

Bio-valorização de resíduos de *Cryptomeria japonica* por obtenção do óleo essencial e de extratos orgânicos e determinação das suas propriedades biológicas

Dissertação de Mestrado

Filipe Martim Pacheco Arruda

Mestrado em

Ambiente, Saúde e Segurança



Bio-valorização de resíduos de *Cryptomeria japonica* por obtenção do óleo essencial e de extratos orgânicos e determinação das suas propriedades biológicas

Dissertação de Mestrado

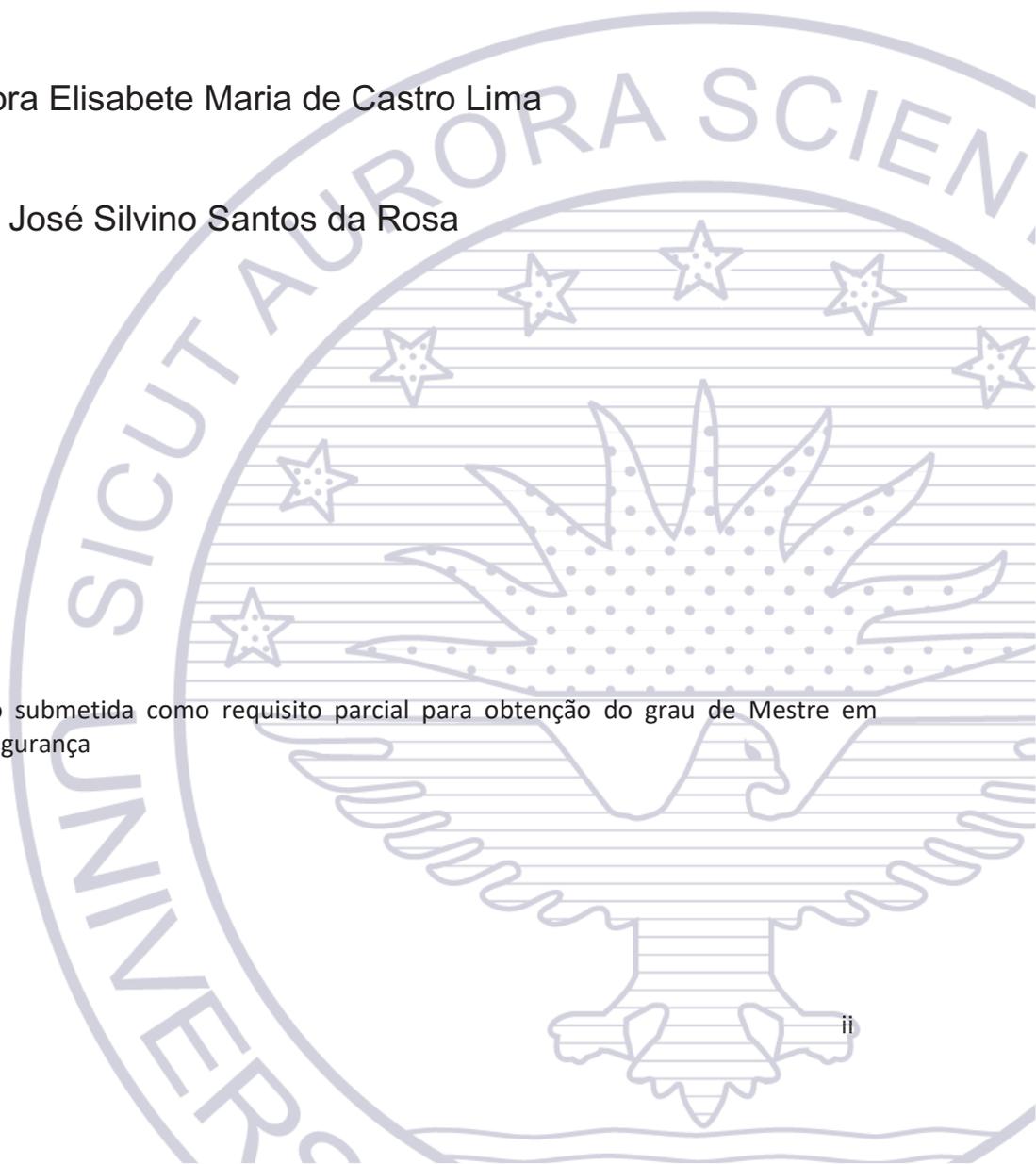
Filipe Martim Pacheco Arruda

Orientadores

Professora Doutora Elisabete Maria de Castro Lima

Professor Doutor José Silvino Santos da Rosa

Dissertação de Mestrado submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ambiente, Saúde e Segurança



Agradecimentos

A realização desta tese não teria sido possível sem a essencial contribuição e disponibilidade de diversas pessoas que merecem a minha especial consideração. A todos os que estiveram presentes e sempre apoiaram a realização deste trabalho, direta ou indiretamente, expresso aqui o meu sincero agradecimento.

À minha orientadora, Professora Doutora Elisabete Maria de Castro Lima, deixo uma palavra de estima e admiração, por me ter confiado a realização desta tese, pelos seus incansáveis esforços e pela transmissão de um vasto conhecimento, brio e rigor científico que me foram essenciais para a conclusão desta tese.

Ao meu orientador, Professor Doutor José Silvino Santos da Rosa, deixo o meu sincero agradecimento, por ter estado sempre presente e me ter acompanhado de perto na realização dos ensaios. A sua disponibilidade, conselhos e saber foram essenciais para a realização desta tese.

À Doutora Maria Luísa Oliveira, pelo seu contributo na análise estatística.

À coordenadora do mestrado, Professora Doutora Maria da Anunciação Ventura pela prontidão com que com que respondeu a questões de funcionamento do mestrado e pelas suas recomendações.

Ao meu grande amigo Rafael Martins, pelos inúmeros momentos de descontração, apoio e amizade.

Aos meus amigos e colegas de laboratório Ana Rodrigues, Ana Rita Sousa, Jorge Frias e Tiago Paiva por todo o apoio demonstrado e amizade.

À minha família, em particular aos meus pais e irmã, por terem sido o meu porto de abrigo durante todo o meu percurso académico. Obrigado pelo vosso apoio incondicional.

Resumo

Na presente tese foram avaliadas, pela primeira vez, algumas propriedades biológicas (moluscicida contra *Radix peregra*, toxicidade em *Artemia salina*, bactericidas, fungicidas e antioxidantes) do óleo essencial (OE) e de extratos orgânicos obtidos da ramada de *Criptomeria japonica* oriunda de São Miguel (Açores, Portugal), de modo a contribuir para a valorização da biomassa florestal açoriana. O OE foi extraído por dois processos de destilação diferentes, hidrodestilação (OE-hd) e arraste de vapor (OE-av), e os extratos orgânicos foram obtidos por extração por Soxhlet, usando sequencialmente solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano e metanol), e por maceração a frio com acetona. Todos os extratos apresentaram duas fases físicas diferentes, pelo que foram fracionados, obtendo-se assim 8 amostras de extratos.

Relativamente à atividade moluscicida sobre *R. peregra*, um caracol de água doce europeu e hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* (agente causador da fasciolose), os OEs e extratos foram testados a dose única contra adultos, juvenis e ovos. As amostras OE-hd, OE-av e extrato de acetona-fração sólida (Acet-s) demonstraram ser fortemente ativas contra os juvenis e os ovos à concentração de 30 ppm e contra os adultos à concentração de 100 ppm. Subsequentemente, os parâmetros tempo e dose dependentes foram avaliados nos adultos para determinar os valores letais ($DL_{50;90}$ e $TL_{50;90}$). As DL_{50} obtidas variaram de 33,3 a 64,71 ppm, com o OE-av exibindo a atividade moluscicida mais significativa. Relativamente ao ensaio tempo-dependente, o OE-av, o OE-hd e o Acet-s foram os tratamentos mais eficazes quando testados em exposição contínua (TL_{50} a 100 ppm = 20,8, 21,8 e 24,1 h, respetivamente).

No respeitante ao ensaio em *A. salina*, as DL_{50} obtidas variaram de 97,7 a 344,5 ppm, com o OE-av exibindo a maior toxicidade.

A atividade antimicrobiana foi determinada contra as bactérias *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus* e *Bacillus subtilis* e contra o fungo *Penicillium* spp.. De entre os tratamentos realizados, apenas o OE-av apresentou atividade antimicrobiana contra todos os micróbios

(halos de inibição entre 7 a 21 mm), sendo que apenas os OEs apresentaram atividade antifúngica.

Relativamente às propriedades antioxidantes, os extratos de acetona-fração sólida (Acet-s), metanol-fração resinosa (MeOH-r) e diclorometano-fração resinosa (Dcm-r) foram os que apresentaram maior teor de polifenóis totais (TPT) com 85,3, 84,4 e 83,6 mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/g amostra seca, respectivamente, e capacidade de sequestrar o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) com EC_{50} de 0,17, 0,18 e 0,18 mg EAG/g amostra seca, respectivamente. Quanto à capacidade protetora do ADN contra os danos causados pelos radicais hidroxilo, o OE-hd e todos os extratos (à exceção do extrato acetona-fração oleosa) demonstraram possuir uma boa atividade antioxidante.

O presente estudo revela o potencial de *C. japonica* como fonte natural de moléculas biomoluscidas, antimicrobianas e antioxidantes, com potenciais aplicações nas indústrias farmacêutica, alimentar, agroquímica e de cosméticos.

Palavras-chave: valorização de resíduos, *Cryptomeria japonica*, óleo essencial, extratos orgânicos, antioxidante, antibacteriano, antifúngico, biomoluscida, indústria farmacêutica, agroquímica.

Abstract

In the present thesis, some biological properties (molluscicide against *Radix peregra*, toxicity in *Artemia salina*, antibacterial, fungicide and antioxidant) of the essential oil (EO) and of organic extracts obtained from *Criptomeria japonica* leaves and stems from São Miguel (Azores, Portugal), in order to contribute to the valorization of Azorean forest biomass. The EO was extracted by two different distillation processes, hydrodistillation (EO-hd) and steam-distillation (EO-sd), and the organic extracts were obtained by Soxhlet extraction, sequentially using increasing polarity solvents (hexane, dichloromethane and methanol), and by cold maceration with acetone. All the extracts presented two different physical phases, reason why they were fractionated, thus obtaining 8 samples of extracts.

Regarding the molluscicidal activity on *R. peregra*, an European freshwater snail and a susceptible intermediate host of *Fasciola hepatica* (the causing agent of fascioliasis), the EOs and extracts were first screened through a single-dose assay against adults, juveniles and eggs. EO-hd, EO-sd and acetone-solid fraction (Acet-s) were highly active towards juveniles and eggs at 30 ppm and adults at 100 ppm. Subsequently, time and dose-dependent parameters were evaluated on adults snails in order to determine lethal values ($LC_{50;90}$ and $LT_{50;90}$). The obtained LC_{50} varied from 33.3 to 64.71 ppm, with the EO-av exhibiting the most significant molluscicidal activity. For the time-dependent assay, OE-av, OE-hd and Acet-s were the most effective treatments when tested under continuous exposure (TL_{50} at 100 ppm = 20.8, 21.8 and 24.1 h, respectively). EO-sd, EO-hd and Acet-s were the most time-effective treatments when assessed by by continuous exposure (LT_{50} at 100 ppm = 20.8, 21.8 and 24.1 h, respectively).

Regarding the brine shrimp lethality assay with *A. salina*, the LC_{50} obtained ranged from 97.7 to 344.5 ppm, with the EO-sd exhibiting the highest toxicity.

Antimicrobial activity was determined against the bacteria *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus* and *Bacillus subtilis* and against the fungus *Penicillium* spp.. Of the treatments tested, only EO-sd showed antimicrobial activity against all microbes (inhibition halos varied from 7 to 21 mm), whereas only the EOs presented antifungal activity.

Regarding antioxidant properties, the acetone-solid fraction (Acet-s), the methanol-resinous fraction (MeOH-r) and the dichloromethane-resinous fraction (Dcm-r) were the extracts who exhibited higher total polyphenols content (TPT) with 85.3, 84.4 and 83.6 mg gallic acid equivalent GAE/g dry sample, respectively, and higher scavenging capacity of the radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) with EC₅₀ of 0.17, 0.18 e 0.18 mg GAE/g dry sample, respectively. EO-hd and extracts (except acetone-oil fraction), showed to have good DNA protecting ability against damage caused by hydroxyl radicals.

The present study uncovers the potential of *C. japonica* as a natural source of biomolluscicidal, antimicrobial and antioxidant molecules, with potential applications in the pharmaceutical, food, agrochemical and cosmetic industries.

Keywords: Residues valorization, *Cryptomeria japonica*, essential oil, antioxidant, organic extracts, antioxidant, antibacterial, antifungal, biomolluscicide, pharmaceutical industry, agrochemistry.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	vi
Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos.....	x
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tabelas.....	xv
1. Introdução.....	1
1.1 Enquadramento.....	1
1.2 Objetivos gerais e específicos.....	3
1.3 Contribuição científica.....	4
1.4 Estrutura da tese.....	5
2. Revisão bibliográfica.....	5
2.1 Metabolitos primários e secundários.....	5
2.2 Os produtos naturais como fonte de fármacos e de biopesticidas.....	10
2.3 <i>Cryptomeria japonica</i> (Thunb. ex L. f.) D. Don.....	13
2.4 Fasciolose.....	16
3. Materiais e Métodos.....	19
3.1 Material vegetal.....	19
3.1.1 Recolha e preparação do material vegetal.....	19
3.1.2 Extração dos óleos essenciais.....	20
3.1.3 Obtenção dos extratos orgânicos.....	22
3.2 Material biológico.....	25
3.2.1 <i>Radix peregra</i> (adultos, juvenis e ovos).....	25
3.2.2 <i>Artemia salina</i>	26
3.2.3 Microorganismos.....	26
3.2.3.1 Bactérias.....	26
3.2.3.2 Fungos.....	27
3.3 Bioensaios para determinação de propriedades biocidas.....	28
3.3.1 Atividade moluscicida.....	28
3.3.1.1 Ensaio triagem dose-única sobre adultos.....	28
3.3.1.2 Determinação da Dose Letal 50 e 90 (DL ₅₀ e DL ₉₀).....	29
3.3.1.3 Determinação do Tempo Letal 50 e 90 (TL ₅₀ e TL ₉₀).....	29
3.3.1.4 Ensaio triagem dose-única sobre juvenis.....	30
3.3.1.5 Atividade ovicida.....	30
3.3.2 Toxicidade em <i>Artemia salina</i>	31
3.3.3 Atividade antimicrobiana.....	32
3.3.3.1 Atividade antibacteriana.....	32
3.3.3.2 Atividade antifúngica.....	32
3.4 Ensaios para determinação de propriedades antioxidantes.....	33
3.4.1 Determinação do teor de polifenóis totais (TPT).....	33
3.4.2 Teste da capacidade de sequestrar o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).....	34
3.4.3 Ensaio de proteção <i>in vitro</i> do ADN.....	36
3.5 Análise da composição química dos óleos essenciais por cromatografia gasosa (GC) e por cromatografia gasosa/espetrometria de massa (GC/MS).....	37
3.6 Análise estatística.....	38

4. Resultados e Discussão	39
4.1 Atividade moluscicida.....	39
4.1.1. Ensaio triagem dose-única contra adultos.....	39
4.1.2 Determinação da Dose Letal 50 e 90 (DL ₅₀ e DL ₉₀) nos adultos.....	42
4.1.3 Determinação do Tempo Letal 50 e 90 (TL ₅₀ e TL ₉₀) nos adultos.....	44
4.1.4 Ensaio triagem dose-única contra juvenis.....	47
4.1.5 Atividade ovicida.....	48
4.2 Ensaio de toxicidade em <i>Artemia salina</i>	51
4.3 Atividade antimicrobiana.....	53
4.4 Propriedades antioxidantes.....	57
4.4.1 Teor de Polifenóis Totais (TPT).....	57
4.4.2 Capacidade de sequestrar o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).....	59
4.4.3 Ensaio de proteção <i>in vitro</i> do ADN.....	61
4.5 Análise da composição química dos óleos essenciais por cromatografia gasosa (GC) e por cromatografia gasosa/espetrometria de massa (GC/MS).....	64
5. Conclusão	66
6. Referências bibliográficas	70

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

AA – Atividade antioxidante

ABS – Absorvância

Acet-o – Fração oleosa do extrato de acetona

Acet-s – Fração sólida do extrato de acetona

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ANOVA – Análise de variância

CuSO₄ – Sulfato de cobre

Dcm-c – Fração cerosa do extrato de diclorometano

Dcm-r – Fração resinosa do extrato de diclorometano

DDT – Diclorodifeniltricloroetano

DL – Dose letal

DP – Desvio-padrão

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

EAG – Equivalentes de ácido gálico

EC₅₀ – Concentração efetiva 50

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EP – Erro padrão

EPA – Environmental Protection Agency

ERO – Espécies reativas de oxigênio

ESBLs - Extended spectrum β lactamases

H – Fator de heterogeneidade

HCH – Hexaclorocicloexano

Hexa – Fração solúvel do extrato de hexano

IC – Intervalo de confiança

LB – Lysogeny broth

MeOH-c – Fração cerosa do extrato de metanol

MeOH-r – Fração resinosa do extrato de metanol

MIC – Minimum inhibitory concentration

OE – Óleo essencial

OEs – Óleo essenciais
OE-hd – Óleo essencial obtido por hidrodestilação
OE-av – Óleo essencial obtido por arraste de vapor
OMS – Organização Mundial de Saúde
ppm – Partes por milhão
r² – Coeficiente de determinação
RAA – Região Autónoma dos Açores
SDA + Y – Sabourad Dextrose Agar + levedura
SPSS – Statistical package for the social sciences
p/v – Peso por volume
TL – Tempo letal
TPT – Teor de polifenóis totais
UFC – Unidades formadoras de clónias
UV – Ultra-violeta
v/v – Volume por volume
WHO – World Health Organization

Lista de Figuras

Figura	Descrição	Página
Revisão bibliográfica		
1	Principais vias biossintéticas de metabolitos secundários e inter-relações com o metabolismo primário nas plantas (adaptado de Street & Cockburn, 1972).	7
2	Estrutura química da morfina (A) e ácido salicílico (B).	10
3	Estrutura química da piretrina I (A) e Prozap® solução inseticida (B).	12
4	Árvore de <i>Cryptomeria japonica</i> (A); Cortes transversais dos troncos de <i>C. japonica</i> (B); Detalhe da folhagem de <i>C. japonica</i> : (esquerda) ramo com cones maduros; (centro) folhagem de indivíduo adulto; (direita) folhagem indivíduo juvenil (C) (adaptado de Base de dados da Biodiversidade dos Açores e Direção Regional dos Recursos Florestais).	14
5	Distribuição global da fasciolose (adaptado de Lu <i>et al.</i> , 2018).	17
Materiais e Métodos		
6	Ramada (folhas e ramos finos) de <i>Cryptomeria japonica</i> .	20
7	Processos de destilação dos óleos essenciais: hidrodestilação com aparelho de Clevenger modificado (A) e aparelho para destilação por arraste de Vapor (B).	20
8	Óleo essencial (OE) no tubo de separação da aparelhagem para extração por hidrodestilação (A) e por arraste de vapor (B). Observa-se a separação nítida das fases oleosa (OE) e aquosa (hidrolato), bem como uma diferente coloração dos OEs obtidos.	22
9	Sistema de extração por Soxhlet (composto por balão de aquecimento, extrator de Soxhlet e condensador) usando, sequencialmente, solventes orgânicos de polaridade crescente.	23
10	Amostras obtidas de folhas e ramos finos de <i>Cryptomeria japonica</i> açoriana. Óleos essenciais extraídos por hidrodestilação e arraste de vapor, respetivamente (A); Frações obtidas por extração com solventes orgânicos (B a E): hexano (B), diclorometano (C), metanol (D) e acetona (E).	24
11	Tanque de recolha dos caracóis adultos de <i>Radix peregra</i> (A); Caracóis adultos num aquário de polietileno com água de nascente e alimentados com alface (B); Juvenil de <i>R. peregra</i> (C).	25
12	Cistos de <i>Artemia salina</i> Ocean Nutrition™ (A) e náuplios (B).	26
13	Bactérias utilizadas isoladas em meio sólido LB Agar.	27

14	Limão contaminado por <i>Penicillium</i> spp. (A); Isolamento de colónias de <i>Penicillium</i> spp. (B); Características morfológicas de <i>Penicillium</i> spp. – observam-se as hifas, os conidióforos e as fiáldes (C).	27
15	Ensaio de imersão realizado com caracóis adultos de <i>Radix peregra</i> .	29
16	Forma radical do 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (A); Forma não-radical do DPPH (B).	35

Resultados e Discussão

17	Mortalidade de adultos de <i>Radix peregra</i> às 24 h após exposição e às 48 h de recuperação (24 h exposição + 24 h recuperação) à dose única de 100 ppm para os óleos essenciais e extratos testados ($n = 3$). O desvio padrão está representado pelas linhas no topo das colunas. Médias assinaladas pela mesma letra indicam que não existem diferenças significativas ($p \geq 0,05$) entre as diferentes amostras (teste de Tukey). As abreviaturas das amostras testadas encontram-se definidas nas Tabelas 1 e 2. C = controlo (Acet, acetona e Et, etanol).	40
18	Mortalidade de juvenis de <i>Radix peregra</i> às 24 h após exposição e às 48 h de recuperação (24 h exposição + 24 h recuperação) à dose única de 30 ppm para os óleos essenciais e extratos testados ($n = 3$). O desvio padrão está representado pelas linhas no topo das colunas. Médias assinaladas pela mesma letra indicam que não existem diferenças significativas ($p \geq 0,05$) entre as diferentes amostras (teste de Tukey). As abreviaturas das amostras testadas encontram-se definidas nas Tabela 1 e 2. C = controlo (Acet, acetona; MeOH, metanol e Et, etanol).	48
19	Atividade ovicida à dose única de 30 ppm para os óleos essenciais e extratos testados ($n = 3$). O desvio padrão está representado pelas linhas no topo das colunas. Médias assinaladas pela mesma letra indicam que não existem diferenças significativas ($p \geq 0,05$) entre as diferentes amostras (teste de Tukey). As abreviaturas das amostras testadas encontram-se definidas nas Tabela 1 e 2. C = controlo (Acet, acetona; MeOH, metanol e Et, etanol).	49
20	Efeitos observados nos embriões e adultos de <i>Radix peregra</i> após tratamento com óleos essenciais (OEs)/extratos (A-G). Embrião viável de <i>R. peregra</i> (A); Embriões desintegrados após tratamento com OE-hd e OE-av, respetivamente (B e C); Cápsula com juvenis já desenvolvidos antes da eclosão (D); Cápsula com embriões desintegrados (E); Caracol adulto com o pé inchado após exposição a tratamento (F); Caracol adulto morto com descoloração do pé, deterioração dos tecidos e vazamento de fluidos corporais (G); Caracol adulto vivo (H).	51
21	Representação gráfica do teor médio (em %) da capacidade sequestradora de radicais de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) das amostras analisadas, em função da concentração (0,063 a 1,00 mg/mL). As abreviaturas das amostras testadas (extratos) encontram-se definidas na Tabela 2.	61
22	Efeitos protetores do óleo essencial obtido por hidrodestilação (OE-hd) contra os danos oxidativos ao ADN induzidos pelos radicais hidroxilo. Coluna 1 - ADN nativo; coluna 2 - ADN + reação de Fenton; coluna 3 - ADN + reação de Fenton + OE-hd; coluna 4 - ADN + reação de Fenton + catalase (5 unidades).	62

- 23 Efeitos protetores do óleo essencial obtido por arraste de vapor (OE-av) 63
contra os danos oxidativos ao ADN induzidos pelos radicais hidroxilo.
Coluna 1 - ADN nativo; coluna 2 - ADN + reação de Fenton; coluna 3 - ADN
+ reação de Fenton + OE-av; coluna 4 - ADN + reação de Fenton + catalase
(5 unidades).
- 24 Efeitos protetores dos extratos contra os danos oxidativos ao ADN 63
induzidos pelos radicais hidroxilo. Coluna 1 - ADN nativo; coluna 2 - ADN
+ reação de Fenton; coluna 3 - ADN + reação de Fenton + Hexa; coluna 4
- ADN + reação de Fenton + Dcm-r; coluna - 5, ADN + reação de Fenton
+ MeOH-r; coluna 6 - ADN + reação de Fenton + Acet-s; coluna 7 - ADN +
reação de Fenton + Acet-o; coluna 8 - ADN + reação de Fenton + solvente
acetona; coluna 9 - ADN + reação de Fenton + catalase (5 unidades). As
abreviaturas das amostras testadas (extratos) encontram-se definidas na
Tabela 2.

Lista de Tabelas

Tabela	Descrição	Página
<hr/> Materiais e Métodos		
1	Designações e abreviaturas dos óleos essenciais obtidos.	22
2	Designações e abreviaturas dos extratos obtidos.	24
<hr/> Resultados e Discussão		
3	DL ₅₀ e DL ₉₀ estimadas dos óleos essenciais (OEs) e extratos de <i>Cryptomeria japonica</i> contra adultos de <i>Radix peregra</i> , após 24 h de exposição seguidas por 24 h de período de recuperação.	43
4	TL ₅₀ e TL ₉₀ estimadas dos óleos essenciais (OEs) e extratos de <i>Cryptomeria japonica</i> contra adultos de <i>Radix peregra</i> a diferentes períodos de exposição (contínuo, 16 h e 8 h) a 100 ppm.	46
5	DL ₅₀ e DL ₉₀ estimadas dos óleos essenciais e extratos de <i>Cryptomeria japonica</i> contra náuplios de <i>Artemia salina</i> , após 24 h de exposição.	52
6	Halos de inibição (mm) dos óleos essenciais e extratos de <i>Cryptomeria japonica</i> contra as bactérias <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Micrococcus luteus</i> e <i>Bacillus subtilis</i> e o fungo <i>Penicillium</i> spp.	54
7	Teor de polifenóis totais (TPT) nas amostras analisadas ^a .	58
8	Teor médio (em %) da capacidade sequestradora de radicais de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) das amostras analisadas, de acordo com a concentração (0,063 a 1,000 mg/mL) e respetivo EC ₅₀ ^a .	60
9	Composição (%) dos óleos essenciais (OE) da ramada de <i>Cryptomeria japonica</i> obtidos por hidrodestilação (hd) e arraste de vapor (av).	65

1. Introdução

1.1 Enquadramento

Há já algum tempo que o alarme soou no que diz respeito à disponibilidade dos recursos naturais do nosso planeta. O modo de vida consumista aliado a uma economia linear de uma grande parte da população mundial levou a uma rápida, irracional e insustentável utilização dos recursos naturais. Nesta nova realidade, a economia mundial até agora assente num modelo linear de negócios vê-se compelida a mudar para um novo modelo de economia circular. Esta é uma mudança inevitável, até porque ao ritmo a que os recursos naturais são consumidos pelo homem, quer a curto ou longo prazo não serão suficientes para responder às necessidades de uma população em constante crescimento (Mittal & Gupta, 2015).

A transição de um modelo linear para um modelo circular, não é mais do que migrar de um modelo de extração da matéria-prima, produção, uso e descarte dos produtos e subprodutos, para um modelo assente no princípio de devolução dos materiais ao ciclo produtivo através da recuperação, reutilização e reciclagem. Para que tal aconteça é necessário alterar o paradigma da economia mundial e desenvolver uma nova tendência de gestão. Muito tem sido feito a nível global e, em particular, no contexto da União Europeia, através de políticas de prevenção de resíduos ou hierarquização da gestão de resíduos, sendo que em 2012 e 2015, a União Europeia lançou a estratégia para uma Bioeconomia na Europa e para a Economia Circular, respetivamente. Ambas as agendas políticas adotam medidas com respeito a preocupações económicas e ambientais, investigação e inovação e transição social para a sustentabilidade (European Environment Agency, 2018).

A floresta constitui um elemento marcante e estruturante da paisagem açoriana. Ocupando cerca de um terço do território terrestre insular da Região, suporta um setor de importância económica considerável e com um potencial de expansão enorme. Tendo em conta a sua importância, a Direção Regional dos Recursos Florestais anunciou, em 2014, a Estratégia Florestal dos Açores,

direcionada para garantir o ordenamento e a gestão dos recursos florestais, assente em 4 objetivos de entre os quais o de “aumentar a competitividade do setor florestal através da utilização sustentável dos recursos florestais”. Uma das medidas propostas para concretizar esse objetivo (medida 2.9) é “incentivar a valorização da biomassa florestal”, nomeadamente “estimular a utilização de resíduos de exploração florestal, subprodutos da indústria madeireira e de material proveniente de áreas ocupadas por espécies lenhosas invasoras, com vista à sua valorização como fonte de rendimento e aproveitamento para produção de energia ou de outros produtos derivados” (Direção Regional dos Recursos Florestais, 2014). Nesta estratégia, a procura de novos mercados e oportunidades assume importância estruturante.

Na floresta açoriana, a criptoméria (*Cryptomeria japonica* D. Don), originária do Japão e introduzida em São Miguel há cerca de 2 séculos, ilha a partir da qual se dispersou por todo o arquipélago, assume o papel preponderante, ocupando 12 698 hectares, o que corresponde a 60% da área florestal de produção (Dias *et al.*, 2007).

A produção de madeira de criptoméria é de grande importância económica nos Açores, tendo esta elevado valor comercial como material de construção, mobília ou árvore ornamental. Por ano, a indústria de madeira de criptoméria gera uma grande quantidade e diversidade de subprodutos/resíduos (costaneiros, serradura, retalhos de madeira e cascas). Como exemplo, a média de resíduos gerado por uma serralharia representa cerca de 30% do peso da criptoméria que foi processada (Mendes, 2008; Direção Regional dos Recursos Florestais, 2014). Acresce que a madeira de criptoméria foi recentemente marcada como produto CE, sendo esperado um aumento no seu consumo no mercado nacional e internacional e, conseqüentemente, uma maior produção de resíduos madeireiros (Simas, 2016).

Os principais recursos de biomassa derivada da criptoméria são, deste modo, os subprodutos/resíduos da serração e os resíduos provenientes da exploração florestal. Estes últimos são resíduos de abate (árvores inteiras mortas, doentes ou que não apresentam qualquer valor/interesse comercial, folhagem,

ramos e copas das árvores exploradas) e representam cerca de 10 a 20% do total da biomassa existente numa área de exploração florestal típica (Simas, 2016).

Os resíduos do processamento da madeira de criptoméria são normalmente encaminhados para pilhas de compostagem ou aterros, enquanto que os resíduos de abate permanecem na mata uma vez que a sua remoção é inviável, quer do ponto de vista técnico quer económico, dadas as características topográficas das matas (Simas, 2016).

Numa altura em que estão a surgir na região investimentos de diversa índole, que contemplam o aproveitamento da biomassa florestal, é importante estimular a utilização dos desperdícios do setor florestal/indústria madeireira para a obtenção de produtos de valor acrescentado, como por exemplo, o óleo essencial e extratos orgânicos de ramada de *C. japonica*.

1.2 Objetivos gerais e específicos

A presente tese de mestrado tem por objetivo geral a avaliação das propriedades biocidas e promotoras de saúde dos óleos essenciais e extratos orgânicos obtidos da ramada de *C. japonica* açoriana, com potencial impacto na economia da Região.

Os objetivos específicos definidos de modo a concretizar o objetivo geral proposto foram os seguintes:

- a) Recolha do material vegetal de *C. japonica* (folhas e ramos finos) oriunda da ilha de São Miguel, Açores;
- b) Obtenção dos óleos essenciais usando dois métodos de destilação diferentes;
- c) Obtenção dos extratos vegetais usando diferentes solventes orgânicos e processos extrativos;
- d) Avaliação da atividade moluscicida sobre *Radix peregra*:
 - Ensaio de triagem com dose-única sobre caracóis adultos;
 - Determinação da Dose Letal 50 e 90 (DL₅₀ e DL₉₀) para caracóis adultos;

- Determinação do Tempo Letal 50 e 90 (TL₅₀ e TL₉₀) para caracóis adultos;
- Ensaio de triagem com dose-única sobre caracóis juvenis;
- Ensaio de atividade ovicida;
- e) Avaliação da toxicidade em *Artemia salina*;
- f) Avaliação da atividade antimicrobiana sobre bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas) e fungos;
- g) Avaliação das propriedades antioxidantes:
 - Determinação do teor de polifenóis totais (TPT);
 - Determinação da capacidade de sequestrar o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH);
 - Determinação da capacidade de proteção *in vitro* do ADN;
- h) Análise da composição química dos óleos essenciais por cromatografia gasosa e cromatografia gasosa/espetrometria de massa.

1.3 Contribuição científica

Considerando que as políticas ambientais apontam para uma melhor gestão e valorização dos resíduos, o trabalho de investigação apresentado nesta tese de mestrado reveste-se de grande importância para o setor florestal/industrial da Região Autónoma dos Açores (RAA). A bio-valorização da ramada de *C. japonica*, por obtenção do óleo essencial e extratos orgânicos e avaliação das suas propriedades biocidas e terapêuticas, representa um contributo não só para (i) a investigação de novos produtos bioativos com potencial aplicação na indústria farmacêutica e agroquímica, mas também para (ii) a valorização da biomassa da floresta açoriana. Consequentemente, pode assim constituir um incentivo à obtenção industrial do óleo essencial e/ou extratos dos resíduos de *C. japonica* para posterior comercialização, com potencial impacto económico e social para a RAA.