

**Susana Rodrigues Matos**

Influência da localização geográfica de produção nas propriedades de mirtilos *Vaccinium corymbosum* L. cv. Bluecrop

**Dissertação**

Mestrado em Qualidade e Tecnologia Alimentar

Julho, 2015



**Susana Rodrigues Matos**

Influência da localização geográfica de produção nas propriedades de mirtilos *Vaccinium corymbosum* L. cv. Bluecrop

**Dissertação**

Mestrado em Qualidade e Tecnologia Alimentar

Trabalho efetuado sob orientação de

Prof. Doutora Raquel Guiné

Trabalho co-orientado por

Prof. Doutor Fernando Gonçalves

Mestre Daniela Teixeira

Julho, 2015



Dissertação apresentada à  
Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viseu  
para obtenção do grau de  
Mestre em Qualidade e Tecnologia Alimentar

As doutrinas expressas neste trabalho  
são da exclusiva responsabilidade do autor.

“Stay Hungry. Stay Foolish.”

Steve Jobs

## **AGRADECIMENTOS**

É da minha vontade deixar aqui expresso o meu agradecimento e reconhecimento a todas as pessoas, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço em particular:

À Professora Doutora Raquel Guiné, minha orientadora e aos meus co-orientadores, Professor Doutor Fernando Gonçalves e Professora Daniela Teixeira, pela excelente orientação científica, pela revisão do trabalho, pelos esclarecimentos, opiniões e sugestões. Agradeço a total disponibilidade em todo o trabalho desenvolvido, empenho na condução do trabalho experimental, pelos conhecimentos transmitidos, pela ajuda, colaboração, amizade e por todo o apoio. Obrigada a Todos.

Às empresas Biobaga, Terras altas e Delicias do Tojal, e à Eng<sup>a</sup> Cecília Palmeiro e ao Sr. Borges, que que tão generosamente me disponibilizaram as amostras das cultivares de mirtilo, sem as quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

À D<sup>a</sup> Etelvina e Engenheiro Rui Coutinho pela ajuda e pelos momentos passados no laboratório.

Aos colegas de mestrado pela ajuda durante a realização deste trabalho.

Às minhas amigas Filipa, Susana e Vitória por todas as palavras de apoio e pelo encorajamento.

À Catarina, pela amizade e apoio incondicional. Obrigada pelos teus conselhos, pela tua força e por estares sempre aí.

Ao Ricardo, pela amizade, amor, carinho e compreensão. Obrigada por nunca teres desistido, por acreditares em mim e me fazeres acreditar também. Obrigada por teres lutado comigo.

Aos meus pais, José Carlos e Fernanda, a quem devo tudo o que sou hoje. Obrigada por todos os esforços, e por me apoiarem incondicionalmente.

Aos meus avós, José e Ermelinda, por fazerem parte da minha vida.

## RESUMO

Os antioxidantes na dieta podem ter um papel importante na prevenção de algumas doenças crónicas em seres humanos resultantes da oxidação de lípidos e outros componentes celulares por radicais livres. Os mirtilos (*Vaccinium sp.*) são considerados, de entre os frutos frescos, uma das melhores fontes de antioxidantes.

Neste trabalho foram estudados mirtilos Northern Highbush, da cultivar *Bluecrop* colhidos no estado de maturação comercial em 5 localizações diferentes: Bouças - Sever do Vouga, Estarreja, Queirã – Vouzela, Oliveira do Hospital e Vila Verde.

Foram avaliadas as características físico-químicas (°brix, acidez, humidade, calibre, firmeza, elasticidade e parâmetros colorimétricos) dos frutos. Para a determinação da composição fenólica e a atividade antioxidante os mirtilos foram submetidos a extrações sucessivas, com metanol (2x) e depois 2 vezes com uma solução aquosa de acetona (40% v/v), durante 1 h, com o auxílio de um banho de ultrassons. Os extratos obtidos foram utilizados para a determinação da composição fenólica (compostos fenólicos totais, antocianinas e taninos) e da capacidade antioxidante (utilizando os métodos ABTS, DPPH e FRAP). Foi ainda avaliada a influência da conservação durante 6 meses a -20°C no teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante dos frutos.

Pelos resultados obtidos, nos parâmetros de textura avaliados a amostra BBO revelou maior firmeza e elasticidade, e na avaliação da cor a amostra BES apresentou uma tonalidade azul mais acentuada. Os mirtilos provenientes de Estarreja eram os mais ricos em compostos fenólicos totais, em antocianinas e taninos, e que também apresentavam maior atividade antioxidante. O armazenamento durante 6 meses a -20°C, originou diferenças significativas nas antocianinas e na atividade antioxidante.

Em geral as amostras apresentavam diferenças significativas tanto nas suas propriedades físico-químicas, como na composição fenólica e na atividade antioxidante.

**Palavras-chave:** Mirtilo; Bluecrop; compostos fenólicos; atividade antioxidante; cor; textura; antocianinas; taninos

## ABSTRACT

Dietary antioxidants can play an important role in the prevention of some chronic diseases in human beings, resulting from lipid oxidation and other cellular components by free radicals. Blueberries (*Vaccinium* sp.) are considered, from the fresh fruit, one of the best sources of antioxidants.

At this work involved a study blueberries Northern Highbush, cultivar Bluecrop harvested at a commercial maturity state in 5 different locations: Bouças - Sever do Vouga, Estarreja, Queirã - Vouzela, Oliveira do Hospital and Vila Verde.

Were evaluated the physical and chemical characteristics (°brix, acidity, moisture, size, firmness, elasticity and colorimetric parameters) of the fruit. For the determination of the composition and phenolic antioxidant blueberries were submitted to successive extractions with methanol (2x) and then 2 times with aqueous acetone (40% v / v) for 1 h with the aid of a ultrasonic bath. The extracts obtained were used to determine the phenolic composition (total phenolic compounds, anthocyanins and tannins) and antioxidant capacity (using the ABTS method, DPPH and FRAP). Was also evaluated the influence of preservation for 6 months at -20 ° C in the content of phenolic compounds and antioxidant capacity of fruits.

The results obtained in texture parameters evaluated BBO sample revealed greater firmness and elasticity, and the evaluation of color sample BES showed a more pronounced blue tint. Blueberries from Estarreja were richer in phenolic compounds, anthocyanins and tannins and who also had higher antioxidant activity. The storage for 6 months at -20 ° C caused significant differences in anthocyanins and antioxidant activity.

In general the samples showed significant differences in their physicochemical properties, in the phenolic composition and antioxidant activity.

**Keywords:** Blueberry; Bluecrop; phenolic compounds; antioxidant activity; color; texture; anthocyanins; tannins.

## ÍNDICE GERAL

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>IV</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE GERAL</b> .....	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>X</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	<b>XII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1. ENQUADRAMENTO GERAL.....	2
2. OBJETIVOS .....	3
<b>II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
3. O MIRTILLO.....	5
3.1. Classificação botânica.....	5
3.2. Anatomia e Morfologia.....	6
3.3. A cultivar Bluecrop.....	7
3.4. Informação nutricional do mirtilo.....	8
3.5. Condições favoráveis de cultivo .....	9
3.6. Produção de mirtilo em Portugal .....	10
3.7. Parâmetros indicativos da qualidade do fruto.....	11
3.7.1. Cor .....	11
3.7.2. Textura.....	12
3.8. Fitoquímicos – compostos fenólicos.....	13
3.8.1. Ácidos Fenólicos.....	15
3.8.2. Antocianinas .....	17
3.8.3. Taninos .....	18
3.8.4. Atividade antioxidante.....	20
3.8.5. Impactos na saúde.....	222

3.9.	Fatores que influenciam os compostos bioativos .....	244
3.9.1.	Genótipo .....	25
3.9.2.	Práticas de cultivo.....	26
3.9.3.	Sistema de produção agrícola .....	27
3.9.4.	Clima e Fatores ambientais .....	28
3.9.5.	Data de colheita e estado de maturação .....	29
3.9.6.	Condições de armazenamento e processamento.....	29
<b>III.</b>	<b>DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>31</b>
4.	MATERIAL E MÉTODOS .....	32
4.1.	Colheita das amostras.....	32
4.2.	Caracterização dos locais de colheita .....	33
4.3.	Análises Físicas.....	34
4.3.1.	Cor .....	34
4.3.2.	Textura.....	35
4.3.3.	Calibre.....	35
4.4.	Análises Químicas.....	35
4.4.1.	Humidade.....	35
4.4.2.	Determinação da acidez titulável (AcT) .....	36
4.4.3.	Determinação do teor de sólidos solúveis (grau Brix).....	36
4.5.	Preparação de extratos .....	36
4.5.1.	Determinação dos fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu .....	37
4.5.2.	Determinação das antocianinas totais .....	38
4.5.3.	Determinação dos taninos totais.....	39
4.5.4.	Avaliação da atividade antioxidante.....	39
4.6.	Tratamento estatístico .....	44
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
5.	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS .....	46
5.1.	Caracterização físico-química dos frutos.....	46
5.2.	Conteúdo em fenóis totais.....	50
5.2.1.	Conteúdo em fenóis totais nos frutos frescos .....	50
5.2.2.	Comparação do teor de fenóis entre os frutos frescos e congelados.....	52

5.3.	Atividade antioxidante .....	53
5.3.1.	Atividade antioxidante dos frutos em frescos.....	53
5.3.2.	Comparação da atividade antioxidante dos frutos congelados e frescos.....	57
5.4.	Conteúdo em antocianinas totais .....	59
5.5.	Conteúdo em taninos totais .....	61
5.5.1.	Conteúdo em taninos totais no fruto fresco.....	61
5.5.2.	Comparação do teor de taninos totais entre os frutos congelados e frescos.....	62
5.6.	Análise global dos resultados .....	63
<b>V.</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>67</b>
6.	CONCLUSÕES .....	68
<b>VI.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>70</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ilustração Botânica da espécie <i>Vaccinium corymbosum</i> L. ....	7
<b>Figura 2:</b> Horas de frio abaixo dos 7°C registadas em Portugal entre o ano de 2009 e 2013. ....	10
<b>Figura 3:</b> <i>Vaccinium corymbosum</i> L. em diferentes estados de maturação, com as cores típicas de evolução do fruto.....	12
<b>Figura 4:</b> Classificação dos compostos fenólicos existentes nos pequenos frutos.....	14
<b>Figura 5:</b> Estrutura de ácidos fenólicos derivados do ácido benzoico.....	15
<b>Figura 6:</b> Estrutura de ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico.....	16
<b>Figura 7:</b> Estruturas das antocianidinas mais frequentemente encontradas em alimentos de origem vegetal .....	17
<b>Figura 8:</b> Estrutura química da Catequina e Epicatequina.....	19
<b>Figura 9:</b> Ativação do fator de transcrição NF-kB (P50-P65) por stresse oxidativo.....	23
<b>Figura 10:</b> Mirtilos no estado de maturação comercial: coloração completamente desenvolvida, sem perda de turgência.....	32
<b>Figura 11:</b> Locais de recolha dos mirtilos.....	33
<b>Figura 12:</b> Sistema de cores CIELab (L*a*b*).....	34
<b>Figura 13:</b> Curva de calibração obtida com padrões de ácido gálico, utilizada na determinação do teor em fenóis totais. ....	38
<b>Figura 14:</b> Formação do complexo (Fe <sup>2+</sup> -TPTZ) após redução do Fe <sup>3+</sup> por um antioxidante.....	40
<b>Figura 15:</b> Curva de calibração elaborada com padrões de Trolox usada na determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP.....	41
<b>Figura 16:</b> Reações que ocorrem na redução do radical DPPH•.....	41
<b>Figura 17:</b> Curva de calibração elaborada com padrões de Trolox usada na determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH. ....	42
<b>Figura 18:</b> Formação do Radical ABTS <sup>•+</sup> .....	43
<b>Figura 19:</b> Curva de calibração elaborada com padrões de Trolox utilizada na determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS.....	43
<b>Figura 20:</b> Valores dos fenóis totais nos extratos de metanol e acetona. ....	50

<b>Figura 21:</b> Variação de fenóis totais no fruto congelado em relação ao fruto fresco. ....	52
<b>Figura 22:</b> Atividade antioxidante dos extratos de metanol e acetona das amostras da cultivar Bluecrop, avaliadas pelo método de DDPH expressos em equivalentes de Trolox. ....	53
<b>Figura 23:</b> Atividade antioxidante dos extratos de metanol e acetona das amostras da cultivar Bluecrop, avaliadas pelo método de ABTS expressos em equivalentes de Trolox. ....	54
<b>Figura 24:</b> Atividade antioxidante dos extratos de metanol e acetona das amostras da cultivar Bluecrop, avaliadas pelo método de FRAP expressos em equivalentes de Trolox. ....	56
<b>Figura 25:</b> Comparação da atividade antioxidante total dos frutos frescos e congelados pelo método DPPH. ....	57
<b>Figura 26:</b> Comparação da atividade antioxidante total dos frutos frescos e congelados pelo método ABTS. ....	58
<b>Figura 27:</b> Valor de antocianinas expresso em mg Mal-3-Glu por grama de amostra. ....	59
<b>Figura 28:</b> Valores de Taninos totais obtidos expressos em mg por grama de amostra. ....	61
<b>Figura 29:</b> Valores de taninos totais obtidos para o fruto fresco e congelado. ....	62

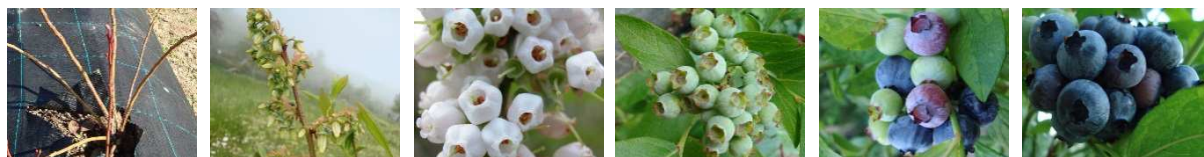
## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Composição nutricional do mirtilo por 100 g de parte edível .....	8
<b>Tabela 2:</b> Estrutura química, mecanismo antioxidante e localização dos principais antioxidantes existentes nas frutas e vegetais.....	22
<b>Tabela 3:</b> Avaliação da influência do genótipo no teor de fenóis totais, antocianinas e atividade antioxidante ao longo de dois anos consecutivos.....	25
<b>Tabela 4:</b> Características das plantações dos mirtilos colhidos para análise ..	33
<b>Tabela 5:</b> Caracterização físico-química dos mirtilos avaliados .....	46
<b>Tabela 6:</b> Valores de textura e calibre obtidos para as diferentes amostras	<b>Erro!</b>
<b>Marcador não definido.</b>	
<b>Tabela 7:</b> Valores dos parâmetros de cor para as amostras de diferentes localidades .....	49
<b>Tabela 8:</b> Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e os parâmetros físicos analisados. ....	64
<b>Tabela 9:</b> Coeficientes de Pearson para as correlações entre composição fenólica e atividade antioxidante. ....	64
<b>Tabela 10:</b> Correlação linear entre as variáveis idade da planta e altitude de produção e as características físico-químicas.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 1E-M – 1º extrato de Metanol  
2E-M - 2º extrato de Metanol  
3E-A - 1º extrato de Acetona  
4E-A - 2º extrato de Acetona  
AAT – Atividade antioxidante total  
Abs - Absorvância  
ABTS\* - 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)  
AcT – Acidez titulável  
ADN - ácido desoxirribonucleico  
ANT - antocianinas  
BBO – mirtilos colhidos na localidade de Bouças – Sever do Vouga  
BES - mirtilos colhidos na localidade de Avanca – Estarreja  
BOH - mirtilos colhidos na localidade de Oliveira do Hospital  
BQU - mirtilos colhidos na localidade de Queirã – Vouzela  
BVV - mirtilos colhidos na localidade de Coucieiro - Vila Verde  
DPPH\* - 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo  
EAG – Equivalente de ácido gálico  
ERO – Espécies reativas de oxigénio  
ET – Equivalentes de Trolox  
FD – Fator diluição  
FRAP - Ferric Reduction Antioxidant Power  
FT – Fenóis totais  
IM – índice de maturação  
Mav3G – Malvidina-3-Glucósido  
MC<sub>6</sub> – Mirtilo congelado 6 meses  
NHB – Northern Highbush  
ORAC - Oxygen Radical Absorbance Capacity  
SHB – Southern Highbush  
SST – Sólidos solúveis totais  
TAN – Taninos Totais  
TPTZ - 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina

## I. INTRODUÇÃO



## 1. Enquadramento geral

Em Portugal, a cultura do mirtilo tem vindo a assumir protagonismo e a ganhar interesse por parte dos consumidores e produtores. O crescimento e desenvolvimento do sector alimentar, e a influência dos restantes países da Europa, introduziram novos hábitos alimentares, como o consumo de alimentos funcionais, especialmente dos frutos vermelhos.

O consumo de bagas tornou-se popular entre os consumidores preocupados com a saúde devido aos seus altos níveis de compostos bioativos com propriedades antioxidantes (You *et al.*, 2011). Dentro dos compostos antioxidantes existentes no mirtilo, os que desempenham um papel de maior relevância são os compostos fenólicos, nomeadamente os flavonoides, antocianinas e taninos, tornando-o numa das frutas mais desejáveis e nutritivas (Contessa *et al.*, 2013). Como fonte elevada de compostos bioativos, o mirtilo surgiu como potencial terapêutico para abrandar a progressão de diversas doenças. Esta pequena baga, para além de ter efeitos protetores no trato intestinal e nos olhos, atua nos principais mecanismos anti-inflamatórios e de stresse oxidativo. Para além disto têm sido descritas diversas propriedades benéficas associadas aos mirtilos, nomeadamente no tratamento e prevenção de desordens do trato urinário, de patologias cardiovasculares, da cárie dentária, de úlceras gástricas e do cancro (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; Norberto *et al.*, 2013). São também descritas propriedades anti-proliferativas, anti-cancerígenas, antibacterianas e antivirais (Wang *et al.*, 2012a).

Apesar do teor elevado em fitoquímicos, na generalidade das variedades de mirtilos, é sabido que quer a quantidade, quer o perfil exato destes compostos, podem variar, não só, com a cultivar e com o seu grau de maturação, como também com as condições de solo e clima ou com práticas agrícolas, podendo algumas destas diferenças ser resultado de diferentes graus de stresse hídrico, da maior ou menor disponibilidade de nutrientes e da intensidade da radiação ultravioleta (Giovanelli & Buratti, 2009; Kalt, 2005).

Portugal, pela variedade dos seus relevos e exposição das suas encostas e vales, apresenta condições microclimáticas muito diferentes (Sousa *et al.*, 2001).

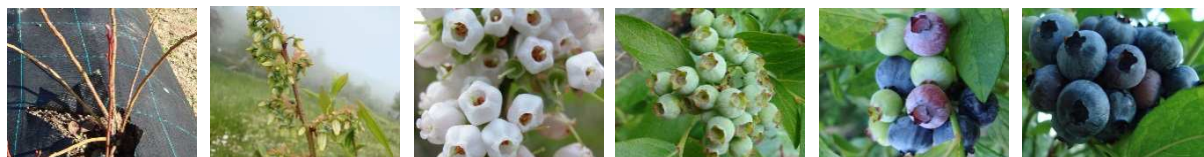
Nesse sentido, foram avaliados os teores de compostos bioativos presentes em mirtilos produzidos em diferentes condições ambientais.

## 2. Objetivos

Com a realização deste trabalho pretendeu-se avaliar a influência da localização de cultivo de mirtilos *Vaccinium corymbosum* L., cultivar Bluecrop, nas suas propriedades físicas e químicas. Nesse sentido foram colhidos mirtilos em 5 localidades geográficas distintas, e que, posteriormente, foram avaliados quanto às suas propriedades físicas (calibre, firmeza da pele e cor) e químicas (acidez, °brix, humidade, composição fenólica, atividade antioxidante e teor de antocianinas e taninos totais).

Este trabalho teve ainda como objetivo estabelecer correlações entre os parâmetros analisados, bem como avaliar a influência da idade das plantas e da altitude do local de cultivo nas características dos mirtilos.

## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



### 3. O mirtilo

#### 3.1. Classificação botânica

O mirtilo pertence à família *Ericaceae*, do género *vaccinium* e subgénero *Cyanococcus* (Ratnaparkhe, 2007). O género *vaccinium* apresenta um alto nível de diversidade morfológica, contabilizando cerca de 450 espécies, das quais 40% se encontram na Ásia e no Pacífico, 26 no sub-continente norte-americano e 6 na Europa (Fonseca & Oliveira, 2007).

As plantas de mirtilo com maior interesse económico pertencem ao subgénero *Cyanococcus*, e dividem-se normalmente em três grupos consoante as suas características: (1) cultivares Lowbush, (2) cultivares Rabbiteye e (3) cultivares *Highbush* (*Vaccinium corymbosum* L.) (Hancock, Lyrene, Finn, Vorsa, & Lobos, 2008; Kim, Kim, Kim, & Park, 2013; Ratnaparkhe, 2007), sendo as últimas responsáveis pela maioria da produção mundial de mirtilos. As cultivares *Vaccinium corymbosum* L. contemplam ainda espécies com maior ou menor necessidade de horas de frio, “Northern Highbush Blueberry (NHB)” e “Southern Highbush Blueberry (SHB)” respetivamente (Sousa *et al.*, 2007).

Dentro das características mais procuradas nos frutos de mirtilo destacam-se o sabor e aroma, o tamanho do fruto, o tamanho da cicatriz e a cor das bagas (Retamales & Hancock, 2012). Na produção de mirtilos, cultivares que produzem bagas mais firmes e uniformes, com pedúnculos que se desprendem facilmente merecem também especial atenção por parte do produtor (J. F. Hancock *et al.*, 2008). Para além das características supracitadas, a maioria dos programas de melhoramento de cultivares de mirtilo estão também preocupados com a expansão da data de colheita (Retamales & Hancock, 2012; Scalzo *et al.*, 2013), com o desenvolvimento de cultivares com maior rusticidade ao inverno, mais resistentes à seca, com maior adaptação à colheita mecânica (J. F. Hancock *et al.*, 2008; Scalzo *et al.*, 2013) e com produtividades mais elevadas (Prodorutti *et al.*, 2007).

### 3.2. Anatomia e morfologia

O mirtilo é uma planta perene que possui um sistema radicular superficial e muito fibroso (Retamales & Hancock, 2012), cujas raízes se distribuem nos primeiros 60 centímetros de profundidade (Prodorutti *et al.*, 2007) assegurando a absorção de água e nutrientes. No entanto, a ausência de pelos radiculares torna as plantas mais sensíveis a mudanças nas condições de água no solo (Fonseca & Oliveira, 2007; Retamales & Hancock, 2012). As raízes dos mirtilos não apresentam um verdadeiro período de repouso, visto que crescem sempre que as condições ambientais no solo sejam favoráveis.

O género *vaccinium* caracteriza-se por arbustos que alcançam de 1 a 1,5 metros de altura, com ramos grossos, eretos e lenhosos, com flores de corola em sino (Fonseca & Oliveira, 2007). Nos mirtilos a diferenciação floral inicia-se nos gomos da extremidade distal e prossegue de forma basípeta ao longo do ramo, sendo que em algumas cultivares, os gomos florais encontram-se intercalados por gomos vegetativos (Fonseca & Oliveira, 2007).

O fruto do mirtilo, que amadurece 2 a 3 meses após a floração, é baciforme e globoso, sumarento e tem um sabor agridoce (Sousa *et al.*, 2007). Esta pequena baga com sementes apresenta geralmente uma coloração azul e uma cicatriz localizada diametralmente oposta ao ápice, de dimensão e formato variáveis, consoante a espécie e a cultivar (Sousa *et al.*, 2007). A figura 1 mostra a anatomia e morfologia características da espécie *Vaccinium corymbosum* L.

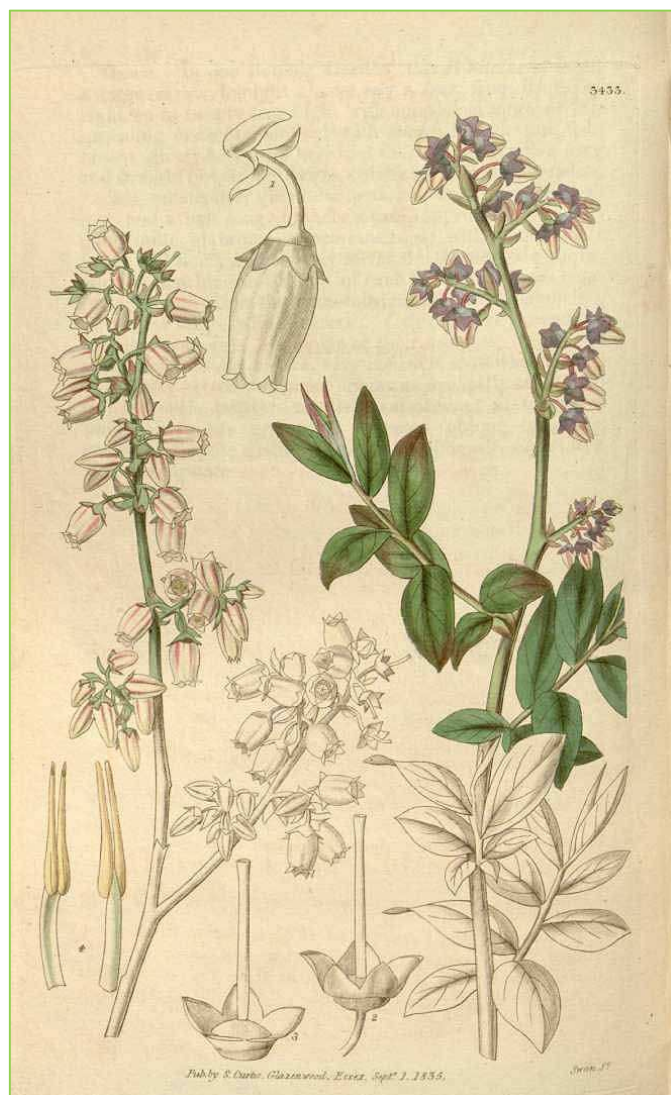


Figura 1: Ilustração Botânica da espécie *Vaccinium corymbosum* L. Fonte: Curtis's Botanical Magazine, vol. 62," 1835).

### 3.3. A cultivar *Bluecrop*

A variedade *Bluecrop* está inserida no grupo das cultivares “Northern Highbush Blueberry”, e foi durante muitos anos considerada a cultivar mais importante do mundo (J. F. Hancock *et al.*, 2008). A cultivar foi lançada pelo departamento de Agricultura dos Estados Unidos, através de um cruzamento entre (Jersey x Pioneer) x (Stanley x June) realizado por Coville e Freeman em 1934 (Fira *et al.*, 2008).

A cultivar *Bluecrop* caracteriza-se por ser um arbusto vigoroso e reto (Demchak, 2013), muito produtivo, resistente à geada e à seca, de fácil crescimento,

mas relativamente difícil de propagar (Fira *et al.*, 2008). As bagas são médias, numerosas e resistentes a rachaduras (Demchak, 2013). O fruto possui uma cicatriz pequena, o que permite diminuir a suscetibilidade dos frutos ao aparecimento de podridões e perdas de turgência durante o armazenamento (Sousa *et al.*, 2007). Caracteriza-se ainda por possuir bagos com calibres muito irregulares, e pela necessidade de estes permanecerem na planta 5 a 7 dias após a maturação visual, para adquirir bom sabor e doçura. A poda da *Bluecrop* deve ser cuidadosa, a fim de evitar a prostração da planta.

Em Portugal, a cultivar *Bluecrop* produz em geral entre o final do mês de Maio e final do mês de Junho.

### 3.4. Informação nutricional do mirtilo

A composição nutricional do mirtilo varia em função de diversos fatores que incluem o genótipo, as práticas de cultivo, o grau de maturação, as condições edafoclimáticas e as condições de armazenamento. Na tabela 1 apresenta-se a composição nutricional média do mirtilo por 100 g de parte edível.

Tabela 1: Composição nutricional do mirtilo por 100 g de parte edível

Adaptado de ("USDA - National Nutrient Database for Standard Reference, Release 27," 2010).

Nutrientes	Valor/100g	Nutrientes	Valor/100g
Energia (kcal)	57,00	Selénio (µg)	0,10
Proteínas (g)	0,74	Sódio (mg)	1,00
Gorduras (g)	0,33	Zinco (mg)	0,16
Hidratos de carbono (g)	14,49	Vitamina C (mg)	9,70
Fibra (g)	2,40	Tiamina (mg)	0,04
Água (g)	84,21	Riboflavina (mg)	0,04
Cálcio (mg)	6,00	Niacina (mg)	0,42
Ferro (mg)	0,28	Ácido pantoténico (mg)	0,12
Magnésio (mg)	6,00	Vitamina B-6 (mg)	0,05
Manganésio (mg)	0,34	Folato (µg)	6,00
Fósforo (mg)	12,00	Vitamina A (UI)	54,00
Potássio (mg)	77,00	Vitamina E (mg EAT)	0,57

O mirtilo é um fruto com excelentes propriedades organolépticas, nutricionais e funcionais, visto que, para além das características observadas na tabela 1,

apresenta de um modo geral, teores elevados de polifenóis, em particular antocianinas e taninos, que contribuem fortemente para a sua atividade antioxidante.

### 3.5. Condições favoráveis de cultivo

Os mirtilos, como as demais plantas, necessitam de condições específicas e adequadas ao seu crescimento, que permitam alcançar uma melhor produção. Dos fatores mais importantes para a obtenção de boas produções destacam-se as características do solo e as condições ambientais.

O mirtilo prefere um solo profundo, bem arejado, ácido e rico em matéria orgânica (Demchak, 2013; Ireland & Wilk, 2006; Tasa *et al.*, 2012). Este arbusto da família *Ericaceae* tem a capacidade de crescer numa grande variedade de solos; no entanto, para as cultivares *Highbush* o pH ideal situa-se entre 4,5-5,2 (Prodorutti *et al.*, 2007).

Como cobertura ou por aplicação no solo, a turfa pode favorecer o crescimento da planta (Ochmian *et al.*, 2009; Xie & Wu, 2009). Esta substância orgânica ácida auxilia na manutenção do pH ideal para o cultivo do mirtilo, que por sua vez influencia significativamente a fotossíntese foliar, a absorção de nutrientes e a atividade da raiz da planta (Tasa *et al.*, 2012), para além de favorecer o arejamento do solo.

Os solos ricos em matéria orgânica (superior a 5%) são também benéficos na produção de mirtilos, pois mantêm os nutrientes no sistema radicular, evitando que sejam lixiviados (Ireland & Wilk, 2006). Ainda relativamente aos pré-requisitos do solo, as raízes dos mirtilos não toleram solos extremamente secos ou húmidos (Demchak, 2013), pelo que plantações em solos mal drenados ou compactados podem provocar stresse hídrico nas plantas, bem como favorecer o desenvolvimento de doenças (Bryla, 2011).

Outra das exigências deste arbusto são as horas de frio abaixo dos 7 °C necessárias para o abrolhamento dos gomos vegetativos e o crescimento dos ramos (figura 2). Para a maioria das cultivares *Highbush* as quantidades de frio variam de um mínimo de 750 horas (Demchak, 2013; Strik, 2012) a um máximo de 1500 horas (Strik, 2012). No caso da cultivar *Bluecrop*, os requisitos de frio abaixo dos 7 °C são

superiores às 800 horas. Caso as condições climáticas não propiciem o período de quiescência adequado a cada cultivar, e ocorra um precoce florescimento dos mirtilos, os produtores devem ter especial cuidado com geadas tardias, a fim de evitar danos na folhagem, flores e frutos (Ireland & Wilk, 2006).

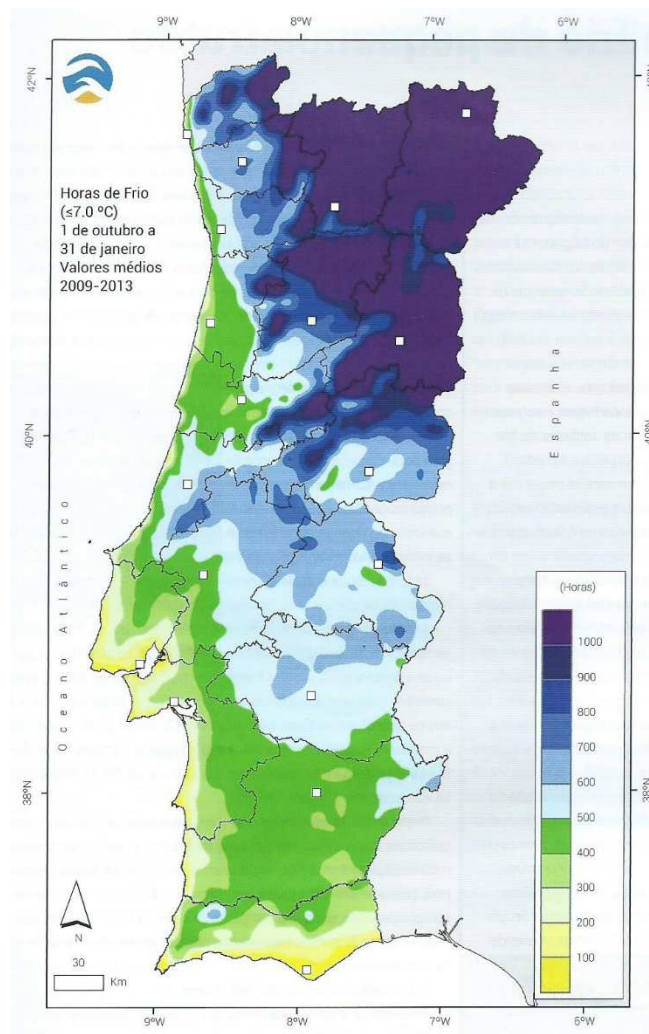


Figura 2: Horas de frio abaixo dos 7°C registadas em Portugal entre o ano de 2009 e 2013. Adaptado de Madeira, (2013)

### 3.6. Produção de mirtilo em Portugal

A produção de mirtilos em Portugal iniciou-se há cerca de 25 anos, quando a Fundação Lockorn, da Holanda, efetuou uma experiência nos concelhos de Sever

do Vouga e Trancoso no sentido de determinar se possuíam as condições indicadas para garantir a produção precoce do mirtilo.

A exploração do mirtilo está a tornar-se numa cultura com considerável importância económica a nível regional e nacional, não só em termos de área mas também em número de produtores. Nos últimos anos tem-se assistido a um crescente interesse pela cultura dos mirtilos, não só por causa da conjuntura atual do país, mas também devido às ajudas comunitárias para este tipo de cultura. Por outro lado, o progressivo crescimento e desenvolvimento do sector alimentar e a influência dos restantes países da Europa, introduziram novos hábitos alimentares, como o consumo de pequenos frutos, nos quais se inclui o mirtilo.

Pelas características fortemente sazonais da produção de mirtilo na Europa, em Portugal, em particular na região sudoeste do país, surge a oportunidade de reduzir o período não-produtivo produzindo-se mirtilo durante a primavera, e também em setembro, aproveitando os preços elevados praticados na Europa durante esse período (Parente *et al.*, 2013).

Nos últimos anos assistiu-se a um aumento da área de produção, que passou dos 75 hectares em 2011, para 534 hectares em 2013 (INE, 2014), representando um aumento de 712%. Estima-se que a área cultivada continue a aumentar, e atinja brevemente os 1000 hectares. Segundo as mesmas estatísticas agrícolas de 2014, a produção de mirtilos duplicou, sendo em 2011 de cerca de 700 toneladas, e em 2012 de 1437 toneladas (INE, 2014). Apesar disto, os Estados Unidos da América continuam a ser o grande produtor mundial de mirtilos, seguido do Canadá, Polónia e Alemanha, com 120929, 11251 e 8 843 toneladas, respetivamente (FAOSTAT, 2015).

### **3.7. Parâmetros indicativos da qualidade do fruto**

#### **3.7.1. Cor**

O cultivo do mirtilo está claramente em expansão, e a sua aceitabilidade por parte do consumidor está relacionada com as suas características físicas, nomeadamente a textura e a cor.

Os mirtilos destinados à comercialização em fresco devem apresentar-se com cor azul e recobertos por uma cera epicuticular natural, a pruína, que constitui uma barreira importante à perda de água, impedindo a perda de turgência (Rasteiro, 2012). As bagas do mirtilo são facilmente reconhecidas pela sua distinta cor azul-avermelhada, derivada fundamentalmente do teor em antocianinas que estas contêm (Pallas *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2005) e também pela quantidade e estrutura da cera superficial, a pruína (Silva *et al.*, 2005). A cor do mirtilo é influenciada pela presença de pruína, que produz o efeito glauco responsável pela cor azul típica dos mirtilos (figura 3).



Figura 3: *Vaccinium corymbosum* L. em diferentes estados de maturação, com as cores típicas de evolução do fruto

### 3.7.2. Textura

No mirtilo, a textura está associada ao conceito geral de frescura e qualidade dos frutos (Matiacevich *et al.*, 2011; Saftner *et al.*, 2008), constituindo um fator crítico na determinação do seu sucesso económico (Giongo *et al.*, 2013). Características anatómicas como as camadas do tecido e o tamanho das células, o conteúdo em água e a própria composição da parede celular podem afetar a textura do mirtilo (Chiabrando *et al.*, 2009; Sams, 1999).

A firmeza surge como uma das formas mais comumente usadas para descrever a textura da fruta, e é essencialmente determinada pelo tamanho das células da pele e a pela forma das camadas das células do pericarpo subjacentes (Giongo *et al.*, 2013). Para além de ser um importante atributo na avaliação da frescura do mirtilo (Chiabrando *et al.*, 2009), a firmeza é também essencial durante o transporte deste fruto aos principais mercados de consumo (Silva *et al.*, 2005), afetando o seu período de conservação pós-colheita (Yang *et al.*, 2009).

O amadurecimento é uma das fases mais importantes no desenvolvimento do fruto. Nesta fase, a pectina total solúvel em água diminui e a degradação da parede celular e lamela central é responsável pela perda de firmeza, seguida da perda de turgência das células do fruto (Giongo *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2007).

Segundo Sams (1999), fatores ambientais como luz e temperatura, o tipo de nutrição da planta, nomeadamente o fósforo, cálcio, azoto e potássio, bem como factores genéticos, têm um efeito pronunciado sobre a textura dos frutos.

A cultivar Bluecrop caracteriza-se por possuir frutos de cicatrizes pequenas, diminuindo assim a suscetibilidade ao aparecimento de podridões e perdas de turgência durante o armazenamento (Fonseca & Oliveira, 2007)

### **3.8. Fitoquímicos – compostos fenólicos**

Os fitoquímicos, ou compostos bioativos, fazem parte de um conjunto de metabolitos secundários fundamentais para o crescimento e desenvolvimento de frutos e plantas (Kalt, 2005), desempenhando um papel importante na sua adaptação e defesa em condições adversas (Gnanavinthan, 2013; Jimenez-Garcia *et al.*, 2012). Estes podem ser classificados com base na identidade ou tipo de biopolímero, e incluem os compostos fenólicos, as fibras alimentares, os lípidos funcionais, as proteínas e peptídeos e os carotenoides (Gnanavinthan, 2013).

Os compostos fenólicos são a principal classe de antioxidantes encontrados em quase todas as plantas, embora, em concentrações maiores em frutos e vegetais (Oancea, Stoia & Coman, 2012; Prior *et al.*, 1998; You *et al.*, 2011). A sua estrutura química é caracterizada pela presença de um ou mais anéis aromáticos com grupos hidroxilo (Jimenez-Garcia *et al.*, 2012), e podem ser classificados em compostos

flavonoides ou não-flavonoides (figura 4). O grupo dos compostos flavonoides é constituído por flavanóis, flavonóis, isoflavonas, flavonas, flavanas, flavanonas, antocianidinas e antocianinas (Belitz, Grosch & Schieberle, 2004; Jimenez-Garcia *et al.*, 2012; Kalt *et al.*, 2001). Por sua vez, dos compostos não-flavonoides fazem parte os tocoferóis, ácidos fenólicos, taninos hidralizáveis, estilbenos, cumarinas e lignanas (Belitz *et al.*, 2004).

Os pequenos frutos, incluindo o mirtilo, possuem um elevado conteúdo e diversidade de compostos fenólicos (Kalt *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2013; Krüger & Josuttis, 2014; Prior *et al.*, 1998; Wang, Camp & Ehlenfeldt, 2012; Yuan *et al.*, 2011), revelando-se uma excelente fonte de antioxidantes. O conteúdo de compostos fenólicos é influenciado por muitos fatores, nomeadamente o tipo de cultivar, as práticas de cultivo, os fatores climáticos, o estado de maturação no momento da colheita (Castrejón *et al.*, 2008; Kalt, 2005) e as condições de armazenamento após a colheita (Connor *et al.*, 2002a).

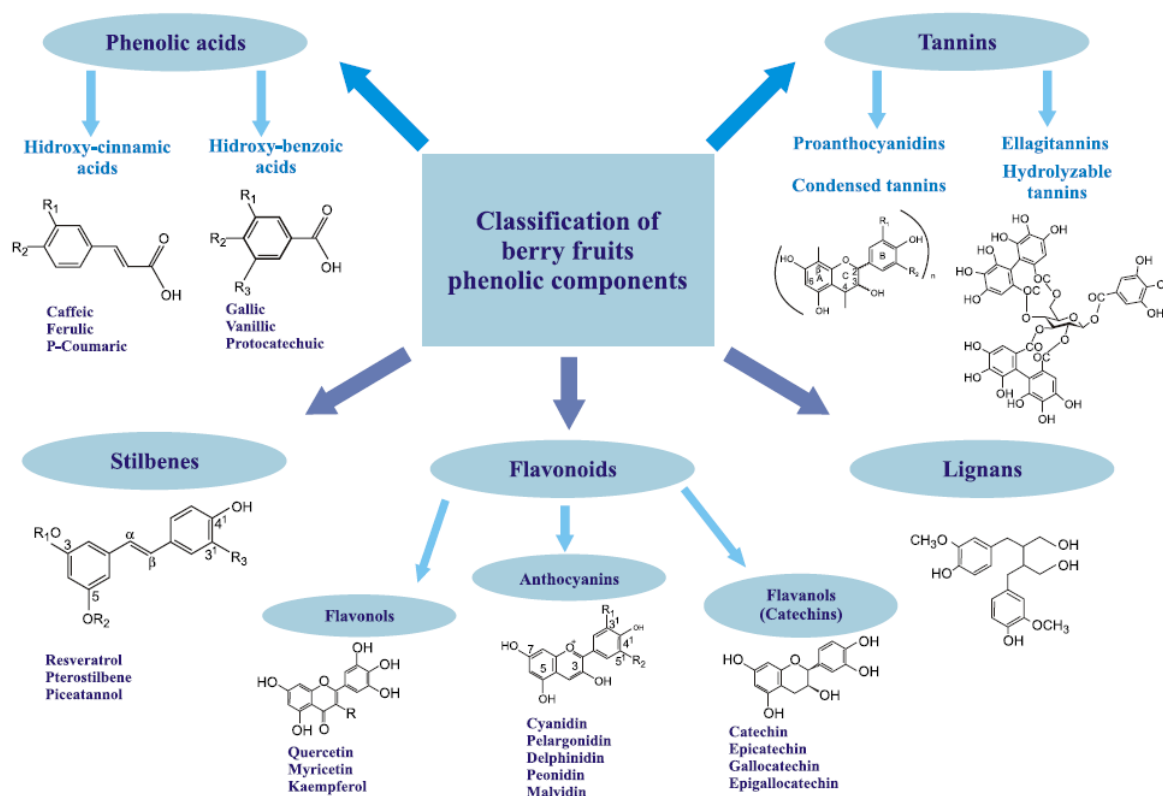
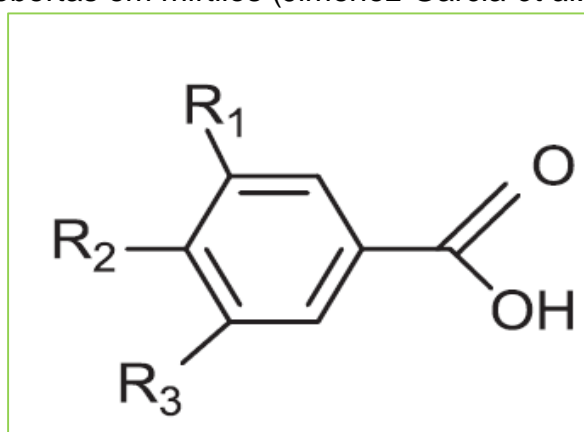


Figura 4: Classificação dos compostos fenólicos existentes nos pequenos frutos (Paredes-López *et al.*, 2010)

### 3.8.1. Ácidos Fenólicos

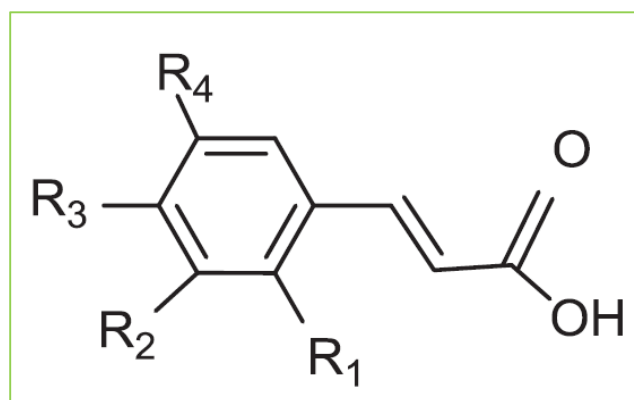
Incluídos no grupo dos compostos não-flavonoides, os ácidos fenólicos ocorrem na maioria das frutas, contribuindo na sua generalidade para a sua cor e sabor (Belitz *et al.*, 2004).

Os ácidos fenólicos, caracterizam-se por possuir um anel aromático, um grupo carboxilo e um ou mais grupos hidroxilo e/ou metoxilo na estrutura da molécula, conferindo propriedades antioxidantes aos vegetais (Sequeiros, 2009). Estes encontram-se divididos em duas classes: os que derivam do ácido benzoico (C6-C1) (figura 5), e os derivados do ácido cinâmico (figura 6), que possuem uma cadeia natural insaturada (C6-C3). Raramente existentes nas formas livres, os ácidos fenólicos encontram-se muitas vezes em formas conjugadas, como ésteres e glicosídeos (Gnanavinthan, 2013). Encontrando-se normalmente esterificados com açúcares, ácidos orgânicos ou álcoois (Gnanavinthan, 2013). Alguns derivados do ácido benzoico tais como o ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido salicílico, ácido gálico e ácido elágico foram encontrados em pequenos frutos (Jimenez-Garcia *et al.*, 2012). Quantidades significativas de ácido ferúlico, um importante ácido hidroxicinâmico, foram também descobertas em mirtilos (Jimenez-Garcia *et al.*, 2012).



Derivados do ácido benzoico	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Ácido gálico	OH	OH	OH
Ácido protocatecuico	H	OH	OH
Ácido vanílico	H	OH	OCH <sub>3</sub>
Ácido siríngico	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

Figura 5: Estrutura de ácidos fenólicos derivados do ácido benzoico. Adaptado de Gnanavinthan, 2013.



Derivados do ácido cinâmico	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Ácido <i>p</i> -cumárico	H	H	OH	H
Ácido <i>o</i> -cumárico	H	H	H	H
Ácido cafeico	H	H	OH	OH
Ácido sinápico	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>

Figura 6: Estrutura de ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico. Adaptado de Gnanavinthan, 2013.

Kim *et al.* (2013) também avaliaram 39 cultivares de mirtilos Northern Highbush e verificaram diferenças significativas entre elas, sendo que as cultivares Elliott, Rubel e Rancocas foram as que obtiveram maior conteúdo fenólico, 4,35 mg AGE/g, 3,76 mg AGE/g e 3,86 mg AGE/g respectivamente. As cultivares Rabbiteye também possuem um teor de antocianinas superior, aquando comparadas com as cultivares highbush (Lohachoompol *et al.*, 2008).

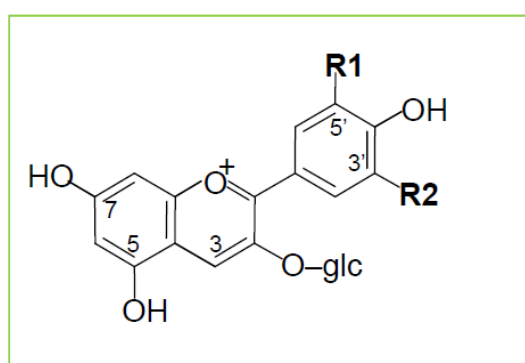
As cultivares que produzem bagas menores, contêm por sua vez, níveis mais elevados de compostos fenólicos totais, antocianinas e flavonoides (Connor *et al.*, 2002d; Dragovic-Uzelac *et al.*, 2010; Remberg *et al.*, 2007). A espessura das bagas também pode influenciar a atividade antioxidante (Connor *et al.*, 2002b).

### 3.8.2. Antocianinas

As antocianidinas são instáveis à luz e são insolúveis em água, pelo que normalmente não se encontram na natureza no seu estado livre. Em vez disso, estas estão presentes no vacúolo da célula, ligadas a açúcares, que proporcionam estabilidade e solubilidade em água (Pascual-Teresa, Moreno, & García-Viguera, 2010), formando glicosídeos, que se designam por antocianinas. Na pele do mirtilo, as antocianinas desempenham um papel vital, protegendo a polpa do fruto da exposição excessiva à luz ultravioleta (Elks *et al.*, 2013).

As antocianinas são um grupo de mais de 500 compostos, que dão a cor vermelha, violeta e azul a muitos vegetais e frutos (Jaakola & Hohtola, 2010; McGhie & Walton, 2007), formando o maior grupo na classe dos compostos flavonoides (Lohachoompol *et al.*, 2008). Aquelas que são encontradas em maiores quantidades nas flores, polpa e pele de pequenos frutos são a cianidina, delphinidina, peonidina, malvidina e petunidina (You *et al.*, 2011; Yousef *et al.*, 2013).

As antocianinas (figura 8) diferem entre si, no número de grupos hidroxilo e/ou metoxilo, no tipo, número e local de ligação das moléculas de açúcar ou no tipo e número de ácidos alifáticos ou aromáticos ligados à molécula de açúcar (Jimenez-Garcia *et al.*, 2012). Estas alterações estruturais influenciam as suas propriedades, nomeadamente a sua biodisponibilidade e o seu potencial efeito na saúde (Bunea *et al.*, 2013).



Antocianina	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Pelargonidina-3-glucósido	H	H
Cianidina-3-glucósido	OH	H
Delfinidina-3-glucósido	OH	OH
Peonidina-3-glucósido	OCH <sub>3</sub>	H
Petunidina-3-glucósido	OCH <sub>3</sub>	OH
Malvidina-3-glucósido	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

Figura 7: Estruturas das antocianidinas mais frequentemente encontradas em alimentos de origem vegetal (Adaptado de Pascual-Teresa *et al.*, 2010)

A sua cor e estabilidade são grandemente afetados pelo número e natureza dos substituintes. Enquanto a hidroxilação conduz ao aumento da tonalidade azul, a metoxilação tem o efeito oposto, enaltecendo a tonalidade vermelha (Dias, 2011). Por outro lado, um aumento na hidroxilação torna as antocianinas mais instáveis, enquanto que a metoxilação lhe confere uma maior estabilidade (Reque *et al.*, 2014). Para além disto, a cor das antocianinas também pode ainda ser afetada por pH, solventes, temperatura, concentração de antocianina, oxigénio, luz, enzimas, e outras substâncias acompanhantes (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; Rein, 2005; Sadilova *et al.*, 2007).

Yousef *et al.* (2013) qualificaram o conteúdo em antocianinas de diferentes cultivares de mirtilo comercial, e verificaram que a malvidina-3-O-galactosídeo, a definidina-3-O-galactosídeo, a malvidina-3-O-arabinósido, a cianidina-3-O-arabinósido e a delfinidina-3-O-arabinósio constituíam cerca de 70% do total de antocianinas. De acordo com a bibliografia, o teor total em antocianinas da cultivar Bluecrop, pode variar entre 82,4 e 187,3 mg cianidina-3-glucósido/100g fruto fresco (Connor *et al.*, 2002d; Kim *et al.*, 2013; Moyer *et al.*, 2002; Rodriguez-Mateos *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2008).

### **3.8.3. Taninos**

Os taninos são polifenóis capazes de precipitar proteínas a partir de soluções aquosas (Shahidi & Naczki, 2004), e desempenham um papel essencial na definição das propriedades sensoriais dos frutos frescos e dos seus produtos derivados (Jimenez-Garcia *et al.*, 2012). Os taninos são habitualmente considerados antinutricionais, uma vez que se ligam fortemente aos grupos -NH das proteínas e dos péptidos, evitando assim a sua hidrólise e a digestão no estômago (Shahidi & Naczki, 2004).

Devido às suas variações estruturais, são tradicionalmente divididos em taninos condensados ou proantocianidinas e taninos hidrolisáveis (Gnanavithan, 2013; Srivastava, 2006). Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácido gálico ou

elágico, enquanto que as proantocianidinas são polímeros de flavonoides (Srivastava, 2006).

As proantocianidinas são derivados estruturais dos flavan-3-óis, e de acordo com o número de vezes que esta unidade se repete, assim são consideradas diméricas, triméricas, oligoméricas (até 6 unidades) ou poliméricas (superior a 6 unidades) (Shahidi & Naczki, 2004). Em função da sua unidade monomérica, as proantocianidinas organizam-se em dois grandes grupos. Caso se liberte, por hidrólise ácida, a cianidina as moléculas recebem o nome de procianidina, sendo esta um polímero de catequina e epicatequina (figura 9). No caso de ocorrer a libertação de delphinidina, a molécula recebe o nome de prodelfinidina, sendo esta um polímero de epigalocatequina e galocatequina (Dias, 2011).

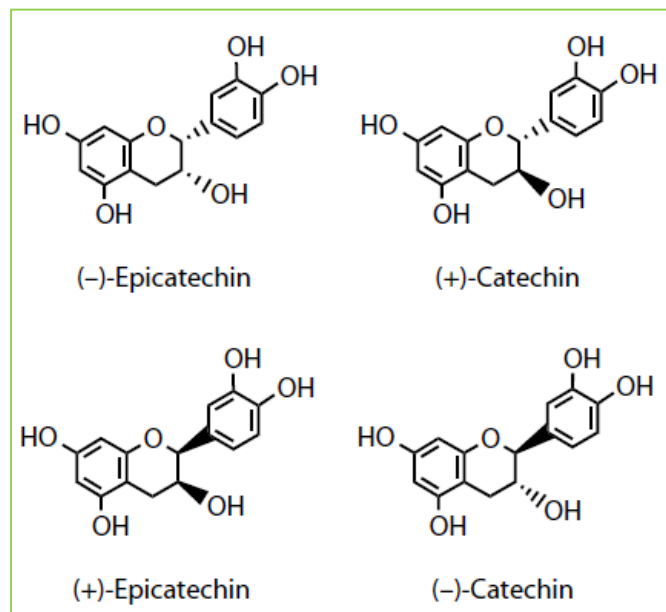


Figura 8: Estrutura química da Catequina e Epicatequina. Adaptado de Crozier *et al.*, (2012).

Segundo Cheynier (2006), nas uvas, os taninos estão localizados principalmente nas sementes e na pele, embora também tenham sido encontrados alguns vestígios de monómeros e dímeros na parte estrutural das plantas (celulose). O mesmo autor refere ainda terem sido observados agregados de taninos nos vacúolos das células de pequenos frutos.

Os mirtilos são conhecidos por conterem predominantemente taninos condensados (Seeram *et al.*, 2006), que variam entre flavanóis monoméricos e oligómeros, a polímeros de massa molecular elevada (grau de polimerização superior a 10) (Howard *et al.*, 2012). Alguns estudos efetuados em frutos vermelhos sugerem que as proantocianidinas encontradas na respetiva pele do fruto estão associadas não só a alguns polissacáridos como também a pequenas quantidades de antocianinas (Cheynier, 2006).

Monitorizações da composição em taninos efetuadas durante a maturação da uva demonstraram que a quantidade de taninos diminui gradualmente ao longo da maturação (Cheynier, 2006).

#### **3.8.4. Atividade antioxidante**

Dentro do grupo das frutas e legumes, os mirtilos (*Vaccinium corymbosum* L.) são elogiados pelo seu elevado teor em antioxidantes (Castrejón *et al.*, 2008; Prior *et al.*, 1998; You *et al.*, 2011).

Um antioxidante pode ser definido como uma substância que, presente em baixas concentrações, quando comparado com a concentração do substrato oxidável, inibe ou atrasa significativamente a oxidação do substrato, protegendo os alvos biológicos (Benzie & Wachtel-Galor, 2013; Rasteiro, 2012). Este tipo de compostos é largamente utilizado na indústria alimentar como forma de prolongar o prazo de validade dos alimentos.

Os danos induzidos pela oxidação de lípidos, ácido desoxirribonucleico e outras biomoléculas importantes é denominado por stresse oxidativo, ou seja, é uma consequência da falta relativa ou absoluta de defesa antioxidante (Oliveira, 2012; Rasteiro, 2012; Wang *et al.*, 2012b), inevitável aquando de um ambiente na presença de oxigénio (Kalt, 2005). Este fenómeno pode resultar de uma diminuição da quantidade de antioxidantes devido a uma produção excessiva de espécies reativas de oxigénio (ERO) (de origem endógena ou exógena) ou de uma alimentação deficiente. A exposição a condições de stresse oxidativo suaves conduz, geralmente, a um aumento da síntese dos sistemas de defesa antioxidante, com o objetivo final de repor o equilíbrio. As ERO desempenham papéis fisiológicos

importantes ao funcionarem como mensageiros secundários nas células de mamíferos, regulando vias de transdução de sinal que controlam a expressão de genes e a indução de alterações pós-traducionais de proteínas, estando, assim, implicadas no controlo dos processos de divisão e diferenciação celular (Balk *et al.*, 2014).

Por outro lado, a exposição a condições de stresse oxidativo mais severas conduz a uma acumulação de lesões oxidativas, com implicações fisiopatológicas (Rasteiro, 2012), levando a patologias no ser humano tais como artrites, aterosclerose, cancro, doenças cardiovasculares, diabetes, doenças de Alzheimer e Parkinson (Paredes-López *et al.*, 2010).

As formas mais comuns de ERO incluem radical superóxido, peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo ( $OH^*$ ), oxigénio singleto ( $^1O_2$ ) (forma excitada do oxigénio molecular) e óxido nítrico, e têm atividades biológicas *in vivo* e *in vitro* particularmente elevadas (Fu *et al.*, 2011). Estas formas podem conduzir diretamente a mutações de ADN, alterações na expressão do gene, modificação de transdução de sinal celular, apoptose celular, peroxidação lipídica e degradação de proteínas (Fu *et al.*, 2011).

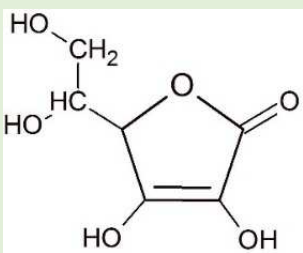
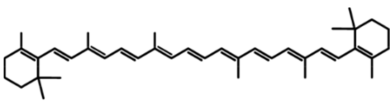
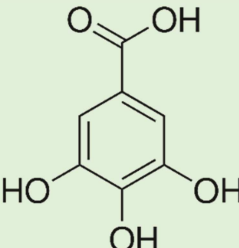
O oxigénio molecular, quando no estado fundamental, designado por oxigénio tripleto, possui dois eletrões desemparelhados com “spins” paralelos, em duas orbitais separadas. Esta molécula, que no estado fundamental é pouco reativa, pode no estado excitado originar espécies de reatividade bem mais acentuada como são o oxigénio singleto delta, em que os dois eletrões de valência ocupam a mesmo orbital e têm sentidos opostos, e o oxigénio singleto sigma, em que os dois eletrões de valência ocupam orbitais diferentes tendo “spins” antiparalelos (Rasteiro, 2012).

Os antioxidantes podem ser divididos em duas grandes classes: os enzimáticos e os não enzimáticos. Alguns são endógenos, como enzimas, moléculas de baixo massa molecular, e cofatores enzimáticos. Entre os antioxidantes não enzimáticos muitos são obtidos por via alimentar, como é o caso dos compostos fenólicos e das vitaminas.

Os tipos de antioxidantes mais abundantes em frutas e vegetais são a vitamina C, os carotenoides e os compostos fenólicos (tabela 2), e as suas propriedades resultam da sua estrutura rica em eletrões sob a forma de ligações duplas oxidáveis

e grupos hidroxilo (Kalt, 2005). A capacidade de doar elétrons de metilo, etilo, butilo terciário e substituições nas posições *orto* e *para* com os grupos hidroxilo, aumenta grandemente a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos (Pokorny *et al.*, 2003).

Tabela 2: Estrutura química, mecanismo antioxidante e localização dos principais antioxidantes existentes nas frutas e vegetais (adaptado de Kalt, 2005).

	<b>Estrutura química</b>	<b>Mecanismo antioxidante</b>	<b>Localização estrutural</b>
<b>Vitamina C</b>		-Doação direta de elétrons; -Redução enzimática; -Redução de ERO;	Dissolvido no apoplasto, citoplasma, cloroplastos, mitocôndrias e vacúolos.
<b>Carotenoides</b>	 beta-caroteno	-Doação de elétrons; -Redução de ERO;	Associados aos complexos de proteína das membranas de cloroplastos ou cromoplastos.
<b>Fenólicos</b>		-Doação de elétrons; -Redução de ERO; -Quelação de íons metálicos;	Dissolvidos em vacúolos e apoplastos.

### 3.8.5. Impactos na saúde

A procura dos consumidores por produtos ricos em fitoquímicos está a aumentar, como resultado de uma maior consciência dos seus potenciais benefícios para a saúde (Fracassetti *et al.*, 2013; Kalt, 2005; Syamaladevi *et al.*, 2012). As plantas têm sido consideradas uma importante fonte de compostos bioativos úteis na

medicina tradicional e/ou alternativa que proporcionam benefícios de prevenção de doenças e promoção da saúde (Oancea *et al.*, 2012).

É cada vez mais evidente que o stresse oxidativo pode conduzir a uma inflamação, estando muitas vezes associado a doenças caracterizadas por uma inflamação crónica suave (Balk *et al.*, 2014). Um dos principais fatores neste processo é o fator de transcrição NF- $\kappa$ B, que, com o stresse oxidativo conduz à fosforilação e conseqüentemente à destruição do fator inibidor de NF- $\kappa$ B (Figura 9). Como resultado, o NF- $\kappa$ B é ativado, deslocando-se para o núcleo onde ativa a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, surgindo desta forma um ciclo vicioso, onde o stresse oxidativo e a inflamação aumentam mutuamente (Balk *et al.*, 2014).

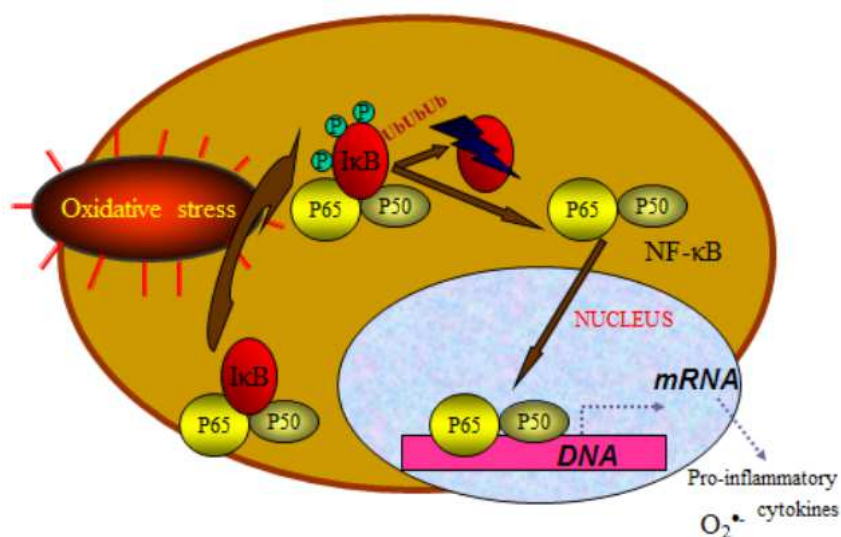


Figura 9: Ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (P50-P65) por stresse oxidativo (Balk *et al.*, 2014).

A insuficiência de mecanismos antioxidantes de defesa está associada a doenças como cardiovasculares, inflamações e diabetes (Paredes-López *et al.*, 2010), pelo que, o consumo de alimentos que possuam compostos antioxidantes pode ser fulcral na prevenção destas doenças.

Os compostos fenólicos apresentam muitos mecanismos biológicos de ação significativos, nomeadamente a exclusão ou desintoxicação de ERO e radicais livres, bloqueando a sua produção (Jimenez-Garcia *et al.*, 2012; Paredes-López *et*

*al.*, 2010). As antocianinas destacam-se de entre os compostos fenólicos como as que mais beneficentemente contribuem para o equilíbrio do organismo humano. As antocianinas têm a capacidade de eliminar radicais livres nos locais de eventos oxidativos, devido à sua deficiência de elétrons (Sadilova *et al.*, 2007), e para além disto também têm sido utilizadas para vários propósitos terapêuticos, nomeadamente no tratamento da retinopatia diabética, doença fibrocística e perturbações na visão (Koca & Karadeniz, 2009). São também implicadas numa série de processos biológicos relacionados com a proteção de doenças cardiovasculares, síndrome metabólica, diabetes tipo II, vários cancros, incluindo no trato gastrointestinal, envelhecimento da pele, doenças neuro degenerativas e inflamação (Norberto *et al.*, 2013; Nunez & Magnuson, 2014).

Apesar de tudo, a maioria das provas que sustentam o efeito terapêutico das antocianinas é *in vitro*, faltando ainda a evidência *in vivo* a partir de estudos com animais ou intervenção humana. Além disto, quaisquer efeitos terapêuticos das antocianinas são dependentes da biodisponibilidade (McGhie & Walton, 2007).

Foram ainda efetuados estudos, que demonstram que o consumo regular de mirtilos pode suprimir infeções urinárias, infeções por *Helicobacter pylori* e auxiliar na recuperação de infeções do vírus da gripe (Paredes-López *et al.*, 2010).

### **3.9. Fatores que influenciam os compostos bioativos**

Os compostos bioativos, como metabolitos secundários das plantas, estão presentes nas suas células e tecidos em quantidades grandemente condicionadas pelos fatores ambientais. Enquanto que os fatores genéticos determinam os metabolitos secundários específicos de cada cultivar, o ambiente é muitas vezes o fator regulador desses mesmos níveis (Burritt, 2013).

O grau de maturação aquando a colheita (Prior *et al.*, 1998; Remberg *et al.*, 2006), as diferenças genéticas (Dragovic-Uzelac *et al.*, 2010; Howard *et al.*, 2003), as condições de armazenamento e processamento (Shahidi & Naczki, 2004), a temperatura, intensidade e qualidade da luz (raios UV) (Jaakola & Hohtola, 2010; Krüger & Josuttis, 2014), e o sistema de produção (Wang *et al.*, 2008; You *et al.*, 2011) também influenciam o conteúdo fenólico nos mirtilos, e por sua vez a atividade

antioxidante. Têm sido também relatados efeitos combinados da estação de crescimento e da cultivar no teor de antocianinas e na massa do fruto (Dragovic-Uzelac *et al.*, 2010).

A compreensão dos fatores que influenciam a qualidade nutricional dos mirtilos, aliada à capacidade de resposta às condições ambientais específicas de cada região, pode criar oportunidades para a produção e processamento de mirtilos com melhores propriedades antioxidantes (Burritt, 2013).

### 3.9.1. Genótipo

O genótipo parece ser um fator importante no teor de fitoquímicos presentes nos frutos, nomeadamente na atividade antioxidante e no teor de fenóis (Scalzo *et al.*, 2005)

Howard *et al.* (2003) avaliaram a influência da cultivar no teor em fenóis, em antocianinas e a atividade antioxidante, durante 2 anos consecutivos, e constataram que, embora houvesse diferenças sazonais nesses parâmetros, as diferenças entre as cultivares eram muito maiores (tabela 3).

Tabela 3: Avaliação da influência do genótipo no teor de fenóis totais, antocianinas e atividade antioxidante ao longo de dois anos consecutivos

<b>Cultivares</b>	<b>Ano de produção</b>	<b>Total fenóis (mg/g EAG)</b>	<b>Antocianinas (mg cianidina-3-glucósido/g)</b>	<b>Capacidade antioxidante<sup>a</sup> (mM ET/kg)</b>
Bluecrop (NHB)	2000	3,19	0,75	38,00
	2001	3,24	0,70	20,90
Cape Fear (SHB)	2000	3,97	1,65	44,00
	2001	2,85	1,40	40,00
Summit (SHB)	2000	2,98	0,50	28,00
	2001	2,27	0,65	30,00
Ozarkblue (SHB)	2000	3,19	0,91	23,80
	2001	3,25	1,15	24,00
Magnolia (SHB)	2000	2,79	0,77	20,50
	2001	2,74	1,22	33,00

<sup>a</sup> ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) Adaptado de (Howard *et al.*, 2003)

### 3.9.2. Práticas de cultivo

Para garantir o crescimento vegetativo ideal para um bom rendimento, as práticas de cultivo dos pequenos frutos dependem das condições ambientais regionais (Krüger & Josuttis, 2014).

Eichholz *et al.* (2007) avaliaram a influência da fertilização na atividade antioxidante da cultivar Bluecrop, e verificaram que as plantas sem cobertura no solo e com menores teores em azoto e boro apresentavam maior conteúdo de compostos fenólicos totais, e maior atividade antioxidante. Segundo os mesmos autores, o resultado parece estar relacionado com um processo de stresse mediado ao qual a planta foi sujeita, pois o facto de o solo não estar coberto resultou numa diminuição do teor de matéria orgânica, num solo de pH elevado e com insuficiente armazenamento de água. Alguns trabalhos citados por Eichholz *et al.* (2007) mostram os efeitos negativos da aplicação de boro na concentração de compostos bioativos. Strik e Buller (2014) também avaliaram a fertilização das plantas de mirtilo com azoto (N), e apuraram que a aplicação entre 112-269 kg azoto/hectare tem um efeito positivo na firmeza e no tamanho das bagas.

Por outro lado, culturas de mirtilo cobertas na superfície com materiais orgânicos, como serragem, cavacos de madeira ou casca de pinheiro, e posteriormente tapadas com plástico parecem criar um ambiente mais adequado aos requisitos das plantas (Krüger & Josuttis, 2014; Strik & Buller, 2014), e conseqüentemente uma produção com maior qualidade. O teor de compostos fenólicos e de antocianinas também é maior em mirtilos obtidos de plantações que usam turfa e casca de cacau (Ochmian *et al.*, 2009).

Burritt (2013) e outros, descreveram alguns estudos sobre a influência da utilização de reguladores de crescimento nas plantas nos níveis de compostos bioativos. Apesar de prejudicarem a produtividade dos mirtilos, a aplicação de reguladores como jasmonato de metilo ou riboflavina aumentou os teores de compostos bioativos.

Outra das práticas culturais que mais influencia a planta do mirtilo é a rega. O mirtilo é muito sensível a flutuações de humidade no solo, e, em caso de stresse

hídrico a divisão celular da planta pode sessar completamente, reduzindo o tamanho dos frutos na colheita (Bryla, 2011), e afetando características de qualidade, tais como cor, sabor e aroma (Jimenez-Garcia *et al.*, 2012). Segundo o mesmo autor, as plantas parecem ser mais afetadas pela limitação de água no solo nas fases posteriores do desenvolvimento da baga, particularmente durante o amadurecimento dos frutos.

### 3.9.3. Sistema de produção agrícola

O consumo de alimentos biológicos tem aumentado rapidamente nos últimos anos, em parte devido à noção de que os benefícios de saúde estão relacionados com o seu consumo (Wang *et al.*, 2008). No entanto os estudos sobre a influência do sistema de produção agrícola, convencional ou biológico, não são consensuais, e não existem provas suficientes do seu efeito nas qualidades nutricionais dos mirtilos.

O sistema de produção biológico, pela dificuldade dos produtores em controlar ervas daninhas, pragas e doenças, tem geralmente rendimentos mais baixos comparativamente ao sistema de produção convencional (Retamales *et al.*, 2015; Strik, 2014) .

Os estudos realizados para avaliar o efeito do modo de produção, biológico *versus* convencional, nas propriedades dos mirtilos, têm dado origem a resultados distintos. Wang e colaboradores (2008) observaram, para a cultivar *Bluecrop* produzida em modo biológico maiores quantidades de açúcar, ácido málico, fenóis totais, e maior atividade antioxidante. Por outro lado, a análise a mirtilos *Rabbiteye* não apresentava diferenças significativas na quantidade de fenóis, antocianinas e atividade antioxidante, entre os dois sistemas de produção (You *et al.*, 2011). Estes autores observaram que o conteúdo em antocianinas variou entre cultivares, mas manteve-se constante entre as amostras cultivadas em modo de produção biológica e convencional. Em alguns estudos, o teor de antocianinas dos mirtilos produzidos em agricultura biológica era inferior, quando comparado com a agricultura tradicional (Rodriguez-Mateos *et al.*, 2011). Os mirtilos produzidos em agricultura biológica continham maior teor de ácido clorogénico (Rodriguez-Mateos *et al.*, 2011) e de

antocianinas, nomeadamente delfinidina 3-galactósido, delfinidina 3-glucósido, delfinidina 3-arabinósido, petunidina 3-galactósido, petunidina 3-glucósido e malvidina 3-arabinósido.

#### **3.9.4. Clima e Fatores ambientais**

A mudança climática está a tornar-se um problema mundial, e stresses abióticos como secas, calor ou frio, salinidade do solo, aumento dos níveis de ozono e excesso de raios UV podem provocar perdas globais na produção agrícola. A exposição a estes fatores pode causar inúmeras alterações na fisiologia das plantas, particularmente mudanças nas taxas fotossintéticas, alterações na captação e utilização de nutrientes e água, que poderão provocar alterações bioquímicas significativas, como a variação do teor de antioxidantes (Burritt, 2013).

Os fatores ambientais antes e depois da colheita podem influenciar significativamente o conteúdo antioxidante, nomeadamente os antioxidantes fenólicos, visto serem mais sensíveis a fatores ambientais, como a disponibilidade de água, qualidade da luz e temperatura (Kalt, 2005).

As variações de temperatura estão muito associadas a altitude dos locais, pois quanto mais elevada for a altitude, maiores serão os níveis de radiação UV, e naturalmente de temperatura (Krüger & Josuttis, 2014). A latitude do lugar de produção também influenciará a temperatura, o comprimento do dia, e a qualidade da luz, ou seja, a distribuição espectral da luz (Jaakola & Hohtola, 2010). O conteúdo em flavonoides, especialmente derivados da quercetina, parece aumentar com o aumento da temperatura (Jaakola & Hohtola, 2010).

Akerstrom *et al.* (2010) verificaram que o teor de antocianinas em mirtilos produzidos em latitude norte continham maior teor em antocianinas que as produzidas em latitude sul. As características do clima a norte, como dias longos, com temperaturas noturnas frias, têm um impacto positivo na biossíntese de flavonoides nas plantas (Jaakola & Hohtola, 2010). Para além disto, os teores de ácido ascórbico, açúcar ou caroteno determinados em produtos hortícolas criados

em latitudes do norte eram superiores aos das latitudes mais a sul (Akerstrom et al., 2010).

### **3.9.5. Data de colheita e estado de maturação**

Alterações que ocorrem durante o desenvolvimento dos frutos afetam a qualidade nutricional e organoléptica dos pequenos frutos (Forney et al., 2012).

No mirtilo, uma vez iniciada a maturação, a cor da fruta muda rapidamente, passando de bagas de tons rosa para completamente azul, devido ao aumento substancial na concentração de pigmentos de antocianinas (Kalt et al., 2003). Os mirtilos colhidos imediatamente após exibirem cor azul (maturação comercial), apresentaram menor atividade antioxidante e menor quantidade de antocianinas que as bagas colhidas 49 dias após a primeira colheita (Prior et al., 1998).

### **3.9.6. Condições de armazenamento e processamento**

Todas as frutas e vegetais, quando sujeitas a movimentação e armazenamento por parte de produtores e/ou consumidores, podem sofrer alterações na integridade dos seus fitoquímicos, prejudicando os seus benefícios nutricionais.

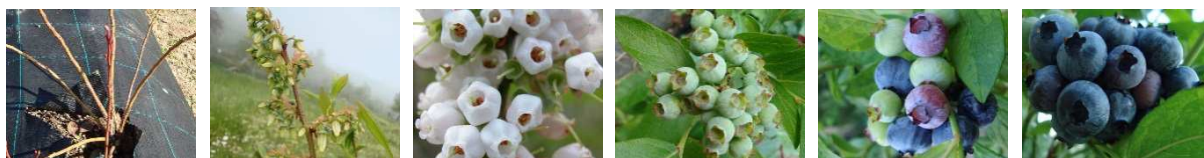
O desenvolvimento e aperfeiçoamento de novos tratamentos para frutos de baga após a colheita tem ganho novo destaque, e vão desde a melhoria das embalagens de filme, à aplicação de substâncias que aceleram a síntese de compostos bioativos nos frutos, aumentando assim o seu período de vida útil (Eichholz et al., 2015).

O ácido ascórbico é dos fitoquímicos mais sensíveis à perda/degradação durante o manuseamento e conservação, enquanto que determinados carotenoides e polifenóis são mais estáveis, podendo mesmo aumentar em determinadas condições de armazenamento (Kalt, 2005). O mesmo autor observou uma acumulação de antocianinas em morangos e framboesas, quando os frutos foram armazenados durante vários períodos a 20 °C.

Reque *et al.* (2014) avaliaram a influência da congelação na atividade antioxidante de mirtilos, e verificaram que ocorreu um aumento significativo no terceiro mês de armazenamento a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Por sua vez, o teor de antocianinas diminuiu, possivelmente devido a oxidações e/ou reações de condensação com outros compostos fenólicos. Quando armazenados a  $4^{\circ}\text{C}$  ou congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 2 semanas, o teor de fenóis, antocianinas e atividade antioxidante nos mirtilos permaneceu intacto (Yuan *et al.*, 2011).

O armazenamento em atmosfera controlada também apresenta efeitos positivos na vida útil das bagas, principalmente em frutos de primeira colheita em comparação com colheitas mais tardias (Hancock *et al.*, 2008).

### III. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL



## 4. Material é Métodos

### 4.1. Colheita das amostras

Para a realização deste trabalho foram usados mirtilos *Vaccinium corymbosum* L., da cultivar Bluecrop, cultivados em modo de produção convencional, em 5 localidades distintas. Os frutos analisados foram gentilmente cedidos por cinco fornecedores diferentes: Biobaga, Sr. Borges, Eng<sup>a</sup> Cecília Palmeiro, Delícias do Tojal e Terras Altas.

Os frutos foram colhidos manualmente, durante os meses de Junho e Julho de 2013, de plantas saudáveis e no estado de maturação correspondente à sua comercialização: frutos com a tonalidade da coloração desenvolvida mas sem a perda de turgência (figura 10). Foram colhidas amostras de aproximadamente 1 Kg da cultivar Bluecrop em cada produtor. Os frutos foram colhidos no período da manhã, e foram colocados em embalagens de polietileno usadas na sua comercialização, e transportados até ao laboratório da Escola Superior Agrária de Viseu no escuro e sob refrigeração.



Figura 10: Mirtilos no estado de maturação comercial: coloração completamente desenvolvida, sem perda de turgência.

As determinações físicas, a determinação da humidade, de TSS e acidez foram efetuadas no próprio dia de colheita. Depois disso, o restante fruto foi congelado a uma temperatura de -20 °C. As análises aos fenóis totais, antocianinas, taninos e

atividade antioxidante (ABTS e DPPH) ao fruto congelado foram efetuadas 6 meses após a congelação.

## 4.2. Caracterização dos locais de colheita

A figura 11 ilustra os locais onde foram realizadas as colheitas dos mirtilos.

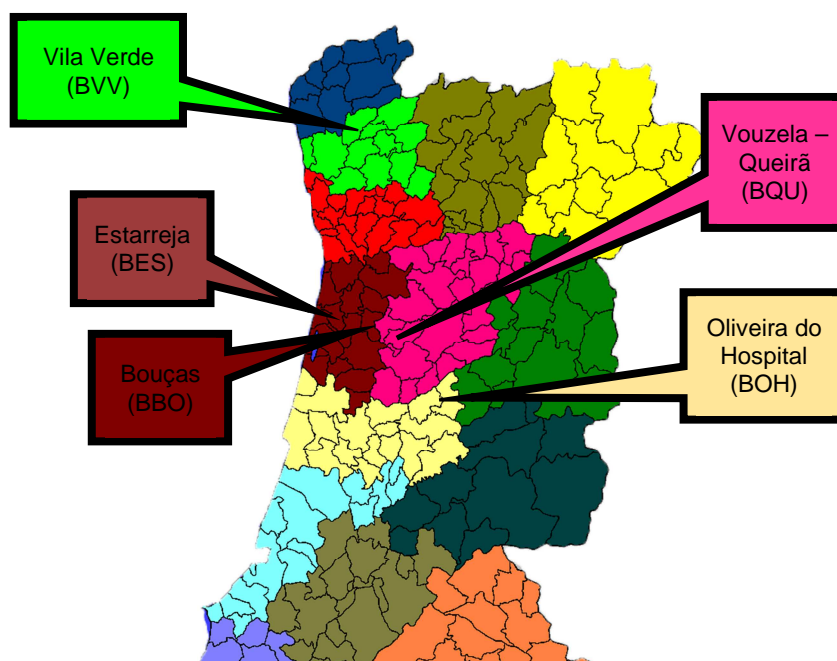


Figura 11: Locais de recolha dos mirtilos

A tabela 4 apresenta as características das plantações da cultivar Bluecrop, nos 5 locais de colheita do fruto.

Tabela 4: Características das plantações dos mirtilos colhidos para análise

Localidade	Idade da planta (anos)	Altitude de produção (metros)	Data de Colheita* (ano 2013)
Bouças – Sever do Vouga (BBO)	20	463	11/07
Estarreja (BES)	4	45	2/07
Oliveira do Hospital (BOH)	21	510	24/06
Queirã – Vouzela (BQU)	4	450	22/07
Coucieiro – Vila Verde (BVV)	28	125	2/07

\*Diferentes datas de colheita, mas correspondendo ao estado normal de comercialização.

### 4.3. Análises físicas

No que concerne às análises físicas, estas foram realizadas aos mirtilos frescos e foram considerados os parâmetros de cor, textura e calibre. Na avaliação da cor e da textura foram utilizados 50 frutos, escolhidos aleatoriamente de um lote de 1 kg. Na determinação do calibre foram usados 30 frutos do mesmo lote.

#### 4.3.1. Cor

A cor é um dos atributos mais importantes nos alimentos, e, apesar de não refletir necessariamente o seu valor nutricional, sabor e valor funcional, determina a sua aceitabilidade pelos consumidores. Como parâmetro de qualidade, a cor influencia o valor de mercado do fruto destinado ao consumo em fresco, e determina também a conformidade dos mirtilos destinados ao processamento.

A cor de 50 mirtilos frescos foi determinada com recurso a um colorímetro (Chroma Meter – CR-400, Konica Minolta) no sistema de cor CIELab. Antes da utilização do aparelho, procedeu-se à sua calibração, através de uma leitura sobre um azulejo branco padrão. Este sistema de cor foi desenvolvido em 1976, e a localização de qualquer cor no seu espaço de cor é determinada pelas suas coordenadas de cor:  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  (Figura 12). A dimensão  $L^*$  representa a luminosidade, variando de preto (0) a branco (100), e  $a^*$  e  $b^*$  representam as dimensões de oposição de cor, com  $a^*$  a variar de verde (-a) a vermelho (+a) e  $b^*$  a variar de azul (-b) a amarelo (+b).

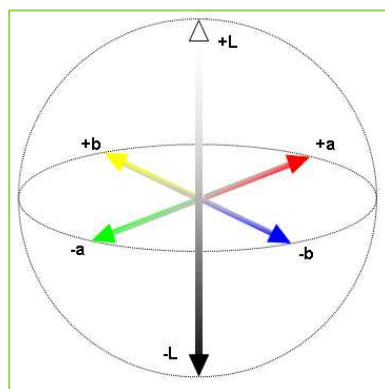


Figura 12: Sistema de cores CIELab ( $L^*a^*b^*$ )

#### **4.3.2. Textura**

A avaliação da firmeza dos frutos é principalmente usada para fins científicos e fornece informação sobre a capacidade de armazenamento e de resistência à lesão do produto durante o seu armazenamento e comercialização (Chiabrando *et al.*, 2009).

Na determinação da textura foi usado um texturómetro “Texture Analyser”, modelo “TA.XT Plus” da “Stable Microsystems”, do Reino Unido. Foi usada uma sonda cilíndrica de 2 mm de diâmetro e uma célula de carga de 5 Kg. A velocidade do teste foi de 1,0 mm/s, a velocidade pré-teste foi de 1,5 mm/s e pós-teste foi de 10,0 mm/s. Os mirtilos foram sempre penetrados pelo lado sagital, e a firmeza dos frutos foi avaliada pela resistência da pele à penetração da sonda.

#### **4.3.3. Calibre**

A medição do calibre foi efetuada em 30 frutos frescos, escolhidos aleatoriamente do lote de 1 kg, com o auxílio de um paquímetro.

### **4.4. Análises químicas**

As análises químicas efetuadas às amostras de mirtilo recolhidas foram: a humidade, a acidez titulável (AcT), o teor de sólidos solúveis (SST), o teor de fenóis totais (FT), taninos (TAN) e antocianinas totais (ANT) e a atividade antioxidante total (AAT) pelos métodos de FRAP, DPPH e ABTS.

#### **4.4.1. Humidade**

Para a determinação da humidade utilizou-se o método de perda de peso após desidratação até se obter peso constante, recorrendo a uma balança de halogéneo (Mettler Toledo, HG53), a uma temperatura de 120 °C. As amostras analisadas apresentavam-se com uma massa compreendida entre 0,2 g e 0,5 g. O processo foi repetido 3 vezes para cada amostra.

#### **4.4.2. Determinação da acidez titulável (AcT)**

A determinação da acidez dos mirtilos foi avaliada segundo a NP-1421. O método baseia-se na titulação da amostra com uma solução de hidróxido de sódio de concentração 0,1 M, usando como indicador a fenolftaleína, na qual se determina o ponto de equivalência através da medida do pH da solução.

Os resultados são expressos em mg de ácido cítrico por 100g de amostra.

#### **4.4.3. Determinação do teor de sólidos solúveis (grau Brix)**

A determinação do grau Brix é usada como referência de ponto de colheita e consumo para a maioria das frutas, especialmente para as não-climatéricas. Este grau Brix indica a percentagem de sólidos solúveis no sumo do fruto. Este parâmetro pode ser influenciado por vários fatores nos quais se incluem, a variedade, região de cultivo, fatores climatéricos e estado de maturação (Türkmen & Eksi, 2011). Cada grau Brix corresponde a 1 g de sólidos solúveis/açúcares por 100 g de sumo. O sumo extraído de 4 a 5 bagas de cada localidade foi utilizado para determinar a concentração de sólidos solúveis, através de um refratômetro manual, com correção de temperatura.

#### **4.5. Preparação de extratos**

Os compostos fenólicos presentes nos frutos foram extraídos segundo adaptação do método proposto por Ferreira *et al.* (2002).

Os mirtilos foram macerados e sujeitos a 4 extrações sucessivas. As duas primeiras extrações realizaram-se com uma solução de metanol:ácido acético (98:2), e as seguintes com uma solução de acetona/água (60:40), durante 1 hora, com agitação magnética à temperatura ambiente. O procedimento executado originou 2 extratos de metanol (1º extrato de metanol – 1E-M e 2º extrato de metanol – 2E-M), e 2 extratos de acetona (1º extrato de acetona – 3E-A e 2º extrato de acetona – 4E-A), mantidos a uma temperatura de -20 °C até serem analisados.

#### 4.5.1. Determinação dos fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu

O ensaio Folin-Ciocalteu baseia-se na redução a pH alcalino do heteropolianião molibdotungsteniofosfórico do reagente de Folin-Ciocalteu, efetuada pelos compostos fenólicos, na forma de íon fenolato da amostra e que origina o aparecimento de um produto azul com um máximo de absorção a 760 nm, sendo a intensidade da coloração desenvolvida proporcional ao teor em compostos fenólicos (Singleton *et al.*, 1999). É um método simples, sensível e preciso mas pode sofrer interferências de outros componentes da amostra que possam igualmente reagir com o reagente de Folin-Ciocalteu como, por exemplo, adenina, adenosina, alanina, ácido aminobenzóico, ácido ascórbico, benzaldeído, cisteína, creatinina, histamina, histidina, índole, frutose, sacarose, sulfito de sódio, sulfato de ferro entre outros (Prior *et al.*, 2005).

Para a determinação dos fenóis totais utilizou-se o método descrito por Slinkard & Singleton (1977). Num tudo juntaram-se 125 µl de amostra com 0,75 mL de água destilada e 125 µL de reagente Folin Ciocalteu. Ao fim de 6 minutos adicionaram-se 2 mL de carbonato de sódio a 5%, e colocaram-se os tubos no escuro, à temperatura ambiente. Posteriormente leu-se a absorvância (Abs) de 760 nm num espectrofotómetro UV mini – 1240, SHIMADZU.

Todas as amostras foram analisadas em triplicado, tendo a concentração em fenóis sido determinada por interpolação de uma curva de calibração (figura 13), preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções de ácido gálico com concentrações entre os 0,04 e os 0,5 g/L.

Os resultados finais foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de massa fresca de amostra.

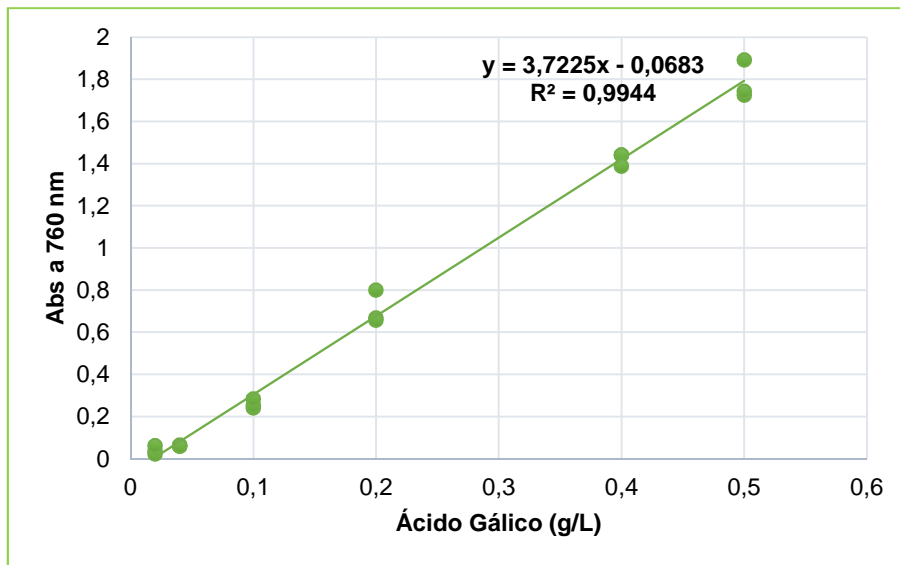


Figura 13: Curva de calibração obtida com padrões de ácido gálico, utilizada na determinação do teor em fenóis totais.

#### 4.5.2. Determinação das antocianinas totais

A quantificação das antocianinas totais foi efetuada através do método de Boulton (2001). Este método baseia-se na transformação estrutural reversível em função do pH que as antocianinas monoméricas sofrem e que leva à obtenção de diferentes espectros de absorção. Assim, a pH 1, a forma predominante é a de oxónio colorido, enquanto a pH 4,5 a forma predominante é a de hemiacetal sem coloração (figura 13).

Colocaram-se 100  $\mu$ l de amostra num balão de diluição de 5 mL, perfazendo-se com uma solução previamente preparada com 1 mL de HCl, 70 mL de etanol e 30 mL de água destilada. Homogeneizou-se a amostra e procedeu-se à leitura da absorvância a 540 nm. As amostras foram analisadas em triplicado tendo o teor em antocianinas no extrato, expresso em mg equivalentes de cianidina-3-glucósido, sido determinado recorrendo à seguinte expressão:

$$\text{Antocianinas Totais (mg/L)} = \text{Abs}_{540} \times 16,17 \times \text{FD.}$$

Os resultados finais foram expressos em miligramas de equivalentes de cianidina-3-glucósido por 100 gramas de massa fresca de amostra.

#### 4.5.3. Determinação dos taninos totais

Os taninos totais foram estimados de acordo com o método descrito por Ribereau-Gayon & Stonestreet (1966).

Preparou-se inicialmente numa balão de diluição, uma solução padrão composta por 200 mL de HCl, 200 mL de butanol e 60 mg de sulfato de ferro hexahidratado. Seguidamente adicionou-se num tubo, 2 mL da amostra diluída e 6 mL da solução padrão preparada anteriormente, e homogeneizou-se muito bem. O conteúdo do tubo foi dividido igualmente em dois tubos de ensaio, cada um com 4 mL. Um dos tubos foi colocado em banho-maria a 100°C e o outro foi colocado no escuro à temperatura ambiente, durante 30 minutos. Findo este tempo, procedeu-se à leitura da absorvância de ambos os tubos ( $Abs_1$  e  $Abs_2$ ) a 540 nm.

As amostras foram analisadas em triplicado tendo o teor em taninos totais no extrato sido determinado recorrendo à seguinte expressão:

$$\text{Taninos Totais (g/L)} = (Abs_2 - Abs_1) \times 0,1736 \times FD$$

Em que:  $Abs_1$  = Absorvância obtida da leitura da amostra aquecida a 100°C durante 30 minutos.  $Abs_2$  = Absorvância obtida da leitura da amostra mantida no escuro à temperatura ambiente.

Os resultados finais foram expressos em miligrama por grama de massa fresca de mirtilo.

#### 4.5.4. Avaliação da atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante total (AAT) dos mirtilos foi efetuada utilizando três métodos: o método do DPPH<sup>•</sup>, adaptado do método descrito por Brand-Williams *et al.* (1995), o método do ABTS<sup>•+</sup> adaptado do método descrito por

Re *et al.* (1999) e o método de FRAP de acordo com o descrito por Benzie e Strain (1996). Todas as determinações foram efetuadas em triplicado.

### i) Avaliação da atividade antioxidante pelo método FRAP

Para a determinação da atividade antioxidante foi utilizado o método de redução do íon ferro (FRAP), descrito por Benzie & Strain (1996) com modificações apresentadas por Deighton *et al.* (2000). Este método baseia-se na capacidade dos antioxidantes (redutores) presentes na amostra reduzirem, em meio ácido (pH=3,6), o complexo  $\text{Fe}^{3+}$ /tripiridiltriazina (TPTZ), originando  $\text{Fe}^{2+}$ /tripiridiltriazina, de cor azul (figura 14), que apresenta uma absorção máxima a 593 nm.

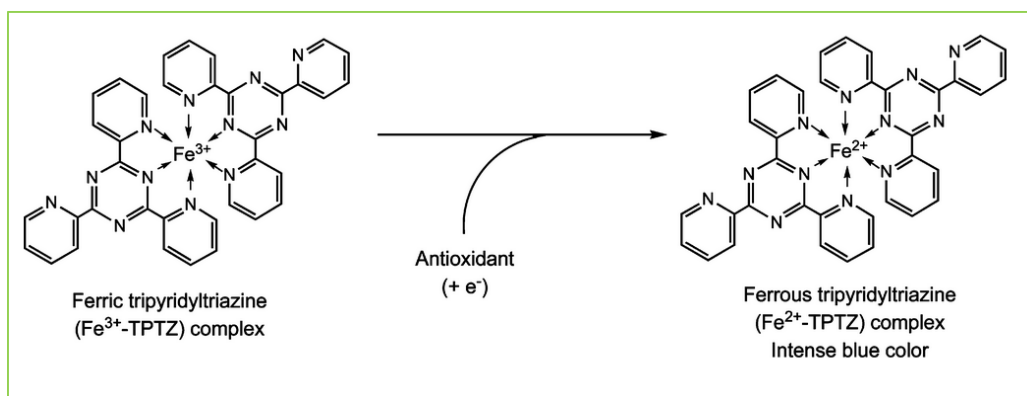


Figura 14: Formação do complexo (Fe<sup>2+</sup> -TPTZ) após redução do Fe<sup>3+</sup> por um antioxidante (adaptado de Moon e Shibamoto, (2009))

O reagente FRAP foi preparado no momento da utilização, adicionando 25 mL de tampão acetato 0,25 M (pH 3,6), 2,5 mL de TPTZ (10 mM) em HCl (40 mM) e 2,5 mL de cloreto de ferro (III) (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 20 mM). O ensaio iniciou-se com a adição, num tubo de ensaio, de 3,0 mL do reagente FRAP, preparado de fresco e pré-aquecido a 37°C, com 300 µL de água e 100 µL de cada um dos extratos. As misturas foram incubadas no escuro durante 4 minutos a 37°C.

As amostras foram analisadas em triplicado, tendo a atividade antioxidante sido determinada por interpolação de uma curva de calibração (figura 15), utilizando como padrão o Trolox, em concentrações a variar entre 0,16 e 2,80 mmol/L.

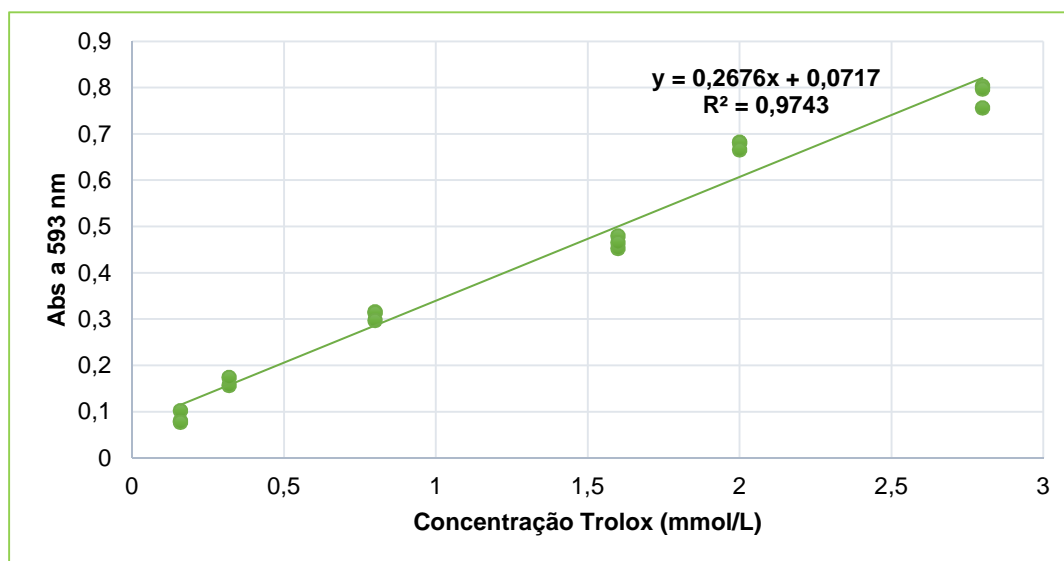


Figura 15: Curva de calibração elaborada com padrões de Trolox usada na determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP.

Os resultados foram expressos em miligrama de equivalente trolox por cada grama de massa fresca de mirtilo.

## ii) Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH•

Para a determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH• foi utilizada a metodologia descrita por Brand-Williams (1995). Este ensaio tem como base a redução do radical (DPPH•) (figura 16), que ao fixar um H• (removido pelo antioxidante em estudo) origina uma diminuição da absorvância, permitindo calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação química, a quantidade de antioxidante gasta, capaz de reduzir 50% do radical DPPH•. Na presença de uma substância capaz de lhe doar um átomo de hidrogénio, o DPPH• transforma-se na sua forma reduzida (DPPH) perdendo a cor violeta da solução original.

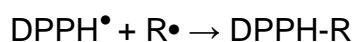
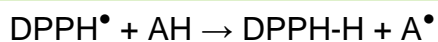


Figura 16: Reações que ocorrem na redução do radical DPPH• Adaptado de Brand-Williams, 1995

Elaborou-se uma curva de calibração utilizando como padrão (figura 17), soluções de Trolox, com concentrações de 0,01 a 0,1 g/L.

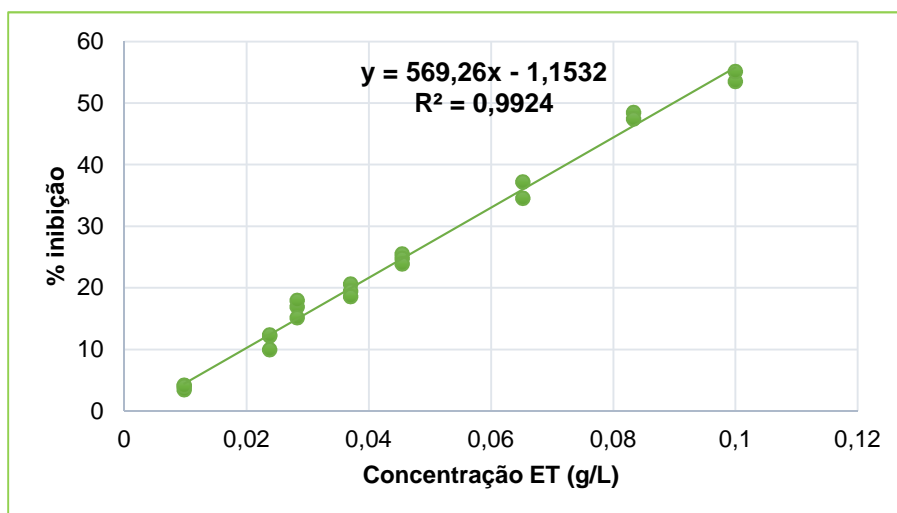


Figura 17: Curva de calibração elaborada com padrões de Trolox usada na determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH.

A percentagem de inibição das amostras foi determinada pela utilização da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{A_0 - A_{30}}{A_0} \times 100$$

Em que:  $A_0$  = Absorvância do tubo de Controlo (Branco).

$A_{30}$  = Absorvância da amostra ao fim de 30 minutos no escuro.

### iii) Avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS<sup>•+</sup>

A atividade antioxidante do mirtilo foi também analisada pelo método de ABTS descrito por Re *et al.*, (1999). O método do ABTS<sup>•+</sup> (2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) baseia-se na geração de um catião radicalar (ABTS<sup>•+</sup>) através da reação entre o ABTS e o persulfato de potássio originando uma solução azul-esverdeada, com capacidade de absorver a 734 nm. A adição de substâncias com poder antioxidante à solução com o ABTS<sup>•+</sup> provoca uma alteração estrutural que se traduz na descoloração e perda da capacidade de absorver nesse comprimento de onda (Magalhães *et al.*, 2005).

O  $ABTS^{\bullet+}$  é gerado pela reação de 7 mM de ABTS em água com 2.45 mM de  $K_2O_8S_2$  e misturados na proporção de 1:1 (figura 18).

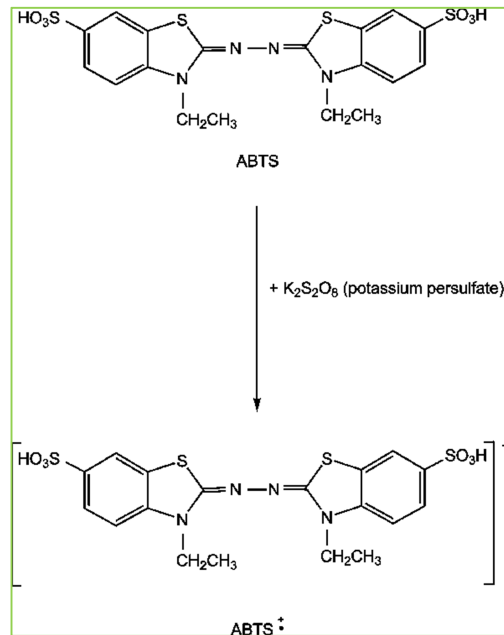


Figura 18: Formação do Radical  $ABTS^{\bullet+}$  (Adaptado de Moon and Shibamoto (2009))

Esta solução é mantida ao abrigo da luz durante 12 a 16 horas, por forma a assegurar que a reação ocorra na sua totalidade. Após este período de espera é efetuada uma diluição com etanol até a obtenção de uma absorvância a 700 nm.

Foi elaborada uma curva de calibração, apresentada na figura 19, utilizando como padrão, soluções de Trolox, com concentrações de 0,01 e 0,12 g/L.

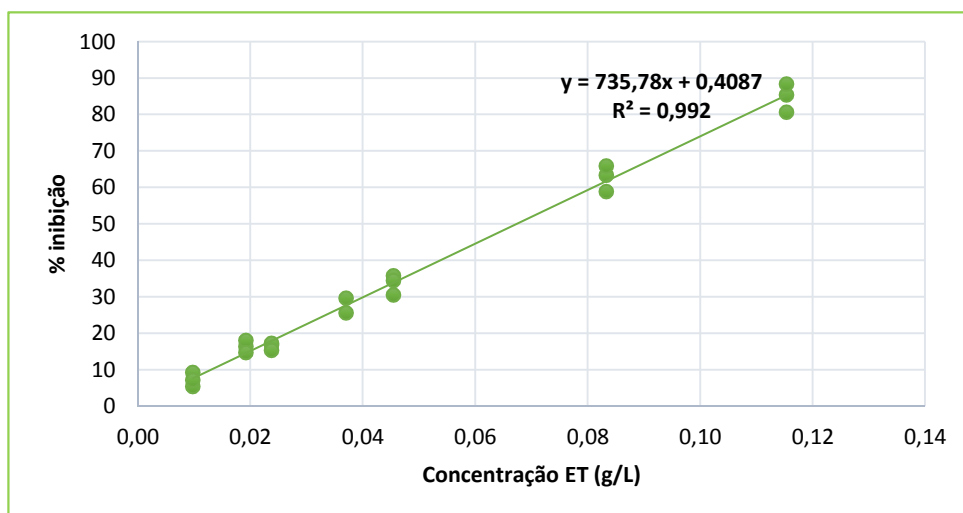


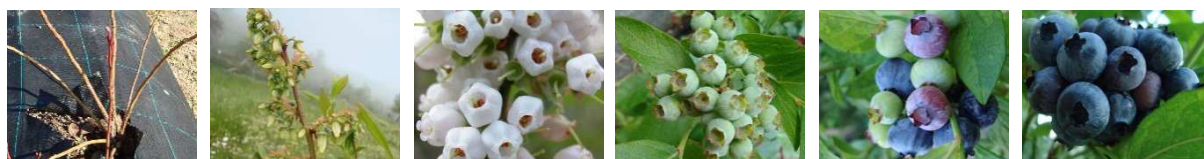
Figura 19: Curva de calibração elaborada com padrões de Trolox utilizada na determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS.

#### **4.6. Tratamento estatístico**

Os resultados foram sujeitos a uma análise recorrendo ao software SPSS, versão 21, e as comparações entre grupos para todos os parâmetros avaliados foram testadas pelos testes t de student, One Way – ANOVA, Kruskal Wallis (KW) e U Mann Whitney (UMW) sendo o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

Foram ainda calculados os coeficientes de correlação (r) de Pearson para determinação das relações existentes entre as diversas propriedades avaliadas.

#### IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO



## 5. Apresentação e Discussão de Resultados

### 5.1. Caracterização físico-química dos frutos

A tabela 5 mostra os resultados das propriedades físico-químicas avaliadas, nomeadamente a humidade relativa, o teor de sólidos solúveis totais, a acidez titulável e o índice de maturação, calculado pela relação entre o teor de SST e AcT.

Tabela 5: Caracterização físico-química dos mirtilos avaliados

Amostras	H <sup>1</sup> (%)	SST <sup>2</sup> (%)	AcT <sup>3</sup> (mg ac. cítrico/100 g amostra)	IM <sup>4</sup>
<b>BBO</b>	78,37 <sup>a</sup> ± 1,93	11,78 <sup>a</sup> ± 0,54	0,70 <sup>a</sup> ± 0,06	16,83 ± 1,94
<b>BES</b>	76,17 <sup>a</sup> ± 1,64	14,65 <sup>b</sup> ± 0,48	0,56 <sup>a</sup> ± 0,07	26,62 ± 2,49
<b>BOH</b>	76,59 <sup>a</sup> ± 0,88	9,30 <sup>c</sup> ± 1,09	0,79 <sup>a</sup> ± 0,04	11,80 ± 1,70
<b>BQU</b>	77,91 <sup>a</sup> ± 3,61	13,64 <sup>d</sup> ± 0,88	0,62 <sup>a</sup> ± 0,07	22,24 ± 3,05
<b>BVV</b>	82,79 <sup>a</sup> ± 0,17	13,05 <sup>e</sup> ± 0,26	0,75 <sup>a</sup> ± 0,10	17,65 ± 2,07

Média ± desvio padrão de 3 réplicas; <sup>1</sup>H = Humidade; <sup>2</sup>SST = Sólidos solúveis totais; <sup>3</sup>AcT = Acidez total; <sup>4</sup>IM = Índice de maturação (= SST/Acidez).

Médias com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes de acordo com o teste KW ( $p < 0,05$ ).

Pela análise da tabela 5 verificou-se que para os valores de humidade, a amostra BVV foi a que apresentou mais percentagem, 82,79 %, e as amostras BOH e BES as que apresentaram menor valor de humidade, 76,59 % e 76,17% respetivamente. Os valores estão de acordo com os descritos por Prior *et al.* (1998), que reportam valores de matéria seca de 24,1% para a mesma cultivar. Díaz *et al.* (2011) também determinaram o conteúdo de humidade nas cultivares Duke e Brigitte, cultivadas no Chile, e obtiveram valores superiores aos descritos, cerca de 84±2%.

Relativamente aos valores em açúcares (SST), estes variaram entre 9,30% e 14,65%. A amostra BOH obteve o valor mais baixo (9,3%), seguida da amostra BBO (11,78%). Por outro lado, as amostras BES e BQU obtiveram teores de SST mais

elevados, 14,65% e 13,64% respetivamente. De acordo com o teste Kruskal Wallis (KW) ( $p < 0,01$ ), todas as amostras diferiram significativamente entre si. Carreira (2012) reportou valores de SST de 10,4% para a cultivar Bluecrop cultivada na região portuguesa de Sever do Vouga. Gündüz *et al.* (2015) também avaliou o conteúdo de sólidos solúveis para a mesma cultivar durante 3 colheitas consecutivas (2010, 2011 e 2012), e apurou valores entre 12,5% e 13,4%. Também Castrejón *et al.* (2008) estudou a evolução do teor de SST durante o amadurecimento de baga da cultivar Bluecrop, e obteve valores próximos de 14% no final na maturação.

Pelo contrário, os valores obtidos para a acidez são superiores na amostra BOH, 0,79 mg ácido cítrico/100 g fruto fresco, e inferiores na amostra BES, 0,56 mg ácido cítrico/100 g fruto fresco. A acidez titulável apresentou uma correlação negativa com o SST, sendo o seu coeficiente de correlação linear de 0,67, ou seja, à medida que a acidez diminui, o teor de SST aumenta.

Pela análise do índice de maturação, comprovou-se que a amostra BES se encontrava num estado de maturação superior (26,62), seguida da amostra BQU (22,24) e BVV (17,65). Hancock *et al.* (2008) reportaram índices de maturação inferiores aos obtidos, cerca de 11,3 para a cultivar Elliott. Castrejón *et al.* (2008) também o índice de maturação durante o amadurecimento dos frutos da cultivar Bluecrop. Os autores apuraram que durante as transformações de cor do fruto, ou seja, durante o amadurecimento, o índice de maturação aumentava cerca de 4,5 vezes, evoluindo de 5 para 22. Pela análise dos valores relativos ao índice de maturação, podemos constatar que apesar de todas as amostras se encontrarem num estado de maturação considerado pelos produtores, como adequado à comercialização, o valor do índice de maturação variou bastante.

A tabela 6 apresenta os resultados para o calibre, área de superfície dos mirtilos e parâmetros de textura avaliados (firmeza da pele e elasticidade).

Tabela 6: Valores de textura e calibre obtidos para as diferentes amostras

<b>Amostras</b>	<b>Calibre (cm)</b>	<b>Área de superfície (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Firmeza da pele (N)</b>	<b>Elasticidade (mm)</b>
<b>BBO</b>	0,90 <sup>a</sup> ± 0,13	2,54	15,43 <sup>a</sup> ± 2,75	2,54 <sup>a</sup> ± 0,53
<b>BES</b>	1,05 <sup>a</sup> ± 0,15	3,46	12,19 <sup>b</sup> ± 1,65	2,18 <sup>b</sup> ± 0,41
<b>BOH</b>	1,17 <sup>a</sup> ± 0,12	4,30	14,39 <sup>c</sup> ± 2,06	2,51 <sup>c</sup> ± 0,42
<b>BQU</b>	1,00 <sup>a</sup> ± 0,17	3,14	11,24 <sup>d</sup> ± 1,90	2,41 <sup>d</sup> ± 0,41
<b>BVV</b>	0,95 <sup>a</sup> ± 0,18	2,66	11,83 <sup>e</sup> ± 1,79	2,47 <sup>e</sup> ± 0,63

Média ± desvio padrão de 3 réplicas; \*cálculo da área de superfície (AS) (cm<sup>2</sup>)

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste ANOVA (p<0,001).

Para os valores do calibre, pode verificar-se que as amostras não apresentam diferenças significativas entre si (p<0,001), sendo a amostra BOH a que obteve o maior valor médio, 1,17 cm, seguida da amostra BES (1,05 cm), BQH (1,00 cm), BVV (0,95 cm) e por último a BBO (0,90 cm). A área de superfície também foi maior na amostra BOH, 4,30 cm<sup>2</sup>. Estes valores encontram-se abaixo dos relatados para a mesma cultivar por Prior *et al.* (1998).

No que diz respeito à elasticidade, verificou-se que a amostra BES foi a que obteve menor valor médio, 2,18 mm, e por sua vez a amostra BOH a que obteve valor superior, 2,54 mm. De acordo com o teste ANOVA (p<0,001) as amostras diferem significativamente entre si. Na tabela 5 ainda é possível observar os resultados para a firmeza da pele dos mirtilos. A amostra BBO apresentou a maior firmeza (15,43 N), seguido pela amostra BOH (14,39 N). Por outro lado, as amostras de BVV e BQU foram aquelas que obtiveram os menores valores para a firmeza, 11,83 N e 11,24 N, respetivamente. Chiabrandi *et al.* (2009) avaliaram a textura da cultivar Bluecrop durante a conservação pós-colheita, e obtiveram valores semelhantes aos obtidos.

Na tabela 7 apresentam-se os valores médios dos diferentes parâmetros de cor obtidos para cada amostra de diferentes localidades.

Tabela 7: Valores dos parâmetros de cor para as amostras de diferentes localidades

Amostras	L*	a*	b*
<b>BBO</b>	33,88 <sup>a</sup> ± 4,18	0,52 <sup>a</sup> ± 0,93	-6,19 <sup>a</sup> ± 1,85
<b>BES</b>	36,38 <sup>b</sup> ± 2,54	0,09 <sup>b</sup> ± 0,38	-7,77 <sup>b</sup> ± 1,20
<b>BOH</b>	34,56 <sup>c</sup> ± 2,01	0,31 <sup>c</sup> ± 0,43	-7,76 <sup>c</sup> ± 0,88
<b>BQU</b>	36,79 <sup>d</sup> ± 3,14	-0,02 <sup>d</sup> ± 0,46	-7,32 <sup>d</sup> ± 1,20
<b>BVV</b>	31,08 <sup>e</sup> ± 2,67	0,62 <sup>e</sup> ± 0,91	-5,02 <sup>e</sup> ± 1,51

Média ± desvio padrão de 3 réplicas; Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste ANOVA ( $p < 0,001$ ).

Pela análise da tabela, pode verificar-se que a luminosidade das amostras é inferior a 50, o que indica que os mirtilos são escuros. As amostras BQU e BES obtiveram valores mais elevados, 36,79 e 36,38 respetivamente. Por sua vez, as amostras BBO e BVV obtiveram valores de luminosidade ainda mais próximos da coloração preta, 33,88 e 31,08 respetivamente.

Em relação à coordenada a\* os valores são em geral positivos, indicando a predominância da coloração vermelha em detrimento da verde, com a exceção da amostra BQU, que apresentou valores próximos de zero. A amostra BVV foi a que apresentou uma tonalidade vermelha mais elevada, 0,62, seguida da amostra BBO, com 0,52. Observou-se ainda que os valores da coordenada b\* são negativos, isto é, há predominância da coloração azul em detrimento da amarela. As amostras BES, BOH e BQU apresentaram os valores mais negativos, 7,77, 7,76 e 7,32, indicando uma coloração azul mais intensa para estas amostras. Estes resultados vão de encontro os obtidos por Saftner *et al.* (2008) e Silva *et al.* (2005). Também Giovanelli & Buratti (2009) avaliaram os parâmetros colorimétricos da cultivar Bluecrop, cultivada a 700 metros de altitude em Itália. Os valores de L\* obtidos neste trabalho estão de acordo com os referidos pelos autores citados (34,9), no entanto os valores das coordenadas a\* e b\* são mais baixos que os reportados, 0,74 e -3,26

respetivamente. Contudo, outros autores reportam valores mais elevados para a coordenada L\*, entre 60 e 70 para as cultivares Star, Centurio, Elliot, Brigitte e Duke (Matiacevich *et al.*, 2011).

## 5.2. Conteúdo em fenóis totais

### 5.2.1. Conteúdo em fenóis totais nos frutos frescos

A figura 20 apresenta o teor de fenóis totais, expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de fruto fresco, obtidos nos extratos de metanol e acetona/água, das cultivares Bluecrop colhidas nas diferentes localidades.

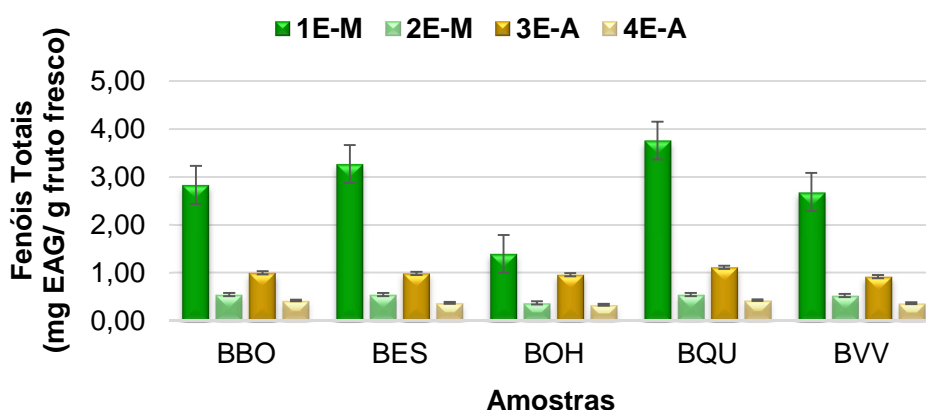


Figura 20: Valores dos fenóis totais nos extratos de metanol e acetona. (Legenda: 1E-M – 1º extrato de metanol; 2E-M – 2º extrato de metanol; 3E-A – 1º extrato de acetona; 4E-A – 2º extrato de acetona.)

Pela análise da figura, é possível observar que os primeiros extratos do solvente de metanol e acetona (1E-M e 3E-A) obtiveram maior quantidade de compostos fenólicos, quando comparados com os segundos extratos de cada solvente (2E-M e 4E-A). Para além disso, os extratos de metanol apresentaram valores de compostos fenólicos estatisticamente (teste t de student,  $p < 0,001$ ) superiores aos dos extratos de acetona. Em geral, o teor de fenóis extraídos com metanol representavam entre 70-74% do total quantificado, exceto no caso da amostra BOH, em que apenas representava 58%.

A amostra BQU foi a que obteve maior conteúdo fenólico nos extratos 1E-M e 3E-A, 3,76 e 1,12 mg EAG/g fruto fresco, respetivamente, seguida da amostra BES. Por sua vez, a amostra BOH foi a que obteve resultados inferiores também em ambos os tipos de solvente, sendo os valores de 1,77 mg EAG/g fruto para os extratos de metanol (1E-M e 2E-M) e 1,29 mg EAG/g fruto para os extrato de acetona (3E-A e 4E-A).

O total de fenóis de cada fruto foi obtido, pela soma dos teores quantificados nos 4 extratos. Os resultados mostraram que a amostra produzida na região de Vouzela (BQU) continha a maior quantidade de fenóis totais (5,85 mg EAG/g fruto fresco), seguida da amostra de Estarreja com 5,18 mg EAG/g amostra. Pelo contrário, a amostra cultivada na região de Oliveira do Hospital (BOH) apresentava o valor mais baixo de compostos fenólicos (3,06 mg EAG/g fruto). Os resultados obtidos para as amostras BBO, BES, BQU e BVV encontram-se acima dos apresentados por Howard *et al.* (2003), Moyer *et al.* (2002) e Gündüz *et al.* (2015) 3,24 mg EAG/g,  $3,04 \pm 15$  mg EAG/g e 1,44 mg EAG/g respetivamente, para a mesma cultivar. Estas diferenças podem ser reflexo do sistema de produção, condições ambientais ou do estado maturação do fruto (Prior *et al.*, 1998) aquando a colheita. Wang *et al.* (2008) observaram para a variedade de *v. corymbosum* Bluecrop, quando cultivada em condições de agricultura biológica, valores de fenóis totais quase duas vezes superiores aos valores obtidos em modo de agricultura convencional, 3,19 mg EAG/g e 1,90 mg EAG/g frutos fresco, respetivamente. Por outro lado, Dragovic-Uzelac e colaboradores (2010) verificaram diferenças significativas entre o ano de produção de 2006 (3,68 mg EAG/g amostra) e de 2007 (2,92 mg EAG/g amostra), da variedade Bluecrop, o que demonstra a importância dos fatores climáticos, entre outros, na composição fenólica dos mirtilos. A intensidade da radiação UV pode também ser um fator capaz de influenciar a composição fenólica, provocando mesmo o aumento destes compostos (Eichholz *et al.*, 2011). Outra das explicações possíveis para a grande diversidade de valores obtidos para a mesma cultivar, pode ser a amplitude térmica diária, ou seja, diferença entre as temperaturas mínimas e máximas alcançadas durante o dia, e que pode influenciar expressivamente a produção de compostos fenólicos (Granelli *et al.*, 2012).

Dentro do grupo das pequenas bagas, Granelli *et al.* (2012) descreveram valores médios em compostos fenólicos de 2,36 mg EAG/g em amoras, e de 0,90 mg EAG/g em framboesas. Ngo *et al.* (2007) reportaram também para o morango valores de fenóis totais de 1,18 mg EAG/g fruto. Estes valores são bastante inferiores aos obtidos para os mirtilos analisados, demonstrando assim que, dentro do grupo das pequenas bagas, podem ser considerados uma importante fonte de compostos bioativos.

### 5.2.2. Comparação do teor de fenóis entre os frutos frescos e congelados

A figura 21 apresenta o valor de fenóis totais presentes nos mirtilos à data da colheita e após seis meses conservados no congelador a -20°C.

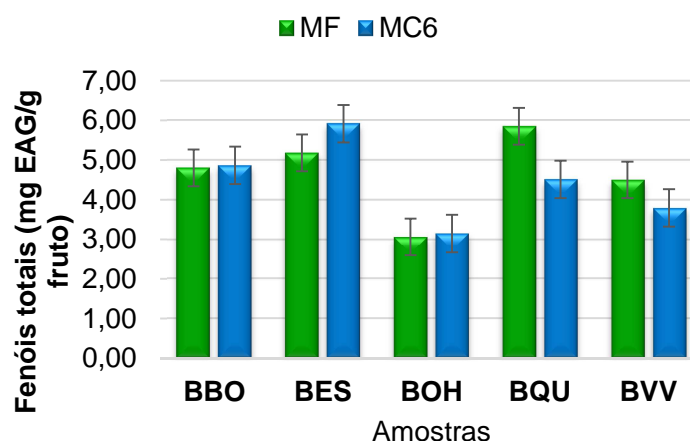


Figura 21: Variação de fenóis totais no fruto congelado em relação ao fruto fresco. (Legenda: MC6 - mirtilo congelado 6 meses; MF - mirtilo fresco).

Pela figura 21 é possível observar que, no caso das amostras BES, BBO e BOH, a quantidade de fenóis presentes nas amostras congeladas era superior às amostras em fresco. Na amostra BQU e BVV, os valores de fenóis totais diminuíram no fruto congelado, 19% e 12% respetivamente. A amostra BQU mostrou uma maior variação entre o fruto fresco (5,85 mg EAG/g) e o fruto congelado, (4,51 mg EAG/g). Por outro lado, a amostra BES apresentava um teor de fenóis mais elevado após a

congelamento (5,92 mg EAG/g) quando comparado com o fruto fresco (5,18 mg EAG/g). No entanto, todas estas diferenças não eram significativas do ponto de vista estatístico.

A mesma tendência foi verificada por Yuan *et al.* (2011) relativamente à variação de fenóis totais em cultivares do grupo Rabbiteye, durante o armazenamento a temperatura de congelamento (-20°C) durante 2 semanas. Os autores verificaram aumentos de 40% e 11% para as cultivares Tifblue e Premier.

### 5.3. Atividade antioxidante

#### 5.3.1. Atividade antioxidante dos frutos em frescos

A figura 22 ilustra os resultados obtidos para a atividade antioxidante determinada pelo método de DPPH expresso miligramas equivalentes de trolox (ET) por grama de fruto fresco.

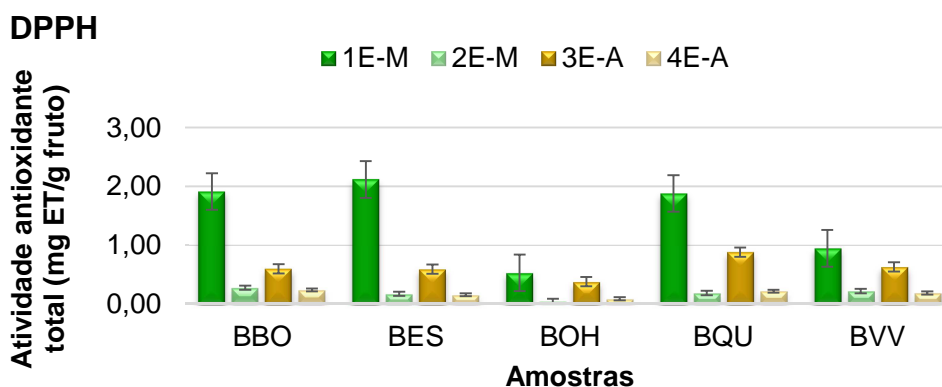


Figura 22: Atividade antioxidante dos extratos de metanol e acetona das amostras da cultivar Bluecrop, avaliadas pelo método de DPPH expressos em equivalentes de Trolox. (Legenda: 1E-M – 1º extrato de metanol; 2E-M – 2º extrato de metanol; 3E-A – 1º extrato de acetona; 4E-A – 2º extrato de acetona).

Pela análise da figura 22, constata-se que os extratos 1E-M que apresentavam maior atividade antioxidante eram os da amostra BES (2,29 mg ET/g), BBO (1,91 mg ET/g) e BQU (1,87 mg ET/g), sendo que a menor atividade antioxidante foi observada na amostra BOH (0,57 mg ET/g). Relativamente ao primeiro extrato de

acetona/água (3E-A), a amostra de Queirã (BQU) obteve maior atividade antioxidante, 0,88 mg ET/g, e a amostra BOH apresentou novamente uma atividade antioxidante inferior, 0,36 mg ET/g fruto.

Analisando de forma conjunta os valores obtidos, a amostra de Queirã (BQU) obteve maior atividade antioxidante total, 3,15 mg ET/g fruto, seguida da amostra de Estarreja (BES), 3,03 mg ET/g fruto. As amostras de Vila Verde (BVV) e Oliveira do Hospital (BOH) apresentaram resultados inferiores, 1,97 mg ET/g fruto e 1,03 mg ET/g fruto respetivamente. Os resultados obtidos, indicam ainda que os extratos de metanol (1E-M e 2E-M), representavam entre 55% e 76% do total de atividade antioxidante quantificado. No método de DPPH também foram encontradas diferenças significativas ( $p=0,047$ ) entre todas as amostras analisadas.

A figura 23 apresenta os resultados obtidos para a atividade antioxidante determinada pelo método ABTS. Em geral, os valores absolutos de atividade antioxidante eram mais elevados em relação aos do DPPH. A mesma tendência foi descrita por Thaipong *et al.* (2006), que obtiveram, em goiabas, valores absolutos de atividade antioxidante determinada pelo método do ABTS superiores aos obtidos pelo método DPPH.

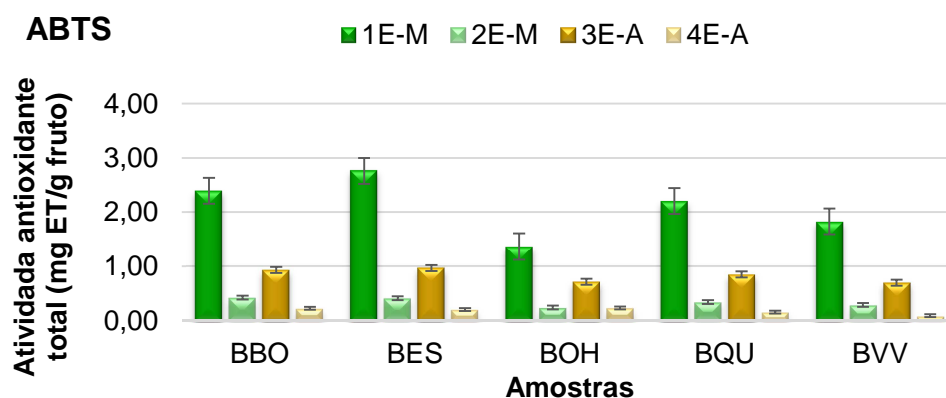


Figura 23: Atividade antioxidante dos extratos de metanol e acetona das amostras da cultivar Bluecrop, avaliadas pelo método de ABTS expressos em equivalentes de Trolox. (Legenda: 1E-M – 1º extrato de metanol; 2E-M – 2º extrato de metanol; 3E-A – 1º extrato de acetona; 4E-A – 2º extrato de acetona).

Pela análise da figura 23 verifica-se que também no método ABTS, nos extratos metanólicos (1E-M e 2E-M), a amostra BES foi a que obteve maior atividade antioxidante, e a BOH a menor, com 3,17 mg ET/g e 1,61 mg ET/g respectivamente. Em relação ao extrato 3E-A, à semelhança dos extratos metanólicos, a amostra de Estarreja (BES) obteve o valor mais elevado, 0,97 mg ET/g fruto, seguida da amostra de Bouças (BBO) com 0,93 mg ET/g fruto). Por sua vez, as amostras BOH e BVV apresentaram os valores mais baixos, 0,72 mg ET/g e 0,70 mg ET/g respectivamente.

De acordo com o teste t-student, existiram diferenças altamente significativas ( $p < 0,001$ ) entre os extratos, nos métodos DPPH e ABTS. A atividade antioxidante dos extratos de metanol era sempre superior aos extratos de acetona, representando cerca de 70%. A ordem do extrato também apresenta diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) nos dois os métodos, onde a atividade antioxidante nos primeiros extratos de metanol e acetona era superior aos restantes.

No global, os valores obtidos pela soma dos 4 extratos, a amostra BES e a amostra BBO obtiveram valores de atividade antioxidante mais elevadas, 4,34 mg ET/g e 3,97 mg ET/g fruto respectivamente. Pelo contrário, a amostra BOH obteve o valor mais baixo, 2,56 mg ET/g.

Os resultados descritos estão de acordo com Ehlenfeldt & Prior (2001), Howard *et al.* (2003) e Connor *et al.* (2002), para frutos da cultivar Bluecrop produzidos em diversos estados dos EUA. Nos resultados obtidos pode verificar-se que, os frutos provenientes de Oliveira de Hospital (BOH) possuíam um calibre superior às restantes amostras, 1,17 cm, e por sua vez, apresentavam também uma capacidade antioxidante menor. Connor *et al.*, (2002d) verificaram bagas colhidas em 2 anos consecutivos (1998 e 1999), que aquelas que possuíam maior tamanho, apresentavam atividade antioxidante inferior. Este fato deverá estar relacionado com a maior atividade antioxidante relativa da pele dos frutos comparada com a da polpa.

A figura 24 mostra a atividade antioxidante para os mirtilos determinada pelo método de FRAP.

## FRAP

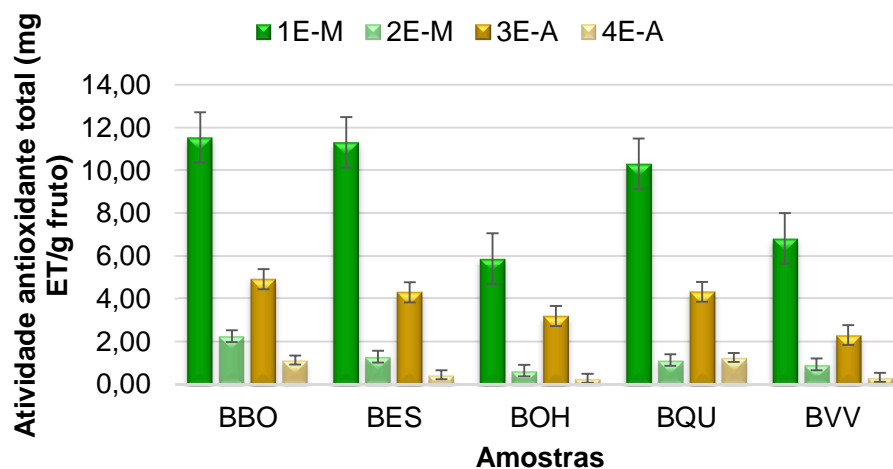


Figura 24: Atividade antioxidante dos extratos de metanol e acetona das amostras da cultivar Bluecrop, avaliadas pelo método de FRAP expressos em equivalentes de Trolox. (Legenda: 1E-M – 1º extrato de metanol; 2E-M – 2º extrato de metanol; 3E-A – 1º extrato de acetona; 4E-A – 2º extrato de acetona).

Pela análise da figura verificou-se que, à semelhança do método DPPH e ABTS, o primeiro extrato de metanol (1E-M) era o que possuía maior atividade antioxidante, seguido do primeiro extrato de acetona (3E-A). A figura mostra que amostra BBO foi a que obteve resultados mais elevados de atividade antioxidante, sendo 11,54 mg ET/g fruto fresco para o extrato 1E-M e 4,91 mg ET/g de fruto para o extrato 3E-A, seguida da amostra de Estarreja (BES) com 11,31 mg ET/g no 1E-M e 4,30 mg ET/g para o extrato 3E-A. Por sua vez, a amostra BOH apresentou os valores mais baixos, 5,88 mg ET/g para o extrato 1E-M e 3,19 mg ET/g para o extrato 3E-A.

A atividade antioxidante total dos mirtilos provenientes das diferentes localidades variou entre 19,83 mg ET/g e 9,99 mg ET/g, existindo diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,03$ ). Pela soma dos extratos obtidos, podemos verificar que a amostra BBO, BES e BQU obtiveram os valores para a atividade antioxidante mais elevados, 19,83 mg ET/g, 17,34 mg ET/g e 17,01 mg ET/g respetivamente. À semelhança do método DPPH e ABTS a amostra de Oliveira do Hospital (BOH) obteve também os valores de atividade antioxidante total mais baixos, 9,99 mg ET/g fruto fresco.

Os valores de FRAP encontram-se acima dos valores reportados por *Moyer et al.* (2002) para a mesma cultivar, produzida nos EUA, 8,6 mg TE/g. Giovaneli & Buratti (2009) também observaram a atividade antioxidante da Bluecrop pelo método FRAP e obtiveram valores inferiores aos presentes neste trabalho, 6,1 mg TE/g fruto.

### 5.3.2. Comparação da atividade antioxidante dos frutos congelados e frescos

A atividade antioxidante determinada pelo método DPPH e ABTS foi também determinada nos mirtilos congelados durante 6 meses. A figura 25 mostra os valores totais de atividade antioxidante obtida para o método DPPH.

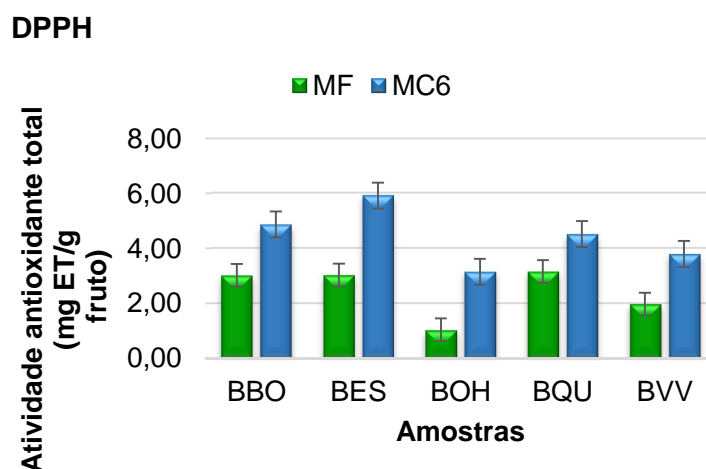


Figura 25: Comparação da atividade antioxidante total dos frutos frescos e congelados pelo método DPPH. (Legenda: MF - mirtilo fresco; MC6 - mirtilo congelado 6 meses).

Pela análise da figura 25 é possível observar que a atividade antioxidante total aumentou nos frutos congelados, entre 43% e 206% para a amostra de BQU e Oliveira do Hospital (BOH) respetivamente. À semelhança dos resultados obtidos para o conteúdo fenólico total, no método DPPH a amostra BES obteve também

uma maior variação da atividade antioxidante total. No estado congelado, a amostra BES apresentava mais 2,89 mg ET/g face ao fruto fresco, ou seja, 5,92 mg ET/g,. No final dos 6 meses de congelação a -20°C, a ordem relativa das amostras manteve-se, sendo que as amostras de Estarreja (BES) e de Queirã (BQU) apresentavam valores superiores, e a amostra de Oliveira do Hospital (BOH) continuava a apresentar uma atividade antioxidante inferior às restantes amostras. Estas diferenças eram estatisticamente significativas ( $p=0,047$ ) de acordo com o teste t-student.

A figura 26 mostra a atividade antioxidante total avaliada pelo método ABTS nos mirtilos em fresco e congelados a 6 meses.

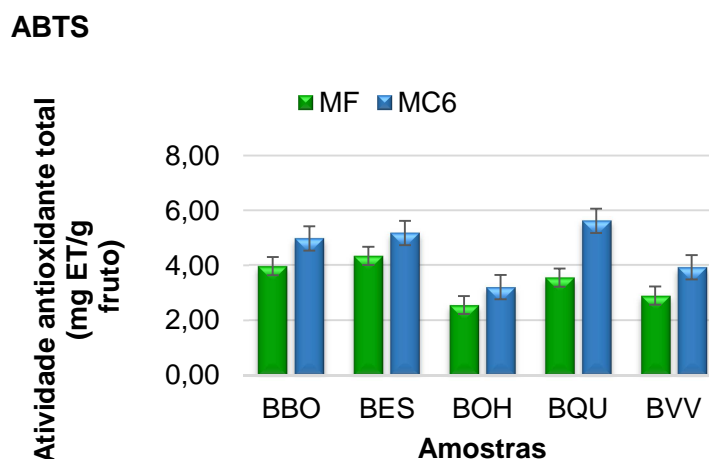


Figura 26: Comparação da atividade antioxidante total dos frutos frescos e congelados pelo método ABTS. (Legenda: MF - mirtilo fresco; MC6 - mirtilo congelado 6 meses;).

No que diz respeito ao método ABTS, a amostra BQU foi a que obteve maior valor de atividade antioxidante total, após 6 meses de congelação, 5,62 mg ET/g, seguida da amostra BES com 5,18 mg ET/g. Por sua vez, a amostra BOH foi a que obteve resultados inferiores, 3,21 mg ET/g. Pela figura pode observar-se, que tal como no método de DPPH, o teor antioxidante é superior nos frutos congelados, com variações entre 19 % para a amostra de Estarreja e 58% para a amostra de

Queirã. Constata-se assim que, o aumento da atividade antioxidante nos frutos congelados foi maior no método DPPH.

Reque *et al.* (2014), descreveram o aumento (29,20  $\mu\text{mol ET/g}$  para 35,77  $\mu\text{mol ET/g}$ ) da atividade antioxidante em mirtilos, conservados durante 6 meses a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . De acordo com os mesmos autores, a variação dos valores de atividade antioxidante dos frutos congelados pode ser explicado por reações que ocorram após a colheita, formando compostos responsáveis por este aumento, ou pelo rompimento celular causado pela descongelação aquando do momento da análise, melhorando a extração de compostos que contribuem para a atividade antioxidante do mirtilo. Por outro lado, Srivastava *et al.* (2007) descreveram uma ligeira diminuição, cerca de 2% na capacidade antioxidante de extratos de duas cultivares de mirtilo, Tifblue e Powderblue, armazenados durante 60 dias a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 5.4. Conteúdo em antocianinas totais

A figura 27 mostra os resultados obtidos para as antocianinas totais, nos diferentes extratos de metanol e acetona, expressos em miligrama de Malvidina-3-Glucósido (Mv3G) por grama de fruto fresco.

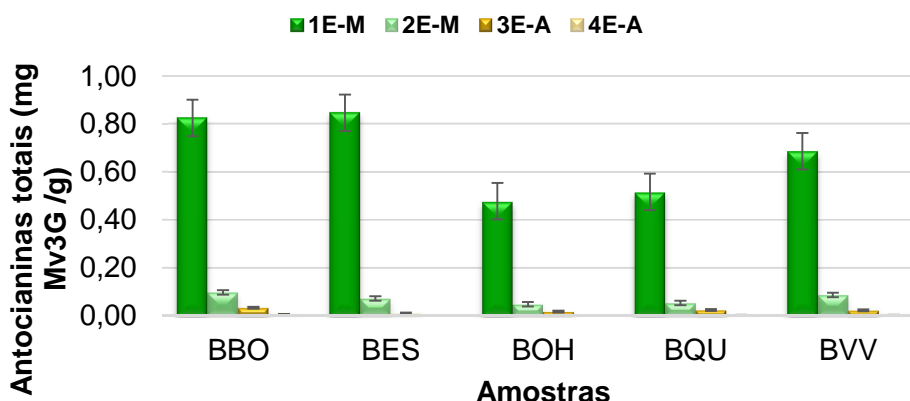


Figura 27: Valor de antocianinas expresso em mg Mal-3-Glu por grama de amostra. (Legenda: 1E-M – 1º extrato de metanol; 2E-M – 2º extrato de metanol; 3E-A – 1º extrato de acetona; 4E-A – 2º extrato de acetona.)

Pela análise da figura 27, verifica-se, para todas as amostras que as antocianinas foram preferencialmente (mais de 96%) extraídas na primeira extração com metanol (1E-M). O extrato 1E-M, a amostra de Estarreja (BES) foi a que obteve maior teor em antocianinas, 0,85 mg Mv3G/g, seguida da amostra de Bouças (BBO) com 0,83 mg Mv3G/g de fruto fresco. Por outro lado, a amostra BOH revelou menor conteúdo em antocianinas 0,78 mg Mv3G/g. No extrato 2E-M a amostra BBO alcançou maior valor, 0,10 mg Mv3G/g, enquanto que a amostra de Oliveira do Hospital (BOH) obteve novamente o valor mais baixo 0,05 mg Mv3G/g fruto fresco. Para os extratos de acetona, 3E-A e 4E-A, constatou-se que o teor de antocianinas extraído em todas as amostras era próximo de 0. No global, a amostra de Bouças (BBO) obteve um total de antocianinas superior, 0,96 mg Mv3G/g, seguida da amostra de Estarreja (BES) com 0,93 mg Mv3G/g. As amostras de Queirã (BQU) e de Oliveira do Hospital (BOH) apresentaram, por sua vez, valores inferiores de antocianinas totais, 0,60 mg Mv3G/g e 0,54 mg Mv3G/g respetivamente. De acordo com o teste t-student existiam diferenças significativas entre as amostras avaliadas ( $p < 0,001$ ).

Os valores obtidos para as amostras de diferentes localidades encontram-se acima dos descritos por Wang *et al.* (2012b) e Gavrilova *et al.* (2011) para a cultivar Bluecrop, com 0,20 mg Mv3G/g de fruto fresco e 0,41 mg Mv3G/g massa fresca, respetivamente. O conteúdo de antocianinas presentes nos extratos varia com o tipo de solvente, temperatura e tempo de extração, armazenamento ou temperatura de congelação (Oancea *et al.*, 2012).

Procedeu-se igualmente à determinação do teor de antocianinas para o fruto congelado durante 6 meses. No entanto, em todas as amostras, o teor de antocianinas era inferior ao limite de quantificação. Os resultados obtidos não estão de acordo com Oancea *et al.* (2012), que descreveram o aumento de antocianinas após armazenamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 5.5. Conteúdo em taninos totais

### 5.5.1. Conteúdo em taninos totais no fruto fresco

A figura 28 apresenta o conteúdo em taninos totais obtidos para as amostras, analisadas em fresco, das 5 localidades analisadas.

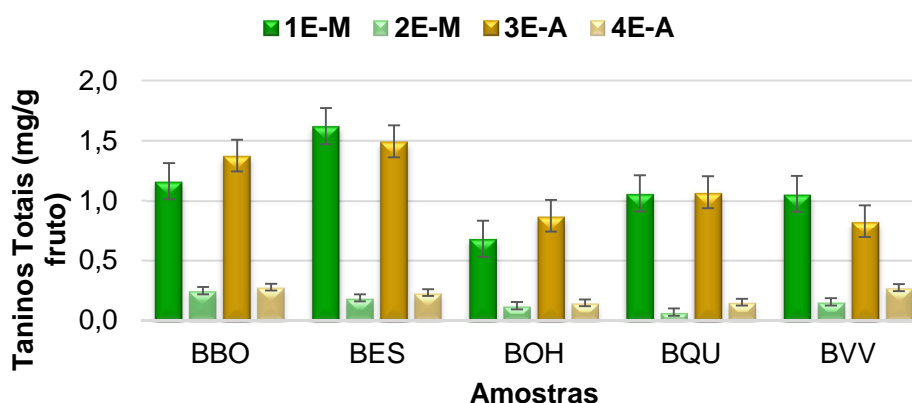


Figura 28: Valores de Taninos totais obtidos expressos em mg por grama de amostra. (Legenda: 1E-M – 1º extrato de metanol; 2E-M – 2º extrato de metanol; 3E-A – 1º extrato de acetona; 4E-A – 2º extrato de acetona.).

Pode observar-se pela análise da figura 28, que nas amostras BBO, BOH e BQU o extrato 3E-A obteve maior quantidade de taninos comparativamente ao extrato 1E-M. Nas amostras BES e BVV o extrato 1E-M apresentou maior conteúdo em taninos, quando comparado com o extrato 3E-A.

A amostra BES foi a que obteve maiores valores no extrato 1E-M e no extrato 3E-A, 1,62 mg/g e 1,49 mg/g, seguida da amostra BBO, com um teor de taninos de 1,38 mg/g para o extrato 3E-A e 1,16 mg/g para o extrato 1E-M. A amostra BOH teve menor teor de taninos, 0,87 mg/g e 0,68 mg/g para os extratos 3E-A e 1E-M respectivamente. O teor de taninos totais foi muito inferior nos extratos 2E-M e 4E-A em todas as amostras relativamente aos primeiros extratos de metanol e acetona, sendo estas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ). Os valores de

taninos totais nas 5 amostras, diferiam significativamente entre os 4 extratos analisados ( $p < 0,004$ ).

Com a análise da figura verifica-se ainda que, quer os extratos de metanol (1E-M e 2E-M), quer os extratos de acetona (3E-A e 4E-A), apresentavam percentagens de extração de taninos próximas de 50%.

No geral, a amostra BES foi a que obteve maior quantidade total de taninos, 3,53 mg/g, seguida da amostra BBO com 3,06 mg/g fruto fresco. Por sua vez, a amostra BOH foi a que apresentou um teor em taninos mais baixo (1,818 mg/g). Os valores obtidos encontram-se acima dos obtidos por Yi *et al.* (2005) para as cultivares Briteblue, Powderblue e Tifblue. Arancibia-Avila *et al.* (2012) também avaliaram o teor de taninos em cultivares *vaccinium corymbosum* L. e reportaram valores idênticos aos obtidos, 4,08 mg/g fruto.

### 5.5.2. Comparação do teor de taninos totais entre os frutos congelados e frescos

A figura 29 mostra o conteúdo de taninos totais, expressos em mg/g de fruto, no estado fresco e após 6 meses de armazenamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

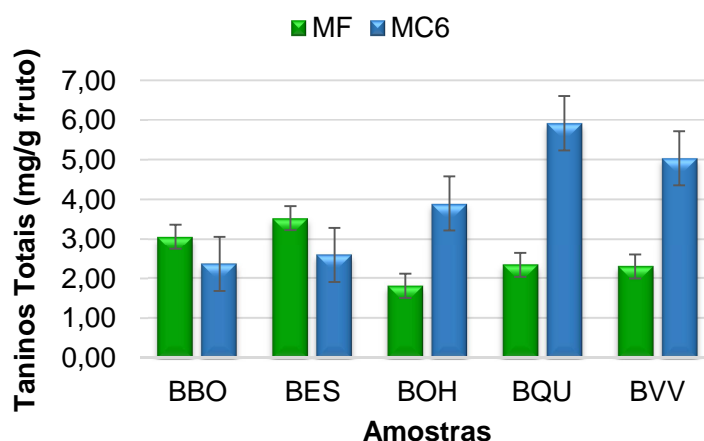


Figura 29: Valores de taninos totais obtidos para o fruto fresco e congelado. (Legenda: MF - mirtilo fresco; MC6 - mirtilo congelado 6 meses).

Pela análise da figura é possível observar que nas amostras BBO e BES o teor de taninos totais diminuiu com a congelação, enquanto que nas restantes amostras esse valor aumentou. O teor de taninos totais na amostra de Estarreja (BES) foi o que mais diminuiu, cerca 26%, representando uma perda de 0,93 mg/g, em relação ao fruto fresco. No que diz respeito à amostra de Queirã (BQU) apresentava um valor de taninos totais de 5,92 mg/g no fruto congelado, representando um aumento de 60% em relação ao fruto fresco. Nas amostras BVV e BOH, e o teor de taninos totais foi maior no fruto congelado, 5,04 mg/g e 3,90 mg/g respetivamente.

Apesar das diferenças de taninos totais entre as amostras frescas e congeladas, os valores não apresentam diferenças significativas ( $p=0,054$ ).

## 5.6. Análise global dos resultados

Foram estabelecidas relações entre a composição físico-química dos mirtilos. Analisando a tabela 8 pode observar-se uma forte correlação negativa entre a acidez titulável e os sólidos solúveis totais, evidenciando a evolução inversa ao longo do amadurecimento, ou seja, à medida que o SST aumenta a acidez diminui. Outra das correlações moderadamente negativas se pode observar é entre a firmeza e os sólidos solúveis totais ( $r^2=-0,701$ ). Os resultados obtidos estão de acordo com Sousa *et al.* (2001) que obtiveram um  $r^2$  de -0,966.

Tabela 8: Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e os parâmetros físicos analisados.

	H	SST	AcT	Calibre	L*	a*	b*	firmeza	Elast.
H									
SST	0,130								
AcT	0,381	-0,658*							
Calibre	-0,429	-0,156	0,060						
L*	-0,156	0,059	-0,133	0,114					
a*	-0,164	-0,070	-0,307	-0,140	-0,463*				
b*	0,271	0,132	0,069	-0,249*	-0,911*	0,442*			
Firmeza	-0,103	-0,701	0,417	-0,116	-0,124**	0,146**	0,044		
Elast.	-0,063	-0,267	0,018	0,015	-0,208*	0,117	0,182*	0,404*	

\*Correlação significativa ( $p < 0.01$ ) \*\* Correlação significativa ( $p < 0,05$ )

Relativamente aos parâmetros colorimétricos, é ainda possível observar uma correlação fortemente negativa ( $r^2 = -0,911$ ) entre a coordenada  $b^*$  e a coordenada  $L^*$ . Assim a coloração azul da coordenada  $b^*$  parece contribuir de forma determinante para a luminosidade das bagas.

Com o objetivo de tentar estabelecer relações entre a composição em compostos fenólicos totais, as antocianinas, os taninos e a atividade antioxidante determinada pelos vários métodos, efetuaram-se várias correlações lineares, apresentadas na tabela 9.

Tabela 9: Coeficientes de Pearson para as correlações entre composição fenólica e atividade antioxidante.

	Fenóis	Antocianinas	Taninos	ABTS	FRAP
Antocianinas	0,576*				
Taninos	0,246*	0,144			
ABTS	0,919*	0,390*	0,259*		
FRAP	0,939*	0,658*	0,329*	0,902*	
DPPH	0,911*	0,389*	0,355*	0,961*	0,905*

\*Correlação significativa ( $p < 0.01$ )

A partir da análise da tabela 9, é possível afirmar que se verifica uma correlação fortemente positiva entre o teor de fenóis totais e a capacidade antioxidante medida dos mirtilos estudados em todos os testes realizados (0,919 no ABTS, 0,911 no DPPH e 0,939 no FRAP). Encontrou-se ainda uma boa correlação entre o teor de fenóis totais e as antocianinas totais ( $r^2=0,576$ ). Os resultados indicam assim, que as propriedades antioxidantes dos mirtilos se devem, em grande parte, à presença de compostos fenólicos. Estas correlações foram também verificadas por outros autores (Bunea *et al.*, 2011; Castrejón *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2011; Moyer *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2012a) para diferentes variedades de mirtilo, nomeadamente para a variedade Bluecrop.

Verifica-se igualmente a existência de correlações fortemente positivas entre todos os ensaios de atividade antioxidante efetuados, indiciando que os compostos envolvidos na atividade antioxidante dos mirtilos sejam maioritariamente os mesmos. No ensaio de FRAP, verifica-se ainda uma boa correlação com o teor de antocianinas ( $r^2=0,658$ ). Para os métodos DPPH e ABTS a correlação com o teor de antocianinas é baixa, inferior a 0,4. Connor *et al.* (2002c) obtiveram resultados semelhantes na cultivar Chippewa, onde a atividade antioxidante diminuía, sem que houvesse alterações no teor de antocianinas e fenóis.

Na tabela 10 está representada a correlação linear entre as variáveis idade da planta e altitude de produção e as características físico-químicas dos frutos analisadas.

Tabela 10: Correlação linear entre as variáveis idade da planta e altitude de produção e as características físico-químicas

	<b>Idade</b>	<b>Altitude</b>
<b>H</b>	0,518**	-0,284
<b>SST</b>	-0,560	0,622**
<b>AcT</b>	0,736*	0,262
<b>Calibre</b>	-0,084	0,099
<b>L*</b>	-0,534*	0,190*
<b>a*</b>	0,328*	-0,061
<b>b*</b>	0,451*	-0,226*
<b>Firmeza</b>	0,264*	0,327*
<b>Elasticidade</b>	0,190*	0,151**

\*Correlação significativa ( $p < 0,01$ )

\*\* Correlação significativa ( $p < 0,05$ )

É possível observar pela tabela que a idade da planta e a altitude de cultivo da mesma se correlacionam com alguns parâmetros analisados. Pode-se verificar correlações moderadamente positivas entre a idade da planta e a humidade ( $r^2=0,518$ ) e a AcT ( $r^2=0,736$ ). É igualmente possível observar a existência de correlações moderadamente negativas entre o teor em SST ( $r^2=-0,560$ ), a coordenada L\* ( $r^2=-0,534$ ) e a idade da planta. Estes valores sugerem que quanto mais velha a planta for, menos doces e mais escuras serão as bagas. Por sua vez, a altitude de produção das plantas apresenta uma correlação moderadamente positiva com o teor em SST ( $r^2=0,622$ ).

## V. CONCLUSÕES GERAIS



## 6. Conclusões

O trabalho desenvolvido teve por objetivo fazer um estudo comparativo das características físico-químicas, do teor de fenóis, antocianinas, taninos e atividade antioxidante em mirtilos da cultivar Bluecrop cultivados em modo de produção convencional, em 5 localidades de Portugal.

Os resultados obtidos mostraram que as amostras cultivadas em Estarreja e Queirã apresentaram teores de sólidos solúveis totais mais elevados, bem como um índice de maturação superior, comparativamente às outras amostras. Relativamente aos parâmetros de textura analisados também foram detetadas alterações significativas entre os locais, sendo que as amostras de Sever do Vouga e de Oliveira do Hospital apresentaram maior firmeza e elasticidade. Nos parâmetros colorimétricos, os mirtilos de Estarreja mostraram uma coloração azul mais intensa, e uma luminosidade superior.

A composição fenólica das amostras mostrou variações na quantidade e composição de acordo com a origem dos frutos. Os fenóis totais (58-74%) e as antocianinas (>96%) foram significativamente mais extraídos com metanol, quando comparado com a acetona/água. Por outro lado, os taninos foram obtidos de forma semelhante nos dois extratos, mostrando a presença de compostos de baixo e de elevada massa molecular.

O teor em fenóis totais variou entre 3,06 e 5,85 mg EAG/g fruto, o teor de antocianinas entre 0,54 e 0,96 mg EMv3Glc, e o teor de taninos totais variou entre 1,82 e 3,53 mg/g. No geral, as amostras provenientes de Estarreja e de Sever do Vouga eram as mais ricas nestes compostos, enquanto a amostra cultivada em Oliveira do Hospital obteve as quantidades mais baixas.

A atividade antioxidante foi determinada pelos métodos do DPPH, ABTS e FRAP. Apesar dos valores absolutos, em geral, a ordem de reatividade era semelhante, sendo que as amostras de Estarreja e de Sever do Vouga apresentavam os valores mais elevados. Pelos resultados, é possível concluir que a atividade antioxidante era fortemente influenciada teor em fenóis totais.

O armazenamento dos frutos a -20°C, durante seis meses originou aumentos ou diminuições do teor em fenóis totais e em taninos, de acordo com as amostras

analisadas. Relativamente à atividade antioxidante, as amostras apresentaram no final do tempo de congelação valores superiores aos frutos em fresco.

Os resultados deste trabalho permitem concluir que as características e composição dos mirtilos variam de acordo com as condições de produção. Os resultados comprovam igualmente uma boa adaptabilidade dos mirtilos *Vaccinium corymbosum* L., nomeadamente da cultivar Bluecrop às condições climáticas do nosso país, podendo ser considerados uma boa fonte de compostos bioativos, normalmente associados a efeitos benéficos para a saúde humana.

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Norma Portuguesa: NP 1421 Determinação da acidez, 1977. Official Methods of Analysis -A.O.A.C., 15th Edition, Kenneth, USA, 1990
- Akerstrom, A., Jaakola, L., Bang, U., Jaderlund, A., 2010. Effects of Latitude-Related Factors and Geographical Origin on Anthocyanidin Concentrations on Fruits of *Vaccinium Myrtillus* L. (Bilberries). *Journal of agricultural and food chemistry* 58, 11939–11945.
- Arancibia-Avila, P., Namiesnik, J., Toledo, F., Werner, E., Martinez-Ayala, A.L., Rocha-Guzmán, N.E., Gallegos-Infante, J.A., Gorinstein, S., 2012. The influence of different time durations of thermal processing on berries quality. *Food Control* 26, 587–593.
- Balk, J.M., Haenen, G.R.M.M., Koek, G.H., Bast, A., 2014. Beyond ORAC and TEAC : Plant Bioactive Components with Anti- Oxidative and Anti-Inflammatory Actions. *ISHS Acta Horticulturae* 1017, 279–286.
- Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P., 2004. *Food Chemistry*, 3<sup>a</sup> ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Benzie, I.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry* 239, 70–6.
- Benzie, I.F., Wachtel-Galor, S., 2013. Bioavailability of Antioxidant Compounds from Fruits, in: Skinner, M., Hunter, D. (Eds.), *Bioactives in Fruit: Health Benefits and Functional Foods*. WILEY Blackwell, India, pp. 35–54.
- Boulton, R., 2001. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture* 52, 67–87.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28, 25–30.
- Bryla, D.R., 2011. Crop Evapotranspiration and Irrigation Scheduling in Blueberry, in: Gerosa, G. (Ed.), *Evapotranspiration - From Measurements to Agricultural and Environmental Applications*. InTech, pp. 167–186.
- Bunea, A., Rugină, D., Sconța, Z., Pop, R.M., Pinteș, A., Socaciu, C., Tăbăran, F., Grootaert, C., Struijs, K., VanCamp, J., 2013. Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells. *Phytochemistry* 95, 436–44.

- Bunea, A., Rugină, D.O., Pinte, A.M., Sconța, Z., Bunea, C.I., Socaciu, C., 2011. Comparative polyphenolic content and antioxidant activities of some wild and cultivated blueberries from Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 39, 70–76.
- Burritt, D.J., 2013. The Influence of Pre- and Postharvest Environmental Stress on Fruit Bioactives, in: Skinner, M., Hunter, D. (Eds.), *Bioactives in Fruit: Health Benefits and Functional Foods*. WILEY Blackwell, India, pp. 409–421.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M.D.L., Páez-Hernández, M.E., Rodríguez, J. a., Galán-Vidal, C.A., 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* 113, 859–871.
- Castrejón, A.D.R., Eichholz, I., Rohn, S., Kroh, L.W., Huyskens-Keil, S., 2008. Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry* 109, 564–572.
- Cheynier, V., 2006. Flavonoids in Wine, in: Andersen, Ø.M., Markham, K.R. (Eds.), *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*. Taylor & Francis Group, USA, pp. 263–306.
- Chiabrando, V., Giacalone, G., Rolle, L., 2009. Mechanical behaviour and quality traits of highbush blueberry during postharvest storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89, 989–992.
- Connor, A.M., Luby, J.J., Hancock, J.F., Berkheimer, S., Hanson, E.J., 2002a. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. *Journal of agricultural and food chemistry* 50, 893–8.
- Connor, A.M., Luby, J.J., Tong, C.B.S., 2002b. Variation and Heritability Estimates for Antioxidant Activity, Total Phenolic Content, and Anthocyanin Content in Blueberry Progenies. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127, 82–88.
- Connor, A.M., Luby, J.J., Tong, C.B.S., 2002c. Variability in Antioxidant Activity in Blueberry and Correlations among Different Antioxidant Activity Assays. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127, 238–244.
- Connor, A.M., Luby, J.J., Tong, C.B.S., Finn, C.E., Hancock, J.F., 2002d. Genotypic and Environmental Variation in Antioxidant Activity, Total Phenolic Content, and Anthocyanin Content among Blueberry Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127, 89–97.
- Contessa, C., Mellano, M.G., Beccaro, G.L., Giusiano, A., Botta, R., 2013. Total antioxidant capacity and total phenolic and anthocyanin contents in fruit species grown in Northwest Italy. *Scientia Horticulturae* 160, 351–357.

- Crozier, A., Clifford, M., Rio Del, D., 2012. Bioavailability of Dietary Monomeric and Polymeric Flavan-3-ols, in: SPENCER, J.P.E., CROZIER, A. (Eds.), FLAVONOIDS AND RELATED COMPOUNDS: Bioavailability and Function. CRC Press, USA, pp. 47–56.
- Curtis's Botanical Magazine, vol. 62, 1835. URL [http://botanicalillustrations.org/illustration.php?id\\_illustration=10472](http://botanicalillustrations.org/illustration.php?id_illustration=10472) (accessed 06.02.2015).
- Deighton, N., Brennan, R., Finn, C., Davies, H. V, 2000. Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1307–1313.
- Demchak, K., 2013. The Mid-Atlantic Berry Guide: for Commercial Growers, in: Kirsten, A. (Ed.), . The Pennsylvania State University, pp. 115–170.
- Dias, C., 2011. Avaliação de taninos condensados , antocianinas e precursores de aroma ao longo da maturação em castas tintas : efeito da altitude da vinha. Instituto Superior de Agronomia.
- Díaz, P., Henríquez, O., Enrione, J., Matiacevich, S., 2011. Thermal transitions of pulp and cuticle of blueberries. *Thermochimica Acta* 525, 56–61.
- Dragovic-Uzelac, V., Savic, Z., Brala, A., Levaf, B., 2010. Evaluation of Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Blueberry Cultivars (*Vaccinium corymbosum* L .) Grown in the Northwest Croatia. *Food Technology and Biotechnology* 48, 214–221.
- Ehlenfeldt, M.K., Prior, R.L., 2001. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 2222–2227.
- Eichholz, I., Huyskens-Keil, S., Keller, A., Ulrich, D., Kroh, L.W., Rohn, S., 2011. UV-B-induced changes of volatile metabolites and phenolic compounds in blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chemistry* 126, 60–64.
- Eichholz, I., Huyskens-Keil, S., Rohn, S., 2015. Blueberry phenolic compounds: Fruit maturation, ripening and pos-harvest effects, in: Preedy, V.R. (Ed.), *Processing and Impact on Active Components in Food*. Academic press, USA, pp. 173–180.
- Eichholz, I., Rohn, S., Kroh, L.W., 2007. Influence of location and fertilization on antioxidant activity in highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality* 44, 41–44.
- Elks, C., Francis, J., Stull, A., Cefalu, W.T., Shukitt-Hale, B., Ingram K., D., 2013. Overview of the Health Properties of Blueberries, in: Skinner, M., Hunter, D. (Eds.), *Bioactives in Fruit: Health Benefits and Functional Foods*. WILEY Blackwell, India, pp. 251–268.

- FAOSTAT, 2015. URL <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (accessed 06.02.2015).
- Ferreira, D., Guyot, S., Marnet, N., Delgadillo, I., Renard, C.M.G.C., Coimbra, M. a., 2002. Composition of phenolic compounds in a Portuguese pear (*Pyrus communis* L. var. S. Bartolomeu) and changes after sun-drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 4537–4544.
- Fira, A., Clapa, D., Badescu, C., 2008. Aspects regarding the in vitro propagation of highbush blueberry cultivar bluecrop. *Horticulture* 65, 104–109.
- Fonseca, L.L., Oliveira, P.B., 2007. A planta de mirtilo: morfologia e fisiologia [WWW Document]. *Divulgação Agro* 556 n° 2. URL [http://www.iniav.pt/fotos/gca/2\\_a\\_planta\\_de\\_mirtilo\\_morfologia\\_e\\_fisiologia\\_1369130315.pdf](http://www.iniav.pt/fotos/gca/2_a_planta_de_mirtilo_morfologia_e_fisiologia_1369130315.pdf)
- Forney, C.F., Kalt, W., Jordan, M.A., Vinqvist-Tymchuk, M.R., Fillmore, S.A.E., 2012. Blueberry and cranberry fruit composition during development. *Journal of Berry Research* 2, 169–177.
- Fracassetti, D., Del Bo', C., Simonetti, P., Gardana, C., Klimis-Zacas, D., Ciappellano, S., 2013. Effect of Time and storage temperature on anthocyanin decay and antioxidant activity in wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) powder. *Journal of agricultural and food chemistry* 61, 2999–3005.
- Fu, L., Xu, B.-T., Xu, X.-R., Gan, R.-Y., Zhang, Y., Xia, E.-Q., Li, H.-B., 2011. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry* 129, 345–350.
- Gavrilova, V., Kajdzanoska, M., Gjamovski, V., Stefova, M., 2011. Separation, characterization and quantification of phenolic compounds in blueberries and red and black currants by HPLC-DAD-ESI-MSn. *Journal of agricultural and food chemistry* 59, 4009–18.
- Giongo, L., Poncetta, P., Loretto, P., Costa, F., 2013. Texture profiling of blueberries (*Vaccinium* spp.) during fruit development, ripening and storage. *Postharvest Biology and Technology* 76, 34–39.
- Giovanelli, G., Buratti, S., 2009. Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. *Food Chemistry* 112, 903–908.
- Gnanavinthan, A., 2013. Introduction to the Major Classes of Bioactives Present in Fruit, in: Skinner, M., Hunter, D. (Eds.), *Bioactives in Fruit: Health Benefits and Functional Foods*. WILEY Blackwell, India, pp. 1–18.

- Graneli, G., Mariani, L., Parisi, S., Eccher, T., 2012. Influence of Genotype , Location and Year Factors on Quality and Health Promoting Compounds of Rubus Fruits. International Society for Horticultural Science (ISHS) - Acta Horticulturae 926, 697–704.
- Gündüz, K., Serçe, S., Hancock, J.F., 2015. Variation among highbush and rabbiteye cultivars of blueberry for fruit quality and phytochemical characteristics. Journal of Food Composition and Analysis 38, 69–79.
- Hancock, J., Callow, P., Serçe, S., Hanson, E., Beaudry, R., 2008. Effect of cultivar, Controlled Atmosphere Storage, and Fruit Ripeness on the Long-term Storage of Highbush Blueberries. HortTechnology 18, 199–205.
- Hancock, J.F., Lyrene, P., Finn, C.E., Vorsa, N., Lobos, G.A., 2008. Blueberries and Cranberries, in: Hancock, J.F. (Ed.), Temperate Fruit Crop Breeding - Germplasm to Genomics. Springer, USA, pp. 115–141.
- Howard, L.R., Clark, J.R., Brownmiller, C., 2003. Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. Journal of the Science of Food and Agriculture 83, 1238–1247.
- Howard, L.R., Prior, R.L., Liyanage, R., Lay, J.O., 2012. Processing and storage effect on berry polyphenols: challenges and implications for bioactive properties. Journal of agricultural and food chemistry 60, 6678–93.
- INE, 2014. Estatísticas Agrícolas 2013. Estatísticas Oficiais. URL [http://www.ine.pt/ngt\\_server/attachfileu.jsp?look\\_parentBoui=219238096&att\\_display=n&att\\_download=y](http://www.ine.pt/ngt_server/attachfileu.jsp?look_parentBoui=219238096&att_display=n&att_download=y) (accessed 01.12.2015).
- Ireland, G., Wilk, P., 2006. Blueberry production in northern NSW. Primefact 195, 1–8.
- Jaakola, L., Hohtola, A., 2010. Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. Plant, cell & environment 33, 1239–47.
- Jimenez-Garcia, S.N., Guevara-Gonzalez, R.G., Miranda-Lopez, R., Feregrino-Perez, A.A., Torres-Pacheco, I., Vazquez-Cruz, M.A., 2012. Functional properties and quality characteristics of bioactive compounds in berries: Biochemistry, biotechnology, and genomics. Food Research International 54, 1195–1207.
- Kalt, W., 2005. Effects of Production and Processing Factors on Major Fruit and Vegetable Antioxidants. Journal of food science 70.
- Kalt, W., Howell, A., Duy, J.C., Forney, C.F., Mcdonald, J.E., 2001. Horticultural Factors Affecting Antioxidant Capacity of Blueberries and other Small Fruit. HortTechnology 11, 523–528.

- Kalt, W., Lawand, C., Ryan, D.A.J., Island, P.E., Canada, C.A., McDonald, J.E., Donner, H., Forney, C.F., 2003. Oxygen Radical Absorbing Capacity , Anthocyanin and Phenolic Content of Highbush Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) during Ripening and Storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128, 917–923.
- Kim, J.G., Kim, H.L., Kim, S.J., Park, K.-S., 2013. Fruit quality, anthocyanin and total phenolic contents, and antioxidant activities of 45 blueberry cultivars grown in Suwon, Korea. *Journal of Zhejiang University. Science. B* 14, 793–799.
- Koca, I., Karadeniz, B., 2009. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. *Scientia Horticulturae* 121, 447–450.
- Krüger, E., Josuttis, M., 2014. Effects of Growing and Climate Conditions on Berry Yield and Nutritional Quality. *Acta Horticulture* 1017, 351–362.
- Lohachoompol, V., Mulholland, M., Srzednicki, G., Craske, J., 2008. Determination of anthocyanins in various cultivars of highbush and rabbiteye blueberries. *Food Chemistry* 111, 249–254.
- Madeira, B., 2013. Requisitos de frio de pequenos frutos. *Agrotec - Pequenos Frutos* 17–19.
- Magalhães, L., Segundo, M., Siquet, C., Reis, S., Lima, J., 2005. Determinação e aplicação de uma metodologia automática para determinação da capacidade antioxidante em alimentos, in: 7<sup>o</sup> Encontro de Química Dos Alimentos. Viseu.
- Matiacevich, S., Silva, P., Enrione, J., Osorio, F., 2011. Quality assessment of blueberries by computer vision. *Procedia Food Science* 1, 421–425.
- McGhie, T.K., Walton, M.C., 2007. The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Molecular nutrition & food research* 51, 702–13.
- Moon, J., Shibamoto, T., 2009. Antioxidant Assays for Plant and Food Components Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 1655–1666.
- Moyer, R.A., Hummer, K.E., Finn, C.E., Frei, B., Wrolstad, R.E., 2002. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: vaccinium, rubus, and ribes. *Journal of agricultural and food chemistry* 50, 519–25.
- Ngo, T., Wrolstad, R.E., Zhao, Y., 2007. Color quality of Oregon strawberries--impact of genotype, composition, and processing. *Journal of food science* 72, C025–32.

- Norberto, S., Silva, S., Meireles, M., Faria, A., Pintado, M., Calhau, C., 2013. Blueberry anthocyanins in health promotion: A metabolic overview. *Journal of Functional Foods* 5, 1518–1528.
- Nunez, M.F., Magnuson, B.A., 2014. Anthocyanins in Health and Disease Prevention, in: Wallace, T., Giusti, M. (Eds.), *Anthocyanins in Health and Disease*. CRC Press, USA, pp. 1–12.
- Oancea, S., Stoia, M., Coman, D., 2012. Effects of Extraction Conditions on Bioactive Anthocyanin Content of *Vaccinium Corymbosum* in the Perspective of Food Applications. *Procedia Engineering* 42, 489–495.
- Ochmian, I., Grajkowski, J., Skupień, K., 2009. Influence of substrate on yield and chemical composition of highbush blueberry cv. Sierra. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 17, 89–100.
- Oliveira, P.F.M., 2012. Influência dos fatores ambientais , de produção e do grau de amadurecimento nas propriedades antioxidantes e antimutagénicas de diferentes cultivares de *Vaccinium* spp , produzidas em Portugal. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar. Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, Portugal.
- Pallas, L. a, Pegg, R.B., Kerr, W.L., 2013. Quality factors, antioxidant activity, and sensory properties of jet-tube dried rabbiteye blueberries. *Journal of the science of food and agriculture* 93, 1887–97.
- Paredes-López, O., Cervantes-Ceja, M.L., Vigna-Pérez, M., Hernández-Pérez, T., 2010. Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life--a review. *Plant foods for human nutrition* 65, 299–308.
- Parente, C., Oliveira, P., Oliveira, C., 2013. Produção precoce e tardia de Mirtilo em substrato. *Pequenos Frutos - Agrotec* n° 5 20–22.
- Pascual-Teresa, S., Moreno, D.A., García-Viguera, C., 2010. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *International journal of molecular sciences* 11, 1679–1703.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M., 2003. *Antioxidants in Food - Practical applications*. CRC Press, Inglaterra.
- Prior, R., Wu, X., Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4290–4302.
- Prior, R.L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., Mcewen, J., Brien, C.O., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G., Mainland, C.M., 1998. Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content , Maturity , and

- Variety of *Vaccinium* Species. *Journal of agricultural and food chemistry* 46, 2686–2693.
- Prodorutti, D., Pertot, I., Giongo, L., Gessler, C., 2007. Highbush Blueberry: Cultivation, Protection, Breeding and Biotechnology. *Journal of Plant Science and Biotechnology* 1, 44–56.
- Rasteiro, E.M.N., 2012. Avaliação das propriedades antioxidantes e antimutagénicas de diferentes cultivares de *Vaccinium* spp., do grupo “Southern Highbush”, produzidas em Portugal. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar. Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, Portugal.
- Ratnaparkhe, M.B., 2007. Blueberry, in: Kole, C. (Ed.), *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants: Fruits and Nuts*. Springer, Heidelberg, Germany, pp. 217–224.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL. *Free radical biology & medicine* 26, 1231–1237.
- Rein, M., 2005. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Dissertação apresentada à Universidade de Helsinquia.
- Remberg, S.F., Måge, F., Haffner, K., 2007. Highbush Blueberries *Vaccinium corymbosum* L., Raspberries *Rubus idaeus* L. and Black Currants *Ribes nigrum* L. - Influence of Cultivar on Antioxidant Activity and Other Quality Parameters. *ISHS Acta Horticulturae* 744, 259–266.
- Remberg, S.F., Rosenfeld, H.J., Haffner, K., Grønnerød, K., Lea, P., 2006. Characterization of Quality Parameters of Highbush Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) Cultivars. *ISHS Acta Horticulturae* 715, 559–565.
- Reque, P.M., Steffens, R.S., Jablonski, A., Flôres, S.H., Rios, A.D.O., de Jong, E. V., 2014. Cold storage of blueberry (*Vaccinium* spp.) fruits and juice: Anthocyanin stability and antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis* 33, 111–116.
- Retamales, J.B., Hancock, J.F., 2012. *Blueberries*, 1<sup>a</sup> ed. CAB International, Cambridge.
- Retamales, J.B., Mena, C., Lobos, G., Morales, Y., 2015. A regression analysis on factors affecting yield of highbush blueberries. *Scientia Horticulturae* 186, 7–14.
- Ribera, A.E., Alberdi, M., Zuñiga, G.E., Mora, M.L., 2006. Antioxidant compounds in skin and pulp of fruits change among genotypes and maturity stages in Highbush Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) grown in southern Chile. *Journal of soil science plant nutrition* 509–536.

- Ribereau-Gayon, P., Stonestreet, E., 1966. Ribereau-Gayon, P.; Stonestreet, E. (1966). Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chimie Analytique* 48, 188–196.
- Rodriguez-Mateos, A., Cifuentes-Gomez, T., Tabatabaee, S., Lecras, C., Spencer, J.P.E., 2011. Procyanidin, anthocyanin, and chlorogenic Acid contents of highbush and lowbush blueberries. *Journal of agricultural and food chemistry* 60, 5772–8.
- Sadilova, E., Carle, R., Stintzing, F.C., 2007. Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Molecular nutrition & food research* 51, 1461–71.
- Saftner, R., Polashock, J., Ehlenfeldt, M., Vinyard, B., 2008. Instrumental and sensory quality characteristics of blueberry fruit from twelve cultivars. *Postharvest Biology and Technology* 49, 19–26.
- Sams, C.E., 1999. Preharvest factors affecting postharvest texture. *Postharvest Biology and Technology* 15, 249–254.
- Scalzo, J., Politi, A., Pellegrini, N., Mezzetti, B., Battino, M., 2005. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition* 21, 207–13.
- Scalzo, J., Stevenson, D., Hedderley, D., 2013. Blueberry estimated harvest from seven new cultivars: fruit and anthocyanins. *Food chemistry* 139, 44–50.
- Seeram, N.P., Adams, L.S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H.S., Heber, D., 2006. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry* 54, 9329–39.
- Sequeiros, R., 2009. Aplicação de novas metodologias analíticas no estudo de compostos fenólicos em matrizes alimentares. Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Química. Universidade de Lisboa - Faculdade de Ciências. Lisboa, Portugal. doi:06-09-2014
- Shahidi, F., Naczk, M., 2004. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. CRC Press, USA.
- Silva, J.L., Marroquin, E., Matta, F.B., Garner, J.O., Stojanovic, J., 2005. Physicochemical, carbohydrate and sensory characteristics of highbush and rabbiteye blueberry cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 1815–1821.
- Singleton, V., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152–178.

- Slinkard, K., Singleton, V., 1977. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 28, 49–55.
- Sobral, A., 2012. Efeito do solvente nas propriedades antioxidantes e no conteúdo em compostos fenólicos de extratos de frutos e folhas de *Rubus*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biológica. Universidade do Algarve. Faro, Portugal.
- Sousa, M., Curado, T., Vieira, S., 2001. Características físicas, químicas e sensoriais de cultivares de mirtilo (*Vaccinium* sp) introduzidas em Portugal. Atas 5º Encontro de Química de Alimentos: Qualidade, Segurança, Inovação 1, 349–351.
- Sousa, M.B., Curado, T., Vasconcelos, F., Trigo, M.J., 2007. Mirtilo - Qualidade pós-colheita. *Divulgação Agro* 556 n° 8. URL [http://www.inia.pt/fotos/gca/8\\_mirtilo\\_qualidade\\_pos\\_colheita\\_1369137340.pdf](http://www.inia.pt/fotos/gca/8_mirtilo_qualidade_pos_colheita_1369137340.pdf)
- Srivastava, A., 2006. Effect of storage conditions on phenolic compounds and antioxidant activity of blueberry extract and the effect of anthocyanins from selected cultivars of georgia-grown blueberries on apoptosis and phase-II enzymes. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Ciências. University of Delhi, India.
- Srivastava, A., Akoh, C.C., Yi, W., Fischer, J., Krewer, G., 2007. Effect of storage conditions on the biological activity of phenolic compounds of blueberry extract packed in glass bottles. *Journal of agricultural and food chemistry* 55, 2705–13.
- Strik, B., 2014. Organic blueberry production systems: advances in research and industry. *Acta Horticulture* 1017, 257–268.
- Strik, B., Buller, G., 2014. Nitrogen Fertilization Rate, Sawdust Mulch and Pre-Plant incorporation of Sawdust - Long-term Impact on Yield, Fruit Quality and Soil and Plant Nutrition in “Elliott.” *ISHS Acta Horticulturae* 1017, 269–275.
- Strik, B.C., 2012. Flowering and Fruiting on Command in Berry Crops. *ISHS Acta Horticulturae* 926, 197–214.
- Syamaladevi, R.M., Andrews, P.K., Davies, N.M., Walters, T., Sablani, S.S., 2012. Storage effects on anthocyanins, phenolics and antioxidant activity of thermally processed conventional and organic blueberries. *Journal of the science of food and agriculture* 92, 916–24.
- Tasa, T., Starast, M., Vool, E., Moor, U., Karp, K., 2012. Influence of soil type on half-highbush blueberry productivity. *Agricultural and Food Science* 21, 409–420.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Hawkins Byrne, D., 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating

- antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 669–675.
- Türkmen, I., Eksi, A., 2011. Brix degree and sorbitol/xylitol level of authentic pomegranate (*Punica granatum*) juice. *Food Chemistry* 127, 1404–1407.
- USDA - National Nutrient Database for Standard Reference, 2010. URL <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2215?fg=&man=&facet=&format=&count=&max=25&offset=&sort=&qlookup=blueberry> (accessed 16.02.2015).
- Wang, S.Y., Camp, M.J., Ehlenfeldt, M.K., 2012a. Antioxidant capacity and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (*Vaccinium* spp.) cultivars. *Food Chemistry* 132, 1759–1768.
- Wang, S.Y., Chen, C.-T., Sciarappa, W., Wang, C.Y., Camp, M.J., 2008. Fruit quality, antioxidant capacity, and flavonoid content of organically and conventionally grown blueberries. *Journal of agricultural and food chemistry* 56, 5788–94.
- Wang, S.Y., Chen, H., Camp, M.J., Ehlenfeldt, M.K., 2012b. Flavonoid constituents and their contribution to antioxidant activity in cultivars and hybrids of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade). *Food Chemistry* 132, 855–864.
- Xie, Z., Wu, X., 2009. Studies on Substrates for Blueberry Cultivation. *ISHS Acta Horticulturae* 810, 513–520.
- Yang, W.Q., Harpole, J., Finn, C.E., Strik, B.C., 2009. Evaluating Berry Firmness and Total Soluble Solids of Newly Released Highbush Blueberry Cultivars. *International Society for Horticultural Science (ISHS) - Acta Horticulturae* 810, 863–868.
- Yi, W., Fischer, J., Krewer, G., Akoh, C.C., 2005. Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *Journal of agricultural and food chemistry* 53, 7320–9.
- You, Q., Wang, B., Chen, F., Huang, Z., Wang, X., Luo, P.G., 2011. Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars. *Food Chemistry* 125, 201–208.
- Yousef, G.G., Brown, A.F., Funakoshi, Y., Mbeunkui, F., Grace, M.H., Ballington, J.R., Loraine, A., Lila, M.A., 2013. Efficient Quantification of the Health-Relevant Anthocyanin and Phenolic Acid Profiles in Commercial Cultivars and Breeding Selections of Blueberries (*Vaccinium* spp.). *Journal of agricultural and food chemistry* 61, 4806–4815.
- Yuan, W., Zhou, L., Deng, G., Wang, P., Creech, D., Li, S., 2011. Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity of *Vaccinium* L. in Texas, USA. *Pharmaceutical Crops* 2, 11–23.

