*Silva Lusitana* ***16****(1): 1 - 19, 2008*
*© EFN, Lisboa. Portugal*


# Caracterização de Parâmetros Biométricos e de Ácidos Gordos em Pinhões de Populações Portuguesas de *Pinus pinea* L.

**Isabel Evaristo*, Rogério Tenreiro** e Rita Costa***
*Investigador Auxiliar
Instituto Nacional de Investigação Agrária/INRB, I.P., Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-159 OEIRAS
**Professor Auxiliar c/Agregação
Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. ICAT – Unidade de Microbiologia, Biotecnologia e Biologia Molecular, Campo Grande, 1749-016 LISBOA

**Sumário.** Este estudo segue-se ao artigo já publicado intitulado "Caracterização de genótipos seleccionados de pinheiro manso para o controlo da qualidade do pinhão" e pretende ser uma contribuição para valorizar e proteger o pinhão de Alcácer do Sal, de modo a permitir a criação de uma Região de Denominação de Origem Protegida (DOP).

Avaliou-se a variabilidade de 14 parâmetros morfológicos nas pinhas e sementes de pinheiro manso, em quatro povoamentos na principal Região de Proveniência de modo a encontrar correlações que nos permitam seleccionar de forma expedita as características a melhorar. A Quinta do Sousa e a herdade de Monte Novo apresentaram potencial genético mais elevado. Nos mesmos povoamentos, determinámos o teor de gordura e de ácidos gordos com a finalidade de seleccionar clones a utilizar em futuros programas de plantações. Os resultados confirmaram que o pinhão apresenta teores elevados de gordura (43%), teores baixos em ácidos saturados (11%) e teores elevados em ácidos gordos polinsaturados (48%). Os ácidos gordos com valores mais elevados foram o linoleico e o oleico, que em conjunto apresentaram teores de 84% em relação ao total de ácidos gordos.
**Palavras-chave:** Pinheiro manso; parâmetros morfológicos; pinhas; sementes; ácidos gordos

**Characterisation of Biometric Parameters and Fatty Acids Content of *Pinus pinea* L. Pine Nuts of Portuguese Populations**

**Abstract.** This study is a follow up to the article already published entitled "Caracterização de genótipos seleccionados de pinheiro manso para o controlo da qualidade do pinhão" and intends to contribute to increase the value of the Alcácer do Sal pine nut and thereby create a region with a denomination of protected origin (DOP).

The variability of 14 morphological parameters was evaluated in the pine cones and the seeds, on four populations from the main Provenance Region, in order to find out correlations that allow us to quickly select the characteristics to improve. Quinta do Sousa and Monte Novo revealed higher genetic potential. In the same populations, the fatty acids content was also assessed in order to select clones to be used in future plantation programmes. The results

1º Autor E-mail: isabel.evaristo@efn.com.pt

confirmed that pine nut has high crude fat content (43%), low saturated fatty acids (SFA) (11%) and high polyunsaturated fatty acids (PUFA) (48%). The most abundant acids were the unsaturated linoleic and oleic, which comprise together about 84% of the total fatty acid content.
**Key words:** Stone pine; morphological parameters; cones; seeds; fatty acids

**Caractérisation des Paramètres Biométriques et des Acides Gras sur Pignon de *Pinus pinea* L. d'Origine Portugaise**

**Résumé.** À la suite de l'article publié sous le titre "Caracterização de genótipos seleccionados de pinheiro manso para o controlo da qualidade do pinhão", on prétend, par ce travail, mettre en valeur et protéger le pignon de Alcácer do Sal en vue d'établir une DOP- Dénomination d'Origine Protégée pour cette région. La variabilité de 14 paramètres morphologiques des cônes et graines de pin pignon a été évaluée sur quatre peuplements installés dans la plus importante Région de Provenance de façon à trouver des corrélations qui permettent une sélection expéditive des caractéristiques à améliorer.

Quinta do Sousa et Monte Novo ont présenté un potentiel génétique plus élevé. Dans les quatre peuplements on a déterminé la teneur en matière grasse et en acides gras avec pour objectif de faire la sélection de clones pour de futurs peuplements. Les résultats ont confirmé que le pignon est riche en matière grasse (43%) et a des teneurs relativement faibles en acides saturés (11%) et assez élevés en acides gras polyinsaturés (48%). Ensemble, les acides linoléique et oléique ont des teneurs qui correspondent à 84% des acides gras totaux.
**Mots clés:** Pin pignon; paramètres morphologiques; cônes; graines de pin pignon; acides gras

## Introdução

O pinheiro manso (*Pinus pinea* L.) é uma espécie tipicamente mediterrânica que, devido à sua plasticidade se distribui por todo o país. No entanto, as zonas mais favoráveis para a espécie e onde se encontram as maiores produções de pinhão concentram-se na estação ecológica sub mediterrânica, em solos arenosos que se estendem, em grande parte, pelas bacias Terciárias do Tejo e Sado ocupando as charnecas do Miocénico e Pliocénico.

Actualmente, a produção de pinhão constitui um incentivo importante na exploração de pinheiro manso. Com efeito, o pinhão é hoje muito apreciado quer ao natural quer nas suas inúmeras aplicações em pastelaria. Este apresenta um elevado valor nutritivo, é particularmente rico em proteínas (33-38%), hidratos de carbono (4,5-6,0%), gordura (46-51%), ácidos gordos, principalmente ácido oleico e linoleico, vitaminas B1, ácido fólico e minerais como potássio, fósforo e magnésio (NERGIZ e DONMEZ, 2004; COSTA *et al.,* 2008). Por outro lado, a sua composição lipídica é das mais interessantes do ponto de vista dietético alimentar, principalmente pela quase perfeita equivalência quantitativa dos ácidos linoleico e oleico (CARVALHO, 1996).

Estudos efectuados por FERREIRA-CARDOSO *et al*. (1999), CAÑELLAS *et al*. (2000) e, mais recentemente, por CHISHOLM *et al*. (2005), confirmam que os frutos secos com teor significativo em ácidos gordos polinsaturados podem desempenhar um papel fundamental na alimentação uma vez que, para além de reduzir a concentração de colesterol, prevenindo, assim, as doenças coronárias, também promovem, nas crianças, o desenvolvimento do cérebro e

da retina.

A composição dos pinhões apresenta variação entre as espécies e, até mesmo, com algumas subespécies dependendo das condições geográficas e climáticas (SAGREDO-NIEVES, 1992; NASRI *et al*., 2005b).

Actualmente, já é possível diferenciar as principais famílias de coníferas, bem como a maioria dos géneros de *Pinaceae,* por quimiotaxonomia com base nos teores de ácidos gordos em sementes (destaque particular para os ácidos oleico, linoleico e os ácidos 5,9-18:2). Por exemplo, no género *Pinus* o ácido linoleico varia entre 43,6 e 60,5%; no género *Picea* entre 45,4-49,5% e, com valores ligeiramente inferiores, surgem os géneros *Abies* (38,6-47,5%) e *Larix* (42,7-45,5%) (WOLFF *et al*., 1997).

Atendendo que nos últimos anos, o pinhão tem registado flutuações devido à concorrência com o pinhão de origem asiática, comercializado a preços inferiores, existe todo o interesse em incrementar e uniformizar a produção de semente certificada em qualidade e quantidade pelas vantagens que representa para a economia das regiões a Sul do Tejo.

Neste sentido, foram caracterizados 14 parâmetros morfológicos em pinhas e sementes e determinados os teores em gordura bem como o perfil de ácidos gordos, em quatro povoamentos seleccionados na principal região de proveniência (V).

## Material e métodos

### *Material vegetal*

Para este estudo foram utilizadas 48 árvores seleccionadas nas Herdades Monte Novo (MN), Quinta do Sousa (QS), Pai Sobrado (PS) e Mata Nacional de Valverde (MNV), povoamentos localizados na principal região de produção de pinhão (Quadro 1).

Assim, no período compreendido entre Janeiro e Março de 2003 procedeu-se à apanha de pinhas nas árvores seleccionadas. O material colhido, 144 pinhas (3 pinhas/árvore), foi transportado para as estufas da Mata Nacional do Escaroupim para secagem e colheita de pinhão. As determinações físicas foram rapidamente registadas e o miolo de pinhão conservado a -20ºC até à sua análise química.

### *Métodos*

#### Parâmetros biométricos

As medições, contagens e pesagens foram realizadas directamente nas pinhas e no pinhão. No que se refere à pinha, foram registados os seguintes parâmetros: comprimento (CP), diâmetro maior (DMP), peso (PP), número (NSe) e peso de sementes por pinha (PSe), enquanto que, no pinhão com casca, se avaliaram os valores referentes ao comprimento (CSe), largura (LSe) e espessura (ESe). Considerando que o aspecto exterior do pinhão tem importância em termos de comercialização, independentemente da sua composição química foi, também, determinado o comprimento (CM), a largura (LM) e a espessura (EM), registado o peso da casca (PC) e o peso do miolo (PM). Como parâmetro, foi, ainda, avaliado o peso de cem sementes (PCEM). Por pinha foram colhidas e medidas cinquenta sementes (Figura 1).

**Quadro 1** - Povoamentos estudados e número de árvores analisadas na Região de Proveniência V

| Povoamentos | | | |
|---|---|---|---|
| Herdade Monte Novo | Herdade Pai Sobrado | Herdade Quinta do Sousa | Mata Nacional de Valverde |
| 10 árvores | 19 árvores | 13 árvores | 6 árvores |

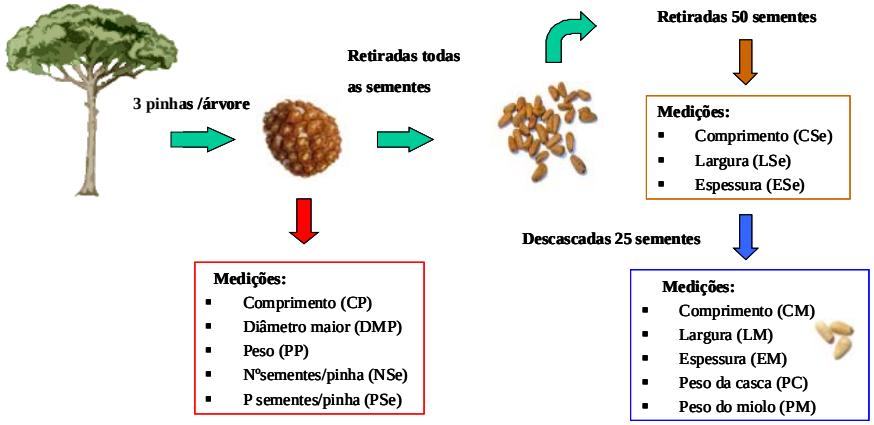



**Figura 1 -** Esquema do delineamento experimental utilizado

Gordura e ácidos gordos

Na determinação dos ácidos gordos utilizou-se o método descrito por CARVALHO (1996). O óleo foi extraído três vezes com éter etílico. A metilação dos ácidos gordos foi efectuada pelo $MeOHBF_3$ em ebulição sob refluxo durante sete minutos, após saponificação durante duas horas com KOH 10N em 50 mL EtOH:Éter (3:1). Os ésteres metilados foram dissolvidos em n-hexano e analisados por cromatografia gasosa.

A separação dos ácido gordos foi efectuada num cromatógrafo gasoso (CG) Hewlett-Packard HP 5890 com detector de chama ionizada (FID), acoplado a um integrador electrónico equipado com uma coluna capilar Carbowax 10M, (30 m, 0,25 mm ID, 0.25 µm espessura de filme). A optimização das condições de separação foi obtida com a seguinte programação: temperatura inicial do forno 180ºC durante um minuto com subida até 250ºC (5ºC/minuto) mantendo a temperatura final do forno durante seis minutos. As injecções automatizadas foram feitas em triplicado e as temperaturas do injector e do detector foram, respectivamente, de 260ºC e 270ºC. A composição em ácidos gordos foi determinada em termos de ácidos saturados: palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), e de ácidos insaturados: oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolénico (C18:3). Os ácidos gordos foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção com os de padrões comerciais (SIGMA Chemical Co., St Louis, USA) e quantificados percentualmente através da integração das áreas dos picos.

*Análise de dados*

Os dados foram tratados estatisticamente recorrendo, para o efeito, ao programa STATISTICA (Versão 6.0) que permitiu a aplicação de:

- Técnicas de análise univariada (estatísticas básicas diagramas de extremos e *Box-plots*) e bivariada (diagramas de dispersão e regressões lineares).

- Técnicas de análise multivariada nomeadamente recorrendo aos métodos de ordenação. Na análise das variáveis quantitativas utilizou-se a análise de componentes principais (ACP).

- Métodos de classificação hierárquica para análise de semelhança entre os parâmetros biométricos do fruto e semente e, ainda, dos ácidos gordos.

**Resultados e discussão**

As análises univariadas permitiram visualizar, graficamente, a variação de cada parâmetro avaliado nos 48 indivíduos analisados.

Os *Box-plots* constituíram o tipo de análise escolhida para ser apresentada. Numa análise sumária de *Box-plots* apresentados graficamente na Figura 2, pode concluir-se que a maioria das pinhas das herdades Quinta do Sousa e Monte Novo apresentaram valores médios mais elevados de PP, CP, DMP e PSe em relação aos outros dois povoamentos e os valores mais baixos, com excepção do peso da pinha, foram obtidos para a Mata Nacional de Valverde.

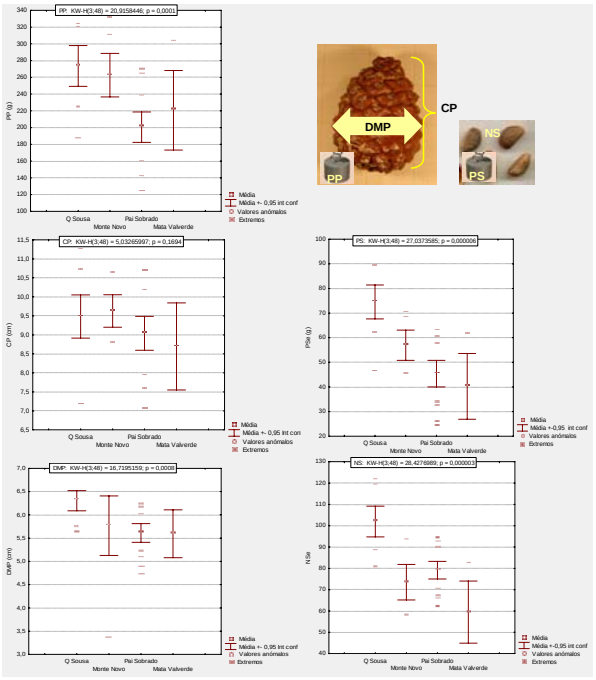



**Figura 2** - *Box-plot* de valores quantitativos referentes à análise de parâmetros biométricos da pinha em 48 indivíduos de *P. pinea* dos quatro povoamentos. Variação no peso da pinha (PP), no comprimento da pinha (CP), no diâmetro maior da pinha (DMP), no peso das sementes por pinha (PSe) e no número de sementes por pinha (NSe)

Relativamente ao comprimento, largura e espessura da semente, verificou-se que os valores médios mais elevados correspondiam ao povoamento Monte Novo. Contudo, evidenciou-se o povoamento de Pai Sobrado pelo elevado número de valores anómalos registados e a Mata Nacional de Valverde pela grande amplitude de valores (Quadro 2 e Figura 3)

**Quadro 2** - Variação nos parâmetros biométricos em 48 indivíduos de *P. pinea* nos quatro povoamentos estudados

| Parâmetros | Quinta Sousa | | | Monte Novo | | | Pai Sobrado | | | Mata N. Valverde | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Média | Min. | Max. | Média | Min. | Max. | Média | Min. | Max. | Média | Min. | Max. |
| PP | 270,02 | 185,33 | 322,33 | 262,62 | 217,50 | 330,66 | 200,53 | 122,17 | 268,33 | 220,72 | 177,3 | 302,66 |
| CP | 9,43 | 7,17 | 11,23 | 9,63 | 8,77 | 10,63 | 9,04 | 7,03 | 10,67 | 8,69 | 7,43 | 10,03 |
| DMP | 6,28 | 5,60 | 6,66 | 5,77 | 3,35 | 6,63 | 5,61 | 4,70 | 6,20 | 5,59 | 5,03 | 6,37 |
| NSe | 98,83 | 58,00 | 121,33 | 73,52 | 58,0 | 93,33 | 79,14 | 62,0 | 94,00 | 59,44 | 40,00 | 82,33 |
| PSe | 72,43 | 45,17 | 89,17 | 56,93 | 45,17 | 70,17 | 45,43 | 24,0 | 62,67 | 40,26 | 27,83 | 61,50 |
| PCEM | 73,28 | 58,23 | 89,82 | 77,96 | 62,47 | 89,12 | 56,91 | 35,76 | 72,78 | 72,90 | 60,48 | 79,40 |
| CSe | 1,80 | 1,61 | 1,92 | 1,85 | 1,72 | 1,98 | 1,63 | 1,41 | 1,81 | 1,65 | 1,48 | 1,79 |
| LSe | 0,89 | 0,83 | 0,96 | 0,93 | 0,86 | 0,98 | 0,84 | 0,75 | 0,90 | 0,89 | 0,80 | 0,97 |
| ESe | 0,74 | 0,69 | 0,81 | 0,76 | 0,69 | 0,79 | 0,69 | 0,60 | 0,75 | 0,72 | 0,64 | 0,81 |
| CM | 1,30 | 1,15 | 1,39 | 1,36 | 1,29 | 1,44 | 1,18 | 1,01 | 1,34 | 1,14 | 0,82 | 1,31 |
| LM | 0,50 | 0,47 | 0,52 | 0,52 | 0,47 | 0,55 | 0,52 | 0,43 | 1,29 | 0,49 | 0,37 | 0,56 |
| EM | 0,35 | 0,31 | 0,37 | 0,38 | 0,35 | 0,43 | 0,35 | 0,31 | 0,41 | 0,36 | 0,26 | 0,41 |
| PC | 13,93 | 11,83 | 16,0 | 14,79 | 12,17 | 16,67 | 11,12 | 7,67 | 15,33 | 11,96 | 8,00 | 14,5 |
| PM | 4,19 | 3,33 | 4,67 | 4,67 | 4,17 | 5,00 | 3,66 | 2,50 | 4,33 | 4,22 | 2,67 | 5,25 |

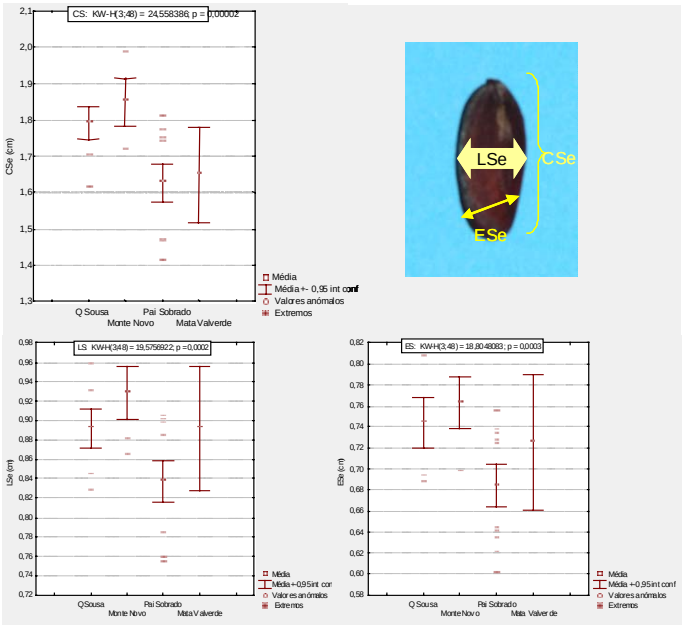



**Figura 3** - *Box-plot* de valores quantitativos referentes à análise de parâmetros biométricos da semente em 48 indivíduos de *P. pinea* dos quatro povoamentos. Variação no comprimento da semente (CSe), na largura da semente (LSe) e na espessura da semente (ESe)

No miolo de pinhão da herdade de Monte Novo constatou-se que o comprimento, a largura, a espessura do miolo, o peso do miolo e o peso da casca atingiram valores médios mais elevados quando comparados com os restantes povoamentos. A Mata Nacional de Valverde continuou a apresentar uma grande variação de valores, excepto para a largura do miolo e o povoamento de Pai Sobrado destacou-se, tal como nos casos anteriores, pelo elevado número de valores anómalos, estão fora da amplitude de valores (Figura 4).

As análises bivariadas permitiram relacionar, nos quatro povoamentos, duas variáveis quantitativas e analisar o comportamento de uma em relação à outra.

De todas as combinações realizadas apresenta-se a situação que demonstrou resultados mais interessantes na relação entre duas variáveis, nomeadamente o peso da pinha (PP) e o peso do miolo (PM), para cada uma das populações (Figura 5) e para o conjunto delas (Figura 6). Assim sendo, verificou-se que nas populações Pai Sobrado e Mata Nacional de Valverde, à medida que aumentava o peso da pinha aumentava igualmente o peso de miolo. Relativamente aos restantes povoamentos, particularmente, Monte Novo, constatou-se que o aumento do peso da pinha não tinha influência sobre o aumento do peso do miolo.

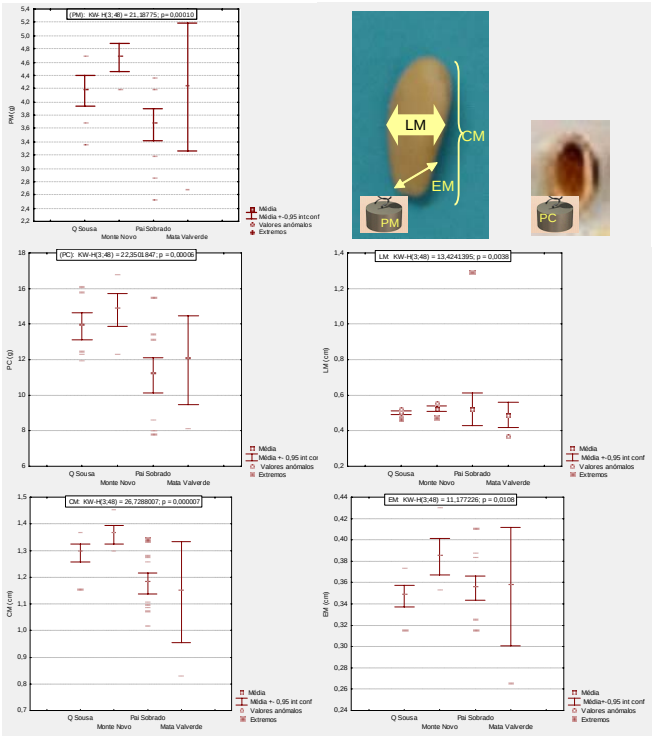



**Figura 4** - *Box-plot* de valores quantitativos referentes à análise de parâmetros biométricos da semente em 48 indivíduos de *P. pinea* dos quatro povoamentos. Variação no peso do miolo (PM), no peso da casca (PC), no comprimento do miolo (CM), na largura do miolo (LM) e na espessura do miolo (EM)

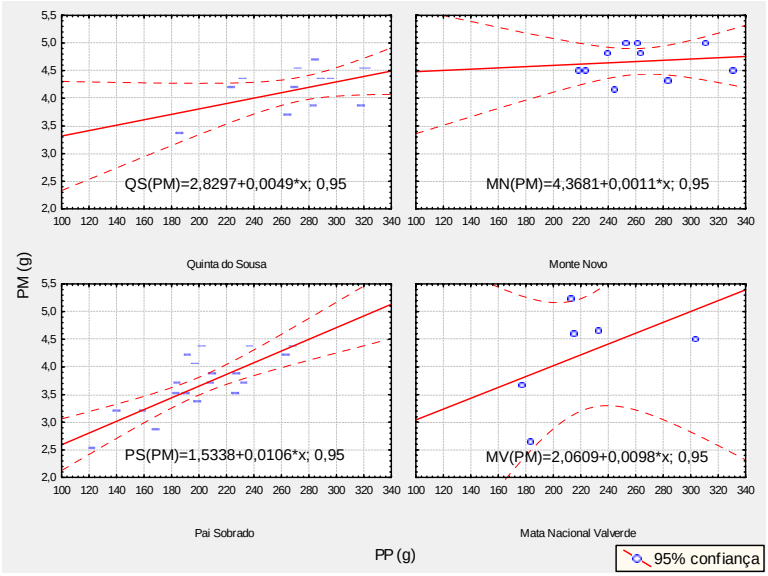



**Figura 5** - Diagrama de dispersão entre as variáveis: peso da pinha (PP) e peso do miolo (PM), para os 48 indivíduos analisados dos quatro povoamentos

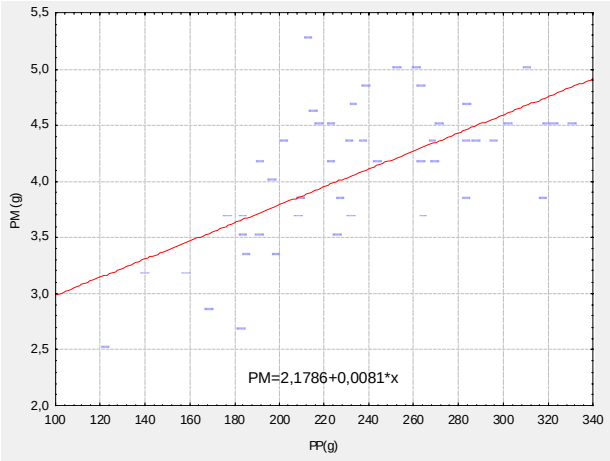



**Figura 6** - Regressão linear entre as variáveis: peso da pinha (PP) e peso do miolo (PM), para o conjunto das populações

*Correlações*

No Quadro 3 apresentam-se estimativas das correlações totais calculadas com base nas médias das observações. As correlações foram muito significativas entre um grande número de características.

As características relativas à pinha que apresentaram correlação significa-

tiva com as características morfológicas do pinhão têm uma importância fundamental neste estudo, se tivermos em conta a facilidade com que podemos observar e avaliar estes parâmetros no terreno. Assim, por exemplo, as características do PP x PM apresentaram uma correlação altamente significativa de 0,63. Este resultado indica que a selecção de plantas com maior peso de pinha poderá levar ao aumento de peso de miolo, assim como a correlação entre CP e PM, que apresenta um valor de 0,51, também indica que a selecção para um maior comprimento de pinha poderá contribuir, de forma directa, para o aumento do peso do miolo.

Constatou-se que a característica largura do miolo (LM) não está correlacionada com nenhum parâmetro, enquanto que a espessura do miolo (ESe) apenas apresentou correlação com largura da semente (LSe), peso do miolo (PM) e comprimento do miolo (CM).

*Análises multivariadas*

Através da análise em componentes principais relacionaram-se sete dos 14 parâmetros biométricos, que caracterizam os indivíduos estudados, com os grupos de indivíduos de cada povoamento. Só os dois primeiros eixos são significativos, pois apresentam valor próprio superior à unidade (Quadro 4). Nos dois primeiros eixos mostram-se as variáveis transformadas como combinações lineares das variáveis originais (Figura 7). Na Figura 8 a) e b) projectaram-se todos os indivíduos em análise, respectivamente no 1º e 2º factor e no 1º e 3º factor da ACP. Os factores extraídos nesta análise explicam 79% da variância total (factor 1-47%; factor 2-19% e factor 3-13%).

**Quadro 3 -** Correlações totais calculadas com base nas médias observadas entre as 14 características biométricas do pinheiro manso: PP- peso da pinha; CP- comprimento da pinha; DMP- diâmetro maior da pinha; NSe- número de sementes; Pse- peso da semente; PCEM- peso de cem sementes; CSe- comprimento da semente; LSe- largura da semente; Ese- espessura da semente; PM- peso do miolo; PC peso da casca; CM- comprimento do miolo (pinhão); LM- largura do miolo; EM- espessura do miolo

| | PP | CP | DMP | NSe | PSe | PCEM | CSe | LSe | ESe | PM | PC | CM | LM | EM |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PP | - | | | | | | | | | | | | | |
| CP | 0,74*** | - | | | | | | | | | | | | |
| DMP | 0,57*** | 0,55*** | - | | | | | | | | | | | |
| NSe | 0,60*** | 0,50*** | 0,58*** | - | | | | | | | | | | |
| PSe | 0,83*** | 0,68*** | 0,60*** | 0,81*** | - | | | | | | | | | |
| PCEM | 0,64*** | 0,49*** | 0,29** | 0,06n.s | 0,62*** | - | | | | | | | | |
| CSe | 0,81*** | 0,66*** | 0,46*** | 0,32* | 0,71*** | 0,78*** | - | | | | | | | |
| LSe | 0,64*** | 0,45** | 0,40** | 0,01 n.s | 0,50*** | 0,82*** | 0,85*** | - | | | | | | |
| ESe | 0,76*** | 0,60*** | 0,47*** | 0,25 n.s | 0,67*** | 0,81*** | 0,84*** | 0,90*** | - | | | | | |
| PM | 0,63*** | 0,51*** | 0,32** | 0,01 n.s | 0,49*** | 0,78*** | 0,80*** | 0,87*** | 0,83*** | - | | | | |
| PC | 0,75*** | 0,60*** | 0,51*** | 0,25n.s | 0,68*** | 0,81*** | 0,92*** | 0,94*** | 0,92*** | 0,86*** | - | | | |
| CM | 0,71*** | 0,60*** | 0,39** | 0,32* | 0,60*** | 0,59*** | 0,82*** | 0,58*** | 0,56*** | 0,65*** | 0,71*** | - | | |
| LM | -0,01n.s | -0,01n.s | -0,00n.s | -0,01n.s | 0,01n.s | 0,02 n.s | 0,05 n.s | 0,05 n.s | 0,04 n.s | 0,07 n.s | 0,07 n.s | 0,14n.s | - | |
| EM | 0,19 n.s | 0,24 n.s | -0,05n.s | -0,17n.s | 0,03n.s | 0,28 n.s | 0,27 n.s | 0,29 n.s | 0,19 n.s | 0,47*** | 0,24 n.s | 0,52*** | 0,15n.s | - |

n.s - não significativo (>0,05); *- significativo (p≤0,05); **- muito significativo (p≤0,01); ***- altamente significativo (p≤0,001)

**Quadro 4** - Valores próprios e percentagem de explicação dos sete eixos da Análise em Componentes Principais (ACP) aplicada a parâmetros estudados em 48 indivíduos de *P. pinea*. A importância relativa de cada um dos eixos é analisada pela coluna % explicada

| Eixos | Valores Próprios | % Explicada | % Acumulada |
|---|---|---|---|
| 1 | 3,28 | 46,89 | 46,89 |
| 2 | 1,32 | 18,85 | 65,74 |
| 3 | 0,92 | 13,13 | 78,87 |
| 4 | 0,56 | 7,99 | 86,87 |
| 5 | 0,42 | 5,94 | 92,81 |
| 6 | 0,31 | 4,49 | 97,30 |
| 7 | 0,19 | 2,70 | 100,00 |

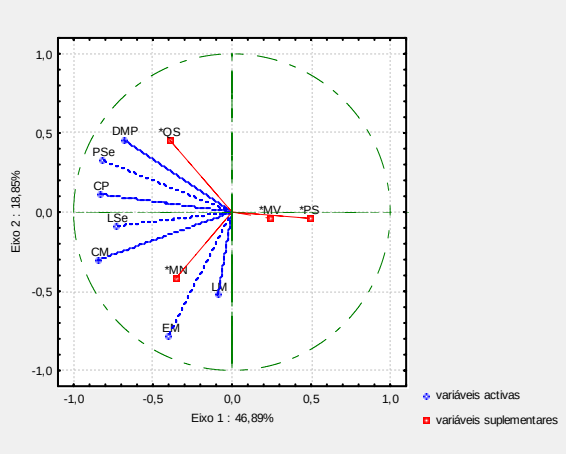



**Figura 7** - Projecção de sete parâmetros biométricos no 1º plano factorial da ACP

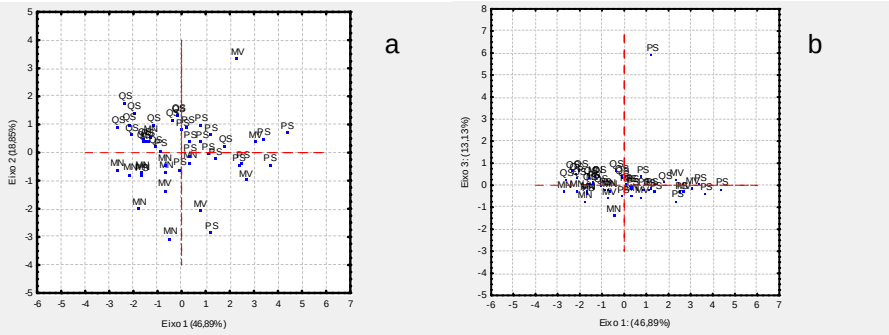



**Figura 8** - Projecção das 48 árvores dos quatro povoamentos de *P. pinea*, a) nos 1º e 2º factor da ACP, b) nos 1º e 3º factor da ACP

A sobreposição de dados contidos nos dois gráficos indica quais os parâmetros que melhor caracterizam um determinado grupo de indivíduos. Deste modo, verificou-se que as variáveis CP, DMP, e PSe e os indivíduos do povoamento Quinta do Sousa estão mais relacionados, o que indica que as pinhas com maior diâmetro, maior comprimento e sementes mais pesadas se encontram entre os indivíduos da Quinta do Sousa. Estudos recentemente efectuados por CARNEIRO (2002), em nove locais e para as mesmas 14 características, revelaram, também, que a Quinta do Sousa diferiu significativamente em relação aos restantes locais para a maioria dos parâmetros. Quanto aos parâmetros que se relacionam com o miolo, nomeadamente CM, EM e LM (miolo de pinhão com maior comprimento, espessura e largura), encontram-se na Herdade de Monte Novo.

*Análise aglomerativa*

O dendrograma obtido com base na distância Euclidiana permitiu visualizar seis *clusters,* ainda que com alguma sobreposição entre as populações estudadas. Dos seis agrupamentos definidos destacam-se, com alguma uniformidade em relação aos agrupamentos, os seguintes grupos: V representado pela maioria das árvores da herdade de Monte Novo; VI com dois agrupamentos no seu interior - o primeiro predominantemente com indivíduos da Quinta do Sousa e o segundo menos homogéneo mas, ainda assim, com muitos indivíduos da herdade Pai Sobrado (Figura 9).

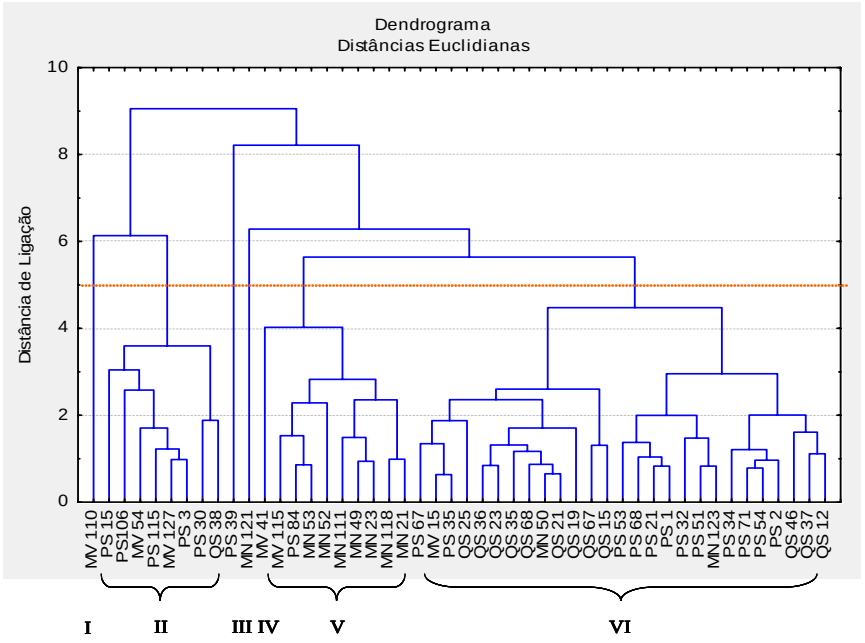



**Figura 9 -** Dendrograma obtido para os quatro povoamentos, através do método de ligação completa aplicado à matriz das coordenadas da ACP

Apesar dos dados deste estudo serem preliminares, uma vez que se referem a um ano de colheita, foi, no entanto, possível obter informação quanto ao comportamento dos povoamentos.

O peso e o tamanho do pinhão são parâmetros normalmente muito variáveis porque dependem de vários parâmetros ecológicos (tipo de solo, clima, localização geográfica, práticas silvícolas, entre outros) e do regime de produção irregular no tempo, com ciclos alternados em termos de frutificação.

Tal como foi constatado neste estudo, verificou-se que os valores do peso médio da pinha e do número médio de pinhões por pinha foram superiores nos povoamentos com cerca de 40 anos e menor densidade de plantação (Herdades da Quinta do Sousa e Monte Novo). Contrariamente, na província de Huelva, MONTERO *et al.* (2000), não registaram nenhuma tendência que indicasse que a idade e a densidade dos povoamentos tivessem influência no peso e no número de sementes por pinha. Contudo, devo lembrar que esta falta de concordância nos resultados se poderá dever ao reduzido número de indivíduos com que trabalhámos. Relativamente ao número de pinhões por pinha, registaram-se valores muito díspares e nem sempre proporcionais ao tamanho da pinha.

Num trabalho realizado por ALPUIM e ROCHA (1994) sobre as características biométricas das pinhas e pinhões, em várias herdades da região de Alcácer do Sal, Zambujal, Palma, e Ervideira, conhecidas pelas suas boas produções, obtiveram-se dimensões superiores relativamente às correntemente encontradas na bibliografia. Pode-se então concluir que o pinhão de Alcácer do Sal apresenta uma produtividade superior à média geral, corroborado por DOMINGUEZ e ZURIMENDI, 2000.

Das populações estudadas, a Quinta do Sousa e a Herdade de Monte Novo, revelaram elevado potencial para fins de melhoramento genético em relação à quase totalidade das características avaliadas devendo, por isso, ser os locais recomendados para se proceder à selecção e a cruzamentos de árvores *plus* para obtenção da geração seguinte.

Contudo, será necessário confirmar estes resultados com novas amostragens a realizar ao longo de, pelo menos, quatro anos consecutivos, com vista a atenuar os efeitos de safra e contra safra inerentes a esta espécie.

**Teor em ácidos gordos**

Foram identificados os seguintes compostos: ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico e ácido linolénico (Figura 10).

*Análises univariadas*

Utilizámos também, a análise univariada para visualizar a variação de cada parâmetro químico avaliado para os 48 indivíduos analisados.

O teor em gordura nos pinhões analisados variou entre 33,46% (Mata Nacional de Valverde) e 51,16% no mesmo povoamento (Quadro 5). Pela análise efectuada por BAGCI e KARAAGAÇLI (2004), em várias sementes de diversas espécies de *Pinus* confirmou-se a superioridade, no que se refere ao teor em gordura, da espécie *P. pinea* (43,87%) relativamente às outras espécies cujos valores oscilaram entre 23,05% e 41,30%.

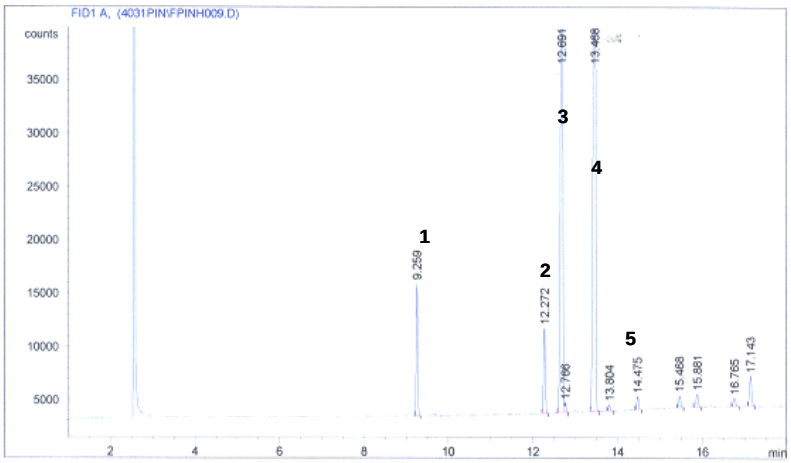



**Figura 10 -** Cromatograma de ácidos gordos metilados de pinhão de *P. pinea*., separados em coluna Carbowax x10M, 30m, d.i. 0,25, 1 -ácido palmítico, 2 -ácido esteárico, 3 -ácido oleico, 4 -ácido linoleico, 5 -ácido linolénico

Relativamente à composição em ácidos gordos, verificou-se que os valores mais elevados se registaram nos ácidos linoleico e oleico que, em conjunto, atingiram cerca de 84% dos ácidos gordos totais, seguido do palmítico (6,34%) e esteárico (4,31%). Foram encontrados vestígios de linolénico, dados coincidentes com outras determinações realizadas, também em pinhão, por CARVALHO (1996), CAÑELLAS *et al*. (2000) e NASRI *et al*. (2005a).

Estudos realizados em *P. cembroides* por SAGREDO-NIEVES (1992), em *P. edulis* e *P. monophylla* por LANNER L. (1981), revelaram valores em ácido oleico e linoleico que correspondem a cerca de 82% do total de ácidos gordos.

Estudos efectuados por FERREIRA e PESTANA (2000) e, mais recentemente, por COSTA *et al.* (2008) revelaram diferenças acentuadas em relação ao pinhão proveniente da China. Este apresentava teores mais elevados de ácido linolénico (15,70%) e mais baixos de oleico (27,20%).

Nos diferentes povoamentos, o valor médio da soma de ácido oleico e linoleico foi praticamente o mesmo (84,70%; 84,51%; 84,37%; 84,27) com alternância de valores consoante o povoamento. Por exemplo, a herdade do Pai Sobrado apresentou o teor mais baixo em ácido oleico (34,40%) e o mais alto em ácido linoleico (50,38%) enquanto que, na Quinta do Sousa, se registou o teor mais elevado em ácido oleico (41,29%) e o mínimo em linoleico (42,71%) (Quadro 5).

Da análise sumária de *Box-plots,* apresentados graficamente na Figura 11, pode concluir-se que os valores médios mais elevados de teor em gordura e ácido linoleico foram registados nos indivíduos da herdade do Pai Sobrado, enquanto que, nas herdades da Quinta do Sousa e Monte Novo se obtiveram os valores médios mais altos em ácido oleico. Tal como nos parâmetros biométricos, também se constataram grandes amplitudes de valores na Mata Nacional de Valverde.

**Quadro 5** - Variação nos teores em gordura e ácidos gordos do miolo de pinhão em 48 indivíduos de *P. pinea,* nos quatro povoamentos estudados

| Parâmetros | Quinta Sousa | | | Monte Novo | | | Pai Sobrado | | | Mata N. Valverde | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Média | Min. | Max. | Média | Min. | Max. | Média | Min. | Max. | Média | Min. | Max. |
| Teor gordura | 41,76 | 38,69 | 44,60 | 42,02 | 37,48 | 50,97 | 44,99 | 40,14 | 50,36 | 41,69 | 33,46 | 51,16 |
| Ac. palmítico | 6,35 | 6,11 | 6,56 | 6,37 | 6,13 | 6,60 | 6,42 | 6,16 | 6,64 | 6,24 | 6,07 | 6,60 |
| Ac. esteárico | 4,31 | 3,88 | 4,64 | 4,25 | 3,90 | 4,68 | 4,30 | 3,94 | 4,72 | 4,40 | 3,93 | 4,75 |
| Ac. oleico | 39,08 | 36,90 | 41,29 | 38,83 | 37,50 | 40,81 | 35,81 | 34,40 | 37,98 | 36,72 | 35,00 | 40,31 |
| Ac. linoleico | 45,62 | 42,71 | 47,83 | 45,68 | 43,79 | 47,27 | 48,56 | 46,24 | 50,38 | 47,48 | 43,42 | 49,11 |
| Ac.linolénico | 0,69 | 0,62 | 0,75 | 0,70 | 0,67 | 0,78 | 0,71 | 0,67 | 0,77 | 0,72 | 0,63 | 0,81 |

**Nota**: valores apresentados em %

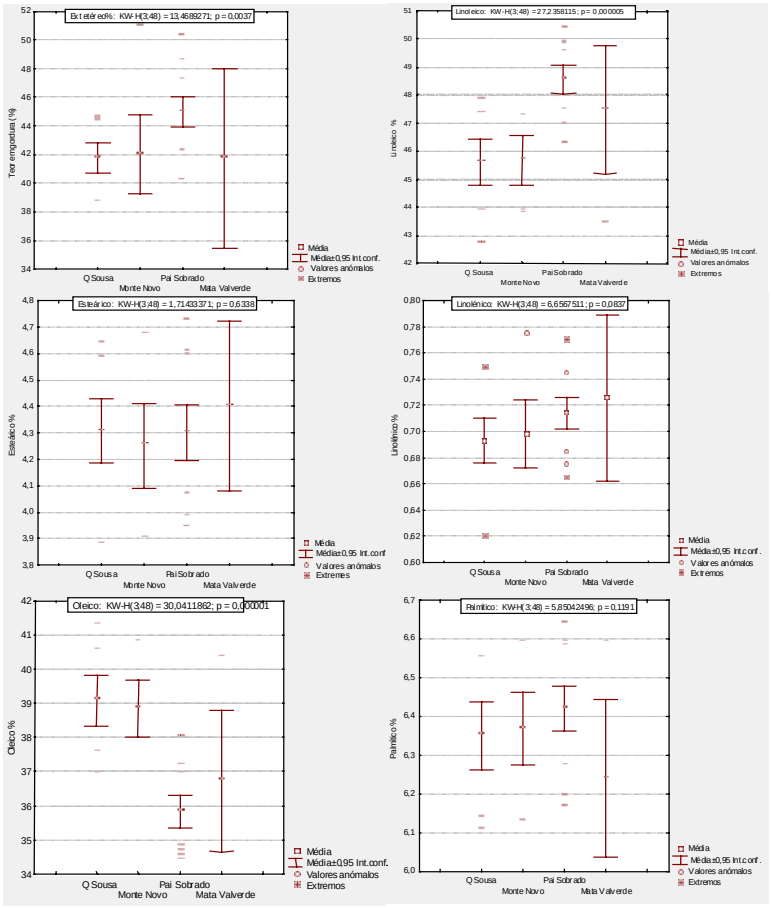



**Figura 11** - *Box-plot* de valores quantitativos referentes às análises de teores em gordura e em ácidos gordos do miolo de pinhão em 48 indivíduos de *P. pinea* dos quatro povoamentos. Variação no teor em gordura, no ácido esteárico, no ácido oleico, no ácido linoleico, no ácido linolénico, e no ácido palmítico

*Análises bivariadas*

O ácido oleico e o ácido linoleico apresentam uma forte correlação negativa com valor de r = -0,96 (Figura 12). Esta correlação resulta do processo de biossíntese do ácido linoleico que é obtido a partir do ácido oleico (FERREIRA-CARDOSO *et al.*, 1999).

No Quadro 6 apresenta as estimativas das correlações totais com base nas médias das observações. Revelou-se altamente significativa, negativamente, a correlação entre o ácido linoleico e oleico (-0,96***), o ácido linolénico e o oleico (-0,64***) e, positivamente, com o linoleico (0,67***).

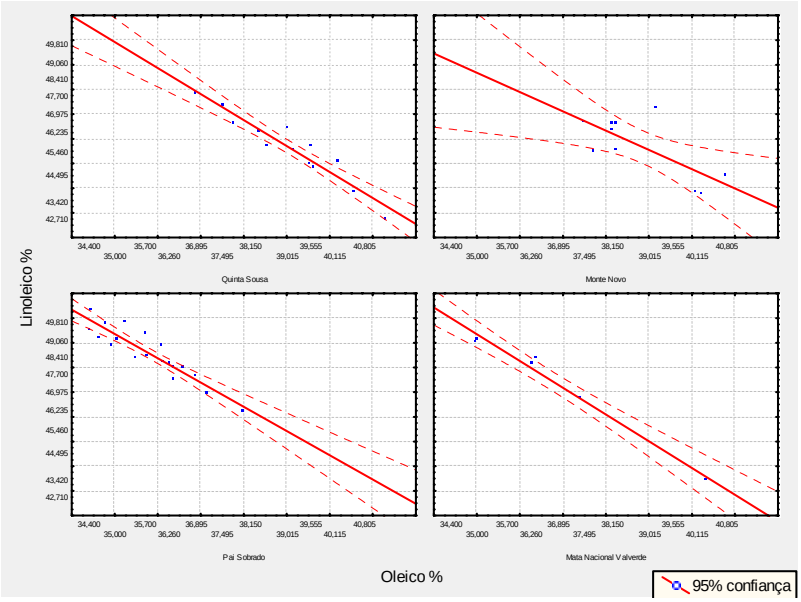



**Figura 12** - Diagrama de dispersão entre as variáveis: ácido oleico e ácido linoleico, para os 48 indivíduos de *P. pinea* dos quatro povoamentos

**Quadro 6** - Correlações totais calculadas com base nas médias observadas entre os cinco ácidos gordos

| | **Acido palmítico** | **Ácido esteárico** | **Ácido oleico** | **Ácido linoleico** | **Ácido linolénico** |
|---|---|---|---|---|---|
| Acido palmítico | - | | | | |
| Ácido esteárico | -0,31* | - | | | |
| Ácido oleico | -0,03n.s | -0,04n.s | - | | |
| Ácido linoleico | 0,02n.s | -0,12n.s | -0,96*** | - | |
| Ácido linolénico | -0,16n.s | -0,07n.s | -0,64*** | 0,67*** | - |

n.s. - não significativo (>0,05); *- significativo (p≤0,05); ***- altamente significativo (p≤0,001)

Análises multivariadas

A análise em componentes principais permitiu relacionar todos os atributos variáveis. Projectaram-se os cinco ácidos gordos que caracterizam os indivíduos estudados (Figura 13) e, na Figura 14 a) e b), projectaram-se todos os indivíduos de *P. pinea* analisados, respectivamente, no 1º e 2º plano factorial. Deste modo, pretendeu-se relacionar as características com os grupos de indivíduos de cada povoamento.

Os resultados obtidos com a ACP para os três primeiros eixos e que definem os gráficos apresentados na Figura 14 a) e b), explicam 92,07% da variabilidade total (factor 1-50,61%; factor 2-26,52%; factor 3-14,94%) (Quadro 7).

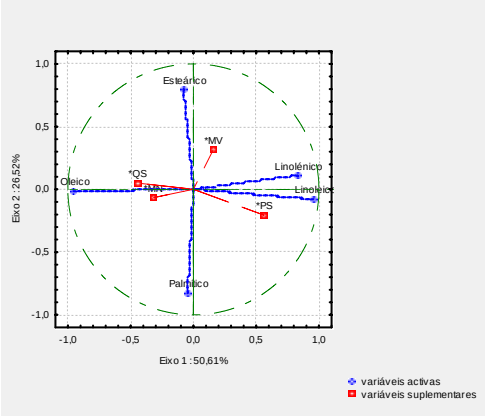



**Figura 13** - Projecção dos ácidos gordos no 1º plano factorial da ACP

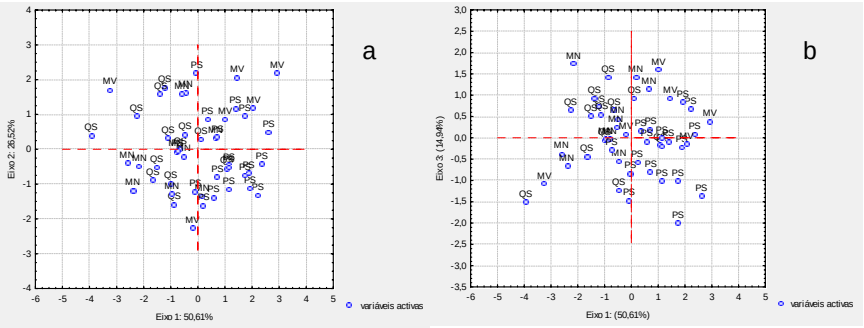



**Figura 14** - Projecção das 48 árvores dos quatro povoamentos de *P. pinea* a) no 1º plano factorial da ACP; b) no 2º plano factorial da ACP

**Quadro 7 -** Valores próprios e percentagem de explicação dos cinco eixos da Análise de Componentes Principais (ACP), aplicada a parâmetros estudados em 48 indivíduos de *P. pinea.* A importância relativa de cada um dos eixos é analisada pela coluna % explicada

| Eixos | Valores próprios | % Explicada | % Acumulada |
|---|---|---|---|
| 1 | 2,53 | 50,61 | 50,61 |
| 2 | 1,32 | 26,52 | 77,13 |
| 3 | 0,75 | 14,94 | 92,07 |
| 4 | 0,37 | 7,39 | 99,47 |
| 5 | 0,03 | 0,53 | 100,00 |

Constatou-se que o primeiro eixo está mais relacionado com os ácidos linoleico e linolénico e, em oposição, o ácido oleico e que os indivíduos da herdade Pai Sobrado estão mais relacionados com a parte positiva do eixo, o que indica que os valores de ácido linoleico e linolénico mais altos estão entre os indivíduos pertencentes à herdade Pai Sobrado. Os valores mais elevados de ácido oleico registaram-se na Quinta do Sousa seguida da herdade Monte Novo. A segunda componente principal opôs os teores em ácido esteárico e palmítico. A Mata Nacional de Valverde apresentou os mais elevados teores em ácido esteárico.

*Análise aglomerativa*

A utilização de um algoritmo de análise de agregação, aplicado aos parâmetros químicos estudados nos 48 indivíduos de *P. pinea*, levou à obtenção de quatro grupos, representados na Figura 15, com a distância de 4,5.

Da observação deste dendrograma é visível que, no primeiro grupo constituído por 11 árvores, figuram cinco das seis árvores da Mata Nacional de Valverde, juntamente com três da herdade do Pai Sobrado, duas de Monte Novo e uma da Quinta do Sousa. O segundo grupo está, maioritariamente, representado por 12 indivíduos da Herdade do Pai Sobrado e apenas um da Quinta do Sousa. O terceiro grupo apresenta apenas duas árvores (MN e QS). O quarto grupo, constituído por sete árvores de Monte Novo, dez da Quinta do Sousa, quatro de Pai Sobrado e uma da Mata Nacional de Valverde, não reflecte uma separação tão nítida por povoamentos.

A quantificação de ácidos gordos por Cromatografia de Fase Gasosa revelou-se um método sensível, reprodutível e preciso, na análise de ácidos gordos em miolo de pinhão de pinheiro manso.

Este trabalho constituiu uma primeira abordagem ao estudo destes compostos em povoamentos Portugueses e serviu de ponto de partida para um estudo mais profundo que está em curso e engloba determinações abrangendo um número mais representativo de populações, nomeadamente nos diferentes Concelhos da Região de Proveniência V, de modo a ser possível confirmar algumas tendências detectadas. (COSTA *et al.*, 2008).

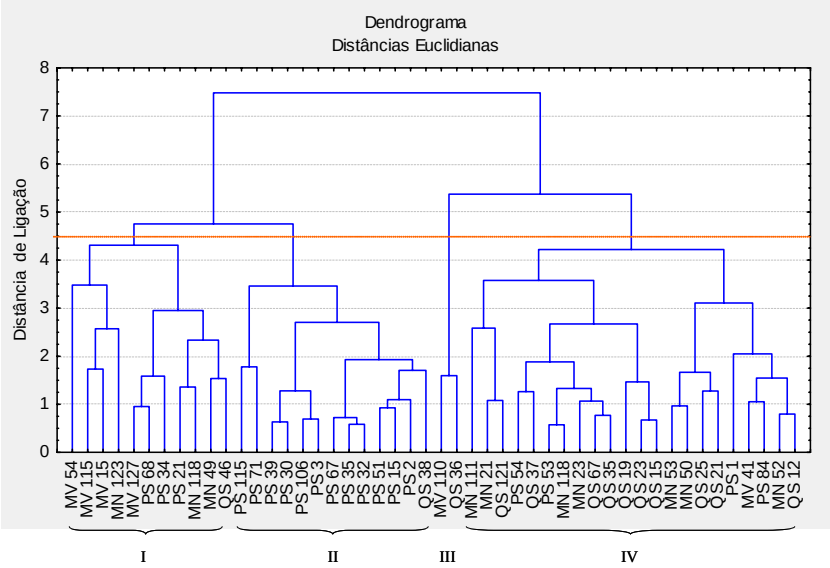



**Figura 15 -** Dendrograma obtido através do método de ligação completa aplicado à matriz das coordenadas da ACP para os quatro povoamentos estudados

## Conclusões

Da análise dos 14 parâmetros biométricos considerados fundamentais para a caracterização das pinhas e das sementes ressalta que a Quinta do Sousa e a Herdade Monte Novo apresentam elevado potencial em termos de melhoramento genético.

Relativamente à composição qualitativa e quantitativa dos ácidos gordos determinada no miolo de pinhão constatou-se que foi idêntica ao padrão/tipo do género *Pinus* (NASRI *et al*., 2005). Assim, registaram-se valores elevados de ácido linoleico e oleico que, no conjunto, correspondem a cerca de 84% do total de ácidos gordos. Os ácidos palmíticos e esteáricos representaram, respectivamente, 6,34% e 4,31% do total de ácidos gordos.

## Agradecimentos

Este estudo foi efectuado no âmbito do projecto PIDDAC 213 "Caracterização molecular de genótipos seleccionados de pinheiro manso para o controlo da qualidade do pinhão". Os autores agradecem às Técnicas Profissionais Fátima Carreira e Graça Andrade o empenho e sentido de responsabilidade que revelaram nas medições dos parâmetros biométricos das pinhas e pinhão e, ao Eng.º José Baeta pelo excelente apoio prestado no tratamento estatístico.

## Bibliografia

ALPUIM, M., ROCHA, M.E., 1994. Breve estudo biométrico sobre as características da pinha e semente de *Pinus pinea* L. apresentação de poster In *Actas do III Congresso Florestal Nacional*, Figueira da Foz.

BAGCI, E., KARAAGAÇLI, Y., 2004. Fatty acid and tocochromanol patterns of Turkish Pines. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* **46**: 95-100.

CAÑELLAS, I., CAÑADAS, N., BACHILLER, A., MONTERO, G., 2000. Caracterização química de los piñones de *Pinus pinea* L. Para el sur y centro de España In Actas *1er Simposio del Pino Piñonero* Valladolid, Tomo II pp. 221-226.

CARNEIRO, A.I.L.N., 2002. *Avaliação da variabilidade e controlo genético de características biométricas das pinhas e da semente da Pinus pinea* L. Relatório de fim de curso de Engenharia Florestal. Universidade Técnica de Lisboa -Instituto Superior de Agronomia, pp. 58.

CARVALHO, J.S., 1996. Caracterização química do pinhão de *Pinus pinea* L.. *Silva Lusitana* **4**(1): 89-96.

CHISHOLM, A., MC AULEY, K., MANN, J., WILLIAMS, S., SKEAFF, M., 2005. Cholesterol lowering effects of nuts compared with a Canola oil enriched cereal of similar fat composition. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases* **15**(4): 284-292.

COSTA, R., EVARISTO, I., BATISTA, D., AFONSO, S., CARRASQUINHO, I., SANTOS, L., SOUSA, E., INÁCIO, L., BONIFÁCIO, L., CAPELO, J., AZEVEDO GOMES, J., VACAS de CARVALHO, M.A., ALPUIM, M., 2008. Condução de Povoamentos de Pinheiro Manso e Características Nutricionais do Pinhão. Eds. Rita Costa e Isabel Evaristo, pp. 48.

DOMINGUEZ, R., ZURIMENDI, P.M., 2000. Una denominación de origen para el piñon. In Actas *1er Simposio del Pino Piñonero* Valladolid, Tomo II 313-320.

FERREIRA-CARDOSO J.V., SEQUEIRA C.A., 1999. Lipid composition of *Castanea sativa* Mill. Fruits of some native Portuguese cultivars Proc. 2nd Int. Symp on Chestnut, *Acta Hort*. **494**: 133-138.

FERREIRA, R., PESTANA, M., 2000. Comparação química de pinhões de *Pinus pinea* L. Provenientes de diferentes regiões do globo. In Actas *1er Simposio del Pino Piñonero* Valladolid. Tomo II 299-307.

LANNER LIKEWISE, 1981. *The piñon pine. A natural and cultural history*. University of Nevada press, Reno. Nevada, pp. 101.

MONTERO, G.G., MARTINEZ, F., ALÍA, R., CANDELAS, J.A., RUIZ-PEINADO, R., CAÑELLAS, I., MUTKE, S., CALAMA, R., GUTIÉRREZ, M., PAVON, J., ALONSO, A., DEL RIO, M., BACHIELLER, A., 2004. *El Pino Piñonero (Pinus pinea* L.) *en Andalucia. Ecologia, distribution y selvicultura.* Consejeria de médio Ambiente. Junta de Andalucia, pp. 261.

NASRI, N., KHALDI, A., FADY, B., TRIKI, S., 2005a. Fatty acids from seeds of *Pinus pinea* L.: composition and population profiling. *Phytochemistry* **66**: 1729-1735.

NASRI, N., KHALDI, A., HAMMAMI, M., TRIKI, S., 2005b. Fatty acid composition of two Tunisian pine seed oils. *Biotechnol. Prog* **21**: 998-1001.

NERGIZ, C., DÖNMEZ, I., 2004. Chemical composition and nutritive value of *Pinus pinea* L. seeds. *Food Chemistry* **86**: 365-368.

SAGREDO-NIEVES L., 1992. Fatty acid composition of Mexican pine nut (*Pinus cembroides*) oil from three seed coat phenotypes. *J. Sci. Food Agric*. **59**: 413-414.

WOLFF, R.L., DELUC, L.G., MARPEAU, A.M., COMPS, B., 1997. Chemotaxonomia differentiation of conifer families and genera based on the seed oil fatty acid compositions: multivariate analyses. *Trees* **12**: 57-65.

*Entregue para publicação em Fevereiro de 2008*
*Aceite para publicação em Abril de 2008*