



INSTITUTO POLITÉCNICO DE COIMBRA  
**ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA**

**Mestrado em Engenharia Alimentar**

## Relatório de Estágio Profissionalizante

Contributo para a avaliação da evolução da maturação de  
medronho na sua pós-colheita e estudo comparativo de  
produção de aguardente de medronho

Carolina Patrícia Gonçalves Santos

Coimbra, 2013



**INSTITUTO POLITÉCNICO DE COIMBRA**  
**ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA**

**Mestrado em Engenharia Alimentar**

## **Relatório de Estágio Profissionalizante**

**Contributo para a avaliação da evolução da maturação de  
medronho na sua pós-colheita e estudo comparativo de  
produção de aguardente de medronho**

**Carolina Patrícia Gonçalves Santos**

Orientador: Doutora Goreti Botelho

Co-orientador: Doutora Fernanda Ferreira

Local de estágio: Escola Superior Agrária de Coimbra

Coimbra, 2013

*Este Relatório de Estágio Profissionalizante foi elaborado expressamente para a obtenção de grau de Mestre de acordo com o despacho nº 19151/2008 de 17/07/2008, referente ao Regulamento do Ciclo de Estudos conducente à obtenção do grau de Mestre do Instituto Politécnico de Coimbra.*

## **Agradecimentos**

Os meus sinceros agradecimentos a todos os que me ajudaram, encorajaram e estiveram presentes ao longo deste trabalho de uma forma ou de outra.

À orientadora, professora Doutora Goreti Botelho, agradeço a motivação, a forma como me acompanhou na realização deste trabalho e elaboração do presente relatório, transmitindo os seus conhecimentos, empenho e dedicação.

À co-orientadora, professora Doutora Fernanda Ferreira, pela motivação e apoio demonstrado durante a execução do presente trabalho, principalmente na determinação de antioxidantes.

Ao Sr. Jorge Simões do Estreito (Oleiros) pela oferta dos medronhos para a concretização de todo o trabalho.

À empresa SILVAPA por ter permitido a visita às suas instalações.

À Eng<sup>a</sup> Ilda Caldeira, Investigadora Auxiliar no Laboratório de Enologia da Unidade de Investigação de Viticultura e Enologia (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.), pela determinação da composição volátil das aguardentes de medronho.

Em especial à minha Mãe, ao meu Pai, à minha Irmã e aos meus Avós. Agradeço a compreensão nas alturas mais complicadas e a forma como toleraram a minha falta de tempo para lidar com variadas situações em prol de realizar e terminar este estudo.

## Resumo

O medronheiro (*Arbutus unedo* L.) é uma espécie florestal presente na maioria do território continental Português, caracterizada por uma grande rusticidade, resiliência, produção anual e rápida entrada em produção, ou seja, é uma das espécies florestais Portuguesas com maior potencial de progressão. Desta árvore obtém-se o medronho que no seu estado maduro apresenta cor vermelha, sendo o  $\beta$ -caroteno e as antocianinas os principais compostos químicos responsáveis por esta coloração.

A aguardente de medronho é uma bebida destilada produzida a partir de frutos fermentados da espécie *Arbutus unedo* L.

O presente trabalho teve como objetivos acompanhar a evolução da maturação de medronho na sua pós-colheita, estudar o efeito do grau de maturação inicial dos medronhos no perfil de composição volátil da aguardente obtida (e nas frações cabeça e cauda) e, por último, quantificar a capacidade antioxidante total e compostos fenólicos totais dessa mesma aguardente.

No fruto em fresco foram determinados os parâmetros de cor no espaço CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  e  $h^\circ$ ) tendo-se previamente avaliado a precisão do colorímetro. Verificou-se que os valores dos parâmetros  $L^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  e  $h^\circ$  diminuem ao longo do tempo. Inversamente, o parâmetro  $a^*$  e o teor de °Brix aumentam ao longo do tempo de maturação do fruto, registando-se em frutos maduros, valores de 22,2°Brix. Estes resultados indicam que o medronho parece ser um fruto climatérico, ou seja, o seu processo de amadurecimento continua, naturalmente, após a sua colheita.

A fermentação alcoólica do fruto de *Arbutus unedo* L. foi acompanhada ao longo do tempo através da análise dos parâmetros físico-químicos pH, °Brix e temperatura do fermentado. Após o término da fermentação realizou-se a destilação, tendo-se obtido três frações de destilado: cabeça, coração e cauda. A quantificação dos compostos voláteis foi efetuada, para as três frações de destilado, com recurso à cromatografia em fase gasosa e os resultados analíticos obtidos foram comparados com os limites legais constantes no Decreto-Lei n.º 238/2000.

Analisando o perfil volátil das aguardentes de medronho, produzidas durante este trabalho, verificou-se que a concentração de metanol é superior (1022,39 g/hL AP) na aguardente de medronhos provenientes da queda natural (frutos com grau de maturação inicial mais elevado, de 21,4 °Brix), encontrando-se este valor acima do limite legal de 1000 g/hl AP. O contrário acontece com a aguardente de medronho obtida de frutos

provenientes da recolha direta do medronheiro (com 19,8 °Brix) em que a concentração de metanol foi de 825,90 g/hL AP, que se encontra dentro do limite legalmente permitido. Conclui-se assim, que para a produção de aguardente de medronho de qualidade, cumprindo os requisitos legais no que se refere à sua composição volátil, os frutos não devem apresentar elevado grau de maturação, uma vez que, quanto mais maduro se encontrar o fruto mais pectinas terá e, conseqüentemente, pela sua degradação durante a fermentação, possivelmente será mais elevado o teor de metanol na aguardente resultante.

A determinação da capacidade antioxidante total e de compostos fenólicos totais, nas aguardentes de medronho, produzidas no ensaio previamente referido, foram realizadas utilizando o método ABTS e o reagente Folin-Ciocalteu, respetivamente. Verificou-se diferente capacidade antioxidante total e quantidade de compostos fenólicos totais de acordo com o grau de maturação dos medronhos utilizados, tendo-se obtido 110,6  $\mu\text{mol Eq TE/mL}$  na aguardente de medronhos provenientes da queda natural e 157,3  $\mu\text{mol Eq TE/mL}$  na aguardente de medronhos recolhidos diretamente do medronheiro. Por sua vez, a concentração de compostos fenólicos totais determinada foi de 290,6  $\mu\text{mol Eq GAE/mL}$  na aguardente de medronhos provenientes da queda natural e de 423  $\mu\text{mol Eq GAE/mL}$  na aguardente de medronhos colhidos diretamente do medronheiro. Estes resultados demonstram que a atividade antioxidante está fortemente relacionada com o teor de compostos fenólicos totais.

**Palavras-chave:** *Arbutus unedo* L; Medronho; Aguardente de medronho; Composição volátil; Fermentação alcoólica; Grau Brix, Maturação, Metanol, Capacidade antioxidante total, Compostos fenólicos totais.

## Abstract

The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) is a forest specie present in the most of Portuguese continental territory, known for its great rusticity, resiliency, annual production and fast entry in production, that is to say, it is one of the Portuguese forest species with the biggest potential for progression. Strawberry tree fruit is obtained from this tree and, when it's ripe, presents a red color, being the  $\beta$ -carotene and the anthocyanins the foremost important compounds for this coloring.

The strawberry tree fruit spirit is a distilled drink produced from fermented fruits from the *Arbutus unedo* L specie.

The goal of this work were to follow up the strawberry tree fruit's ripening evolution after its crop, studying the effect of initial ripening level of strawberry tree fruit on the obtained spirit volatile composition (and on the fractions head and tale), and, at last, quantify the total antioxidant capacity and total phenols compounds from that same spirits.

Color parameters from the CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  and  $h^\circ$ ) scale were determined on fresh fruit, and the colorimeter accuracy was beforehand evaluated. It was found that  $L^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  and  $h^\circ$  color parameter values get lower over time. On the reverse, the  $a^*$  parameter and the °Brix degree increase over the ripening time, and so there are 22.2°Brix values. These results indicate that the strawberry tree fruit seems to be a climacteric fruit, or in other words, its ripening process goes on, after its picking, in a natural way.

The alcoholic fermentation of *Arbutus unedo* L. fruit was monitored throughout the time all the way through physical and chemical parameters analysis, pH, °Brix and its temperature. After fermentation ended, distillation took place, and three fractions were obtained out of it: head, heart and tale. The quantification of volatile compounds was performed towards the three fractions, using the gas chromatography technique and the obtained analytical data was compared to the legal limits established in the Decree-law n.º 238/2000.

After analyzing the strawberry tree fruit spirits volatile characteristic, produced throughout this work, it has been verified that the methanol concentration is superior (1022.39 g/hL AP) in the spirit made from fruits that fell naturally (fruits with higher initial maturation, of 21.4 °Brix), which is a value above the legal limit (1000 h/hl AP). The opposite happens with the spirit obtained from harvested fruits containing

19.8°Brix, from which methanol concentration is of 825.90 g/hL AP, that is within the allowed legal limit. It was concluded that, for the production of quality strawberry tree fruit spirit within the legal requirements concerning its volatile composing, the fruits should not present an elevated maturation level, since the more mature the fruit is the more pectins will have, and therefore, through its degradation during the fermentation, the resulting spirit will possible have higher methanol levels.

The determination of the total antioxidant capacity and total phenols compounds, in the strawberry tree fruit spirit, produced in the abovementioned experiment, were completed using ABTS methods and Folin-Ciocalteau agent, respectively. Different total antioxidant capacity and total phenols compounds amount were found, according to the used fruits maturation level: 110.6  $\mu\text{mol Eq TE/mL}$  were obtained from the strawberry tree fruit spirit from fruits that fell naturally, and 157.3  $\mu\text{mol Eq TE/mL}$  from the one made with harvested directly from the tree. Therefore, the obtained concentration of total phenols compounds was 290.6  $\mu\text{mol Eq GAE/mL}$  from the strawberry tree fruit spirit made of fruits that fell naturally and 423.9  $\mu\text{mol Eq GAE/mL}$  from the spirit made with directly harvested fruits. These results seems to indicate that antioxidant activity is strongly related to total phenols content.

**Keywords:** *Arbutus unedo* L; Strawberry tree fruit; Strawberry tree fruit spirit; Volatile compounds; Alcoholic fermentation; Degree Brix, Ripeness, Methanol, Total antioxidant capacity, Total phenols compounds.



# Índice Geral

Agradecimentos.....	II
Resumo.....	III
Abstract .....	V
Índice de figuras .....	IX
Índice de tabelas .....	X
Lista de abreviaturas e símbolos .....	XI
Financiamento .....	XIII
Divulgação do trabalho .....	XIV
1. Introdução .....	15
Revisão bibliográfica .....	17
2. O medronheiro ( <i>Arbutus unedo</i> L.) .....	17
2.1. Composição nutricional do medronho .....	21
2.2. Pós-colheita.....	22
2.2.1. Alterações fisiológicas e bioquímicas dos frutos.....	22
2.3. Medição da cor pelo sistema CIELAB.....	23
2.4. Subprodutos do medronheiro .....	25
3. Caracterização e localização das várias zonas de cultivo do medronheiro .....	27
4. Fermentação alcoólica.....	29
5. Destilação.....	32
5.1. Alambique.....	32
6. Aguardente de medronho .....	34
7. Compostos voláteis .....	36
8. Antioxidantes .....	40
8.1. Compostos fenólicos .....	43
9. Procedimento experimental.....	45
9.1. Determinação do grau de maturação do fruto de medronheiro ( <i>Arbutus unedo</i> L.).....	45
9.1.1. Avaliação da precisão do colorímetro .....	45
9.1.2. Determinação da temperatura e humidade do ar do laboratório.....	45
9.1.3. Determinação do teor de sólidos solúveis totais (°Brix).....	45
9.1.4. Determinação da cor do medronho (refração L*, a* e b*).....	45
9.2. Produção de aguardente de medronho .....	46
9.2.1. Descrição das etapas de produção de aguardente de medronho .....	47
9.3. Determinação dos parâmetros físico-químicos dos fermentados .....	51

9.3.1. Determinação do teor de sólidos solúveis totais (°Brix).....	51
9.3.2. Determinação do pH.....	51
9.3.3. Monitorização das temperaturas ao longo do processo fermentativo.....	51
9.3.4. Determinação da acidez total.....	51
9.4. Análise das aguardentes de medronho .....	52
9.4.1. Determinação do pH das aguardentes de medronho.....	52
9.4.2. Determinação do grau alcoólico .....	52
9.4.3. Doseamento dos compostos voláteis da aguardente de medronho .....	52
9.5. Determinação de antioxidantes na aguardente de medronho .....	53
9.5.1. Reagentes químicos .....	53
9.5.2. Capacidade antioxidante total utilizando ABTS .....	53
9.5.3. Determinação de compostos fenólicos totais.....	53
9.6. Análise estatística.....	54
10. Resultados e discussão .....	55
10.1. Estudo da evolução da maturação dos medronhos na sua pós-colheita .....	55
10.1.1. Avaliação da precisão do colorímetro .....	55
10.1.2. Determinação da humidade e temperatura .....	55
10.1.3. Avaliação da evolução da cor dos medronhos.....	56
10.1.4. Avaliação da evolução do °Brix dos medronhos .....	61
10.2. Evolução dos parâmetros físico-químicos ao longo do processo fermentativo. ....	62
10.2.1. Determinação do teor de sólidos solúveis totais (°Brix).....	62
10.2.2. Determinação do pH.....	64
10.2.3. Monitorização das temperaturas ao longo do processo fermentativo.....	64
10.2.4. Determinação da acidez total.....	65
10.3. Caracterização das aguardentes de medronho obtidas .....	67
10.3.1. Determinação de compostos voláteis na aguardente de medronho .....	68
10.4. Determinação da capacidade antioxidante total e compostos fenólicos totais .....	77
11. Conclusões e perspectivas futuras.....	79
11.1. Conclusões .....	79
11.2. Perspetivas de trabalho futuro.....	81
12. Referências Bibliográficas .....	82
Anexos 1 – Especificações técnicas de um colorímetro comercial utilizado como referência. ..	94

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> - <i>Arbutus unedo</i> L. ....	17
<b>Figura 2</b> - Medronho e flor do medronheiro em forma de guizo. ....	18
<b>Figura 3</b> - Estrutura química do carotenóide $\beta$ -Caroteno .....	19
<b>Figura 4</b> - Estrutura química básica das antocianinas. ....	20
<b>Figura 5</b> - Plantação de medronheiro no Estreito.....	28
<b>Figura 6</b> - Esquema do processo de fermentação alcoólica.....	30
<b>Figura 7</b> - Alambique Charantais existente na ESAC. ....	33
<b>Figura 8</b> - Estabilização do radical livre DPPH .....	41
<b>Figura 9</b> - Estabilização do radical ABTS <sup>+</sup> por um antioxidante e sua formação por persulfato de potássio.....	42
<b>Figura 10</b> - Fluxograma de produção de aguardente de medronho .....	46
<b>Figura 11</b> - a) - <i>Arbutus unedo</i> L; b) – <i>Arbutus unedo</i> L. com rede na sua base.....	47
<b>Figura 12</b> - Fermentação do medronho ao longo do tempo. ....	49
<b>Figura 13</b> - Cromatógrafo Focus GC .....	52
<b>Figura 14</b> - Evolução da cor do fruto .....	56
<b>Figura 15</b> - Evolução do parâmetro L*. ....	57
<b>Figura 16</b> - Evolução do parâmetro a*. ....	58
<b>Figura 17</b> - Evolução do parâmetro b*. ....	58
<b>Figura 18</b> - Evolução do parâmetro C*. ....	59
<b>Figura 19</b> - Evolução do parâmetro h°. ....	60
<b>Figura 20</b> - Evolução do °Brix.....	61
<b>Figura 21</b> – Evolução da variação do °Brix ao longo do tempo de fermentação. ....	62
<b>Figura 22</b> - Evolução da variação do pH ao longo do tempo de fermentação.....	64
<b>Figura 23</b> - Evolução da variação da temperatura dos fermentados A e B. ....	65

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> - Propriedades dimensionais (média $\pm$ desvio padrão) do fruto de medronheiro .....	19
<b>Tabela 2</b> - Composição nutricional e físico-química (média $\pm$ desvio padrão) do fruto de <i>Arbutus unedo</i> L.....	21
<b>Tabela 3</b> - Características do fruto <i>Arbutus unedo</i> L. (média $\pm$ desvio padrão) de acordo com os diferentes graus de maturação .....	25
<b>Tabela 4</b> - Especificações dos parâmetros físico-químicos e organoléticos para a comercialização da aguardente de medronho.....	35
<b>Tabela 5</b> - Estrutura química dos compostos voláteis presentes na aguardente de medronhos que apresentam limites legais .....	38
<b>Tabela 6</b> - Codificação das amostras. ....	48
<b>Tabela 7</b> - Acidez total dos fermentados A e B (média $\pm$ desvio padrão). ....	65
<b>Tabela 8</b> - Volumes de cabeça, coração e caudas obtido na destilação.....	67
<b>Tabela 9</b> - Composição das aguardentes de medronho resultantes das fermentações A e B (N=2; média $\pm$ desvio padrão). ....	69
<b>Tabela 10</b> - Capacidade antioxidante total e conteúdo em fenóis totais das aguardentes de medronho (N=2; média $\pm$ desvio padrão).....	77

## Lista de abreviaturas e símbolos

%	Porcentagem
% vol.	Porcentagem em volume
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrómetro
µmol	Micromole
µmol Eq GAE/mL	Micromole de equivalente de ácido gálico por mililitros
µmol Eq TE/mL	Micromole de equivalente de Trolox por mililitros
$^1\text{O}^2$	Oxigénio singlete
A	Amostra com frutos provenientes da queda natural
a*	Vermelho (+)/verde (-)
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)
ANOVA	Análise de variância
AP	Álcool puro
ATP	Trifosfato de adenosina
B	Amostra com frutos provenientes da recolha direta da árvore
b*	Amarelo (+)/azul (-)
C*	Saturação (Croma)
$\text{C}_2\text{H}_2$	Etileno
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	Etanol
$\text{CH}_3\text{OH}$	Metanol
CIE	Comissão Internacional de Iluminação
CIELAB	Sistema Lab Color
$\text{CO}_2$	Dióxido de carbono
DPPH	1,1-Difenil-2-picrilhidrazil
ESAC	Escola Superior Agrária de Coimbra
g	Gramas
g/hl AP	Gramas por hectolitro de álcool puro
g/Kg	Gramas por quilogramas
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrogénio
$h^\circ$	Ângulo Hue
$\text{HO}^\cdot$	Radical hidroxilo
$\text{HOCl}$	Ácido hipocloroso
I.P.	Instituto Público
HR	Humidade Relativa
$\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$	Persulfato de potássio
Kcal/g	Quilocalorias por gramas
Kg	Quilograma
L	Litro
L*	Luminosidade
m	Metros

m/v	Massa/volume
mg/100g	Miligramas por 100 gramas
mg/100mL	Miligramas por 100 mililitros
mg/Kg	Miligramas por quilograma
mg/L	Miligramas por litro
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
mm	Milímetros
mol.dm <sup>-3</sup>	Mole por decímetros cúbicos
NAD <sup>+</sup>	Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina (forma oxidada)
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanómetros
<i>p</i>	Valor de <i>p</i>
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Anião superóxido
O <sub>3</sub>	Ozono
°C	Graus Celcius
ROO <sup>•</sup>	Radical peroxilo
ROS	Espécies reativas de oxigénio
Sig.	Significância
Trolox	Ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
UV-Vis	Radiação Ultra Violeta - Visível

## Financiamento

Este trabalho foi realizado e financiado no âmbito dos seguintes projetos:

in\_Agri/CERNAS/IPC – Rede de Oficinas de Inovação é financiado pelo Mais Centro/PORC/Portugal : CENTRO-01-A28-FEDER-004038; nº 3494.

PRODER, medida 4.1: Ref: 43748. O Medronho - Conversão da planta silvestre numa espécie fruteira rentável.

Projeto intitulado “Melhoramento das plantas e da qualidade dos produtos de *Arbutus unedo* para o sector agro-florestal”. Referência: PTDC/AGR-FOR/3746/2012. Financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT).

## **Divulgação do trabalho**

A divulgação do conhecimento relativo ao presente trabalho até ao momento, centrou-se na elaboração de um artigo para publicação numa revista técnico-científica agrícola nacional e num artigo para publicação em revista científica internacional (ambas com refereeing):

**Santos, C.**, Franco, J. e Botelho, G. 2013. Contributo para a avaliação da maturação do medronho na sua pós-colheita. AGROTEC. (aceite)

**Santos, C.**, Botelho, G., Caldeira, I., Torres, A. e Ferreira, F. 2013. Comparison of chemical assays reliability for antioxidant activity assessment in fruit spirits and liquors. Journal of Food Composition and Analysis. (submetido)



## 1. Introdução

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do estágio profissionalizante, para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar, tendo sido realizado na Escola Superior Agrária de Coimbra, Instituto Politécnico de Coimbra.

Face às atuais exigências de mercado, um produto só é comercializável se a sua composição se mantiver constante e com perfil de qualidade. Desta forma, é necessário conhecer as suas características, verificar se as mesmas obedecem aos parâmetros de qualidade existentes para o tipo de produto e ser capaz de o produzir mantendo esses mesmos parâmetros.

A produção de aguardente de medronho não é exceção. Assim, a otimização de parâmetros para a produção deste produto está dependente de conhecimentos relativos à evolução das características físico-químicas e biológicas ao longo de todo o processo de produção e aos seus efeitos no produto final.

A fase da fermentação do medronho é determinante na qualidade do produto final. Assim, a monitorização dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos de um processo fermentativo desde o seu início, será de grande utilidade para os vários produtores de aguardente de medronho.

A fermentação do medronho, atualmente, é alcançada pela sua microbiota epifítica. Durante a fermentação natural do medronho, para além das leveduras, que se encontram presentes no fruto, responsáveis pela produção de etanol durante o processo de fermentação alcoólica, outros microrganismos presentes podem originar subprodutos indesejados. Estes microrganismos incluem bactérias e várias estirpes de leveduras que podem dominar durante a primeira fase da fermentação e ter efeitos negativos na aguardente, que se refletirão nas suas características químicas e organoléticas. Para além disto, estas espécies causam um consumo desnecessário de açúcares, diminuindo o teor de etanol produzido (Santo, 2010).

Para minimizar estes problemas, com este trabalho pretendeu-se, contribuir para aumento do conhecimento sobre a evolução da maturação de medronho na sua pós-colheita, o efeito do grau de maturação inicial dos medronhos na composição volátil, e a quantificação da capacidade antioxidante total e compostos fenólicos totais nas aguardentes de medronho obtidas. Assim, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Avaliar a evolução da cor e do teor de sólidos solúveis totais de três estados diferentes de maturação de medronho ao longo de um período de pós-colheita.

- Estudar a fase de fermentação do medronho (fruto de *Arbutus unedo* L.), ao longo do tempo, através da monitorização dos parâmetros físico-químicos.
- Estudar e comparar o efeito do grau de maturação inicial dos medronhos, (usando fruto recolhido diretamente dos medronheiros e frutos provenientes da queda natural), na composição volátil das aguardentes e, em particular, no seu teor de metanol.
- Quantificar a capacidade antioxidante total e compostos fenólicos totais, das aguardentes obtidas, através do método ABTS e Folin-Ciocalteu, respetivamente.

## Revisão bibliográfica

### 2. O medronheiro (*Arbutus unedo* L.)

O medronheiro (*Arbutus unedo* L.) (Figura 1) é uma pequena árvore ou arbusto de folha perene, ramos sinuosos, troncos verdes quando jovens, avermelhados quando envelhecido. Esta planta atinge entre os três e os seis metros, podendo no entanto alcançar os 10 metros de altura. Possui flores brancas ou verdes e por vezes rosadas, em forma de guizo (Figura 2), que se encontram em cachos nas árvores. Pertence ao género *Arbutus* e à família Ericaceae (Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001; Ayaz *et al.*, 2000; Gilman e Watson, 1993; Özcan e Haciseferoğullari, 2007; Soufleros *et al.*, 2004).



**Figura 1** - *Arbutus unedo* L.

O seu *habitat* natural são locais de climas temperados nos quais as temperaturas médias anuais são superiores a 12,5°C, as temperaturas mínimas variam entre os -12°C e os 6°C e a precipitação média anual situa-se entre os 500 e os 1400 milímetros por metro quadrado. Este tipo de clima garante a sobrevivência da espécie, pois as chuvas intensas (de janeiro a março) destroem as flores e as chuvas fora de época (de junho a agosto) provocam lesões nas folhas e queda prematura dos frutos, ficando o *Arbutus unedo* L. suscetível a invasões por agentes patogénicos (Celikel *et al.*, 2008; Correia e Oliveira, 2002; Ferreira e Gonçalves, 2001).

No que diz respeito à constituição físico-química do solo, esta espécie, no que refere às características físicas, elege solos frescos, arenosos, siliciosos, feldspáticos, graníticos e calcários (Correia e Oliveira, 1999; Ferreira *et al.*, 2001; Gonzáles, 2006; Torres *et al.*, 2002), embora também se desenvolva bem em solos áridos (Martínez-Vilalta *et al.*, 2002). No que refere às características químicas prefere solos ácidos,

embora também consiga crescer em solos alcalinos, variando a sua gama de pH ótimo entre 5 e 8,5 (Cabral e Telles, 1999; Correia e Oliveira, 1999; Ferreira *et al.*, 2001; Gonzáles, 2006; Mereti *et al.*, 2002; Mereti *et al.*, 2003).

A propagação do medronheiro pode ser seminal e/ou vegetativa. A propagação seminal faz-se por sementes, que são recolhidas entre Novembro e Dezembro quando os frutos estão maduros. A germinação das sementes do medronheiro é muito lenta e a propagação seminal não garante a preservação das características da árvore de onde provém (planta mãe), embora permita obter rapidamente um grande número de plantas a baixo custo. A propagação vegetativa permite evitar a variabilidade genotípica da propagação seminal embora apresente custos mais elevados. Este tipo de propagação vegetativa pode ser feita por estacaria, cultura *in vitro*, caulinar e/ou micropropagação (Gomes e Canhoto, 2009; Mendes e Gonçalves, 1997).



**Figura 2** - Medronho e flor do medronheiro em forma de guizo (Cedida por: Goreti Botelho).

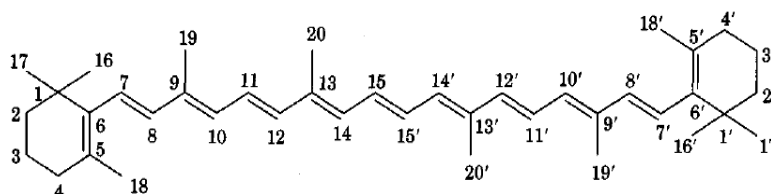
Os frutos são geralmente esféricos, carnudos, globulosos, granuloso na superfície, contêm sementes e medem entre um a quatro centímetros de diâmetro. A Tabela 1 resume as propriedades dimensionais deste fruto. A cor vermelha/laranja do fruto de medronheiro (Figura 2) caracteriza o estado final da maturação (Gilman e Watson, 1993; Özcan e Haciseferoğullari, 2007; Soufleros *et al.*, 2004), sendo esta cor,

vermelha/alaranjada, devida à presença de pigmentos de  $\beta$ -catoteno e antiocianinas (Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001).

**Tabela 1** - Propriedades dimensionais (média  $\pm$  desvio padrão) do fruto de medronheiro (adaptado de: Özcan e Haciseferoğullari, 2007).

Propriedade	Valor ( $\bar{x} \pm dp$ )
Peso (g)	0,70 $\pm$ 0,027
Diâmetro (mm)	10,70 $\pm$ 0,111
Comprimento (mm)	8,51 $\pm$ 0,134
Diâmetro geométrico médio (mm)	9,91 $\pm$ 0,027

O  $\beta$ -caroteno possui uma estrutura química com um esqueleto de quarenta átomos de carbono, com onze ligações duplas conjugadas C=C (Figura 3) (Faber *et al.*, 2007), e possui uma coloração que vai desde o amarelo até ao vermelho forte, dependendo do seu grau de pureza, fonte e localização, ocorre naturalmente em muitas plantas, nomeadamente vegetais e frutos (Leach *et al.*, 1998).



**Figura 3** - Estrutura química do carotenóide  $\beta$ -Caroteno (IUPAC, 1993).

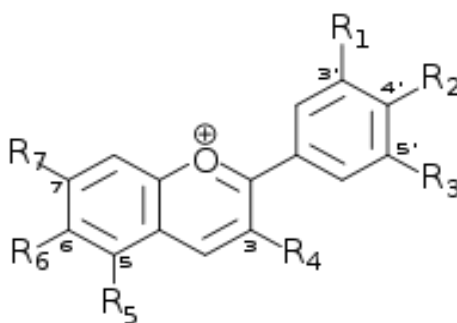
Para o ser humano, a função mais importante do  $\beta$ -caroteno na saúde é o fato de ser precursor da vitamina A, ou seja, a conversão do  $\beta$ -caroteno a vitamina A só ocorre quando esta é requerida pelo corpo, o que se opõe à potencial toxicidade associada à overdose de vitamina A (Faber *et al.*, 2007). O  $\beta$ -caroteno possui ainda atividade antioxidante, sendo, que atua por aniquilação dos radicais, sendo a sua atividade ótima à pressão de oxigénio normal existente nos tecidos. Evidências epidemiológicas têm mostrado que o  $\beta$ -caroteno é capaz de prevenir o cancro em vários órgãos, como o pulmão, o estômago, o colo do útero, o pâncreas, o cólon, o reto, a próstata e o ovário, devido à sua atividade antioxidante. Outras funções deste carotenóide são a sua influência na comunicação intracelular, resposta imunitária, e controlo do crescimento (Murthy *et al.*, 2005).

As antocianinas (do Grego “ánthos”, flor e “kýanos”, azul) constituem uma das principais classes de flavonóides e enquanto pigmentos hidrossolúveis estão largamente distribuídas em várias flores, vegetais, frutos e bebidas, tais como os sumos e principalmente os vinhos tintos, sendo responsáveis pelas suas intensas colorações de vermelho, violeta ou azul (Kong *et al.*, 2003).

A estrutura química básica é a de um difenilpropanóide [C6(anel A)-C3(anel C)-C6(anel B)] baseado numa estrutura em anel polifenólica (Figura 4).

As antocianinas formam em solução ácida os chamados catiões flavílio (2-fenilbenzopirílio) e por esse motivo são espécies altamente reativas. As diferenças estruturais entre as antocianinas estão, essencialmente, relacionadas com o número e posição dos grupos hidroxilo e metoxilo, com a natureza, o número e posição dos açúcares ligados à estrutura básica da antocianidina e, ainda, com a extensão da acilação desses açúcares e a natureza dos agentes acilantes (Kong *et al.*, 2003).

Em suma, as antocianinas são glicósidos das antocianidinas, possuindo glucose galactose, ramnose, xilose ou arabinose ligada ao núcleo. De referir que a glicosilação aumenta a estabilidade destes pigmentos.



**Figura 4** - Estrutura química básica das antocianinas (IUPAC, 1993).

A administração oral, de frutos ou extratos ricos em antocianinas, tem provado ter efeitos benéficos na prevenção ou supressão de vários estados de doença *in vivo*. Vários estudos sobre a administração oral de antocianinas têm também confirmado o aumento da capacidade antioxidante no plasma (Bitsch *et al.*, 2004; Mazza *et al.*, 2002; Ramirez-Tortosa *et al.*, 2001). As antocianinas possuem uma enorme variedade de propriedades biológicas conferindo proteção contra doenças oculares e possuindo também atividade antimutagénica e antiviral (Knox *et al.*, 2001; Yoshimoto *et al.*, 2001).

## 2.1. Composição nutricional do medronho

O fruto do medronheiro (*A. unedo* L.) possui na sua composição nutricional essencialmente água, açúcares, proteínas e minerais, como indicado na Tabela 2.

**Tabela 2** - Composição nutricional e físico-química (média  $\pm$  desvio padrão) do fruto de *Arbutus unedo* L. (adaptado de: Özcan e Haciseferoğullari, 2007).

Composição	Valores ( $\bar{x} \pm dp$ )
Teor de Humidade (%)	53,72 $\pm$ 2,10
Proteínas (%)	3,36 $\pm$ 0,12
Gordura (%)	2,10 $\pm$ 0,10
Fibras (%)	6,40 $\pm$ 1,10
Valor Energético (kcal/g)	327 $\pm$ 13,00
Cinzas (%)	2,82 $\pm$ 0,12
Acidez (%)	0,40 $\pm$ 0,10
Sulfito de diemtilo (g/kg)	5,30 $\pm$ 0,60
Óleos essenciais (%)	0,02 $\pm$ 0,00
Alumínio (mg/kg)	20,11 $\pm$ 2,69
Arsénio (mg/kg)	10,58 $\pm$ 6,47
Boro (mg/kg)	16,03 $\pm$ 2,12
Cálcio (mg/kg)	4959,02 $\pm$ 150
Cádmio (mg/kg)	0,19 $\pm$ 0,05
Cobre (mg/kg)	1,64 $\pm$ 0,41
Ferro (mg/kg)	12,15 $\pm$ 1,11
Potássio (mg/kg)	14909,08 $\pm$ 1687
Magnésio (mg/kg)	1315,57 $\pm$ 129,19
Sódio (mg/kg)	701,26 $\pm$ 80
Fósforo (mg/kg)	3668,56 $\pm$ 339,69
Zinco (mg/kg)	8,09 $\pm$ 0,96
pH	4,60 $\pm$ 0,10

## **2.2. Pós-colheita**

Os frutos são formados por tecidos vivos sujeitos a alterações contínuas após a colheita, que sofrem danos cumulativos e sucessivos durante os períodos de manuseamento, armazenamento e transporte. Contudo, a preservação da qualidade, assim como o período de conservação da fruta, também está largamente associada ao comportamento da fisiologia pós-colheita.

Durante a pós-colheita, pode ocorrer rutura dos compartimentos celulares que possibilitam o contacto de enzimas e substratos, originando modificações químicas, como escurecimento, formação de odores desagradáveis e perda da textura original, fatores que os consumidores consideram determinantes para a escolha do produto no ato da compra. Os fatores extrínsecos, tais como a temperatura e composição atmosférica, são fundamentais para retardar desordens fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas que afetam as características sensoriais dos alimentos minimamente processados (Silva e Moraes, 2000).

### **2.2.1. Alterações fisiológicas e bioquímicas dos frutos**

**Respiração:** A respiração é o processo bioquímico pelo qual os materiais orgânicos, principalmente hidratos de carbono simples, são degradados nas células em produtos mais simples com libertação de energia. Nesta reação é consumido oxigénio e produzido dióxido de carbono e água. Os produtos frescos não podem repor hidratos de carbono ou água depois da colheita. A respiração utiliza os hidratos de carbono até estes se esgotarem, seguindo-se o envelhecimento que se designa por senescência e morte dos tecidos. A perda destes materiais orgânicos traduz-se na redução do valor nutricional, perda do sabor característico do fruto e perda de peso (Pinto e Moraes, 2000).

A respiração nos produtos hortofrutícolas é medida pela taxa de respiração e está relacionada com a degradação dos hortofrutícolas. As taxas respiratórias mais elevadas, correspondem taxas de degradação mais rápidas (Pinto e Moraes, 2000, Silva e Moraes, 2000).



**Transpiração:** A transpiração traduz-se na evaporação da água dos tecidos biológicos. Esta perda de água do produto fresco depois da colheita traduz-se num problema para o produtor, pois há perda do peso vendável e, por outro lado, perda de textura e aparência (Pinto e Moraes, 2000). A transpiração é influenciada por características do produto, tais como as características morfológicas, a relação superfície/volume, danos na epiderme e estado de maturação, sendo também influenciada por fatores externos, tais como, a temperatura, a humidade relativa e a circulação do ar (Bieto e Talon, 1993; Pinto e Moraes, 2000).

**Ação do Etileno:** O etileno ( $C_2H_2$ ) é uma hormona natural resultante do metabolismo das plantas, que regula o seu crescimento, desenvolvimento e senescência.

De acordo com a sua sensibilidade ao etileno durante a maturação, os produtos podem ser classificados em duas categorias: Climatéricos e Não Climatéricos. Entende-se por Produtos Climatéricos aqueles em que o etileno tem a capacidade de desencadear o processo de amadurecimento do produto imaturo separado da planta. Nos Produtos Não Climatéricos os frutos não amadurecem separados da planta. No entanto, para estes o etileno pode por exemplo ser utilizado para promover a pigmentação da epiderme (Pinto e Moraes, 2000; Silva e Moraes, 2000).

A taxa de produção de etileno aumenta com a maturação, a incidência dos danos físicos, doenças e o aumento da temperatura. Esta taxa diminui em ambientes com oxigénio reduzido ( $< 8\%$ ) e/ou dióxido de carbono elevado ( $> 2\%$ ) (Pinto e Moraes, 2000; Silva e Moraes, 2000).

### **2.3. Medição da cor pelo sistema CIELAB**

A cor é uma sensação, isto é, uma manifestação da percepção da luz. O fenómeno da visão da cor depende de três fatores: natureza da luz, integração da luz com a matéria e fisiologia do olho humano. A ausência ou defeito de qualquer um deles torna a sua percepção impossível (Araújo, 2004).

A fim de evitar as diferenças naturais entre as percepções humanas da cor, a CIE (*Comission Internationale de l'Eclairage, International Commission on Illumination* – Comissão Internacional de Iluminação) em 1976, desenvolveu o sistema CIELAB (Sistema Lab Color ou Espaço Lab Color) de medição de cor através dos parâmetros

( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ) usando para o efeito colorímetros com sistema tridimensional (KONICA MINOLTA, 2003).

Os colorímetros com sistema tridimensional examinam uma área extensa da amostra, medindo a cor real, correlacionando-a com a observada visualmente, utilizando filtros de cor especializados e detetores luminosos que simulam a sensibilidade humana para a cor. O olho humano é capaz de detetar acima de 10 milhões de tonalidades diferentes de cor e o colorímetro com sistema tridimensional pode quantificá-las (Arias *et al.*, 2000; KONICA MINOLTA, 2003).

Uma descrição mais precisa e uniforme da cor é obtida com a medição dos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  que matematicamente combinados permitem calcular outros índices de cor como o Chroma ( $C^*$ ), o ângulo Hue ( $h^\circ$ ) e também, as razões  $a^*/b^*$  e  $(a^*/b^*)^2$  (Arias *et al.*, 2000).

Os parâmetros do sistema CIELAB localizam-se dentro de uma esfera de cor definida pelos três eixos perpendiculares  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ . A luminosidade ( $L^*$ ) é definida como a capacidade de um objeto refletir ou transmitir luz resultando a cor luminosa (100 - branco) ou escura (zero - preto) (Arias *et al.*, 2000; KONICA MINOLTA, 2003). A cromaticidade é composta pelas coordenadas  $a^*$  (vermelho-verde: valor positivo representa vermelho e negativo verde) e  $b^*$  (amarelo-azul: valor positivo representa amarelo e negativo azul) (Arias *et al.*, 2000; KONICA MINOLTA, 2003).

A saturação ( $C^*$  ou Chroma) define a vivacidade (próximo de 60) ou opacidade da cor (próximo de zero) (Arias *et al.*, 2000; KONICA MINOLTA, 2003) sendo calculado através da equação  $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$  (Arias *et al.*, 2000).

O Hue ou ângulo Hue ( $h^\circ$ ) está relacionado com as diferenças de absorvência em diferentes comprimentos de onda permitindo distinguir colorações com a mesma luminosidade, calculado a partir: de  $\tan^{-1} (b^*/a^*)$ , quando  $a^* > 0$  e  $b^* \geq 0$ ; e  $180 + \tan^{-1} (b^*/a^*)$ , quando  $a^* < 0$  (Arias *et al.*, 2000). O valor Hue ( $h^\circ$ ) de  $180^\circ$  representa o verde puro e  $0^\circ$  vermelho puro; quanto mais próximo de zero for este valor mais vermelha será a cor do alimento (Arias *et al.*, 2000; KONICA MINOLTA, 2003).

Assim, a cor de um objeto pode ser expressa numericamente a partir das coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , de forma a facilitar a medição de pequenas diferenças de cor, que podem ser imperceptíveis visualmente (Martim e Silva, 2002). O CIE (1976) estabelece a diferença de cor normalizada de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}, \text{ onde } \Delta L^* = L^*_f - L^*_i, \Delta a^* = a^*_f - a^*_i, \Delta b^* = b^*_f - b^*_i$$

são as diferenças entre a cor final e inicial de um objeto (Martim e Silva, 2002).

A diferença de cor pode ser classificada como: muito distinto ( $\Delta E > 3$ ), distinto ( $1,5 < \Delta E < 3$ ) e pequena diferença ( $1,5 < \Delta E$ ) (Adekunte *et al.*, 2010).

A medição da cor pode ser usada para estabelecer índices de qualidade, determinações da conformidade da qualidade de alimentos específicos e para análises de mudança de qualidade resultante do processo de fabrico, armazenamento e outros fatores.

A Tabela 3 caracteriza a composição físico-química e nutricional do medronho de acordo com diferentes estados de maturação.

**Tabela 3** - Características do fruto *Arbutus unedo* L. (média  $\pm$  desvio padrão) de acordo com os diferentes graus de maturação (Adaptado de: Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001).

Parâmetro/Nutriente	Coordenadas/Composto	Fruto verde	Fruto Maduro
Cor	L*	81,75	59,82
	a*	-4,40	18,75
	b*	36,49	38,11
	C*	36,49	42,47
	h°	96,87	63,80
Vitaminas (mg/100g)	niacina	4,9 $\pm$ 1,70	9,1 $\pm$ 0,60
	ácido ascórbico	542 $\pm$ 11	346 $\pm$ 7
	$\beta$ -caroteno	38,1 $\pm$ 0,37	70,9 $\pm$ 5,20

## 2.4. Subprodutos do medronheiro

*Arbutus unedo* L. tem várias qualidades associadas tais como ornamentação, propriedades ecológicas, terapêuticas e medicinais (Oliveira *et al.*, 2011).

As tendências em jardinagem apontam para a construção de espaços, onde se cultivam plantas ornamentais, aromáticas, fruteiras e hortícolas, geradores de ambientes de convívio social e de desfrute da natureza. Neste contexto, o medronheiro tem características ornamentais, entre elas: folhagem persistente e brilhante, floração abundante, frutificação colorida e comestível, para poder assumir um papel de destaque como planta ornamental em espaços verdes públicos e privados (Costa, 2012).

A nível ecológico o medronheiro desempenha funções muito importantes, uma vez que mantém a diversidade da fauna, evita a erosão dos solos, regenera rapidamente

após os incêndios, cresce em solos pobres e pode ser usado para fitorremediação de solos contaminados com arsénio (Gomes e Canhoto, 2009).

Os frutos, embora sejam comestíveis, são normalmente usados para compotas, licores e aguardente (Soufleros *et al.*, 2005). O mel de medronheiro é popular pelo seu sabor forte e amargo (Spano *et al.*, 2009).

A produção de doces, licores e mel com base em medronheiros representam um elevado interesse económico do presente arbusto em áreas rurais (Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001).

Na medicina tradicional, existem vários relatos sobre o uso das diferentes partes da árvore. O medronho é reconhecido pelo seu poder anti-séptico das vias urinárias, diurético e laxante (Cornara *et al.*, 2009; El-Hilaly *et al.*, 2003; Leonti *et al.*, 2009; Pallauf *et al.*, 2008; Ziyat e Boussairi, 1998). Estas propriedades derivam sobretudo da sua composição química, rica em compostos com propriedades antioxidantes como sejam fenóis, vitaminas (C e E), carotenóides e ácidos orgânicos (Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001; Kivçak e Mert, 2001; Maleš *et al.*, 2006; Pallauf *et al.*, 2008; Pawlowska *et al.*, 2006). As folhas do medronheiro são usadas pelo interesse nas suas propriedades antioxidantes, adstringentes, diuréticas, antidiarreicas e depurativas. Mais recentemente, surgiram trabalhos indicando a utilização das folhas no tratamento de doenças como a hipertensão, diabetes e problemas inflamatórios (Afkir *et al.*, 2008; Mariotto *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2009; Ziyat e Boussairi, 1998; Ziyat *et al.*, 1997). Estudos fitoquímicos em folhas revelaram que, grande parte destas propriedades resultam da sua composição em compostos fenólicos como taninos, flavonóides, entre outros (Fiorentino *et al.*, 2007; Maleš *et al.*, 2006), assim como de  $\alpha$ -tocoferol (Kivçak e Mert, 2001).

Outras partes da planta, como raízes e cascas, também são usados na medicina tradicional, no tratamento de doenças gastrointestinais, problemas urológicos e dermatológicos (Leonti *et al.*, 2009; Novais *et al.*, 2004).

Todas estas características medicinais e terapêuticas descritas estão ligadas aos conteúdos de vários compostos biologicamente ativos, em diferentes partes de *A. unedo* L. (Oliveira *et al.*, 2011).

### 3. Caracterização e localização das várias zonas de cultivo do medronheiro

O medronheiro encontra-se numa vasta área da bacia mediterrânea, exceto na orla costeira do Sudoeste de Espanha e na área que vai desde a Tunísia até ao Sul da Turquia. A área de distribuição inclui também todo o território de Portugal continental, Norte de Espanha, regiões das Landes da Bretanha (França) e a zona ocidental da Irlanda (Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001; Ayaz *et al.*, 2000; Özcan e Haciseferoğullari, 2007).

É uma espécie muito comum em Portugal, sendo possível encontrar um grande número de exemplares que crescem espontaneamente em quase todo o território embora com maior frequência a Sul do rio Tejo, especialmente nas Serras de Monchique e do Caldeirão (Correia e Oliveira, 1999; Ferreira *et al.*, 2001; Godinho-Ferreira *et al.*, 2005).

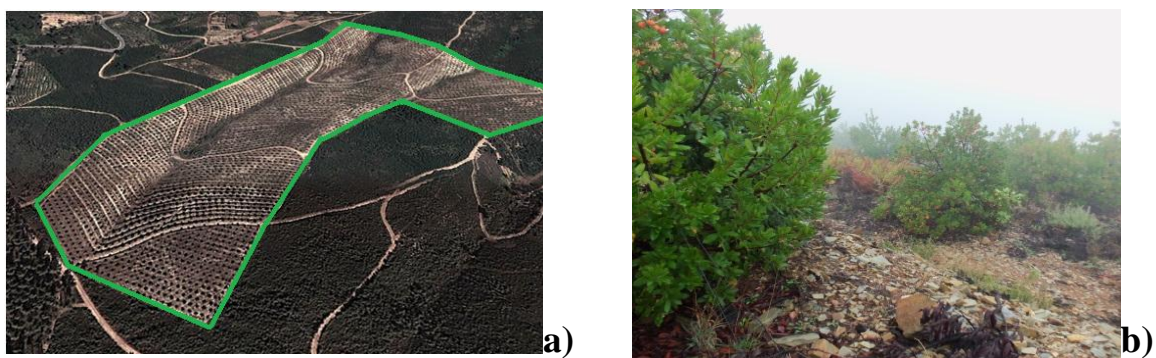
Paralelamente a esta existência de consideráveis manchas de medronheiros espontâneos, na última década, em Portugal, tem-se assistido a um crescente investimento na conversão do medronheiro numa cultura *extremis* e com práticas culturais próximas de outras fruteiras. Neste contexto, as maiores plantações situam-se nas Serras de Monchique e do Caldeirão, no Algarve. No entanto, na Zona Centro do país a plantação de medronheiro está em expansão. Os concelhos de Oleiros e Pampilhosa da Serra são os que mais se expandiram na plantação de medronheiros, contando atualmente com 22 hectares e 25 hectares, respetivamente (Lagarto *et al.*, 2013).

Na freguesia de Sarzedas existe uma pequena exploração de cerca de 2,7 hectares de medronheiro, bem como em Proença-a-Nova com cerca de 2,10 hectares (Lagarto *et al.*, 2013).

Nos concelhos de Ansião e Figueiró dos Vinhos, não é possível contabilizar o número de hectares de plantação de medronheiro, pois os produtores não mostram interesse na sua plantação de modo intensivo, uma vez que o *Arbutus unedo* se encontra em estado selvagem, o que faz com que o medronheiro e seus subprodutos sejam desvalorizados (Lagarto *et al.*, 2013).

É no lugar de Perocabeço, freguesia de Estreito (Oleiros), que se localiza uma moderna plantação (Figura 5a), com cerca de 15 hectares e mais de seis mil árvores plantadas em curvas de nível num terreno de encosta. Dada a natureza ácida dos

terrenos e a pouca espessura efetiva da camada superficial destes solos de xisto (Figura 5b), a fertilização de fundo incorporou os adubos e corretivos considerados indicados, proporcionando as operações de plantação (DRAPC, 2011). Foi nesta plantação que se realizou a colheita do fruto de medronheiro para concretização deste trabalho.



**Figura 5** – Plantação de medronheiro no Estreito. a) Fotografia de satélite da zona de colheita no Estreito (obtida de: Google Earth, 2013); b) Aspeto do solo e plantio de medronheiro no Estreito (cedida por: Goreti Botelho).

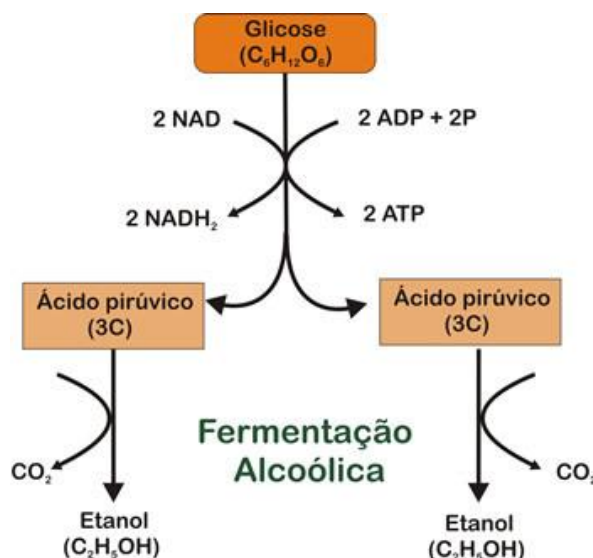
## 4. Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é um processo bioenergético, conduzido por microrganismos, subjacentes ao fabrico de bebidas alcoólicas, pão, leites fermentados e outros produtos utilizados na alimentação humana (Walker, 2000).

Na fermentação alcoólica a fonte de energia e dador inicial de eletrões é um açúcar simples e o recetor é o acetaldeído, sendo os produtos finais o etanol e o dióxido de carbono. A glucose é, em geral, o ponto de partida das principais vias de catabolismo celular. Numa primeira fase, a glucose é convertida em ácido pirúvico com a concomitante produção de ATP, numa sequência de reações químicas catalisadas enzimaticamente, designada por glicólise (Ribéreau-Gayon, 2006; Walker, 2000).

A glicólise fornece energia, precursores metabólicos e poder redutor para outras vias biossintéticas. Por outro lado, durante a fermentação alcoólica o piruvato é descarboxilado por ação da enzima piruvato descarboxilase a acetaldeído, o qual é reduzido a etanol, numa reação catalisada pela enzima álcool desidrogenase. Neste passo, ocorre a reoxidação da coenzima NADH a  $\text{NAD}^+$ . A regeneração da coenzima  $\text{NAD}^+$  é necessária para a manutenção do balanço redox das células e, sem ela, a glicólise não prosseguiria. Desta forma, os produtos finais mais importantes da fermentação alcoólica são o etanol e o dióxido de carbono. Contudo, o glicerol pode também ser um produto importante desta fermentação, pois a sua produção é uma via alternativa de recuperação da coenzima  $\text{NAD}^+$  (Walker, 2000). Deve salientar-se que são conhecidos outros metabolitos produzidos em pequenas quantidades no decurso da fermentação alcoólica (álcool isoamílico, acetato de etilo, ácidos cítrico e succínico, entre outros). Estas substâncias variam, dependendo das estirpes e das condições de fermentação, sendo muito importantes no desenvolvimento do flavour de bebidas alcoólicas e outros produtos fermentados (Figura 6) (Walker, 2000).

A fermentação alcoólica é levada a cabo por microrganismos que existem no solo, ar, plantas, superfícies de frutos e alimentos (Madigan *et al.*, 1997). As espécies mais comuns associadas a este processo são leveduras, sendo a mais conhecida, *Saccharomyces cerevisiae*, devido ao seu papel na produção de pão, vinho e cerveja. Esta levedura tem também associada a sua capacidade de produção de compostos voláteis, pois é isolada de fermentados de cana-de-açúcar destinadas à produção de aguardente (Oliveira *et al.*, 2005).



**Figura 6** - Esquema do processo de fermentação alcoólica (Adaptado de: Cardoso *et al.*, 2005).

A fermentação de frutos destinada à produção de bebidas alcoólicas, realiza-se, em geral com base na microbiota existente nos frutos, existindo assim um risco da fermentação não se realizar da forma esperada, pois além das leveduras que produzem etanol, existem outras leveduras que podem deteriorar o fermentado. A deterioração de um fermentado pode ocorrer com a formação de flavours indesejados, formação de biofilmes ou turbidez dos fermentados. A presença de várias populações de leveduras resulta numa competição pela fonte de carbono, que se traduz numa relação do rendimento final em etanol e consequentemente levará à produção de excesso de compostos secundários (butanol, isobutanol, acetato de etilo, ácido acético, propanol, acetaldeído, entre outros) eventualmente responsáveis por alguns aromas indesejáveis (Fleet, 1993; Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Martorell *et al.*, 2007; Sangorrín *et al.*, 2007). Esta produção de compostos podem resultar em enormes prejuízos para os produtores a nível económico.

A microbiota presente na fermentação de medronho traduz-se em 15 espécies diferentes: *Aureobasidium pullulans*, *Candida apicola*, *Candida zemplinina*, *Cryptococcus tephrensis*, *Dothichiza pithyophila*, *Dioszegia zsoldii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia orientalis*, *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia fructicola*, *Pichia membranaefaciens*, *Rhodotorula nothofagi*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*; e três grupos de isolados do género: *Cryptococcus* sp., *Metschnikowia* sp. e *Sporidobolus* sp. (Santo, 2011).



A fermentação do medronho é realizada de uma forma artesanal, em fermentadores fechados, durante cerca de 30 a 40 dias. Os fatores que podem influenciar o tempo de fermentação são vários, tais como a temperatura ambiente, a humidade, a disponibilidade de oxigénio, o teor de açúcares, grau de maturação do fruto e a microbiota dos frutos (Cavaco *et al.*, 2007; Galego, 1995).

O modo de produção é diferente de produtor para produtor, dependendo dos fatores mencionados anteriormente incluindo a natureza dos recipientes utilizados e a quantidade de água adicionada no início da fermentação. A quantidade de água varia de produtor para produtor e depende também do estado do medronho, com mais ou menos humidade consoante houvesse ou não chuva na época de colheita (Galego, 1995). Ainda assim, Galego (1995) realizou estudos em que adicionou diferentes volumes de água no início da fermentação, no entanto, sem resultados claros de qual a quantidade ideal a adicionar ao medronho na pré-fermentação. Santo (2011) no seu trabalho usou a proporção de 5 Kg de medronho para cerca de 1,3 L de água (proporção realizada, em escala real, numa destilaria local da zona do Algarve).

Assim, o resultado final é uma serie de aguardentes de medronho com caraterísticas específicas de cada produtor. Por vezes essas caraterísticas traduzem-se em aromas desagradáveis e excesso de acidez (Cavaco *et al.*, 2007; Galego, 1995).

Durante a fermentação do medronho o mosto deve estar em anaerobiose, pois o contacto da massa em fermentação com oxigénio potencia o excesso de acetato de etilo (Versini *et al.*, 1995). Assim a abertura dos depósitos em fermentação deve ser uma prática muito bem controlada durante o processo fermentativo da massa de medronhos, e sobretudo, evitada na fase temporal entre o fim da fermentação e o processo de destilação.

## 5. Destilação

A destilação é o processo pelo qual uma mistura (líquido ou vapor) é separada em duas correntes de composição diferente: uma de menor ponto de ebulição rica nos componentes mais leves e mais voláteis, denominada de destilado, e outra de maior ponto de ebulição rica nos componentes mais pesados e menos voláteis, o resíduo, por fornecimento ou remoção de calor (Berglund, 2004).

A destilação baseia-se no fato de que quando se processa a vaporização parcial de uma mistura (aquecendo-a até à ebulição), produz-se um vapor mais rico nos componentes de menor ponto de ebulição em relação à mistura inicial (alimentação), enquanto o líquido, que em cada instante ainda se mantém no recipiente, vai ficando cada vez mais rico nos componentes menos voláteis, de maior ponto de ebulição (Berglund, 2004).

A separação por destilação só é possível se os diferentes componentes da mistura a separar tiverem volatilidades diferentes ou seja, pontos de ebulição diferentes (Berglund, 2004).

Na destilação do fermentado da massa de medronho são recolhidas três frações do destilado. A primeira fração corresponde à cabeça (é uma fração de destilado rica em acetato de etilo), a segunda fração corresponde ao coração (é a parte importante da destilação pois constitui a aguardente para consumo) e a terceira parte corresponde à cauda ou frouxo (um destilado com menor grau alcoólico) (Cantagrel *et al.*, 1990; Galego, 1995; Soufleros e Bertrand, 1990).

### 5.1. Alambique

O alambique é um equipamento de destilação. Foi utilizado desde tempos remotos, encontrando-se frequentemente relacionado com a alquimia. Embora os Egípcios fossem os primeiros povos a construir utensílios semelhantes a alambiques, cujos desenhos adornam um velho Templo de Mênfis, foi da língua Árabe que nasceram os termos alambique (“al ambic”) e álcool (“al cóhol”) significando, o primeiro, vaso destilatório, e o segundo, embora querendo designar um pó muito duro à base de chumbo ou antimónio, exprime a ideia de ténue e subtil, significando vapores e destilação. O alambique foi desenvolvido no ano de 800 depois de Cristo, pelo Alquimista Árabe Jabir ibn Hayyan. A palavra alambique derivou do significado

metafórico de “algo que refina; que transmuta”, mediante a destilação (Lusian Cooppers).

Nas destilarias mais antigas a destilação é realizada em alambiques de cobre com aquecimento direto resultante da queima de lenha. Nas destilarias mais recentes os alambiques são de inox e possuem um banho de parafina. O aquecimento é realizado de forma indireta recorrendo à energia elétrica. O destilado obtido tem um grau alcoólico entre os 40 e 50% vol., podendo ser comercializado diretamente ou envelhecido em cascos de carvalho, durante alguns anos de modo a valorizar o produto (Galego, 1995).

O alambique Charantais (Figura 7) é composto de caldeira ou cucúrbita, cabeça ou capitel, e refrigerante, incluindo a serpentina e um recipiente onde circula a água que vai refrigerar a mesma. A união da cabeça com a serpentina é feita com o pescoço de cisne (Galego e Almeida, 2007).

A cabeça é feita em aço inox incorporada em toda a estrutura de cobre, para que o teor em cobre nos destilados seja menor. Entre a cabeça e a caldeira existe um filtro que pode ser preenchido com carbonato de cálcio, quando se pretende atenuar a acidez da aguardente, ou em carvão natural ativado quando se deseja subtrair parte do aroma caraterístico do destilado (Galego e Almeida, 2007).



**Figura 7** - Alambique Charantais existente na ESAC.

## 6. Aguardente de medronho

A aguardente de medronho é obtida a partir da destilação dos frutos fermentados do medronheiro (*Arbutus unedo* L.). Esta bebida foi reconhecida pela comunidade Europeia desde 1989 (Regulamento (CEE) n.º 1576/89). Em Portugal é produzida em algumas zonas da Serra Algarvia de onde é característica, Baixo Alentejo, Buçaco, Serra da Estrela e Oleiros.

O Decreto-Lei n.º 238/2000 define a aguardente de medronho no Art.º 2 “*entende-se por aguardente de medronho a aguardente de frutos obtida exclusivamente por fermentação alcoólica e destilação do fruto carnudo do Arbutus unedo L. ou do seu respetivo mosto*” e as suas características são descritas no Art.º 3 n.º 2 – “*Na aguardente de medronho o teor máximo admissível de cobre é de 15mg/l*”. No anexo que se refere ao artigo 2 encontram-se as restantes características (Tabela 4).

A comercialização desta bebida depende do cumprimento dos limites indicados no Decreto-Lei n.º 238/2000 de 26 de setembro de 2000 e do Regulamento (CE) n.º 110/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 15 de janeiro de 2008, da União Europeia.

O fabrico de aguardente de medronhos é também conhecido noutros países como na Grécia, onde é apelidado de *Koumaro* (termo grego para designar medronho), no sul de Itália, apelidado de *Corbezzolo* e na Turquia (Alberti *et al.*, 2007; Soufleros *et al.*, 2005).

O início da produção deste destilado na zona centro, não é conhecido, mas no livro “Memórias da Vila de Oleiros e do seu concelho” o autor refere que na freguesia de Madeirã, nos anos 1856 e 1857, a aguardente de medronho foi a principal riqueza (Pimentel, 1881).

Na Região Centro, presentemente, existem apenas dois produtores de aguardente de medronho, devidamente legalizados, a empresa SILVAPA, localizada na Madeirã, freguesia do concelho de Oleiros, e a Quinta do Espinho, Sociedade de Agricultura Biológica e Produtos Naturais, Lda. situada no lugar de Barriosa, no concelho de Seia.

**Tabela 4** - Especificações dos parâmetros físico-químicos e organoléticos para a comercialização da aguardente de medronho (Anexo do artigo 3º do Decreto-Lei n.º 238/2000 de 26 de Setembro de 2000).

Parâmetros	Especificações
Características organoléticas	Aspeto – Límpido.
	Cor – Incolor; Topázio (no caso de aguardente velha).
	Aroma – a medronho e etéreo.
	Sabor – a medronho e alcoólico.
Título alcoométrico a 20% em volume	$\geq 42$ (g/hl de álcool a 100% vol.)
Extrato seco	$< 20$ g/hl
Acidez Total (em ácido acético)	$\leq 200$ (g/hl de álcool a 100% vol.)
Substâncias voláteis (*)	$\geq 200$ (g/hl de álcool a 100% vol.)
Etanal	$\geq 5 \leq 40$ (g/hl de álcool a 100% vol.)
Acetato de Etilo	$\leq 300$ (g/hl de álcool a 100% vol.)
Metanol	$\geq 500 \leq 1000$ (g/hl de álcool a 100% vol.)
2-Butanol	$\leq 2$ (g/hl de álcool a 100% vol.)
1-Propanol	$\geq 10 \leq 40$ (g/hl de álcool a 100% vol.)
Isobutanol	$\geq 30 \leq 70$ (g/hl de álcool a 100% vol.)
1-Butanol	$\leq 3$ (g/hl de álcool a 100% vol.)
Isopentanóis	$\geq 80 \leq 185$ (g/hl de álcool a 100% vol.)
Álcoois superiores totais	$\geq 130 \leq 300$ (g/hl de álcool a 100% vol.)
Isobutanol/propanol	$\geq 1,5 \leq 4$ (g/hl de álcool a 100% vol.)

(\*) Não incluem os álcoois etílico e metílico, de acordo com a definição constante da alínea k) do nº 3 do artigo 1.º do Regulamento (CEE) n.º 1576/89, do conselho de 29 de Maio.

A aguardente de medronho é utilizada ainda para temperos de carnes, na confeção de molhos, na preparação de algumas compotas e cocktails (Galego, 2006).

## 7. Compostos voláteis

Durante os processos fermentativos, as leveduras presentes sintetizam diversos compostos voláteis, responsáveis pelo flavour das bebidas alcoólicas. A atividade das leveduras durante a fermentação transforma o açúcar em etanol, mas também ocorre a formação de outros metabolitos como álcoois superiores, ácidos gordos e ésteres, relacionados com os diferentes géneros e espécies de leveduras envolvidos nos processos e com as condições em que decorrem (temperatura, pH, presença de oxigénio assim como a natureza e concentração do substrato). A nível de características organoléticas é possível distinguir uma bebida alcoólica, quanto ao seu flavour, pois a variação entre os metabolitos confere-lhe uma “identidade” própria. A presença de compostos orgânicos voláteis e não voláteis nas bebidas fermentadas e destiladas permite avaliar qualitativamente as mesmas (Domizio *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2003; Querol e Fleet, 2006). A Tabela 5 apresenta a estrutura química dos compostos voláteis, a seguir mencionados.

**Teor Alcoólico:** O etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) é um álcool, resultante normalmente do processo fermentativo de açúcares, realizado por leveduras, sendo este o maior responsável pelo grau alcoólico de um fermentado e pela sua conservação (Fleet, 1993; Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Martorell *et al.*, 2007; Sangorrin *et al.*, 2007). Nas bebidas destiladas de frutos e de acordo com o Regulamento (CE) n.º 110/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho o teor alcoólico é de pelo menos 37,5 % vol. O teor alcoólico mínimo permitido para aguardente de medronho é de 42% vol. (Decreto-Lei n.º 238/2000).

**Etanal:** O etanal, também denominado por acetaldeído, é produzido pelas leveduras principalmente durante os primeiros estágios da fermentação alcoólica, diminuindo a sua presença gradualmente até ao estágio final, pela oxidação do ácido acético. (Cardoso, 2006). A presença de oxigénio favorece também a formação de outros aldeídos, provenientes da oxidação de álcoois superiores, que por sua vez são gerados pela degradação parcial de aminoácidos (Nagato *et al.*, 2001).

**Acetato de Etilo:** No caso dos fermentados e das aguardentes existe um composto que é obtido por reações de esterificação entre o etanol e o ácido acético, o acetato de etilo (Vera-Guzmán *et al.*, 2010), o qual, quando em concentrações até 120 mg/100 ml de álcool puro contribui positivamente para o aroma do destilado (Versini *et al.*, 1995).

Concentrações superiores induzem nos fermentados o aroma característico a colas ou verniz, contribuindo negativamente para as características aromáticas do produto final (Vera-Guzmán *et al.*, 2010). A presença deste composto pode ser um indicador de contaminação (leveduras formadoras de véu, ou bactérias do género *Glucanobacter*) ou de uma fermentação que não foi bem realizada devido ao contacto com o oxigénio e a problemas de higienização do material utilizado (Fleet, 1993; Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Martorell *et al.*, 2007; Sangorrin *et al.*, 2007). No caso dos fermentados de medronho, o excesso de acetato de etilo é potenciado principalmente, pelo contacto entre a massa em fermentação e o oxigénio (Versini *et al.*, 1995). O acetato de etilo é um composto volátil característico da “cabeça” do destilado (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

**Metanol:** O metanol, conhecido também como álcool metílico é composto por um átomo de carbono, três átomos de hidrogénio e um grupo hidroxilo ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), é um álcool oriundo da mesma família do etanol. O metanol tem origem na desmetilação de substâncias pécticas presentes no fruto (Blindler e Laugel, 1992; Soufleros *et al.*, 2005). A concentração de metanol aumenta com o tempo de destilação (Soufleros *et al.*, 2005).

O metanol é um dos compostos voláteis, que tem merecido particular atenção devido à sua toxicidade. De fato, trata-se de uma substância neurotóxica para o ser humano, afetando especialmente a retina, tendo sido detetadas várias situações de intoxicação por metanol, associado ao consumo de bebidas alcoólicas adulteradas e com teores elevados deste álcool (Paine e Dayan, 2001). Alguns autores consideram que o consumo de 20 mL de metanol pode provocar cegueira e que 60 mL constitui a dose letal (Blindler *et al.*, 1988; Gosselin *et al.*, 1976).

**Tabela 5** - Estrutura química dos compostos voláteis presentes na aguardente de medronhos que apresentam limites legais (IUPAC, 1993).

Composto	Estrutura química
Metanol	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\   \\ \text{H} \end{array}$
Etanol	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\   \quad   \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\   \quad   \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$
Etanal (acetaldeído)	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\   \quad // \\ \text{H}-\text{C}-\text{C} \\   \quad \backslash \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$
Acetato de Etilo	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad // \quad   \quad \diagup \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{C}-\text{H} \\ \diagup \quad \diagdown \quad   \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \end{array}$
2-butanol	$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3 \end{array}$
1-propanol	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\   \quad   \quad   \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\   \quad   \quad   \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \end{array}$
2-metil-1-propanol (Isobutanol)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OH} \end{array}$
1-butanol	$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$
Isopentanóis	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} \end{array}$

**Álcoois superiores:** Os principais álcoois superiores encontrados nas bebidas destiladas são: 2-butanol; 1-propanol; isobutanol (2-metil-1-propanol), 1-butanol e isopentanóis (2+3-metil-1-butanol). A importância destes compostos deve-se ao seu odor característico, e também à sua ação solvente sobre outras substâncias aromáticas que interferem com o grau de volatilidade (Fleet, 1993).

A formação de álcoois superiores durante a fermentação é influenciada por vários fatores tais como pH, temperatura, aeração do mosto, composição do meio (concentrações de açúcares, compostos nitrogenados) e linhagem de levedura. A



formação de álcoois superiores é tanto maior quanto mais demorada for a fermentação (Yokota, 1995).

## 8. Antioxidantes

Os antioxidantes têm uma longa história de uso na alimentação/saúde da população e na indústria alimentar (Finley *et al.*, 2011), sendo usados como conservantes em diversos produtos (como por exemplo: gorduras, produtos alimentares, para retardar o desenvolvimento de ranço) (Huang *et al.*, 2005).

Um antioxidante é, por definição, qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações relativamente às dos potenciais substratos oxidáveis, atrasa significativamente, ou inibe, a oxidação desses substratos por espécies reativas de oxigénio (ROS) (Ferreira *et al.*, 2007; Halliwell, 1990).

As espécies reativas de oxigénio (ROS) incluem radicais livres tais como o anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ) e radical peróxido ( $ROO^{\bullet}$ ), e espécies não radicalares, nomeadamente oxigénio singleto ( $^1O_2$ ), ozono ( $O_3$ ), peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) e podem ser geradas durante a redução do oxigénio a água (Caballero *et al.*, 2005).

Um radical livre pode ser definido como uma molécula ou fragmento de molécula que contém um ou mais eletrões desemparelhados em orbitais moleculares ou atómicas, e é capaz de existir de modo independente. A ocorrência de um eletrão desemparelhado resulta numa grande reatividade e num tempo de semivida curto, isto porque estas espécies têm afinidade para ceder ou receber um eletrão, de modo a tornarem-se estáveis (Benzie e Wachtel-Galor, 2011).

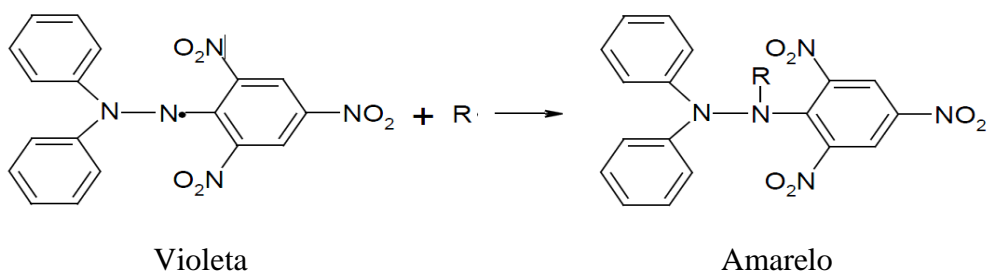
A produção excessiva de espécies reativas ou a diminuição dos níveis de antioxidantes conduzem ao stresse oxidativo, ou seja à alteração do equilíbrio oxidante/antioxidante em favor do primeiro, o qual tem sido implicado na etiologia de várias doenças e no envelhecimento (Almeida, 2009).

A atividade antioxidante é um parâmetro amplamente utilizado para caraterizar diferentes matrizes como por exemplo os vegetais, vinhos, óleos e chás. Vários estudos indicam que a atividade antioxidante da aguardente pode ter efeitos benéficos na saúde. Duriez *et al.* (2001), num estudo *in vivo*, verificaram que após a ingestão de Cognac, a concentração de ácidos fenólicos, e de ácido elágico em particular, aumentou no plasma sanguíneo, e consequentemente, a capacidade antioxidante aumentou. Umar *et al.* (2003), analisaram o efeito do Armagnac administrado a ratos sobre a trombose arteriovenosa, e observaram uma diminuição da agregação plaquetária, e por sua vez, uma diminuição da ocorrência de trombozes. Para suporte dos resultados obtidos, Umar

*et al.* (2005), compararam os efeitos do consumo de pequenas quantidades de Armagnac e de vodka em humanos e detetaram uma diminuição mais significativa da agregação plaquetária durante e após o consumo de Armagnac, comparativamente com o consumo de vodka. Estes estudos indicam que, não é só o fator etanol que tem um efeito benéfico e protetor relativamente à agregação plaquetária e à trombose, mas que existe um sinergismo com os compostos fenólicos, em especial o ácido elágico.

Inúmeros métodos são utilizados na medição desta atividade sendo os preferidos, pela facilidade, rapidez e sensibilidade, aqueles com compostos cromogéneos de natureza radicalar que simulam espécies de oxigénio reativas tais como DPPH<sup>•</sup> (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) e ABTS<sup>+</sup> (2,2'-Azinobis-3-etilbenzotiozolino-6-sulfónico) (Arnao, 2000).

O método da atividade bloqueadora do radical DPPH é usado regularmente para avaliar a capacidade das espécies antioxidantes para sequestrar radicais livres. O radical DPPH é um composto comercialmente disponível e que apresenta cor púrpura (Ali *et al.*, 2008). É um radical azotado orgânico estável, que na presença da substância (antioxidante) pode doar um átomo de hidrogénio, que pode ser reduzido em meio alcoólico, dando origem à forma reduzida do radical (molécula de 2,2-difenil-1-picrilhidrazina) (Koleva *et al.*, 2002). Após a redução, a cor da solução do radical DPPH desvanece para amarelo (Figura 8), podendo esta alteração ser monitorizada no máximo de absorção entre 517-520 nm (Hassas-Roudsari *et al.*, 2009). Assim, quanto mais rapidamente decrescer a absorvência, maior será a atividade antioxidante do extrato em estudo, ou seja, os compostos testados com elevada atividade antioxidante induzem num rápido declínio da absorvência do radical DPPH (Amarowicz *et al.*, 2004; Bondet *et al.*, 1997).



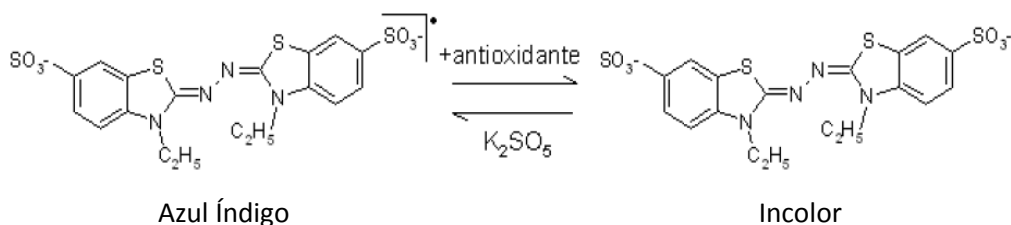
**Figura 8** – Estabilização do radical livre DPPH (Oliveira *et al.*, 2009).

O método da atividade bloqueadora do radical DPPH é um método rápido, de baixo custo por utilizar reagentes acessíveis e por não necessitar de equipamentos sofisticados (Viuda-Martos *et al.*, 2009). Além disso, o ensaio é efetuado à temperatura ambiente, eliminando o risco de degradação térmica de algumas substâncias analisadas (Bondet *et al.*, 1997; Molyneux, 2004).

A determinação da atividade antioxidante com a utilização de ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) é também muito frequente, e foi primeiramente sugerido por Miller *et al.* (1993) em testes de amostras biológicas. Assim como o DPPH, o  $\text{ABTS}^+$  apresenta excelente estabilidade em determinadas condições de análise. Porém estes radicais apresentam algumas diferenças importantes. O radical DPPH já vem pronto para o uso e é solúvel em solventes orgânicos, enquanto o  $\text{ABTS}^+$  necessita ser reproduzido antes por reações químicas (como o persulfato de potássio) ou enzimáticas, e, é solúvel tanto em água como em solventes orgânicos, permitindo a análise tanto de amostras hidrofílicas como lipofílicas (Arnao, 2000).

Por meio da adição do persulfato de potássio, ocorre a formação do radical ABTS, que apresenta cor esverdeada. Na medida em que o antioxidante é misturado com esse radical, ocorre a redução do  $\text{ABTS}^+$  a ABTS, provocando a diminuição da coloração do meio de reação (Figura 9). O  $\text{ABTS}^+$  é um radical estável na ausência de antioxidantes, apresenta forte absorção no intervalo de 600-750nm e pode ser facilmente determinado por espectrofotometria.

Uma das vantagens do método é sua relativa simplicidade, o que permite a sua aplicação em análises laboratoriais de rotina. Além disso, oferece vários máximos de absorção e uma boa solubilidade (Roginsky e Lissi, 2005).



**Figura 9** - Estabilização do radical  $\text{ABTS}^+$  por um antioxidante e sua formação por persulfato de potássio (Huang *et al.*, 2005)

## 8.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos têm diversos efeitos biológicos, incluindo a atividade antioxidante. Vários estudos demonstram que ácidos fenólicos, tais como o ácido gálico e ácido elágico têm elevada capacidade antioxidante (Goldberg *et al.*, 1999; Priyadarsini *et al.*, 2002; Sroka e Cisowski, 2003; Vinson *et al.*, 2001), enquanto outros enfatizam o papel dos taninos hidrolisáveis, como por exemplo: Da Porto *et al.* (2000) e Mullen *et al.* (2002). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos depende da sua estrutura química, concentração e estado químico de oxidação (Canas *et al.*, 2008).

Vários estudos têm demonstrado que ao consumo de alimentos e bebidas ricas em compostos fenólicos está associada a diminuição de doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e mortalidade por cancro (Umar *et al.*, 2003).

O Armagnac (conhaque francês) e outras aguardentes envelhecidas são ricos em compostos fenólicos, devido à sua maturação em barris de madeira (Canas, 2003; Viriot *et al.*, 1993).

Atendendo a que a atividade antioxidante está estreitamente relacionada com o teor de compostos fenólicos, é pois expectável que a atividade antioxidante da aguardente seja condicionada pelos fatores que determinam a composição fenólica, designadamente: a espécie botânica da madeira (Belchior *et al.*, 2001), o nível de queima da vasilha (Casanova, 2007; Patrício *et al.*, 2005; Mosedale e Puech, 1998; Quaresma, 2000) e o tempo de envelhecimento (Caldeira *et al.*, 2006; Canas *et al.*, 1999; Belchior *et al.*, 2001).

Em relação ao uso de determinadas espécies botânicas de madeira, vários estudos demonstraram diferenças significativas na composição fenólica entre aguardentes envelhecidas em vasilhas de castanheiro e vasilhas de carvalho, em que a composição fenólica é 15 vezes menos em aguardentes envelhecidas em vasilhas de carvalho (Belchior *et al.*, 2001; Canas *et al.*, 1999; Canas *et al.*, 2008). Com o aumento da temperatura na queima da vasilha ocorre a clivagem oxidativa dos aldeídos cinâmicos e formam-se aldeídos benzóicos em grande quantidade (vanilina e siringaldeído) e os correspondentes ácidos fenólicos (Canas 2003; Canas *et al.*, 2002; Sarni *et al.*, 1991). Excetuando os estudos desenvolvidos em Portugal, por Canas e seus colaboradores, na Unidade de Investigação de Viticultura e Enologia do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária I.P., (localizada em Dois Portos), sobre a atividade antioxidante em aguardentes vínicas, envelhecidas em madeira (tipo Brandy), desconhece-se a

existência de estudos em aguardentes de medronho, envelhecidas ou não, pelo que, neste trabalho, este estudo será realizado.

## **9. Procedimento experimental**

### **9.1. Determinação do grau de maturação do fruto de medronheiro (*Arbutus unedo* L.)**

Os medronhos em fresco foram separados em três recipientes de acordo com a sua cor, e codificados do seguinte modo: medronhos A (frutos vermelhos - frutos maduros), medronhos B (fase intermedia da maturação do fruto) e medronhos C (frutos louros ou imaturos). Os medronhos foram colocados no laboratório, expostos ao ar, durante 21 dias.

#### **9.1.1. Avaliação da precisão do colorímetro**

Para determinar a precisão do aparelho calibrou-se o colorímetro (Zhejiang Top Instrument Co. Ltd., modelo HP-2132) usando padrão vermelho (CR-A47  $x=480$ ;  $y=15,3$ ;  $z=313$ ) e posteriormente mediu-se a cor do mesmo padrão em intervalos de 10 segundos, 30 vezes, e calculou-se o desvio padrão de  $\Delta E$  (TECNAL Equipamentos para Laboratórios, 2009).

#### **9.1.2. Determinação da temperatura e humidade do ar do laboratório**

A humidade e a temperatura foram medidas com um higrómetro (Satto, modelo Sk-L200TH) em intervalos de 15 em 15 segundos (Santos *et al*, 2013b).

#### **9.1.3. Determinação do teor de sólidos solúveis totais (°Brix)**

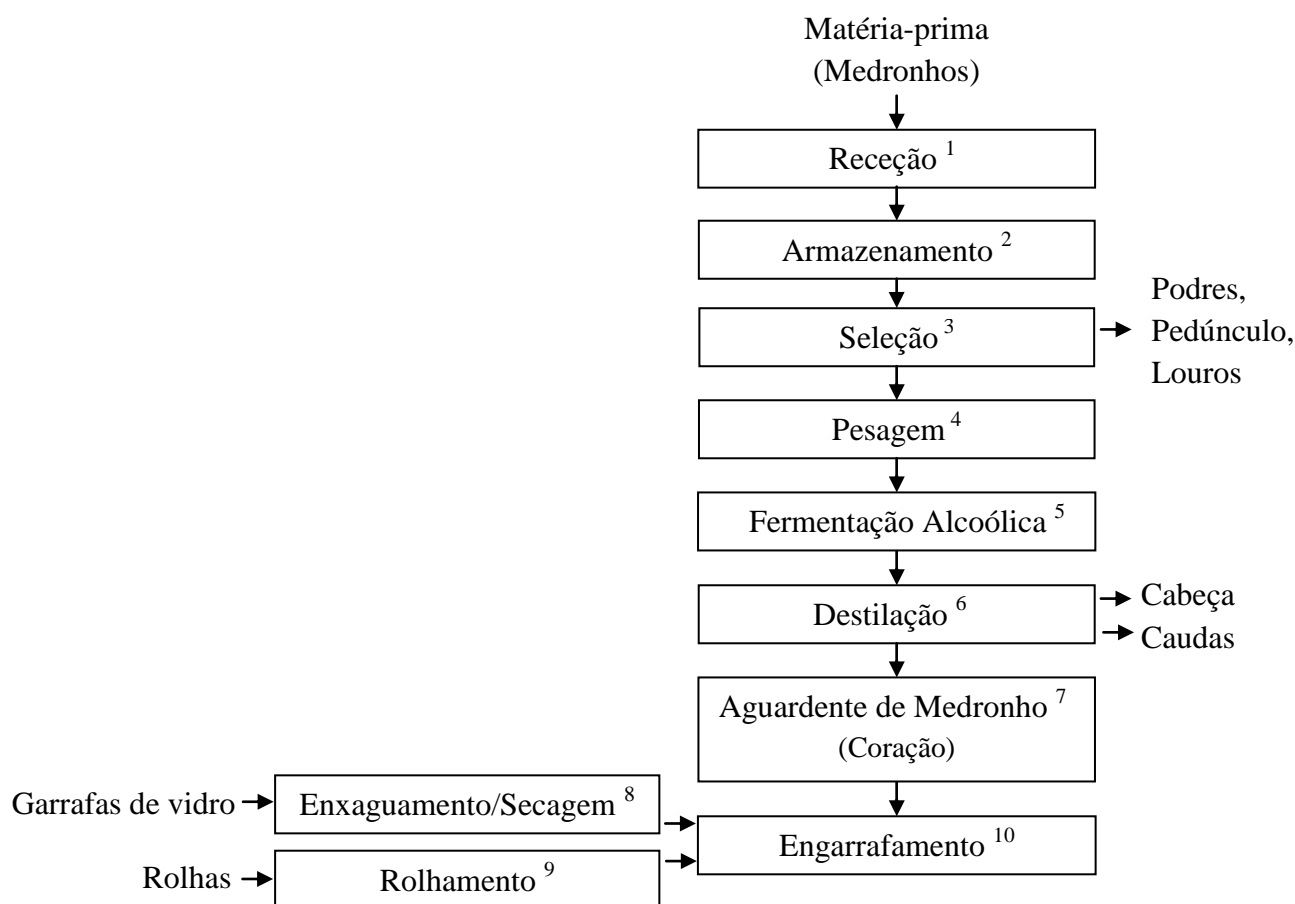
Colocou-se 2 gota de sumo do medronho filtrada no centro do prisma principal do refratómetro portátil (ATAGO, modelo FG-113) e fez-se a leitura do °Brix. Esta determinação foi realizada de 2 em 2 dias, durante 21 dias (Santos *et al*, 2013b).

#### **9.1.4. Determinação da cor do medronho (refração $L^*$ , $a^*$ e $b^*$ )**

Utilizando o colorímetro (Zhejiang Top Instrument Co. Ltd., modelo HP-2132) procedeu-se, de acordo com as especificações do aparelho, à calibração deste antes da sua utilização, com o padrão vermelho (CR-A47  $x=480$ ;  $y=15,3$ ;  $z=313$ ). Colocou-se a amostra no porta amostras e mediu-se a refração  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  no espaço CIE. As medições da cor foram realizadas diariamente durante 21 dias (Santos *et al.*, 2013b).

## 9.2. Produção de aguardente de medronho

O processo de produção de aguardente de medronho foi realizado segundo o fluxograma apresentado na figura 10.



**Figura 10** - Fluxograma de produção de aguardente de medronho



### 9.2.1. Descrição das etapas de produção de aguardente de medronho

**Colheita** - O trabalho prático iniciou-se com a colheita dos medronhos, no Estreito - Oleiros, onde foram colhidos 8 kg de medronhos, diretamente dos arbustos *Arbutus unedo* L. (Figura 11a). Foram também apanhados, no mesmo dia, 8 kg de medronhos maduros, que se encontravam caídos numa rede, após a sua queda natural, situada por baixo do medronheiro (Figura 11b). Esta rede serve para aparar os medronhos quando estes se desprendem naturalmente do medronheiro possibilitando o aproveitamento de todos os frutos, que ficam assim livres de sujidade.



**Figura 11** - a) - *Arbutus unedo* L; b) – *Arbutus unedo* L. com rede na sua base.

Seguiram-se as várias etapas do processamento (ver figura 10), para a obtenção da aguardente de medronho:

**1 - Receção** - Após a colheita os medronhos foram transportados em baldes de plástico para as instalações do Laboratório de Hortofrutícolas da Escola Superior Agrária de Coimbra.

**2 - Armazenamento** - Os medronhos foram armazenados na câmara frigorífica do laboratório de hortofrutícolas, onde permaneceram à temperatura de 6°C, até ao dia seguinte.

**3 - Seleção** - No dia seguinte à colheita foi efetuado o controlo visual dos frutos, por forma a não deixar passar medronhos louros (fruto imaturo), folhas e pedúnculos.

**4 - Pesagem** - Dos frutos colhidos da rede, dividiu-se o material para dois ensaios pesando-se 4 kg de fruto para cada balão Erlenmeyer, efetuou-se o mesmo

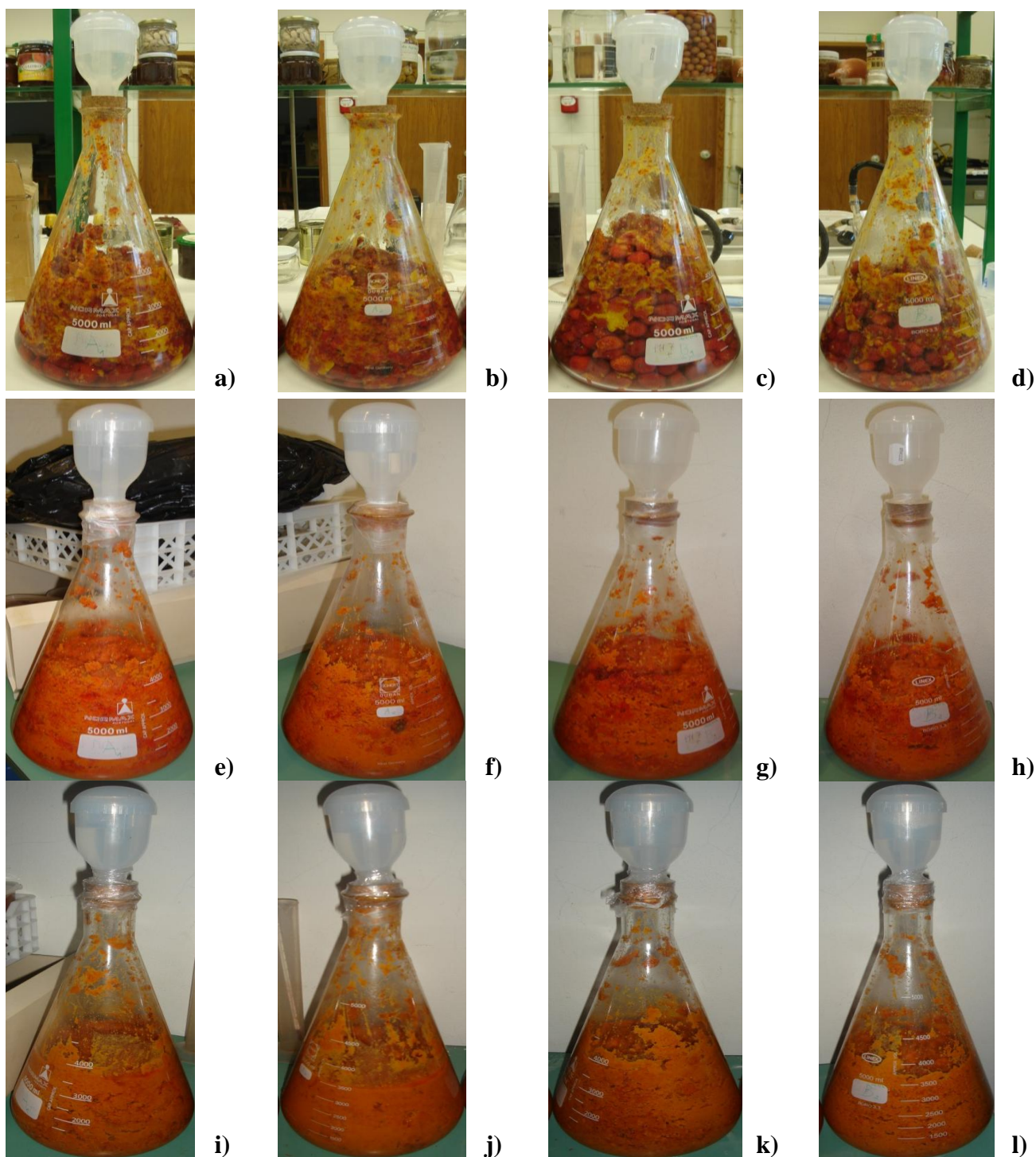
procedimento para os frutos colhidos dos medronheiros. A codificação das amostras encontra-se descrita na Tabela 6, sendo os resultados posteriormente apresentados com as letras A e B, em que A representa o valor médio entre A1 e A2 e B representa o valor médio entre B1 e B2.

**Tabela 6** – Codificação das amostras.

<b>Amostra</b>	<b>Código</b>
Frutos colhidos da rede	A1
Frutos colhidos da rede	A2
Frutos colhidos do medronheiro	B1
Frutos colhidos do medronheiro	B2

**5 - Fermentação alcoólica** – No final da pesagem do fruto colocaram-se os batoques de cortiça e as batoqueiras de plástico no Erlenmeyer e envolveu-se com parafilme. Durante o processo de fermentação foram realizadas as seguintes análises físico-químicas: pH, °Brix e temperatura. Os fermentadores foram colocados no laboratório à temperatura ambiente e cobertos com um plástico preto para proteger da luz, durante todo o tempo de fermentação.

A Figura 12 ilustra a evolução da fermentação dos medronhos durante o período de fermentação.



**Figura 12** - Fermentação do medronho ao longo do tempo, a) – Fermentado A1 no primeiro dia da fermentação; b) – Fermentado A2 no primeiro dia de fermentação; c) – Fermentado B1 no primeiro dia de fermentação; d) - Fermentado B2 no primeiro dia de fermentação; e) - Fermentado A1 ao fim de 10 dias de fermentação; f) - Fermentado A2 ao fim de 10 dias de fermentação; g) - Fermentado B1 ao fim de 10 dias de fermentação; h) - Fermentado B2 ao fim de 10 dias de fermentação i) - Fermentado A1 no último dia de fermentação; j) - Fermentado A2 no último dia de fermentação; k) - Fermentado B1 no último dia de fermentação; l) - Fermentado B2 no último dia de fermentação.

**6 - Destilação** - Após o tempo de fermentação procedeu-se à destilação. Nesta etapa foi utilizado o alambique de cobre Charantais de 16 L de capacidade. Colocou-se a massa de medronho fermentado na caldeira, onde foi aquecida até à fase de ebulição. A fração evaporada foi arrastada através do capitel para a serpentina (que se encontrava dentro de um recipiente onde circula água que vai refrigerar a mesma) onde condensou e deu origem à aguardente de medronho.

A primeira parte do destilado (cabeça), com um aroma forte e desagradável a acetato de etilo foi separada (40 ml), em seguida, recolheu-se o “coração” do destilado (aguardente) até atingir um teor alcoólico de 25% vol., por fim, recolheu-se a cauda até atingir o teor alcoólico de 20% vol.

**7 - Aguardente de medronho** - Obtenção da aguardente de medronho.

**8 - Enxaguamento/Secagem** - As garrafas utilizadas na etapa seguinte foram previamente lavadas com água destilada e secas.

**9 - Rolhamento** - As cápsulas de plástico utilizadas foram previamente lavadas com água destilada e depois de secas colocadas nas garrafas

**10 - Engarrafamento** - A aguardente foi transferida para as garrafas de vidro transparentes com capacidade de 375 mL.

### **9.3. Determinação dos parâmetros físico-químicos dos fermentados**

A temperatura, teor de resíduo seco solúvel (°Brix) e pH do fermentado A foi registada ao longo de 30 dias; os mesmos parâmetros foram avaliados para o fermentado B, ao longo de 34 dias. A acidez total foi medida somente no primeiro dia da fermentação, uma vez que é um método destrutivo de amostra. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

#### **9.3.1. Determinação do teor de sólidos solúveis totais (°Brix)**

O resíduo seco solúvel foi determinado de acordo com a Norma Portuguesa 785 (1985). Colocou-se 1 gota de amostra filtrada no centro do prisma principal do refratómetro portátil (ATAGO, modelo FG-113) e fez-se a leitura do °Brix.

#### **9.3.2. Determinação do pH**

A determinação do pH foi realizada utilizando um potenciómetro (Crison, modelo micropH 2002) acoplado a um eléctrodo de pH. Antes da determinação do valor de pH de cada amostra o aparelho foi calibrado utilizando duas soluções padrão, uma com pH 4 e outra com pH 7 (Santo, 2007).

#### **9.3.3. Monitorização das temperaturas ao longo do processo fermentativo**

A temperatura foi medida com um termómetro de vidro com escala graduada entre 0°C e 25°C, colocando o termómetro dentro do balão Erlenmeyer e posteriormente foi colocado o batoque de cortiça e batoqueira de plástico.

#### **9.3.4. Determinação da acidez total**

A acidez total foi determinada segundo a Norma Portuguesa 2139 (1987). Pesaram-se 10 g de massa de fermentado, adicionaram-se 50 mL de água destilada e procedeu-se à titulação com uma solução de NaOH 0,1 mol.dm<sup>3</sup>, utilizando como indicador, uma solução de fenolftaleína a 1 % m/v.

## **9.4. Análise das aguardentes de medronho**

### **9.4.1. Determinação do pH das aguardentes de medronho**

A determinação do pH foi realizada utilizando um potenciómetro (Crison, modelo micropH 2002) com um eléctrodo de pH, como descrito no ponto 9.3.2.

### **9.4.2. Determinação do grau alcoólico**

O título alcoométrico volúmico das aguardentes foi determinado por densimetria electrónica (OIV, 2009). Os resultados são arredondados às décimas e resultam da média aritmética das três leituras.

### **9.4.3. Doseamento dos compostos voláteis da aguardente de medronho**

A determinação de compostos voláteis foi executada no Laboratório de Enologia, da Unidade de Investigação de Viticultura e Enologia (Dois Portos, Torres Vedras). A quantificação dos compostos voláteis foi realizada por cromatografia gás-líquido de alta resolução, de acordo com a Norma Portuguesa 3263 (1990), utilizando um cromatógrafo (Focus GC, modelo Thermo Scientific; Figura 13) equipado com um detetor de ionização de chama DIC (250°C), injetor (200°C) a funcionar em modo de divisão e com coluna capilar de sílica de polietileno glicol (DB-WAX da J&W Scientific, modelo Folsom), 60m x 0,32mm com 0,25 µm de espessura de filme. O gás de arraste usado foi o hidrogénio (3,40 mL/min) e a razão de divisão de 1:6. A cada amostra de destilado (10 mL) adicionou-se 1 mL de padrão interno (4 metil-2-pentanol). O método de análise utilizado foi o da injeção direta de 2 µL de destilado. Todas as amostras foram analisadas em duplicado.



**Figura 13** – Cromatógrafo Focus GC (Cedida por: Dra. Ilda Caldeira).

## **9.5. Determinação de antioxidantes na aguardente de medronho**

### **9.5.1. Reagentes químicos**

Ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox); 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS); persulfato de potássio e reagente Folin-Ciocalteu foram obtidos na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Todos os reagentes utilizados tinham grau de pureza superior a 95%.

### **9.5.2. Capacidade antioxidante total utilizando ABTS**

Para determinar a capacidade antioxidante total foi usado o método descrito por Miller e Rice-Evans (1997), através da descoloração do radical catiónico 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico (ABTS), calculado a partir da diminuição da absorvância a 734 nm.

Prepararam-se duas soluções: uma solução de ABTS de  $7 \times 10^{-3}$  mol.dm<sup>-3</sup> e uma outra solução de  $2,45 \times 10^{-3}$  mol.dm<sup>-3</sup> de persulfato de potássio (K<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>). De seguida misturaram-se as duas soluções e colocaram-se a reagir no escuro, por um período de tempo nunca inferior a 16 horas, à temperatura ambiente. Para se conseguir obter uma absorvância no intervalo compreendido entre 0,680 e 0,720, adicionou-se água desionizada na quantidade adequada. A absorvância foi avaliada a um comprimento de onda de 734 nm utilizando um espectrofotómetro UV-Vis (DR LANCE, modelo Xion 500). Para avaliar a capacidade antioxidante das aguardentes, adicionou-se 1 mL de solução ABTS a 50 µL das aguardentes a testar, deixando-se reagir por 6 minutos e seguidamente mediu-se a absorvância. Simultaneamente foi feita uma reta de calibração com uma gama de concentrações Trolox (0 - 150 µmol; R<sup>2</sup> > 0,990) por forma a quantificar os resultados obtidos. Os resultados obtidos foram expressos em micromoles de equivalente de Trolox por mililitros de amostra (µmol TE/mL). Todos os ensaios foram realizados três vezes em triplicado.

### **9.5.3. Determinação de compostos fenólicos totais**

Os compostos fenólicos totais, foram estimados através de um ensaio colorimétrico com base em procedimentos descritos por Singleton e Rossi (1965). Misturou-se 50 µL de amostra com 300 µL de solução de carbonato de sódio a 17%. Depois de 30 segundos, adicionou-se 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Posteriormente manteve-se a mistura em banho a 40°C durante 30 minutos. A



absorvência foi avaliada a um comprimento de onda de 765 nm, usando um espectrofotometro UV-Vis (DR LANCE, modelo Xion 500). Para cada ensaio elaborou-se uma curva padrão com ácido gálico (0 - 20 µg;  $R^2 > 0.990$ ). Os resultados estão expressos em micromoles de equivalentes de ácido gálico por mililitro de amostra (µmol GAE/mL). Todos os ensaios foram realizados três vezes em triplicado.

## **9.6. Análise estatística**

A elaboração de gráficos foi realizado recorrendo ao programa informático da Microsoft Office Excel 2007 em ambiente Windows 7.

Para realizar a análise estatística dos dados obtidos na composição volátil das aguardentes de medronho, estes foram introduzidos numa base de dados, construída com a ajuda do software IBM SPSS 2.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

A análise estatística univariada (ANOVA one-way) foi aplicada com o objetivo de comparar os valores médios de pH, teor alcoólico e a concentração dos compostos voláteis (etanal, acetato de etilo, metanol, 1-propanol, isobutanol, isopentanois, álcoois superiores totais e a relação isobutanol/propanol) considerando como fator (variável independente) a origem dos medronhos: frutos colhidos do chão *versus* frutos colhidos do medronheiro.



## **10. Resultados e discussão**

### **10.1. Estudo da evolução da maturação dos medronhos na sua pós-colheita**

O estudo da evolução da maturação dos medronhos na sua pós-colheita permite fazer algumas considerações importantes como relacionar a evolução da cor do fruto com o seu teor de sólidos solúveis totais.

#### **10.1.1. Avaliação da precisão do colorímetro**

A precisão avalia a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (Guia RELACRE, 2000). Uma forma mais comum de expressar a precisão é por meio da repetibilidade.

Por definição, a repetibilidade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de uma mesma amostra (ou padrão), efetuadas sob as mesmas condições de medição, o mesmo procedimento de medição, o mesmo analista, o mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, no mesmo local e repetições num pequeno intervalo de tempo (Guia RELACRE, 2000). Assim, para avaliar a precisão do colorímetro fez-se o procedimento descrito em materiais e métodos, pela repetibilidade.

A determinação da precisão do colorímetro é feita através da repetibilidade, calculando o desvio padrão de  $\Delta E^*ab$ . Depois de uma larga pesquisa sobre como obter precisão para o colorímetro utilizado (Zhejiang Top Instrument Co), sem sucesso, fez-se a análise da repetibilidade com base nas especificações de um colorímetro de referência (KONICA MINOLTA, modelo CR-400 series - Anexo).

Para o colorímetro, usado no presente trabalho, obteve-se um desvio padrão de  $\Delta E^*ab = 0,07$ . O valor obtido para o desvio padrão de  $\Delta E^*ab$  é igual ao descrito nas características técnicas do colorímetro tomado como referência.

#### **10.1.2. Determinação da humidade e temperatura**

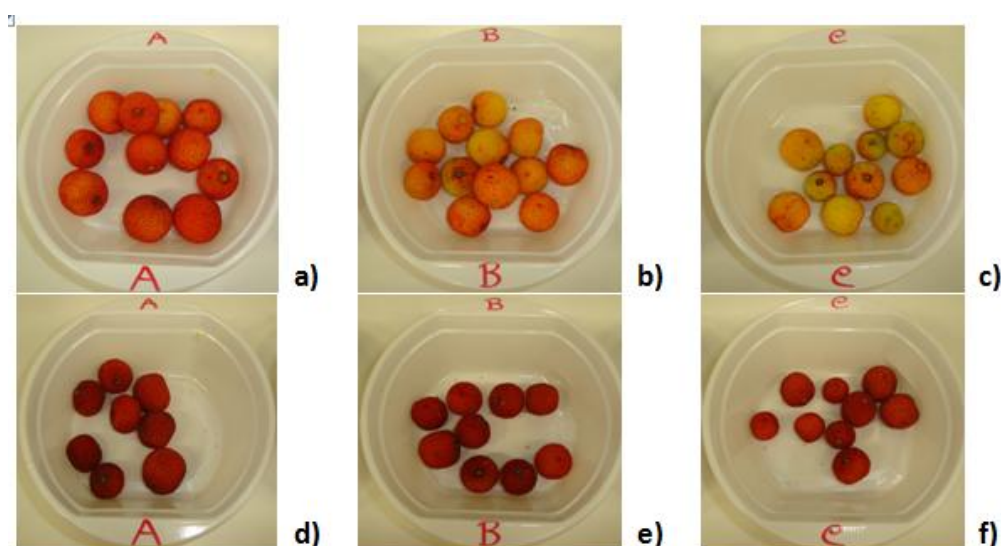
No laboratório onde se encontravam os medronhos A, B e C foi determinada a humidade e temperatura do ar (sob condições de luz natural). Num total de 1799 registos destes parâmetros, obtiveram-se os seguintes resultados: humidade relativa (HR) em % de  $58,2 \pm 9,4\%$ , em que no intervalo de tempo de estudo a HR mínima

registada foi de 28,1% e a HR máxima registada foi 74,8%; e a temperatura em graus Celsius (°C) de  $14,6 \pm 2,3^{\circ}\text{C}$ , em que a temperatura mínima registada foi de  $10,6^{\circ}\text{C}$  e a temperatura máxima registada foi de  $25,0^{\circ}\text{C}$ .

### 10.1.3. Avaliação da evolução da cor dos medronhos

A cor do fruto é um importante fator que permite determinar a sua maturação, afetando por isso a decisão de compra dos consumidores, é também um atributo de qualidade para as indústrias produtoras de fruto (Arias *et al.*, 2000).

Ao longo do tempo de estudo do grau de maturação foi registada a evolução da cor perceptível ao olho humano. Assim no primeiro dia do estudo (dia 0, corresponde ao dia da colheita e das primeiras análises) os medronhos apresentavam a cor observada na Figura 14 a), b) e c).



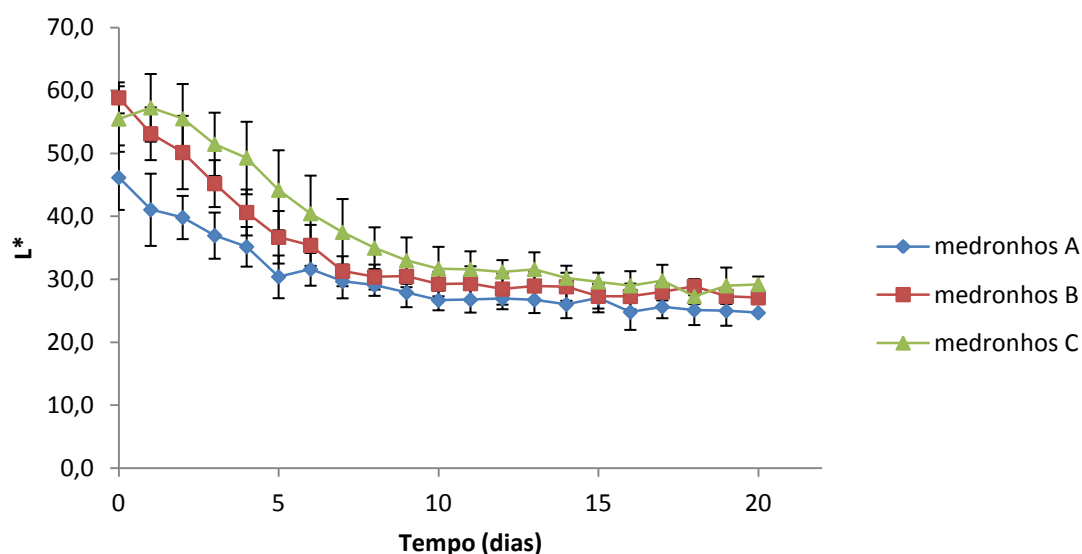
**Figura 14** - Evolução da cor do fruto. a) medronhos A no primeiro dia de estudo; b) medronhos B no primeiro dia de estudo; c) medronhos C no primeiro dia de estudo; d) medronhos A após 10 dias de estudo; e) medronhos B após 10 dias de estudo; f) medronhos C após 10 dias de estudo.

O colorímetro é dotado do sistema CIELAB, fornecendo os parâmetros deste sistema dados quantificáveis e precisos sobre a cor de frutas e vegetais *in natura* e processados (KONICA MINOLTA, 2003).

Os parâmetros, do sistema CIELAB, avaliados foram  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  e  $h^{\circ}$ .

Verificou-se que o valor  $L^*$  diminui nos estádios iniciais da maturação (fase verde) e depois, permaneceu constante refletindo o escurecimento dos medronhos pelo aparecimento e intensificação da cor vermelha (Figura 15). Ao longo dos 21 dias do

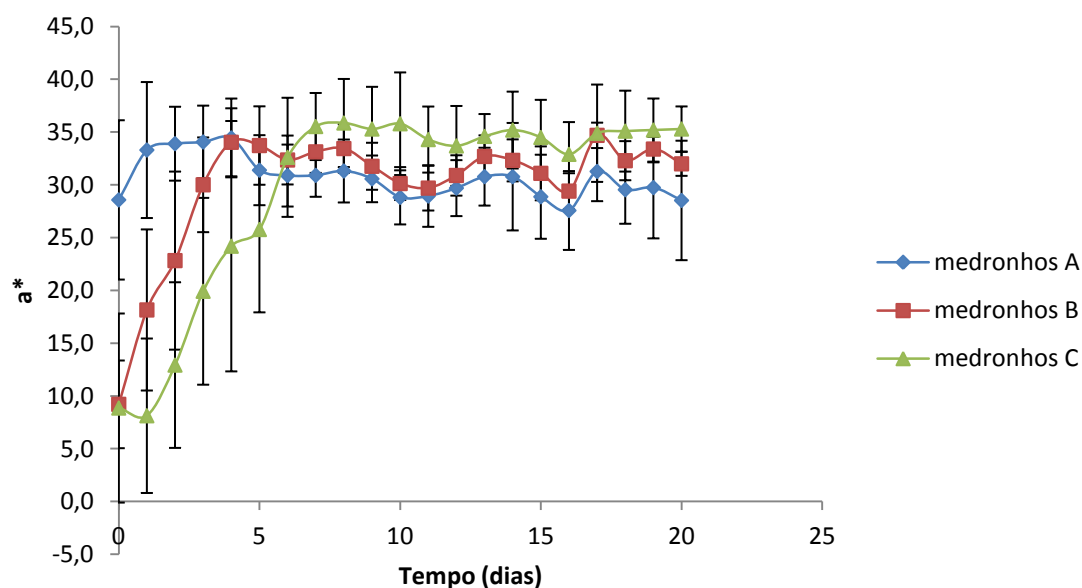
estudo, o valor  $L^*$  para: medronhos A varia entre 46,2 e 24,7; medronhos B varia entre 58,9 e 27,1; medronhos C varia entre 55,5 e 29,2.



**Figura 15** - Evolução do parâmetro  $L^*$ .

Os valores de luminosidade obtidos são semelhantes aos descritos por Jesus e Martins (1999) e Galego (1995) para amostras da região do Algarve ( $L^*$  entre 24,6 e 39,8). Estes valores são mais baixos que os obtidos os para amostras de medronho recolhidas na região de Lisboa – Tapada da Ajuda (Alarcão-E-Silva et al., 2001).

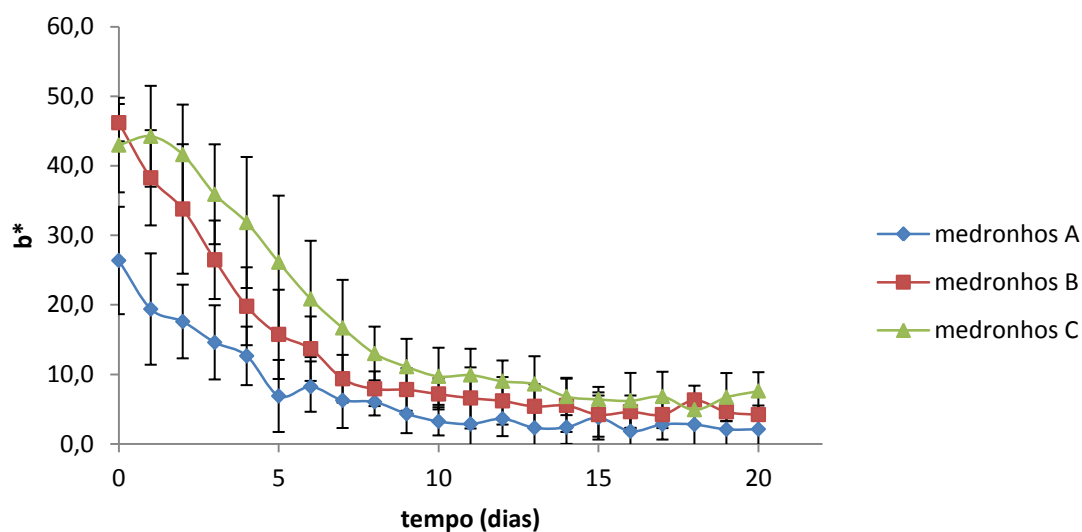
Na avaliação do parâmetro  $a^*$  observou-se um aumento acentuado deste parâmetro ao longo dos primeiros sete dias (Figura 16), como resultado da síntese de  $\beta$ -caroteno e degradação da clorofila, representada pela mudança de cor verde para vermelha (Abushita *et al.*, 2000). No intervalo de estudo seguinte o índice de saturação de vermelho sofreu pequenas oscilações.



**Figura 16** - Evolução do parâmetro  $a^*$ .

O mesmo comportamento pode-se verificar para outros frutos. Por exemplo, Ferrer *et al.* (2005) relataram que em pêssegos os valores de  $a^*$  aumentaram durante o período de maturação, denotando a perda da cor verde relacionada com o desaparecimento das clorofilas.

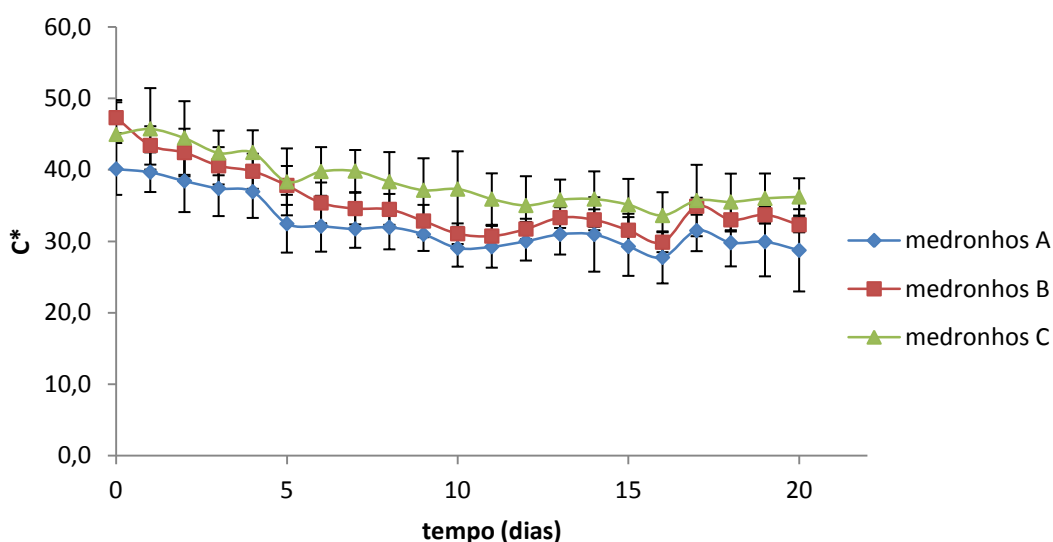
Ao longo do tempo de avaliação, do parâmetro  $b^*$ , verificou-se sempre a diminuição deste parâmetro (Figura 17). O valor obtido nos medronhos C (frutos imaturos), no primeiro dia (43,0), é próximo do valor encontrado (36,49) por Alarcão-E-Silva *et al.* (2001) para medronhos imaturos. Mas estes, quando maduros apresentam valores de  $b^*$  muito diferentes dos valores obtidos por Alarcão-E-Silva *et al.* (2001).



**Figura 17** - Evolução do parâmetro  $b^*$ .

No caso das amostras designadas como medronhos A (fruto maduro) os valores obtidos foram também muito diferentes dos referidos em Alarcão-E-Silva *et al.* (2001). Pelo contrário, em estudos da evolução da cor no tomate registou-se um aumento do contributo da cor amarelo (Brandt *et al.*, 2006; López-Camelo e Gómez, 2004; Palet, 2012).

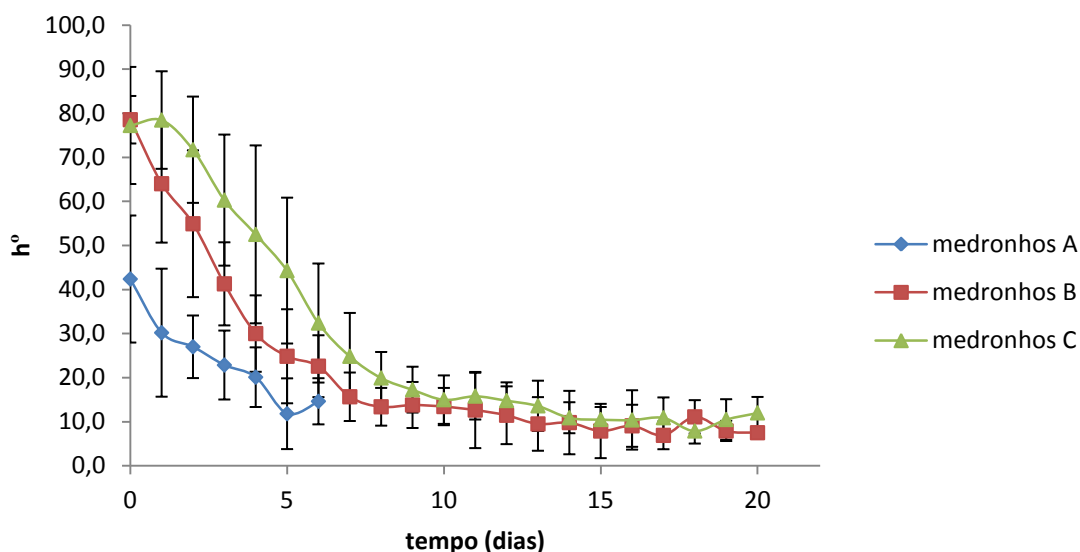
A saturação ( $C^*$ ), ao longo do tempo, diminuiu (Figura 18), o que conduz à opacidade da cor vermelha. Os valores obtidos nos medronhos A (40,1 a 28,1), B (47,3 a 32,3) e C (45,0 a 36,2) são próximos dos fornecidos por Alarcão-E-Silva *et al.* (2001) que para medronho maduro obteve 42,47 e para fruto imaturo 36,49. No entanto os valores de  $C^*$  nos medronhos A, B e C são muitos discrepantes dos observados por Galego (1995), em que o  $C^*$  para fruto maduro apresentou o valor de 63,35. Cox *et al.* (2004) observaram, durante o amadurecimento de abacate exposto a temperaturas de 15°C, 20°C e 25°C o mesmo comportamento para o parâmetro  $C^*$ , ou seja, o decréscimo deste parâmetro ao longo do tempo. Krüger *et al.* (2011) demonstraram que em framboesas, durante o amadurecimento quando expostas à temperatura ambiente, o parâmetro  $C^*$  também diminui ao longo do tempo.



**Figura 18** - Evolução do parâmetro  $C^*$ .

Na Figura 19 é representada a evolução do ângulo Hue ( $h^\circ$ ). Os valores de  $h^\circ$  para: medronhos A varia entre 42,4 e 8,0; medronhos B varia entre 78,5 e 7,5; e finalmente medronhos C, o ângulo Hue varia entre 77,2 e 12,0. Galego (1995) obteve valores de  $h^\circ$  de 0,6 para frutos maduros, este valor é bastante inferior aos valores de  $h^\circ$  obtidos no presente estudo. No entanto, Alarcão-E-Silva *et al.* (2001) para o mesmo parâmetro, em

frutos maduros obtiveram  $h^\circ$  de 63,80 e para frutos imaturos  $h^\circ$  de 96,87, que se revelam superiores aos valores encontrados para o ângulo hue nos medronhos A, B e C.



**Figura 19** - Evolução do parâmetro  $h^\circ$ .

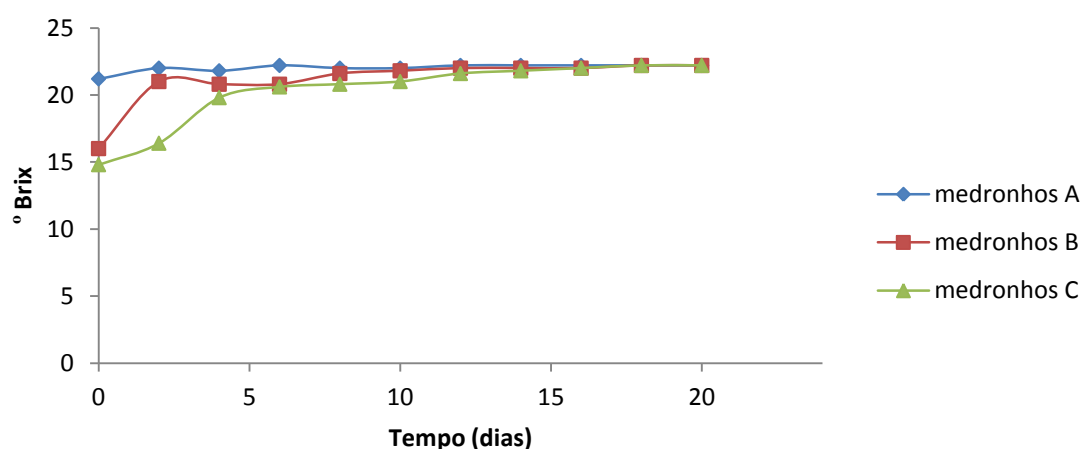
Estes resultados parecem confirmar afirmação “o ângulo hue é um bom indicativo da mudança de cor no plano a, b” (Chervin *et al.*, 1996). Segundo McGuire (1992) o ângulo hue de  $0^\circ$  representa a cor vermelha pura,  $90^\circ$  representa o amarelo,  $180^\circ$  corresponde ao verde-azulado e  $270^\circ$  equivale a azul puro, com esta consonância Alarcão-E-Silva *et al.* (2001) mostraram que o medronho imaturo é verde e o que medronho maduro é vermelho, que por observação visual é, de fato, o amadurecimento do fruto. Assim, os resultados do presente estudo, corroboram a conclusão de que este procedimento é útil para determinar as diferenças de cor dos frutos que amadurecem do verde para o amarelo ou tons de vermelho, como é o caso do medronho (Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001). Similarmente, noutros frutos em maturação como, por exemplo, abacate, framboesas e tomate o ângulo hue diminui sempre ao longo do tempo (Brandt *et al.*, 2006; Cox *et al.*, 2004; Krüger *et al.*, 2011; López Camelo e Gómez, 2004; Palet, 2012).

Nos diferentes parâmetros obteve-se valores diferentes aos valores descritos na bibliografia, este fato poderá ser explicado pelas condições climáticas, que de acordo com o Instituto de Meteorologia tanto a zona de Oleiros como o Algarve são mais quentes, que a zona de Lisboa. Estas condições climáticas podem ter influência nos valores de pH e nas condições fisiológicas da planta, que estão relacionados com a formação dos pigmentos (Cavaco, 2007).

#### 10.1.4. Avaliação da evolução do °Brix dos medronhos

O teor de sólidos solúveis totais (°Brix) reúne os compostos hidrossolúveis nos frutos, como hidratos de carbono, substâncias pécnicas, vitaminas, lípidos, aminoácidos (Davies, 1998; Fernández, 1995). Este é dependente do estado de maturação no qual o fruto é colhido, geralmente aumenta durante o amadurecimento, pela degradação de polissacarídeos de reserva, como o amido (Davies, 1998; Kays, 1997).

Na Figura 20 observa-se que o teor de sólidos solúveis totais aumentou continuamente durante os 10 primeiros dias, após a colheita dos frutos, tendo depois estabilizado nos 22,2°Brix.



**Figura 20** – Evolução do °Brix.

Os medronhos A (medronhos maduros) inicialmente apresentavam 21,2°Brix que aumentou até 22,2°Brix nos primeiros 10 dias, sendo que no restante tempo de estudo este parâmetro se manteve constante.

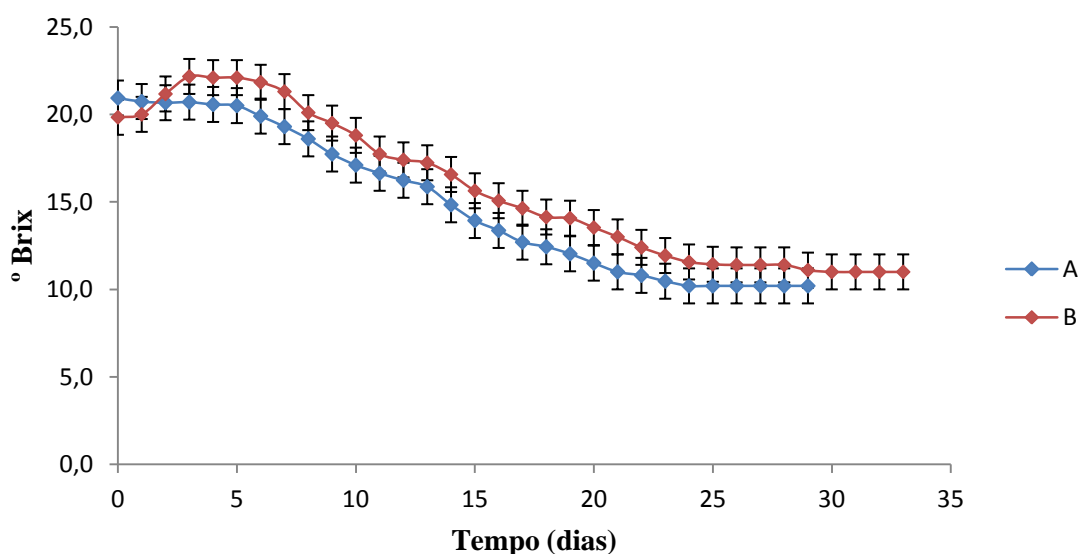
No primeiro dia, os medronhos B (medronhos em fase intermédia de maturação) apresentavam 16,0°Brix, valor que aumentou substancialmente nos primeiros três dias, seguido de um aumento gradual até aos 22,2°Brix. O teor de sólidos solúveis totais nos medronhos C no primeiro dia foi de 14,8 °Brix, este valor aumentou ao longo dos dias, sendo que nos dois últimos dias de estudo atingiu os 22,2°Brix. Galego (1995) obteve 20,5°Brix em fruto maduro o que é próximo dos valores obtidos em medronhos A, B e C quando maduros, ou seja, no final do tempo de estudo. Outros estudos de pós-colheita, realizados em frutos climatéricos, demonstraram que existe um aumento do °Brix nos mesmos após a sua colheita, como é o caso da maçã, banana, pera e manga (Kader, 1992).

## 10.2. Evolução dos parâmetros físico-químicos ao longo do processo fermentativo.

O acompanhamento da fermentação do medronho permite fazer algumas considerações importantes como relacionar a composição química e bioquímica do fruto com a qualidade do produto final – aguardente de medronho.

### 10.2.1. Determinação do teor de sólidos solúveis totais (°Brix)

A evolução do teor de sólidos solúveis totais, e respetivo desvio-padrão, ao longo das fermentações A e B está representado no gráfico da Figura 21.



**Figura 21** – Evolução da variação do °Brix ao longo do tempo de fermentação.

No fermentado A o teor de sólidos solúveis totais inicial foi de 20,9°Brix, nos seguintes dias o °Brix diminuiu gradualmente até estabilizar em 10,2°Brix.

No fermentado B o valor de sólidos solúveis totais aumentou durante os primeiros quatro dias, atingindo o valor máximo de 22,2°Brix, após este período o valor de sólidos solúveis totais diminuiu gradualmente até estabilizar em 11,0°Brix. O aumento de °Brix, observado nos primeiros quatro dias do fermentado B, resulta, provavelmente, da hidrólise enzimática dos hidratos de carbono complexos presentes nas estruturas celulares dos frutos. Outro fator que poderá explicar este fenómeno é o rebentamento da película que envolve a polpa do fruto (rica em açúcares) (Özcan e Haciseferoğullari, 2007). A subsequente diminuição do °Brix deve-se à utilização dos açúcares pelos microrganismos (Sumerly e Alvarez, 1997).

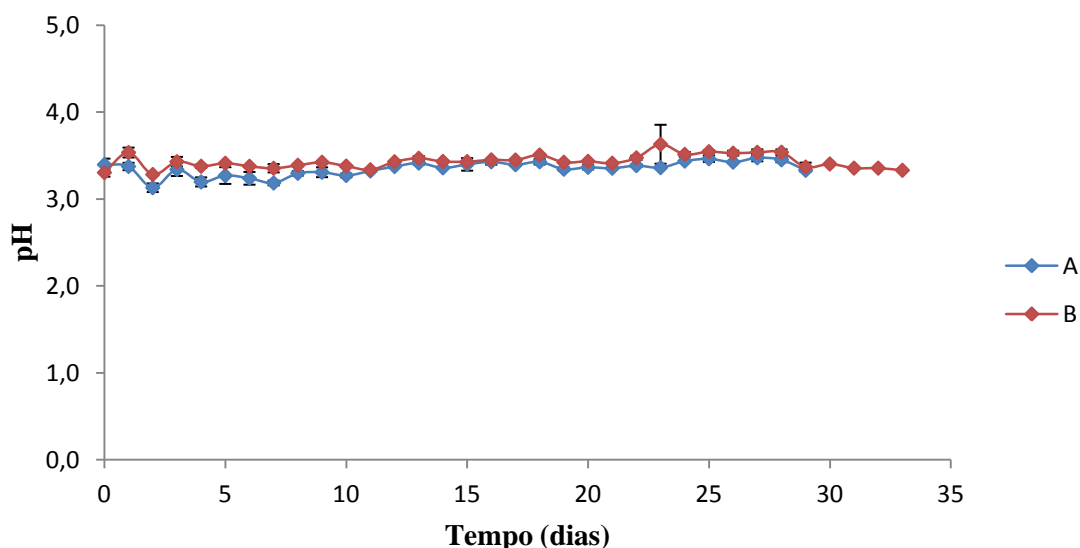


No final das reações de fermentação verificou-se que não existiu um consumo total dos açúcares solúveis. Estas situações podem ser explicadas pela incapacidade das leveduras em degradar alguns açúcares ou pela inibição causada pelo etanol produzido durante a fermentação (Querol e Fleet, 2006).

A diminuição dos açúcares, nas fermentações em estudo, teve o mesmo comportamento observado em trabalhos anteriores (Cavaco *et al.*, 2007; Galego, 1995; Santo, 2010), ou seja, houve sempre a diminuição do teor de sólidos solúveis totais, pois através do metabolismo das leveduras ocorre a utilização dos hidratos de carbono solúveis como fonte de carbono (König *et al.*, 2009; Najafpour e Kang, 2002; Querol e Fleet, 2006). Contudo, os valores de °Brix, apresentados pelos autores acima referidos, são muito inferiores aos obtidos nas fermentações A e B. Esta diferença deve-se provavelmente ao modo de preparação das amostras utilizadas nas fermentações, pois nos trabalhos anteriormente efetuados (Cavaco *et al.*, 2007; Galego, 1995; Santo, 2010) foi adicionada água no início da fermentação, enquanto no presente estudo não foi adicionada água na preparação dos fermentados, sendo apenas utilizado o próprio fruto. Esta decisão de não adição de água foi tomada pelo fato de se ter pretendido simular o modo de produção tradicional seguido por alguns produtores da região do Estreito.

### 10.2.2. Determinação do pH

A variação do pH ao longo do tempo de fermentação nos diferentes ensaios com o respetivo desvio-padrão é ilustrada na Figura 22. Ao longo da fermentação a análise de pH, revelou-se com resultados semelhantes nos processos de fermentação estudados.



**Figura 22** - Evolução da variação do pH ao longo do tempo de fermentação.

No início das fermentações o mosto apresentou valores de pH de 3,4 na amostra A e 3,3 na amostra B.

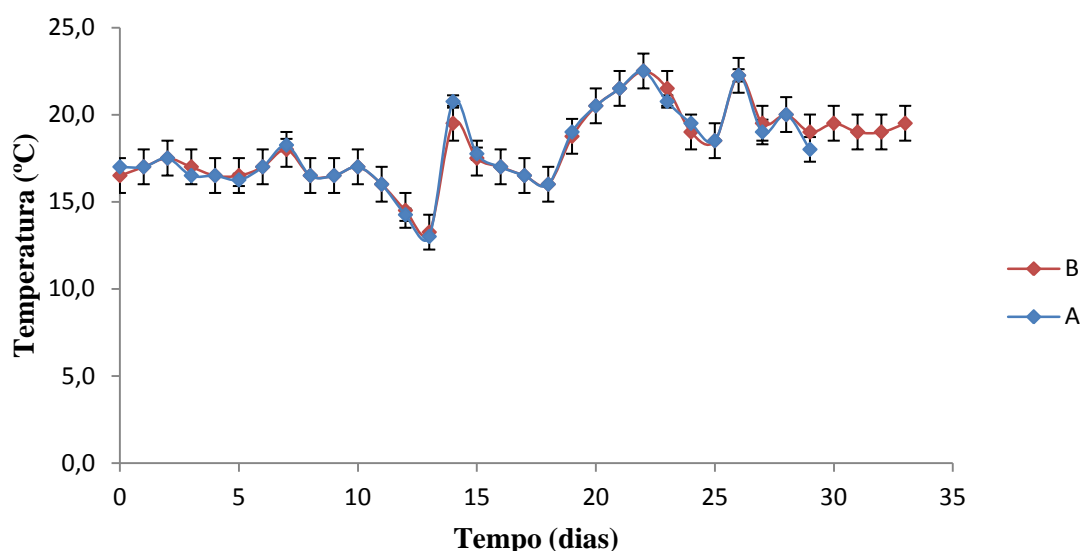
O pH da massa dos fermentados ao longo do tempo apresentou algumas oscilações que poderão ser explicadas pelo fato de a massa não ser homogênea possuindo sementes e grânulos sólidos próprios do fruto.

As variações do pH na massa dos fermentados ocorreram de forma semelhante ao descrito em trabalhos anteriores (Cavaco *et al.* 2007; Galego, 1995 e Santo, 2010).

### 10.2.3. Monitorização das temperaturas ao longo do processo fermentativo

A variação da temperatura do mosto nos diferentes fermentados encontra-se representada na Figura 23. Ao longo dos processos fermentativos estudados a temperatura da sala de fermentação sofreu várias oscilações, o que provocou também oscilações na temperatura do mosto.

Os valores de temperatura ao longo deste período de estudo oscilaram entre 13,0°C e os 22,5°C. Durante da fermentação a temperatura no interior do fermentador comportou-se de igual modo para as diferentes amostras.



**Figura 23** – Evolução da variação da temperatura dos fermentados A e B.

Ao longo do período em que decorreu a fermentação a temperatura do laboratório sofreu várias oscilações, registando-se a temperatura mais baixa em todas as fermentações de 13,0°C no dia 14, e a temperatura máxima foi registada no dia 23 com 22,5°C.

#### 10.2.4. Determinação da acidez total

A acidez total da massa de fermentado só foi medida no primeiro dia de fermentação, pois este é um método destrutivo de amostra.

Os valores de acidez total são expressos em equivalentes de ácido acético e encontram-se na Tabela 7.

**Tabela 7** – Acidez total dos fermentados A e B (média  $\pm$  desvio padrão).

Amostra	Acidez Total ( $\bar{x} \pm dp$ ) (mg/100 mL)*
A	735,85 $\pm$ 3,53
B	469,24 $\pm$ 9,61

\*expresso em ácido acético.

No fermentado A, com frutos provenientes da queda natural, verificou-se uma acidez total de 735,85 mg/100 mL, valor este superior à acidez total no fermentado B, com frutos colhidos diretamente da árvore. Teoricamente não seria de esperar estes valores, uma vez que a acidez total diminui com a maturação das frutas (Awad, 1993).

O valor de acidez total observado por Galego (1995) no primeiro dia de fermentação foi de 720,0 mg por 100 mL de amostra, expresso em equivalentes de ácido acético. Este valor é muito semelhante ao valor de acidez total do fermentado A.

### 10.3. Caracterização das aguardentes de medronho obtidas

Da destilação da massa fermentada de medronho obteve-se três partes de destilado: a cabeça, coração e cauda.

A Tabela 8 refere-se às quantidades de cada parte obtida na destilação.

**Tabela 8** – Volumes de cabeça, coração e caudas obtido na destilação.

<b>Amostra</b>	<b>Volume cabeça (mL)</b>	<b>Volume coração (mL)</b>	<b>Volume cauda (mL)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
A	40	105	242	2,63
B	40	118	319	2,95

Os rendimentos obtidos são muito baixos uma vez que não se adicionou água na fermentação nem na destilação, tendo-se utilizado apenas o fruto para a fermentação e o medronho fermentado para a destilação.

Quando adicionada água à fermentação aliada a outros fatores, tais como adição de compostos químicos, pH e tempo de espera entre a fermentação e a destilação o rendimento é maior, como se pode verificar no trabalho realizado por Galego (1995), que realizou cinco ensaios em que a 22 kg de medronho adicionou 7 L de água, no início da fermentação. A quantidade de medronho e água foi igual para todos os ensaios, tendo variado nestes ensaios o pH inicial, o tempo que decorreu entre o fim da fermentação e a destilação e adição de metabissulfito de potássio (60 mg/L). Através dos resultados obtidos por Galego (1995) observou-se que para maior rendimento de aguardente de medronho deve-se adicionar água no início da fermentação e proceder à destilação do fermentado uma semana depois de terminada a fermentação. A adição de metabissulfito de potássio no início da fermentação é também uma opção, para garantir maior rendimento, mas implicaria gastos financeiros para o produtor.

### **10.3.1. Determinação de compostos voláteis na aguardente de medronho**

A determinação de compostos voláteis foi executada para as três partes de destilado obtido, para cada amostra.

A composição volátil dos diferentes tipos de aguardente (fruta, bagaceira, cereais entre outras) é legislada pelo Regulamento (CE) n.º 110/2008 de 15 de janeiro, enquanto a aguardente de medronho é legislada pelo Decreto-Lei n.º 238/2000 de 26 de setembro. De acordo com este Decreto-Lei os destilados de medronho para poderem ser consumidos têm que cumprir determinadas especificações no que diz respeito a algumas características químicas.

As características químicas e voláteis analisadas nos destilados A e B das diferentes frações estão registadas na Tabela 9.

**Tabela 9** – Composição das aguardentes de medronho resultantes das fermentações A e B (N=2; média  $\pm$  desvio padrão).

Determinações	Unidades	Limite Legal*	Resultados			
			A ( $\bar{x} \pm dp$ )	B ( $\bar{x} \pm dp$ )	F	Sig.
Cabeça						
pH			4,20 ± 0,04	4,25 ± 0,24	0,208	0,664
Teor alcoólico	% vol.		46,95 ± 1,21	45,75 ± 2,02	1,037	0,348
Etanal	g/hl AP		47,52 ± 7,79	31,48 ± 2,52	15,329	0,008
Acetato de Etilo	g/hl AP		327,03 ± 68,44	506,03 ± 10,07	26,787	0,002
Metanol	g/hl AP		854,89 ± 12,55	711,80 ± 34,49	60,794	0,000
2-butanol	g/hl AP		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00		
1-propanol	g/hl AP		19,33 ± 1,33	11,46 ± 1,26	74,201	0,000
Isobutanol	g/hl AP		82,81 ± 7,07	65,01 ± 8,47	10,395	0,018
1-butanol	g/hl AP		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00		
Isopentanóis	g/hl AP		278,12 ± 23,68	221,62 ± 10,25	19,181	0,005
Álcoois superiores totais	g/hl AP		380,26 ± 32,08	298,08 ± 19,90	18,952	0,005
Isobutanol/prop anol	g/hl AP		4,28 ± 0,08	5,66 ± 0,17	233,65	0,000
Coração						
pH			3,50 ± 0,00	3,72 ± 0,32	1,238	0,328
Teor alcoólico	% vol.	≥ 42	37,40 ± 0,00	39,45 ± 2,37	1,333	0,312
Etanal	g/hl AP	≥ 5 ≤ 40	39,84 ± 1,28	32,32 ± 0,87	76,925	0,001
Acetato de Etilo	g/hl AP	≤ 300	145,98 ± 2,58	359,62 ± 11,96	558,234	0,000
Metanol	g/hl AP	≥ 500 ≤1000	1022,39 ± 0,27	825,90 ± 20,87	157,656	0,000
2-butanol	g/hl AP	≤ 2	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00		
1-propanol	g/hl AP	≥ 10 ≤ 40	18,79 ± 0,05	11,03 ± 0,68	227,668	0,000
Isobutanol	g/hl AP	≥ 30 ≤ 70	66,96 ± 0,52	56,07 ± 2,88	25,100	0,007
1-butanol	g/hl AP	≤ 3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00		
Isopentanóis	g/hl AP	≥ 80 ≤ 185	230,25 ± 0,34	197,06 ± 5,16	73,550	0,001
Álcoois superiores totais	g/hl AP	≥ 130 ≤ 300	315,99 ± 0,91	264,17 ± 1,87	1260,218	0,000
Isobutanol/prop anol	g/hl AP	≥ 1,5 ≤ 4	3,56 ± 0,02	5,08 ± 0,06	1221,007	0,000
Cauda						
pH			3,29 ± 0,06	3,36 ± 0,22	0,381	0,560
Teor alcoólico	% vol.		23,30 ± 0,12	24,25 ± 0,40	20,434	0,004
Etanal	g/hl AP		36,01 ± 2,57	34,71 ± 3,16	0,408	0,547
Acetato de Etilo	g/hl AP		140,77 ± 36,48	241,19 ± 43,99	12,350	0,013
Metanol	g/hl AP		1215,30 ± 16,56	947,20 ± 21,62	387,624	0,000
2-butanol	g/hl AP		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00		
1-propanol	g/hl AP		16,32 ± 0,69	9,64 ± 1,32	79,577	0,000
Isobutanol	g/hl AP		52,96 ± 2,85	45,36 ± 7,05	3,983	0,093
1-butanol	g/hl AP		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00		
Isopentanóis	g/hl AP		187,14 ± 6,65	161,27 ± 11,40	15,366	0,008
Álcoois superiores totais	g/hl AP		256,41 ± 10,17	216,27 ± 19,78	13,034	0,011
Isobutanol/prop anol	g/hl AP		3,25 ± 0,05	4,69 ± 0,09	781,448	0,000

AP – Álcool Puro;  $p \leq 0,05$ ; \* De acordo com o Decreto-Lei n.º 238/2000 de 26 de Setembro para a aguardente de medronho

## Cabeças e Caudas

Com base na Tabela 9, na qual se encontra descrita a composição volátil, pH e teor alcoólico das diferentes frações de destilado, pode observar-se que na fração cabeça existem diferenças estatisticamente significativas para as concentrações de etanal, acetato de etilo, metanol, 1-propanol, isobutanol, isopentanóis, álcoois superiores totais e relação isobutanol/propanol. Por outro lado, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas relativamente ao pH e teor alcoólico (intervalo de confiança de 95%).

Na fração cauda pode verificar-se que existem diferenças estatisticamente significativas para a o teor de etanol, concentração de acetato de etilo, metanol, 1-propanol, isopentanóis, álcoois superiores totais e relação isobutanol/propanol. Não existem diferenças estatisticamente significativas no pH, na concentração de etanal e na concentração de isobutanol.

A rejeição da primeira e da última fração (cabeças e caudas do destilado) na produção de aguardentes é uma prática comum, pois o acetaldeído encontra-se em grande quantidade nas cabeças e o metanol encontra-se em grande quantidade nas caudas (Da Porto, 1998). Comparando a concentração de compostos voláteis das cabeças e caudas, na Tabela 9, verificou-se que a concentração de acetaldeído é superior na fração de destilado designada por cabeça, não se podendo, no entanto, afirmar o mesmo para a concentração de metanol, dado existir em maior quantidade na cauda. A cauda possui ainda baixa concentração de etanol (álcool responsável pelo grau alcoólico de um fermentado) levando também à sua rejeição.

## Aguardente de medronho (Coração)

**Teor Alcoólico:** O teor alcoólico resulta normalmente do processo fermentativo dos açúcares (Fleet, 1993; Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Martorell *et al.*, 2007; Sangorín *et al.*, 2007).

Através da Tabela 9 observa-se que o teor alcoólico não apresenta diferenças estatisticamente significativas, independentemente de o fruto ser colhido do chão ou da árvore, para um intervalo de confiança de 95%. Assim, para a amostra A o teor alcoólico é 37,40% vol. e para a amostra B 32,32% vol. estes são inferiores ao valor de limite legal ( $\geq 42,00\%$  vol.) (Tabela 9). Esta variação do teor alcoólico mostra que a aguardente de medronho necessita de standardização e produção sistemática, a fim de



garantir a homogeneidade e qualidade do produto final (Soufleros *et al.*, 2005). Uma vez que o presente estudo está sobretudo centrado no efeito que o grau de maturação dos medronhos previamente à sua fermentação alcoólica apresentam, relativamente à composição em metanol das aguardentes resultantes (e respetivas frações de cada destilado), os valores de etanol devem ser analisados considerando as limitações do trabalho. Neste sentido, uma vez que se trabalhou com quantidades muito pequenas de frutos durante o processo fermentativo, a obtenção das diferentes frações de destilado ficou muito limitada (com volumes obtidos muito pequenos) e pode ter havido um corte da fração coração um pouco retardado no tempo, fazendo diminuir o teor alcoólico dessa fração abaixo do limite legal.

Santo (2010), em seis amostras diferentes de aguardente de medronho, obteve um teor alcoólico entre 45,0 e 52,7% vol. Galego (1995) obteve teor alcoólico nas suas amostras de destilado de medronho de 46,7% vol. Botelho e Caldeira (2012) obtiveram 43,0% vol em aguardente de medronho. Soufleros *et al.* (2005), num total de 19 amostras de aguardente de medronho, obtiveram em média 39,4% vol., tendo em conta que este estudo foi realizado na Grécia este valor está de acordo com Regulamento (CE) n.º 110/2008, que estipula que aguardentes de frutos devem ter no mínimo 37,5% vol. Também para aguardente de outros frutos se regista valores de teor alcoólico superior a 37,5 vol., como é o exemplo da aguardente de amora com 42,51% vol. (Soufleros *et al.*, 2004).

**Etanal:** O acetaldeído ou etanal, é proveniente da fermentação da matéria-prima, aumenta durante a destilação e envelhecimento da aguardente. É também considerado o principal resultado da oxidação espontânea e/ou microbiana dos frutos (Silva e Malcata 1998, 1999; Silva *et al.*, 1996).

Na Tabela 9, para um intervalo de confiança de 95%, verifica-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre os valores de concentração de etanal nas amostras (A e B). As amostras A e B contém uma concentração de etanal de 39,84 g/hL AP e 32,32 g/hL AP, respetivamente. Estes valores estão de acordo com os valores legalmente permitidos. O que significa que a fermentação e destilação ocorreram em condições favoráveis e sem interação de bactérias indesejáveis (Silva e Malcata 1998, 1999; Silva *et al.*, 1996). Verificou-se também que na aguardente de medronho, proveniente de frutos com grau de maturação mais elevado, a concentração de etanal foi superior e Watkins *et al.* (2000) e Zaldivar *et al.* (2007) observaram que a presença de

etanal em maior concentração nos frutos é um indicador de frutos em estágio avançado de amadurecimento, uma vez que com o amadurecimento do fruto ocorre desorganização celular e degradação de membranas. Tais acontecimentos, podem prejudicar a fosforilação oxidativa (ocorre na membrana da mitocôndria), e a produção do  $\text{NAD}^+$ , essencial para a produção de glicólise e de energia. Para suprir essa necessidade, é possível que o piruvato não seja oxidado mas sim descarboxilado, no metabolismo fermentativo, formando acetaldeído e etanol (Taiz e Zeiger, 2004).

Santo (2010) obteve seis aguardentes de medronho com concentrações de etanal distintas, apenas uma das suas amostras continha concentração de etanal (29,3 g/hl AP) de acordo com o legalmente permitido por lei ( $\geq 5 \leq 40$  g/hl AP, de acordo com Decreto-Lei n.º 238/2000), as restantes amostras apresentaram valores de concentração de etanal num intervalo de 42,2 a 80,0 g/hl AP.

Silva *et al.*, (1996) obtiveram, para aguardentes bagaceiras um valor médio de 133 g/hL AP de etanal, embora com o mesmo destilado, Silva e Malcata (1998) demonstraram valores médios mais baixos, entre 69,9 e 85,0 g/hL AP de etanal, dependendo da variedade de uva. Ainda menores, eram os valores obtidos por Soufleros e Bertrand (1987) que obtiveram variações de 4,7 a 40,8 g/hL AP de etanal, para aguardente bagaceira.

**Acetato de etilo:** É o éster formado pelas leveduras em maior quantidade durante a fermentação alcoólica e confere aroma característico a colas ou verniz, contribuindo negativamente para as características aromáticas do produto final (Vera-Guzmán *et al.*, 2010; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). Constatou-se pela análise estatística efetuada nas diferentes amostras (A e B) que as concentrações de acetato de etilo são estatisticamente diferentes, num intervalo de confiança de 95%. A amostra A obtida apresenta concentração de acetato de etilo de 145,98 g/hL AP, o que está de acordo com a legislação em vigor (Decreto-Lei n.º 208/2000). Na amostra B, o valor da concentração de acetato de etilo obtido foi superior ao permitido, 359,62 g/hL AP (Tabela 9). Este acontecimento pode ser explicado pelo contacto dos fermentados com o oxigénio atmosférico, uma vez por dia, durante as recolhas sucessivas de amostra (durante todo o período fermentativo) para o controlo analítico das massas o que certamente potenciou o aparecimento deste composto. Assim, a abertura diária dos fermentadores e a sua exposição ao ar, ainda que por breves segundos, constituiu uma limitação do trabalho experimental e contribuiu certamente para o incremento dos valores de acetato de etilo

nas aguardentes obtidas. Deste modo, em contexto real, recomenda-se que a abertura dos depósitos em fermentação seja uma prática muito bem controlada durante o processo fermentativo da massa de medronhos, e sobretudo, evitada na fase temporal entre o fim da fermentação e o processo de destilação. Estas recomendações, já foram aliás, preconizadas anteriormente por Versini *et al.* (1995) e Santo (2010). Santo (2010) obteve uma concentração de acetato de etilo de 349,3 g/hL AP o que também se encontra acima do legalmente permitido, que também possivelmente foi potenciado pelo contacto com o oxigénio uma vez que foram realizadas, à semelhança do presente trabalho, análises diárias ao fermentado. Galego (1995) obteve concentrações de acetato de etilo de 143,0 g/hL de AP.

Cordonnier (1971) verificou que em aguardentes bagaceiras a concentração de acetato de etilo é de 230 a 330 g/hL AP, enquanto Soufleros e Bertrand (1987) apresentaram uma concentração de acetato de etilo de 58 g/hL AP para tipsouro (aguardente bagaceira típica da Grécia).

**Metanol:** O metanol é formado pela degradação de substâncias pécicas presentes nos frutos. Por esta razão a concentração de metanol no destilado final aumenta com o tempo de extração (Silva e Malcata 1998, 1999; Silva *et al.*, 1996). De acordo com o Decreto-Lei n.º 238/2000, a concentração de metanol deve estar situada entre 500 a 1000 g/hL AP, No presente trabalho, verificou-se que as concentrações de metanol nas amostras A e B são estatisticamente diferentes com um intervalo de confiança de 95%. Para a amostra A (com frutos provenientes de queda natural e °Brix médio de 21,4) obteve-se uma concentração de metanol de 1022,39 g/hL AP, valor este superior ao estipulado pelo Decreto-Lei anteriormente mencionado. Contrariamente, na amostra B (frutos colhidos dos medronheiros e °Brix médio de 19,8) o teor de metanol obtido foi de 825,90 g/hL AP (Tabela 9), que se encontra dentro do limite legal. O que significa que, por um lado, a manipulação da matéria-prima e os procedimentos de destilação foram realizados com grande sensibilidade e cuidado (Silva *et al.*, 1996) e, por outro, o grau de maturação dos medronhos utilizados na fermentação da amostra B terá sido o mais adequado para manter relativamente baixos os níveis de metanol nas aguardentes resultantes.

Santo (2010) obteve concentrações de metanol entre 763,9 e 895,0 g/hL AP, em seis amostras de aguardente de medronho, enquanto Galego (1995) obteve 723 g/hL AP de metanol presente na aguardente de medronho.

Bauer-Christoph *et al.* (1997) apresentaram valores de metanol para destilado de maçã de 359 g/hL AP, destilado de cereja de 457 g/hL AP, destilados pera de 765 g/hL AP e destilado de ameixa de 866 g/hL AP, estes valores encontram-se de acordo com Regulamento (CE) nº 110/2008. Botelho e Caldeira (2012) obtiveram concentrações de metanol em aguardente de medronho de 629,39 g/hl AP, que se encontra dentro do limite legal estabelecido pelo Decreto-Lei n.º 238/2000. Para destilados de outras frutas, Botelho e Caldeira (2012) obtiveram concentrações de metanol em aguardente de maçã de 47,08 g/hl de AP, aguardente de cereja de 388,96 g/hl de AP, aguardente de pera de 984,61 g/hl AP, e aguardente de dióspiro de 387,60 g/hl AP, estas concentrações encontram-se dentro dos limites legais estabelecido pelo Regulamento (CE) nº 110/2008, no entanto as concentrações de metanol para destilados de maçã, cereja e pera obtidas por Botelho e Caldeira (2012) são muito diferentes das obtidas Bauer-Christoph *et al.* (1997), principalmente no destilado de maçã. Estas diferenças devem-se provavelmente ao modo de processamento dos diferentes destilados e também ao fato de os frutos usados serem de origens diferentes, uma vez que os frutos usados por Botelho e Caldeira (2012) são de origem Portuguesa.

No que respeita a outro tipo de destilados, cuja origem não são frutos, Lehtonen *et al.* (1999), para o uísque, apresentaram valores de concentração de metanol, significativamente baixos, concentração média de 0,077 g/hL AP e numa amostra de rum ainda menor, de apenas 0,023 g/hL AP.

Após esta comparação com os resultados obtidos por outros autores, pode-se concluir que a aguardente de medronho B apresenta uma concentração de metanol semelhante a outras aguardentes de frutos, principalmente à aguardente de ameixa.

**Álcoois Superiores:** Os álcoois superiores constituem o grupo com a concentração mais elevada em destilados, sendo responsáveis por lhes conferir o aroma característico (Ferreira *et al.*, 1999; Silva e Malcata, 1999). Os álcoois mais importantes na aguardente de medronho são o 2-butanol; 1-propanol; isobutanol (2-metil-1-propanol), 1-butanol e isopentanois (2+3-metil-1-butanol). Os níveis destes compostos são influenciados pela variedade do fruto, pelas condições de fermentação e destilação, e encontram-se concentrados principalmente na primeira fração do destilado, que se designa por cabeça (Silva e Malcata, 1998).

Pela análise da Tabela 9, pode verificar-se que na concentração de álcoois superiores existem diferenças estatisticamente significativas entre as amostras A e B, sendo os seus valores diferentes, com um intervalo de confiança de 95%.

Nas amostras A e B as concentrações obtidas de isobutanol (2-metil-1-propanol) foram 66,96 g/hL AP e 56,07 g/hL AP, respetivamente. As concentrações de 1-propanol obtidas foram de 18,79 g/hL AP para a amostra A, e 11,03 g/hL AP para a amostra B (Tabela 9). Em todas as frações de destilado não foi detetável a presença de 1-butanol e 2-butanol (Tabela 9). Todos estes álcoois superiores encontram-se dentro do limite legal estabelecido pelo Decreto-Lei n.º 238/2000. O mesmo não se verificou com a concentração de isopentanois (2+3-metil-1-butanol), na amostra A o valor obtido foi 230,25 g/hL AP e na amostra B 197,06 g/hL AP, valores estes do fora do intervalo estabelecido pelo Decreto-Lei n.º 238/2000.

Santo (2010) obteve valores entre 12,9 e 20,4 g/hL AP de 1-propanol e valores entre 38,5 e 77,0 g/hL AP de isobutanol e à semelhança do presente trabalho as aguardentes de medronho não continham 2-butanol. Na aguardente de medronho analisada por Galego (1995) a concentração de 1-propanol foi 19 g/hL AP, e a de isobutanol foi 63 g/hL de AP, estas amostras também não continham 2-butanol nem 1-butanol, bem como a aguardente de medronho analisada por Botelho e Caldeira (2012).

Botelho e Caldeira (2012) obtiveram em aguardente de medronho uma concentração de isopentanois de 193,71 g/hL AP, à semelhança do presente trabalho também este valor se encontra fora limite legal, de acordo com o Decreto-Lei n.º 238/2000. Por sua vez Santo (2010) obteve concentrações de isopentanois entre 93,3 e 141,6 g/hL AP em aguardente de medronho, valores estes no do intervalo  $\geq 80 \leq 150$  g/hL AP estabelecido pelo Decreto-Lei n.º 238/2000.

Bauer-Christoph *et al.* (1997), obtiveram: 67 g/hL AP de Isobutanol em destilados de maçã e pera; 53 g/hL AP de isobutanol em destilados de ameixa; 48g/hL AP de isobutanol em destilados de cereja e por fim 66 g/hL AP de isobutanol para destilados de uva. Relativamente ao 1-butanol Bauer-Christoph *et al.* (1997) obteve os seguintes valores: 11,4 g/hL AP para destilados de maçã, 12,4 g/hL AP para destilados de pera; 11,8 g/hL AP para destilados de ameixa, 1,9 g/hL AP em destilados de cereja e 2,5 g/hL AP para destilados de uva. No entanto, Botelho e Caldeira (2012) obtiveram concentrações de isobutanol e 1-propanol bastante diferentes das obtidas por Bauer-Christoph *et al.* (1997). Assim, para destilado de maçã Botelho e Caldeira (2012) obtiveram 35,57 g/hL AP de isobutanol e 42,41 g/hL AP de 1-butanol. Em destilados de

pera a concentração de isobutanol obtida foi de 37,88 g/hl AP e a concentração de 1-butanol foi de 30,55 g/hl AP. No destilado de cereja obtiveram 85,0 g/hl AP de isobutanol e 1,19 g/hl AP de 1-butanol (Botelho e Caldeira, 2012). Esta diferença de valores deve-se provavelmente ao fato de os frutos usados nas destilações serem de origem diferentes, outra razão provável para esta discrepância de valores das concentrações de isobutanol e 1-butanol pode estar no modo como a aguardente foi processada.

Ao contrário do descrito anteriormente, no trabalho de Fitzgerald *et al.* (2000) obtiveram, para whisky, concentrações de 2-metil-1-propanol e 1-butanol mais baixos (0,96 g/hL AP e 1,09 g/hL AP, respetivamente).

Como se verificou anteriormente existe uma grande variedade de destilados. Destilados de frutos, “*obtido por fermentação alcoólica e destilação de um fruto carnudo ou de um mosto; de tal fruto, de bagas ou legumes, com ou sem caroço*” (Regulamento (CE) n.º 110/2008), são exemplo destes destilados aguardente maçã, pera, cereja, ameixa, uva, ameixa, framboesa, amora de silva, groselha, dióspiro, bagas de sabugueiro, bagas de zimbo, entre outros (Regulamento (CE) n.º110/2008).

Destilados de cereais, “*obtida exclusivamente por destilação de um mosto fermentado de grãos inteiros de cereais que apresente as características organolépticas provenientes das matérias-primas utilizadas*” (Regulamento (CE) n.º110/2008) o whisky é um exemplo deste tipo de destilado uma vez que é produzida exclusivamente da destilação do mosto de cereais maltados, com ou sem grãos inteiros de outros cereais (Regulamento (CE) n.º110/2008).

Destilados de melaços ou xaropes, como é o caso do rum, que é produzido exclusivamente por fermentação alcoólica e destilação, quer de melaços ou xaropes provenientes da produção do açúcar de cana (Regulamento (CE) n.º110/2008).

Atendendo aos valores dos diferentes compostos voláteis anteriormente referidos, verificou-se que o perfil da composição volátil dos destilados de fruta e cereais são bastante distintos. Principalmente, no que diz respeito à concentração de metanol, que em destilados de fruta é muito superior à concentração de metanol encontrada em whisky e rum. Esta diferença é expectável uma vez que os frutos contêm pectina.

#### 10.4. Determinação da capacidade antioxidante total e compostos fenólicos totais

A determinação de antioxidantes na aguardente de medronho, tanto quanto se sabe, nunca tinha sido realizada em Portugal, pelo que o trabalho realizado é exploratório.

A capacidade antioxidante total de bebidas destiladas é frequentemente avaliada usando um método espectrofotométrico comum aliado à utilização de DPPH como aceitador de eletrões (Aoshima, 2004; Da Porto, 2000). No entanto, Santos *et al.*, 2013a (não publicado) verificaram que para determinação da capacidade antioxidante total em aguardentes de frutos, o método de determinação que envolve o uso do reagente DPPH não é o mais indicado, uma vez que este não detetou capacidade antioxidante nas amostras analisadas. Assim, no presente trabalho, a determinação da capacidade antioxidante total foi determinada com a utilização do reagente ABTS e a determinação de compostos fenólicos totais com o reagente Folin-Ciocalteu. A quantificação da capacidade antioxidante total e compostos fenólicos totais é apresentada na Tabela 10.

**Tabela 10** – Capacidade antioxidante total e conteúdo em fenóis totais das aguardentes de medronho (N=2; média  $\pm$  desvio padrão).

Amostra	Capacidade Antioxidante Total ( $\bar{x} \pm dp$ ) ABTS ( $\mu\text{mol Eq TE/mL}$ )	Compostos Fenólicos Totais ( $\bar{x} \pm dp$ ) ( $\mu\text{mol Eq GAE/mL}$ )
A	110,6 $\pm$ 4,3	290,6 $\pm$ 6,8
B	157,3 $\pm$ 5,0	423,9 $\pm$ 8,0

Da análise da Tabela 10, verificou-se que a aguardente de medronho (amostra A), proveniente da queda natural, contém menor capacidade antioxidante total, 111,6  $\mu\text{mol Eq TE/mL}$ . Por sua vez, a aguardente de medronho (amostra B), proveniente da recolha direta do *Arbutus unedo* L, apresenta maior capacidade antioxidante, com valor médio de 157,3  $\mu\text{mol Eq TE/mL}$ . A concentração de compostos fenólicos totais na amostra A também foi menor, apresentando um valor médio de 290,6  $\mu\text{mol Eq GAE/mL}$ , em relação a amostra B que contém 423,9  $\mu\text{mol Eq GAE/mL}$  de compostos fenólicos totais. Assim, dependendo do grau de maturação do fruto, a aguardente de medronho tem diferente capacidade de antioxidantes totais e compostos fenólicos totais.

Verificando-se assim que a atividade antioxidante está fortemente relacionada com o teor de compostos fenólicos totais, o que também já foi demonstrado por vários

autores tais como: Abdoul-latif *et al.* (2012); Canas *et al.* (2008); Dudonné *et al.* (2009); Floegel *et al.* (2011) e Gorinstein *et al.* (2010).

Santos *et al.*, 2013a (não publicado) determinaram a capacidade antioxidante total em aguardentes de diferentes frutos tendo obtido: 97,6  $\mu\text{mol Eq TE/mL}$  em aguardente de maçã, 80,1  $\mu\text{mol Eq TE/mL}$  em aguardente de cereja, 199,3  $\mu\text{mol Eq TE/mL}$  em aguardente de maracujá e 185,9  $\mu\text{mol Eq TE/mL}$  em aguardente de banana. No mesmo trabalho, Santos *et al.*, 2013a determinaram para as aguardentes referidas anteriormente os compostos fenólicos totais, de onde obtiveram 137,7  $\mu\text{mol Eq GAE/mL}$  em aguardente de maçã, 199,6  $\mu\text{mol Eq GAE/mL}$  em aguardente de cereja, 250,1  $\mu\text{mol Eq GAE/mL}$  em aguardente de maracujá e 216,0  $\mu\text{mol Eq GAE/mL}$  em aguardente de banana.

Os diferentes frutos dão origem a aguardentes muito distintas em relação à sua capacidade antioxidante total e compostos fenólicos totais.



## 11. Conclusões e perspectivas futuras

### 11.1. Conclusões

A fermentação de medronho (fruto de *Arbutus unedo* L). é uma prática comum em Portugal e noutras regiões do mediterrâneo, para produzir uma bebida destilada típica designada por aguardente de medronho. A aguardente de medronho está a iniciar a sua expansão a nível de produção e comercialização na zona centro de Portugal, permitindo a dinamização socioeconómica desta região do país.

Com o estudo da evolução da maturação do medronho na pós-colheita constatou-se que, nos dias seguintes à colheita dos medronhos houve a mudança na passagem da cor verde do fruto para vermelho e que ocorreu um aumento gradual do °Brix dos frutos, o que permitiu verificar que o medronho parece ser um fruto climatérico, ou seja, o seu processo de amadurecimento continua, naturalmente, após ser colhido. Isto constitui uma vantagem para o produtor, uma vez que, geralmente, a apanha do medronho é feita várias vezes, diminuindo assim o número de apanhas e consequentemente a mão-de-obra.

Com o presente trabalho foi ainda possível obter destilados de medronho, em que o grau de maturação inicial dos medronhos era diferente, originando aguardentes de medronho com composições voláteis distintas, em particular o teor metanol, com diferenças estatisticamente significativas num intervalo de confiança de 95%. Para a amostra de aguardente de medronho (com frutos provenientes da queda natural e °Brix médio de 21,4) obteve-se uma concentração de metanol de 1022,39 g/hl AP, valor este acima do intervalo ( $\geq 500 \leq 1000$  g/hl AP) permitido segundo o Decreto-Lei n.º 238/2000, enquanto a aguardente de medronho (com frutos colhidos dos medronheiros e °Brix médio de 19,8) o teor de metanol obtido foi de 825,90 g/hl AP, valor este, dentro do intervalo permitido legalmente. Esta realidade permite concluir que os medronhos utilizados na produção de aguardente não devem apresentar elevado grau de maturação, pois quanto mais maduro se encontrar o fruto mais pectina irá ter e, consequentemente, maior será a concentração de metanol na aguardente de medronho. Assim, recomenda-se que a colheita do medronho seja sobretudo realizada diretamente do medronheiro e os frutos apresentem coloração vermelho/alaranjado.

A aguardente de medronho obtida contém diferente capacidade antioxidante total e compostos fenólicos totais dependendo do grau de maturação do fruto. Assim, para destilados de medronho com frutos, com grau de maturação mais elevado, apresenta menor capacidade antioxidante total, bem como menor concentração de compostos fenólicos totais.

## 11.2. Perspetivas de trabalho futuro

No seguimento deste trabalho, tendo em conta os resultados obtidos, propõem-se os seguintes trabalhos futuros:

- Estudar a evolução da taxa de respiração dos medronhos e a sua taxa de produção de etileno, para se poder retirar a conclusão final acerca do tipo de fruto (climatérico ou não).
- Determinar a composição de  $\beta$ -caroteno e antocianinas do fruto fresco e monitorizar a sua evolução ao longo do tempo, para conhecer melhor a evolução da cor do medronho, do ponto de vista bioquímico.
- Efetuar ensaios de fermentação com amostras onde se coloque água na fase inicial de fermentação alcoólica e outras sem adição de água para avaliar o impacto da presença da água na cinética de fermentação, no rendimento alcoólico e na composição volátil das aguardentes obtidas.
- Realizar ensaios de fermentação, utilizando lotes de medronhos com °Brix diferentes, de forma a determinar-se quais o que originarão aguardente de medronho com maior qualidade sensorial e com menor concentração de metanol.
- Realizar ensaios de fermentação, com o objetivo de avaliar o efeito da agitação das massas durante o início da fermentação alcoólica, na qualidade e rendimento da aguardente de medronho obtida.
- Repetir o presente estudo, usando as massas fermentadas dentro de fermentadores de grandes dimensões, tendo sido separados previamente os medronhos colhidos do chão e do medronheiro, para confirmação dos resultados obtidos.
- Caracterizar um maior número de compostos voláteis na aguardente de medronho para se estabelecer o seu perfil, complementando essa informação, com análise sensorial descritiva utilizando um painel de provadores devidamente treinado.

## 12. Referências Bibliográficas

- Abdoul-latif, F. M., Bayili, R. G., Obame, L-C., Bassolé, I. H. N. e Dicko, M. 2012. Comparison of phenolic compounds and antioxidant capacities of traditional sorghum beers with other alcoholic beverages. *African Journal of Biotechnology*, 81:14671-14678.
- Abushita, A. A., Daood, H. G. e Biacs, P. A. 2000. Change in carotenoids and antioxidant vitamins in tomato as a function of varietal and technological factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:2075-2081.
- Adekunte, A. O., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., Scannell, A. G. M. e O'Donnell, C. P. 2010. Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. *Food Chemistry*, 122:500-507.
- Afkir, S., Nguelefack, T. B., Aziz, M., Zoheir, J., Cuisinaud, G., Bnouham, M., Mekhfi, H., Legssyer, A., Lahlou, S. e Ziyat, A. 2008. *Arbutus unedo* prevents cardiovascular and morphological alterations in L-NAME-induced hypertensive rats. Part I: Cardiovascular and renal hemodynamic effects of *Arbutus unedo* in L-NAME induced hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 116:288-295.
- Alarcão-E-Silva, M. L. C. M. M., Leitão, A. E. B., Azinheira, H. G. e Leitão, M. C. A. 2001. The Arbutus Berry: Studies on its color and chemical. Characteristics at two mature stages. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14:27-35.
- Alberti, G., Inglima, I., Arriga, N., Piermatteo, D., Pecchiari, M., Zaldei, A., Papale, D., Peressotti, A., Valentini, R., Cotrufo, M. F. e Miglietta, F. 2007. Cambiamenti nel regime pluviometrico in ecosistemi mediterranei: il progetto MIND. *Forest@*, 4:460-468.
- Ali, S. S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A. e Bora, U. 2008. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, 41:1-15.
- Almeida, I. F. 2009. Desenvolvimento de sistemas semi-sólidos contendo fitocompostos captadores de espécies reativas. Dissertação de doutoramento. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Porto, Portugal.
- Amarowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B. e Weil, J. A. 2004. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84:551-562.
- Aoshima, H., Tsunoue, H., Koda, H. e Kiso, Y. 2004. Aging of whiskey increases 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:5240-5244.
- Araújo, I. M. M. 2004. Características aromáticas e cromáticas das castas Amarel e Vinhão. Dissertação de Mestrado, Universidade do Porto. Porto, Portugal.
- Arias, R., Lee, T-C., Logendra, L. e Janes, H. 2000. Correlation of lycopene measured by HPLC with the L\*, a\*, b\* color readings of a hydroponic tomato and the relationship of maturity with color and lycopene content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:1697-1702.
- Arnao, M. B. 2000. Some methodological problems in determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science and Technology*, 11:419-421.
- Awad, M. 1993. Fisiologia de Pós – Colheita de Frutos. 1ª Edição. Nobel, Brasil, 114 p.

- Ayaz, F. A., Kucukislamoglu, M. e Reunanen, M. 2000. Sugar, non-volatile and phenolic acids Composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L. var. *ellipsoidea*) Fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13:171-177.
- Bauer-Christoph, C., Wachter, H., Christoph, N., Roßmann, A. e Adam, L. 1997. Assignment of raw material and authentication of spirits by gas chromatography, hydrogen- and carbon-isotope ratio measurements. *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung A*, 204:445-452.
- Belchior, A. P., Caldeira, I., Costa, S., Lopes, C., Tralhão, G., Ferrão, A. F. M., Mateus, A. M. e Carvalho, E. 2001. Evolução das características físico-químicas e organolépticas de aguardentes Lourinhã ao longo de cinco anos de envelhecimento em madeira de carvalho e de castanheiro. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 16:81-94.
- Benzie, I. F. F. e Wachtel-Galor, S. 2011. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 1ª Edição. CRC Press, Florida, 499p.
- Berglund, K. A. 2004. *Artisan Distilling - A Guide for Small Distilleries*. Dissertação de Douturamento, Michigan State University, EUA.
- Bieto, J. e Talon, M. 1996. *Fisiologia y Bioquímica Vegetal*. 1ª Edição. McGraw Hill Interamericana de España, Madrid, 581p.
- Bindler, F. e Laugel, P. 1992. Possibilité de Réduction de la Teneur en Méthanol des eaux-de-vide poire: Éventuelles Répercussions sur leur Composition. In: *Élaboration et Connaissance des Spiritueux*, R. Contagel. Tec & Doc, 375-384.
- Bindler, F., Voges, E. e Laugel, P. 1988. The problem of methanol concentration admissible in distilled fruit spirits. *Food Additives and Contaminants*, 5:343-351.
- Bitsch, I., Janssen, M., Netzel, M., Strass, G. e Frank, T. 2004. Bioavailability of anthocyanidin-3-glucosides following consumption of elderberry extract and blackcurrant juice. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 42:293-300.
- Bondet, V., Brand-Williams, W. e Berset, C. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH<sup>•</sup> free radical method. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 30:609-615.
- Botelho G. e Caldeira I. 2012. Determination of volatile composition of distilled fruit spirits as an important tool in its quality control. *Congresso Internacional de Valorização de Produtos Tradicionais*. 3-5 Maio, Ponte de Lima, Portugal.
- Brandt, S., Pék, Z., Barna, É., Lugasi, A. e Helyes, L. 2006. Lycopene content and colour of ripening tomatoes as affected by environmental conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86:568-572.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. e Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28:25-30.
- Caballero, B., Allen, L. e Prentice, A. 2005. *Encyclopedia of human nutrition*. 2ª Edição. Academic Press, Amesterdão, 2000p.
- Cabral, F. C. e Telles, G. R. 1999. *A Árvore em Portugal*. 1ª Edição. Assírio & Alvim, Lisboa, 204p.
- Caldeira, I., Clímaco, M. C., Bruno de Sousa, R. e Belchior, A. P. 2006. Volatile composition of oak and chestnut woods used in brandy ageing: modification induced by heat treatment. *Journal of Food Engineering*, 76:202-211.

- Canas, S. 2003. Study of the extractable compounds of woods (oak and chestnut) and the extraction processes in the enological perspective. Dissertação de doutoramento. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, Portugal.
- Canas, S., Belchior, A. P., Mateus, A. M., Spranger, M. I. e Bruno-de-Sousa, R. 2002. Kinetics of impregnation/evaporation and release of phenolic compounds from wood to brandy in experimental model. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 17:1-14.
- Canas, S., Leandro, M. C., Spranger, M. I. e Belchior, A. P. 1999. Low molecular weight organic compounds of chestnut wood (*Castanea sativa* L.) and corresponding aged brandies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:5023-5030.
- Canas, S., Vaz, M. e Belchior, A. P. 2008. Influence de la dimension du fût dans les cinétiques d'extraction/oxydation des composés phénoliques du bois pour les eaux-de-vie Lourinhã. In: *Les Eaux-de-vie Traditionnelles d'origine Viticole*. Tec & Doc, 143-146.
- Cantagrel, R., Lurton, L., Vidal, J. P. e Galy, B. 1990. La distillation charentaise pour l'obtention des eaux-de-vie de cognac. In: *Les Eaux-de-vie Traditionnelles d'origine Viticole*. Tec & Doc, 60-69.
- Cardoso, A. D., Carvalheira, J., Coimbra, M. A. e Rocha, S. 2005. Tecnologia dos Vinhos Tintos. 1ª Edição. Estação Vitivinícola da Bairrada - Direção Regional de Agricultura da Beira Litoral, Coimbra, Portugal.
- Cardoso, M. G. 2006. Produção de aguardente de cana-de-açúcar. 2ª Edição. Universidade Federal de Lavras, Brasil, 444p.
- Casanova V. 2007. Actividade Antioxidante de Aguardentes Lourinhã. Influência das Características da Vasilha de Madeira e do Tempo de Envelhecimento. Dissertação de Licenciatura de Engenharia Agronómica, do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, Portugal.
- Cavaco, T. M. G. 2007. Caracterização química e bioquímica dos frutos de "*Arbutus unedo* L." e de "*Rubus fruticosus* Agg." - Contribuição para a sua valorização. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais, Universidade do Algarve. Faro, Portugal.
- Cavaco, T., Longuinho, C., Quintas, C. e Saraiva de Carvalho, I. 2007. Chemical and microbial changes during the natural fermentation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Journal of Food Biochemistry*, 31:715-725.
- Celikel, G., Demirsoy, L. e Demirsoy, H. 2008. The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) selection in Turkey. *Scientia Horticulturae*, 118:115-119.
- Chervin, C., Franz, P. e Birrell, F. 1996. Calibration tile slightly influences assessment of color change in pears from green to yellow using the L, a, b space. *HortScience*, 31:471.
- Cordonnier, R. 1971. Les arômes des Vins et des eaux-de-vie élaborées à partir de cépages indigènes. Leur formation et leur évolution. *Bulletin d'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin*, 483:1128-1148.
- Cornara, L., La Rocca, A., Marsili, S. e Mariotti, M. G. 2009. Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, 125:16-30.
- Correia, A. V. e Oliveira, A. C. 1999. Principais espécies florestais com interesse para Portugal: zonas de influência mediterrânica. 2ª Edição. Direção Geral das Florestas, Estudos e Informação nº 318, 119p.

- Costa, M. 2012. A utilização do Medronheiro como ornamental. In: Jornadas do Medronho. Programa e Resumos Jornadas do Medronho, Escola Superior Agrária de Coimbra, 30p.
- Cox, K. A., McGhie, T. K., White, A. e Woolf, A. B. 2004. Skin colour and pigment changes during ripening of “Hass” avocado fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 31:287-294.
- Da Porto, C. 1998. Grappa and grape-spirit production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 18:13-24.
- Da Porto, C., Calligaris, S., Celotti, E. e Nicoli, M. C. 2000. Antiradical properties of commercial cognacs assessed by the DPPH<sup>•</sup> test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:4241-4245.
- Davies, F. S. 1998. Citrus. Fruit quality, harvesting and postharvest technology. 1<sup>a</sup> Edição. Cab Internacional, University Press, Cambridge, 254p.
- Decreto-Lei nº 238/2000 de 26 de Setembro. Diário da República I série A, Imprensa Nacional 223, 5145-5147.
- Domizio, P., Lencioni, L., Ciani, M., Di Blasi, S., Pontremolesi, C. e Sabatelli, M. P. 2007. Spontaneous and inoculated yeast population dynamics and their effect on organoleptic characters of Vinsanto wine under different process conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 115:281-289.
- Direção Regional de Agricultura e Pescas do Centro (DRAPC). 2011. Medronheiro: do “garimpo” à plantação. Publicação bimestral para o sector agrícola e pescas da Região Centro, 22:2-3.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M. e Mérillon, J. M. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:1768–1774.
- Duriez, P., Cren, C., Luc, G., Fruchart, J. C., Rolando, C. H. e Teissier E. 2001. Ingestion of Cognac significantly increases plasma phenolic and ellagic acid concentrations and plasma antioxidant capacity in humans. In: *Proceedings of 26th World Congress of International Organisation of Vine and Wine - Section Wine and Health*.
- El-Hilaly, J., Hmamouchi, M. e Lyoussi, B. 2003. Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco). *Journal of Ethnopharmacology*, 86:149-158.
- Faber, M. e van Jaarsveld, P. J. 2007. The production of provitamin A-rich vegetables in home-gardens as a means of addressing vitamin A deficiency in rural African communities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87:366-377.
- Fernández, J. L. 1995. La naranja, composición y cualidades de sus zumos y esencias. Generalitat Valenciana, Conselleria de agricultura y medio ambiente, Valência, 414 pp.
- Ferreira, A. G., Gonçalves, A. C., Pinheiro, A. C., Gomes, C. P., Ilhéu, M., Neves, N., Ribeiro, N. e Santos, P. 2001. Plano Específico de Ordenamento Florestal para o Alentejo. Universidade de Évora, Évora, 452p.
- Ferreira, F., Ferreira, R. e Duarte, J. A. 2007. Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*, 7:257-275.

- Ferreira, V., Hernández-Orte, P., Escudeiro, A., López, R. e Cacho, J. 1999. Semipreparative reserved-phase liquid chromatographic fractionation of aroma extracts from wine and other alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*, 864:77-78.
- Ferrer, A., Remón, S., Negueruela, A. e Oria, R. 2005. Changes during the ripening of the very late season Spanish peach cultivar Calanda Feasibility of using CIELAB coordinates as maturity indices. *Scientia Horticulturae*, 105:435-446.
- Finley, J. W., Kong, A-N., Hintze, K. J., Jeffery, E. H., Ji, L. L. e Lei, X. G. 2011. Antioxidants in foods: state of the science important to the food industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59:6837-6846.
- Fiorentino, A., Castaldi, S., D'Abrosca, B., Natale, A., Carfora, A., Messere, A. e Monaco, P. 2007. Polyphenols from the hydroalcoholic extract of *Arbutus unedo* living in a monospecific Mediterranean woodland. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35:809-811.
- Fitzgerald, G., James, K. J., MacNamara, K. e Stack, M. A. 2000. Characterization of whiskeys using solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 896:351-359.
- Fleet, G. H. 1993. *Wine Microbiology and biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Suíça, 510p.
- Floegel, A., Kim, D-O., Chung, S-J., Koo, S. I. e Chun, O. K. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24:1043-1048.
- Galego, L. e Almeida, V. 2007. *Aguardente de frutos e licores do Algarve. História, técnica de produção e legislação*. 1ª Edição, Edições Colibri, Lisboa 136p.
- Galego, L. R. 1995. *Optimização de parâmetros para a aguardente de medronho*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, Portugal.
- Galego, L. R. 2006. *Traditional Algarvian distillates and liqueurs historic scientific aspects*. Universidade do Algarve. Disponível em: <https://sapientia.ualg.pt/bitstream/10400.1/197/1/Galego.pdf> Acedido em 10/12/2012.
- Gilman, E. F. e Watson, D. G. 1993. *Arbutus unedo* Strawberry tree. Forest Service, Department of Agriculture Florida. Fact Sheet ST-85.
- Godinho-Ferreira, P., Azevedo, A. M. e Rego, F. 2005. Carta da Tipologia Florestal de Portugal Continental. *Silva Lusitana*, 13:1-34.
- Goldberg, D. M., Hoffman, B., Yang, J. e Soleas, G. J. 1999. Phenolic constituents, furans, and total antioxidant status of distilled spirits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:3978-3985.
- Gomes, F. e Canhoto, J. M. 2009. Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plants*, 45:72-82.
- González, G. L. 2006. *Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares: especies silvestres y las principales cultivadas*. 2ª Edição. Mundi-Prensa, Madrid, 1727p.
- Google Earth - [www.google.pt/earth/](http://www.google.pt/earth/) (versão 7). Acedido em 13/1/2013
- Gorinstein, S., Haruenkit, R., Poovarodom, S., Vearasilp, S., Ruamsuke, P., Namiesnik, J., Leontowicz, M., Leontowicz, H., Suhaj, M. e Sheng, G. P. 2010. Some analytical assays for the determination of bioactivity of exotic fruits. *Phytochemical Analysis*, 21:355-362.



- Gosselin, R. E., Hodge, H. C., Smith, R. P. e Braddock, J. 1976. Clinical Toxicology of Commercial Products. The Williams & Wilkins, Baltimore, 2009p.
- Guia RELACRE. 2000. Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química. RELACRE nº13, Lisboa, 50p.
- Halliwell, B. 1990. How to characterize a biological antioxidant. Free Radical Research Communications, 9:1-32.
- Hassas-Roudsari, M., Chang, P. R., Pegg, R. B. e Tyler, R. T. 2009. Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanolic and hot water extraction. Food Chemistry, 114:717-726.
- Huang, D., Ou, B. e Prior, R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53:1841-1856.
- Instituto Português do Mar e da Atmosfera. 2012. Disponível em: [www.meteo.pt](http://www.meteo.pt) Acedido em 9/5/2013.
- IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) and IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN), Nomenclature of Carotenoids, Molecular and Cellular Biochemistry. Volume 9, Number 2/November, 1993.
- Jesus, J. P. e Martins, A. N. 1997 e 1999. 1º e 2º Colóquio – Valorização da Aguardente de medronho. “Aguardente de Medronho ensaios em laboratório”. Associação in Loco, Universidade do Algarve, Direção Regional de Agricultura do Algarve, 22-26.
- Kader, A. 1992. Postharvest Technology of Horticultural Crops. Universidade da California, Davis, EUA, 535p.
- Kays, S. J. 1997. Postharvest physiology of perishable plant products. Van Nostrand Reinhold, Nova Iorque, 532pp.
- Kivçak, B. e Mert, T. 2001. Quantitative determination of  $\alpha$ -tocopherol in *Arbutus unedo* by TLC- densitometry and colorimetry. Fitoterapia, 72:656-661
- Knox, Y. M., Hayashi, K., Suzutani, T., Ogasawara, M. Yoshida, I., Shiina, R., Tsukui, A., Terahara, N. e Azuma, M. 2001. Activity of anthocyanins from fruit extract of *Ribes nigrum* L. against influenza A and B viruses. Acta Virologica, 45:209-215.
- Koleva, I. I., van Beek, T. A., Linssen, J. P. H., De Groot, A. e Evstatieva, L. N. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. Phytochemical Analysis, 13:8-17.
- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F. e Brouillard, R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochemistry, 64:923-933.
- KONICA MINOLTA. 2003. Precise color communication - Colour Control From Perception to Instrumentation. Disponível em: <http://www.konicaminoltaeurope.com/pcc/en>. Acedido em: 11 de abril 2013.
- König, H., Unden, G. e Fröhlich, J. 2009. Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Springer-Verlag Berlin, Alemanha, 522p.
- Krüger, E., Dietrich, H., Schöpplein, E., Rasim, S. e Kürbel, P. 2011. Cultivar, storage conditions and ripening effects on physical and chemical qualities of red raspberry fruit. Postharvest Biology and Technology, 60:31-37.
- Lagarto, V., Gomes, F., Franco, J. e Oliveira, F. 2013. Estudo de mercado sobre as potencialidades dos medronho na região centro. Agrotec, 6:78-82.

- Leach, G., Oliveira, G. e Morais, R. 1998. Production of a carotenoid-rich product by alginate entrapment and fluid-bed drying of *Dunaliella salina*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 76:298-302.
- Lehtonen, P. J., Keller LaDena, A. e Ali-Matila, E. T. 1999. Multy method analysis of matured distilled alcoholic beverages for brand identification. Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung A, 208:413-417.
- Leonti, M., Casu, L., Sanna, F. e Bonsignore, L. 2009. A comparison of medicinal plant use in Sardinia and Sicily - De Materia Medica revisited? Journal of Ethnopharmacology, 121:255-267.
- López-Camelo, A. F. L. e Gómez, P. A. 2004. Comparison of color indexes for tomato ripening. Horticultura Brasileira, 22:534-537.
- Loureiro, V. e Malfeito-Ferreira, M. 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. International Journal of Food Microbiology, 86:23-50.
- Lusian Cooppers. Disponível em: <http://www.lusiancoppers.com/files/StillHistory.pdf> Acedido em 13 de dezembro de 2012.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. e Parker, J. 1997. Brock Biology of Microorganisms. 8ª Edição. Prentice Hall, Nova Jérсия, 912p.
- Maleš, Z., Plazibat, M., Vundać, V. e Žunta, I. 2006. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree - *Arbutus unedo* L. (Ericaceae). Acta Pharmaceutica, 56:245-250.
- Mariotto, S., Esposito, E., Di Paola, R., Ciampa, A., Mazzon, E., Prati, A. C., Darra, E., Vincenzo, S., Cucinotta, G., Caminiti, R., Suzuki, H. e Cuzzocrea, S. 2008. Protective effect of *Arbutus unedo* aqueous extract in carrageenan-induced lung inflammation in mice. Pharmacological Research, 57:110-124.
- Martínez-Vilalta, J., Prat, E., Oliveras, I. e Piñol, J. 2002. Xylem hydraulic properties of roots and stems of nine Mediterranean woody species. Oecologia, 133:19-29.
- Martins, R. C. e Silva, C. L. M. 2002. Modelling colour and chlorophyll losses of frozen green beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). International Journal of Refrigeration, 25:966-974.
- Martorell, P., Stratford, M., Steels, H., Fernández-Espinar, M. T. e Querol, A. 2007. Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. International Journal of Food Microbiology, 114:234-242.
- Mazza, G., Kay, C. D., Cottrell, T. e Holub, B. J. 2002. Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50:7731-7737.
- McGuire, R. G. 1992. Reporting of objective color measurements. HortScience 27:1254-1255.
- Mendes, M. L. e Gonçalves, J. C. 1997. 2º Colóquio – Valorização da Aguardente de medronho. “Avanços no Estudo da Multiplicação in vitro do medronheiro.” Projecto PAMAF- IED Nº 4057 e Projeto PAMAF- IED nº 8005.
- Mereti, M., Grigoriadou, K. e Nanos, G. D. 2002. Micropropagation of the strawberry tree, *Arbutus unedo* L. Scientia Horticulturae, 93:143-148.
- Mereti, M., Grigoriadou, K., Levantakis, N. e Nanos, G. D. 2003. In vitro rooting of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) in médium solidified by peat-perlite mixture in combination with agar. Acta Horticulturae, 616:207-210.

- Miller, N. e Rice-Evans, C. 1997. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS<sup>+</sup> radical cation assay. *Free Radical Research*, 26:195-199.
- Miller, N., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V. e Milner, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84:407-412.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26:211-219.
- Mosedale J. R. e Puech J-L. 1998. Wood maturation of distilled beverages. *Trends in Food Science and Thechnology*, 9:95-101.
- Mullen, W., McGinn, J., Lean, M. E. J., MacLean, M. R., Gardner, P., Duthie, G. G., Yokota, T. e Crozier, A. 2002. Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:5191–5196.
- Murthy, K. N. C., Vanitha, A., Rajesha, J., Swamy, M. M., Sowmya, P. R. e Ravishankar, A. 2005. In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* - a green microalga. *Life Sciences*, 76:1381-1390.
- Nagato, L. A. F., Duran, M. C., Caruso, M. S. F., Barsotti, R. C. F. e Badolato, E. S. G. 2001. Monitoramento da autenticidade de amostras de bebidas alcoólicas enviadas ao Instituto Adolfo Lutz em São Paulo. *Ciência e Tecnologia Alimentar*, 21:39-42.
- Najafpour, G. D. e Kang, L. J. 2002. Evaluation and Isolation of ethanol producer strain smp-6. The proceedings of Regional Symposium on Chemical Engineering.
- Norma Portuguesa 2139, 1987. Bebidas alcoólicas e espirituosas. Determinação do teor de acidez total. IPQ.
- Norma Portuguesa 2143, 1987. Bebidas alcoólicas e espirituosas. Determinação do teor alcoólico em volume (grau alcoólico volumétrico). IPQ
- Norma Portuguesa 3263, 1990. Bebidas alcoólicas e espirituosas: Determinação dos teores de etanol, acetato de etilo, metanol, 2-butanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-propeno-1-ol, 1-butanol, 2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol. IPQ.
- Norma Portuguesa 785, 1985. Derivados de frutos e de produtos hortícolas. Determinação do resíduo seco solúvel. IPQ.
- Novais, M. H., Santos, I., Mendes, S. e Pinto-Gomes, C. 2004. Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 93:183-195.
- Oliveira, A. C., Valentim, I. B. e Goulart, M. O. F., Silva, C. A., Bechara, E. J. H e Trevisan, M. T. S. 2009. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, 32:689-702.
- Oliveira, E. S., Rosa, C. A., Morgano, M. A. e Serra, G. E. 2005. The production of volatile compounds by yeasts isolated from small Brazilian cachaça distilleries. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21:1569-1576.
- Oliveira, I., Baptista, P., Bento, A. e Pereira, J. A. 2011. *Arbutus unedo* L. and its benefits on human health. *Journal of Food and Nutrition Research*, 50:73-85.
- Organisation Internationale de la Vigne et du Vin.(OIV) 2009. Résolution OIV/OENO 379/2009. Actualisation du Recueil des methodes internationales d’analyse des boissons spiritueuses d’origine vitivinicole de l’OIV – Partie 1. OIV

- Özcan, M. M. e Haciseferoğullari, H. 2007. The Strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: Chemical composition, physical properties and mineral contents. *Journal of Food Engineering*, 78:1022-1028.
- Paine, A. J. e Dayan, A. D. 2001. Defining a tolerable concentration of methanol in alcoholic drinks. *Human & Experimental Toxicology*, 20:563-568.
- Palet, J. S. C. 2012. Alterações físico-químicas e microbiológicas num produto à base de tomate embalado em Doypack, ao longo do tempo de prateleira. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, Portugal.
- Pallauf, K., Rivas-Gonzalo, J. C., del Castillo, M. D., Cano, M. P. e Pascual-Teresa, S. 2008. Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21:273-281.
- Patrício I., Canas S. e Belchior A. P. 2005. Effect of brandies' agitation on the kinetics of extraction/oxidation and diffusion of wood extractable compounds in experimental model. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 20, 1-15.
- Pawlowska, A. M., Leo, M. e Braca, A. 2006. Phenolics of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) fruits: Identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:10234-10238.
- Pereira, N. E., Cardoso, M. G., Azevedo, S. M., Morais, A. R., Fernandes, W. e Aguiar, P. M. 2003. Compostos secundários em cachaças produzidas no estado de minas gerais. *Ciência e Agrotecnologia*, 27:1068-1075.
- Pimentel, J. M. P. A. 1881. Memórias da vila de Oleiros e do seu concelho. Typ. da Virgem Immaculada. Angra do Heroísmo, 358p.
- Pinto, P. e Morais, A. 2000. Boas Práticas para conservação de produtos hortofrutícolas. Associação para a Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica, Porto, 33p.
- Priyadarsini, K. I., Khopde, S. M., Kumar, S. S., Mohan, H. 2002. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:2200-2206.
- Quaresma H. 2000. Evolução da composição fenólica de aguardentes Lourinhã ao longo dos quatro primeiros anos de envelhecimento. Dissertação de licenciatura. Escola Superior Agrária de Santarém. Santarém, Portugal.
- Querol, A. e Fleet, G. 2006. The yeast handbook: Yeasts in food and beverages. 1ª Edição. Springer-Verlag Berlim, Alemanha 453p.
- Ramirez-Tortosa, C., Andersen, Ø. M., Gardner, P. T., Morrice, P. C., Wood, S. G., Duthie, S. J., Collins, A. R. e Duthie, G. G. 2001. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 31:1033-1037.
- Regulamento CE n.º 110/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 15 de Janeiro de 2008 *Jornal Oficial da Comunidade Europeia*, L 39, 16-54.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. e Lonvaud, A. 1998. *Traité d'Oenologie - Microbiologie du vin. Vinifications. Pratiques vitivinicoles*, Collectif, França, 704p.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. e Lonvaud, A. 2006. *Handbook of enology. The Microbiology of Wine and Vinifications. Volume 1*. John Wiley & Sons Ltd, Londres, 497p.

- Roginsky, V. e Lissi, E. A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92:235-254.
- Sangorrín, M. P., Lopes, C. A., Giraudo, M. R. e Caballero, A. C. 2007. Diversity and killer behaviour of indigenous yeasts isolated from the fermentation vat surfaces in four Patagonian wineries. *International Journal of Food Microbiology*, 119:351-357.
- Santos, C., Botelho, G., Caldeira, I., Torres, A. e Ferreira, F. 2013a. Comparison of chemical assays reliability for antioxidant activity assessment in fruit spirits and liquors. (submetido)
- Santos, C., Franco, J e Botelho, G. (b). 2013b. Contribuição para a avaliação da evolução da maturação do medronho na sua pós-colheita. *Agrotec* (in press).
- Santo, D. M. C. E. 2010. Controlo e análise do processo de produção de Aguardente de Medronho na Serra do Caldeirão. Dissertação de mestrado. Instituto Superior de Engenharia, Universidade do Algarve. Faro, Portugal.
- Sarni, F., Moutonet, M. e Puech, J.-L. 1991. Composés phenolics extractibles de copeaux de bois de chêne. In: *Les eaux-de-vie Traditionnelles d'origine Viticole*. Tec & Doc, 231-239.
- Silva, F. e Morais, A. 2000. Boas Práticas de pós-colheita para Frutos Frescos. Associação para a Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica, Porto, 29p.
- Silva, M. L. e Malcata, F. X. 1998. Relationships between storage conditions of grape pomace and volatile composition of spirit obtained therefrom. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49:56-64.
- Silva, M. L. e Malcata, F. X. 1999. Effects of time of grape pomace fermentation and distillation cuts on the chemical composition of grape marcs. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A*, 208:134-143.
- Silva, M. L., Malcata, F. X. e Revel, G. 1996. Volatile Contents of Grappe Marcs in Portugal. *Journal of Food and Comparative Analysis*, 9:72-80.
- Singleton, V. L. e Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16:144-158.
- Soufleros, E. e Bertrand, A. 1987. Etude sur le “Tsipouro”, eau-de-vie de marc traditionnelle de Grèce, précurseur de l’ouzo. *Connaissance de la vigne et du vin*, 21:93-111.
- Soufleros, E. H., Mygdalia, A. e Natskoulis, P. 2004. Characterization and safety evaluation of the traditional Greek fruit distillate “Mouro” by flavor compounds and mineral analysis. *Food Chemistry*, 86:625-636.
- Soufleros, E. H., Mygdalia, S. A. e Natskoulis, P. 2005. Production process and characterization of the traditional Greek fruit distillate “Koumaro” by aromatic and mineral composition. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18:699-716.
- Soufleros, E. e Bertrand, A. 1990. La production artisanale du «Tsipouro» a Naoussa (Grece). In: *Les eaux-de-vie Traditionnelles d'origine Viticole*. Tec & Doc, 1991:19-27.
- Spano, N., Piras, I., Ciulu, M., Floris, I., Panzanelli, A., Pilo, M. I., Piu, P. C. e Sanna, G. 2009. Reserved-phase liquid chromatographic profile of free amino acids in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey. *Journal of AOAC International*, 92:73-84.
- Sroka, Z. e Cisowski, W. 2003. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 41:753-758.

- Sumerly, R. H. e Alvarez, H. 1997. Hidrolisados de amido no Brasil e sua produção. Centro de Raizes Tropicais, 49p.
- Taiz, L. e Zeiger, E. 2004. Fisiologia vegetal. 3ª Edição. Artmed, Porto Alegre, 719p.
- TECNAL Equipamentos para Laboratórios. 2009. Colorímetro. Modelos: CR-400 E CR-410. Características Técnicas. Disponível em: [www.tecnallab.com.br](http://www.tecnallab.com.br) Acedido em 2/1/2013
- Torres, J. A., Valle, F., Pinto, C., García-Fuentes, A., Salazar, C. e Cano, E. 2002. *Arbutus unedo* L. communities in southern Iberian Peninsula mountains. Plant Ecology, 160:207-223.
- Umar, A., Depont, F., Jacquet, A., Lignot, S., Segur, M. C., Boisseau, M., Bégaud, B. e Moore, N. 2005. Effects of armagnac or vodka on platelet aggregation in healthy volunteers: a randomized controlled clinical trial. Thrombosis Research, 115, 31-37.
- Umar, A., Guerin, V., Renard, M., Boisseau, M., Garreau, C., Bégaud, B., Molimard, M. e Moore, N. 2003. Effects of armagnac extracts on human platelet function in vitro and on rat arteriovenous shunt thrombosis in vivo. Thrombosis Research, 110:135-140.
- Vera-Guzmán, A. M., Guzmán-Geronimo, R. I. e López, M. G. 2010. Major and minor compounds in a Mexican spirit, young mezcal coming from two *Agave* Species. Czech Journal of Food Science, 28:127-132.
- Versini, G., Seeber, R., Serra, A. D., Sferlazzo, G., Carvalho, B. e Reniero, F. 1995. Aroma compounds of arbutus distillates. Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence, 37:1779-1790.
- Vinson, J. A., Su, X., Zubik, L. e Bose, P. 2001. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49, 5315-5321.
- Viriot, C., Scalbert, A., Lapierre, C. e Moutounet, M. 1993. Ellagitannins and lignins in aging of spirits in oak barrels. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41:1872-1879.
- Viuda-Martos, M., Navajas, Y. R., Zapata, E. S., Fernández-López, J. e Pérez-Álvarez, J. A. 2009. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. Flavour and Fragrance Journal, 25:13-19.
- Walker, G. M. 2000. Yeast-physiology and biotechnology. Chichester: John Wiley and Sons, Nova Jérsea, 362p.
- Watkins, C. B., Nock, J. F. e Whitaker, B. D. 2000. Responses of early, mid and late season apple cultivars to postharvest application of 1-methylcyclopropene (1-MCP) under air and controlled atmosphere storage conditions. Postharvest Biology and Technology, 19:17-32.
- Yokoya, F. 1995 Fabricação da aguardente de cana: série fermentações industriais. Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”, 92 p.
- Yoshimoto, M., Okuno, S., Yamaguchi, M. e Yamakawa, O. 2001. Antimutagenicity of deacylated anthocyanins in purple-fleshed sweetpotato. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 65:1652-1655.
- Zaldivar, C. P., Abda, J. B., Ebeler, S. E. e Kader, A. A. 2007. Quality and chemical changes associated with flavor of camarosa strawberries in response to a CO<sub>2</sub> enriched atmosphere. Hortscience, 42:299-303.
- Ziyyat, A. e Boussairi, E-H. 1998. Cardiovascular effects of *Arbutus unedo* L. in spontaneously hypertensive rats. Phytotherapy Research, 12:110-113

Ziyyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M. e Benjelloun, W. 1997. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. Journal of Ethnopharmacology, 58:45-54.

## Anexos 1 – Especificações técnicas de um colorímetro comercial utilizado como referência.



### Características Técnicas

Modelos:	CR-400	CR-410
Geometria de Medição	d/0; iluminação difusa, ângulo de observação 0°. SCI -componente especular incluso	
Detector	6 Fotocélulas de silicone	
Faixa disponível	Y:0 a 100,00%; reflectância	
Fonte de luz	Lâmpada de xenônio	
Tempo de medição	Aproximadamente 1s	
Intervalo mínimo entre medições	3s	
Performance da bateria	Aproximadamente 800 medições (quando utiliza baterias testadas pela Konica Minolta)	
Áreas de iluminação e medição	Ø11/ Ø8	Ø53/ Ø40
Correlação inter instrumentos	Média baseada na série II de 12 cerâmicas coloridas BCRA ΔE*ab 0,06	ΔE*ab 0,08
Repetibilidade	Quando o padrão de calibração branco é medido 30 vezes em intervalos de 10 s após a calibração do branco. Desvio padrão ΔE*ab 0,07	
Observador	2 graus próximo do observador padrão CIE 1931 (XYZ)	
Iluminantes	C, D65	
Visor	Valores cromáticos, diferenças de cor, aviso de aprovado / atenção / reprovado	
Avaliação de Tolerâncias	Tolerância da diferença de cor em caixa ou elipse	
Idiomas	Teclas de operação: Inglês - LCD: Inglês, Alemão, Espanhol, Francês, Italiano e Japonês	
Arquivo de dados	1000 (cabeçote de medição e processador de dados arquivam dados diferentes)	
Arquivo de padrões	100	
Canais de calibração	20 canais (ch00: calibração de branco, ch01 a ch19: calibração do usuário)	
Visor	Matriz de pontos LCD com luz de fundo (15 caracteres x 9 linhas + 1 linha para o ícone)	
Espaços de cor e dados colorimétricos	XYZ, Yxy, L*a*b*, Hunter Lab, L*C*h, Munsell (apenas para iluminante C), CMC (l:c), CIE1994, Lab99, LCh99, CIE2000, CIE W1*Tw (apenas iluminante D65), WI ASTM E313 (apenas para iluminante C), YI ASTM D1925 (apenas iluminante C), YI ASTM E313 (apenas iluminante C) Até 6 índices de usuário podem ser registrados via PC	
Variação de temperatura	Reflectância espectral: ± 0,30% / °C; Diferença de cor: ΔE*ab 0,05 / °C	
Interface	Padrão RS-232-C	
Alimentação	4 baterias \$\$\$ alcalinas ou Ni-MH; Adaptador AC (AC-A17); AC120V- 50/60Hz; AC230V-50/60Hz	
Faixa de operação de temperatura e umidade	0-40°C Umidade relativa menor que 85% a 35°C sem condensação	
Faixa de armazenagem de temperatura e umidade	-20 a 40°C Umidade relativa menor que 85% a 35°C sem condensação	
Dimensões	102(l) x 217(a) x 63(p)	102(l) x 244(a) x 63(p)
Peso	550g incluindo 4 AAA baterias	
Aplicação	Equipamento portátil utilizado para medição e padronização de cor na produção e controle de qualidade na indústria alimentícia	

Tecnial - Equipamentos para Laboratórios Ltda.  
 Av. Pasteur, 544 - Vila Rezende - Caixa Postal 1400 - CEP 13.414- 906 - Piracicaba - SP - BRASIL  
 Fone: +55 19 2105-6161 - Fax: + 55 19 3421-6656  
 Internet: [www.tecnialab.com.br](http://www.tecnialab.com.br) - E-mail: [vendas@tecnialab.com.br](mailto:vendas@tecnialab.com.br)

MODELO  
CR-400  
e 410