



Universidade dos Açores

Faculdade de Ciências Agrárias e do Ambiente

Departamento de Ciências Agrárias

**Caracterização farmacológica de diferentes partes da
planta *Vaccinium cylindraceum* endêmica dos Açores
tendo em vista a sua valorização como
alimento funcional e nutracêutico**

Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar

Vera Catarina Branco Furtado Lima

Ponta Delgada, 2016

Vera Catarina Branco Furtado Lima

**Caracterização farmacológica de diferentes partes da
planta *Vaccinium cylindraceum* endêmica dos Açores
tendo em vista a sua valorização como
alimento funcional e nutracêutico**

**Dissertação de candidatura a obtenção do grau de
Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar**

Orientador:

Doutora Elisabete Maria de Castro Lima
Professora Auxiliar do Departamento de Ciências da
Física, Química e Engenharia da Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade dos Açores

Co-Orientador:

Doutor José António Bettencourt Baptista
Professor Associado convidado do Departamento de
Ciências da Física, Química e Engenharia da Faculdade de
Ciências e Tecnologia da Universidade dos Açores

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Professora Doutora Elisabete Lima e Professor Doutor José Baptista do Departamento de Ciências da Física, Química e Engenharia da Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT) da Universidade dos Açores, pela excelente e constante orientação, pelo apoio incondicional, simpatia, amizade e empenho, bem como todos os conhecimentos transmitidos que sem eles não teria sido possível realizar e terminar a minha tese.

À Professora Doutora Graça Silveira e à Professora Doutora Célia Silva na qualidade de docentes e coordenadoras do mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar.

Ao meu colega Filipe Gaspar e à Dra. Lisete Paiva pela sua disponibilidade e preciosa colaboração na componente laboratorial.

À Helena Figueiredo, técnica de laboratório do Departamento de Ciências da Física, Química e Engenharia da FCT da Universidade dos Açores, pela sua disponibilidade e colaboração na componente laboratorial.

À Universidade dos Açores, mais especificamente ao Departamento de Ciências da Física, Química e Engenharia da FCT, pela cedência das instalações para a realização de toda a componente prática laboratorial.

Ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, mais concretamente à Direção Geral do Ensino Superior pela cedência da Bolsa de Estudos.

Aos meus queridos pais António Lima e Jorgeana Lima, à minha querida irmã Carla Lima e ao meu namorado e companheiro Luís Carreiro por todo o apoio incondicional que me ajudou a conseguir avançar e terminar esta importante etapa da minha vida.

Por fim agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o meu sucesso académico e para a conclusão deste trabalho.

A todos, o meu sincero MUITO OBRIGADA

*“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo,
participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”*

Marie Curie

*“Sejam quais forem os resultados com êxito ou não, o importante é que no final
cada um possa dizer: 'fiz o que pude'.”*

Louis Pasteur

Lista de siglas e acrónimos

- AA** – Atividade antioxidante
- ADA** – do inglês *American Dietetic Association*
- ANOVA** - do inglês *Analisis of Variance*
- BHT** – Butil hidroxitolueno
- CPG** – Caules do VC, proveninetes do Planalto dos Graminhais (Açores)
- CSC** – Caules do VC, proveninetes da Cumeeira das Sete-Cidades (Açores)
- CV** – Chá verde (folhas soltas)
- CVP** – Chá verde (folhas pulverizadas)
- DP** – desvio padrão
- DPPH** – 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
- DRA** – Direção Regional do Ambiente
- EAG** – Equivalentes de ácido gálico
- EC₅₀** – Concentração efetiva 50 (expressa a concentração mínima de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH)
- EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EFSA** – Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
- e.g.** – do latim *exempli gratia*, que significa "por exemplo"
- EIT** – do inglês *European Institute of Innovation & Tecnology*
- ENA** – do inglês *European Nutraceutical Association*
- ECy3Glu** – Equivalentes de cianidina-3-glucósido
- EQ** – Equivalentes de quercetina
- ER** – Equivalentes de rutina
- ERN** – Espécie reativa de azoto
- ERO** – Espécie reativa de oxigénio
- EUA** – Estados Unidos da América
- FF** – Fruto fresco maduro do VC, proveninete do Planalto dos Graminhais (Açores)
- FFC** – Frusto fresco maduro do VA, proveniente do norte do Canadá
- FOSHU** – do inglês *Foods for Specifed Health Use*
- FPG** – Folhas verdes do VC, provenientes do Planalto dos Graminhais (Açores)
- FS** – Fruto seco do VC, proveniente da Cumeeira das Sete-Cidades (Açores)

FSC – Folhas verdes do VC, provenientes da Cumeeira das Sete-Cidades (Açores)

FSC2 – Folhas verdes do VC, provenientes da Cumeeira das Sete-Cidades, Açores (amostra resultante da maceração com metanol seguida da maceração com acetona)

FV – Folhas vermelhas do VC, provenientes do Planalto dos Graminhais (Açores)

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NBT – Nitro cloreto de tetrazólio azul

ODC – Ornitina decarboxilase

PMS – Metossulfato de fenazina

PNPAS – Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável

TAT – Teor de antocianinas totais

TCA – Ácido tricloroacético

TFT – Teor de flavonóides totais

TPT – Teor de polifenóis totais

UE – União Europeia

USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América

UV – Ultra-violeta

VA – *Vaccinium angustifolium*

VC – *Vaccinium cylindraceum*

V. spp. – *Vaccinium spp.*

Resumo

A elevada incidência nas sociedades industrializadas ocidentais de doenças relacionadas com distúrbios alimentares, está a conduzir a grandes mudanças nos padrões dietéticos da população em geral, levando a que haja um maior interesse por alimentos promotores de saúde.

Entre a grande variedade de alimentos naturais benéficos para a saúde humana, encontram-se os frutos vermelhos, nomeadamente o mirtilo (*Vaccinium* spp.), fruto muito conhecido quer pelo seu extraordinário poder antioxidante (atribuído sobretudo ao seu elevado teor e diversidade em compostos fenólicos), quer pelo seu sabor e aroma exóticos. De facto, o cultivo comercial deste fruto tem vindo a aumentar exponencialmente, em particular nos países da América do Sul, devido à extraordinária procura do mercado americano e europeu por este fruto fresco, seus subprodutos, ou produtos de valor acrescentado. Por outro lado, outras partes da planta do género *Vaccinium*, como por exemplo as folhas e os caules, embora menos conhecidas e estudadas do que o fruto, apresentam também propriedades antioxidantes que podem contribuir, em grande parte, para os efeitos terapêuticos que lhes são atribuídas.

Sendo o setor agrário relevante para a economia da Região Autónoma dos Açores, reveste-se de grande importância a investigação das propriedades antioxidantes do mirtilo endémico da região (*Vaccinium cylindraceum*) que se encontra escassamente estudado, apesar de pertencer ao género *Vaccinium* muito valorizado pelos seus potentes efeitos farmacológicos, nomeadamente antioxidantes, atribuídos à sua fitoquímica única e diversificada. Acresce o facto de que Portugal continental cultiva e comercializa mirtilos, com sucesso, já desde a década de 90, colocando o fruto no mercado europeu nos meses de Maio/Junho de cada ano, ou seja, antes dos demais concorrentes. O fruto comestível do mirtilo-silvestre dos Açores, se comprovado cientificamente como sendo um produto diferenciado, poderá também vir a competir, pela diferença, com os mirtilos produzidos na América e Europa.

Neste contexto, amostras de frutos, folhas e caules do mirtilo açoriano da ilha de São Miguel foram avaliadas, no presente trabalho, quanto ao seu potencial antioxidante, através do uso de diferentes ensaios antioxidantes (poder redutor, capacidade de sequestrar o radical DPPH, capacidade de sequestrar o radical anião superóxido, poder quelante e capacidade de inibição da oxidação lipídica pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico) e da determinação do teor de compostos fenólicos (fenólicos totais, flavonóides totais e antocianinas totais). Para comparação do potencial antioxidante das amostras de *V. cylindraceum* foram analisadas, nas mesmas condições experimentais, amostras de fruto fresco maduro (comercial) de *V. angustifolium*, mirtilo selvagem de plantio biológico proveniente do norte do Canadá (Quebec), e de chá verde da Gorreana (Gorreana Hysson), da ilha de São Miguel (Açores), um poderoso antioxidante natural.

A análise dos resultados mostrou que as várias partes do mirtilo-silvestre da ilha de São Miguel apresentam elevadas propriedades antioxidantes e são uma excelente fonte de compostos fenólicos. Nomeadamente, o seu fruto fresco, comparado com o fruto fresco de *V. angustifolium*, apresentou, para uma concentração de amostra de 1,00 mg/ml: (a) uma potente capacidade de sequestrar o radical DPPH (93% vs 22%; EC_{50} 0,18 vs 1,59 mg EAG/g amostra seca); (b) uma capacidade de inibição da oxidação lipídica pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico ligeiramente superior (64,4% vs 60,8%); (c) poder redutor, poder quelante e capacidade de sequestrar o radical anião superóxido ligeiramente inferiores (85,8% vs 95,9%, 74,8% vs 89,3% e 95,5% vs 98,8%, respetivamente); (d) um teor de fenólicos totais superior (34,0 vs 20,7 mg EAG/g de amostra seca); (e) um teor de flavonóides totais similar (13,2 vs 13,3 mg ER/g de amostra seca) e (f) um teor de antocianinas totais superior (3,06 vs 1,76 mg ECy3Glu/g de amostra seca).

Relativamente às outras partes do mirtilo analisadas, e para uma concentração de amostra de 1,00 mg/ml, destaca-se a extraordinária similaridade entre as suas folhas vermelhas e a amostra de chá verde, nomeadamente: (a) uma potente capacidade de sequestrar o radical DPPH (94,2% vs 93,9%; EC_{50} 0,03 vs 0,01 mg EAG/g amostra seca); (b) uma capacidade de inibição da oxidação lipídica pelo sistema β -caroteno/ácido

linoleico superior (37,8% vs 18,3%); (c) poder redutor, poder quelante e capacidade de sequestrar o radical anião superóxido similares (74,0% vs 75,5%, 99,6% vs 98,8% e 63,5% vs 63,7%, respetivamente); (d) um teor de fenólicos totais similar (247,3 vs 255,3 mg EAG/g de amostra seca); (e) um teor de flavonóides totais similar (13,2 vs 13,0 mg ER/g de amostra seca) e (f) um teor de antocianinas totais similar (0,63 vs 0,60 mg ECy3Glu/g de amostra seca).

Em conclusão, os resultados obtidos representam um contributo para a valorização do mirtilo-silvestre dos Açores como produto funcional e/ou nutracêutico e, conseqüentemente, um incentivo à sua produção biológica nos Açores a partir de espécimes endémicas selecionadas, para posterior comercialização e transformação pela agroindústria, o que contribuirá para a diversificação e desenvolvimento de novas atividades económicas na área da agricultura e da agroindústria com interesse estratégico para a Região dos Açores.

Palavras-Chaves: *Vaccinium*, Mirtilo-silvestre dos Açores, Antioxidantes, Radical DPPH, Radical anião superóxido, Poder redutor, Poder quelante, Oxidação lipídica, Teor de polifenóis totais, Teor de flavonóides totais, Teor de antocianinas totais, Alimentos funcionais, Nutracêuticos

Abstract

The high incidence in Western industrialized societies of diseases related to eating disorders, is leading to major changes in dietary patterns of the general population, and consequently in a greater interest in promoting health food.

Among the wide range of beneficial natural foods for human health, the red fruits are, in particular blueberry (*Vaccinium spp.*), well-known fruits by its extraordinary antioxidant power (attributed mainly to its high content and diversity in phenolic compounds), and for its taste and exotic aroma. In fact, the commercial production of this fruit has increased exponentially, particularly in South America countries, due to the extraordinary demand for the American and European markets by this fresh fruit, its by-products, or value-added products. On the other hand, other parts of the genus *Vaccinium*, such as leaves and stems, although less known and investigated than the fruit, also have antioxidant properties that can contribute largely to the therapeutic effects attributed to them.

The local agrarian sector is relevant to the economy of the Azores islands, therefore it is important to investigate the antioxidant properties of endemic blueberry (*Vaccinium cylindraceum*) which is poorly studied, although belong to the *Vaccinium* genus that is highly valued for their potent pharmacological effects, including antioxidant properties, attributed to its unique and diverse phytochemical products. Moreover, Portugal (main land) produces and successfully sells blueberries since the 90's, placing the fruit on the European market in the months of May/ June each year before the other competitors. The edible fruit of the Azorean wild blueberry, if proven scientifically as a better quality product, can also come to compete, in the future, with the blueberries produced in America and Europe

In this context, samples of fruits, leaves and stems of the Azorean blueberry from São Miguel island were evaluated in this study, as to its antioxidant potential by using different antioxidant tests (reducing power, ability to scavenge the DPPH radical, capacity to scavenge superoxide anion radical,

chelating power and ability to inhibit lipid oxidation by β -carotene system/linoleic acid) and determining the content of phenolic compounds (total phenolics, total flavonoids and total anthocyanins). In order to compare the antioxidant potential of *V. cylindraceum* (VC) samples, were analyzed, under the same experimental conditions, ripe fresh fruit samples of *V. angustifolium* (VA), biological commercial plantation of wild blueberry from northern Canada (Quebec), and green tea (Gorreana Hysson), a powerful natural antioxidant from São Miguel island (Azores).

The results showed that the various parts of the Azorean wild blueberry (VC) from São Miguel island have high antioxidant properties and are an excellent source of phenolic compounds. Considering the sample concentration of 1,00 mg/ml, and comparing the fresh fruit of VC with the fresh fruit of VA, the conclusions are that VC fruit have: (a) a powerful ability to scavenge the DPPH radical (93% vs 22%; EC₅₀ 0.18 vs 1.59 mg EAG/g of dry sample); (b) a slightly higher ability to inhibit lipid oxidation by β -carotene system/linoleic acid (64.4% vs 60.8%); (c) a slightly lower reducing power, chelating power and capacity to scavenge the superoxide anion radical (85.8% vs 95.9%, 74.8% vs 89.3% and 95.5% vs 98.8%, respectively); (d) a higher total phenolic content (34.0 vs 20.7 mg EAG/g of dry sample); (e) a similar total flavonoid content (13.2 vs 13.3 mg ER/g of dry sample); (f) a higher total anthocyanin content (3.06 vs 1.76 mg ECy3Glu/g of dry sample).

In regards to the other VC parts analyzed, and considering the sample concentration of 1,00 mg/ml, it should be pointed that its red leaves shows an extraordinary similarity with the green tea sample, namely: (a) a powerful ability to scavenge the DPPH radical (94.2% vs 93.9%; EC₅₀ 0.03 vs 0.01 mg EAG/g of dry sample); (b) a higher ability to inhibit lipid oxidation by β -carotene system/linoleic acid (37.8% vs 18.3%); (c) a similar reducing power, chelating power, and capacity to scavenge the superoxide anion radical (74.0% vs 75.5%, 99.6% vs 98.8% and 63.5% vs 63.7%, respectively); (d) a similar total phenolic content (247.3 vs 255.3 mg EAG/g of dry sample); (e) a similar total flavonoid content (13.2 vs 13.0 mg ER/g of dry sample) and (f) a similar total anthocyanin content (0.63 vs 0.60 mg ECy3Glu/g of dry sample).

In conclusion, the results represent a valuable contribution to the knowledge of the Azores wild blueberry as a functional fruit and/or nutraceutical and therefore turn to be an incentive to organic production in the Azores of the selected endemic specimens for further processing and agribusiness marketing, which will contribute to the diversification and development of new economic activities in the area of agriculture and agribusiness with strategic interest for the Azores region.

Keywords: *Vaccinium*, Azorean wild blueberry, Antioxidants, DPPH radical, Superoxide anion radical, Reducing power, Chelating power, Lipid oxidation, Total phenolic content, Total flavonoid content, Total anthocyanin content, Functional foods, Nutraceuticals

Índice

Agradecimentos.....	i
Lista de siglas e acrónimos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	viii
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xiv
Capítulo 1. Introdução.....	1
1.1. Enquadramento.....	1
1.2. Objetivos gerais e específicos.....	3
1.3. Contribuição científica.....	4
1.4. Estrutura da tese.....	4
Capítulo 2. Revisão bibliográfica.....	5
2.1. Alimentação e saúde.....	5
2.1.1. Alimentos funcionais.....	6
2.1.2. Nutracêuticos.....	8
2.1.3. Antioxidantes alimentares naturais na prevenção de patologias.....	10
2.1.3.1. Radicais livres e patologias induzidas pelo <i>stress</i> oxidativo: generalidades.....	10
2.1.3.2. Antioxidantes: generalidades.....	11
2.1.3.3. Fitoquímicos com atividade antioxidante.....	13
2.1.3.3.1. Compostos fenólicos.....	15
2.1.3.3.1.1. Flavonóides	17
2.1.3.3.1.2. Antocianinas.....	18
2.2. Mirtilo (<i>Vaccinium</i> spp.).....	19
2.2.1. A planta e o fruto.....	19
2.2.2. Contextualização histórica da produção do mirtilo em Portugal.....	21
2.2.3. O mirtilo nos Açores.....	22
2.2.4. Propriedades nutricionais do mirtilo.....	24
2.2.5. O mirtilo como alimento funcional e nutracêutico.....	26
2.2.5.1. Fitoquímicos, atividades biológicas e valor terapêutico de diferentes partes de <i>Vaccinium</i> spp.....	26
Capítulo 3. Materiais e Métodos.....	32
3.1. Produtos químicos e Equipamentos.....	32
3.2. Material vegetal.....	32

3.3. Extração do material vegetal.....	35
3.4. Determinação <i>in vitro</i> das propriedades antioxidantes dos extratos vegetais.....	37
3.4.1. Teste da capacidade de sequestrar o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).....	37
3.4.2. Teste do poder redutor.....	39
3.4.3. Teste do poder quelante.....	41
3.4.4. Teste da capacidade de sequestrar o radical anião superóxido.....	42
3.4.5. Teste da capacidade de inibição da oxidação lipídica pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	43
3.5. Determinação quantitativa dos teores totais de polifenóis, flavonóides e antocianinas dos extratos vegetais.....	44
3.5.1. Determinação do teor de polifenóis totais (TPT).....	44
3.5.2. Determinação do teor de flavonóides totais (TFT).....	46
3.5.3. Determinação do teor de antocianinas totais (TAT).....	47
3.6. Análise estatística.....	49
Capítulo 4. Resultados e Discussão.....	50
4.1. Avaliação <i>in vitro</i> das propriedades antioxidantes dos extratos vegetais.....	50
4.1.1. Capacidade de sequestrar o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).....	50
4.1.2. Poder redutor.....	52
4.1.3. Poder quelante.....	55
4.1.4. Capacidade de sequestrar o radical anião superóxido.....	58
4.1.5. Capacidade de inibição da oxidação lipídica pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	60
4.2. Quantificação dos teores totais de polifenóis, flavonóides e antocianinas dos extratos vegetais.....	62
4.2.1. Quantificação dos teores de polifenóis totais (TPT) e flavonóides totais (TFT).....	62
4.2.2. Quantificação do teor de antocianinas totais (TAT).....	65
4.3. Correlação entre os parâmetros estudados.....	68
Capítulo 5. Considerações finais.....	69
Bibliografia.....	76

Lista de Figuras

Figura 1. Classificação de fitoquímicos dietéticos, encontrando-se destacados os compostos fenólicos.....	14
Figura 2. Estrutura das principais classes de flavonóides.....	17
Figura 3. Estrutura de algumas antocianinas (antocianidinas 3-glucósido) abundantes em alimentos vegetais e respetivas cores.....	19
Figura 4. <i>Vaccinium cylindraceum</i> (ilha de São Miguel, Açores, Portugal).....	23
Figura 5. Pomar de Uva-da-serra (<i>Vaccinium cylindraceum</i>) nas terras altas da bacia hidrográfica da Lagoa das Furnas, ilha de São Miguel, Açores, Portugal.....	24
Figura 6. Exemplo de algumas amostras de material vegetal seco e triturado (de acordo com a ordem caules (CSC), folhas verdes (FPG) e fruto fresco maduro (FF)).....	34
Figura 7. Amostras nos agitadores magnéticos.....	35
Figura 8. (a) Exemplos de alguns extratos metanólicos. (b) Evaporação do metanol num evaporador rotativo.....	36
Figura 9. Formas radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH.....	38
Figura 10. Determinação da atividade antioxidante através da captação de radicais de DPPH.....	39
Figura 11. Exemplo de algumas amostras após a realização do método do poder redutor.....	40
Figura 12. Amostras após adição do NBT no teste da capacidade de sequestrar o radical anião superóxido.....	43
Figura 13. Exemplo de algumas amostras durante a realização do método de Folin-Ciocalteu.....	45
Figura 14. Exemplo de algumas amostras após a realização do método para a determinação do TFT.....	47
Figura 15. Exemplo de uma réplica de amostras após a realização do método para a determinação do TAT.....	49
Figura 16. Representação gráfica do teor médio (em %) da capacidade captadora de radicais de DPPH nas amostras analisadas, de acordo com a concentração (2,00 a 0,002 mg/ml).....	52
Figura 17. Representação gráfica do teor médio (em %) da capacidade do poder redutor de acordo com a concentração das amostras analisadas (0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,50 mg/ml e 1,00 mg/ml).....	53
Figura 18. Representação gráfica do teor médio (em %) da capacidade do poder quelante de acordo com a concentração das amostras (0,25 mg/ml, 0,50 mg/ml e 1,00 mg/ml).....	56
Figura 19. Representação gráfica do teor médio (em %) da capacidade de sequestrar o radical anião superóxido de acordo com a concentração das amostras (0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,50 mg/ml e 1,00 mg/ml).....	59

Figura 20. Representação gráfica do teor médio (em %) da capacidade de inibição lipídica pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico das amostras à concentração de 1,00 mg/ml.....	61
Figura 21. Representação gráfica do teor médio de antocianinas totais (TAT) nas amostras analisadas.....	66

Lista de Tabelas

Tabela 1. Exemplos de espécies reativas de oxigénio (radicalares e não radicalares) potencialmente tóxicas.....	11
Tabela 2. Classificação de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.....	12
Tabela 3. Composição nutricional média de frutos de mirtilo.....	25
Tabela 4. Teor médio em flavonóides de frutos de mirtilo cultivados.....	27
Tabela 5. Material vegetal estudado e respetiva percentagem de perda de água..	33
Tabela 6. Amostras estudadas, respetivas abreviaturas e pesos dos extratos.....	36
Tabela 7. Teor médio (em %) da capacidade captadora de radicais de DPPH nas amostras analisadas, de acordo com a concentração (2,00 a 0,002 mg/ml) e respetivo EC_{50} (média \pm DP; n = 3).....	51
Tabela 8. Teor médio (em %) da capacidade do poder redutor de acordo com a concentração das amostras analisadas (0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,50 mg/ml e 1,00 mg/ml) (média \pm DP; n = 3).....	53
Tabela 9. Teor médio (em %) da capacidade do poder quelante de acordo com a concentração das amostras analisadas (0,25 mg/ml, 0,50 mg/ml e 1,00 mg/ml) (média \pm DP; n = 3).....	55
Tabela 10. Teor médio (em %) da capacidade de sequestrar o radical anião superóxido de acordo com a concentração das amostras (0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,50 mg/ml e 1,00 mg/ml) (média \pm DP; n = 3).....	58
Tabela 11. Teor médio (em %) da capacidade de inibição lipídica pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico das amostras à concentração de 1,00 mg/ml (média \pm DP; n = 3).....	61
Tabela 12. Teor médio de polifenóis totais (TPT) e flavonóides totais (TFT) nas amostras analisadas (média \pm DP; n = 3).....	63
Tabela 13. Teor médio de antocianinas totais (TAT) nas amostras analisadas (média \pm DP; n = 3).....	65
Tabela 14. Matriz de correlação (r) dos testes efetuados para a determinação do potencial antioxidante de <i>V. cylindraceum</i> (coeficiente de correlação de <i>Pearson</i>).	68

Capítulo 1. Introdução

1.1. Enquadramento

A prevenção de doenças relacionadas com a alimentação é um dos novos desafios sociais do século XXI. Estes novos desafios da sociedade só podem ser resolvidos atravessando a barreira transfronteiriça, interdisciplinar e multicultural utilizando uma abordagem integrada que envolva a participação de todos os interessados com um esforço conjunto de modo a ultrapassar os desafios comuns e as múltiplas ligações às diferentes culturas populacionais europeias. Um dos fatores mais importantes que possibilita esta parceria é a crise económica que se vive na conjuntura atual, que deu origem a uma escassez de financiamento, tanto nos setores público como no privado. Deste modo tornou-se necessário criar um grupo de investigação europeia no que concerne à estreita relação entre a alimentação e saúde (European Commission, 2012).

Inúmeros fatores afetam a qualidade da vida moderna, de forma que a população começa a consciencializar-se da importância dos alimentos contendo substâncias que auxiliam a promoção da saúde, trazendo com isso uma melhoria do estado nutricional. De facto, as tendências mundiais da alimentação dos últimos anos demonstram um interesse crescente dos consumidores por determinados alimentos que, para além da sua composição nutricional, proporcionem benefícios para as funções fisiológicas e químicas do organismo humano. A par deste fenómeno, tem-se assistido a um aumento da oferta, variedade e qualidade dos produtos alimentares, dando origem a uma nova área de desenvolvimento nas ciências da nutrição.

O progressivo crescimento e desenvolvimento do setor alimentar tem pois constituído também um estímulo à adoção de novos hábitos alimentares, como por exemplo o consumo regular de pequenos frutos entre os quais se destaca o mirtilo (*Vaccinium* spp.). De facto é enorme a popularidade deste fruto, primeiro nos Estados Unidos da América e Canadá e atualmente no mundo. Curiosamente, existem vestígios arqueológicos que indicam que os mirtilos foram consumidos frescos ou transformados pelo Homem, desde a pré-história. Também os animais são extremamente apreciadores destes frutos. Por exemplo, nos Açores, o mirtilo endémico da região (*Vaccinium cylindraceum*) integra a dieta de verão do priolo

(*Pyrrhula murina*), uma das espécies de ave mais ameaçadas e mais raras em toda a Europa. Saliente-se, ainda, que o mirtilo dos Açores não tem sido usado para fins comerciais, contrariamente a outros mirtilos de Portugal que, desde a década de 90, cultiva e comercializa este fruto (Fonseca & Oliveira, 2007; Serrado *et al.*, 2008).

Vários estudos epidemiológicos têm sugerido a existência de uma correlação positiva entre o consumo regular de frutos e vegetais frescos e a redução do risco de ocorrência de diversas doenças crónicas. Estes alimentos, particularmente os frutos vermelhos, além de conterem quantidades apreciáveis de vitaminas e minerais, são uma excelente fonte natural de fitoquímicos (em especial compostos fenólicos) que têm demonstrado possuir diversas propriedades biológicas específicas, nomeadamente antioxidantes, desempenhando assim um papel importantíssimo no combate quer a diversas doenças diretamente relacionadas com o *stress* oxidativo (incluindo as doenças cardiovasculares, o cancro e as doenças neurodegenerativas), bem como ao processo de envelhecimento (Arts & Hollman, 2005; Neto, 2007a).

Os frutos de mirtilo são conhecidos pelo seu extraordinário poder antioxidante, atribuído sobretudo ao seu elevado teor em compostos fenólicos. No entanto, a quantidade e diversidade de compostos fenólicos presentes nesses frutos e, conseqüentemente, o seu valor terapêutico depende de vários fatores como a espécie, o grau de maturação, a localização geográfica, a composição do solo, as práticas de cultivo, entre outros (Lima *et al.*, 2009; Prior *et al.*, 1998; Rasteiro, 2012). Por outro lado, outras partes das plantas do género *Vaccinium*, como por exemplo as folhas e os caules, embora menos conhecidas e estudadas que o fruto, apresentam também efeitos terapêuticos que são atribuídos, em grande parte, às propriedades antioxidantes destas plantas (Khalili *et al.*, 2011; Vinson *et al.*, 2001).

O género *Vaccinium* é, pois, muito valorizado pelos seus potentes efeitos farmacológicos, incluindo propriedades antioxidantes, entre muitas outras (e.g. antiinflamatórias; anticancerígenas sobre vários tumores, como por exemplo bucal, da mama, cólon, próstata, pulmão, pâncreas e linfoma; antiangiogénicas; antihipertensivas e antiinfeciosas), atribuídos à sua fitoquímica única e diversificada (e.g. flavonóis, antocianinas, proantocianidinas, catequinas, ácidos hidroxicinâmicos e outros compostos fenólicos; outros ácidos orgânicos e iridóides, triterpenóides e outros terpenos) cuja combinação pode produzir benefícios de saúde sinérgicos. Estes resultados sugerem as potencialidades do uso de várias espécies do género

Vaccinium como dieta quimiopreventiva, entre outras propriedades benéficas para a saúde humana (Neto, 2007b).

Neste contexto, reveste-se de grande importância a realização do presente estudo sobre o potencial antioxidante de diferentes partes (frutos, folhas e caules) da planta endémica dos Açores pertencente ao género *Vaccinium*, o *V. cylindraceum*, que se encontra escassamente estudada (Lima *et al.*, 2009).

1.2. Objetivos gerais e específicos

Esta tese tem como objetivo geral o estudo farmacológico, nomeadamente o potencial antioxidante, dos caules, folhas e frutos do mirtilo açoriano da ilha de São Miguel.

De modo a concretizar o objetivo geral proposto, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- a) Recolha do material vegetal de *Vaccinium cylindraceum* (caules, folhas e frutos);
- b) Extração a frio do material vegetal por intermédio de solventes, como o metanol;
- c) Determinação e avaliação das propriedades antioxidantes *in vitro* dos extratos de metanol através do uso de diferentes ensaios antioxidantes, nomeadamente:
 - poder redutor;
 - capacidade de sequestrar o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH);
 - capacidade de sequestrar o radical anião superóxido;
 - poder quelante;
 - capacidade de inibição da oxidação lipídica pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico;
- d) Determinação do teor total de compostos fenólicos;
- e) Determinação do teor total de flavonóides;
- f) Determinação do teor total de antocianinas;
- g) Correlação das referidas atividades antioxidantes (alínea c) com os teores totais de compostos fenólicos, flavonóides e antocianinas;

- h) Comparação do potencial antioxidante das amostras de *Vaccinium cylindraceum* com o do:
- fruto fresco maduro (comercial) de *V. angustifolium*, mirtilo selvagem de plantio biológico proveniente do norte do Canadá (Quebec);
 - chá verde da Gorreana da ilha de São Miguel (Açores, Portugal), um poderoso antioxidante natural.

1.3. Contribuição científica

Tendo em consideração o exposto nos pontos anteriores, a realização desta tese reveste-se de grande importância, uma vez que visa uma melhoria do conhecimento atual sobre as propriedades terapêuticas, nomeadamente antioxidantes, de diferentes partes do mirtilo-silvestre endémico dos Açores (*Vaccinium cylindraceum*). Poderá contribuir, assim, para uma maior valorização desta planta como produto funcional e/ou nutracêutico. Consequentemente, pode constituir um incentivo à produção biológica desta planta nos Açores para posterior comercialização e transformação pela agroindústria, com potencial impacto económico e social para a Região Autónoma dos Açores.

1.4. Estrutura da tese

Esta dissertação de mestrado encontra-se estruturada em cinco capítulos, incluindo a presente introdução onde é feita a caracterização do tema em estudo. No segundo capítulo é efetuado um enquadramento teórico do tema do trabalho. O terceiro capítulo refere-se ao trabalho experimental desenvolvido. No quarto capítulo apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos com o trabalho experimental desenvolvido. Finalmente, no capítulo cinco são apresentadas as principais conclusões deste trabalho, bem com as perspetivas para a sua continuação.