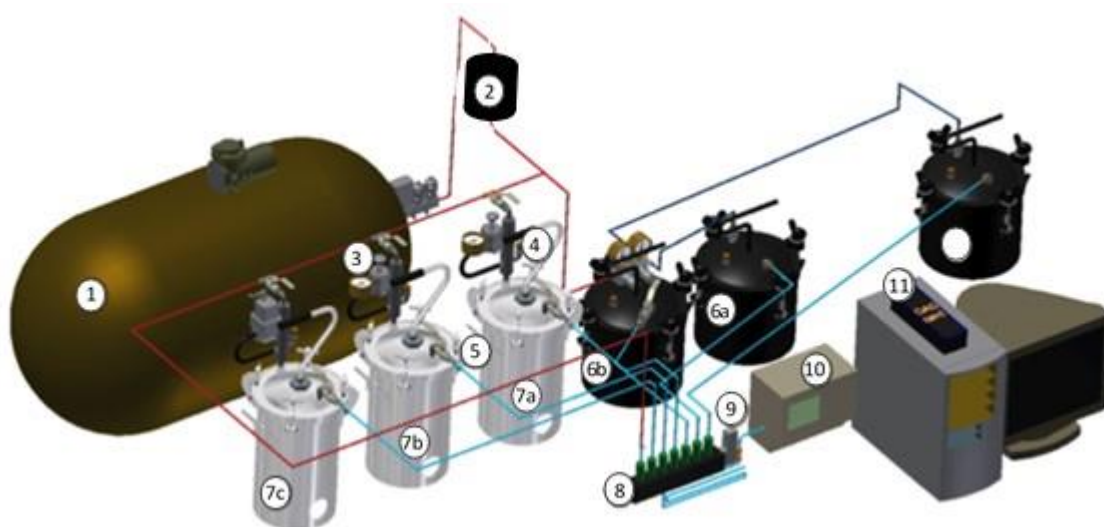


Figura 1. Esquema do sistema de pressão hiperbárica utilizado para a realização dos experimentos: 1. Compressor; 2. Depurador de CO₂; 3. Regulador de pressão; 4. Válvula de segurança; 5. Válvula de controle de fluxo; 6a. Câmara para pressão ambiente (100 kPa); 6b. Câmara para pressão de 200 kPa; 7a,b,c. Câmara para pressão de 400, 600 e 800 kPa, respectivamente; 8. Conjunto válvula-coletor; 9. Medidor de fluxo de ar; 10. Analisador infravermelho de gás; 11. Placa de aquisição de dados e computador.

3.2 Isolados de *Alternaria* sp. e *Botrytis cinerea*

Na obtenção do isolado de *Alternaria* sp. foram utilizados frutos provenientes da plantação comercial de tomates, cv. Débora, coletados da região de Ribeirão Preto. Estes foram acondicionados individualmente em embalagens plásticas tampadas com algodão umedecido, mantidos a temperatura média de 25±1 °C. Por meio do isolamento indireto, foram retirados fragmentos de tecido da região limítrofe (entre a área sadia e a lesionada), os quais foram submetidos à desinfecção superficial em álcool etílico 70% por 1 min e em solução de hipoclorito de sódio (1%)

por 3 min. Após a desinfecção, os fragmentos foram enxaguados em água destilada esterilizada por 1 min, e secos em papel de filtro.

Os fragmentos foram depositados em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar, DB DifcoTM), mantidas à temperatura de 26 ± 1 °C e 12 h de fotoperíodo por 10 dias. Para conservação dos isolados, foram retirados discos da colônia de 5 mm da borda da cultura e colocados em tubos Falcon com água destilada esterilizada para a conservação e manutenção das colônias à temperatura de 23 °C.

Para estimular a produção de esporos de *Alternaria* sp. para os experimentos, foi adaptada a metodologia proposta por Moretto e Barreto (1997), com a realização de injúrias na colônia. Decorridos 10 dias de crescimento, as hifas aéreas das colônias foram raspadas com o auxílio da alça de Drigalsky e mantidas por 3 dias incubadas em estufa tipo BOD à temperatura de 26 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 h.

A suspensão de conídios foi preparada colocando-se água destilada esterilizada com 0,01% de Tween20 sobre a superfície da colônia, com o auxílio da alça de Drigalsky foi feita a raspagem superficial da colônia. A solução foi filtrada em gaze estéril para retenção das hifas, e a quantidade de conídios da solução foi determinada pela contagem em hemocitômetro (câmara de Neubauer), sendo a suspensão conidial do patógeno ajustada para a concentração de 2×10^5 conídios mL⁻¹.

Foi utilizado o isolado de *Botrytis cinerea* de tomateiro proveniente da coleção da micoteca do Instituto Biológico de São Paulo (MMBF 47/13). O patógeno foi cultivado em meio BDA por 10 dias, à 20 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 h. Após este período, a suspensão de conídios foi obtida pela raspagem superficial da colônia com 10 ml de água destilada e esterilizada, contendo 0,01% de Tween20, seguida pela filtragem em gaze estéril. A contagem de conídios presentes na solução foi realizada com o auxílio do hemocitômetro e a concentração ajustada em 2×10^5 conídios mL⁻¹.

3.3 Material vegetal

Foram utilizados tomates da cv. Débora, provenientes de produções comerciais da região de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil (21°20'18" S e 47°43'58" O, 793 m de altitude), colhidos no estágio verde-maturo, segundo a classificação de López-Camelo e Gómez (2004).

Os frutos foram transportados para o Laboratório de Tecnologia Pós-Colheita da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, SP. No laboratório, foram lavados com água potável e detergente neutro, sanitizados em solução de Dicloro S. Triazinatriona Sódica Dihidratada (Sumaveg®) a 200 mg L⁻¹ por 5 min. Foram colocados à temperatura ambiente (23 °C), para secagem do excesso de água e redução da temperatura. Para garantir a homogeneidade dos lotes, antes dos tratamentos, os frutos foram selecionados pelo tamanho, forma, coloração e ausência de defeitos.

3.4 Efeito de pressões hiperbáricas no controle de *Botrytis cinerea* e *Alternaria* sp. *in vitro*

Transferiu-se, individualmente, discos da colônia de cada isolado, com 5 mm de diâmetro, retirados da borda das colônias com 10 dias de cultivo, para o centro das placas de Petri contendo o meio BDA.

Após a repicagem, 15 placas foram colocadas em cada câmara, a qual foi selada, e submetida à pressão de 100 (controle), 200, 400, 600 e 800 kPa, à temperatura de 23±1 °C. A umidade relativa no interior das câmaras foi mantida a 95±2,5% (monitorada a cada 30' com registrador de dados HOBO Prov2 U-23-001).

As placas permaneceram por 3 e 6 dias sob pressão hiperbárica (PH), sendo cada período repetido por 3 vezes. Ao término de cada período de tratamento, as câmaras foram despressurizadas automaticamente durante 2h, e imediatamente foi determinado o crescimento micelial das placas de cada câmara. Para acompanhar o crescimento dos fungos *in vitro* após as pressões hiperbáricas, as placas foram incubadas (PH+I) em BOD à temperatura de 26±1 °C (*Alternaria* sp.) e 20±1 °C

(*Botrytis cinerea*) e 12 h de fotoperíodo até que o tratamento controle (100 kPa) atingisse a borda da placa.

Para se determinar o efeito das pressões hiperbáricas no crescimento micelial dos fungos, as placas de cada tratamento foram avaliadas diariamente, desde a retirada das pressões, o qual foi determinado pela média dos diâmetros (mm), dos dois eixos perpendiculares entre si, com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo, modelo CD-6).

No último dia do período de incubação (3+7 e 6+4 dias) foi realizada a germinação dos conídios de cada fungo, sendo depositada 120 μL da suspensão conidial (2×10^5 conídios mL^{-1}), retirada das placas submetidas às pressões, preparada conforme os procedimentos detalhados no item 3.2, em lâminas contendo Ágar-Água a 1% gelatinizado (Kasvi^{CT}). Após 24 h de incubação à 25 ± 1 °C e ausência de luz em estufa de cultura bacteriológica (Quimis Q316M). Foram observados 200 conídios por lâminas por tratamento, em microscópio ótico (Olympus CX41), considerou-se germinado o conídio que apresentou o tubo germinativo de tamanho igual ou superior ao seu comprimento (MERCIER et al., 2001).

3.5 Efeito de pressões hiperbáricas no controle de *Alternaria* sp. e *Botrytis cinerea* em tomates inoculados

Os tomates selecionados foram perfurados em um único ponto na região equatorial (1 mm de diâmetro e 2 mm de profundidade), com auxílio de uma haste de metal pontiaguda e, com o auxílio de uma seringa de cromatografia foram inoculados 10 μL de suspensão de conídios (2×10^5 conídios mL^{-1} , preparada conforme item 3.2), a qual foi constantemente agitada (PALOU et al., 2008). Os frutos permaneceram em temperatura ambiente 23 ± 1 °C, por 24 h para estabelecimento dos inóculos. Em seguida, foram colocados 25 tomates em cada câmara, as quais foram seladas, e submetidos à pressão de 100 (controle), 200, 400, 600 e 800 kPa à temperatura de 23 ± 1 °C. A umidade relativa no interior das câmaras foi mantida a $95 \pm 2,5\%$ (monitorada a cada 30' com registrador de dados HOBO Prov2 U-23-001).

Os tomates permaneceram por 3 e 6 dias sob pressão hiperbárica (PH), sendo cada período repetido por 3 vezes, num total de 12 colheitas (2 períodos x 2 fungos x 3 repetições). Ao término de cada período de tratamento, as câmaras foram despressurizadas automaticamente durante 2 h. De cada câmara, 5 tomates (unidade experimental) foram avaliados e os demais armazenados à temperatura ambiente (PH+A) de 23 ± 1 °C, 50% UR, 100 kPa, por mais 2 e 4 dias, para acompanhamento da evolução dos fungos nos tomates.

3.5.1 Avaliações

a) Incidência das doenças (%): em cada período de avaliação (PH e PH+A), a incidência de frutos com sintomas de *Alternaria* sp. e *B. cinerea* foi determinada visualmente, e expressa em porcentagem de frutos infectados.

b) Severidade das doenças (mm): em cada período de avaliação (PH e PH+A), a severidade foi determinada nos frutos, como sendo a média do diâmetro da lesão (mm), a qual foi medida em dois sentidos ortogonais dos frutos, com auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo, modelo CD-6).

Para a determinação da atividade enzimática, em cada período de avaliação (PH e PH+A), foram selecionados 5 frutos com lesões de tamanho semelhante, cujas sementes e estruturas fúngicas foram retiradas. Utilizou-se 50 mm dos tecidos sadios em torno da área lesionada, os quais foram macerados em nitrogênio líquido com o auxílio de um moinho (Ika ® A11 basic). As amostras de cada tratamento foram armazenadas em ultrafreezer a -80 °C, para posterior avaliação da atividade enzimática.

c) Atividade da β -1,3 glucanase (EC 3.2.1.39): foi determinada pela quantificação colorimétrica da glicose liberada pela laminarina, por meio do uso da hidrazida do ácido p-hidroxibenzóico (PAHBAH) (LEVER, 1972). O extrato enzimático foi obtido da centrifugação a 20 000 g durante 25 min a 4 °C, de 1 g das amostras dissolvida em 600 μ L de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5). A mistura da reação foi

incubada a 37 °C por 1 h, contendo 150 µL do extrato enzimático e 150 µL de laminarina (0,2%). Após esse período, foi acrescentado 1,5 mL de solução de PAHBAH (0,5 g dissolvido em 20 mL de HCL 0,5 M, acrescido de 80 mL de NaOH 0,5 M), e em seguida essa mistura foi aquecida a 100 °C, por 10 min. Após o resfriamento até a temperatura de 25 °C, as amostras tiveram suas absorvâncias determinadas a 410 nm em espectrofotômetro UV-visível (Femto, 700 plus, São Paulo, Brasil), e os resultados expressos em μg de glicose $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

d) Atividade da Catalase (CAT) (EC 1.11.1.6): foi determinada conforme Kar e Mishra (1976). A reação foi obtida combinando-se 150 µL de amostra extraída em tampão fosfato de potássio + EDTA + DTT + PVPP 100 mmol L^{-1} (pH 7,5). Utilizou-se 1950 µL de tampão fosfato de potássio 100 mmol L^{-1} (pH 7,5) como tampão de determinação, 150 µL de tampão fosfato de potássio + EDTA + DTT + PVPP 100 mmol L^{-1} (pH 7,5), como tampão de extração e 750 µL solução de peróxido de hidrogênio 50 mM como substrato enzimático. As leituras foram feitas em espectrofotômetro com absorvância a 240 nm. A atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ degradado $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de proteína.

e) Atividade da Fenilalanina amônia-liase (PAL) (EC 4.3.1.5): foi determinada pelo método de Peixoto et al. (1999), na qual o extrato foi obtido pesando-se 1 g de amostra e adicionando-se 10 ml da solução de tampão de borato 0,1 M, centrifugado por 20 min a 4 °C. A amostra foi preparada com 1,0 ml de extrato e 2 ml de com tampão borato 0,2 M e incubada a 36 °C por 5 min. Posteriormente, foi adicionado 1 ml de fenilalanina, e em seguida, a amostra foi incubada por 1 h à 36 °C. Após este período foi adicionado 0,1 ml de ácido clorídrico a 6M para paralisar a atividade enzimática. As amostras tiveram suas absorvâncias determinadas em 290 nm e os resultados foram expressos em $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

f) Atividade da Peroxidase (POD) (EC 1.11.1.7): foi determinada conforme Lima; Brasil e Oliveira (1999). A reação foi composta de 1 mL de extrato enzimático com 0,5 mL de 30% de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato de potássio 0,2 M (pH 6,7) e 0,5 mL de solução de fenol e aminoantipirina. O sistema de reação foi

colocado em banho-maria a 30 °C durante 5 min. Adicionou-se 2 mL de álcool etílico absoluto para parar a reação e realizar a leitura em espectrofotômetro a 505 nm de absorvância. A atividade específica da peroxidase foi expressa em μmol de H_2O_2 decomposto por $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de proteína.

g) Atividade da Superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1): foi determinada, conforme Beauchamp e Fridovich (1971). A reação foi obtida combinando-se 50 μL de extrato enzimático, 2 mL de 50 mmol L^{-1} de tampão fosfato de sódio pH 7,8, 450 μL $\mu\text{mol L}^{-1}$ da mistura de p-nitro azul de tetrazólio (NBT) (33 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e EDTA (0,66 mmol L^{-1}) (5:4), 0,5 mL da mistura de L-metionina (5 mmol L^{-1}) e riboflavina (1,65 mol L^{-1}) (1:1), totalizando um volume de 3,0 mL. Após iluminação dos tubos, com lâmpadas fluorescentes de 20 W, por 20 min, a 25 °C, a redução do NBT foi medida por leituras de absorvância, em espectrofotômetro, a 560 nm. A atividade da SOD foi expressa em U mg^{-1} de proteína, em que “U” representa a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a razão de redução do NBT.

h) Conteúdo de licopeno: para determinar o conteúdo de licopeno foi utilizada a metodologia de Nagata e Yamashita (1992). Para tal, 2 g da polpa foi transferida para um tubo Falcon de 50 mL, adicionando-se a solução extratora a base de acetona P.A. (4 mL) e hexano P.A. (6 mL), homogeneizando-se em agitador tipo Vortex (Phoenix Lufenco, modelo AP 56, Araraquara, Brasil). Depois de homogeneizado, foi retirado 4 mL da fase líquida e colocada em cubeta de quartzo para a leitura em 663 nm (clorofila a), 645 nm (clorofila b), 505 nm (licopeno), 453 nm (β -caroteno).

Para quantificar o conteúdo de licopeno foi utilizada a equação (2).

$$\text{Licopeno} = - 0,0458 A_{663} + 0,204 A_{645} + 0,372 A_{505} - 0,0806 A_{453} \quad (2)$$

Em que A_{xxx} = absorvância no comprimento de onda especificado.

Os resultados foram expressos em $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ de polpa.

i) Conteúdo de polifenóis extraíveis totais: a determinação foi realizada pelo método espectrofotométrico, utilizando o reativo de Folin-Ciocalteu (SINGLETON;

ROSSI Jr., 1965). Foram pesados 2 g do material fresco e colocadas em tubos de centrifuga, contendo acetona a 50%. Em seguida, foram levados para banho ultrassônico por 20 min e, posteriormente, centrifugados a 6.000 x g durante 10 min, recuperando-se o sobrenadante. O precipitado foi reextraído e os sobrenadantes combinados. Alíquotas de 0,1 mL do sobrenadante foram transferidas para tubos de ensaio, juntamente com 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteau e 2,5 mL de solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3). Após 1 h de reação (completa precipitação do carbonato) foi realizada a leitura em espectrofotômetro com absorvância a 725 nm. Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico por 100 g^{-1} polpa (mg GAE 100 g^{-1} polpa).

j) Conteúdo de proteínas solúveis totais: foi determinada utilizando-se o método de Bradford (1976). O extrato enzimático foi obtido pensando-se 1 g da amostra e dissolvida em 5 ml de tampão de fosfato de potássio pH 6,7. Em cada 500 μL de amostra foram adicionados 2,5 mL de reagente e mantidos no escuro por 5 min concentrado de Bradford. As amostras tiveram suas absorvâncias determinadas em 595 nm e os resultados foram expressos em μg proteína mL^{-1} .

3.6 Análise estatística

Para cada fungo, foi utilizado o delineamento em blocos ao acaso (DBC) com 10 tratamentos e 3 repetição (colheitas), com esquema de análise fatorial 5 x 2, sendo os fatores: cinco pressões (100, 200, 400 600 e 800 kPa) e dois períodos de pressão hiperbárica (3 e 6 dias).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando-se o teste F para verificar o efeito dos tratamentos e o teste de Tukey para a comparação de médias entres os tratamentos.

Foram realizadas análises de regressão polinomial para testar, os efeitos linear e quadrático dos fatores sobre as variáveis avaliadas, sendo que, na escolha da equação de regressão foram adotados os seguintes critérios: regressão significativa (cujo valor de F foi significativo ao nível de 5% de probabilidade),

coeficiente de determinação (R^2) e explicação biológica em consonância com o modelo estatístico.

Nas análises estatísticas foi empregado o programa Agrostat versão 1.1, desenvolvido por Barbosa e Maldonado Junior (2015).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito de pressões hiperbáricas no controle de *Botrytis cinerea in vitro*

Nos períodos de PH (3 e 6 dias) e PH+I (3+7 e 6+4 dias) houve uma relação inversamente proporcional ($P<0,01$) entre o crescimento micelial de *B. cinerea*, representado pelo diâmetro micelial (mm), e a pressão aplicada (Figura 2). No período de 3 dias de PH, as pressões de 600 e 800 kPa foram as mais eficientes, com redução significativa média de 80% no crescimento micelial de *B. cinerea*, em relação ao controle. Enquanto no 6° dia de PH, a pressão de 800 kPa reduziu significativamente o crescimento micelial em 60%, quando comparada com o controle (100 kPa) (Figura 2).

Na avaliação final (3+7 dias), as colônias das pressões de 100, 200 e 400 kPa atingiram a borda da placa de Petri (diâmetro médio de 90 mm), enquanto as pressões de 600 e 800 kPa reduziram significativamente o crescimento micelial, em média 40%, com diâmetro micelial médio de 54 mm. Enquanto, no período de 6+4 dias não houve diferenças significativas do crescimento micelial das pressões hiperbáricas e do controle (Figura 2).

Esses resultados indicam que tratamentos com as pressões de 600 ou 800 kPa, por apenas 3 dias, interferiram no crescimento micelial, com a redução na velocidade do crescimento do fungo, mantendo assim o diâmetro da colônia em níveis baixos por até 7 dias após a retirada da pressão.

A taxa de germinação dos conídios de *B. cinerea* foi reduzida significativamente ($P<0,01$) e de maneira gradual, com o incremento das pressões aplicadas, com a menor taxa de germinação dos conídios na pressão de 800 kPa de

60 e 75%, respectivamente, nos períodos finais de incubação de 3+7 e 6+4 dias, em relação ao controle, que obteve 100% dos conídios germinados (Figura 3).

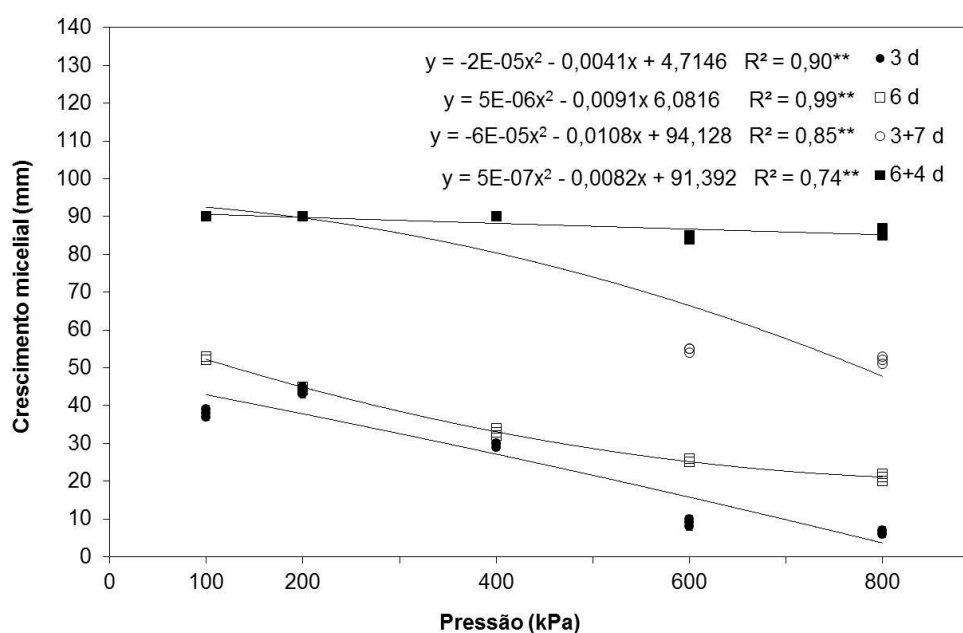


Figura 2. Relação entre o crescimento micelial (mm) de *Botrytis cinerea* e a pressão hiperbárica aplicada por 3 e 6 dias a 23 °C e 95% UR, e por 7 e 4 dias em condição de ambiente a 20 °C, 12 h de fotoperíodo e 100 kPa. ** significativo ($P < 0,01$)

Embora tenham sido publicados resultados promissores sobre o uso de pressões hiperbáricas na conservação pós-colheita de algumas frutas e hortaliças, pesquisas quanto ao efeito das pressões hiperbáricas no crescimento de microrganismos causadores de podridões na pós-colheita são limitadas ou de caráter exploratório.

Segundo Liplap et al. (2014a), incrementos na pressão de 850 kPa por 7 dias reduziram significativamente o crescimento de bactérias, porém a intensidade foi variável em função da espécie, com redução de 71, 56 e 43% no crescimento de *Pseudomonas cichorii*, *Pectobacterium carotovorum*, e *Pseudomonas marginalis*. Resultados semelhantes foram relatados por Barkai-Golan (2001), com a utilização de tratamentos hipobáricos (baixa pressão), os quais promoveram uma inibição do crescimento micelial de *B. cinerea*, sob pressões de 3 a 6 kPa por 5 dias, porém ocorreu uma retomada do crescimento após exposição às condições de ambiente (100 kPa, 20 °C).

Neste ensaio, foram encontrados resultados promitentes do efeito direto das pressões hiperbáricas no crescimento de *B.cinerea in vitro*, visto que a maior pressão aplicada de 800 kPa se mostrou eficiente na redução do crescimento micelial e na taxa de germinação desse fungo após o 3º dia de PH. Entretanto, cabe destacar que a ação não foi fungistática, pois o fungo retomou o crescimento micelial após as condições de incubação (100 kPa, 20 °C e 12 h de fotoperíodo).

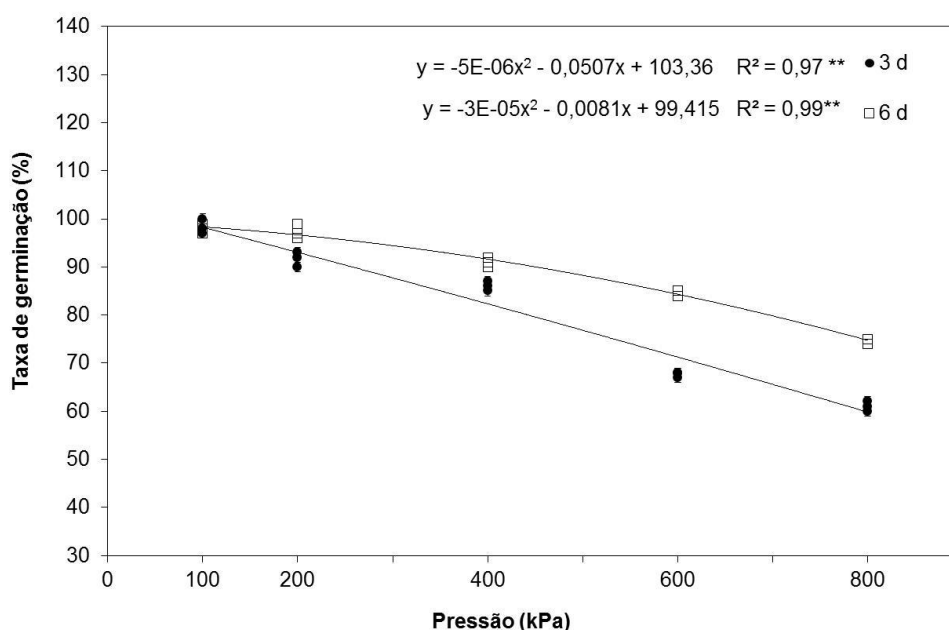


Figura 3. Relação entre a taxa de germinação (%) de *Botrytis cinerea* e a pressão hiperbárica aplicada após 7 e 4 dias em condição de incubação a 20 °C, 12 h de fotoperíodo e 100 kPa. * significativo ($P < 0,05$); ** significativo ($P < 0,01$)

4.2 Efeito de pressões hiperbáricas no controle do mofo cinzento de tomates inoculados com *Botrytis cinerea*

a) Incidência e severidade do mofo cinzento

Houve uma relação funcional significativa ($P < 0,01$) entre a pressão aplicada e a incidência da doença nos tomates, nos períodos de armazenamento hiperbárico e nas condições de ambiente (Figura 4 e 5).

As pressões de 600 e 800 kPa reduziram significativamente a ocorrência e severidade das lesões dos tomates, com 3 e 6 dias de PH, não houve diferenças significativas na incidência do mofo cinzento entre os períodos. Porém, a pressão de 800 kPa foi significativamente mais eficiente, controlando o desenvolvimento do fungo após 3 dias de pressão, e reduzindo a incidência para 5% após 6 dias de PH (Figura 4).

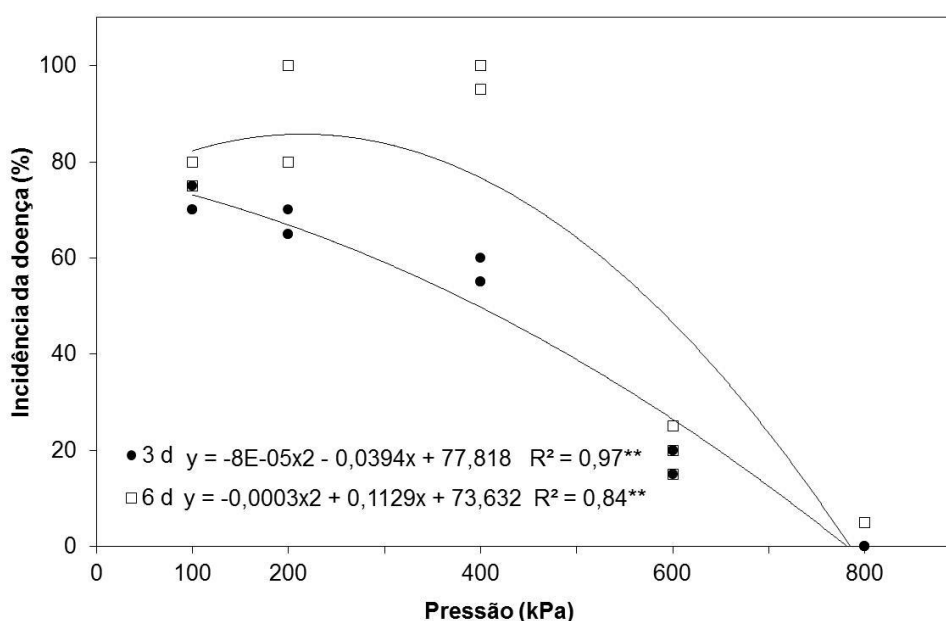


Figura 4. Relação entre incidência (%) do mofo cinzento de tomates 'Débora' inoculados com *B. cinerea* e a pressão hiperbárica aplicada por 3 e 6 dias a 23 °C e 95% UR. ** significativo ($P < 0,01$)

Na condição de ambiente (PH+A), constatou-se aumento na incidência da do mofo cinzento dos frutos tratados e não tratados com as pressões hiperbáricas. Todavia, a incidência de frutos com mofo cinzento foi significativamente menor naqueles que foram tratados com 800 kPa, com 25% (3+4 dias) e 63% (6+4 dias) de frutos infectados, em relação as demais pressões (Figura 5A e 5B).

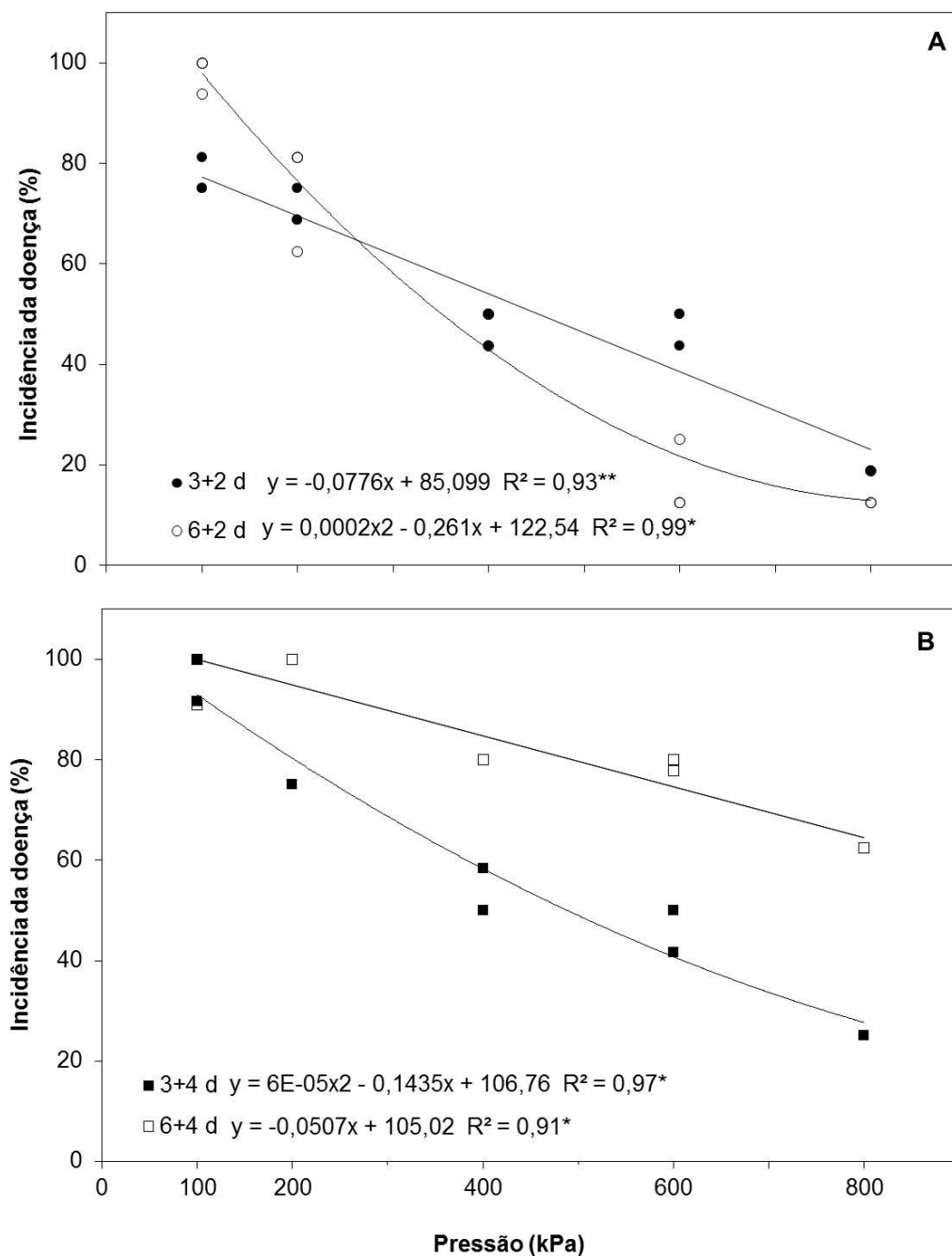


Figura 5. Relação entre incidência (%) do mofo cinzento de tomates 'Débora' inoculados com *B. cinerea* e a pressão hiperbárica aplicada, após 2 dias (A) e 4 dias (B) em condição de ambiente a 23 °C, 50% UR e 100 kPa. ** significativo ($P < 0,01$) * significativo ($P < 0,05$)

Para a severidade da doença ocorreu uma relação funcional significativa ($P < 0,01$) entre a pressão aplicada nos períodos de armazenamento hiperbárico e nas condições de ambiente (Figura 6 e 7). Não houve diferença estatística na severidade do fungo entre os tomates tratados com as pressões de 100, 200 e 400

kPa, com diferenças significativas em relação aos frutos da pressão de 600 e 800 kPa, nos dois períodos de PH (Figura 6). No 3º dia de PH, os tomates tratados com 800 kPa diferiram significativamente dos demais, não apresentando ocorrência do fungo, ou seja, este tratamento promoveu o controle do *B. cinerea*. No 6º dia, não houve diferença significativa entre os tomates tratados com 600 e 800 kPa (diâmetro médio de 6,0 mm), com redução média de 68% na severidade da mofo cinzento, em relação ao controle (diâmetro de 19,0 mm) (Figura 6).

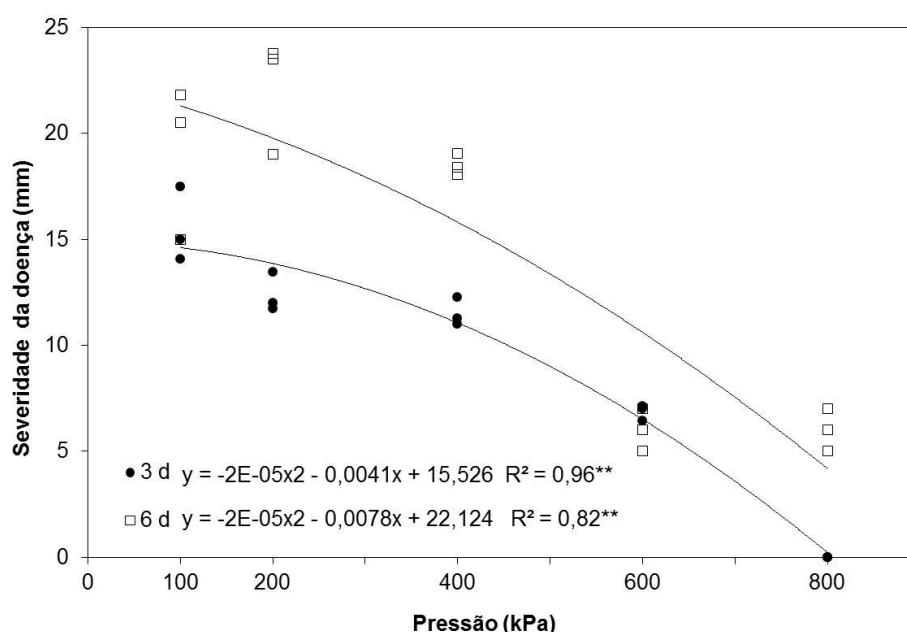


Figura 6. Relação entre severidade (mm) do mofo cinzento de tomates 'Débora' e a pressão aplicada por 3 e 6 dias a 23 °C e 95% UR. ** significativo ($P < 0,01$)

Após 2 dias de condição de ambiente, os tomates tiveram severidade semelhante após 3+2 e 6+2, sendo que os tomates tratados com 800 kPa tiveram diâmetros médios de 8,2 mm, com redução de 67% em relação aos frutos do controle (média de 24,7 mm) (Figura 7A).

Na avaliação final, de 3+4 dias, os tomates tratados com 600 e 800 kPa mantiveram a tendência do período antecedente, com redução significativa em média de 68% na severidade do mofo cinzento, em relação ao controle. Já no dia 6+4, a pressão de 800 kPa foi mais eficiente, reduzindo significativamente a severidade do mofo cinzento dos tomates (diâmetro de 18 mm) em 53%, em relação ao controle (diâmetro de 38 mm) (Figura 7B).

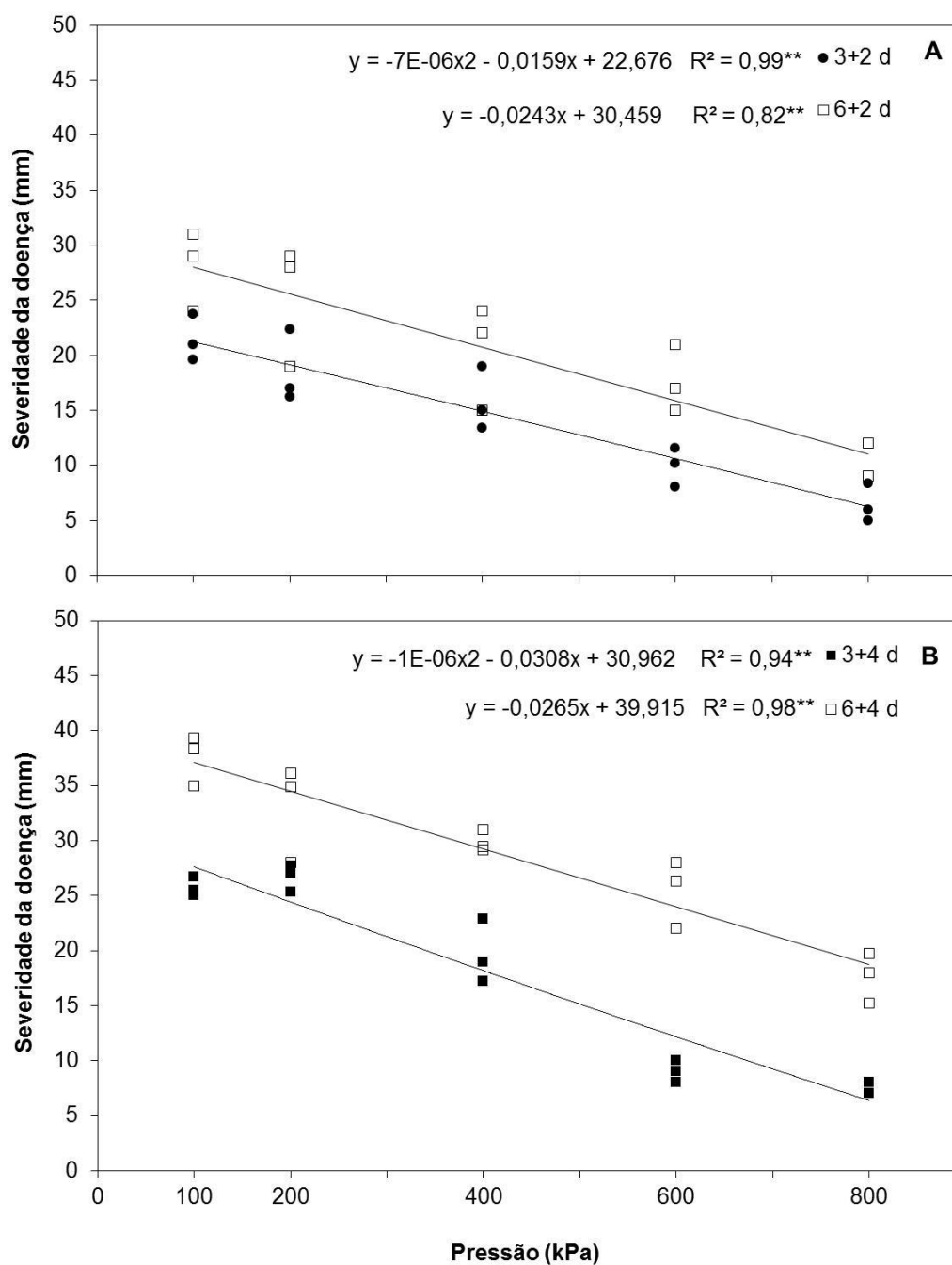


Figura 7. Relação entre severidade do mofo cinzento (mm) de tomates 'Débora' e a pressão aplicada, após 2 dias (A) e 4 dias (B) em condição de ambiente a 23 °C, 50% UR e 100 kPa. ** significativo ($P < 0,01$)

De acordo com Romanazzi et al. (2008), bagas de uvas submetidas a pressão de 150 kPa por um curto período (24 h), e em seguida inoculadas com o fungo *B. cinerea*, tiveram redução de 31% na incidência do mofo cinzento.

Resultados semelhantes foram obtidos neste ensaio, cujos tomates inoculados com *B. cinerea* e, posteriormente tratados com a pressão de 800 kPa, independentemente do tempo de permanência no tratamento (3 ou 6 dias), tiveram redução significativa na incidência do mofo cinzento. Enquanto a severidade da doença foi significativamente menor no 3º dia de 800 kPa, quando comparada com as demais pressões e com o 6º dia de PH (Figura 4 e 6).

Embora as pressões hiperbáricas utilizadas neste ensaio não controlaram o mofo cinzento dos tomates, resultados promissores foram encontrados ao simular as condições de comercialização, principalmente em 3+4 dias, no qual ocorreu uma baixa incidência de frutos com o fungo, bem como, redução na severidade da doença nos tomates tratados com 800 kPa.

b) Conteúdo de licopeno

Após os períodos de pressão hiperbárica (PH) foram obtidas diferentes equações que relacionam o conteúdo de licopeno dos tomates com a pressão aplicada. Porém, para tal relação, as tendências foram similares nos períodos de 3 e 6 dias de PH, com redução do conteúdo de licopeno com o aumento da pressão aplicada (Figura 8).

Independentemente do tempo de permanência no tratamento hiperbárico (3 ou 6 dias), os tomates tratados com 600 e 800 kPa tiveram os menores conteúdos de licopeno (médias de 0,9 mg 100 g⁻¹ polpa), diferindo significativamente dos frutos do controle, que tiveram média 1,9 mg 100 g⁻¹ polpa, o que representa redução de 50% no conteúdo de licopeno dos tomates tratados com as maiores pressões (Figura 8).

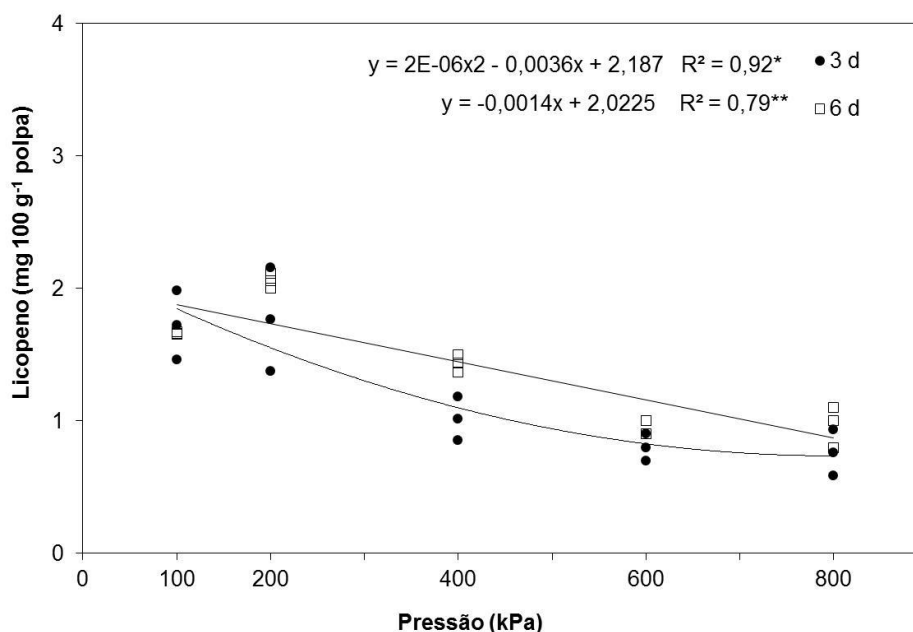


Figura 8. Relação entre o conteúdo de licopeno de tomates 'Débora' inoculados com *B. cinerea* e a pressão hiperbárica aplicada por 3 e 6 dias a 23 °C e 95% UR. ** significativo ($P < 0,01$) * significativo ($P < 0,05$)

Após 2 dias de condição ambiente (PH+2), os tomates tratados com 400, 600 e 800 kPa tiveram os menores conteúdos de licopeno, com médias de 1,0 mg 100 g⁻¹ polpa (3+2 dias) e 1,8 mg 100 g⁻¹ polpa (6+2 dias), diferindo significativamente da pressão de 200 kPa e do controle (Figura 9A).

No final do período de armazenamento (PH+4), os tomates da pressão de 600 e 800 kPa tiveram os menores conteúdos de licopeno, com médias de 1,8 e 2,4 mg 100 g⁻¹ polpa, respectivamente nos dias 3+4 e 6+4, o que representa uma redução média significativa de 22 e 11% no conteúdo de licopeno em relação ao controle (Figura 9B).

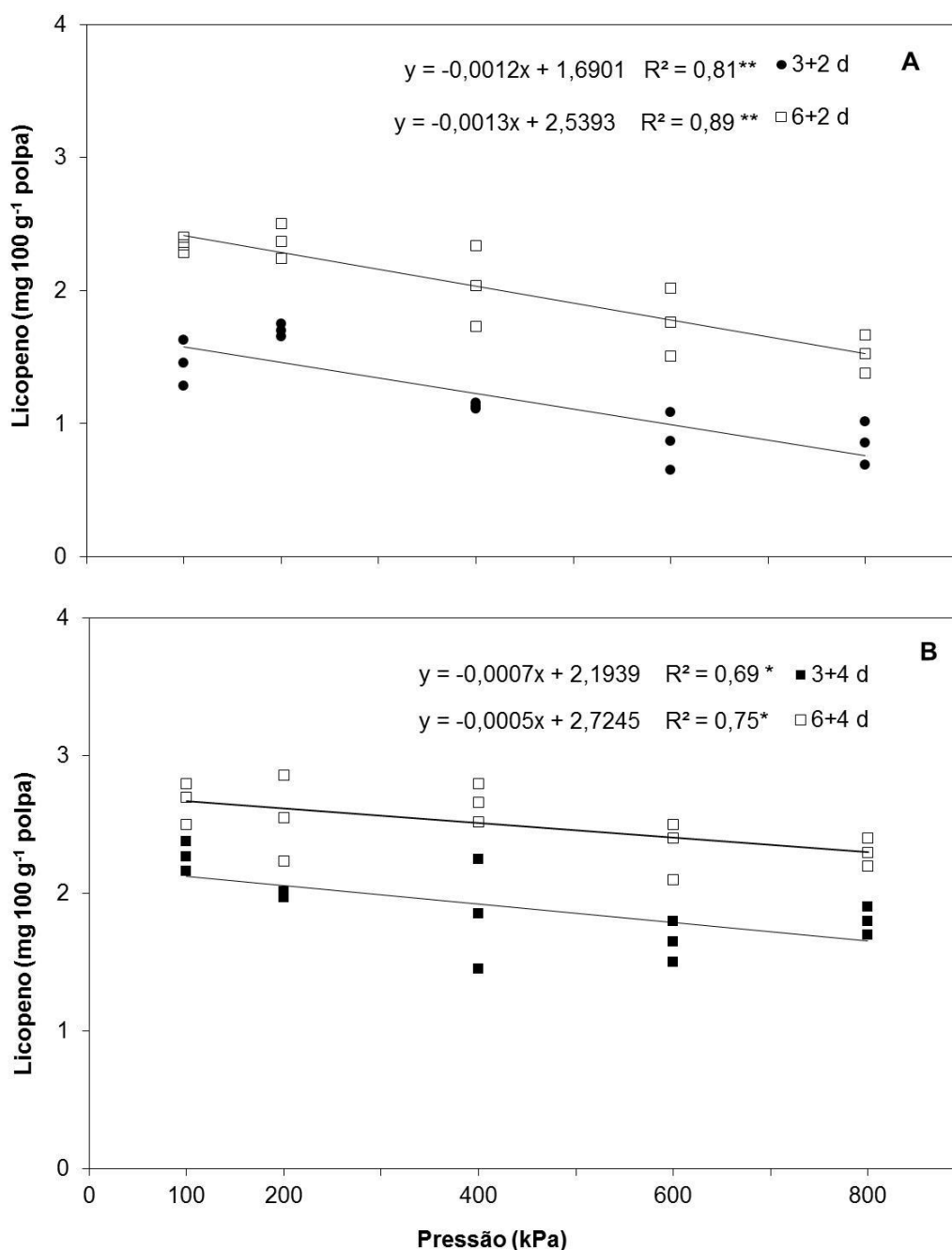


Figura 9. Relação entre o conteúdo de licopeno de tomates ‘Débora’ inoculados com *B. cinerea* e a pressão hiperbárica aplicada, após 2 dias (A) e 4 dias (B) em condição de ambiente a 23 °C, 50% UR e 100 kPa. ** significativo ($P < 0,01$) * significativo ($P < 0,05$)

Durante os processos de maturação, a coloração dos tomates muda de verde para vermelha, à medida que a clorofila é degradada e, principalmente os carotenoides (β -carotenos e licopeno) e antocianinas (xantofilas) são sintetizados (SMITA et al., 2013; SU et al., 2015). Como o licopeno é o principal carotenoide nos

tomates, representando 71% do conteúdo total em frutos maduros, são relatados incrementos de 9 a 25 vezes, durante o processo de amadurecimento, conferindo a coloração avermelhada aos frutos (DEL GIUDICE et al., 2015).

Segundo Inestroza-Lizardo et al. (2018), os tratamentos hiperbáricos de 600 e 800 kPa por 4 dias à 23 °C, retardaram o desenvolvimento da coloração vermelha de tomates, devido à redução de 66% na síntese de licopeno, em relação aos frutos do controle (100 kPa).

Resultados similares foram obtidos neste ensaio, sendo que as pressões de 600 e 800 kPa reduziram em até 50% o conteúdo de licopeno dos tomates após 3 e 6 dias de PH, mesmo quando mantidos em temperatura ótima para a síntese do licopeno (16 a 26 °C).

Porém, o amadurecimento dos frutos é um processo biológico complexo, que envolve mudanças na composição química, pigmentação, textura e sabor dos tomates, mas também aumentam a suscetibilidade a infecção por patógenos (CANTU et.al., 2008; ZHANG et al., 2013). Isto também foi constatado por Wei et al. (2016) em tomates do tipo cereja inoculados com *B. cinerea* e submetidos ao tratamento combinado de ar quente (38 °C, 12 h) e *Cryptococcus laurentii*, os quais tiveram incidência de 28% do mofo cinzento nos frutos no estágio vermelho e de apenas 17% no estágio verde-maduro.

Os resultados obtidos neste ensaio também evidenciaram que o estágio de maturação dos tomates pode influenciar a resistência contra os patógenos na pós-colheita. Os tomates tratados com as menores pressões (100, 200, 400 kPa) tiveram amadurecimento mais acelerado, verificado pelo maior acúmulo de licopeno, em relação aos tratados com 600 e 800 kPa.

Esse comportamento pode ter tornado estes frutos mais suscetíveis (100 kPa) à infecção por *B. cinerea*, comprovado pela maior incidência e severidade da mofo cinzento, em ambos os períodos de PH e PH+A (Figura 5 e 7).

c) Atividade da enzima peroxidase (POD)

Em relação à atividade enzimática da POD, houve relação funcional diretamente proporcional ($P < 0,05$), com o aumento da pressão aplicada, no 3° e 6°

de PH, com diferenças significativas entre a atividade enzimática da POD dos tomates da pressão de 600 e 800 kPa, com média 30% superior em relação ao controle (Figura 10).

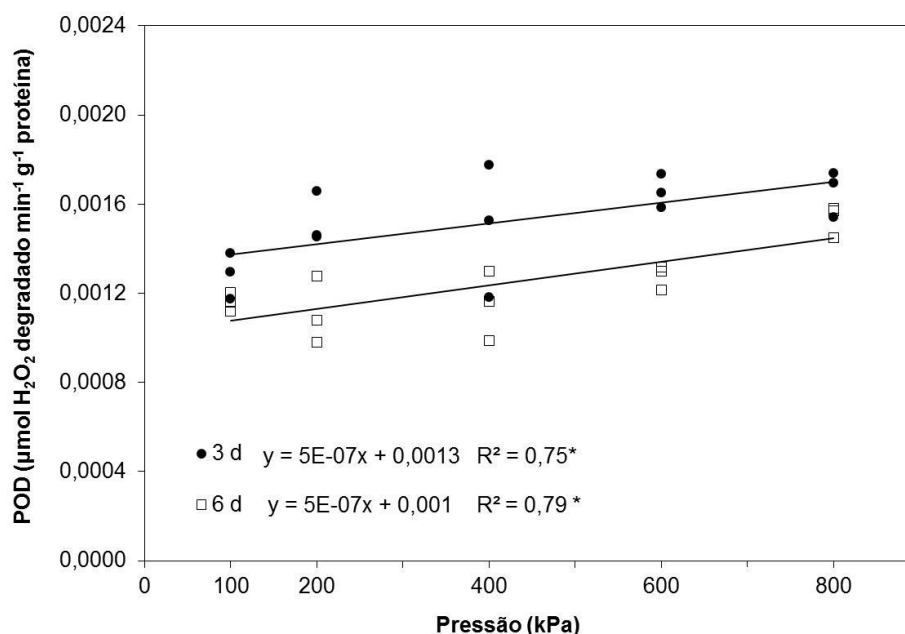


Figura 10. Relação entre a atividade da enzima peroxidase (POD) de tomates 'Débora' inoculados com *B. cinerea* e a pressão hiperbárica aplicada por 3 e 6 dias a 23 °C e 95% UR. * significativo ($P < 0,05$)

No 2º dia de condição ambiente (PH+2) não foi possível estabelecer uma relação funcional entre a atividade enzimática da POD e a pressão aplicada, independentemente do tempo de pressão, com atividade de 0,0016 e 0,0010 μmol de H₂O₂ decomposto min⁻¹ g⁻¹ de proteína, respectivamente no dia 3+2 e 6+2.

No final do período de avaliação de 3+4 dias, houve uma relação funcional inversamente proporcional entre a atividade enzimática da POD e a pressão aplicada. Os tomates submetidos às pressões de 100, 200 e 400 kPa tiveram um conteúdo significativamente maior, média de 0,0020 μmol de H₂O₂ decomposto min⁻¹ g⁻¹ de proteína, em relação a 0,0017 μmol de H₂O₂ decomposto min⁻¹ g⁻¹ de proteína dos tomates das pressões de 600 e 800 kPa. Porém, a atividade da POD dos tomates submetidos à pressão de 800 kPa não diferiu significativamente entre os períodos finais de armazenamento (3+4 e 6+4 dias) (Figura 11).

Não foi possível estabelecer uma relação funcional entre a atividade desta enzima e as pressões aplicadas no período de 6+4 dias, com atividade média nos tomates de $0,0015 \mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ decomposto min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de proteína.

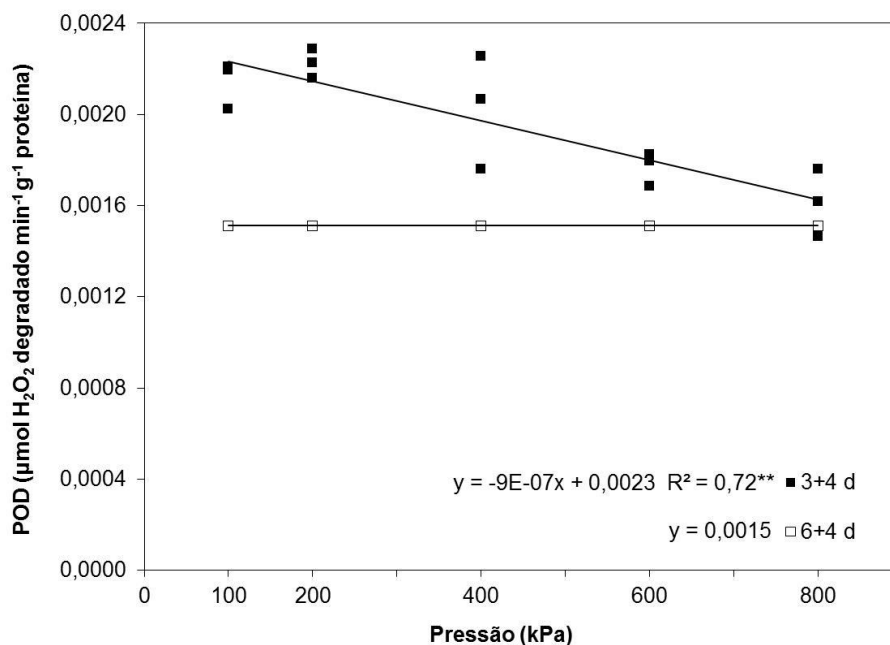


Figura 11. Relação entre a atividade da enzima peroxidase (POD) de tomates Débora' inoculados com *B. cinerea* e a pressão hiperbárica aplicada, após 4 dias em condição de ambiente a 23 °C, 50% UR e 100 kPa. * significativo ($P < 0,05$)

A elevação da atividade enzimática da POD está associada com a ativação do sistema de defesa, em resposta a uma grande diversidade de agentes estressores (ataques de patógenos, insetos e estressores abióticos), funcionando como um protetor eficaz das formas intermediárias reativas de radicais O_2 e radicais peróxidos, além da formação de lignina e suberina, oxidação de compostos fenólicos e sinalização para a formação de fitoalexinas (NASCIMENTO; BARRIGOSI, 2014).

Hashmi et al. (2013) verificaram que o tratamento hipobárico de 50 kPa por 4 h, induziu a atividade das enzimas relacionadas a defesa em morangos, como a PAL e a POD, promovendo redução na incidência e severidade do mofo cinzento por 5 dias à 20 °C.

De maneira similar, os dados obtidos nos tratamentos hiperbáricos deste ensaio demonstraram que as pressões de 600 e 800 kPa induziram a atividade

enzimática da POD independentemente do tempo de permanência no tratamento (3 ou 6 dias).

Isto indica, que as pressões hiperbáricas elevadas, podem ter induzido a síntese da POD de maneira imediata apenas com 3 dias de PH, ativando os mecanismos de defesa que se mantiveram até o final do período de armazenamento (3+4). Neste período foi evidenciado uma redução significativa de 68% no diâmetro do mofo cinzento dos tomates nas referidas pressões em relação ao controle (Figura 7B), indicando uma possível ação preventiva da POD à infecção do patógeno nos frutos.

A maior atividade da POD foi registrada nos tomates do controle (3+4 dias) o que poderia estar relacionada com a deteriorização oxidativa dos frutos que se encontraram em estágio avançado de amadurecimento, também evidenciado pelo maior conteúdo de licopeno, em relação às demais pressões (Figura 9).

d) Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL)

A atividade da PAL dos tomates e a pressão aplicada tiveram relação funcional significativa ($P < 0,01$), no 3° e 6° dia de PH, com uma tendência similar entre os tratamentos. No entanto, a atividade da PAL nos frutos tratados com 6 dia de PH foi significativamente maior, em média $200,1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína, em relação ao 3° dia ($127,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína). Nestes períodos não foram observadas diferenças significativas na atividade da PAL nos tomates tratados com as pressões de 600 e 800 kPa em relação aos frutos do controle (Figura. 12).

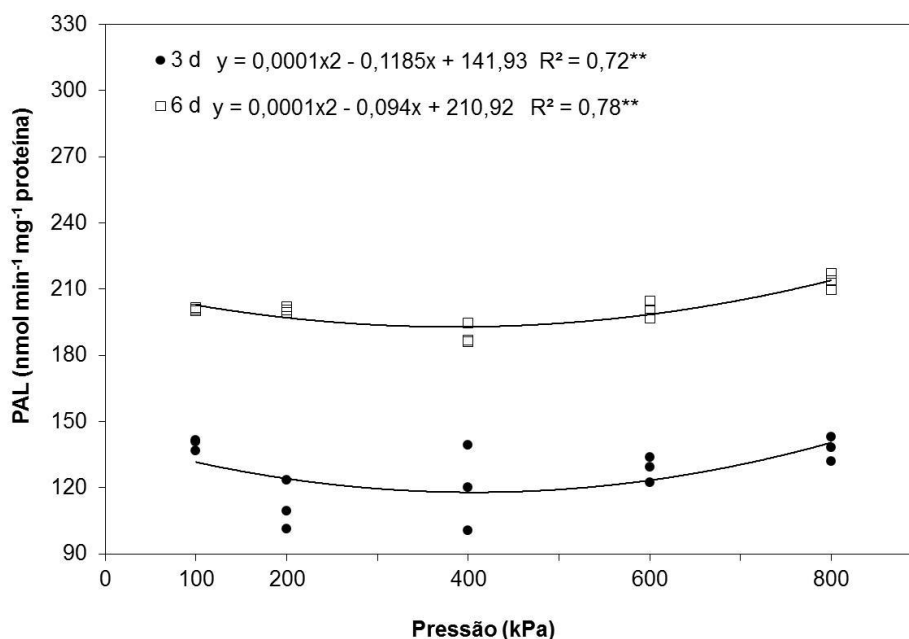


Figura 12. Relação entre a atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) de tomates Débora' inoculados com *B. cinerea* e a pressão hiperbárica aplicada por 3 e 6 dias a 23 °C e 95% UR. ** significativo ($P < 0,01$)

Após 2 e 4 dias de condição de ambiente (PH+2 e PH+4), a atividade enzimática da PAL apresentou uma relação funcional significativa ($P < 0,01$), com o aumento da pressão aplicada. Nos tomates tratados com 800 kPa, a atividade da PAL foi significativamente maior em relação as demais pressões, com médias de 178,0 e 251,0 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, respectivamente após 3+2 e 6+2 dias na condição de ambiente (Figura 13A).

No final do período de avaliação de 3+4 e 6+4 dias, foi registrada a maior atividade da PAL nos tomates da pressão de 800 kPa, com média de 279,1 e 203,1 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, respectivamente em cada período, o que representa um aumento significativo de 69 e 30% em relação aos frutos do controle (165,3 e 161,3 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína (Figura 13B).

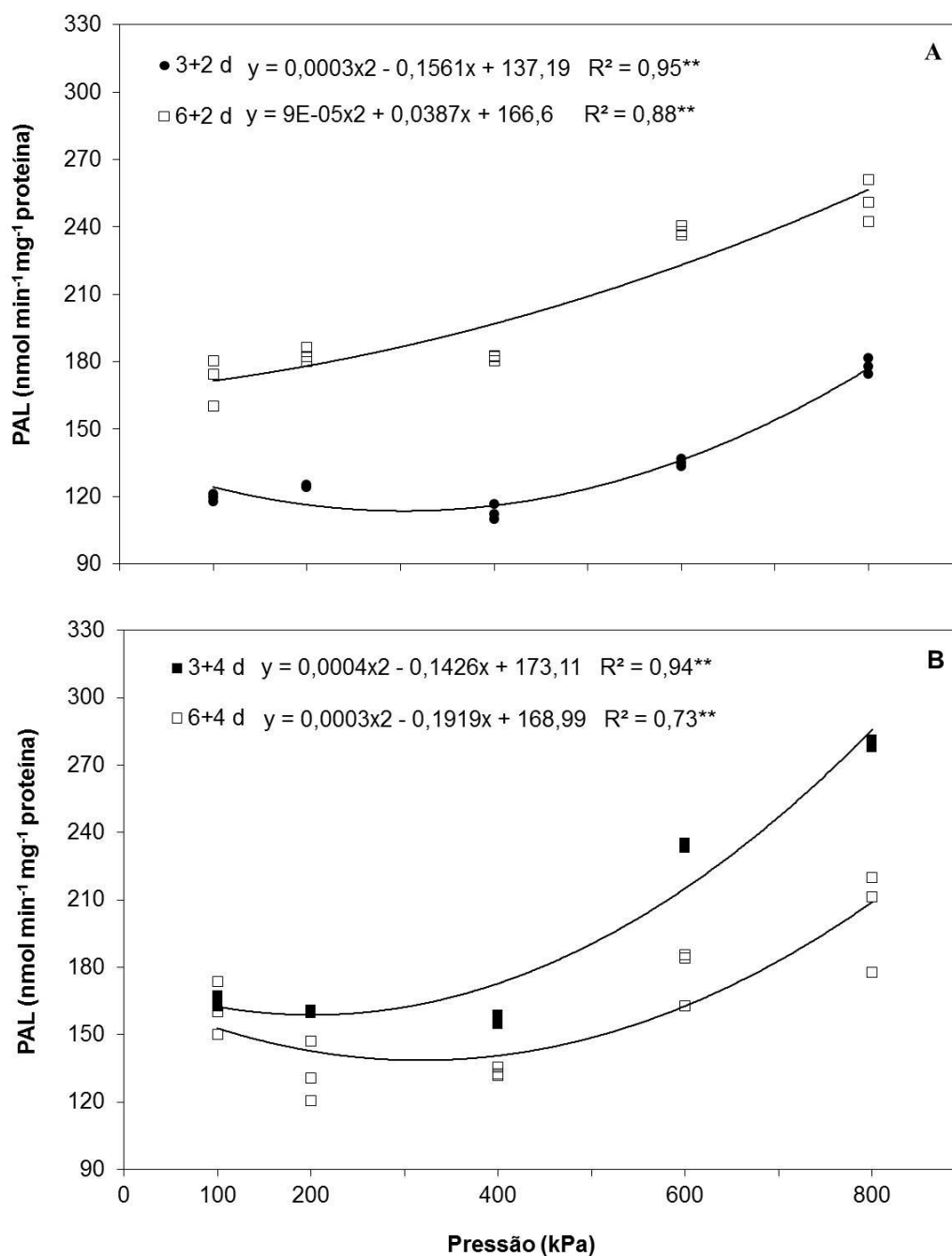


Figura 13. Relação entre a atividade da enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL) de tomates 'Débora' inoculados com *B. cinerea* e a pressão hiperbárica aplicada, após 2 dias (A) e 4 dias (B) em condição de ambiente a 23 °C, 50% UR e 100 kPa. ** significativo ($P < 0,01$)

A fenilalanina amônia-liase (PAL) está relacionada com estresse abiótico e biótico, podendo ser utilizada como indicador de resistência à esses agentes. (VOGT, 2010). Também está envolvida em diversas funções na planta como síntese de fenilpropanóides, com à conversão de fenilalanina em ácido trans-cinâmico com

eliminação de amônia, regulação do acúmulo de lignina, que confere maior resistência à parede celular das plantas (GAYOSO et al., 2010) e síntese de compostos fenólicos (GONZALEZ-AGUILAR et al., 2010).

Em tomates do tipo cereja, o tratamento com ar quente (38 °C, 12 h) induziu a atividade enzimática da PAL, com a ativação da via dos fenilpropanóides, comprovada pela elevação dos teores de compostos fenólicos e flavonoides, os quais estão relacionados com aumento na resistência dos frutos a infecção por *B. cinerea* e *Alternaria alternata* (WEI et al., 2017).

Neste ensaio, as pressões hiperbáricas não exerceram efeito positivo na atividade da PAL, nos tomates após 3 e 6 dias de PH. No entanto, após a permanência nas condições de ambiente (PH+A) houve incrementos significativos na atividade enzimática da PAL dos tomates tratados com 800 kPa em relação ao controle (Figura 13B).

Neste caso, o incremento verificado na atividade enzimática da PAL no período final de armazenamento (3+4 dias), pode ter favorecido a ativação dos mecanismos de defesa nestes frutos, pelo aumento da resistência à infecção por *B. cinerea*, corroborado pela menor incidência (25%) e severidade (68%) da doença, em relação ao controle (Figura 5B e 7B).

e) Conteúdo de polifenóis totais

Para o conteúdo polifenóis totais houve uma relação funcional significativa ($P < 0,05$) com a pressão aplicada após a permanência de PH (Figura 14). Após o 3º dia ocorreu uma tendência linear negativa, com redução significativa dos polifenóis dos tomates com o aumento da pressão, atingindo valores médios de 7,4 GAE 100 g⁻¹ polpa nas pressões de 400, 600 e 800 kPa, diferindo significativamente do controle com 8,6 GAE 100 g⁻¹ polpa. No 6º dia de PH não houve diferenças significativas entre o conteúdo de polifenóis dos tomates tratados com 600 e 800 kPa, em relação ao controle, com médias de 8,2 GAE 100 g⁻¹ polpa (Figura 14).

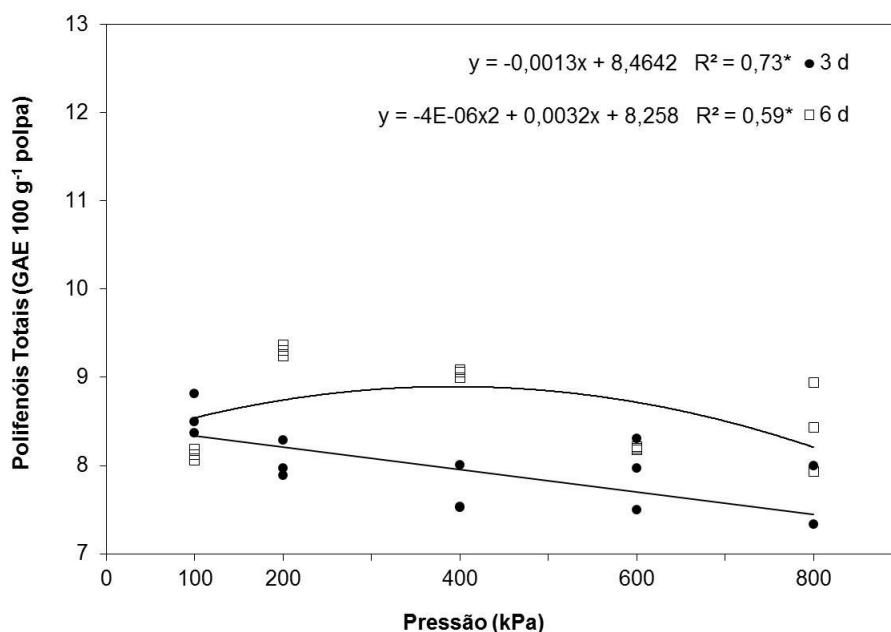


Figura 14. Relação entre o conteúdo de polifenóis totais de tomates Débora inoculados com *B. cinerea* e a pressão hiperbárica aplicada por 3 e 6 dias a 23 °C e 95% UR. * significativo ($P < 0,05$)

Após 2 dias de condição ambiente (PH+2), houve tendências distintas entre o conteúdo de polifenóis totais dos tomates e a pressão aplicada (Figura 13A). Com 3+2 dias, a tendência foi linear positiva ($P < 0,05$) entre o conteúdo de polifenóis e a pressão aplicada, com 11,6 GAE 100 g⁻¹ polpa, nos tomates submetidos às pressões de 600 e 800 kPa, a qual foi significativamente diferente das demais pressões e do controle (média de 8,9 GAE 100 g⁻¹ polpa). Em 6+2 dias a tendência foi linear negativa ($P < 0,01$), cujos tomates da pressão de 800 kPa com o menor conteúdo de polifenóis totais (9,6 GAE 100 g⁻¹ polpa) (Figura 14A).

No final do período de armazenamento (PH+4), as tendências foram distintas entre si, entre o conteúdo de polifenóis dos tomates e a pressão aplicada (Figura 15B). Com 3+4 dias, a tendência entre o conteúdo de polifenóis e a pressão aplicada foi similar ao período de 3+2 dias, com médias de 11,5 GAE 100 g⁻¹ polpa para as pressões de 600 e 800 kPa, diferindo significativamente do controle (8,8 GAE 100 g⁻¹ polpa) (Figura 15B).

Em 6+4, o conteúdo de polifenóis nos tomates tratados a 800 kPa não diferiram significativamente daqueles do controle, com média de 10,3 GAE 100 g⁻¹ polpa (Figura 15B).

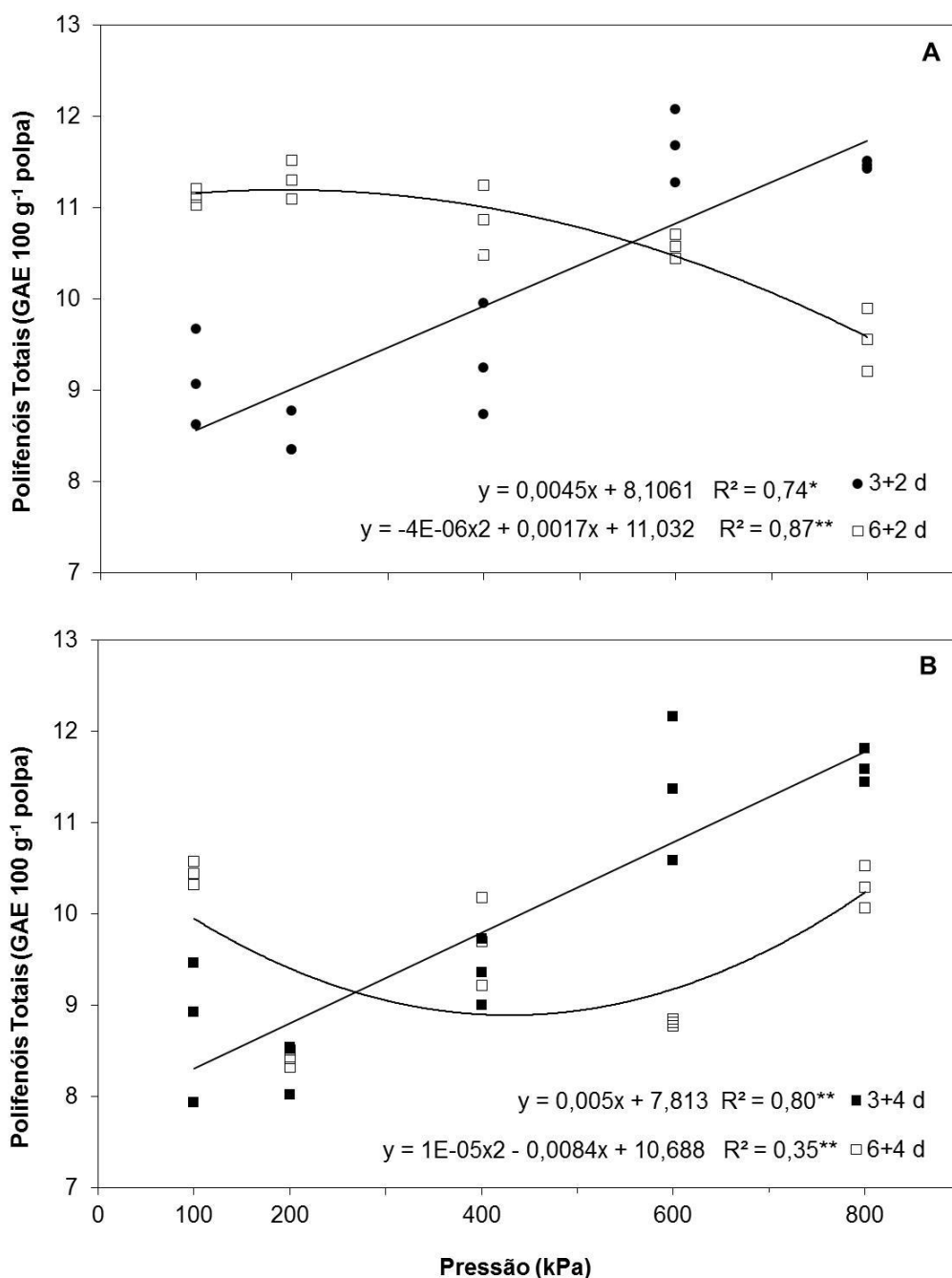


Figura 15. Relação entre o conteúdo de polifenóis totais de tomates ‘Débora’ inoculados com *B. cinerea* e a pressão hiperbárica aplicada, após 2 dias (A) e 4 dias (B) em condição de ambiente a 23 °C, 50% UR e 100 kPa. ** significativo ($P < 0,01$) * significativo ($P < 0,05$)

Os principais compostos fenólicos do tomate são os flavonoides e os ácidos fenólicos (LUTHRIA; MUKHOPADHYAY; KRIZEK, 2006), sendo que o acúmulo de flavonoides específicos, como derivados de miricetina, pode reduzir a suscetibilidade dos tomates a infecções por *B. cinerea* (ZHANG et al., 2015). Resultados de Charles

et al. (2008) corroboram com esse efeito, quando tomates foram tratados com radiação UV-C (3.7 kJ m^{-2}) tiveram aumento na resistência contra *B. cinerea*, a qual foi atribuída ao incremento dos compostos fenólicos e à formação de lignina e de suberina, os quais produziram efeito fungistático, devido a barreira física que impediu a infecção do fungo nos frutos.

Os compostos fenólicos podem ser sintetizados pelas plantas em resposta ao estresse, gerado por fatores bióticos (microrganismos e insetos) e abióticos (luz, temperatura e radiação ionizante) (GONZALEZ-AGUILAR et al., 2010), os quais ativam a PAL, principal enzima-chave envolvida na primeira etapa da síntese dos fenilpropanóides, resultando em compostos como fitoalexinas e ligninas, que conferem maior resistência à parede celular das plantas contra a infecções por patógenos (GAYOSO et al., 2010).

Neste ensaio, como as pressões hiperbáricas exerceram efeito positivo na atividade da enzima PAL (Figura 13B), com incrementos significativos nos tomates tratados com 800 kPa após 3+4 dias de armazenamento, presume-se que, isto pode ter ativado a síntese dos compostos fenólicos específicos, os quais favoreceram os mecanismos de defesa destes frutos e, conseqüentemente, o aumento da resistência dos tomates a infecção por *B. cinerea*, comprovada pela menor incidência e redução da severidade da doença.

f) Atividade da enzima β -1,3 glucanase (GLU)

As tendências da atividade enzimática da GLU nos tomates foram influenciadas pelas pressões, porém de maneira distinta entre os períodos de 3 e 6 dias de PH. No 3º dia a atividade da GLU foi 20% maior, com média de $6,4 \mu\text{g glicose min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$, nos tomates da pressão de 400, 600 e 800 kPa em relação aos frutos da pressão de 200 kPa e do controle (média de $5,3 \mu\text{g glicose min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$) (Figura 16).

Porém, a atividade da GLU no 6º dia apresentou comportamento inverso ao período de 3 dias, com redução significativa de 18% na atividade dos tomates tratados com 400, 600 e 800 kPa (média de $4,6 \mu\text{g glicose min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$), em

relação a pressão de 200 kPa e do controle (média de 5,6 μg glicose min^{-1} mg^{-1} proteína) (Figura 16).

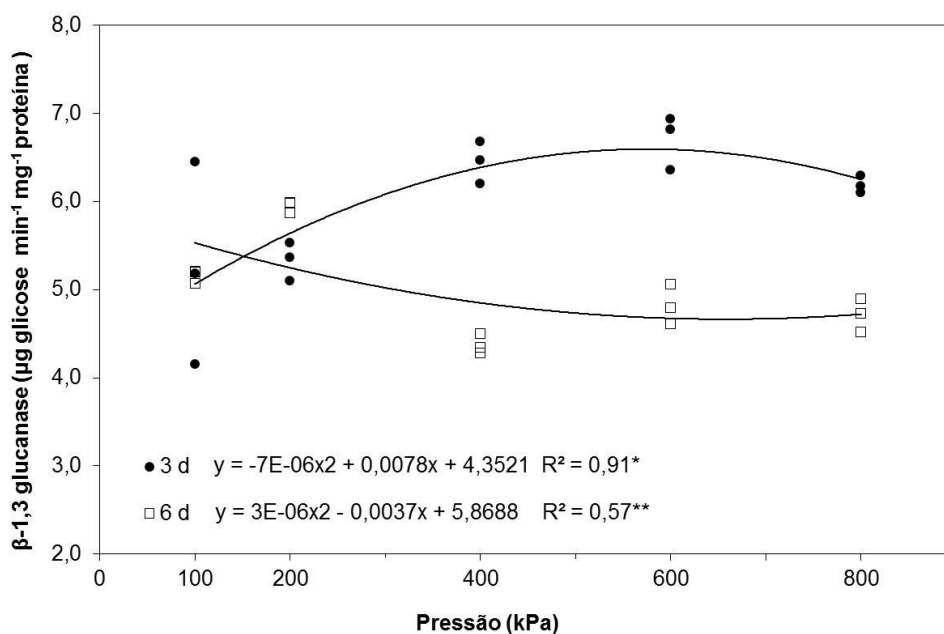


Figura 16. Relação entre a atividade da β -1,3 glucanase (GLU) de tomates Débora' inoculados com *B. cinerea* e a pressão hiperbárica aplicada por 3 e 6 dias a 23 °C e 95% UR. ** significativo ($P < 0,01$) * significativo ($P < 0,05$)

Após armazenamento na condição de ambiente (PH+A), houve relação funcional significativa ($P < 0,01$) entre a atividade da GLU e a pressão aplicada. Após 3+2 e 3+4 dias, foram observadas tendências positivas semelhantes, cujos tomates tratados com a pressão de 600 e 800 kPa tiveram atividade da GLU significativamente superior, de 68 e 44%, respectivamente em 3+2 e 3+4 dias, quando comparadas com as obtidas nos frutos das demais pressões e do controle (Figura 17A e 17B).

Enquanto, nos dias 6+2 e 6+4 não houve diferenças significativas entre a atividade da GLU dos tomates pressurizados em relação ao controle, sendo registradas respectivamente médias de 4,6 e 3,9 μg glicose min^{-1} mg^{-1} proteína (Figura 17A e 17B).

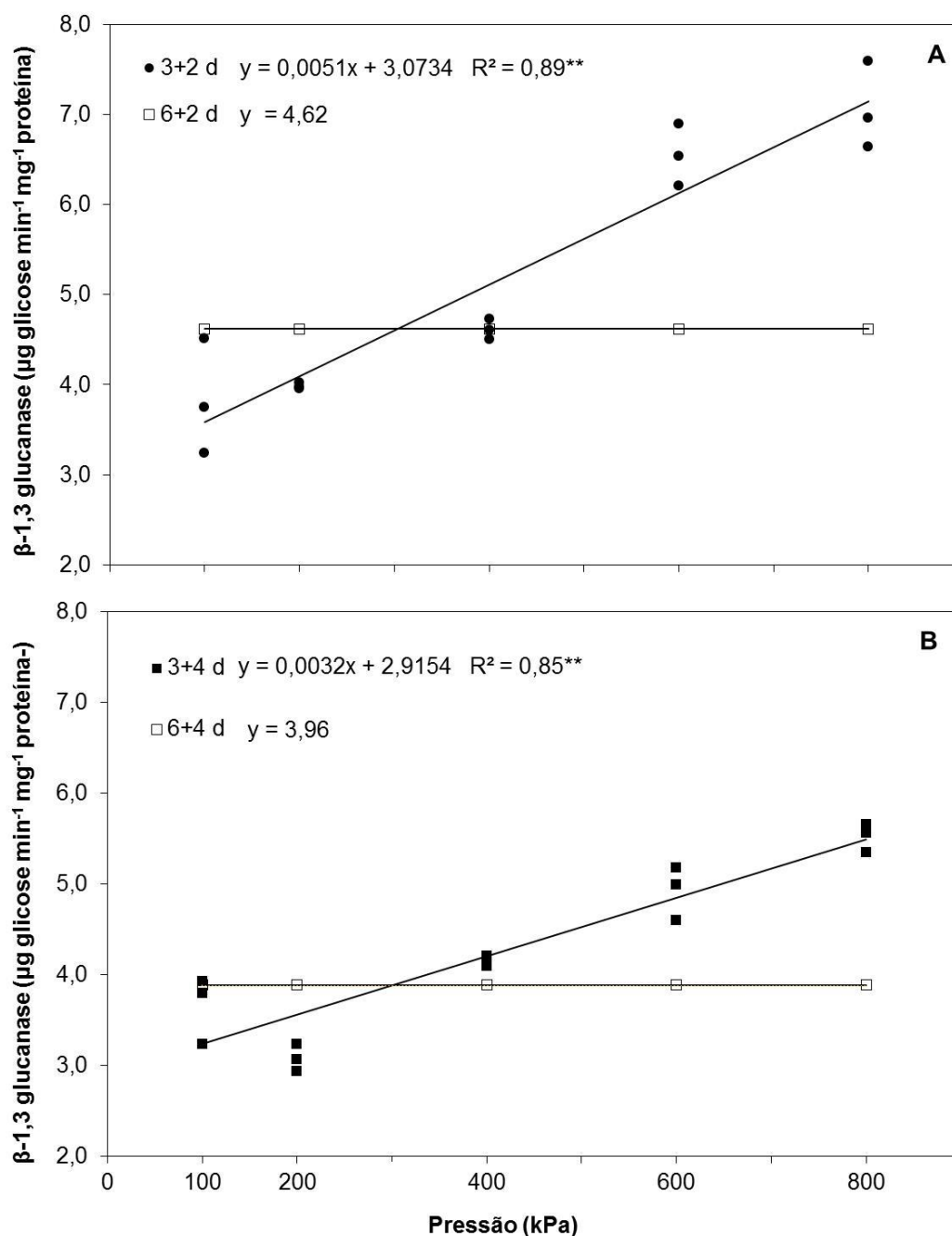


Figura 17. Relação entre a atividade da β -1,3 glucanase (GLU) de tomates Débora' inoculados com *B. cinerea* e a pressão hiperbárica aplicada, após 2 dias (A) e 4 dias (B) em condição de ambiente a 23 °C, 50% UR e 100 kPa. ** significativo ($P < 0,01$)

A glucanase (GLU) catalisa juntamente com a quitinase a hidrólise de polímeros presentes na parede celular de vários fungos. Vários trabalhos na pós-colheita de frutas sugerem que essas proteínas estão relacionadas à patogênese (glucanases e quitinases), podendo ser induzidas durante a infecção por patógenos

e/ou por tratamentos físicos, com UV e ar quente (PAVONCELLO et al., 2001; WANG et al., 2010).

A indução dessas enzimas pode estar relacionada com o aumento da resistência de alguns frutos e hortaliças contra a infecção por patógenos comuns na pós-colheita. Jin et al. (2016) relataram que o tratamento de morangos com ar quente (45 °C por 3,5 h) reduziu o diâmetro da lesão de *B. cinerea*, com aumento nas atividades das enzimas β 1-3 glucanases, quitinases e PAL. Em tomates, Cota et al. (2007) relataram que a quitinase e glucanase fazem parte dos mecanismos de defesa desses frutos contra a infecção de *Alternaria alternata*, com diferentes comportamentos, dependendo do estágio de maturação e variedade.

Resultados similares foram obtidos neste ensaio, após o tratamento dos tomates com as pressões de 600 e 800 por 3 dias, com incremento de 44% na atividade da GLU em relação ao controle, após a condição de ambiente (3+4 dias), o que pode ter contribuído para o aumento da resistência dos frutos à infecção por *B. cinerea*.

g) Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

Houve uma relação funcional significativa ($P < 0,05$), entre a atividade enzimática da SOD dos tomates e a pressão aplicada nos períodos de PH e PH+A (Figura 18 e 19).

A atividade da SOD dos tomates tratados com 600 e 800 kPa não foi influenciada pelo tempo de armazenamento na pressão hiperbárica (3 e 6 dias), bem como não houve diferenças significativas entre esses tratamentos e o controle, em cada período (Figura 18).

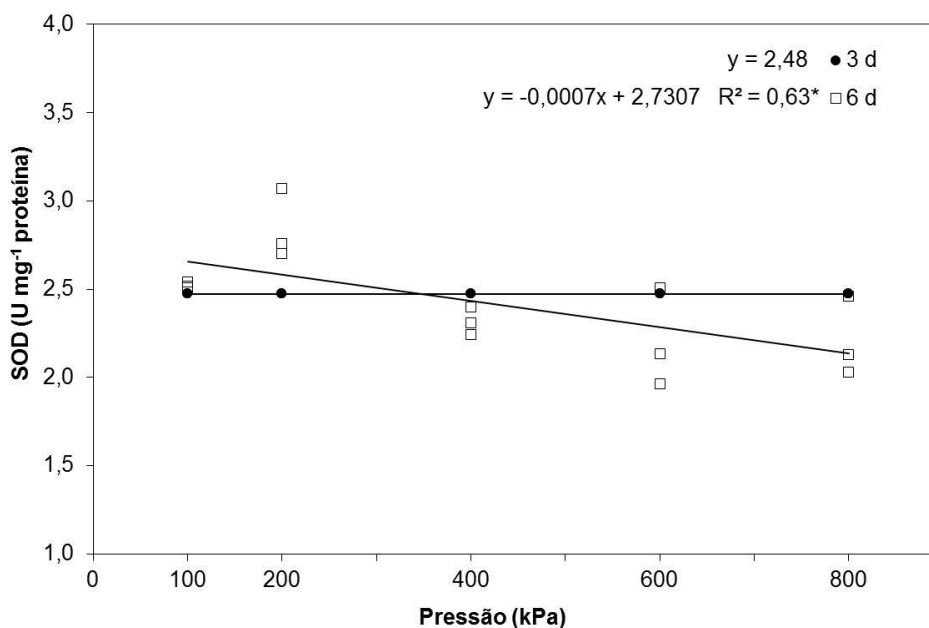


Figura 18. Relação entre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) de tomates Débora' inoculados com *B. cinerea* e a pressão hiperbárica aplicada por 3 e 6 dias a 23 °C e 95% UR. * significativo ($P < 0,05$)

Após 2 dias de condição de ambiente, os tomates da pressão de 800 kPa tiveram atividade da SOD de 2,9 U mg⁻¹ de proteína, com aumento significativo de 26% em relação aos frutos do controle. No dia 6+2 não houve uma relação entre a atividade enzimática de SOD e a pressão aplicada, com média de 2,5 U mg⁻¹ de proteína (Figura 19A).

No final do período de armazenamento no dia 3+4, a atividade enzimática da SOD foi de 3,6 U mg⁻¹ de proteína nos tomates tratados com 800 kPa, sendo 30% superior a obtida nos frutos do controle (2,8 U mg⁻¹ de proteína). Em 6+4 dias, a média da atividade enzimática nos tomates submetidos às pressões de 600 e 800 kPa foi de 2,7 U mg⁻¹ de proteína, ou seja, 11% superior aos 2,4 U mg⁻¹ de proteína dos frutos do controle (Figura 19B).

A alta atividade da SOD dos tomates da pressão de 800 kPa, no período de 3+4 dias, o que representa um incremento de 45% em relação ao período de 3 dias de PH, pode estar relacionada ao retardo no início do amadurecimento, já que estes frutos tiveram um conteúdo de licopeno menor, em relação controle. Enquanto a baixa atividade da SOD, verificada nos tomates das pressões menores, provavelmente pode ser consequência da diminuição da síntese proteica associada

à senescência, a qual é considerada o principal processo oxidativo das plantas, capaz de aumentar a suscetibilidade dos frutos à infecção por patógenos (MAHARAJ et al., 2014).

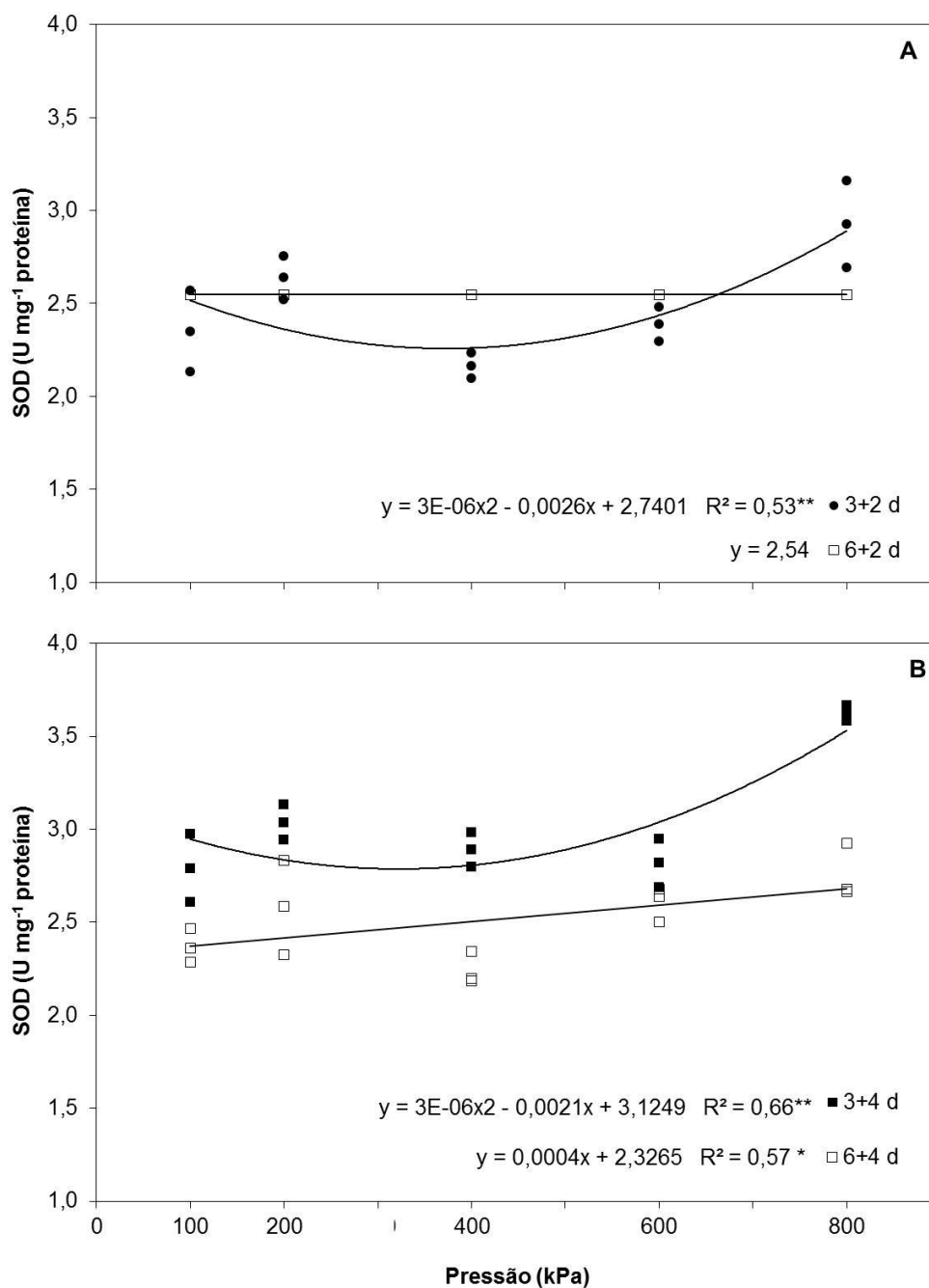


Figura 19. Relação entre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) de tomates Débora' inoculados com *B. cinerea* e a pressão hiperbárica aplicada, após 2 dias (A) e 4 dias (B) em condição de ambiente a 23 °C, 50% UR e 100 kPa. ** significativo ($P < 0,01$) * significativo ($P < 0,05$)

Como a SOD é considerada a primeira linha de defesa contra as espécies reativas de oxigênio (ERO_s) capaz de aumentar na resistência dos frutos contra as infecções por patógenos (GRATÃO et al., 2005), tem sido intensamente estudada após os tratamentos físicos na pós-colheita de diversos frutos e hortaliças, como a radiação UV-C (2,0 KJ m⁻²), que segundo Jin et al. (2017), induziu o aumento da atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e APX), em morangos, contribuindo para o aumento da resistência dos frutos a infecção por *B. cinerea*.

Neste trabalho, as pressões hiperbáricas por 3 e 6 dias não catalisaram a atividade da SOD, já que os conteúdos verificados nos tomates pressurizados foram similares aos obtidos no controle. Entretanto, a alta atividade dos tomates tratados com 800 kPa após 3+4 dias na condição de ambiente, pode ter favorecido a menor incidência (25%) e redução da severidade (68%) do mofo cinzento, este fato também demonstra o efeito positivo dos tratamentos hiperbáricos na indução da resistência à doenças.

h) Atividade da enzima catalase (CAT)

Para a atividade enzimática da CAT, houve uma relação funcional significativa ($P < 0,01$) positiva com a pressão aplicada nos dois períodos de PH (Figura 20).

Com 3 dias de PH, a atividade da CAT foi significativamente superior nos tomates tratados com 400, 600 e 800 kPa, com média de $6,1 \times 10^{-12}$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ degradado $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ proteína, em relação aos frutos do controle ($2,5 \times 10^{-12}$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ degradado $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ proteína).

Já no 6° dia, a pressão de 800 kPa promoveu um aumento significativo de 49% na atividade da CAT em relação ao controle, porém esta atividade foi semelhante a dos frutos armazenados por 3 dias, ou seja, o tempo de exposição (3 ou 6 dias) dos frutos a pressão elevada (800 kPa) não influenciou a atividade enzimática da CAT (Figura 20).

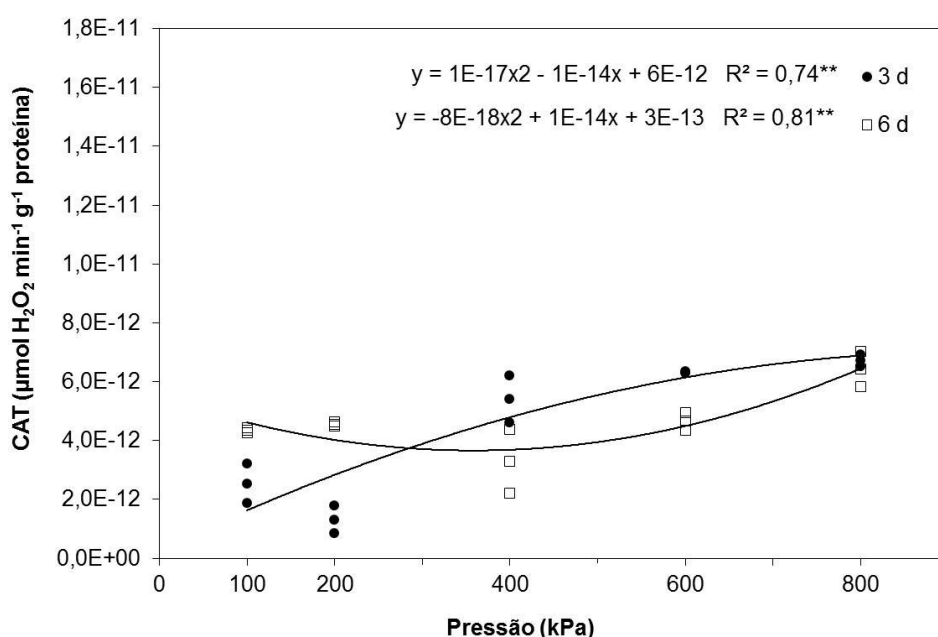


Figura 20. Relação entre a atividade da enzima catalase (CAT) de tomates Débora' inoculados com *B. cinerea* e a pressão hiperbárica aplicada por 3 e 6 dias a 23 °C e 95% UR. ** significativo ($P < 0,01$)

Na condição ambiente de 3+2 dias, não foi possível estabelecer uma relação funcional entre as pressões e a atividade da CAT, a qual foi em média de $7,6 \times 10^{-12}$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ degradado $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ proteína (Figura 21A). Enquanto, na avaliação de 6+2 dias, houve uma relação funcional significativa ($P < 0,01$), com a pressão aplicada, sem diferenças significativas na atividade da CAT dos tomates submetidos às pressões de 600 e 800 kPa e do controle (Figura 21A).

Aos 3+4 dias de condição de ambiente, o maior valor na atividade da CAT, foi registrada nos tomates submetidos a 800 kPa ($1,5 \times 10^{-11}$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ degradado $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ proteína), em relação as demais pressões e ao controle (Figura 21B). Já em 6+4 dias, as maiores atividades ocorreram nos tomates submetidos às pressões de 400, 600 e 800 kPa, com médias de $5,3 \times 10^{-12}$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ degradado $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ proteína, as quais foram significativamente diferentes do controle ($1,9 \times 10^{-12}$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ degradado $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ proteína) (Figura 21B).

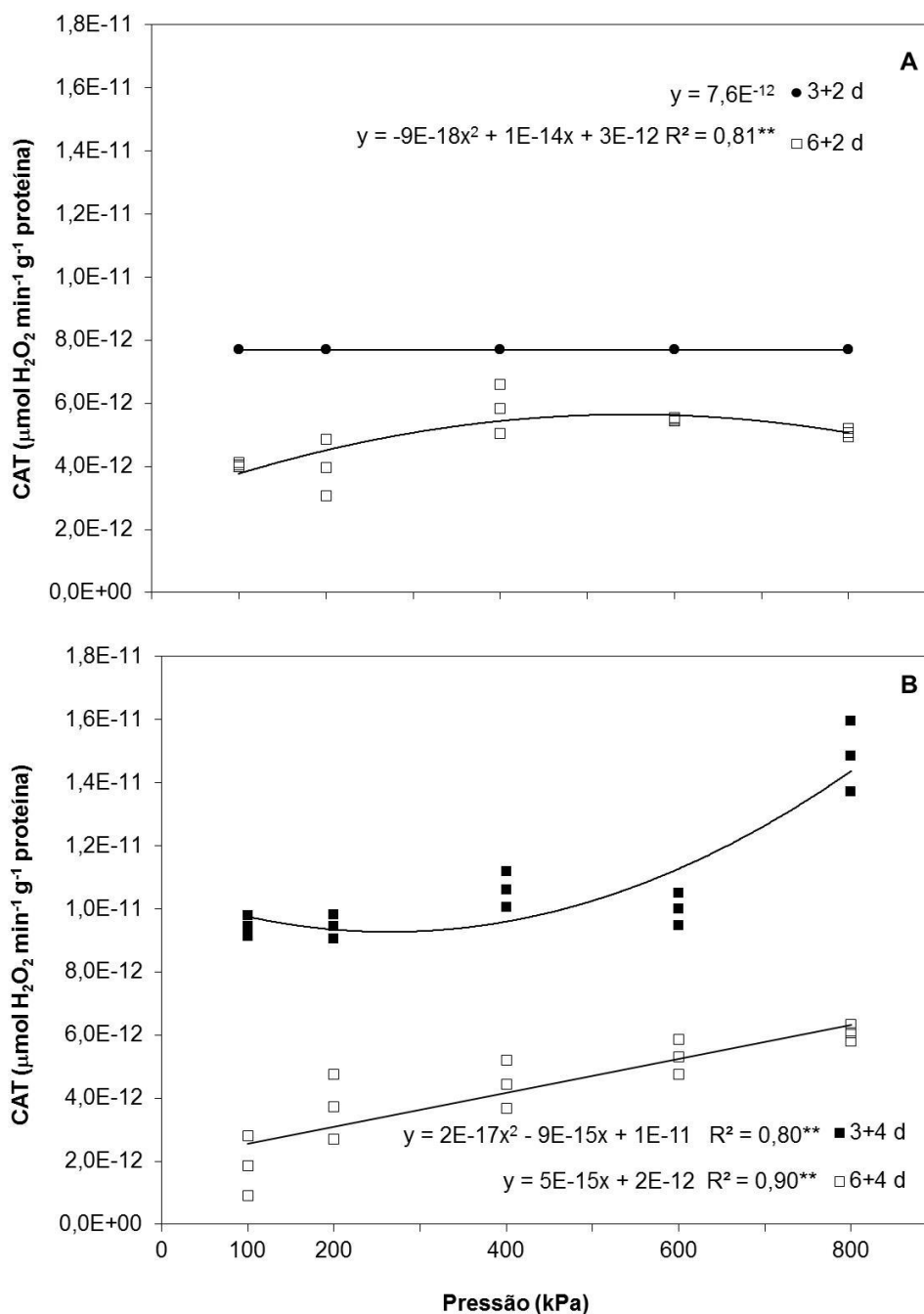


Figura 21. Relação entre a atividade da enzima catalase (CAT) de *Débora'* inoculados com *B. cinerea* e a pressão hiperb\u00e1rica aplicada, ap\u00f3s 2 dias (A) e 4 dias (B) em condi\u00e7\u00e3o de ambiente a 23 °C, 50% UR e 100 kPa. ** significativo ($P < 0,01$)

A CAT desempenha um papel importante na remo\u00e7\u00e3o de per\u00f3xido de hidrog\u00eanio (H_2O_2) das c\u00e9lulas vegetais, por meio da dismuta\u00e7\u00e3o do H_2O_2 gerado nos peroxissomas por oxidases envolvidas na β -oxida\u00e7\u00e3o de \u00e1cidos graxos, fotorrespira\u00e7\u00e3o e catabolismo pur\u00ednico (IGAMBERDIEV; LEA 2002; GILL; TUTEJA,

2010). Por isso, a capacidade dos frutos em manter alta atividade da CAT é um importante mecanismo de defesa contra os fatores de estresses (BOONKORN, 2016). Relatos indicam que tratamentos físicos na pós-colheita de morangos, como altas temperaturas (38 °C) e UV-C (2.0 kJ m⁻²), induziram um incremento nas atividades de SOD e CAT em relação ao controle, resultando no aumento da resistência dos frutos à doença causada por *B. cinerea* durante 12 dias de armazenamento à 5 °C (JIN et al., 2017).

Nesse sentido, os resultados deste ensaio demonstraram que o armazenamento hiperbárico a 800 kPa por 3 dias, propiciou a ativação da CAT dos tomates, a qual se manteve elevada após 4 dias nas condições de ambiente. Isto pode estar diretamente relacionado com uma maior proteção das células ao ataque dos patógenos, resultando em uma menor infecção por *B. cinerea*, confirmada pela menor incidência (25%) e severidade (68%) da doença, em relação ao controle (Figura 5B e 7B).

4.3 Efeito de pressões hiperbáricas no controle de *Alternaria* sp. *in vitro*

Uma relação inversamente proporcional ($P < 0,01$) entre o crescimento micelial de *Alternaria* sp., representado pelo diâmetro micelial (mm), e a pressão aplicada ocorreu no período de PH (3 e 6 dias) e de PH+I (3+7 e 6+4 dias) (Figura 22).

Após 3 e 6 dias de PH, houve uma tendência linear negativa entre o diâmetro micelial de *Alternaria* sp. com o aumento da pressão aplicada, sem diferenças significativas entre os dois períodos. Porém, a pressão de 800 kPa foi a mais eficiente, reduzindo significativamente em 39% o crescimento micelial do fungo, em relação ao controle (100 kPa) (Figura 22).

Nos períodos finais de incubação, 3+7 e 6+4 dias, a pressão de 800 kPa reduziu significativamente o crescimento micelial, respectivamente em 43 e 14%, em relação ao controle (Figura 22).

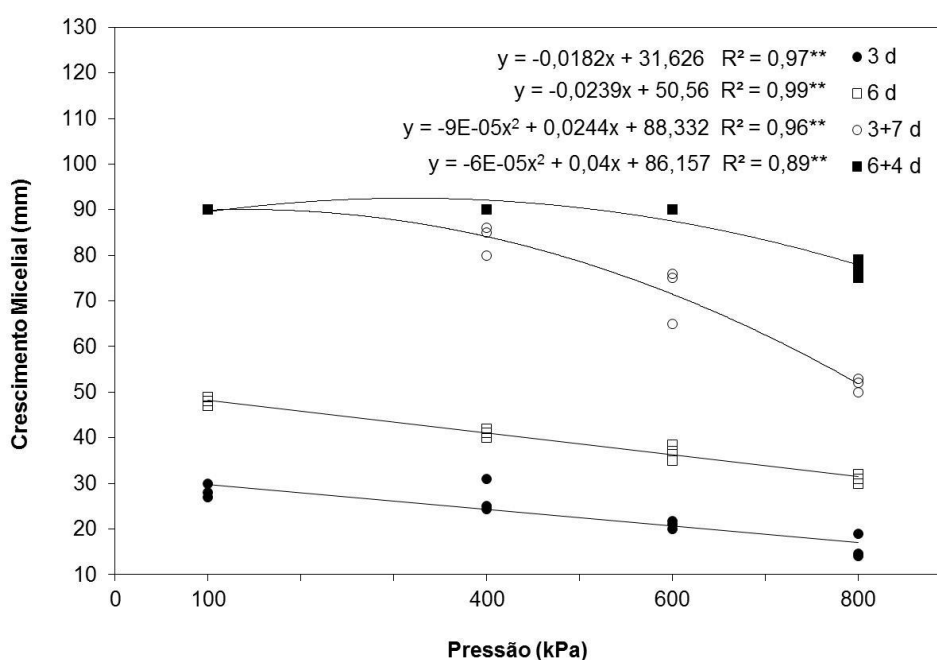


Figura 22. Relação entre o crescimento micelial (mm) de *Alternaria* sp. e a pressão hiperbárica aplicada por 3 e 6 dias a 23 °C e 95% UR e por 7 e 4 dias em condição de incubação a 26 °C, 12h fotoperíodo e 100 kPa. ** significativo ($P < 0,01$)

Similar aos resultados obtidos com *Alternaria* sp. *in vitro* sob tratamentos hiperbáricos, estudos prévios com tratamentos hipobáricos (baixa pressão) revelam que o crescimento *in vitro* de fungos foi reduzido sob o armazenamento de 3 a 6 kPa por 3 a 4 dias, porém o crescimento normal foi retomado após a transferência para as condições ambientais (BARKAI-GOLAN, 2001; ROMANAZZI, 2001).

A taxa de germinação dos conídios de *Alternaria* sp. foi reduzida significativamente ($P < 0,01$) e de maneira gradual com o incremento das pressões aplicadas. No período final de incubação ocorreu redução de 45% (3+7) e de 27% (6+4) na taxa de germinação dos conídios quando tratados com a pressão de 800 kPa, diferindo significativamente em relação aos controles, que tiveram 100% dos conídios germinados (Figura 23).

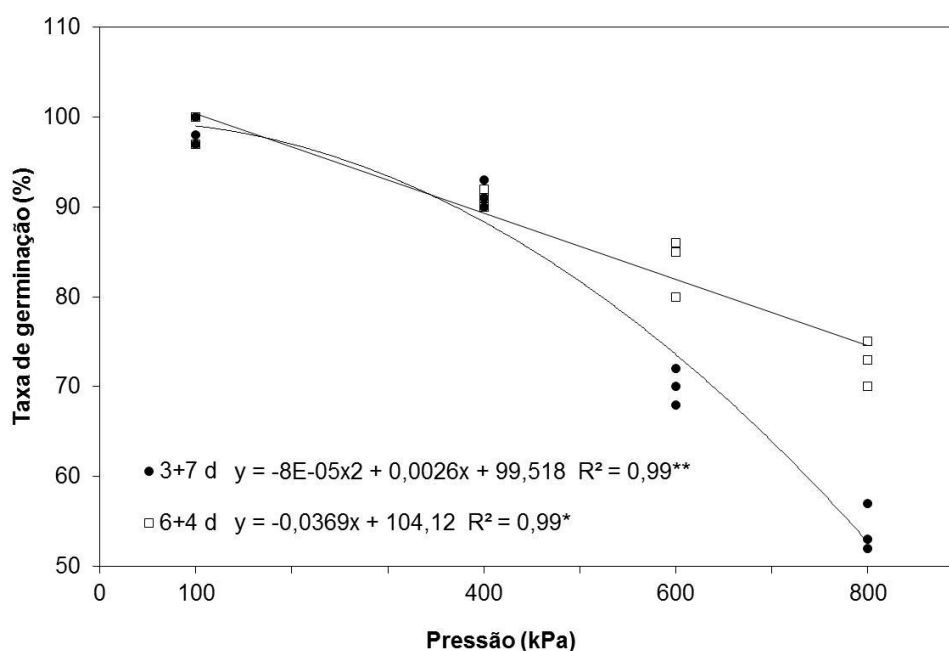


Figura 23. Relação entre a taxa de germinação (%) de *Alternaria* sp. e a pressão hiperbárica aplicada após 7 e 4 dias em condição de incubação a 26 °C, 12h fotoperíodo e 100 kPa. ** significativo ($P < 0,01$) * significativo ($P < 0,05$)

Ao contrário dos resultados obtidos com os tratamentos hiperbáricos para a germinação dos conídios, Zhao et al. (2014) verificaram que tratamentos térmicos (43 °C por 10, 20 ou 30 min) inibiram a germinação e o alongamento do tubo germinativo de *B. cinerea*, devido à indução no acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), ao colapso das membranas mitocondriais e à diminuição nos níveis de ATP intracelular das células dos conídios.

De acordo com os resultados obtidos neste ensaio, a redução no crescimento micelial (39%) de *Alternaria* sp. foi semelhante após os períodos de 3 e 6 dias de pressão hiperbárica. Porém, após 3 dias na pressão de 800 kPa verificou-se no final do período de incubação (3+4 dias), menor crescimento micelial do fungo e menor taxa de germinação dos conídios, em relação ao controle e ao período de 6 dias de PH.

De maneira semelhante ao verificado em *B. cinerea* a ação das pressões hiperbáricas em *Alternaria* sp. não foi fungistática, visto que esse fungo retomou o crescimento micelial, após permanecer em condições de incubação (100 kPa, 26 °C e 12 h de fotoperíodo), porém com redução na taxa de crescimento micelial de 43% após 3+7 dias, quando comparadas com o controle.

Estudos adicionais são necessários para compreender melhor a influência das pressões hiperbáricas nos diferentes patógenos fúngicos, e como estes se adaptam ao estresse provocado pelo tratamento nos meios nutritivos (BDA), já que estes podem ser bastante diferentes da superfície dos frutos, devido aos diferentes fatores intrínsecos (pH e água).

Portanto, seria interessante estudar o crescimento *in vitro* e a taxa de germinação dos fungos tratados com as pressões hiperbáricas com a manipulação dos fatores intrínsecos do meio de crescimento, bem como diferentes tempos de exposição e de temperatura.

4.4 Efeito de pressões hiperbáricas no controle da mancha de alternaria nos tomates inoculados com *Alternaria* sp.

a) Incidência e severidade da mancha de alternaria

Houve uma relação funcional significativa ($P < 0,05$) entre a pressão aplicada e a incidência da doença no período de PH, sendo observadas tendências inversamente proporcionais com o aumento da pressão aplicada (Figura 24).

Embora não tenham sido observadas diferenças significativas na incidência da mancha de alternaria entre os dois períodos de permanência na PH (3 ou 6 dias), a pressão de 800 kPa foi significativamente mais eficiente, com a ocorrência da mancha de alternaria em 71% dos frutos, em relação ao controle (Figura 24).

Após a permanência dos frutos na condição de ambiente (PH+A), constatou-se um aumento na incidência da mancha de alternaria dos frutos tratados e não tratados com as pressões hiperbáricas.

Todavia, não foi possível estabelecer uma relação funcional ($P > 0,05$) para a variável em questão, sendo que a incidência da mancha de alternaria foi semelhante entre os tomates tratados e o controle, com 88 e 92% de ocorrência, respectivamente após 2 e 4 de condição de ambiente.

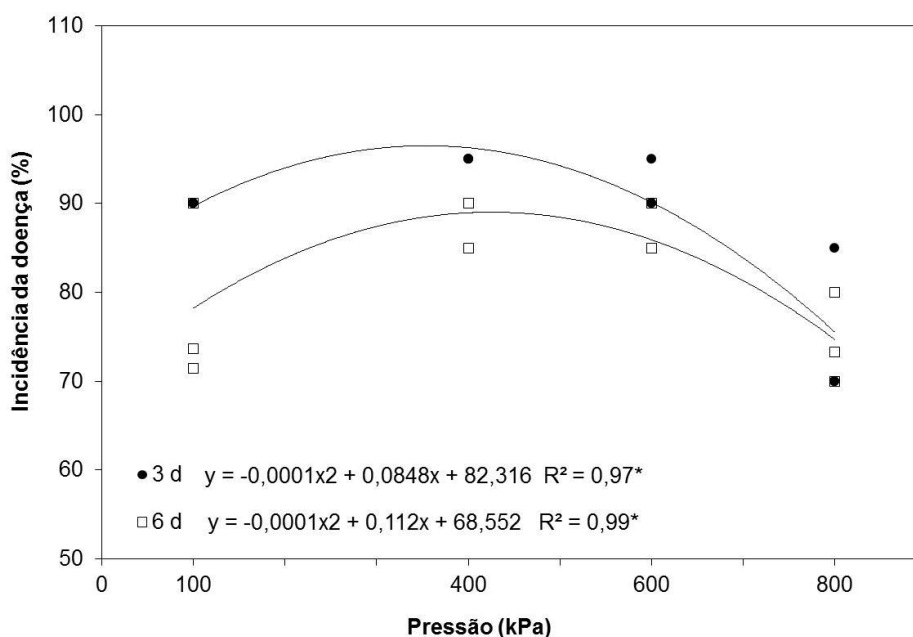


Figura 24. Relação entre a incidência (%) da mancha de alteraria de tomates 'Débora' inoculados com *Alternaria* sp. e a pressão hiperbárica aplicada por 3 e 6 dias a 23 °C e 95% UR. * significativo ($P < 0,05$)

Para a severidade da doença ocorreu uma relação funcional significativa ($P < 0,01$) entre a pressão aplicada e no período de PH e PH+A (Figura 25 e 26).

A severidade da doença nos tomates tratados com 800 kPa (diâmetro de 5,5 mm) foi 54% significativamente menor, em relação ao controle (diâmetro de 12 mm) no 3° dia de PH. Enquanto que no 6° dia, não houve diferença significativa entre os tomates tratados com 600 e 800 kPa (diâmetro médio de 13,7 mm), com redução de 17% na severidade da doença, em relação a pressão de 400 kPa e do controle (diâmetro médio de 16,5 mm) (Figura 25).

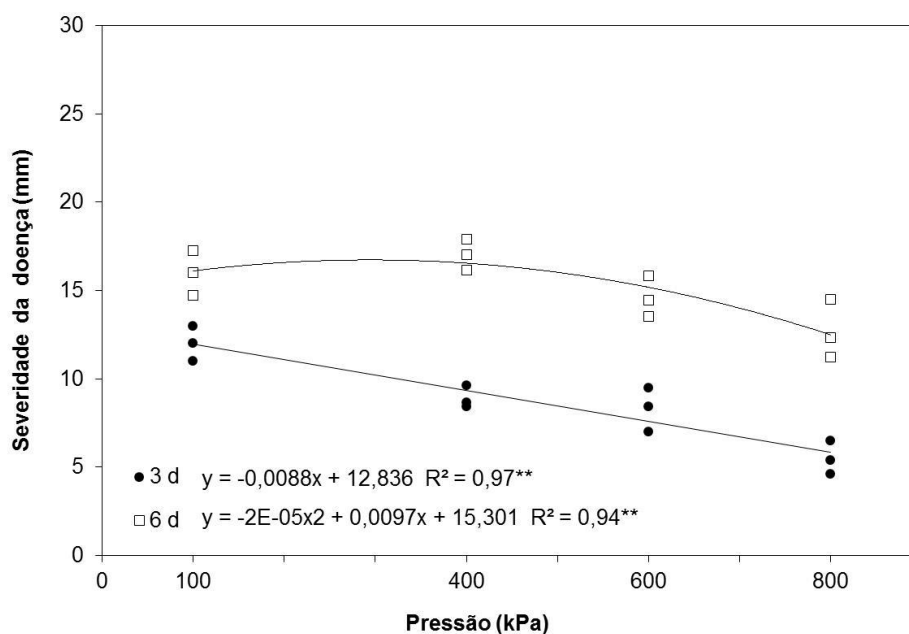


Figura 25. Relação entre severidade (mm) da mancha de alteraria de tomates 'Débora' inoculados com *Alternaria* sp. e a pressão hiperbárica aplicada por 3 e 6 dias a 23 °C e 95% UR. ** significativo ($P < 0,01$)

Após a permanência dos frutos na condição de ambiente (PH+A), não houve diferença estatísticas nos tomates submetidos às pressões hiperbáricas por 3 e 6 dias, porém constatou-se que os frutos tratados com 800 kPa tiveram redução significativa de 25% na severidade da mancha de alternaria, em relação ao controle, após 2 e 4 dias de condição de ambiente (Figura 26A e 26B).

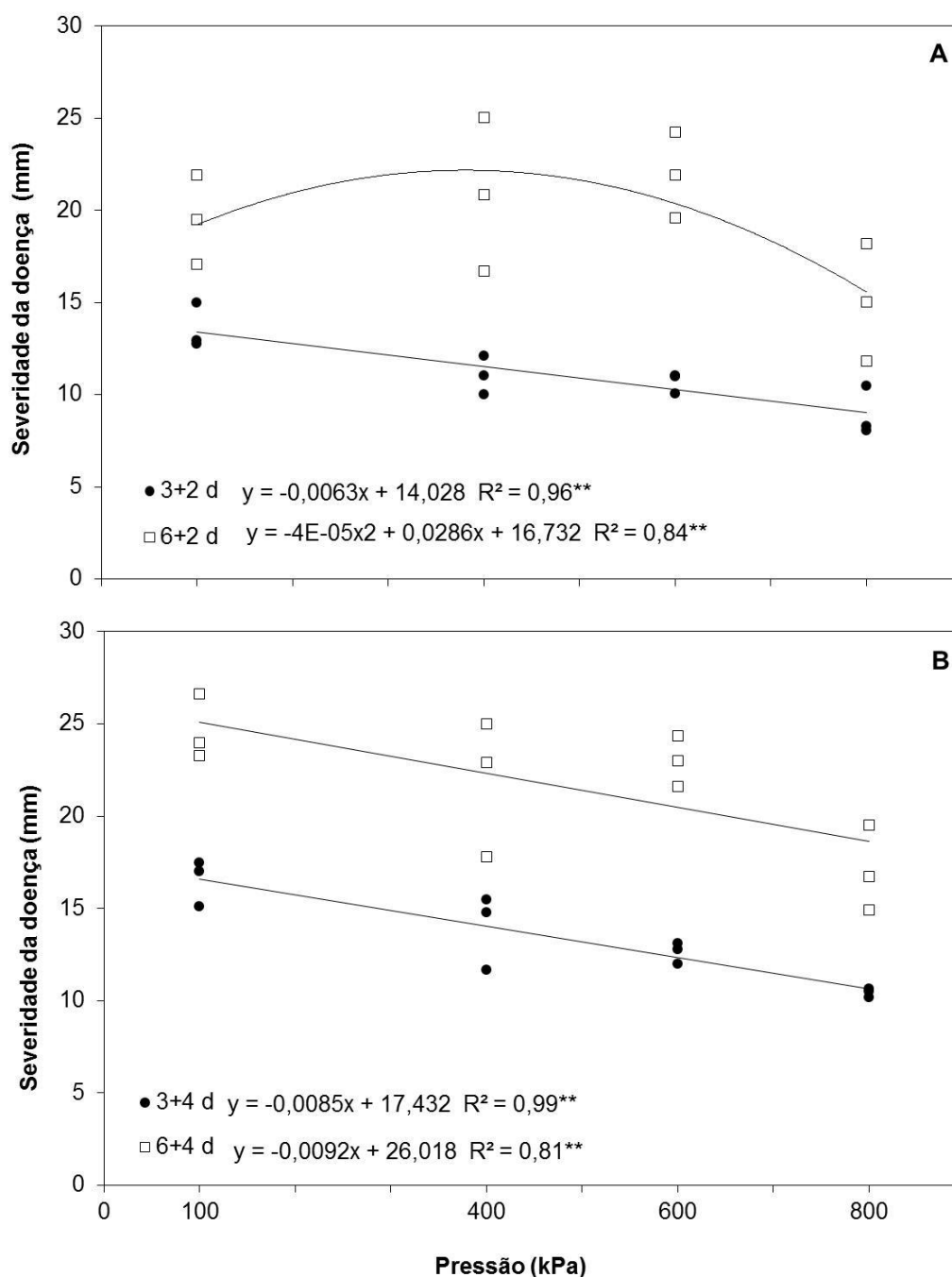


Figura 26. Relação entre severidade (mm) da mancha de alteraria de tomates 'Débora' inoculados com *Alternaria* sp. e a pressão hiperbárica aplicada, após 2 dias (A) e 4 dias (B) em condição de ambiente a 23 °C, 50% UR e 100 kPa. ** significativo ($P < 0,01$)

Embora Romanazzi et al. (2008) verificaram que bagas de uvas, submetidas a pressão de 150 kPa por um curto período (24 h), tiveram uma redução de 31% na incidência do mofo cinzento, os resultados deste estudo evidenciaram que os

tratamentos hiperbáricos não foram capazes de diminuir de maneira expressiva a incidência da *Alternaria* sp. nos tomates após 3 e 6 dias de permanência na pressão.

Os resultados obtidos neste ensaio, após a condição de ambiente (3+4 dias), revelaram que a pressão de 800 kPa por 3 dias, foram menos efetivas na redução da incidência e severidade de *Alternaria* sp., quando comparados com o efeito verificado nos tomates inoculados com *B. cinerea*, o que evidencia uma variação na redução do desenvolvimento de diferentes patógeno com as pressões aplicadas.

De acordo com Hashmi et al. (2013), as variações no desenvolvimento das podridões nos frutos de morangos, submetidos aos tratamentos hipobáricos (baixa pressão) de 25, 50 e 75 kPa por 4 e 6h, pode ter ocorrido devido ao tempo de exposição ao tratamento, diferentes cultivares, tempo de colheita e aplicação dos tratamento e influencia de fatores relacionados a pré-colheita.

Diante disso, mais estudos são necessários para aperfeiçoar o tratamento hiperbárico para as necessidades de cada fruto ou hortaliça, com combinação ideal do binômio, pressão e tempo, a fim de controlar os principais patógenos que causam as podridões da pós-colheita.

b) Conteúdo de licopeno

Após os períodos de tratamento hiperbárico e condição de ambiente houve uma relação inversamente proporcional ($P < 0,01$), entre o conteúdo de licopeno dos tomates e a pressão aplicada, sendo que, os tomates submetidos à pressão hiperbárica (400, 600 e 800 kPa) apresentaram um conteúdo menor de licopeno em relação ao controle (Figura 27).

Não houve diferenças significativas no conteúdo de licopeno dos tomates entre os períodos de permanência de PH (3 e 6 dias), contudo os tomates tratados com 600 e 800 kPa apresentaram conteúdo médio de $0,7 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ de polpa, com redução significativa de 70%, em relação aos frutos do controle ($2,4 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ de polpa) (Figura 27).

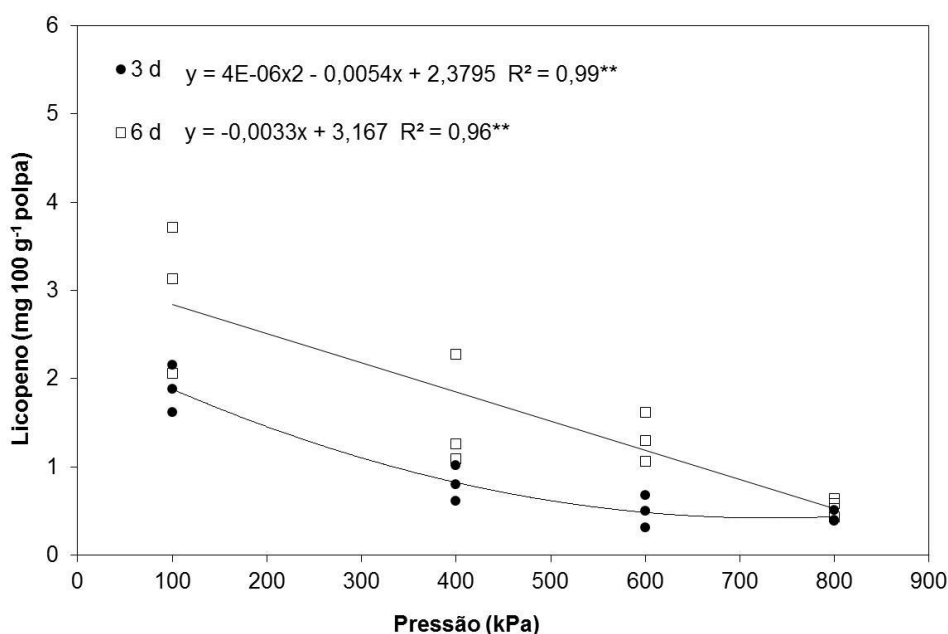


Figura 27. Relação entre o conteúdo de licopeno de tomates ‘Débora’ inoculados com *Alternaria* sp. e a pressão hiperbárica aplicada por 3 e 6 dias a 23 °C e 95% UR. ** significativo ($P < 0,01$)

Os tomates tratados com 600 e 800 kPa tiveram os menores conteúdos de licopeno, com médias de 1,1 e 1,9 mg 100 g⁻¹ de polpa, respectivamente após 2 e 4 dias de armazenamento na condição de ambiente, diferindo significativamente dos frutos da pressão de 400 kPa e do controle, com redução de 60 e 49% no conteúdo de licopeno em cada período (Figura 28A e 28B).

As tendências observadas nos períodos de avaliação de PH e PH+A dos tomates inoculados com *Alternaria* sp. foram similares as verificadas nos tomates com *B. cinerea* (Figura 8 e 9), com redução significativa do conteúdo de licopeno dos tomates com o aumento da pressão aplicada, e conseqüentemente, um retardo no amadurecimento desses frutos

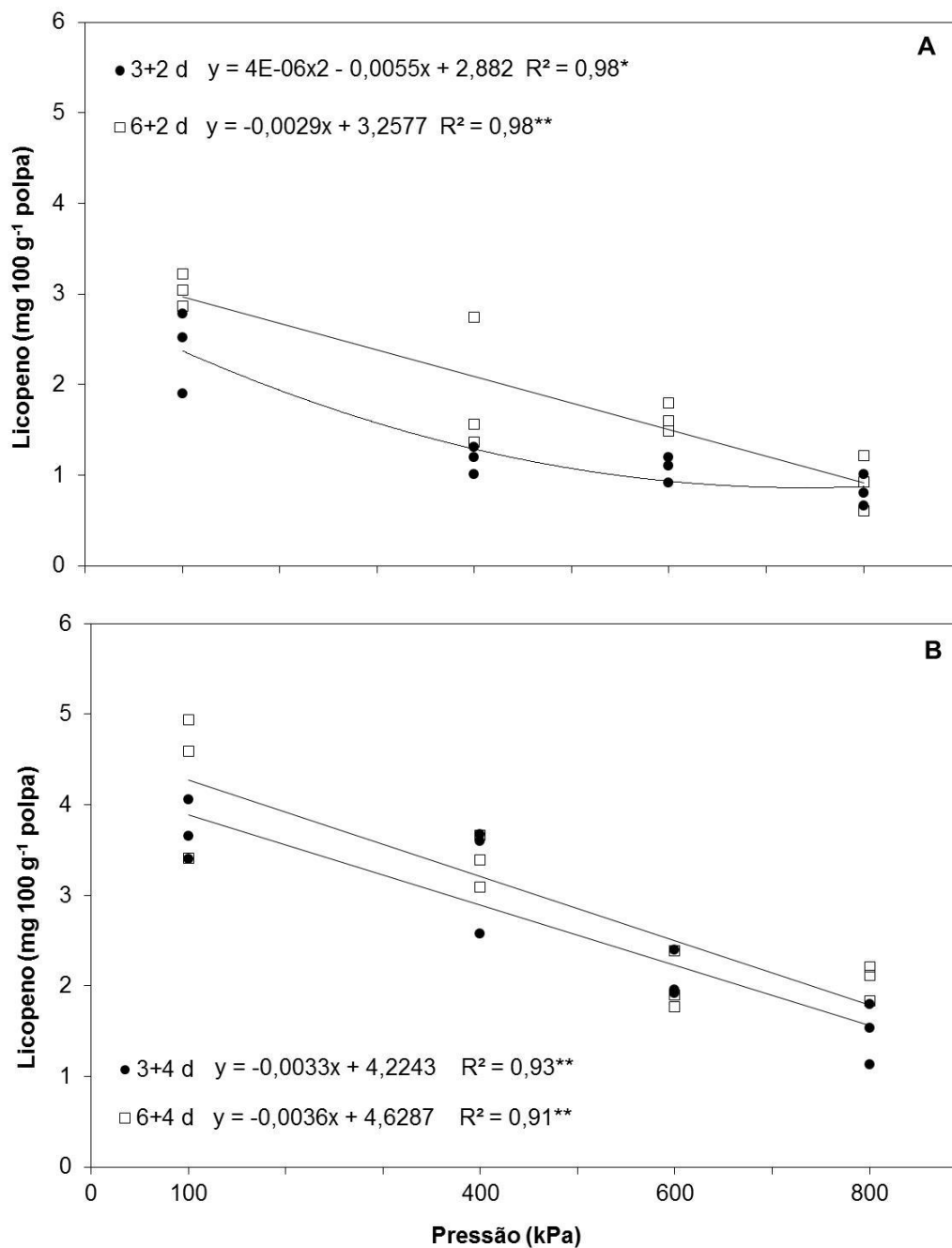


Figura 28. Relação entre o conteúdo de licopeno de tomates ‘Débora’ inoculados com *Alternaria* sp. e a pressão hiperbárica, após 2 dias (A) e 4 dias (B) em condição de ambiente a 23 °C, 50% UR e 100 kPa. ** significativo ($P < 0,01$) * significativo ($P < 0,05$)

Segundo Cantu et al., (2008) o amadurecimento dos frutos pode aumentar à suscetibilidade a infecção por patógenos, porém os resultados obtidos neste ensaio não evidenciaram que o estágio de maturação dos tomates influenciou na resistência contra a infecção por *Alternaria* sp. Embora após 4 dias na condição de

ambiente, os tomates tratados com a pressão de 600 e 800 kPa tiveram o menor conteúdo de licopeno (1,9 mg 100 g⁻¹ de polpa) em relação ao controle, a incidência da doença foi semelhante ao controle (100 kPa) e a severidade da mancha de alternaria foi reduzida em apenas 25%.

Contrariamente a estes resultados, os tomates inoculados com *B. cinerea* tiveram conteúdo de licopeno (1,8 mg 100 g⁻¹ de polpa) semelhante aos obtidos nos tomates inoculados com *Alternaria* sp. após 4 dias, porém a incidência foi menor de 25% e redução expressiva de 68% na severidade da mancha de alternaria (Figura 5B e 7B).

c) Atividade da peroxidase (POD)

Houve relação inversamente proporcional ($P < 0,05$), entre a atividade da POD com o aumento da pressão aplicada, no período de tratamento hiperbárico (Figura 29).

No 3º dia de PH houve diferenças significativas entre a atividade enzimática da POD dos tomates da pressão de 400, 600 e 800 kPa, com média de 0,0009 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2$ decomposto $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de proteína, sendo menor em 31% em relação ao controle (0,0013 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2$ decomposto $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de proteína). No 6º dia, os tomates tratados com 600 e 800 kPa tiveram uma atividade da POD média de 0,0012 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2$ decomposto $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de proteína, com redução significativa de 32% em relação aos tomates da pressão de 400 e do controle (média de 0,0018 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2$ decomposto $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de proteína). A atividade da enzima POD dos tomates submetidos à pressão de 800 kPa não foi afetada pelo tempo de permanência na pressão (Figura 29).

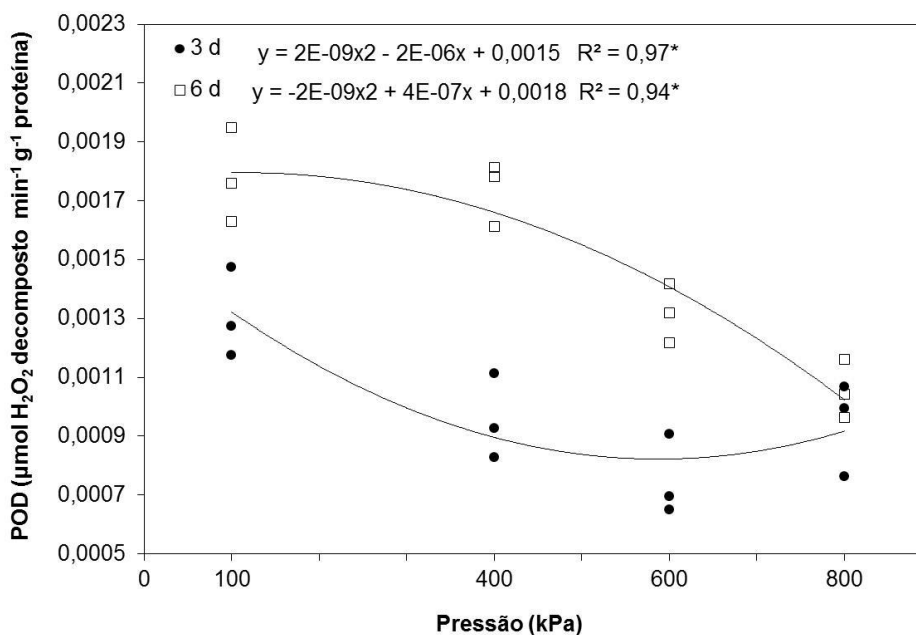


Figura 29. Relação entre a atividade da enzima peroxidase (POD) de tomates 'Débora' inoculados com *Alternaria* sp. e a pressão hiperbárica aplicada por 3 e 6 dias a 23 °C e 95% UR. * significativo ($P < 0,05$)

Durante a condição de ambiente (2 e 4 dias) ocorreu uma relação inversamente proporcional, entre a atividade da POD e o aumento da pressão aplicada com diferentes graus de significância, porém os tomates apresentaram atividade enzimática similar entre os períodos de avaliação, independentemente do tempo de permanência de PH. Após 2 dias, os tomates tratados com 600 e 800 kPa tiveram atividade enzimática da POD média de 0,0013 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2$ decomposto $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de proteína, significativamente menor (18%) em relação ao controle (Figura 30A). Em 4 dias, os tomates tratados com as pressões de 400, 600 e 800 kPa tiveram atividade enzimática média de 0,0015 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2$ degradado $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de proteína, significativamente menor (21%) em relação ao controle (0,0019 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2$ decomposto $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de proteína) (Figura 30B).

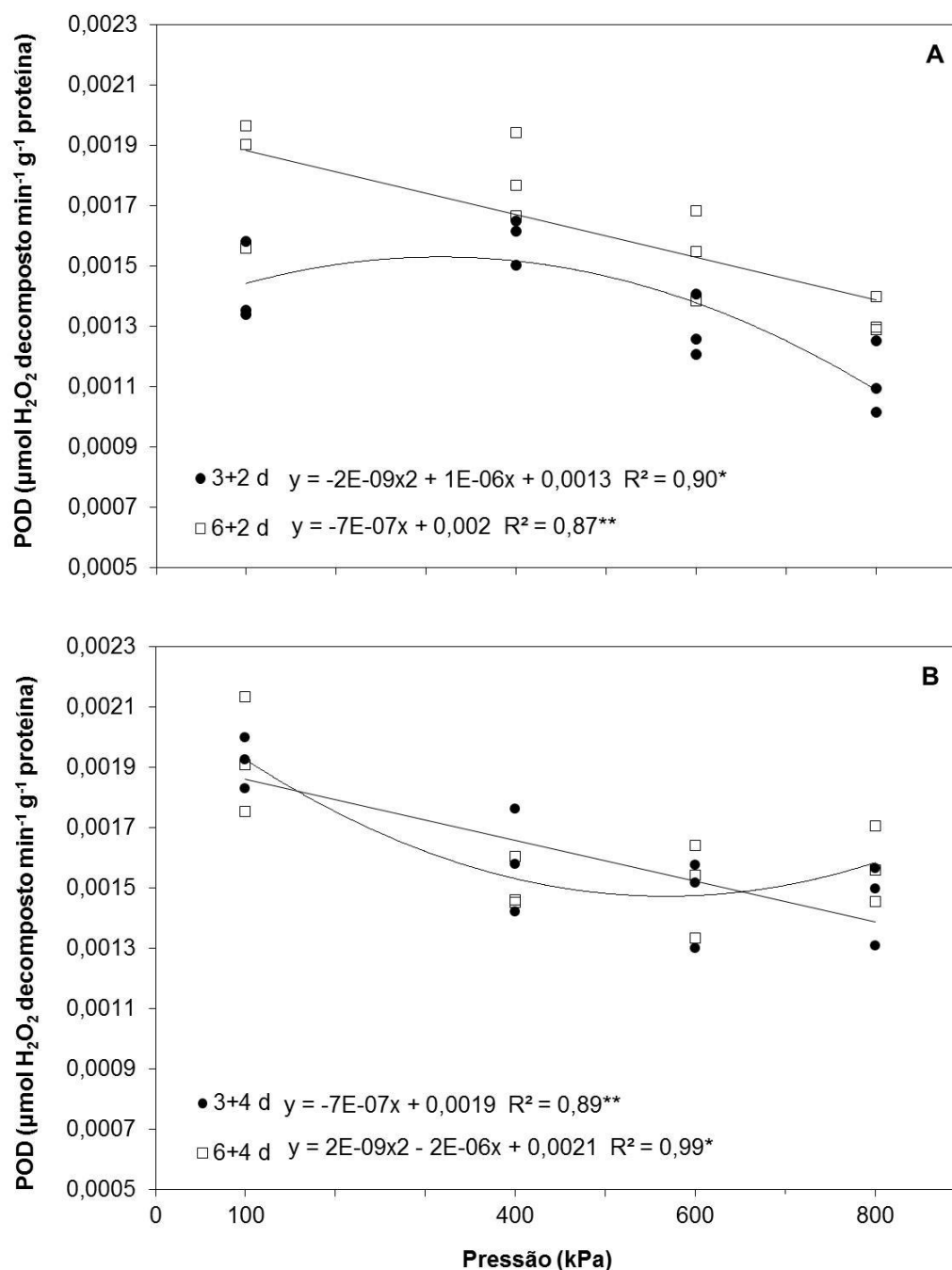


Figura 30. Relação entre a atividade da enzima peroxidase (POD) de tomates 'Débora' inoculados com *Alternaria* sp. e a pressão hiperbárica aplicada, após 2 dias (A) e 4 dias (B) em condição de ambiente a 23 °C, 50% UR e 100 kPa. ** significativo ($P < 0,01$) * significativo ($P < 0,05$)

A POD pode ser considerada uma enzima indicadora do amadurecimento e senescência em diversos tecidos vegetais, sendo que elevados níveis estão associados com a deterioração oxidativa de frutos que se encontram em estágio

avançado de amadurecimento (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Os resultados encontrados no último dia de simulação comercial (3+4 e 6+4) estão em concordância com estas afirmações, cujos frutos do controle (100 kPa) apresentaram atividade da POD superior aos tratados com as pressões, uma vez que estes também tiveram o maior conteúdo de licopeno, evidenciando o amadurecimento avançado.

De acordo com Nascimento e Barrigossi (2014), a elevação da atividade enzimática da POD está associada com a ativação do sistema de defesa, em resposta à grande diversidade de agentes estressores (ataques de patógenos, insetos e estressores abióticos).

Entretanto, os resultados obtidos nesse ensaio indicam que os tratamentos hiperbáricos não foram capazes de induzir a atividade da enzima POD, não influenciando, possivelmente, os mecanismos de defesa contra a infecção por *Alternaria* sp., demonstrada pela elevada incidência (88%) e redução de 25% do diâmetro da lesão, nos períodos finais simulação comercial (3+4 e 6+4 dias). A susceptibilidade aos patogênicos está positivamente correlacionada com o grau de amadurecimentos dos frutos e com a redução da atividade das enzimas relacionadas à defesa.

Estes resultados contrariam os obtidos nos tomates inoculados com *B. cinerea*, nos quais as pressões de 600 e 800 kPa induziram a síntese da POD por 3 e 6 dias, com a ativação dos mecanismos de defesa, evidenciado pela baixa incidência 25% da doença e redução de 68% da severidade da doença, em relação ao controle, após 4 dias de armazenamento na condição de ambiente (Figura 5B e 7B).

d) Atividade de fenilalanina amônia-liase (PAL)

Durante os períodos de armazenamento hiperbárico (PH), a atividade enzimática da PAL dos tomates e a pressão aplicada tiveram uma relação funcional significativa ($P < 0,01$) e com tendência similares (Figura 31).

No 3º dia de PH, os tomates tratados com as pressões de 600 e 800 kPa tiveram atividade enzimática da PAL semelhante ao controle, com média de 265,7

nmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. No 6° dia de PH, os frutos da pressão de 800 kPa apresentaram a maior atividade da PAL, com 324,6 nmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína, diferindo significativamente das demais pressões e do controle (100 kPa), os quais tiveram em média atividade de 295,5 nmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína (Figura 31).

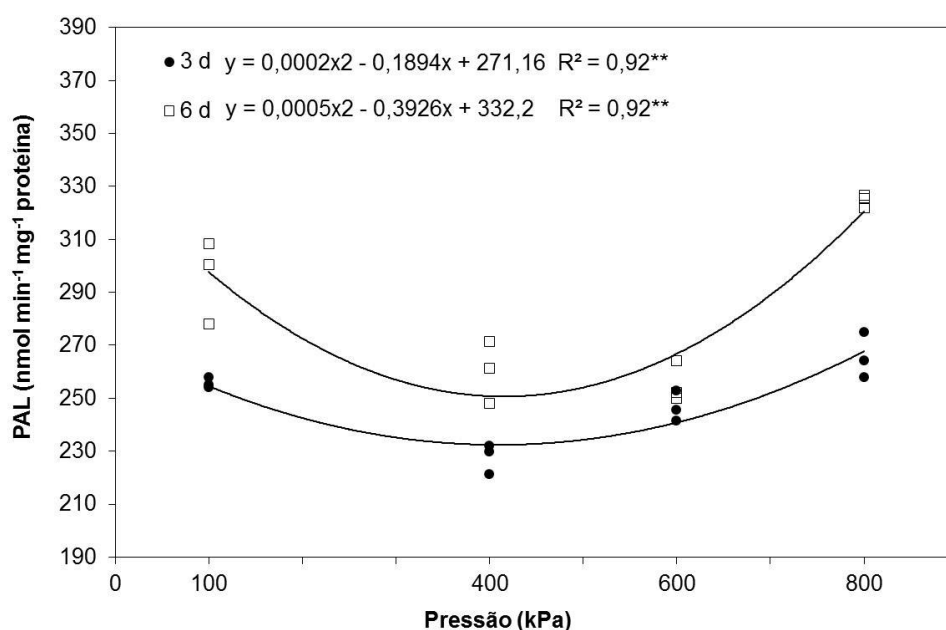


Figura 31. Relação entre a atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) de tomates 'Débora' inoculados com *Alternaria* sp. e a pressão hiperbárica aplicada por 3 e 6 dias a 23 °C e 95%. ** significativo ($P < 0,01$).

Durante os períodos de permanência na condição de ambiente (PH+A), a atividade enzimática da PAL dos tomates e a pressão aplicada tiveram uma relação funcional positiva com diferentes significâncias (Figura 32).

Após 3+2 dias, a atividade enzimática da PAL dos tomates tratados com 400, 600 e 800 kPa foi de 279,5 nmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína, com aumento significativo de 12% em relação ao controle (249,7 nmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) (Figura 32A). No dia 6+2, os tomates tratados com 600 e 800 kPa tiveram atividade média de 328,5 nmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína, com aumento significativo ($P < 0,01$) de 17% em relação ao controle e a pressão de 400 kPa (média de 280,3 nmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) (Figura 32A).

No final do período de armazenamento de 3+4 e 6+4 dias, foi registrada a maior atividade da PAL, respectivamente de 319,2 e 359,8 nmol min⁻¹ mg de

proteína nos tomates tratados com 800 kPa, o que representa um aumento significativo de 22 e 17 % em relação aos respectivos controles (262,2 e 307,2 nmol min⁻¹ mg de proteína) (Figura 32B).

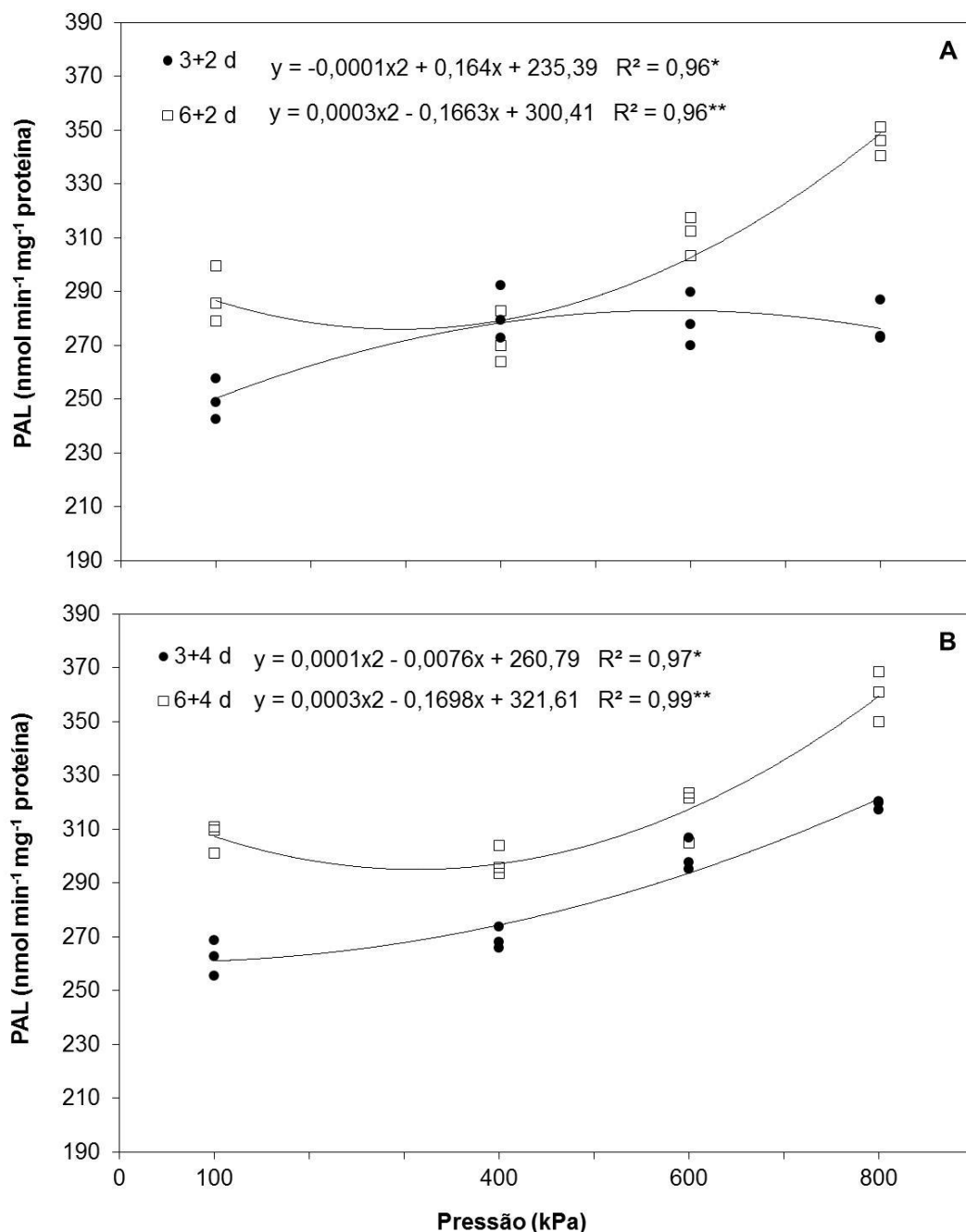


Figura 32. Relação entre a atividade da enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL) de tomates 'Débora' inoculados com *Alternaria* sp. e a pressão hiperbárica aplicada, após 2 dias (A) e 4 dias (B) em condição de ambiente a 23 °C, 50% UR e 100 kPa. ** significativo ($P < 0,01$) * significativo ($P < 0,05$)

A fenilalanina amônia-liase (PAL), é a principal enzima envolvida na síntese dos fenilpropanoides, os quais participam da formação de metabolitos secundários, com destaque para compostos fenólicos, fitoalexinas e ligninas, relacionados com a resistência aos estresses bióticos e abióticos (VOGT, 2010; NGADZE et al., 2012).

Neste ensaio, com tomates inoculados com *Alternaria* sp., as pressões hiperbáricas exerceram um efeito positivo na atividade da PAL, após 3 e 6 dias, com aumento gradual até o final do período nas condições de ambiente, sendo que os tomates tratados com 800 kPa apresentaram elevada atividade após 6+4 dias.

Entretanto, os incrementos significativos na atividade enzimática da PAL dos tomates tratados com as pressões elevadas não foram suficientes para favorecer a ativação dos mecanismos de defesa destes frutos, uma vez que estes não apresentaram redução expressiva no desenvolvimento da *Alteraria* sp. De maneira distinta, a atividade da PAL pode ter proporcionado aumento na resistência à infecção por *B. cinerea*, corroborado pela menor incidência (25%) e severidade (68%) da doença, em relação ao controle, após 4 dias de armazenamento na condição de ambiente (Figura 5B e 7B).

e) Conteúdo de polifenóis totais

Após 3 dias de PH houve uma relação funcional significativa ($P < 0,01$), os tomates tratados com as pressões de 600 e 800 kPa tiveram redução significativa média de 10% no conteúdo de polifenóis totais (média de 9,8 GAE 100 g⁻¹ polpa), em relação ao controle e a pressão de 400 kPa (média de 10,4 GAE 100 g⁻¹ polpa). No 6° dia de PH, houve uma relação funcional significativa ($P < 0,05$), cujo conteúdo de polifenóis totais dos tomates das pressões de 600 e 800 kPa foi semelhante ao dos frutos do controle (média de 10,0 GAE 100 g⁻¹ polpa). O conteúdo de polifenóis totais dos tomates tratados com a pressão de 400 e 600 kPa foi semelhante entre os períodos de PH (Figura 33).

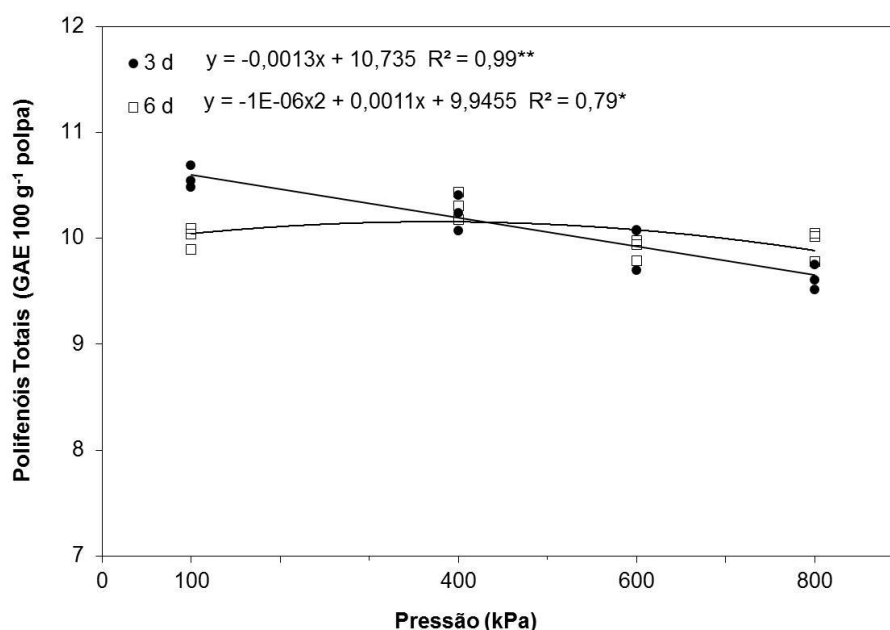


Figura 33. Relação entre o conteúdo de polifenóis totais de tomates 'Débora' inoculados com *Alternaria* sp. e a pressão hiperbárica aplicada por 3 e 6 dias a 23 °C e 95% UR. ** significativo ($P < 0,01$) * significativo ($P < 0,05$)

Após a condição de ambiente (PH+A), houve tendências semelhantes entre o conteúdo de polifenóis totais dos tomates e a pressão aplicada (Figura 34). Em 3+2 dias, o conteúdo de polifenóis totais dos tomates tratados com 800 kPa foi de 10,4 GAE 100 g⁻¹ polpa, sendo 10% significativamente maior que as demais pressões e o controle (9,4 GAE 100 g⁻¹ polpa). Em 6+2 dias, os tomates da pressão de 400 e 800 kPa tiveram o maior conteúdo de polifenóis, 9,3 GAE 100 g⁻¹ polpa, ou seja, com aumento de 16% em relação aos frutos de 600 kPa e do controle (8,1 GAE 100 g⁻¹ polpa) (Figura 34A).

No final do período de armazenamento de 3+4 e 6+4 dias, os tomates tratados com 800 kPa apresentaram conteúdo de polifenóis totais de 10,8 e 9,6 GAE 100 g⁻¹ polpa, respectivamente, com aumento de 12% em comparação aos frutos dos respectivos controles (Figura 34B). De maneira geral, não ocorreu um aumento expressivo no conteúdo de polifenóis dos tomates tratados com as pressões hiperbáricas no final do período na condição de ambiente, em comparação com valores registrados nos períodos de permanência nas pressões hiperbáricas (3 e 6 dias).

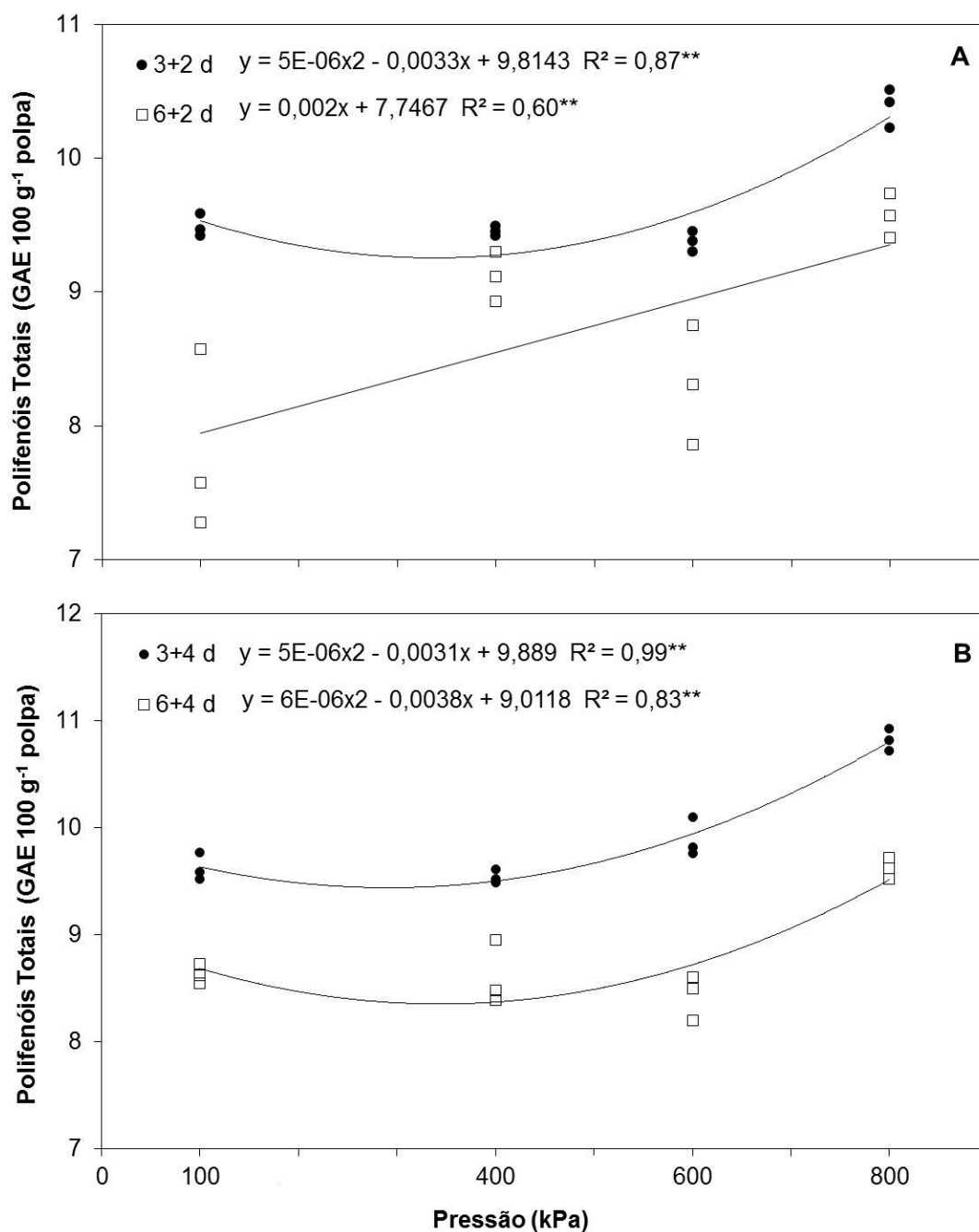


Figura 34. Relação entre o conteúdo de polifenóis totais de tomates 'Débora' inoculados com *Alternaria* sp. e a pressão hiperbárica aplicada, após 2 dias (A) e 4 dias (B) em condição de ambiente a 23 °C, 50% UR e 100 kPa. ** significativo ($P < 0,01$).

A síntese e acúmulo de compostos fenólicos, resultantes da ativação da via dos fenilpropanoides pela principal enzima-chave a PAL, podem também desempenhar um papel adicional nos mecanismos de defesa da planta, contra o ataque de patógenos fúngicos (ZHANG et al., 2015).

Os resultados verificados nos tomates inoculados com *Alternaria* sp., indicam que as pressões hiperbáricas exerceram um efeito positivo na atividade da enzima PAL, com incrementos significativos nos tomates tratados com 800 kPa, após 6+4 dias de armazenamento na condição de ambiente (Figura. 32B).

Porém, não ocorreu uma ativação expressiva da síntese dos compostos fenólicos dos frutos tratados com as pressões, evidenciada pelo conteúdo final em 3+4 e 6+4 dias terem sido semelhantes ao período de permanência no tratamento hiperbárico (3 e 6 dias). Diante disso, o conteúdo de polifenóis não influenciou os mecanismos de defesa contra a infecção por *Alternaria* sp., da maneira que foi constatado nos frutos inoculados com *B. cinerea*, nos quais o aumento na atividade destes compostos secundários de defesa, pode estar relacionado com a resistência dos frutos a infecção pelo mofo cinzento.

f) Atividade de β -1,3 glucanase (GLU)

As tendências da atividade enzimática da GLU nos tomates foram influenciadas pelas pressões com diferentes significâncias, porém de maneira similar nos períodos de 3 e 6 de PH. Os tomates tratados com 600 e 800 kPa tiveram média de 8,6 e 9,4 $\mu\text{g glicose min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína, o que representa atividade superior de 16 e 13%, em relação a pressão de 400 e ao controle (média de 7,4 e 8,2 $\mu\text{g glicose min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína), respectivamente, após os 3 e 6 dias de PH (Figura 35).

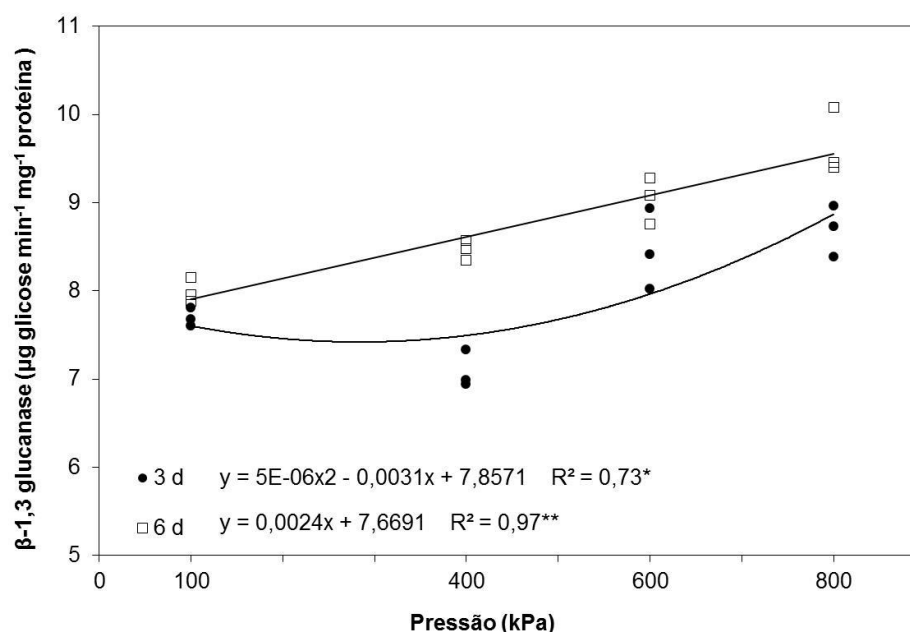


Figura 35. Relação entre a atividade da β -1,3 glucanase (GLU) de tomates 'Débora' inoculados com *Alternaria* sp. e a pressão hiperbárica aplicada por 3 e 6 dias a 23 °C e 95% UR ** significativo ($P < 0,01$) * significativo ($P < 0,05$)

Após o armazenamento na condição de ambiente (PH+A), houve uma relação funcional significativa ($P < 0,01$) entre a atividade da GLU e a pressão aplicada, com exceção para o dia 3+2 que não houve diferenças significativas entre a atividade de GLU nos tomates tratados com as pressões em relação ao controle, com média de $8,6 \mu\text{g glicose min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$.

No dia 6+2, os tomates tratados com 400, 600 e 800 kPa tiveram um aumento na atividade enzimática de 17% (média de $9,1 \mu\text{g glicose min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$) em relação ao controle (de $7,7 \mu\text{g glicose min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$). No entanto, a atividade de GLU dos tomates tratados com 400 e 800 kPa foram semelhantes após 2 dias de condição de ambiente, independentemente do tempo de permanência no tratamento hiperbárico (Figura 36A).

No final do período de armazenamento (PH+4), as tendências foram similares, cujos tomates tratados com a pressão de 600 e 800 kPa tiveram uma atividade superior da GLU, média de $9,8$ e $9,4 \mu\text{g glicose min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$, respectivamente em 3+4 e 6+4 dias, com aumento de 15% em relação as atividades obtidas nos frutos da pressão de 400 kPa e do controle (média de $8,5$ e $8,2 \mu\text{g}$

glicose $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína). Porém, a atividade da GLU dos tomates tratados com a pressão de 800 kPa e do controle foram similares em ambos os períodos finais. (Figura 36B).

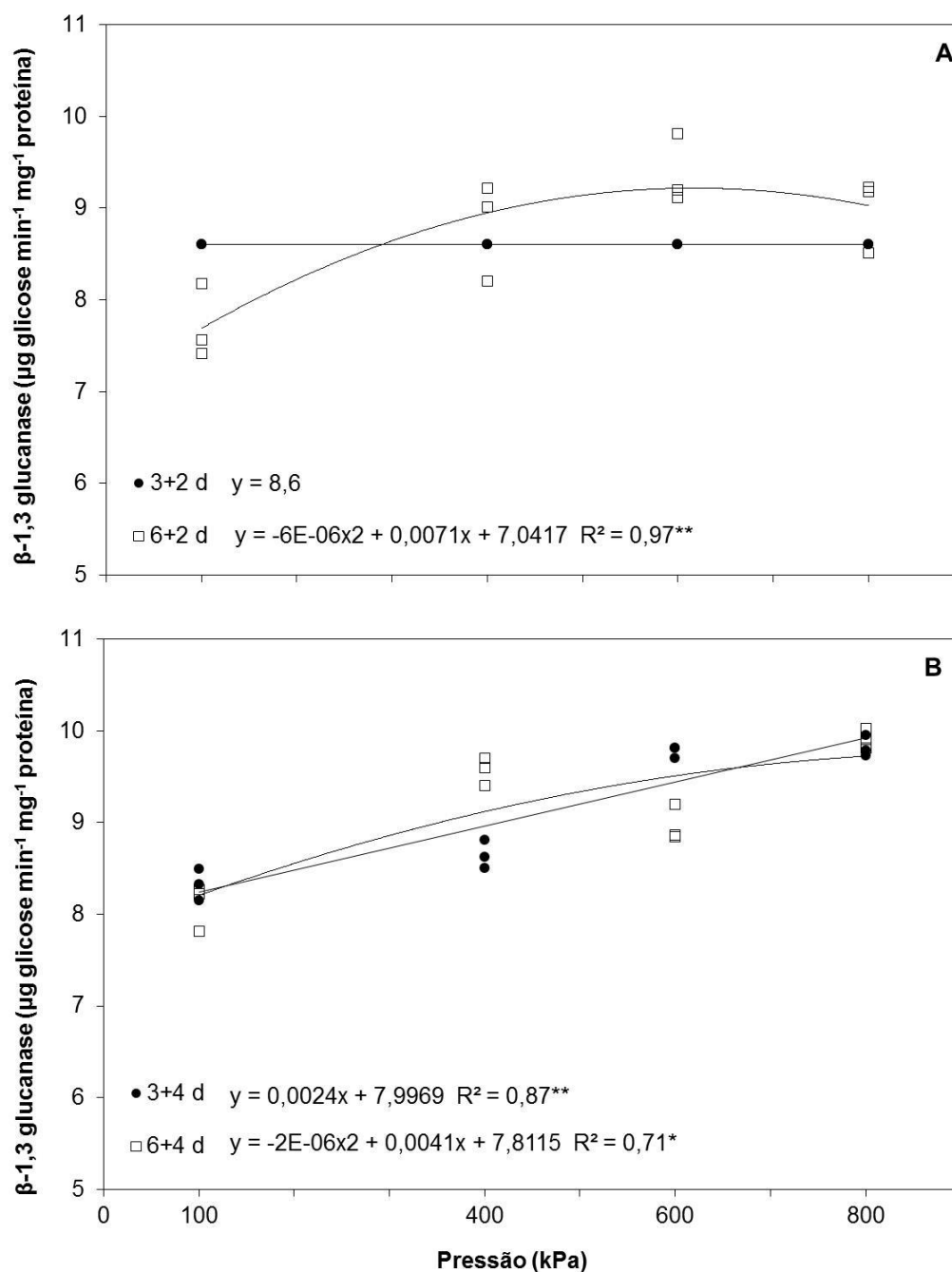


Figura 36. Relação entre a atividade da β -1,3 glucanase (GLU) de tomates 'Débora' inoculados com *Alternaria* sp. e a pressão hiperbárica aplicada, após 2 dias (A) e 4 dias (B) em condição de ambiente a 23 °C, 50% UR e 100 kPa ** significativo ($P < 0,01$) * significativo ($P < 0,05$)

De acordo com Scott et al. (2018), a β -1,3-glucanase é geralmente encontrada nas plantas em baixas concentrações, mas quando as plantas são infectadas por patógenos a concentração aumenta drasticamente. Além disso, tratamentos físicos na pós-colheita de tomates, como exposição à radiação ultravioleta e ao calor, podem induzir um leve estresse, estimulando a síntese desta enzima nos frutos.

Neste ensaio, a atividade da β -1,3-glucanase dos tomates foi significativamente superior, logo após o tratamento com as pressões hiperbárica, portanto a possibilidade de envolvimento da β -1,3-glucanase em estágio inicial do desenvolvimento do fungo não pode ser descartada, já que esta enzima hidrolisa polissacarídeos da camada externa das paredes celulares dos fungos e das bactérias (VAN LOON et al., 2006). Além disso, o efeito proeminente deste incremento permaneceu até o final do período de avaliação (3+4 e 6+4 dias), o qual pode ter contribuído para a redução do diâmetro da lesão, pressupõe-se que os frutos podem reconhecer a invasão pela *Alternaria* sp. devido aos elicitores das proteínas relacionadas à defesa (PR), liberados pela glucanase, com consequente produção de fitoalexinas (EL GHAOUTH et al., 2003).

g) Atividade da superóxido dismutase (SOD)

Não ocorreu diferenças significativas entre a atividade enzimática da SOD dos tomates tratados com 3 ou 6 dias, portanto a atividade dessa enzima não é influenciada pelo tempo de permanência nos tratamentos hiperbáricos. No 3º dia de PH, os tomates apresentaram atividade enzimática da SOD média de 2,5 U mg⁻¹ de proteína. Após 6 dias de PH, os tomates tratados com as pressões de 600 e 800, tiveram média de 2,4 U mg⁻¹ de proteína, o que representa 14% de redução em relação aos 2,7 U mg⁻¹ de proteína do controle.

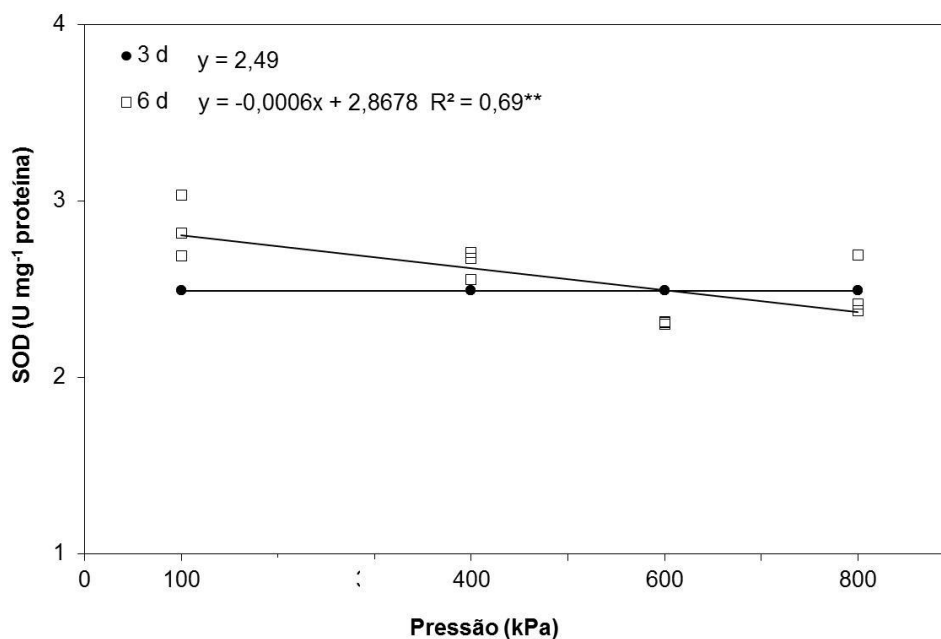


Figura 37. Relação entre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) de tomates 'Débora' inoculados com *Alternaria* sp. e a pressão hiperbárica aplicada por 3 e 6 dias a 23 °C e 95% UR. ** significativo ($P < 0,01$)

Com 2 e 4 dias de condição de ambiente, não se estabeleceu uma relação funcional significativa ($P > 0,01$), entre a atividade da SOD e a pressão aplicada, cujos tomates tiveram médias de 2,6 e 2,7 U mg⁻¹ de proteína, respectivamente.

Por ser um patógeno necrotrófico, a *Alternaria* sp. obtém os nutrientes das células hospedeiras mortas. Durante os processos de colonização, este patógeno desencadeia no hospedeiro a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), em particular o H₂O₂, levando à morte celular programada, o que facilita a invasão (CHUNG, 2012). Apesar de a SOD ser considerada enzima chave de defesa contra o dano oxidativo das EROs, através da catálise da reação de dismutação do ânion superóxido (O⁻²) em O₂ e H₂O₂, o qual é subsequente transformado em H₂O pela atividade da enzima catalase, não foi observada a atividade da SOD nos tomates submetidos as pressões hiperbáricas, que fossem capazes de combater a invasão da *Alternaria* sp.

h) Atividade da catalase (CAT)

Para a atividade enzimática da CAT, houve uma relação funcional positiva significativa ($P < 0,05$), com a pressão aplicada nos períodos de 3 e 6 dias de PH (Figura 38).

No 3º dia de PH, a atividade da CAT foi significativamente superior nos tomates tratados com 400, 600 e 800 kPa, com média de $5,2 \times 10^{-12} \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ proteína}$, em relação aos frutos do controle com média de $4,1 \times 10^{-12} \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ proteína}$. Após 6 dias, a atividade da CAT nos tomates sob pressão de 600 e 800 kPa, foi em média de $5,6 \times 10^{-12} \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ proteína}$, significativamente maior (56%) que os frutos do controle (média de $2,4 \times 10^{-12} \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ proteína}$). Porém a atividade de CAT nos tomates da pressão de 800 kPa foi semelhante entre os período de permanência de 3 e 6 dias de PH, não sendo influenciada pelo tempo de exposição (Figura 38).

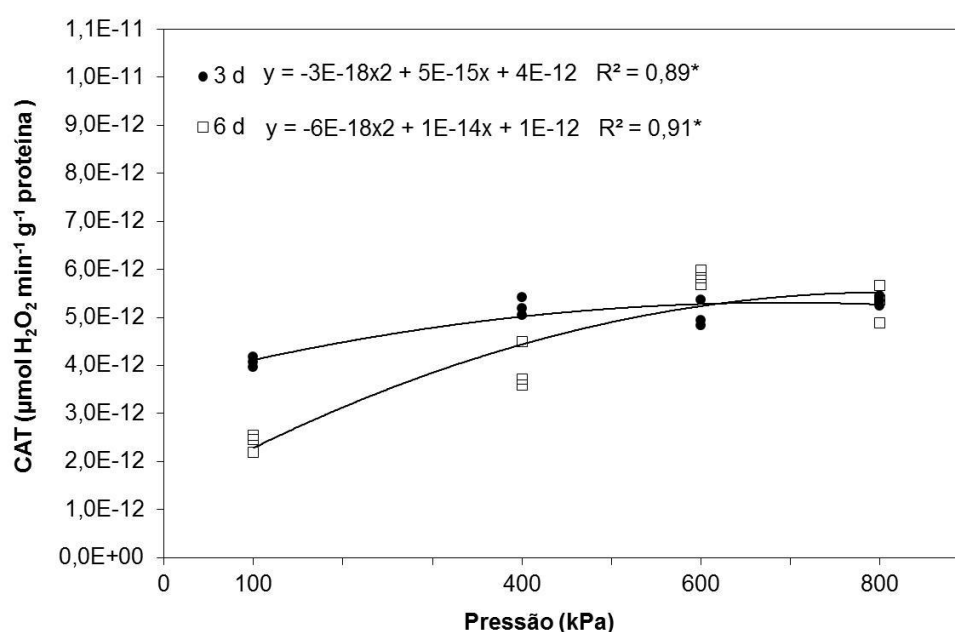


Figura 38. Relação entre a atividade da enzima catalase (CAT) de tomates 'Débora' inoculados com *Alternaria* sp. e a pressão hiperbárica aplicada por 3 e 6 dias a 23 °C e 95% UR. * significativo ($P < 0,05$)

Na condição de ambiente (PH+A) houve uma relação funcional significativa positiva ($P < 0,05$), entre a atividade da CAT e a pressão aplicada (Figura 39).

Em 3+2 dias a atividade da CAT foi de $5,8 \times 10^{-12} \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ proteína nos tomates da pressão de 800 kPa não diferiu significativamente do controle, enquanto em 6+2 dias, os tomates da pressão de 800 kPa tiveram a maior atividade de CAT, com $8,3 \times 10^{-12} \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ proteína, em relação as demais pressões e o controle, com média de $6,2 \times 10^{-12} \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ proteína (Figura 39A).

No período final da condição de ambiente, foram observadas tendências semelhantes entre a atividade da CAT com a pressão aplicada, cujos tomates da pressão de 600 e 800 registraram a maior atividade da CAT, com média de $7,0 \times 10^{-12}$ e $8,3 \times 10^{-12} \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ proteína, respectivamente, em 3+4 e 6+4 dias, em relação aos frutos da pressão de 400 kPa e do controle, que tiveram médias de $6,4 \times 10^{-12}$ e $6,0 \times 10^{-12} \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ proteína, em cada período (Figura 39B).

A CAT desempenha um papel importante na remoção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por isso, a capacidade dos frutos em manter a alta atividade da CAT é um importante mecanismo de defesa contra os fatores de estresse (BOONKORN, 2016).

Assim sendo, os resultados com os tomates inoculados com *Alternaria* sp. revelaram que as pressões de 600 a 800 kPa, independentemente do período de permanência no tratamento (3 e 6 dias), propiciaram a ativação da CAT dos tomates a qual se manteve elevada após o armazenamento nas condições de ambiente por 4 dias. Este fato, pode estar relacionado à proteção das células ao ataque de patógenos, verificado pela pequena redução na severidade da mancha de alternaria em relação aos frutos do controle.

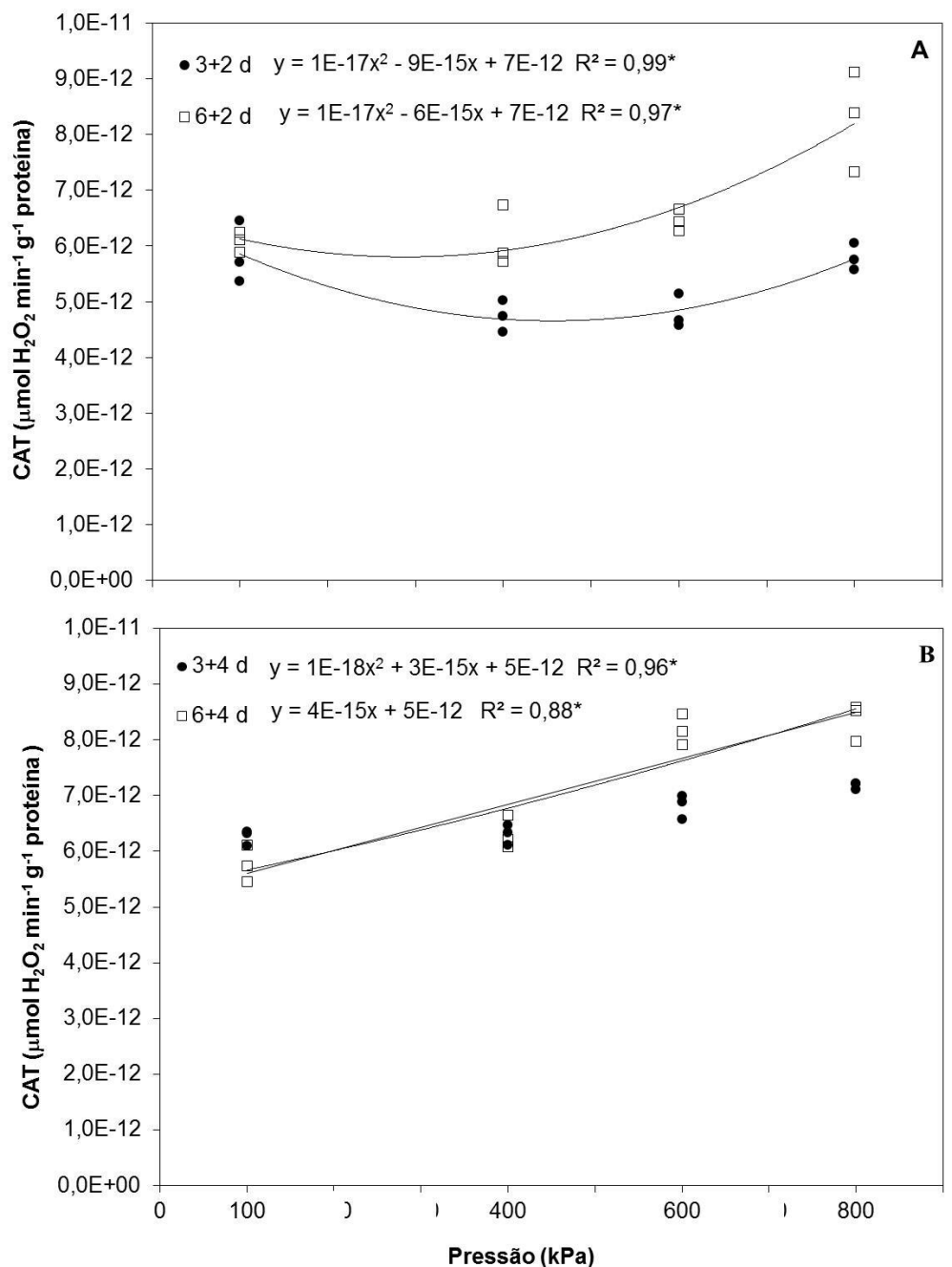


Figura 39. Relação entre a atividade da enzima catalase (CAT) de tomates ‘Débora’ inoculados com *Alternaria* sp. e a pressão hiperb\u00e1rica aplicada, ap\u00f3s 2 dias(A) e 4 dias (B) em condi\u00e7\u00e3o de ambiente a 23 °C, 50% UR e 100 kPa. * significativo ($P < 0,05$)

5. CONCLUSÕES

In vitro, as pressões elevadas de 600 e 800 kPa, por 3 dias, apresentaram efeito positivo na redução do crescimento micelial e na taxa de germinação de conídios de *Botrytis cinerea*. Enquanto que a pressão de 800 kPa, independente do tempo 3 ou 6 dias, foi mais eficiente na redução do crescimento micelial e na taxa de germinação de *Alternaria* sp..

Os tomates 'Débora' submetidos à pressão de 800 kPa tiveram redução significativa na incidência e na severidade do mofo cinzento (*B.cinerea*), após 3 dias de permanência no tratamento hiperbárico, enquanto a redução da mancha de alternaria (*Alternaria* sp.) foi semelhante nos períodos de 3 e 6 dias.

Durante todos os períodos avaliados (PH e PH+A) ocorreu uma diminuição dos processos de amadurecimento dos frutos inoculados com *B. cinerea* e *Alternaria* sp, verificado pela redução no acúmulo de licopeno e diminuição da enzima POD, a qual está relacionada a senescência.

O aumento da atividade enzimática da PAL, GLU e CAT pode ter contribuído para o aumento da resistência da parede celular dos frutos e formação de compostos secundários, hidrólise da parede celular dos fungos e eliminação do H₂O₂ das células, as quais tornaram os frutos menos suscetíveis ao crescimento do mofo cinzento e da *Alternaria* sp.

6. REFERÊNCIAS

ABETE, I.; PEREZ-CORNAGO, A.; NAVAS-CARRETERO, A.; I.; BONDIA-PONS, I.; ZULET M.A.; MARTINEZ, J.A. A regular lycopene enriched tomato sauce consumption influences antioxidant status of healthy young-subjects: A crossover study. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 28-35, 2013.

AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria & Comercio, p. 472, 2017.

AGRIOS, G.N. Plant diseases caused by fungi. In: AGRIOS, G.N (Ed.). **Plant Pathology**. 5.ed. Elsevier Academic Press, p. 385-614, 2004.

AHMED, F. A.; SIPES, B. S.; ALVAREZ, A. M. Natural products to control postharvest gray mold of tomato fruit-possible mechanisms. **Journal Plant Pathology. Microbiolog**, v. 7, p. 1-7, 2016.

AMER, M.A., EL-ABD, S.M., MANSOUR, F.G.F. Enzyme activity and effect of heat treatment on some fungal diseases of postharvest tomato fruits. **Communications in Agricultural and Applied biological Sciences**, v. 78, p. 585-598, 2013.

ANTON, D.; BENDER, I.; KAART, T.; ROASTO, M.; HEINONEN, M.; LUIK, A.; PÜSSA, T. Changes in polyphenols contents and antioxidant capacities of organically and conventionally cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruits during ripening. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2017, p. 10, 2017.

ARAH, I. K.; AMAGLO, H.; KUMAH, E. K.; OFORI, H. Preharvest and postharvest factors affecting the quality and shelf life of harvested tomatoes: a mini review. **International Journal of Agronomy**, v. 2015, p. 6, 2015.

AZABOU, S.; ABID, Y.; SEBII, H.; FELFOUL, I.; GARGOURI, A.; ATTIA, H. Potential of the solid-state fermentation of tomato by products by *Fusarium solani pisi* for enzymatic extraction of lycopene. **Food Science and Technology**, v. 68, p. 280-287, 2016.

AZEVEDO, J. L. Micro-organismos endofíticos. In: Mello, I. S.; Azevedo, J. L. (Eds.). **Ecologia microbiana**, p. 17-137, 1998.

BABA, T., COMO, G., OHTSUBO, T., IKEDA, F., & LIZADA, M. C. C. Effects of high-pressure treatment on mume fruit (*Prunus mume*). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 124(4), p. 399-401, 1999.

BABA, T.; IKEDA, F. Use of high-pressure treatment to prolong the postharvest life of mume fruit (*Prunus mume*). **Acta Horticulturae**, v. 628, p. 373-377, 2003.

BABA, T.; ITO, S.; IKEDA, F.; MANAGO, M. Effectiveness of high pressure treatment at low temperature to improve postharvest life of horticultural commodities. **Acta Horticulturae**, v. 768, p. 417-422, 2008.

BARKAI-GOLAN, R. **Postharvest diseases of fruits and vegetables: development and control**, Elsevier, p. 418, 2001.

BAUTISTA-BAÑOS, E.B.; MOLINA, L.L.; BARRERA-NECHA. Postharvest Decay: Control Strategies, In: Romanazzi, G; Feliziane, E. (Eds.). **Botrytis cinerea (gray mold)**, p. 131-140; 2014.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276-287, 1971.

BERMEJO-PRADA, A.; OTERO, L. Effect of hyperbaric storage at room temperature on color degradation of strawberry juice. **Journal of food engineering**, v. 169, p. 141-148, 2016.

BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: Gupta, S.D. (Ed.). **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, p. 1-30, 2010.

BOONKORN, P. Impact of hot water soaking on antioxidant enzyme activities and some qualities of storage tomato fruits. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 3, p. 934-938, 2016.

BOSTOCK, R. M.; PYE, M. F.; ROUBTSOVA, T. V. Predisposition in plant disease: exploiting the nexus in abiotic and biotic stress perception and response. **Annual Review of Phytopathology**, v. 52, p. 517-549, 2014.

CEAGESP. Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo. Análise financeira do 1º trimestre de 2017 da capital e do interior. Disponível em: <<http://www.ceagesp.gov.br/comunicacao/noticias/ceagesp-divulga-analise-financiera-do-1o-trimestre-de-2017-da-capital-e-interior/>>.

CHARLES, M. T.; MERCIER, J.; MAKHLOUF, J.; ARUL, J. Physiological basis of UV-C-induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 1, n.47, p. 10-20, 2008.

CHARLES, M. T.; TANO, K.; ASSELIN, A.; ARUL, J. Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit. V. Constitutive defence enzymes and inducible pathogenesis-related proteins. **Postharvest Biology and Technology**, v. 51, p. 414-424, 2009.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2.ed. Lavras: UFLA, p. 575, 2005.

CHIUMARELLI, M.; FERREIRA, M.D. Qualidade pós-colheita de tomates 'Debora' com utilização de diferentes coberturas comestíveis e temperaturas de armazenamento. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 3, p. 381-385, 2006.

CHOQUER, M.; FOURNIER, E.; KUNZ, C.; LEVIS, C.; PRADIER, J. M.; SIMON, A.; VIAUD, M. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. **FEMS microbiology letters**, v. 277, n. 1, p. 1-10, 2007.

CHUNG, K. R. Stress response and pathogenicity of the necrotrophic fungal pathogen *Alternaria alternata*. **Scientifica**, 2012.

COTA, I.E.; TRONCOSO-ROJAS, R.; SOTELO-MUNDO, R.; SÁNCHEZ-ESTRADA, A.; TIZNADO-HERNÁNDEZ, M.E. Chitinase and β -1,3-glucanase enzymatic activities in response to infection by *Alternaria alternata* evaluated in two stages of development in different tomato fruit varieties. **Scientia Horticulturae**, v. 112, p. 42-50, 2007.

DEAN, R.; VAN KAN, J. A.; PRETORIUS, Z. A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P. D.; FOSTER, G. D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n.4, p. 414-430, 2012.

DEL GIUDICE, R.; RAIOLA, A.; TENORE, G. C.; FRUSCIANTE, L.; BARONE, A.; MONTI, D. M.; RIGANO, M. M. Antioxidant bioactive compounds in tomato fruits at different ripening stages and their effects on normal and cancer cells. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 83-94, 2015.

DUBEY, R.S. **Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants**. In: Gupta, S.D. (Ed.) Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfield: Science Publishers, Chap. 9, p. 178-203, 2011.

ELAD, Y.; VIVIER, M.; FILLINGER, S. *Botrytis*: the good, the bad and the ugly. In: Fillinger, S.; Elad, Y.; Vivier, M. (Eds.). **Botrytis-the Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems**, p. 1-15, 2015.

EL GHAOUTH, A.; WILSON, C.L.; CALLAHAN, A.M. Induction of chitinase. β -1, 3-Glucanase, and phenylalanine ammonia lyase in peach fruit by UV-C treatment. **Phytopathology**, v. 93, p. 349-355, 2003.

EL OIRDI, M.; EL RAHMAN, T. A.; RIGANO, L.; EL HADRAMI, A.; RODRIGUEZ, M. C.; DAAYF, F.; BOUARAB, K. *Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. **The Plant Cell**, v. 23, n. 6, p. 2405-2421, 2011.

FAGUNDES, C.; PALOU, L.; MONTEIRO, A. R.; PÉREZ-GAGO, M. B. Effect of antifungal hydroxypropyl methylcellulose-beeswax edible coatings on gray mold development and quality attributes of cold-stored cherry tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 92, p. 1-8, 2014.

FAGUNDES, C.; PALOU, L.; MONTEIRO, A.R.; PÉREZ-GAGO, M.B. Hydroxypropyl methylcellulose-beeswax edible coatings formulated with antifungal food additives to reduce alternaria black spot and maintain postharvest quality of coldstored cherry tomatoes. **Scientia Horticulturae**, v. 193, p. 249-257, 2015.

FELIZIANI, E.; SANTINI, M.; LANDI, L.; ROMANAZZI, G. Pre-and postharvest treatment with alternatives to synthetic fungicides to control postharvest decay of sweet cherry. **Postharvest Biology and Technology**, v. 78, p. 133-138, 2013.

GAYOSO, C.; POMAR, F.; NOVO-UZAL, E.; MERINO, F.; DE ILÁRDUYA, Ó. M. The Ve-mediated resistance response of the tomato to *Verticillium dahliae* involves H₂O₂, peroxidase and lignins and drives PAL gene expression. **BMC Plant Biology**, v. 10(1), p. 232, 2010.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.

GÓMEZ-ROMERO, M.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. **Phytochemistry**, v. 71, n. 16, p.1848-1864, 2010.

GOYETTE, B.; VIGNEAUL, C.; CHARLES, M. T.; RAGHAVAN. V. G. S. Pressure treatment for increasing fruit and vegetable qualities. **Stewart Postharvest Review**, v. 3. n. 5, 2007.

GOYETTE, B.; VIGNEAULT, C.; CHARLES, M. T.; RAGHAVAN, G. Effect of hyperbaric treatments on the quality attributes of tomato. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 92, n.3, p. 541-551, 2012.

GOYETTE, B.; VIGNEAULT, C.; RAGHAVAN, G.; CHARLES, M. T. Hyperbaric treatment on respiration rate and respiratory quotient of tomato. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 3066-3074, 2012a.

GOYETTE, B.; VIGNEAULT, C.; WANG, N.; RAGHAVAN, V. Conceptualization, design and evaluation of a hyperbaric respirometer. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 2, p. 283-288, 2011.

GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, p. 481-494, 2005.

GUERRA, I.C.D.; OLIVEIRA, P.D.L.; PONTES, A.L.S.; LÚCIO, A.S.S.C.; TAVARES, J.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; MADRUGA, M.S.; SOUZA, E.L. Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha x villosa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit. **International Journal of Food Microbiology**, v. 214, p. 168-178, 2015.

HASHMI, M.S.; EAST, A.R.; PALMER, J.S.; HEYES, J.A. Hypobaric treatment stimulates defence-related enzymes in strawberry. **Postharvest Biology Technology**, v. 85, p. 77-82, 2013.

IGAMBERDIEV, A. U.; LEA, P. J. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organism. **Phytochemistry**, v. 60, p. 651-674, 2002.

INESTROZA-LIZARDO, C.; MATTIUZ, B. H.; DA SILVA, J. P.; GALATI, V. C.; VOIGT, V. Hyperbaric pressure at room temperature increases post-harvest preservation of the tomato cultivar 'Débora'. **Scientia Horticulturae**, v. 228, p. 103-112, 2018.

JIN, P.; WANG, H.; ZHANG, Y.; HUANG, Y.; WANG, L.; ZHENG, Y. UV-C enhances resistance against gray mold decay caused by *Botrytis cinerea* in strawberry fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 225, p. 106-111, 2017.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p. 315-319, 1976.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed., v. 2, p. 607-626, 2005.

LEE, S. K.; KADER, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, n. 3, p. 207-220, 2000.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical biochemistry**, v. 47, n.1, p. 273-279, 1972.

LEWIS, N.G.; DAVIN, L.B.; SARKANEN, S. The nature and functions of lignins. In: Barton, D.H.R.; Nakanishi, K., Meth-Cohn, O. (Eds.), **Comprehensive Natural Products Chemistry**, v. 1, p. 617–745, 1992.

LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G.; OLIVEIRA, A. M. Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado sob estresse salino. **Scientia Agrícola**, v. 56, n. 1, p. 21-25, 1999.

LIPLAP, P. **Respiration rate in transient period, its implication on the effect of hyperbaric pressure treatment; the Treatment Advantage in Shelf Life Extension of Various Commodities** 2013. 281f. Doctoral thesis Department of Bioresource Engineering McGill University, Montreal Quebec, Canada. 2013.

LIPLAP, P.; BOUTIN, J.; LEBLANC, D. I.; VIGNEAULT, C.; VIJAYA RAGHAVAN, G. S. Effect of hyperbaric pressure and temperature on respiration rates and quality attributes of Boston lettuce. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 1, p. 137-145, 2014.

LIPLAP, P.; TOUSSAINT, V.; TOIVONEN, P.; VIGNEAULT, C.; BOUTIN, J.; RAGHAVAN, G. V. Effect of hyperbaric pressure treatment on the growth and physiology of bacteria that cause decay in fruit and vegetables. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 2267-2280, 2014a.

LIPLAP, P.; VIGNEAULT, C.; TOIVONEN, P.; BOUTIN, J.; RAGHAVAN, G. V. Effect of hyperbaric treatment on respiration rates and quality attributes of sweet corn. **International Journal of Postharvest Technology and Innovation**, v. 3, n. 3, p. 257-271, 2013a.

LIPLAP, P., VIGNEAULT, C., TOIVONENC, P., CHARLES, M. T.; RAGHAVAN, G. V. Effect of hyperbaric pressure and temperature on respiration rates and quality attributes of tomato. **Postharvest Biology and Technology**, v. 86, p. 240-248, 2013b.

LIU, J.; TIAN, S.; MENG, X.; XU, Y. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, p. 300-306, 2007.

LÓPEZ-CAMELO, A.; GÓMEZ, P. Comparison of color indexes for tomato ripening. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 534-537, 2004.

LUTHRIA, D. L., MUKHOPADHYAY, S., KRIZEK, D. T. Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n.8, p. 771-777, 2006.

MAHARAJ, R.; ARUL, J.; NADEAU, P. UV-C irradiation effects on levels of enzymic and non-enzymic phytochemicals in tomato. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 21, p. 99-106, 2014.

MARI, M.; DI FRANCESCO, A.; BERTOLINI, P. Control of fruit postharvest diseases: old issues and innovative approaches. **Stewart Postharvest Review**, v. 10, n. 1, p. 1-4, 2014.

MITTLER, R. Oxidative stress: antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, v. 7, p. 405-410, 2002.

MORETTO, K. C; BARRETO, M. Efeito do critério de avaliação na determinação de resistência de tomateiro à pinta preta. **Summa Phytopathologica**, v. 23 (1), p. 228-231, 1997

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n.1-2, p. 95-111, 2004.

NAGATA, M.; YAMASHITA, I. Simple Method for Simultaneous Determination of Chlorophyll and Carotenoids in Tomato Fruit. **Journal Japanese Society of Food Science and Technology**, v. 39, n. 10, p. 925-928, 1992.

NASCIMENTO, J. B.; BARRIGOSI, J. A. F. O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. **Agrarian Academy**, v. 1, p. 234-250, 2014.

NGADZE, E.; ICISHAHAYO, D.; COUTINHO, T.A.; VAN DER WAALS, J.E. Role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid, and total soluble phenols in resistance of potatoes to soft rot. **Plant Disease**, v. 96, p. 186-192, 2012.

NIRANJANA, R.; GAYATHRI, R.; MOL, S. N.; SUGAWARA, T.; HIRATA, T.; MIYASHITA, K., GANESAN, P. Carotenoids modulate the hallmarks of cancer cells. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 968-985, 2015.

OLIVEIRA, S. D.; TERAPO, D.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. H. **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Embrapa Informação Tecnológica, 2006.

PAIVA, C. N.; BOZZA, M. T. Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens?. **Antioxidants & redox signaling**, v. 20, n. 6, p. 1000-1037, 2014.

PALOU, L.; SMILANICK, J.L.; DROBY, S. Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue molds. **Stewart Postharvest Review**, v. 2, n. 2, p. 1-16, 2008.

PAVONCELLO, D.; LURIE, S.; DROBY, S.; PORAT, R. A hot water treatment induces resistance to *Penicillium digitatum* and promotes the accumulation of heat shock and pathogenesis-related proteins in grapefruit flavedo. **Physiologia Plantarum**, v. 111, n. 1, p. 17-22, 2001.

PEDRESCHI, R.; LURIE, S. Advances and current challenges in understanding postharvest abiotic stresses in perishables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 107, p. 77-89, 2015.

PEIXOTO, E.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, p. 137-143, 1999.

PETROV, V.; HILLE, J.; MUELLER-ROEBER, B.; GECHEV, T. S. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 69, 2015.

PIETERSE, C. M.; ZAMIOUDIS, C.; BERENDSEN, R. L.; WELLER, D. M.; VAN WEES, S. C.; BAKKER, P. A. Induced systemic resistance by beneficial microbes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 52, p. 347-375, 2014.

PINHEIRO, J.; ALEGRIA, C.; ABREU, M.; GONC, ALVES, E.M.; SILVA, C.L.M. Use of UV-C postharvest treatment for extending fresh whole tomato (*Solanum lycopersicum*, cv. zinac) shelf-life. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 5066-5074, 2015.

ROMANAZZI, G.; NIGRO, F.; IPPOLITO, A. Effectiveness of a short hyperbaric treatment to control postharvest decay of sweet cherries and table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 440-442, 2008.

ROMANAZZI, G.; SANZANI, S. M.; BI, Y.; TIAN, S.; MARTÍNEZ, P. G.; ALKAN, N. Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 122, p. 82-94, 2016.

SCOTT, G.; DICKINSON, M.; SHAMA, G.; RUPAR, M. A comparison of the molecular mechanisms underpinning high-intensity, pulsed polychromatic light and low-intensity UV-C hormesis in tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 137, p. 46-55, 2018.

SEGOVIA-BRAVO, K.A.; GUIGNON, B.; BERMEJO-PRADA, A.; SANZ, P.D.; OTERO, L. Hyperbaric storage at room temperature for food preservation: A study in strawberry juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 15, p. 14-22, 2012.

SHI, Y.; ZHANG, Y.; SHIH, D. S. Cloning and expression analysis of two β -1, 3-glucanase genes from strawberry. **Journal of Plant Physiology**, v. 163(9), p. 956-967, 2006.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. J. R. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SMITA, S.; RAJWANSHI, R.; LENKA, S. K.; KATIYAR, A.; CHINNUSAMY, V.; BANSAL, K. C. Expression profile of genes coding for carotenoid biosynthetic pathway during ripening and their association with accumulation of lycopene in tomato fruits. **Journal. Genetics**, v. 92(3), p. 363-368, 2013.

SU, L.; DIRETTO, G.; PURGATTO, E.; DANOUN, S.; ZOUINE, M.; LI, Z.; CHERVIN, C. Carotenoid accumulation during tomato fruit ripening is modulated by the auxin-ethylene balance. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 114, 2015.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10(1), p. 18, 2011.

TIECHER, A.; DE PAULA, L. A.; CHAVES, F. C.; ROMBALDI, C. V. UV-C effect on ethylene, polyamines and the regulation of tomato fruit ripening. **Postharvest Biology and Technology**, v. 86, p. 230-239, 2013.

TOFOLI, J. G.; DE MELO, P. C. T.; DOMINGUES, R. J.; FERRARI, J. T. Controle da queima e pinta preta da batata por fungicidas e seu reflexo sobre a produtividade e a qualidade de tubérculos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 1-12, 2016.

TOFOLI, J.G; DOMINGUES, R.J., PARISI, M.C.M., SINIGAGLIA, C. Doenças Fúngicas. In: Colariccio, A., Tófoli, J.G. (Eds.). **Aspectos fitossanitários do tomateiro**, Boletim Técnico, n. 27, p. 36-56, 2013.

TOFOLI, J. G.; FERRARI, J. T.; DOMINGUES, R. J.; NOGUEIRA, E. M. C. *Botrytis* sp. em espécies hortícolas: hospedeiros, sintomas e manejo. **Biológico**, São Paulo, v. 73, p. 11-20, 2011.

USALL, J.; IPPOLITO, A.; SISQUELLA, M.; NERI, F. Physical treatments to control postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 122, p. 30-40, 2016.

VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual. Review. Phytopathology**, v. 44, p. 135-162, 2006.

VAN KAN, J. A. Infection strategies of *Botrytis cinerea*. In **VIII International Symposium on Postharvest Physiology of Ornamental Plants**, v. 669, p. 77-90, 2003.

VIGNEAULT, C.; LEBLANC, D. I.; GOYETTE, B.; JENNI, S. Invited review: Engineering aspects of physical treatments to increase fruit and vegetable phytochemical content. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 92, n. 3, p. 373-397, 2012.

VILANOVA, L.; VIÑAS, I.; TORRES, R.; USALL, J.; BURON-MOLES, G.; TEIXIDÓ, N. Increasing maturity reduces wound response and lignification processes against *Penicillium expansum* (pathogen) and *Penicillium digitatum* (non-host pathogen) infection in apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 88, p. 54-60, 2014.

VOGT, T. Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular Plant**, v. 3, p. 2-20, 2010.

WALTERS, D. R.; RATSEP, J.; HAVIS, N. D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, v. 64(5), p. 1263-1280, 2013.

WANG, Y.; YU, T.; XIA, J.; YU, D.; WANG, J.; ZHENG, X.D. Biocontrol of postharvest gray mold of cherry tomatoes with the marine yeast *Rhodosporidium paludigenum*. **Biological Control**, v. 53, p.178–182, 2010.

WEI, Y.; XU, M.; WU, H.; TU, S.; PAN, L.; TU, K. Defense response of cherry tomato at different maturity stages to combined treatment of hot air and *Cryptococcus laurentii*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 117, p. 177-186, 2016.

WEI, Y.; ZHOU, D.; PENG, J.; PAN, L.; TU, K. Hot Air Treatment Induces Disease Resistance through Activating the Phenylpropanoid Metabolism in Cherry Tomato Fruit. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65 (36), p. 8003-8010, 2017.

ZHANG, Y.; BUTELLI, E.; DE STEFANO, R.; SCHOONBEEK, H. J.; MAGUSIN, A.; PAGLIARANI, C.; JONES, J. D. Anthocyanins double the shelf life of tomatoes by delaying overripening and reducing susceptibility to gray mold. **Current Biology**, v. 23(12), p. 1094-1100, 2013.

ZHANG, Y.; DE STEFANO, R.; ROBINE, M.; BUTELLI, E.; BULLING, K.; HILL, L.; SCHOONBEEK, H. J. Different reactive oxygen species scavenging properties of flavonoids determine their abilities to extend the shelf life of tomato. **Plant Physiology**, v. 169(3), p. 1568-1583, 2015.

ZHAO, Y.; TU, K.; TU, S.; LIU, M.; SU, J.; HOU, Y. P. A combination of heat treatment and *Pichia guilliermondii* prevents cherry tomato spoilage by fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 106-110, 2010.

ZHAO, W.; WISNIEWSKI, M.; WANG, W.; LIU, J.; LIU, Y. Heat-induced oxidative injury contributes to inhibition of *Botrytis cinerea* spore germination and growth. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. (3), p. 951-957, 2014.

ZAPATA, P.J.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ-ROMERO, D.; CASTILLO, S., VALERO, D.; SERRANO, M. Use of alginate or zein as edible coatings to delay postharvest ripening process and to maintain tomato (*Solanum lycopersicon* Mill.) quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 7, p. 1287-1293, 2008.