

CARACTERIZAÇÃO NUTRITIVA E FUNCIONAL DE VARIEDADES DE MAÇÃ DE ALCOBAÇA

RELATÓRIO FINAL

Preparado para: Associação dos Produtores de Maçã de Alcobaça
Rua de Leiria, Apartado nº 62
2460-059 Alcobaça

À atenção de: Engº Jorge Manuel Pereira Soares;
Engº Pedro Manuel D. T. Oliveira Maia

Preparado por: Domingos P. F. Almeida & Manuela Pintado
Centro de Biotecnologia e Química Fina,
Escola Superior de Biotecnologia,
Universidade Católica Portuguesa,
Rua Dr. António Bernardino de Almeida
4200-072 Porto
Contacto: dfalmeida@esb.ucp.pt

Data: 31 Dezembro 2007

SUMÁRIO EXECUTIVO

Este relatório apresenta a caracterização nutritiva e funcional de sete a oito variedades de maçã de Alcobaça. Os frutos foram analisados num estado de maturação adequado ao consumo e devidamente caracterizado.

Valor nutritivo. O teor calórico das variedades analisadas foi de 53 kcal/100g com uma variação entre 45 kcal/100g na Granny Smith e 61/100g kcal na Reineta, o que reflecte principalmente a variação de açúcares solúveis e de hidratos de carbono totais. As maçãs apresentaram um teor médio em fibra alimentar de 2,1 g/100g, destacando-se o teor de fibra mais elevado na Casa Nova (2,7 g/100g) e na Reineta (2,4 g/100g). Esta última variedade também apresenta um teor em minerais (cinzas) superior à media.

Actividade antioxidante e fitoquímicos funcionais. Foi determinada a actividade antioxidante na casca e na polpa dos frutos. As variedades Reineta e Casa Nova possuem maior actividade antioxidante na polpa e a Starking destaca-se na actividade antioxidante da casca. A menor actividade antioxidante da casca registou-se nas cultivares Golden Delicious e Granny Smith. Em relação aos compostos fitoquímicos com actividade antioxidante, destaca-se o elevado teor em vitamina C da Reineta, o elevado teor em fenois totais na polpa da Reineta, Jonagored, Casa Nova, Fuji e Starking. As variedades Reineta e Casa Nova foram aquelas que apresentaram maiores níveis de flavonóides na polpa. Embora a Reineta tivesse apresentado um elevado nível de flavonóides totais, os níveis de quercitina e de rutina nesta variedade ficaram abaixo do limite de detecção. Estes dois flavonóides encontram-se na casca, com teores médios de 7,3 mg/kg e de 5,6 mg/kg para a quercetina e rutina, respectivamente. Em relação ao teor em antocianinas na casca, destacam-se as variedades Starking e Galaxy. Granny Smith, Reineta e Starking formam o grupo com maior teor de carotenóides.

Conclusões. Este estudo permitiu obter dados reais sobre o valor nutritivo de cada uma das variedades de maçã de Alcobaça que não se encontram de uma forma individualizada na bibliografia e que podem apoiar uma estratégia de segmentação do mercado baseada em variedades. Mais interessante foi a elevada variabilidade identificada na actividade antioxidante e nos principais grupos de fitoquímicos. Existe aqui potencial para valorizar praticamente todas

as variedades uma vez que existem atributos funcionais em que quase todas se podem destacar. O estudo suporta ainda a vantagem de consumir maçã com a casca, onde se localizam os fitoquímicos funcionais.

ÍNDICE GERAL

Sumário executivo	1
Índice geral.....	3
Índice de quadros	5
Índice de Figuras	5
1. Introdução	6
1.1. Objectivos	6
1.2. Organização do relatório	7
2. Resultados	8
2.1. Estado de maturação.....	8
2.1.1. Cor da casca.....	8
2.1.2. Firmeza	9
2.1.3. Teor em sólidos solúveis e acidez	10
2.2. Valor nutritivo	11
2.3. Actividade antioxidante e principais fitoquímicos	13
2.3.1. Actividade antioxidante	14
2.3.2. Capacidade protectora do DNA	15
2.3.3. Ácido ascórbico	16
2.3.4. Fenóis totais	16
2.3.5. Flavonóides totais, quercetina e rutina	17
2.3.6. Antocianinas.....	18
2.3.7. Carotenóides	19
3. Metodologia.....	21
3.1. Material vegetal.....	21
3.2. Caracterização do estado de maturação	21
3.2.1. Cor	21
3.2.2. Firmeza	21
3.2.3. Teor em sólidos solúveis.....	21
3.2.4. Acidez titulável	22
3.2.5. Índice de Thiault	22
3.3. Valor nutritivo	22
3.3.1. Preparação geral da amostra	22
3.3.2. Humidade e teor em matéria seca	22
3.3.3. Proteína total.....	23
3.3.4. Cinza total.....	23
3.3.5. Gordura total	23

3.3.6. Hidratos de carbono totais	23
3.3.7. pH	23
3.3.8. Fibra alimentar	24
3.3.9. Energia	24
3.4. Actividade antioxidante e fitoquímicos funcionais.....	24
3.4.1. Preparação geral da amostra	24
3.4.2. Ácido ascórbico	24
3.4.3. Fenóis totais	25
3.4.4. Actividade antioxidante	25
3.4.5. Capacidade de protecção do DNA	25
3.4.6. Carotenóides totais.....	25
3.4.7. Flavonóides totais	25
3.4.8. Índice de antocianinas.....	26
3.4.9. Quercetina e rutina.....	26
3.5. Análise dos dados	26
Anexo - Equipa do projecto	28

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1- Coordenadas cromáticas da epiderme de oito variedades de maçã pertencentes a distintas classes de coloração.	9
Quadro 2- Firmeza da polpa das cultivares de maçã na data da análise.....	9
Quadro 3- Teor em sólidos solúveis, acidez titulável, pH e índice de Thiault das cultivares de maçã analisadas.....	10
Quadro 4- Razão açúcares/ácidos de sete variedades de maçã e proposta de classificação.	11
Quadro 5- Energia, água, matéria seca e fibra alimentar de sete variedades de maçã de Alcobaça. Valores referem-se ao peso fresco da parte edível (conjunto de casca e polpa).....	12
Quadro 6- Energia, água, matéria seca e fibra alimentar de 6 variedades de maçã não identificadas. Todos os valores se referem ao peso fresco da parte edível.....	12
Quadro 7- Composição em nutrientes de sete cultivares de maçã de Alcobaça. Os valores são a média de três repetições. Todos os valores se referem ao peso fresco da parte edível.	13
Quadro 8- Composição média de 6 cultivares de maçã não identificadas. Todos os valores se referem ao peso fresco da parte edível.....	13
Quadro 9- Actividade antioxidante, expressa em equivalentes de ácido ascórbico.	14
Quadro 10- Concentração de ácido ascórbico (vitamina C) em sete variedades de maçã.	16
Quadro 11- Concentração em fenóis totais na polpa e na casca de oito variedades de maçã de Alcobaça.....	17
Quadro 12- Concentração em flavonóides totais na casca e na polpa de oito variedades de maçã. Os flavonóides totais estão expressos em equivalente de rutina.....	17
Quadro 13- Concentração de quercetina livre e de rutina (quercetina-rutinosídeo) na casca e na polpa de oito variedades de maçã.....	18
Quadro 14- Índice de antocianinas na casca de oito variedades de maçã.....	19
Quadro 15- Concentração de carotenóides totais em sete variedades de maçã de Alcobaça.....	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Efeito do sumo de maçã na protecção do DNA contra a oxidação.	15
--	----

1. INTRODUÇÃO

Diversos estudos recentes demonstram que a maçã é uma fruta com excelentes qualidades nutritivas e funcionais. No âmbito do projecto AGRO 937, intitulado “Demonstração da riqueza dos elementos nutricionais e de fitonutrientes na fruta qualificada do Oeste – Maçã de Alcobaça e Pêra Rocha do Oeste” procedeu-se à caracterização nutritiva e funcional das principais variedades de maçãs com Denominação de Origem Protegida “Maçã de Alcobaça”. Estas características serão divulgadas junto de técnicos da fileira e dos consumidores, consciencializando-os para a importância da maçã no âmbito de uma alimentação saudável.

No contexto deste projecto, a Associação dos Produtores de Maçã de Alcobaça solicitou à Escola Superior de Biotecnologia a elaboração de estudos visando a caracterização da composição nutricional e fitoquímica de variedades de maçã.

Neste relatório apresenta-se a caracterização do valor nutritivo das variedades de maçã estudadas e uma quantificação geral dos principais grupos de fitoquímicos existentes na maçã.

1.1. Objectivos

O estudo que ora se apresenta teve por objectivos:

- Caracterizar o estado de maturação dos frutos na altura da análise;
- Determinar o valor nutritivo de variedades de maçã, nomeadamente a energia, a fibra alimentar total, os hidratos carbono, a proteína bruta, a gordura total e o teor em cinzas.
- Determinar a actividade antioxidante da casca e da polpa das variedades de maçã;
- Quantificar os principais fitoquímicos presentes na casca e na polpa de variedades de maçã, nomeadamente, o ácido ascórbico, os fenois totais, os flavonóides totais, o índice de antocianinas e os carotenóides totais.

1.2. Organização do relatório

O relatório está organizado em três grandes secções. Na primeira secção (Capítulo 1) refere o âmbito do trabalho e os seus objectivos. Apresentam-se em seguida os resultados (Capítulo 2) e por fim, faz-se uma breve referência à metodologia utilizada (Capítulo 3). Os créditos aos membros da equipa que efectuou este estudo consta do anexo 1.

Os resultados (Capítulo 2) estão organizados nas seguintes secções:

- **Estado de maturação**, onde se sumaria a cor, firmeza, teor em sólidos solúveis, acidez titulável e pH que caracterizam o estado de maturação das maçãs;
- **Valor nutritivo**, onde se apresentam os resultados sobre a energia, teor em água e teor em matéria seca, fibra alimentar, hidratos de carbono, proteína, gordura e cinzas;
- **Actividade antioxidante e principais grupos de fitoquímicos**, nomeadamente, os fenóis totais, os flavonóides totais, os carotenóides totais e antocianinas.

Os resultados são apresentados em quadros, contendo a média e o respectivo erro padrão, com indicação do nível de significância estatístico.

2. RESULTADOS

2.1. Estado de maturação

As análises foram efectuadas em extractos de maçãs de Alcobaça (IGP) colhidas no estado de maturação comercial e armazenadas durante aproximadamente 6 semanas a 0 °C. As maçãs foram retiradas das câmaras a 3 Dez 2008, seleccionadas com base no calibre mais representativo do ponto de vista comercial para cada variedade e analisadas.

Uma vez que a composição dos frutos se altera durante o amadurecimento, torna-se necessário descrever o estado de maturação dos frutos analisados, para permitir eventuais comparações com outros valores publicados. O estado de maturação das maçãs na altura da análise foi caracterizado com base nos seguintes índices de maturação:

1. Cor da casca;
2. Firmeza da polpa;
3. Teor em sólidos solúveis;
4. Acidez titulável;
5. pH da polpa;
6. Índice de Thiault.

2.1.1. Cor da casca

A cor dos frutos foi caracterizada com base nas coordenadas cromáticas luminosidade (L^*), croma (C^*) e tonalidade (h). As diferenças entre cultivares foram significativas para cada uma das coordenadas cromáticas. As diferentes colorações da casca traduzem diferenças nos pigmentos dominantes e na sua concentração. Uma vez que alguns pigmentos de maçã (*e.g.* antocianinas e carotenos) possuem uma elevada actividade antioxidante, as diferenças de cor traduzem-se em diferenças na actividade antioxidante dos frutos.

Quadro 1- Coordenadas cromáticas da epiderme de oito variedades de maçã pertencentes a distintas classes de coloração.

Variedade	Classe coloração epiderme	Luminosidade	Croma	Tonalidade (°)
Casa Nova	Bicolor	55,4±2,9 b	27,8±1,2 cd	79,7±7,6 c
Fuji	Vermelha	49,5±2,6 c	38,2±0,7 a	53,7±4,4 d
Golden Delicious	Amarela	70,1±0,5 a	34,9±0,1 b	104,7±1,0 b
Granny Smith	Verde	52,8±0,8 bc	29,9±0,4 c	121,2±0,3 a
Jonagored	Bicolor	42,8±2,0 d	33,6±0,9 b	31,6±3,3 e
Reineta	Parda	43,5±0,7 d	20,8±0,4 e	83,2±1,3 c
Galaxy	Bicolor	41,3±2,3 d	28,2±1,6 cd	48,5±6,4 d
Starking	Vermelha	26,7±1,3 e	26,0±1,1 d	18,5±1,1 f
Significância (P)		0,000	0,000	0,000

Os valores são a média ± erro padrão (n=20). Separação de médias pelo teste de Duncan ao nível de significância $\alpha \leq 0,05$.

2.1.2. Firmeza

Verificaram-se diferenças significativas da dureza da polpa entre as cultivares (Quadro 2). Na data da análise um conjunto de variedades possuía uma firmeza superior a 6 kgf (Fuji, Granny Smith, Reineta, Starking, Galaxy), a Casa Nova tinha uma firmeza de 5,8 kgf enquanto a Golden Delicious e a Jonagored tinham uma firmeza claramente inferior a 5 kgf.

Quadro 2- Firmeza da polpa das cultivares de maçã na data da análise.

Variedade	Firmeza da polpa (kgf)
Casa Nova	5,8±0,2 c
Fuji	7,0±0,2 a
Golden Delicious	4,2±0,1 d
Granny Smith	6,3±0,2 b
Jonagored	4,4±0,1 d
Reineta	6,3±0,2 b
Galaxy	6,9±0,2 a
Starking	6,7±0,2 ab
Significância (P)	0,000

Os valores são a média ± erro padrão (n=20). Separação de médias pelo teste de Duncan ao nível de significância $\alpha \leq 0,05$.

2.1.3. Teor em sólidos solúveis e acidez

Açúcares e ácidos constituem a base da percepção sensorial do sabor da maçã. As diferenças entre as cultivares estudadas foram significativas para o teor em sólidos solúveis, acidez total, pH e índice de Thiault.

O teor em sólidos solúveis (açúcares) variou entre um mínimo de 10.8% na variedade Granny Smith e um máximo de 15% na Reineta. A Reineta foi também a variedade com maior acidez total (0,73%), seguindo-se a Granny Smith (0,60%) e a Casa Nova (0,53%). As restantes variedades apresentaram uma acidez inferior ou igual a 0,30%.

Quadro 3- Teor em sólidos solúveis, acidez titulável, pH e índice de Thiault das cultivares de maçã analisadas.

Variedade	Sólidos solúveis (g/100g)	Acidez titulável (g malato/100g)	pH	Índice de Thiault
Casa Nova	13,2±0,4 b	0,53±0,03 c	3,41±0,02 d	185,0±7,0 b
Golden Delicious	12,4±0,3 b	0,23±0,03 de	3,99±0,04 b	147,7±4,9 e
Granny Smith	10,8±0,6 c	0,60±0,00 b	3,36±0,01 d	168,3±6,1 c
Jonagored	13,7±0,4 b	0,30±0,00 d	3,79±0,03 c	166,7±4,4 cd
Reineta	15,0±0,3 a	0,73±0,03 a	3,33±0,01 d	223,3±3,2 a
Galaxy	13,3±0,3 b	0,30±0,00 d	3,87±0,03 c	163,3±3,3 cde
Starking	13,2±0,5 b	0,20±0,00 e	4,08±0,01 a	151,7±4,8 de
Média variedades	13,1±0,5	0,41±0,08	3,69±0,12	172,3±9,7
Significância (P)	0,000	0,000	0,000	0,000

Os valores são a média ± erro padrão ($n=3$). Separação de médias pelo teste de Duncan ao nível de significância $\alpha \leq 0,05$.

A percepção sensorial das maçãs depende, em larga medida, da relação entre o teor em açúcares (teor em sólidos solúveis) e o teor em ácidos orgânicos (acidez titulável). O índice de Thiault (Quadro 3) é uma forma de expressar essa relação. Uma forma mais expedita consiste em adoptar a razão açúcares/ácidos para classificar as maçãs em grupos sensoriais e de aptidão culinária. De acordo com este critério, as maçãs analisadas seriam classificadas de acordo com o Quadro 4. De uma forma simplista, adoptaram-se apenas duas classes, tendo as variedades com uma razão açúcares/ácidos superior à média sido classificadas

como “doces” enquanto aquelas que apresentaram uma razão açúcares/ácidos superior à média colocadas na categoria das “ácidas”.

Quadro 4- Razão açúcares/ácidos de sete variedades de maçã e proposta de classificação.

Variedade	Classe	Razão açúcares/ácidos
Casa Nova	Ácida	25±1 d
Golden Delicious	Doce	55±7 b
Granny Smith	Ácida	18±1 d
Jonagored	Doce	46±1 c
Reineta	Ácida	21±1 d
Galaxy	Doce	44±1 c
Starking	Doce	66±2 a
Média variedades		39±7
Significância (P)		0.000

Os valores são a média ± erro padrão ($n=3$). Separação de médias pelo teste de Duncan ao nível de significância $\alpha \leq 0,05$.

2.2. Valor nutritivo

O valor nutritivo de variedades de maçã foi caracterizado com base nos seguintes parâmetros:

1. Energia;
2. Teor em água e teor em matéria seca;
3. Fibra alimentar total;
4. Hidratos de carbono;
5. Proteína bruta;
6. Gordura total;
7. Teor em cinzas.

Determinou-se ainda o teor em vitamina C (ácido ascórbico total) que será apresentado na secção referente à actividade antioxidante (2.3).

No Quadro 5 apresentam-se os valores médios de água, matéria seca, energia e fibra alimentar das variedades de maçã analisadas. Os valores médios de energia, de água/matéria seca e de fibra alimentar obtidos são semelhantes à média de 6 variedades não identificadas reportada na *Tabela da Composição de Alimentos* publicada pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (cf.

Quadro 6; INSA, 2006). No entanto, existem diferenças significativas entre variedades em relação ao teor em água e matéria seca, fibra alimentar e valor calórico.

Quadro 5- Energia, água, matéria seca e fibra alimentar de sete variedades de maçã de Alcobaça. Valores referem-se ao peso fresco da parte edível (conjunto de casca e polpa).

Variedade	Energia (kcal)	Água (g/100g)	Matéria seca (g/100g)	Fibra alimentar (g/100g)
Casa Nova	53,4±1,4 b	83,6±0,2 cd	16,4±0,2 ab	2,7±0,1 a
Golden Delicious	49,6±1,1 bc	86,6±0,2 ab	13,4±0,2 cd	1,5±0,0 f
Granny Smith	45,2±2,2 c	87,7±0,8 a	12,3±0,8 d	1,9±0,0 d
Jonagored	54,1±1,5 b	82,7±1,4 cd	17,3±1,4 ab	2,2±0,1 c
Reineta	61,2±0,9 a	81,7±0,1 d	18,3±0,1 a	2,4±0,1 b
Galaxy	53,4±1,3 b	84,7±0,3 bc	15,3±0,3 bc	1,8±0,0 e
Starking	52,2±1,8 b	84,3±0,5 c	15,7±0,5 b	2,0±0,1 d
Média variedades	52,7±1,8	84,5±0,8	15,5±0,8	2,1±0,1
Significância (P)	0,000	0,000	0,000	0,000

Os valores são a média ± erro padrão (n=3). Separação de médias pelo teste de Duncan ao nível de significância $\alpha \leq 0,05$.

Quadro 6- Energia, água, matéria seca e fibra alimentar de 6 variedades de maçã não identificadas. Todos os valores se referem ao peso fresco da parte edível.

Maçã	Energia (kcal)	Água (g/100g)	Fibra alimentar (g/100g)
Com casca	57	82,9	2,1
Sem casca	54	83,8	1,9

Fonte: INSA (2006).

As amostras analisadas apresentaram, em média, valores de hidratos de carbono, proteína e gordura superiores aos valores médios referidos na *Tabela da Composição de Alimentos* (INSA, 2006) e um teor em cinzas (minerais) inferior (cf. Quadro 7 e Quadro 8). Observaram-se diferenças significativas entre variedades quanto ao teor em hidratos de carbono, cinza e proteína, mas não em relação ao teor em gordura.

Quadro 7- Composição em nutrientes de sete cultivares de maçã de Alcobaça. Os valores são a média de três repetições. Todos os valores se referem ao peso fresco da parte edível.

Variedade	Hidratos carbono totais (g/100g)		Proteína total (g/100g)		Gordura total (g/100g)		Cinza total (g/100g)	
Casa Nova	15,7±0,2	ab	0,30±0,00	bc	0,13±0,03		0,23±0,00	b
Golden Delicious	12,8±0,2	cd	0,33±0,03	bc	0,10±0,00		0,18±0,01	c
Granny Smith	11,5±0,8	d	0,47±0,03	a	0,10±0,00		0,20±0,01	c
Jonagored	16,7±1,4	ab	0,27±0,03	c	0,10±0,00		0,19±0,02	c
Reineta	17,5±0,1	a	0,47±0,03	a	0,10±0,00		0,28±0,01	a
Galaxy	14,6±0,4	bc	0,40±0,06	ab	0,10±0,00		0,24±0,00	b
Starking	15,1±0,5	b	0,33±0,03	bc	0,10±0,00		0,20±0,00	c
Média variedades	14,9±0,8		0,37±0,03		0,10±0,00		0,22±0,01	
Significância (P)	0,000		0,006		0,463		0,000	

Os valores são a média ± erro padrão ($n=3$). Separação de médias pelo teste de Duncan ao nível de significância $\alpha \leq 0,05$.

Quadro 8- Composição média de 6 cultivares de maçã não identificadas. Todos os valores se referem ao peso fresco da parte edível.

Maçã	Hidratos carbono totais (g/100g)	Proteína total (g/100g)	Gordura total (g/100g)	Cinza total (g/100g)
Com casca	13,4	0,2	0,5	0,32
Sem casca	12,7	0,2	0,5	0,32

Fonte: INSA (2006).

2.3. Actividade antioxidante e principais fitoquímicos

Procedeu-se à determinação da actividade antioxidante de extractos de maçã e quantificaram-se os principais grupos de compostos fitoquímicos presentes na casca e na polpa de variedades de maçã. Consideraram-se os seguintes fitoquímicos:

1. Fenois totais;
2. Flavonóides totais;
3. Quercitina e rutina;
4. Carotenoides totais;
5. Antocianinas totais.

2.3.1. Actividade antioxidante

A actividade antioxidante foi avaliada separadamente na casca e na polpa das maçãs. Uma vez que existem nos frutos antioxidantes hidrossolúveis (e.g. fenóis e ácido ascórbico) e antioxidantes lipossolúveis (e.g. carotenóides e tocoferóis), procedeu-se à análise da actividade antioxidante num extracto metanólico (que solubiliza os antioxidantes hidrossolúveis) e num extracto de acetona (para avaliar os antioxidantes lipossolúveis).

A actividade antioxidante no extracto metanólico foi, em média, 5 e 10 vezes superior à do extracto em acetona, na casca e polpa, respectivamente (Quadro 9). Este resultado sugere que os compostos fenólicos (e o ácido ascórbico, mas este presente em muito menor quantidade) serão os principais responsáveis pela actividade antioxidante das maçãs. No entanto, as diferenças entre variedades indicam que os antioxidantes lipossolúveis podem dar um contributo importante para a actividade antioxidante da casca das variedades Granny Smith e Golden Delicious.

A actividade antioxidante (hidrossolúvel) da casca foi, em média, quase 5 vezes superior à da polpa. Destaca-se a elevada actividade antioxidante hidrossolúvel na polpa da Reineta e da casca da Starking. De um modo geral, variedades amarelas (Golden Delicious) e verdes (Granny Smith) apresentaram menor actividade antioxidante na casca do que as variedades vermelhas, bicolores e pardas.

Quadro 9- Actividade antioxidante, expressa em equivalentes de ácido ascórbico.

Variedade	Actividade antioxidante (mg ácido ascórbico / g peso fresco)							
	Extracto metanólico ¹				Extracto em acetona ²			
	Polpa		Casca		Polpa		Casca	
Casa Nova	0,77±0,08	b	3,27±0,18	b	0,14±0,03	a	0,59±0,06	ab
Fuji	0,34±0,02	e	1,98±0,06	cd	0,05±0,00	b	0,65±0,03	ab
Golden Delicious	0,48±0,00	de	1,82±0,47	cd	0,03±0,00	b	0,21±0,03	c
Granny Smith	0,54±0,04	cd	1,78±0,13	d	0,05±0,01	b	0,57±0,06	ab
Jonagored	0,65±0,02	bc	3,00±0,52	bc	0,09±0,04	ab	0,58±0,06	ab
Reineta	1,06±0,05	a	3,51±0,30	b	0,07±0,04	ab	0,83±0,12	a
Galaxy	0,54±0,03	cd	2,93±0,32	bcd	0,03±0,01	b	0,42±0,05	bc
Starking	0,61±0,07	cd	5,49±0,59	a	0,02±0,01	b	0,79±0,23	a
Média variedades	0,62±0,08		2,97±0,43		0,06±0,01		0,58±0,07	
Significância (P)	0,000		0,000		0,033		0,013	

Os valores são a média ± erro padrão ($n=3$). Separação de médias pelo teste de Duncan ao nível de significância $\alpha \leq 0,05$. ¹Relacionado com a actividade antioxidante de compostos hidrossolúveis (e.g. compostos fenólicos e ácido ascórbico); ²Relacionado com a actividade antioxidante de compostos lipossolúveis (e.g. tocoferóis e carotenóides).

2.3.2. Capacidade protectora do DNA

Numa metodologia complementar para avaliar a actividade antioxidante, determinou-se a capacidade do sumo de maçã proteger o DNA, evitando a sua fragmentação na presença de compostos oxidantes. Verificou-se que o sumo de maçã não evidenciou acção de protecção da oxidação do DNA (Figura 1). No entanto, os resultados asseguram que nenhum dos sumos apresenta acção pró-oxidante (acção de fragmentação do DNA).

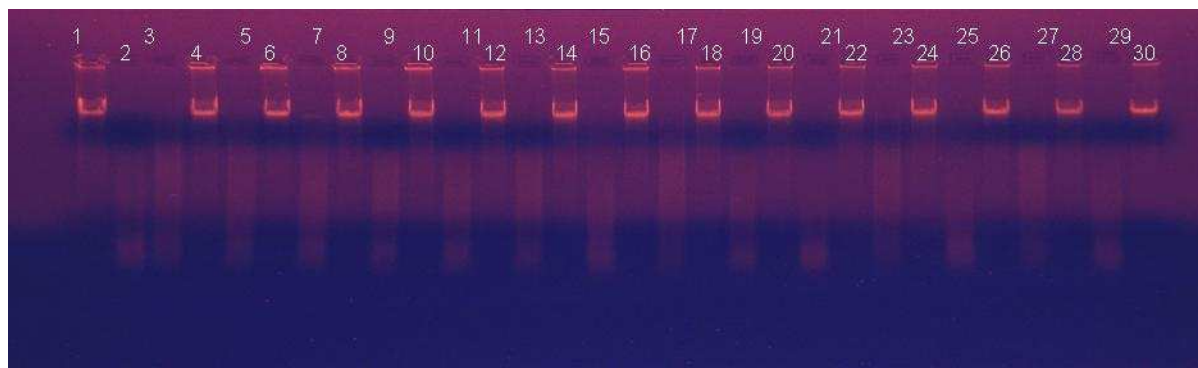


Figura 1- Efeito do sumo de maçã na protecção do DNA contra a oxidação.

Legenda: 1- Controlo positivo (DNA + solução tampão); 2- Controlo negativo (DNA + oxidantes); 3- DNA + oxidantes + Galaxy casca; 4- DNA + Galaxy casca; 5- DNA + oxidantes + Casanova casca; 6- DNA + Casanova casca; 7- DNA + oxidantes + Jonagored casca; 8- DNA + Jonagored casca; 9- DNA + oxidantes + Golden casca; 10- DNA + Golden casca; 11- DNA + oxidantes + Reineta casca; 12- DNA + Reineta casca; 13- DNA + oxidantes + Granny Smith casca; 14- DNA + Granny Smith casca; 15- DNA + oxidantes + Starking casca; 16- DNA + Starking casca; 17- DNA + oxidantes + Alcobaça polpa; 18- DNA + Alcobaça polpa; 19- DNA + oxidantes + Casanova polpa; 20- DNA + Casanova polpa; 21- DNA + oxidantes + Jonagored polpa; 22- DNA + Jonagored polpa; 23- DNA + oxidantes + Golden polpa; 24- DNA + Golden polpa; 25- DNA + oxidantes + Reineta polpa; 26- DNA + Reineta polpa; 27- DNA + oxidantes + Granny Smith polpa; 28- DNA + Granny Smith polpa; 29- DNA + oxidantes + Starking polpa; 30- DNA + Starking polpa.

Apresentam-se em seguida os resultados referentes aos fitoquímicos relacionados com a actividade antioxidante: o ácido ascórbico, os fenóis totais, os flavonóides totais, dois dos principais flavonóides da maçã – quercetina e rutina – antocianinas e carotenóides totais.

2.3.3. Ácido ascórbico

O teor em ácido ascórbico total (vitamina C) variou significativamente em função da variedade. Destacou-se a Reineta, com uma concentração de 13,3 mg/100 g, muito superior à média de 3,1 mg/100 g das restantes variedades (Quadro 10). Estes valores são, em média, um pouco inferiores aos reportados pela *Tabela da Composição de Alimentos* (INSA, 2006) onde se referem 5 e 7 mg/100 g para maçãs sem casca e com casca, respectivamente (média de 6 variedades não identificadas).

Quadro 10- Concentração de ácido ascórbico (vitamina C) em sete variedades de maçã.

Variedade	Ácido ascórbico (mg/100 g)
Casa Nova	3,7±0,9 b
Golden Delicious	3,0±0,0 b
Granny Smith	2,7±0,7 b
Jonagored	3,3±0,3 b
Reineta	13,3±2,9 a
Galaxy	2,3±0,3 b
Starking	3,7±0,3 b
Média variedades	4,6±1,5
Significância (P)	0,000

Os valores são a média ± erro padrão ($n=3$). Separação de médias pelo teste de Duncan ao nível de significância $\alpha \leq 0,05$.

2.3.4. Fenóis totais

Os fenóis totais foram quantificados na casca e na polpa, separadamente. A concentração de fenóis totais na casca foi 5 vezes superior à encontrada na polpa das maçãs (média de 8 variedades). As variedades Reineta, Jonagored e Casa Nova apresentaram as maiores concentrações de fenóis na polpa, enquanto Starking, Reineta e Casa Nova apresentaram concentrações mais elevadas na casca (Quadro 11).

Quadro 11- Concentração em fenóis totais na polpa e na casca de oito variedades de maçã de Alcobaça.

Variedade	Fenóis totais			
	(mg equivalentes de ácido gálico/g peso fresco)			
	Polpa		Casca	
Casa Nova	1,08±0,09	ab	5,29±0,74	abc
Fuji	0,91±0,06	bc	1,47±0,04	f
Golden Delicious	0,56±0,02	c	3,62±0,42	de
Granny Smith	0,52±0,03	c	2,53±0,26	ef
Jonagored	1,12±0,36	ab	4,23±0,48	cd
Reineta	1,44±0,08	a	6,13±0,51	ab
Galaxy	0,71±0,09	bc	4,92±0,14	bcd
Starking	0,72±0,08	bc	6,51±0,36	a
Média variedades	0,88±0,11		4,34±0,62	
Significância (P)	0,004		0,000	

Os valores são a média ± erro padrão ($n=3$). Separação de médias pelo teste de Duncan ao nível de significância $\alpha \leq 0,05$.

2.3.5. Flavonóides totais, quercetina e rutina

As maçãs apresentaram uma concentração de flavonóides totais muito variável. Os flavonóides estão presentes na casca em concentrações 4 a 10 vezes superiores às da polpa nas variedades, sendo a diferença mais elevada nas variedades vermelhas ou bicolores.

Quadro 12- Concentração em flavonóides totais na casca e na polpa de oito variedades de maçã. Os flavonóides totais estão expressos em equivalente de rutina.

Variedade	Flavonóides totais			
	(mg equivalentes de rutina / g peso fresco)			
	Polpa		Casca	
Casa Nova	2,2±0,2	b	9,3±0,5	bcd
Fuji	0,6±0,1	d	6,4±0,5	de
Golden Delicious	1,2±0,0	c	7,9±0,7	cde
Granny Smith	1,3±0,1	c	5,7±0,5	e
Jonagored	1,5±0,2	c	9,1±1,3	bcd
Reineta	3,3±0,1	a	11,8±0,9	ab
Galaxy	1,3±0,1	c	9,7±0,7	bc
Starking	1,6±0,2	c	14,5±1,9	a
Média variedades	1,6±0,3		9,3±1,0	
Significância (P)	0,000		0,000	

Os valores são a média ± erro padrão ($n=3$). Separação de médias pelo teste de Duncan ao nível de significância $\alpha \leq 0,05$.

Quantificaram-se dois dos principais flavonóides presentes na maçã, tendo-se obtido os resultados constantes do

Quadro 13. Estes dois flavonóides encontram-se na casca da maçã. As variedades Fuji, Casa Nova e Galaxy apresentaram concentrações mais elevadas de ambos os flavonóides. A Starking também se mostrou rica em quercetina e a Golden Delicious rica em rutina.

Quadro 13- Concentração de quercetina livre e de rutina (quercetina-rutinosídeo) na casca e na polpa de oito variedades de maçã.

Variedade	Polpa		Casca	
	Quercetina (mg/kg)	Rutina (mg/kg)	Quercetina (mg/kg)	Rutina (mg/kg)
Casa Nova	0,7±0,3	ND	10,3±1,0a	7,0±2,4abc
Fuji	0,1±0,1	ND	9,1±2,6a	10,6±2,2a
Golden Delicious	0,3±0,2	ND	6,1±2,6ab	9,2±1,7ab
Granny Smith	0,0±0,0	ND	2,3±0,5b	3,3±0,6bc
Jonagored	0,2±0,0	ND	7,6±1,6ab	2,4±0,7c
Reineta	0,4±0,2	ND	ND	ND
Galaxy	0,0±0,0	ND	10,6±1,1a	8,2±2,9abc
Starking	0,2±0,1	ND	12,4±3,1a	4,2±1,7bc
Média variedades	0,2±0,1	ND	7,3±1,5	5,6±1,3
Significância (P)	0,091	-	0,003	0,008

Os valores são a média ± erro padrão ($n=3$). ND, não detectado. Separação de médias pelo teste de Duncan ao nível de significância $\alpha \leq 0,05$.

2.3.6. Antocianinas

As antocianinas são uma classe de flavonóides responsáveis pela coloração avermelhada de algumas variedades de maçã e existem exclusivamente na casca. Naturalmente, existem grandes diferenças na concentração de antocianinas na casca de variedades com coloração distinta (Quadro 14),

destacando-se as variedades Starking e a Galaxy com uma concentração de antocianinas muito superior à das restantes variedades (Quadro 14).

Quadro 14- Índice de antocianinas na casca de oito variedades de maçã.

Variedade	Índice de antocianinas (A ₅₃₀ por grama de peso fresco)
Casa Nova	0,197±0,035 de
Fuji	0,654±0,037 c
Golden Delicious	0,033±0,007 e
Granny Smith	0,037±0,007 e
Jonagored	0,315±0,077 d
Reineta	0,054±0,005 de
Galaxy	1,151±0,147 b
Starking	1,773±0,167 a
Média variedades	0,527±0,224
Significância (P)	0,000

Os valores são a média ± erro padrão ($n=3$). Separação de médias pelo teste de Duncan ao nível de significância $\alpha \leq 0,05$.

2.3.7. Carotenóides

Os carotenóides são um importante grupo de antioxidantes lipossolúveis. Além disso, alguns carotenóides podem ser convertidos em vitamina A no organismo humano.

Os carotenóides estão presentes principalmente na casca das maçãs. A concentração de carotenóides na casca variou significativamente com a variedade, enquanto na polpa todas as variedades apresentaram concentrações reduzidas e semelhantes entre si (Quadro 15).

A maior concentração em carotenóides encontrou-se na Granny Smith, Reineta e Starking.

Quadro 15- Concentração de carotenóides totais em sete variedades de maçã de Alcobaça.

Variedade	Carotenóides totais (mg/g)		
	Polpa	Casca	
Casa Nova	0,57±0,11	2,07±0,29	c
Golden Delicious	0,31±0,04	1,95±0,17	c
Granny Smith	0,30±0,03	4,97±0,10	a
Jonagored	0,38±0,10	3,22±0,39	bc
Reineta	0,48±0,16	4,00±0,34	ab
Galaxy	0,27±0,01	2,90±0,07	bc
Starking	0,29±0,10	4,08±1,03	ab
Média variedades	0,37±0,04	3,31±0,42	
Significância (P)	0,239	0,003	

Os valores são a média ± erro padrão ($n=3$). Separação de médias pelo teste de Duncan ao nível de significância $\alpha \leq 0,05$.

3. METODOLOGIA

3.1. Material vegetal

Foram estudadas maçãs (*Malus domestica*) das cultivares Golden Delicious, Starking, Reineta, Jonagored, Galaxy, Granny Smith, Fuji e Casa Nova de Alcobaça. Os frutos foram colhidos no estado de maturação comercial na região do Oeste em Agosto de 2007 e foram armazenados a 0 °C até 3 de Dezembro de 2007.

3.2. Caracterização do estado de maturação

3.2.1. Cor

A cor foi medida na região equatorial do fruto com um colorímetro Minolta CR-300. Utilizou-se o espaço cromático CIELAB e expressou-se a cor nas coordenadas luminosidade (L^*), croma (C^*) e tonalidade (h). A luminosidade varia entre 0 (preto) e 100 (branco). O croma, traduz a saturação da cor, sendo a tonalidade tanto mais definida quanto maior for o croma e tanto mais acinzentada quanto menor for o croma. A tonalidade, expressa em grau, é vermelha para valores próximos de 0°, amarela para valores próximos de 90°, verde para valores em torno de 180° e azul para valores em torno de 270°.

3.2.2. Firmeza

A firmeza foi medida após remoção da casca, na região equatorial dos frutos, com um penetrómetro equipado com uma sonda de 11 mm.

3.2.3. Teor em sólidos solúveis

O teor em sólidos solúveis foi determinado por refractometria e expresso em gramas sacarose por 100 g de peso fresco (ou graus Brix), com base na NP EN 12143:1999.

3.2.4. Acidez titulável

A acidez titulável foi determinada por volumetria ácido-base e expressa em gramas de ácido málico por 100 g de peso fresco. Efectou-se a titulação de uma toma de amostra, em meio aquoso, com solução padrão de hidróxido de sódio até pH=8,1, de acordo com a NP 1421:1977.

3.2.5. Índice de Thiault

O índice de Thiault foi calculado a partir da determinação da acidez titulável e do teor em sólidos solúveis com base na fórmula:

$$IT = TSS + 10 \times AT$$

em que:

IT, índice de Thiault;

TSS, teor em sólidos solúveis, expresso em g.L⁻¹;

AT, acidez titulável, expressa em g.L⁻¹ ácido málico;

3.3. Valor nutritivo

3.3.1. Preparação geral da amostra

Os frutos foram descaroçados com um descaroçador de 25 mm de diâmetro e homogeneizados (com casca e polpa) antes de todas as análises relacionadas com a composição nutricional. As amostras de homogeneizado foram liofilizadas antes de serem sujeita à análise da fibra.

3.3.2. Humidade e teor em matéria seca

A humidade e o teor em matéria seca foram determinados através da secagem a 102 °C até peso constante, de acordo com o método - MSDA 22/2.1 do *Manuel Suisse des Denrées Alimentaires*.

3.3.3. Proteína total

O azoto total foi determinado pelo método de Kjeldhal e a proteína total calculada multiplicando o azoto total pelo factor de conversão 6,25, de acordo com a norma NP EN 12135:2000.

3.3.4. Cinza total

Para a determinação da cinza total procedeu-se à evaporação de uma toma de amostra em banho-maria, carbonização em placa de aquecimento e incineração a 550°C em mufla até peso constante, de acordo com o método MSDA 22/3 do *Manuel Suisse des Denrées Alimentaires*.

3.3.5. Gordura total

A gordura total foi determinada com base no método MSDA 22/5.1 do *Manuel Suisse des Denrées Alimentaires*. Procedeu-se à digestão de uma toma de amostra com ácido clorídrico diluído, filtração e secagem da matéria gorda retido no filtro; extracção com éter de petróleo da matéria gorda em aparelho de Soxhlet, durante 4h; eliminação do solvente por evaporação, secagem e pesagem do extracto até peso constante.

3.3.6. Hidratos de carbono totais

Os hidratos de carbono totais foram calculados através da subtracção da massa dos diferentes componentes da amostra (proteína, gordura, cinza, humidade).

3.3.7. pH

O pH do sumo foi medido directamente por potenciometria, seguindo a norma NP EN 1132:1996.

3.3.8. Fibra alimentar

A fibra alimentar foi determinada de acordo com o método enzimático gravimétrico, de acordo com os métodos AOAC 985.29 e AOAC 991.43 da *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*.

3.3.9. Energia

A energia da parte edível das maçãs foi determinada por cálculo, atribuindo um factor de conversão 9 kcal/g para o teor em gordura e 4 kcal/g para a proteína, 3,75 kcal/g para o hidratos de carbono (usaram-se os sólidos solúveis) e 3 kcal/g para os ácidos orgânicos.

3.4. Actividade antioxidante e fitoquímicos funcionais

3.4.1. Preparação geral da amostra

Foram excisados cilindros com 14 mm de diâmetro da região equatorial dos frutos. A casca foi removida da polpa com um bisturi, tendo-se adoptado uma espessura uniforme de 1 mm. Para análises da polpa utilizou-se tecido localizado logo abaixo da porção de casca com uma espessura de 10 mm.

O tecido foi triturado num almofariz com auxílio de 1 g de areia e extraído com metanol acidificado com HCl (fenóis, flavonóides e antocianinas) ou com água acidificada com HCl seguida de extracção com acetona (carotenóides).

3.4.2. Ácido ascórbico

A vitamina C total foi determinada por HPLC de acordo com a norma EN 14130: 2003. A vitamina C foi extraída de uma toma de amostra com uma solução de ácido metafosfórico. Procedeu-se à redução do ácido dehidroascórbico a ácido ascórbico com L-cisteína e quantificou-se o ácido ascórbico total por HPLC com detecção a 265 nm.

3.4.3. Fenóis totais

Os fenóis totais foram extraídos em metanol acidificado com 1% de ácido clorídrico e determinados por espectrofotometria a 750 nm através do método de Folin-Ciocalteu.

3.4.4. Actividade antioxidante

A actividade antioxidante baseada na oxidação do radical catiónico 2,2' azinobis(3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato) sal diamónio) (ABTS) com base no método descrito por Kim et al. (2003). Ácido ascórbico foi utilizado com padrão.

3.4.5. Capacidade de protecção do DNA

Avaliou-se a capacidade do sumo de maçã evitar a fragmentação de uma amostra de DNA por oxidação. Esta avaliação foi efectuada de uma forma qualitativa, por electroforese, de acordo com o método descrito por Gião et al. (2007).

3.4.6. Carotenóides totais

O carotenóides foram extraídos em acetona, depois da remoção das antocianinas em água acidificada com 1% HCl, e quantificados por espectrofotometria, através do valor da absorvância a 480 nm, com base no método de Jeffrey & Humphrey (1975).

3.4.7. Flavonóides totais

Os flavonóides totais foram determinados num extracto metanólico acidificado com 1% de ácido clorídrico de casca e de polpa. Foi efectuada a reacção descrita em Zhishen et al. (1999) e a quantificação foi efectuada por espectrofotometria a 510 nm.

3.4.8. Índice de antocianinas

O teor de antocianinas foi estimado num extracto de casca e de polpa em metanol acidificado com ácido clorídrico. Efectuou-se a medição directa da absorvância a 530 nm e expressou-se este valor na base do peso fresco.

3.4.9. Quercetina e rutina

O teor em quercitina e rutina foi determinado nos extractos metanólicos de polpa e de casca através de cromatografia líquida com detector de espectroscopia de massa.

3.5. Análise dos dados

Os dados foram sujeitos a análise de variância com um factor de efeitos fixos. Sempre que o efeito do factor *variedade* foi significativo, procedeu-se à comparação das medias recorrendo ao teste de Duncan.

Referências

- AOAC 985.29 e AOAC 991.43 da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC).
- EN 14130:2003 – Foodstuffs- determination of vitamin C by HPLC.
- INSA. 2006. Tabela da Composição de Alimentos. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa.
- Jeffrey, S. W. & Humphrey, G. F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie Und Physiologie Der Pflanzen*, 167:191-194.
- Kim, D.-O., Chun, O.K., Kim, Y.J., Moon, H.-Y., Lee, C.Y. 2003. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6509-6515
- Manuel Suisse des Denrées Alimentaires. Société Suisse des Chimistes Analystes.
- Maria S Gião, M.S., Gonzalez-Sanjose, M.L., Muñoz, P., Rivero-Perez, M.D., Kosinska, M., Pintado, M.E. & Malcata, F.X. 2007. Protection of deoxyribose and DNA from degradation by using aqueous extracts of several wild plants. *J Sci Food Agric* (DOI: 10.1002/jsfa).
- NP 1421:1977 – Géneros alimentícios derivados de frutos e de produtos hortícolas. Determinação da acidez.
- NP EN 1132:1996 - Sumos de frutos e produtos hortícolas. Determinação do valor de pH.
- NP EN 12135:2000 – Sumos de frutos e produtos hortícolas. Determinação do teor de azoto. Método de Kjeldahl.
- NP EN 12143:1999 – Sumos de frutos e produtos hortícolas. Determinação do teor de sólidos solúveis. Método refractométrico
- Zhishen, J., Mengcheng, T. & Jianming. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64: 555-559.

ANEXO - EQUIPA DO PROJECTO

O trabalho que aqui se apresenta foi efectuado por uma equipa de investigadores da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa e contou as seguintes contribuições:

- César Rodrigues, Técnico de tecnologia alimentar;
- Domingos P. F. Almeida, *Ph.D. Horticultural Sciences*, coordenador do estudo;
- Francisco Xavier Malcata, Professor Catedrático, Director da ESB;
- Joana Fundo, Engenheira alimentar;
- Manuela Pintado, Doutora em Biotecnologia;
- Maria Gião, Engenheira alimentar;
- Susana Gomes, Engenheira alimentar.