

II- MATERIAIS E MÉTODOS

1- Material vegetal

A colheita das amostras foi realizada na zona do sotavento Algarvio (Figura 15)



Figura 17- Mapa de localização dos locais de colheita das amostras (<http://www.monterosa.pt>, 2006)

(Concelho de Tavira e Concelho de Alcoutim), tendo-se seleccionado em cada local de recolha da amostra cerca de 20 plantas diferentes (árvores no caso do *Arbutus unedo* L. e arbustos no caso do *Rubus fruticosus* Agg.). Foram colhidos cerca de 2 Kg de frutos das plantas seleccionadas. No caso dos frutos de *Arbutus unedo* L., a colheita de amostras foi feita de Setembro de 2004 a Dezembro de 2005. Para os frutos de *Rubus fruticosus* Agg. a colheita de amostra foi realizada em Agosto de 2005, como se pode verificar no Quadro VI.

Quadro VI.

Código das amostras do fruto de *Arbutus unedo* L. e do fruto de *Rubus fruticosus* Agg..

Fruto	Código de amostra	Local de colheita	Ano de Colheita	Dia de colheita
<i>Arbutus unedo</i> L.	LM ₁	Larache	2004	02 de Novembro
	LM ₂	Larache	2005	05 de Novembro
	VM ₂	Vale de Ôdres	2005	19 de Janeiro
<i>Rubus fruticosus</i> Agg.	RA ₂	Ribeiro	2005	15 de Agosto
	MA ₂	Monte do Cravo	2005	15 de Agosto

Os frutos recolhidos em cada amostragem (cerca de 2 Kg), foram macerados num almofariz de porcelana, tendo sido retirado aleatoriamente 4 aliquotas de 100 g cada para a realização de análises físico químicas: pH, °Brix, teor de humidade, teor em cinza total, do teor de iões (cálcio, magnésio, sódio, potássio), teor de matéria seca, teor de sólidos totais, teor em azoto total e em proteínas total, açúcares (frutose, glucose e sacarose) e identificação de antocianinas [delfinidina 3-glucose (Dp3- glu), delfinidina 3,5-diglucose (Dp3,5- glu), cinidina 3-glucose (Cy3- glu), cinidina 3,5-diglucose (Cy 3,5- glu), pulgonidina 3-glucose (Pg 3-glu) e pulgonidina 3,5-diglucose (Pg3,5-glu)].

A amostra LM₁ (Recolhida em Larache em Novembro de 2003) foi colocada a fermentar, determinando-se ao longo da fermentação parâmetros físico químicos [pH, °Brix, teor de humidade, açúcares (frutose, glucose e sacarose) e etanol] e microbiológicos (contagem de leveduras, bactérias acéticas e bactérias lácticas e isolamento de leveduras para posterior identificação).

De acordo com os diferentes tipos de ensaios a realizar assim as amostras sofreram tratamentos diferentes, como é descrito posteriormente.

2- Métodos

2.1-Determinação do resíduo seco solúvel (°Brix)

O resíduo seco solúvel foi determinado de acordo com Norma Portuguesa 785 (1985). Colocou-se 1 gota de amostra filtrada no centro do prisma principal do refractómetro Abbe (Atago type 1 T, 4T de 1985) e fez-se então a leitura do índice de refração a 20°C.

2.2-Determinação do pH

Após calibração com duas soluções tampão a pH 4 e pH 7, foi determinado o valor de pH dos macerados com o auxílio do potenciómetro (MicropH 2002 da Crison, USA 1997) equipado com um eléctrodo de pH (Crison 52- 02, 2004).

2.3-Determinação da cor (refracção L^* , a^* e b^*)

Utilizando o colorímetro (NeurteK spectro- color) procedeu-se de acordo com as especificações do aparelho calibrando o colorímetro antes da utilização, com o padrão preto (LZM 268; $x= 84,60$; $y= 89,46$; $z= 93,85$) e branco (LZM 268; $x= 4,12$; $y= 4,38$; $z= 4,71$). Colocou-se a amostra no porta amostras e mediu-se a refração L^* , a^* e b^* no espaço CIE.

2.4-Determinação dos açúcares

O teor em açúcares foi determinado após centrifugação do macerado a 15000 rpm a 10 °C durante 20 min. utilizando uma centrífuga Sigma 3 K 20 (USA, 1990). Posteriormente, as amostras foram filtradas utilizando um filtro Millipore 0,45 μm de 13 mm.

Para a determinação do teor de sacarose, glucose e frutose foi necessário preparar uma recta de calibração com as seguintes concentrações (0,1; 0,3 e 0,7 g/100 ml) utilizando padrões adequados (Sigmaaldrich Portugal). A leitura das amostras foi feita por HPLC num cromatógrafo (Beckman – Sistem Cold Analog Interface Modue 406 (USA, 1991) equipado com um detector de índice de refração (Jasco – RI -1530 Intelligent RI Detector) (USA, 1991) e com uma coluna Polyspher OAHy da Merck (USA). A fase móvel utilizada foi água com ácido sulfúrico (99,93:0,07) com um fluxo de 1 ml/min. A corrida teve a duração de 20 min.

2.5-Determinação das antocianinas

Para a determinação das diferentes antocianinas (Dp3- glu; Dp3,5- glu; Cy 3- glu; Cy3,5 - glu; Pg 3- glu e Pg 3,5 - glu) retirou-se uma porção de macerado que foi centrifugada a 15000 rpm a 10 °C durante 20 min. utilizando uma centrífuga Sigma 3 K 20 (USA,1990). Posteriormente, as amostras foram filtradas utilizando um filtro millipore 0,45 μm de 13 mm.

Para a determinação das diferentes antocianinas foi necessário preparar uma recta de calibração com as seguintes concentrações (0,02; 0,04 e 0,08 mg/ ml) utilizando padrões adequados (APIN Chemicals LTD, UK). A leitura das amostras foi feita utilizando um

HPLC (Beckman – Sistem Cold Analog Interface Modue 406, 1991) equipado com um detector UV- Visível (Beckman – Sistem cold Programable Detector Modele 166 de 1991) e com uma coluna Lichocart 250- A HPLC Catridge da Merck (USA). A fase móvel utilizada foi ácido fórmico 5 % (Merck)(A) e metanol (B) num gradiente linear que teve início com 15 % de B para 35 % de B durante 15 minutos e com um fluxo isocrático durante 15 min. com um fluxo de 1 ml/min. A corrida teve a duração de 30 min..

2.6-Determinação do teor em humidade

A determinação do teor de humidade foi realizada de acordo com a AOAC (Association of Analytical Chemists, 2005).

Secavam-se as placas de Petri em estufa (P- Selecta de 1990) a 80 °C durante 15 min, sendo posteriormente transferidas para um exsiccador de vidro onde permaneceram durante uma hora, sendo determinada a sua massa numa balança analítica (Modelo AE 240 Delta Range, Metter Instruments AG, Switerland, 1985). Colocou-se aproximadamente 10 g de amostra na placa, sendo esta introduzida na estufa cerca de 48 horas a 60±1 °C. Retirou-se a amostra da estufa e deixou-se arrefecer no exsiccador cerca de uma hora, determinando a massa de amostra. Voltou a colocar-se na estufa, transferiu-se para o exsiccador e pesou-se novamente até a massa se manter constante. O teor em humidade foi determinado por gravimetria recorrendo à seguinte expressão:

$$\% H = 100x \left(\frac{m_f - m_{RS}}{m_f} \right)$$

$\% H$ – Percentagem de humidade (%)

m_f - Massa de material vegetal fresco (g)

m_{rs} – Massa de resíduo seco (g)

2.7-Determinação do teor em proteína total

2.7.1-Digestão

Pesaram-se aproximadamente 2 gramas de amostra desidratada num papel de filtro sem cinzas e transferiu-se para o tubo de digestão. Adicionaram-se reguladores de ebulição (pérolas de vidro), uma pastilha de Kjeldhal (Merck) e 25 ml de ácido sulfúrico 93-98% (Merck). Colocaram-se os tubos de digestão no suporte apropriado, e procedeu-se de acordo com as instruções do aparelho (aquecimento lento a 100-150°C até à libertação de vapores, seguido de acréscimos de 100 °C até atingir os 420 °C). Deixou-se a amostra a digerir durante 2 horas e meia. Removeram-se os tubos do digestor e colocaram-se a arrefecer. Quando os tubos atingiram a temperatura ambiente (<25°C), adicionou-se cuidadosamente 50 ml de água destilada. Deixou-se os tubos arrefecer novamente até à temperatura ambiente.

2.7.2- Destilação

Adaptou-se os tubos de digestão ao condensador do destilador de proteínas. Introduziu-se no recipiente colector 60-100 ml de uma solução de ácido bórico (Merck) a 3 % e 3 gotas de indicador. Procedeu-se à destilação até recolher um volume de destilado superior a 150 ml no Erlenmaeyer (\approx 15 minutos) – A coloração da solução do Erlenmeyer deverá mudar de cor (de mangenta para verde). Titulou-se o destilado obtido com uma solução de ácido clorídrico 0,1 N.

A percentagem de azoto total presente na amostra pode ser determinado a partir da seguinte expressão:

$$\% N = [(V_1 \times N_1) - (V_2 \times N_2)] \times \frac{1,4007}{m}$$

V_1 - Volume de HCl gasto na titulação do branco (ml)

V_2 - Volume de HCl gasto na titulação da amostra (ml)

N_1 e N_2 - Normalidade da solução de HCl (N)

A percentagem de proteína total presente na amostra pode ser determinado a partir da seguinte expressão:

$$\% \text{ proteína} = \% N \times 6,38$$

2.8-Determinação do teor de matéria seca

Secou-se as placas de Petri em estufa (P- Selecta, 1990) a 80 °C durante 15 min., sendo posteriormente transferidas para um exsiccador de vidro onde permaneceram durante uma hora, e de seguida pesadas com rigor utilizando uma balança analítica (Modelo AE 240 Delta Range, Metter Instruments AG, Switerland, 1985). Colocou-se aproximadamente 10 g de amostra na placa, sendo esta introduzida na estufa cerca de 48 horas a 60±1°C. Retirou-se a amostra da estufa e deixou-se arrefecer no exsiccador cerca de uma hora, pesando rigorosamente a amostra. Voltou-se a colocá-la na estufa, transferi-la para o exsiccador e pesá-la novamente até a massa se manter constante. O teor de matéria seca foi determinado por gravimetria recorrendo à seguinte expressão:

$$\% MS = 100x \left(\frac{m_{RS}}{m_f} \right)$$

% MS – Percentagem de matéria seca (%)

m_f - Massa de material vegetal fresco (g)

m_{rs} – Massa de resíduo seco (g)

A determinação do teor de matéria seca foi determinado em relação a 100 g de amostra seca.

2.9-Determinação do teor em cinza total

Dois gramas de cada amostra seca, foram colocados numa cápsula de porcelana e incinerados, a 550 °C em mufla (P- Selecta, 1990) durante 12 h. Retirou-se então os cadinhos para exsiccador até que estes arrefecessem durante cerca de 2 h, e procedeu-se a respectiva pesagem numa balança analítica (Modelo AE 240 Delta Range, Metter Instruments AG, Switerland de 1985), estimou-se o valor de cinzas totais em relação a 100 g de matéria seca de amostra inicial.

$$\% CT = 100x \left(\frac{m_c}{m_{RS}} \right)$$

$\% CT$ – Percentagem de cinza total (%)

m_c - Massa de cinza (g)

m_{rs} – Massa de resíduo seco (g)

A determinação do teor de cinza total foi determinado em relação a 100 g de amostra seca.

2.10-Determinação do teor sódio (Na^+), potássio (K^+), magnésio (Mg^{2+}) e cálcio (Ca^{2+})

O teor dos diferentes minerais foi realizado a partir das cinzas obtidas para a determinação do valor de cinza total. Às cinzas foram adicionados 5 ml de ácido clorídrico (HCl) diluído (1:1). Esta solução foi aquecida até libertação de vapores correspondentes ao HCl em excesso. Após o arrefecimento, a solução foi filtrada e diluída para 50 ml num balão volumétrico.

Para a determinação de Na^+ e K^+ retirou-se 1 ml da amostra preparada anteriormente para um balão de 50 ml, adicionou-se 1 ml de ácido clorídrico (HCl) diluído (1:1) e fez-se o volume para 50 ml. Para a determinação de Mg^{2+} e Ca^{2+} retirou-se 1 ml da amostra preparada anteriormente para um balão de 50 ml, adicionou-se 1 ml de ácido clorídrico (HCl) diluído (1:1) e 5 ml de cloreto de estrôncio e fez-se o volume para 50 ml.

Os teores Na^+ , K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} foram medidos no espectrofotómetro de absorção atômica (Perking- elmer model 3100, USA, 1991) equipado com uma lâmpada de cátodo oco. As soluções utilizadas para obtenção da recta de calibração para estes minerais foram preparadas por diluição de uma solução padrão de 100 ppm. No caso dos iões sódio e potássio, para a elaboração da recta de calibração foram utilizadas as seguintes concentrações: 0,25; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 12,0. No caso dos iões magnésio e cálcio, para a elaboração da recta de calibração foram utilizadas as seguintes concentrações: 0,25; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0.

A determinação do teor dos diferentes minerais sódio (Na^+), potássio (K^+), magnésio (Mg^{2+}) e cálcio (Ca^{2+}) foi determinada em relação a 100 g de amostra seca.

2.11- Alterações físico-químicas e microbiológicas durante a fermentação do fruto de *Arbutus unedo* L.

2.11.1- Condições de fermentação

Com o objectivo de estudar o processo de fermentação do medronho, adicionou-se água aos frutos maduros (1 parte de água para 10 de fruto) dentro de um fermentador de PVC (Policloreto de vinilo) para alimentos com capacidade de 250 Kg (altura 90 cm e largura 30 cm). O fermentador foi fechado e mantido à temperatura ambiente durante 36 dias. As amostras para análise foram recolhidas de 3 em 3 dias durante o período de fermentação (36 dias). A colheita da amostra no fermentador foi realizada em 4 pontos diferentes, distantes entre si de 15 cm e a uma profundidade de 45 cm. Em cada colheita foram recolhidos aproximadamente 100 g de amostra, os quais foram colocados em sacos de PVC esterilizados e transportados para o laboratório em condições de refrigeração. Foram determinados vários parâmetros químicos (pH, °Brix, açúcares e etanol) e microbiológicos (leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas).

2.11.2- Determinações físico-químicas

As determinações dos parâmetros químicos foram executadas de acordo com os métodos descritos anteriormente para as análises realizadas aos frutos. A determinação do °Brix foi realizada de acordo com a descrição apresentada no ponto 2.1.. A medição do valor de pH foi realizada de acordo com a descrição apresentada no ponto 2.2.. A determinação do teor de açúcares e etanol foi feita de acordo com a descrição apresentada no ponto 2.4..

2.11.3- Parâmetros microbiológicos

Para a determinação dos parâmetros microbiológicos, misturou-se 25 g de massa fermentada de medronho, com cerca de 225 ml de água peptonada tamponada (0,1 %). Esta mistura foi homogeneizada num homogeneizador, durante 3 minutos e utilizada para preparar uma série de diluições sucessivas com água peptonada. Posteriormente, procedeu-se à inoculação nos meios de cultura adequados.

2.11.4- Contagem de leveduras

Procedeu-se à inoculação, por espalhamento, de 0,1 ml de cada uma das diluições na superfície do meio de cultura “Malt Extract Agar” (MEA) (pH 3,6) (Anexo I). As placas foram incubadas a 25 °C durante 5 dias.

2.11.5- Contagem de bactérias lácticas

Procedeu-se à inoculação, por incorporação, de 1 ml de cada uma das diluições no meio de cultura Man Rogosa e Sharp Agar (MRS) com 0,05 % de cicloheximida (inibidor de fungos e leveduras). As placas foram incubadas a 25 °C durante 5 dias.

2.11.6- Contagem de bactérias acéticas

Procedeu-se à inoculação, por espalhamento, de 0,1 ml de cada uma das diluições na superfície do meio de cultura para bactérias acéticas [extracto de levedura (10 g), carbonato de cálcio (20 g), etanol (20 ml) e agar (20 g) (meio preparado para um volume final de 1000 ml)]. As placas foram incubadas a 25 °C durante 5 dias.

2.11.7- Isolamento de leveduras

Após contagem das leveduras fizeram-se várias repicagens das mesmas, utilizando MEA (pH 3,6) (Anexo I) até isolar as leveduras que foram posteriormente congeladas

em criotubos com meio de cultura e glicerol, a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. As leveduras isoladas serão para identificadas posteriormente.

2.12- Procedimento estatístico

A elaboração de gráficos, de matrizes, tabelas, assim como o processamento estatístico foi feita com o auxílio do programa informático Excel v 7,0 da Microsoft Corp, em ambiente Windows XP.

Com o objectivo de se testarem diferenças entre os frutos (medronho) de dois anos diferentes e entre dois frutos (amoras silvestres e medronho) de locais diferentes, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) a todos os resultados, utilizando o programa informático SPSS 12.0., duas variáveis independentes (ano de colheita e local de colheita) e os vários parâmetros testados ($^{\circ}\text{Brix}$, pH, cor, açúcares, antocianinas, humidade, proteína total, matéria seca, minerais) como variáveis dependentes. As associações entre os diferentes parâmetros foram estudadas por análise de regressão, assumindo-se a hipótese formulada válida quando $p < 0,05$. Para além, deste estudo, utilizando SPSS, ainda foi feita uma análise de correlação bivariada utilizando o coeficiente de correlação de Pearson para verificar se os parâmetros testados se relacionam entre si.