

Composição química e atividade biológica de bagas do Zimbro
(*Juniperus communis* L.)

Isabel António Rodrigues Bacém

Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança para obtenção do Grau de
Mestre em Engenharia Química

Orientadora
Professora Doutora Joana Amaral

Bragança, Janeiro 2018

Agradecimentos

A realização desta Dissertação de Mestrado só foi possível graças à colaboração e ao contributo, de forma direta ou indireta, de várias pessoas às quais gostaria de exprimir algumas palavras de agradecimento e profundo reconhecimento, em particular:

À Professora Doutora Joana Amaral, pela orientação, disponibilidade e paciência.

À técnica do Laboratório de Processos Químicos da ESTiG, Eng^a. Maria João, pelo apoio e ajuda que sempre me disponibilizou.

Ao meu namorado Michel Platini, pelo apoio incondicional.

À minha prima Diana Cuma, por toda a ajuda dada e pelo acompanhamento no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os meus amigos, pelo apoio e amizade que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho: Neusa Reis, Edson Mendes, Mila Monteiro, Addy Barros, Gilson dos santos, Adalberto Duarte e Raquel Lopes.

À Ivone Fachada, Rita Pires, Clotilde Nogueira, Raquel Branquinho e Margarida Rodrigues por todo o apoio, carinho e incentivo para a realização deste trabalho.

Resumo

As bagas do zimbro (*Juniperus communis* L.) são tradicionalmente utilizadas em Trás-os-Montes como condimento em pratos de carne de caça, com o objetivo de lhes conferir um aroma e sabor particulares. São ainda utilizadas na aromatização de bebidas, tais como o gin e bebidas tradicionais. As bagas estão também descritas como tendo propriedades medicinais, com especial ênfase para as suas atividades diurética e antisséptica.

Neste trabalho estudou-se a composição química de três amostras de bagas do zimbro, uma colhida na natureza e duas adquiridas comercialmente (vendidas como condimentos alimentares em supermercados), no que respeita à sua composição nutricional (proteínas, gordura, hidratos de carbono, humidade e cinzas), ácidos gordos e compostos bioativos. A composição em ácidos gordos foi determinada por cromatografia gasosa com detetor de ionização em chama (GC-FID). A determinação do teor de fenóis totais, flavonóides totais, poder redutor e atividade antioxidante pelo método do DPPH, para os extratos metanólicos das três amostras de bagas e de uma amostra de folhas colhidas na natureza, foi realizada utilizando métodos espectrofotométricos. Por último, para uma amostra de óleo essencial de bagas do zimbro, realizaram-se ensaios de atividade antimicrobiana face a diversas bactérias gram-positivas e gram-negativas e uma levedura.

Verificou-se a ocorrência de teores superiores de fenóis totais e flavonoides nas folhas comparativamente às bagas, bem como uma superior capacidade antioxidante dos extratos de folhas, expressa em capacidade captadora do radical DPPH e poder redutor. O óleo essencial revelou capacidade de inibir o crescimento de *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecalis*, não apresentando, contudo, atividade face a *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis* nas concentrações testadas. Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento mais aprofundado das bagas do zimbro e sugerem que o seu uso como condimento pode ser benéfico no que respeita a qualidade e segurança alimentar.

Palavras-chave: bagas do zimbro, condimento alimentar, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, fenóis, flavonoides.

Abstract

Juniper berries are traditionally used in the Northeastern region of Portugal as a condiment in game meat dishes, conferring a particular aroma and taste to these dishes. They are also used in flavouring beverages such as gin and traditional drinks. Additionally, the berries are described as having medicinal properties, with special emphasis on its diuretic and antiseptic activities.

The aim of this work was to study the chemical composition of juniper berries, comparing those collected in the nature (wild) and two samples purchased commercially (sold as food flavoring/spices in supermarkets) as regard to its nutritional composition (protein, fat, carbohydrates, moisture and ash), fatty acids and bioactive compounds. Fatty acids profile was determined by gas chromatography coupled to a flame ionization detector (GC-FID). Total phenols, total flavonoids, reducing power and antioxidant activity by the DPPH radical-scavenging method was determined by using UV-Vis spectrophotometric methodologies, applied to methanolic extracts obtained for the three berries samples and one sample of juniper leaves collected in the wild. Additionally, the antimicrobial activity of a sample of essential oil from juniper berries was evaluated against a yeast and several gram-positive and gram negative bacteria.

Results showed higher levels of total phenols and flavonoids in the leaves compared to the berries, as well as a superior antioxidant capacity of leaves extracts, expressed in DPPH radical scavenging capacity and reducing power. The essential oil has shown ability to inhibit the growth of *C. albicans*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterococcus faecalis*, however, not showing activity at the tested concentrations against *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*. The results of this work contribute to increase the knowledge regarding juniper berries composition and suggest that its use as a condiment in food can be beneficial as regards food quality and safety.

Keywords: Juniper berries, condiment, antioxidant activity, antimicrobial activity, phenols, flavonoid

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo.....	ii
Abstract	iii
Índice Geral	v
Índice de Tabelas.....	vii
Índice de Figuras	viii
Abreviaturas.....	ix
1. Introdução.....	1
1.1. Especiarias.....	1
1.2. Zimbro	3
1.3. Composição química do zimbro – revisão bibliográfica.....	6
1.3.1. Composição nutricional.....	6
1.3.2. Óleos essenciais e compostos terpénicos	8
1.3.3. Compostos fenólicos	10
1.3.4. Flavonoides	12
1.4. Atividades biológicas do zimbro – revisão bibliográfica	14
1.4.1. Atividade antioxidante	14
1.4.2. Atividade antimicrobiana	20
1.5. Motivação e objetivos.....	23
2. Material e Métodos.....	25
2.1. Amostras	25
2.2. Padrões e reagentes.....	25
2.3. Valor Nutricional	26
2.4. Ácidos Gordos	26
2.5. Avaliação da atividade antioxidante	27

2.5.1.	Preparação dos extratos das amostras	27
2.5.2.	Determinação de Fenóis totais.....	28
2.5.3.	Determinação Flavonoides totais.....	28
2.5.4.	Poder redutor	29
2.5.5.	Atividade captadora de radicais DPPH	29
2.6.	Atividade antimicrobiana	30
2.6.1.	Método da difusão em placa.....	31
2.6.2.	Método da macrodiluição em caldo.....	31
3.	Resultados e Discussão.....	33
3.1.	Composição nutricional.....	33
3.2.	Composição em Ácidos Gordos	34
3.3.	Teor total de Fenóis e de Flavonoides.....	36
3.4.	Atividade antioxidante	39
3.5.	Atividade antimicrobiana	41
4.	Conclusão e Perspetivas futuras.....	45
5.	Bibliografia.....	47
6.	Anexos	53

Índice de Tabelas

Tabela 1. Produções de especiarias em diferentes continentes no ano de 2013 (FAOSTAT, 2016).	2
Tabela 2. Valor nutricional do zimbros colhido em Dakota do Sul, EUA (adaptado de FEIS, 2005).	7
Tabela 3. Valor nutricional de bagas do zimbros colhidos no Canadá (adaptado de FEIS, 2015).	7
Tabela 4. Composição nutricional das bagas do zimbros estudadas (g/100g de amostra).	33
Tabela 5. Composição em ácidos gordos (percentagem relativa) das amostras estudadas (média ± DP, n = 3).	35
Tabela 6. Compostos fenólicos e flavonoides totais das amostras do zimbros	38
Tabela 7. Atividade antioxidante (valores de EC ₅₀) das amostras estudadas.	39
Tabela 8. Resultados da atividade antimicrobiana pelo método de macrodiluição em caldo.	44

Índice de Figuras

Figura 1. Produção de especiarias a nível global, ao longo dos últimos anos (em toneladas) (FAOSTAT, 2016).	2
Figura 2. Produção de especiarias por países no ano 2013 (FAOSTAT, 2016).	2
Figura 3. Representação das bagas e das folhas do zimbro (adaptado de <i>Plants for a future</i> , 2016).	4
Figura 4. Estrutura geral dos flavonoides e exemplos das suas subfamílias (adaptado de Fraga <i>et al.</i> , 2010).	13
Figura 5. Esquema de evidência de reação de redução do radical DPPH.	18
Figura 6. Esquema simplificado das reações que ocorrem no ensaio do poder redutor de antioxidantes (adaptado de Shahidi e Zhong, 2015).	19
Figura 7: Determinação da atividade antioxidante com o método DPPH: preparação da amostra para leitura por espectrofotometria	30
Figura 8: Curva de calibração utilizada para a determinação do teor total de compostos fenólicos nos extratos, expresso em ácido gálico.	37
Figura 9: Curva de calibração utilizada para a determinação do teor total de flavonoides dos extratos, expresso em catequina.	37
Figura 10: Percentagem de inibição do radical DPPH• de diferentes concentrações de extratos do zimbro.	39
Figura 11: Poder redutor de diferentes concentrações de extratos do zimbro.	40
Figura 12: Atividade antimicrobiana de óleo do zimbro pelo método de difusão em placa.	42
Figura 13: Atividade antimicrobiana de óleo do zimbro pelo método de macrodiluição em caldo	42
Figura 14: Método de macradiluição em caldo das bactérias: A- <i>S. aureus</i> , B- <i>Proteus</i> , C- <i>klebsiella</i> , D- <i>E. faecalis</i> , E- <i>P.aerogenosa</i> , F- <i>B.subtilis</i> , G- <i>B.cereus</i> , H- <i>E.coli</i> , I- <i>C.albicans</i> .	54

Abreviaturas

- A1 - amostra 1 (bagas do zimbro adquiridas comercialmente, herbanário Alma d'Flor)
- A2 - amostra 2 (bagas do zimbro adquiridas na natureza, região de Bragança)
- A2 folha - amostra 2 (folhas do zimbro adquiridas na natureza, região de Bragança)
- A3 - amostra 3 (bagas do zimbro adquiridas comercialmente, supermercado continente)
- ABTS - ácido 2,2'-azino-bis-(3- etilbenzotiazoline-6-sulfónico)
- ACR - atividade captadora de radicais livres
- ATCC – *American Type Culture Collection*
- BHA - 4-hidroxianisol de terc-butilo
- BHT - hidroxitolueno de butilo
- CUPRAC - *Cupric reducing antioxidant capacity*
- DAD – *Diode array detector*
- DMSO – dimetilsulfóxido
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
- EAG - equivalentes de ácido gálico
- EC - equivalentes de catequina
- ESI - *Electrospray ionization*
- ET - transferência de eletrão
- EUA - Estados Unidos da América
- FAME - *fatty acid methyl ester*
- FRAP - *Ferric reducing antioxidant power*
- GC – *Gas chromatography*
- HAT - transferência de átomos de hidrogénio
- HPLC – *High pressure liquid chromatography*
- LDL - lipoproteínas de baixa densidade
- MAE - extração assistida por micro-ondas
- MBC - concentração mínima bactericida
- MIC - concentração mínima inibitória
- MS – *mass spectrometry*
- NCTC- *National Collection of Type Cultures*
- Nd - não determinado
- OE- óleo essencial
- OH• - radicais hidroxilo
- ORAC - *Oxygen Radical Absorbance Capacity*

ppm - partes por milhão

R• - radicais lipídicos

RMN - ressonância magnética nuclear

RO• - radicais alcóxido

ROO• - radicais peróxido

ROS - espécies reativas de oxigênio

rpm - rotação por minuto

SD - destilação por arrastamento de vapor

SDE- extração-destilação simultânea

SFE - extração com fluido supercrítico

SI - sem inibição

SPME - microextração em fase sólida

TBHQ - terc-butil-hidroquinona

TEAC - *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*

UFC - unidades formadoras de colónias

UV-B-radiação ultravioleta

1. Introdução

1.1. Especiarias

As especiarias têm sido utilizadas como condimentos para melhorar a qualidade sensorial dos alimentos, conferindo-lhes frequentemente um sabor, aroma, gosto picante e/ou cor característicos. Algumas especiarias podem ainda modificar a textura dos alimentos. Elas podem ser usadas individualmente, mas também na forma de misturas, para atender a diferentes gostos, sendo uma experiência comum que o seu sabor distinto frequentemente estimula o apetite.

O comércio de especiarias é, provavelmente, um dos mais antigos praticados pelo homem, uma vez que estas têm sido usadas desde a civilização antiga. A riqueza gerada pelo comércio de especiarias foi responsável por várias viagens históricas e descobertas de novas terras (Srinivasan, 2005). Por isso, desde a antiguidade, vários países lutaram pelo controlo do comércio de especiarias, o qual foi geralmente dominado pelas nações mais fortes.

Devido às suas propriedades, as especiarias tornaram-se essenciais na culinária de várias regiões do mundo, o que levou a que a sua produção e comercialização seja atualmente uma importante atividade económica. Entre 2000 e 2004, o valor das importações de especiarias aumentou 1,9% ao ano e o volume aumentou 5,9% (Torres *et al.*, 2015). Na última década, tem-se assistido a um crescimento do mercado de especiarias, verificando-se um aumento da produção global a nível mundial de aproximadamente 1 milhão e 440 mil toneladas no ano 2006 para 2 milhões 157 mil toneladas em 2013 (Figura 1) (FAOSTAT, 2016). Atualmente, a produção de especiarias ocorre sobretudo no continente Asiático (Tabela 1).

No que respeita aos países com maior produção de especiarias, estes incluem a Índia, considerado o maior produtor mundial com uma produção de 1 milhão e 500 mil toneladas em 2013, o Bangladesh, Turquia e China, como se pode verificar pela observação da Figura 2 (FAOSTAT, 2016). No caso particular de determinadas especiarias comerciais, alguns países latino-americanos são dos principais fornecedores a nível mundial, como é o caso do Brasil no que respeita a pimenta e a Guatemala relativamente ao cardamomo (Torres *et al.*, 2015).

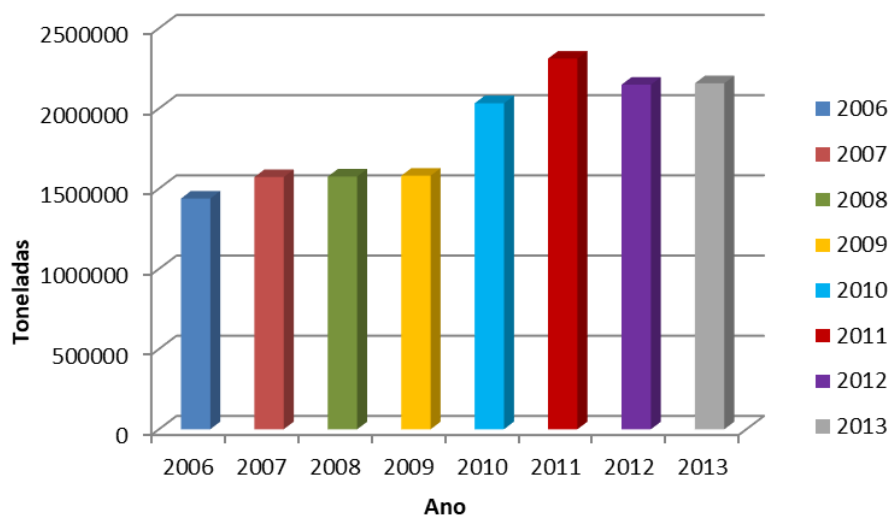


Figura 1. Produção de especiarias a nível global, ao longo dos últimos anos (em toneladas) (FAOSTAT, 2016).

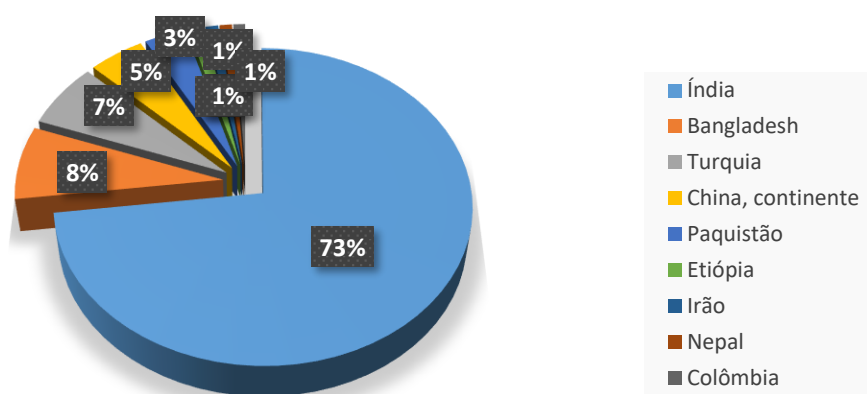


Figura 2. Produção de especiarias por países no ano 2013 (FAOSTAT, 2016).

Tabela 1. Produção de especiarias em diferentes continentes no ano de 2013 (FAOSTAT, 2016).

<i>Região</i>	<i>Produção (toneladas)</i>
Ásia	2049082
África	67758
América do Sul	26330
Europa	6128
América Central	4760
Caraíbas	2418
Oceânia	888

As especiarias não só são usadas como condimentos alimentares, mas também noutras áreas, tais como em perfumaria, cosmética e em artigos de higiene pessoal. Além disso, reconhece-se que várias especiarias possuem propriedades medicinais sendo usadas desde há muito tempo na medicina tradicional com diferentes propósitos. Com o avanço no conhecimento da química e farmacologia dos seus princípios ativos, também os seus efeitos benéficos para a saúde têm sido investigados mais profundamente nas últimas décadas. Muitos benefícios para a saúde têm sido atribuídos a diferentes especiarias, os quais foram reconhecidos nas últimas décadas através de estudos de investigação que permitiram documentar atividades tais como ação estimulante digestiva, efeito hipolipidémico, atividade antidiabética, atividade antimicrobiana, potencial antioxidante, propriedades anti-inflamatórias, potencial antimutagénico e anticarcinogénico, entre outras (Srinivasan, 2005).

Além do seu papel na transmissão de sabor e aroma aos alimentos e dos promissores efeitos benéficos que as especiarias podem exercer no organismo humano, diversos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de determinar a eficiência e viabilidade da aplicação de algumas especiarias como conservantes alimentares (Torres *et al.*, 2015). Diferentes compostos identificados em especiarias, tais como o cinamaldeído na canela, o eugenol no cravo-da-Índia e o cuminaldeído nos cominhos, têm demonstrado conseguir inibir o crescimento de microrganismos patogénicos e ter ação preventiva na degradação de alimentos (Torres *et al.*, 2015). Por outro lado, uma vez que tem sido demonstrado que diversas especiarias apresentam níveis de atividade antioxidante comparáveis aos conservantes sintéticos autorizados para fins alimentares, estas apresentam-se como uma potencial alternativa à sua utilização, sendo mais apelativas aos consumidores por se tratarem de produtos naturais.

1.2. **Zimbro**

O Zimbro (*Juniperus communis* L.), também designado como zimbro comum, zimbro anão, junípero ou junípero-azul, é um arbusto perene da família das Cupressáceas, sendo uma das plantas gimnospérmicas com mais ampla distribuição no Holártico (região que inclui o Norte da África e Eurásia). Atualmente, é uma espécie vegetal abundante em áreas boreais, enquanto na Europa Mediterrânica cresce predominantemente em regiões montanhosas. Embora *J. communis* seja uma espécie comum na Europa as suas populações têm sofrido

graves processos de regressão em certas áreas. Na Península Ibérica, abrange uma área contínua no norte da Espanha, encontrando-se, contudo, cada vez mais fragmentada a sul, ocorrendo em zonas de cadeias montanhosas (García *et al.*, 1999). O género *Juniperus* compreende cerca de 70 espécies distribuídas no Hemisfério Norte, entre as quais se inclui *Juniperus communis*. Para além de *J. communis* L. subsp. *alpina* (Suter) Celak, no território continental português, encontra-se descrita a ocorrência de outros três taxa, nomeadamente *J. oxycedrus* L., *J. navicularis* Gandoger e *J. turbinata* (Guss.) (Cavaleiro, 2006a).

J. communis apresenta-se geralmente como uma pequena árvore ou arbusto, muito variável em tamanho, sendo frequentemente um arbusto baixo/pequeno, mas que ocasionalmente pode atingir 10 m de altura. Este apresenta folhas em forma de agulha em espirais de três, de cor verde, com uma única banda estomática branca sobre a superfície interna. Os cones das sementes (falsos frutos), com forma redonda e pequena (5 - 9 mm de diâmetro), são chamados de bagas (Yazid *et al.*, 2012). As bagas e as folhas do zimbro podem ser visualizadas na Figura 3.



Figura 3. Representação das bagas e das folhas do zimbro (adaptado de *Plants for a future*, 2016).

De uma forma geral, considera-se que as plantas desta família têm um elevado valor ecológico, principalmente devido à sua capacidade de retenção do solo, mas também pela flora e fauna endémicas que lhe estão associadas (García *et al.*, 1999). No caso particular das bagas do zimbro (*J. communis*), estas adquirem especial ênfase pela sua ampla utilização com diversas finalidades, como aromatizantes em perfumes, cosméticos e produtos farmacêuticos, mas também para aromatizar bebidas alcoólicas. Neste último caso, as bagas, juntamente com outros ingredientes botânicos, são usadas na produção de bebidas espirituosas à base do zimbro frequentemente consumidas, tal como o gin. De acordo com a legislação Europeia (Regulamento CEE nº. 1576/89), o sabor principal do tipo mais comum e

popular de gin (*London Dry Gin*), que pertence à classe "gin destilado", deve ser proveniente de bagas do zimbro (Vichi *et al.*, 2007). As bagas do zimbro são também usadas como condimento alimentar, tratando-se de um tempero importante em muitas cozinhas europeias, especialmente nas regiões alpinas, onde o zimbro cresce abundantemente. Na Escandinávia do Norte são frequentemente usadas com o objetivo de conferir um sabor característico a pratos de carne (Taviano *et al.*, 2013). De forma similar, na região Portuguesa de Trás-os-Montes é comum usar zimbro no tempero de carnes de caça. Alguns cozinheiros preferem usar os frutos maduros secos, uma vez que as bagas frescas tendencialmente conferem à carne um sabor forte a resina e ligeiramente mais amargo (Ciesla, 2001). Refira-se ainda que as bagas do zimbro são o único exemplo de uma especiaria pertencente ao grupo botânico Coniferae (Cupressaceae) e também um dos poucos exemplos de especiarias provenientes de regiões climáticas frias, embora se considere que as bagas de melhor qualidade sejam provenientes de países do sul da Europa (Innocenti *et al.*, 2007).

Para além de serem utilizadas como aromatizante em alimentos e bebidas, as folhas e bagas do zimbro são também utilizadas na medicina tradicional, sobretudo pelas suas propriedades diuréticas e gastrointestinais (Plesa *et al.*, 2011). As bagas do zimbro secas e maduras encontram-se inscritas em diferentes farmacopeias, incluindo a Farmacopeia Portuguesa (Farmacopeia Portuguesa, 2008). Encontram-se ainda descritas na bibliografia diversas propriedades medicinais associadas ao zimbro, tais como atividade anti-inflamatória, antiviral, hipoglicémica e anticancerígena (El-Ghorab *et al.*, 2008). Na medicina popular turca, os frutos de *J. communis* são usados pelas suas propriedades diuréticas, antisséticas, analgésicas e de alívio de problemas estomacais. A sua utilização foi ainda descrita no tratamento de reumatismo, gota, doenças cardíacas e de pele (Elmastaş *et al.*, 2007). Em sentido contrário, segundo a literatura, *J. communis* pode ainda afetar a fertilidade em animais, e apresentar propriedades abortivas, possivelmente devido à presença de ácido isocupressico (diterpeno) na sua composição, o qual foi identificado em agulhas de coníferas e o seu consumo por gado associado a efeitos abortivos (Elmastaş *et al.*, 2007). Em ratos diabéticos não obesos, as bagas do zimbro demonstraram possuir atividade antidiabética ao diminuir a concentração de glucose e frutamina no soro (Petlevski *et al.*, 2001).

Devido ao interesse desta espécie, até à presente data encontram-se descritos na bibliografia vários estudos realizados no que respeita à sua composição química, mas também relativos à avaliação de atividades biológicas. Na secção seguinte, apresenta-se de forma mais

detalhada informação sobre a composição química de bagas e folhas do zimbro, bem como as atividades biológicas que lhe estão associadas.

1.3. Composição química do zimbro – revisão bibliográfica

De acordo com o descrito em Flora Ibérica (Franco, 1986, citado por Cabral *et al.*, 2012), *J. communis* divide-se em três subespécies, nomeadamente subsp. *communis*, *hemisphaerica* e *alpina* (Cabral *et al.*, 2012). A maioria dos estudos centra-se na subespécie *J. communis communis*, essencialmente sobre a composição química do óleo essencial das bagas (Angioni *et al.*, 2003; Damjanovic *et al.*, 2003; Lozbreveienè *et al.*, 2010; Orav *et al.*, 2010; Avci e Bilir, 2014), porém encontrando-se também algumas referências sobre as agulhas (Filipowicz *et al.*, 2003; Butkienè *et al.*, 2006; Martz *et al.*, 2009; Adams *et al.*, 2010; Cabral *et al.*, 2012; Larkeche *et al.*, 2015) e a madeira (Gonny *et al.*, 2006). De forma similar ao descrito para outras espécies de plantas, a composição dos extratos do zimbro é influenciada por vários fatores, tais como local de crescimento, idade da planta, a forma dos arbustos e maturação das bagas (Falasca *et al.*, 2014). Falasca e co-autores (2014) utilizaram ressonância magnética nuclear (RMN) para avaliar bagas verdes e maduras do zimbro, tendo verificado que o metaboloma das bagas é dominado por metabolitos primários (açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos) e metabolitos secundários (nomeadamente diterpenos derivados do labdano e componentes polifenólicos). Do ponto de vista da sua composição nutricional, as bagas do zimbro demonstraram ser pobres em nutrientes, como será referido seguidamente. Relativamente à sua composição química as bagas possuem duas frações maioritárias, nomeadamente flavonoides e terpenos, estando associados a estes compostos diversas atividades biológicas. Seguidamente, descreve-se com maior detalhe a composição do zimbro, quer no que respeita o seu valor nutricional, quer em termos de metabolitos secundários descritos para esta matriz.

1.3.1. Composição nutricional

Apesar dos dados disponíveis sobre a composição nutricional de bagas do zimbro serem muito escassos, o zimbro pode ser classificado de uma forma geral como sendo pobre em proteína total e valor energético. As Tabela 2 e 3 apresentam os dados relativos ao valor nutricional de bagas do zimbro colhidas no Dakota do Sul (EUA) e no Canadá, respetivamente

(FEIS, 2005). Como se pode observar pelos dados apresentados nas Tabelas 2 e 3, verifica-se a existência de variações nos valores dos componentes maioritários ao longo dos meses para bagas colhidas na mesma região e entre bagas colhidas em diferentes países (possivelmente, também em diferentes épocas do ano). As variações sazonais encontradas possivelmente relacionam-se com os diferentes estados de maturação das bagas, uma vez que estas são inicialmente pequenos cones com flores, com um tempo de floração entre abril e junho (Falasca, *et al.* 2013) e amadurecem no final do outono do seu segundo ano. As variações da composição nutricional entre locais, Dakota do Sul e Canadá, podem estar associadas não só a diferentes estados de maturação como a diversos fatores edafoclimáticos (solos, pluviosidade, luz solar, entre outros).

Tabela 2. Valor nutricional do zimbros colhido em Dakota do Sul, EUA (adaptado de FEIS, 2005).

Parâmetro analisado	Data de colheita da amostra			
	01-Out	02-Jan	01-Abr	01-Jul
Humidade (%)	50,27	43,48	43,81	66,13
Cinza (%)	1,41	1,65	2	1,38
Matéria gorda (%)	6,07	7,51	7,16	4,12
Fibra bruta (%)	11,28	15,5	12,7	9,51
Proteína bruta (%)	4,22	3,3	2,85	3,53
Azoto livre (%)	26,75	28,56	31,49	15,35
Caroteno (mg / g)	56,63	16,3	52,08	57,88
Fósforo (%)	0,087	0,081	0,12	0,07
Cálcio (%)	0,36	0,85	0,67	0,25
Ferro (ppm) *	94,97	91,02	92,68	40,49
Manganês(ppm) *	43,62	58,82	80,19	45,98

*ppm: partes por milhão

Tabela 3. Valor nutricional de bagas do zimbros colhidos no Canadá (adaptado de FEIS, 2015).

Matéria Seca (%)	Proteína Bruta (%)	Gordura Bruta (%)	Fibra Bruta (%)
72,2	3,7	14,3	22,1

Recentemente, Nasri e co-autores (2011) estudaram a composição química de bagas de uma espécie próxima do zimbro, nomeadamente de uma espécie de zimbreiro denominada Sabina-negral (*Juniperus phoenicea*), em três regiões diferentes da Tunísia. Segundo este estudo, comparativamente aos valores reportados para *J. communis* (Tabelas 2 e 3), de uma forma geral as bagas de zimbreiro apresentaram teores de humidade inferiores (9,6% - 13,4%) e teores superiores de lípidos (7,0% - 18,2%) e de proteínas (6,0% - 9,7%). No que respeita à fração lipídica, os ácidos gordos mais abundantes mostraram ser insaturados (86%), sendo o ácido gordo maioritário o ácido linoleico (33%, valor médio), seguido do ácido linolénico (28%, valor médio). Güvenç e co-autores (2012) estudaram a composição em ácidos gordos de diferentes espécies do género *Juniperus*, nomeadamente *J. drupacea*, *J. communis* var. *communis*, *J. communis* var. *saxatilis*, *J. oxycedrus* subsp. *Oxycedrus* e *J. oxycedrus* subsp. *macrocarpa*. Estas espécies revelaram um perfil algo uniforme no que respeita a sua composição em ácidos gordos, caracterizando-se por um elevado teor em ácidos gordos insaturados, sendo os compostos maioritários o ácido linoleico (C18:2n6), pinolénico (C18:3n6) e oleico (C18:1n9).

1.3.2. Óleos essenciais e compostos terpénicos

Os óleos essenciais (OEs) são misturas complexas de compostos de baixo peso molecular extraídos das plantas por destilação a vapor, usando vários solventes. Terpenoides e fenilpropanoides são os constituintes principais que fornecem aroma característico e propriedades biológicas aos OEs. Estes são indicados para uma variedade de problemas de saúde por sistemas tradicionais de medicina, em todo o mundo. Várias atividades farmacêuticas e biológicas como propriedades antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas, antimutagénicas, antidiabéticas, antivirais, anti-inflamatórias e antiprotozoárias são-lhes atribuídas. A análise fitoquímica extensiva conduziu à caracterização e identificação de componentes principais de EOs que são de grande interesse, especialmente para indústrias cosméticas e farmacêuticas (Raut e Karuppaiyl, 2014).

O óleo essencial de *Juniperus communis* é um líquido aromático e volátil acumulado em cones (bagas) e folhas (agulhas). O óleo essencial das bagas é comumente usado na medicina tradicional e pela indústria farmacêutica, bem como na indústria de alimentos (principalmente como tempero e conservante de carne) e bebidas (como aroma de gin). Os ramos queimados

de *J. communis* produzem um fumo fortemente cheiroso que tem sido usado para fumar carne e peixe desde tempos antigos (Ložienė e Venskutonis, 2016).

Os óleos essenciais de *J. communis* e *J. virginiana*, entre outras espécies, são matérias-primas muito consumidas, sendo considerados produtos com grande procura nos mercados internacionais, estes óleos essenciais podem atingir cotações comerciais elevadas. Por estes motivos, durante a primeira metade da década de 1990 a comunidade científica internacional da especialidade dedicou muita atenção à caracterização da composição química de óleos essenciais de *Juniperus* (Cavaleiro, 2006b).

São vários os métodos analíticos disponíveis para extração e análise dos componentes do óleo essencial a partir de materiais vegetais, tais como a destilação por arrastamento de vapor (SD), extração-destilação simultânea (SDE), a extração assistida por microondas (MAE) e extração com fluido supercrítico (SFE) (Vichi *et al.*, 2007). De entre os métodos referidos, aqueles que envolvem o uso de destilação, apesar de frequentemente utilizados, podem conduzir à ocorrência de reações químicas ou degradação de compostos termolábeis. Também os métodos baseados na extração com solventes apresentam desvantagens, nomeadamente a perda de compostos voláteis durante o passo de evaporação a vácuo do solvente. A utilização de fluidos supercríticos permite ultrapassar as desvantagens referidas, contudo é uma técnica que utiliza equipamentos dispendiosos e nem sempre disponíveis. Tradicionalmente, o óleo é obtido por extração com um solvente orgânico (como *n*-hexano), mas o principal processo usado é a hidrodestilação de bagas esmagadas, secas, parcialmente secas ou bagas fermentadas (Larkeche *et al.*, 2015). Dependendo do método extrativo usado, a composição determinada para um óleo com a mesma proveniência pode variar, considerando-se SDE como sendo o método mais favorável à recuperação de mono e sequiterpenos e seus derivados oxigenados, ao passo que compostos com massa molecular mais elevada, como os diterpenóides, apenas foram observados em extratos obtidos por MAE e SFE (Vichi *et al.*, 2007).

Os óleos essenciais contêm diversos compostos na sua composição, de entre os quais se destacam os compostos terpénicos. Nas bagas de *Juniperus communis*, mais concretamente no seu óleo essencial, diversos autores têm descrito a presença de mono- e sequiterpenos, bem como dos seus derivados oxigenados. Apesar da sua composição poder variar com diversos fatores (acondicionamento, preparação das amostras, entre outros), a generalidade dos trabalhos refere a predominância de hidrocarbonetos monoterpénicos, sendo o α -pineno

o composto maioritário, seguido do β -mirceno e sabineno (Damjanovic *et al.*, 2003; Butkienė *et al.*, 2006; Orav *et al.*, 2010). Tal como o óleo essencial das bagas, o óleo essencial obtido das agulhas do zimbro é constituído predominantemente por compostos monoterpénicos, apresentando, contudo, diferenças comparativamente ao das bagas particularmente na predominância em limoneno, β -felandreno, α -pineno e sabineno (Ottavioli *et al.*, 2009).

Vichi *et al.* (2007) analisaram a composição do óleo essencial de bagas do zimbro por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de massa (GC-MS), após microextração em fase sólida (SPME) ou extração-destilação simultânea (SDE). Os autores descreveram um total de setenta e sete compostos, identificados por comparação com padrões ou provisoriamente identificados comparando os seus espectros de massa e índice de retenção com os descritos em bibliotecas de espectros de massa e na literatura, respetivamente. Dos compostos identificados, setenta e quatro foram detetados na amostra analisada por cromatografia gasosa após extração por SPME e sessenta e oito foram detetados no óleo obtido por SDE.

Refira-se que, para além da composição do óleo essencial poder variar com diversos fatores, incluindo o método extrativo, o mesmo pode acontecer relativamente ao rendimento de extração. As bagas contêm geralmente entre 0,2 a 3,42% de óleo essencial, dependendo de parâmetros específicos, tais como o clima, o solo, a altitude e o grau de maturação. Segundo a Farmacopeia Portuguesa (2008) as gábulas maduras e secas de *Juniperus communis* L. devem apresentar um teor mínimo de 10 mL/kg de óleo essencial.

1.3.3. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são classificados como fenóis simples ou polifenóis, com base no número de unidades de fenol na molécula. O interesse científico nestes compostos, como agentes químicos preventivos e terapêuticos contra várias doenças crónicas surgiu com particular interesse no final da década de 1990, devido ao chamado “paradoxo francês”. Este evidenciou uma baixa ocorrência de doenças cardíacas na população francesa apesar do consumo de dietas ricas em colesterol e gordura saturada, sendo esta atribuída à alta ingestão de polifenóis provenientes do vinho tinto. Atualmente considera-se que os efeitos positivos dos polifenóis no que respeita ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares possam estar, muito possivelmente, relacionados com o aumento da atividade antioxidante do plasma sanguíneo, o que por sua vez pode evitar a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade

(LDL) e, conseqüentemente, a agregação plaquetária. O facto de alguns polifenóis poderem também apresentar propriedades anti-inflamatórias poderá também contribuir para o seu efeito benéfico (Barros *et al.*, 2012). São também consideráveis os efeitos benéficos associados aos compostos fenólicos presentes nas frutas, vegetais, chás e vinhos. Por outro lado, vários estudos epidemiológicos, clínicos e *in vitro*, têm demonstrado múltiplos efeitos biológicos relacionados aos compostos fenólicos, tais como: atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogénica, entre outras (Sanchez-Rangel *et al.*, 2013).

Os compostos fenólicos são excelentes captadores/eliminadores de radicais de oxigénio porque o potencial de redução de eletrões do radical fenólico é menor do que o potencial de redução de eletrões dos radicais de oxigénio e também porque os radicais fenoxilo são geralmente menos reativos do que os radicais de oxigénio. Portanto, os compostos fenólicos podem eliminar intermediários reativos de oxigénio sem promover outras reações oxidativas. Sendo então considerados como uma das moléculas com maior potencial para neutralizar os radicais livres, a sua quantificação é uma prática comum em diferentes áreas no que respeita a investigação em alimentos e produtos naturais. No entanto, deve-se ter em conta que na determinação de compostos fenólicos totais em extratos de plantas, a presença de interferentes redutores (ex: ácido ascórbico) produz estimações imprecisas dos valores de compostos fenólicos totais.

Atualmente, encontram-se diversos métodos disponíveis para a quantificação do teor total de fenóis em produtos alimentares ou amostras biológicas, sendo frequentemente baseados na reação de compostos fenólicos com um reagente colorimétrico, o que permite a medição na parte visível do espectro (Ainsworth e Gillespie, 2007). De entre as várias metodologias, o ensaio Folin-Ciocalteu é possivelmente o procedimento mais frequentemente utilizado para determinar compostos fenólicos totais em extratos alimentares/plantas medicinais. Trata-se de um método colorimétrico baseado em reações de transferência de eletrões entre o reagente Folin-Ciocalteu e o composto fenólico. No entanto, o ensaio de Folin-Ciocalteu não é específico para determinações de compostos fenólicos totais. Sabe-se que há outros compostos que podem estar presentes em grande abundância em extratos de alimentos/plantas (tais como açúcares redutores e aminoácidos) que podem também reduzir o reagente Folin-Ciocalteu, sendo estes considerados compostos interferentes, podendo enviesar os resultados obtidos (Ainsworth e Gillespie, 2007). Embora a natureza química do reagente Folin-Ciocalteu não seja totalmente conhecida, acredita-se

que seja composto por heteropoli-fosfotungstatos/molibdatos. Da mesma forma, a natureza química exata da reação que leva à formação de uma coloração azul em meio alcalino (pH aproximadamente de 10, obtido pela adição de carbonato de sódio) é desconhecida e provavelmente assim permanecerá devido à sua complexidade (Sanchez-Rangel *et al.*, 2013).

1.3.4. Flavonoides

Os flavonoides são metabolitos secundários da classe dos polifenóis, sendo considerados dos mais abundantes no reino vegetal. Geralmente estão presentes nas partes aéreas das plantas de diferentes ecossistemas de todo o mundo. Os efeitos benéficos associados ao consumo de frutas e vegetais têm sido em grande parte atribuídos aos flavonoides, uma vez que se associam diversos efeitos biológicos a esta classe de substâncias, incluindo atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, hormonal (isoflavonas), propriedades venotônicas e atividade anticancerígena, entre outras (Fraga *et al.*, 2010). Destas, uma das propriedades mais conhecida e relevante é a sua capacidade antioxidante. Os flavonoides têm ainda uma série de funções fisiológicas importantes nas plantas, nomeadamente no desenvolvimento da raiz, germinação das sementes, em fenómenos de alelopatia, interação planta-bactérias, proteção de raios ultravioleta solares (principalmente UV-B) e defesa da planta contra agentes patogénicos, predadores e stress ambiental (Falasca *et al.*, 2014).

Os flavonoides são provenientes de duas vias metabólicas distintas (via do xiquimato e do acetato), apresentando uma estrutura comum C6-C3-C6, consistindo usualmente em 2 anéis aromáticos (A e B) ligados por uma cadeia de 3 carbonos, que usualmente se organiza num anel heterocíclico oxigenado (C). A estrutura geral de um flavonoide apresenta-se na Figura 4. De acordo com a estrutura e grau de oxidação do anel C, os flavonoides podem ser classificados em diferentes famílias tais como: flavonóis, flavonas, flavanonas, flavan-3-óis, isoflavonas, antocianinas, entre outras (Fraga *et al.*, 2010). Alguns exemplos destas famílias e das suas características encontram-se igualmente apresentados na Figura 4. De uma forma geral, os flavonoides dietéticos diferem na conjugação entre os anéis A e B, bem como nos arranjos dos grupos laterais (principalmente hidroxilo, mas também metoxilo) e ligações a açúcares (Heim *et al.*, 2002). Durante o metabolismo, pode ocorrer adição de grupos hidroxilo, os quais podem ser metilados, sulfatados ou conjugados com moléculas de ácido glucorónico.

Nos alimentos, os flavonoides existem principalmente como 3-O-glicosídeos e polímeros (Heim *et al.*, 2002). Estes últimos, compreendem uma fração substancial do consumo de flavonoides na dieta, nomeadamente na forma de taninos condensados, ou proantocianidinas, que consistem em unidades de flavan-3-óis (Heim *et al.*, 2002).

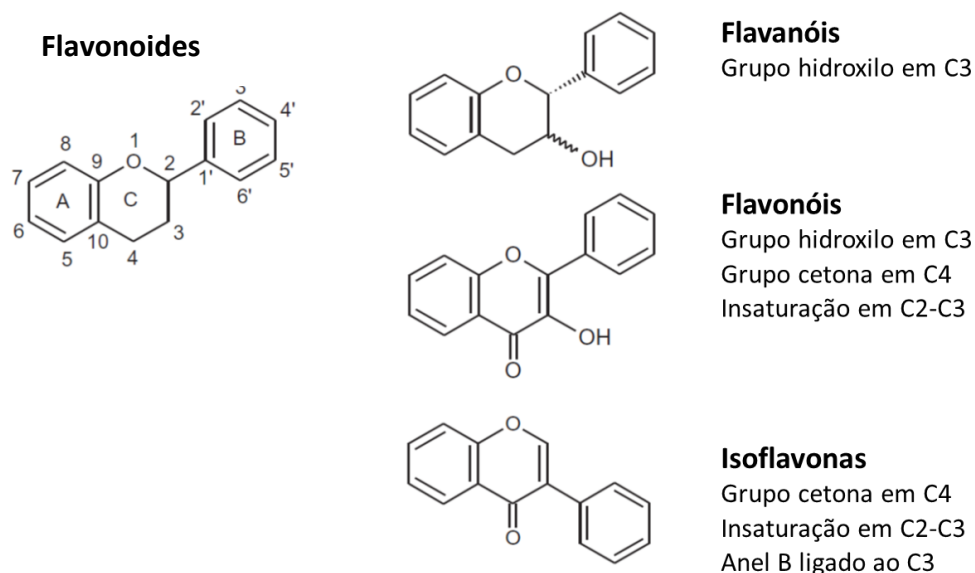


Figura 4. Estrutura geral dos flavonoides e exemplos das suas subfamílias (adaptado de Fraga *et al.*, 2010).

Diferentes estudos têm mostrado que uma das principais classes de metabolitos existentes nas bagas do zimbro são flavonoides e biflavonoides, sendo que os primeiros incluem derivados pentosídicos de isoscutelareína e hipolaetina, mono- e di-glucósidos de quercetina e campferol, e os biflavonoides consistem principalmente nos compostos amentoflavona e cupressoflavona (Innocenti *et al.*, 2007). Segundo Falasca *et al.* (2014), as bagas de *J. communis* contêm diversos compostos pertencentes à família das catequinas (flavan-3-óis). Recentemente, Miceli e co-autores (2009) estudaram a composição de bagas de duas variedades de *J. communis* colhidas na Turquia, tendo identificado um total de 16 flavonoides diferentes, dos quais os compostos maioritários foram a hipolaetina-7-pentósido, quercetina-hexósido e isoscutelareína-8-O-hexósido. Os mesmos autores descreveram ainda, pela primeira vez, a presença de gossipetina-hexosil-pentósido e gossipetina-hexósido.

1.4. Atividades biológicas do zimbro – revisão bibliográfica

Das diferentes propriedades biológicas aportadas ao zimbro quer para as bagas do zimbro, quer para o seu óleo essencial, destacam-se as suas propriedades diuréticas, antissépticas, estomáquicas e carminativas, sendo ainda referida a utilização de decocções, obtidas de ramos contendo bagas, para o alívio de infeções renais (Taviano *et al.*, 2010). Na medicina tradicional Turca, as bagas são ainda usadas para o tratamento de reumatismo, gota e de doenças cardíacas e de pele (Elmastaş *et al.*, 2006). Adicionalmente, o zimbro foi classificado como uma cura tradicional para problemas no peito, tais como bronquite (Gordien *et al.*, 2009). O óleo essencial obtido de bagas do zimbro é referido como tendo atividade anti-inflamatória, anti-hiperglicémica, antiartrítica, antiviral e anticancerígena (El-Ghorab *et al.*, 2008).

Até à presente data encontram-se descritos na bibliografia vários estudos que visam a avaliação de atividades biológicas do zimbro, em particular atividade antimicrobiana e antioxidante, com especial incidência para o óleo essencial do zimbro, uma vez que vários autores consideram que esta fração é provavelmente responsável pelas propriedades biológicas associadas a esta espécie (*J. communis*) (Filipowicz *et al.*, 2003).

Nas subsecções seguintes detalhar-se-ão as atividades antimicrobiana e antioxidante descritas na literatura científica, uma vez que constituem objetivo da presente tese.

1.4.1. Atividade antioxidante

As reações de oxidação são essenciais para muitos organismos vivos para produção de energia que serve de combustível a processos biológicos. No entanto, as espécies reativas de oxigénio (ROS) que são continuamente produzidas *in vivo*, podem provocar danos nos tecidos e morte celular. Contudo, os seres vivos aeróbios têm defesas endógenas, tais como as enzimas superóxido dismutase e catalase, que lhes permite realizar a eliminação de ROS, como o anião superóxido e o peróxido de hidrogénio. O stress oxidativo ocorre quando a formação de radicais livres excede a capacidade do corpo para se proteger. Desta forma, a presença de espécies reativas tais como radicais hidroxilo e radicais de óxido nítrico têm sido amplamente implicados na etiologia de diversas doenças. O dano oxidativo causado por radicais livres pode ser relacionado com o envelhecimento e doenças crónicas, tais como a

arteriosclerose, diabetes e cancro. Embora quase todos os organismos possuam sistemas antioxidantes de defesa e reparação, que evoluíram para protegê-los contra danos oxidativos através de remoção de espécies reativas ou supressão da sua geração, estes sistemas podem não ser suficientes para inteiramente prevenir os danos provocados por radicais livres. Desta forma, os suplementos antioxidantes, ou os alimentos que contenham antioxidantes, podem ser usados para ajudar o corpo humano a reduzir estes efeitos nefastos (Elmatas *et al.*, 2006). Por este motivo, recentemente, têm sido realizados inúmeros estudos sobre diversos fitoquímicos presentes em alimentos e plantas medicinais, assim como os efeitos na saúde, em especial no que respeita a supressão de ROS. Assim, encontra-se descrita na bibliografia a realização de estudos sobre antioxidantes naturais existentes nos chás, especiarias, ervas aromáticas, entre outros alimentos vegetais que têm sido extensivamente estudados (Elmastaş *et al.*, 2006). Adicionalmente, existem evidências *in vivo* de que o consumo de certos alimentos, incluindo as especiarias, conduz à redução de biomarcadores de danos oxidativos e que, compostos extraídos desses mesmos alimentos, apresentam uma elevada capacidade antioxidante *in vitro* (Hossain *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011). Assim, o estudo da atividade antioxidante de produtos naturais consumidos habitualmente apresenta uma grande relevância, uma vez que estes compostos desempenham um papel importante, quer a nível da conservação de alimentos por inibição da oxidação, quer a nível de efeitos benéficos para a saúde humana.

As espécies reativas de oxigénio podem também facilmente desencadear processos de peroxidação nos lípidos membranares, o que pode conduzir a uma acumulação de peróxidos e de produtos secundários de oxidação, que por sua vez podem reagir com outros substratos, como proteínas e DNA. A oxidação lipídica tem sido classificada como o principal processo de deterioração que afeta tanto a qualidade nutricional como sensorial de alimentos, especialmente de produtos com elevado teor de lípidos. Enquanto a oxidação lipídica em alimentos representa um desafio para a preservação da qualidade de alimentos, o stress oxidativo *in vivo* conduz a efeitos destrutivos por oxidação de lípidos membranares, proteínas celulares, enzimas e DNA, podendo conduzir à morte celular. A oxidação de lípidos pode ocorrer por diferentes vias, sendo o processo de auto-oxidação, definido como a reação espontânea do oxigénio atmosférico com lípidos, o processo mais comum levando à deterioração oxidativa e consequentes danos nos sistemas alimentares e biológicos. Tem sido

amplamente aceite que a oxidação lipídica ocorre através de um mecanismo de reação em cadeia de radicais livres (tais como radicais lipídicos R•, alcoxilo RO•, peroxilo ROO• e hidroxilo OH•). Os produtos primários de oxidação lipídica, para além de instáveis e reativos, originam uma vasta gama de produtos de oxidação secundários, incluindo álcoois, aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos, entre outros, alguns dos quais dão origem a mau odor, sendo responsáveis pelas notas "off-flavour" de alimentos deteriorados devido a fenómenos oxidativos (Shahidi e Zhong, 2015).

Entre os muitos métodos utilizados para controlar a oxidação de lípidos em alimentos, a indústria recorre frequentemente à utilização de antioxidantes, sendo esta considerada como uma abordagem eficaz, conveniente e económica. Vários antioxidantes sintéticos, tais como o *terc*-butil-4-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT) e *terc*-butil-hidroquinona (TBHQ), foram utilizados durante décadas na conservação de alimentos devido ao seu baixo custo e sabor agradável (Shahidi e Zhong, 2015). No entanto, estes têm caído em desuso, pois recentemente, os consumidores preocupam-se cada vez mais com os produtos que ingerem, privilegiando os ingredientes naturais em detrimento dos alimentos com aditivos sintéticos.

Sabe-se que a atividade antioxidante pode ser primária ou secundária: antioxidantes primários, como os tocoferóis e alguns compostos fenólicos, captam radicais livres, inibindo as reações de iniciação e propagação em cadeia, ao passo que antioxidantes secundários previnem ou retardam os processos oxidativos porque suprimem a formação de radicais/promotores de oxidação, protegendo assim o dano oxidativo (Miceli *et al.*, 2009, Shahidi e Zhong, 2015). Por sua vez, o poder redutor mostra a capacidade de terminar a reação em cadeia de radicais livres e pode ser considerado como um indicador significativo da potencial atividade antioxidante de um extrato.

De uma forma geral, os antioxidantes podem ser agrupados em diferentes classes, dividindo-se em dois grandes grupos, enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos incluem as enzimas catalase, glutatona redutase, entre outras, ao passo que os antioxidantes não enzimáticos incluem diversos grupos de compostos tais como os flavonoides, ácidos fenólicos, vitaminas e carotenoides (Moon *et al.*, 2009).

A atividade antioxidante pode ser monitorizada por uma variedade de ensaios baseados em diferentes mecanismos, sendo os mais frequentemente utilizados os ensaios químicos baseados na transferência de átomos de hidrogénio (HAT) e a transferência de um único

eletrão (ET) (Shahidi e Zhong, 2015). Entre os diferentes ensaios químicos as metodologias baseadas na captação de radicais livres ou ROS, utilizadas são: *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC), *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC) e o ensaio de captação do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), e as metodologias baseadas no potencial redox utilizadas são: *Ferric reducing antioxidant power* (FRAP) e *Cupric reducing antioxidant capacity* (CUPRAC). As metodologias baseadas na determinação da capacidade de captação/eliminação de ROS estão geralmente associadas à utilização de espécies radicais específicas, algumas das quais podem ser obtidas de forma “artificial”, podendo ser consideradas como biologicamente irrelevantes. Desta forma, este tipo de ensaios apresenta como desvantagem o facto de não refletir realisticamente a situação num alimento em processo de oxidação ou numa situação *in vivo*. Contudo, tratam-se de uma forma geral de ensaios simples, rápidos e, por isso, frequentemente utilizados para um “screening” inicial da capacidade antioxidante de novos compostos ou extratos obtidos de matrizes naturais (Shahidi e Zhong, 2015).

Acresce que, quando considerados os diversos métodos para determinar a atividade antioxidante de extratos como o caso das plantas, por exemplo: DPPH, ABTS e teste da descoloração do caroteno, cada um deles apresenta limitações. Para além disso, tem-se evidenciado que a atividade antioxidante de extratos não pode ser razoavelmente validada por um único método, devido à natureza complexa dos fitoquímicos e suas interações, sendo assim importante, a utilização de diferentes métodos/sistemas para a avaliação da atividade antioxidante de uma determinada matriz (Taviano *et al.*, 2013).

Seguidamente, referir-se-ão algumas das metodologias frequentemente usadas para avaliação da capacidade antioxidante de alimentos ou outras matrizes naturais.

Ensaio da capacidade de captação de radicais DPPH

O ensaio de captação do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) tem sido amplamente utilizado como método químico para investigar o potencial antioxidante de matrizes naturais, com especial relevância em extratos de plantas (Braca *et al.*, 2001). Trata-se de um dos métodos mais frequentemente utilizado e oferece a primeira abordagem de avaliação da atividade antioxidante. O DPPH é um radical cromogénio estável, comercialmente disponível. Imediatamente a seguir à sua preparação, a solução do radical DPPH apresenta uma cor púrpura/violeta, com um máximo de absorção a 517 nm. O ensaio

DPPH é baseado na doação de elétrons de antioxidantes para neutralizar o radical DPPH, sendo a reação acompanhada com a mudança de cor medida a 517 nm. Assim, quando o radical entra em contacto com um antioxidante, este é convertido a 2,2-difenil-1-picril-hidrazina que, por sua vez, apresenta uma coloração amarela pálida, o que origina uma diminuição da absorvância a 517 nm. Assim, a alteração da cor atua como um indicador da eficácia antioxidante. A reação encontra-se esquematicamente descrita na Figura 5. A concentração de antioxidante que causa uma diminuição de 50% da quantidade inicial do radical DPPH é denominada EC₅₀.



Figura 5. Esquema de evidência de reação de redução do radical DPPH.

O ensaio de DPPH apresenta vantagens por ser uma técnica simples, rápida e que não requer nenhum tratamento especial da amostra (Karadag *et al.*, 2009). No entanto, a metodologia baseia-se numa substância que não existe a nível celular e apresenta desvantagens, tal como ser afetada por diversos fatores como o tipo e quantidade de solvente utilizado e a frescura do reagente (Shahidi e Zhong, 2015). De facto, este método apresenta algumas limitações uma vez que o reagente DPPH não deve ser dissolvido em meio aquoso, sendo preferencialmente dissolvido em solventes alcoólicos, adicionalmente, os resultados podem ser afetados pelas alterações do reagente decorrentes da ação da luz e do oxigénio, pelo que este deve ser preferencialmente preparado de fresco (Karadag *et al.*, 2009). Deve ainda ter-se em consideração que o DPPH é um radical estável, podendo os antioxidantes presentes na amostra interferir na redução de outros radicais envolvidos na peroxidação lipídica como os ROO•, por exemplo, e não ter qualquer efeito ou agir lentamente na captação do DPPH que se torna inacessível aos mesmos (Prior *et al.*, 2005). Por último, refira-se que

alguns compostos que absorvem comprimentos de onda similares, tal como os carotenoides, podem interferir nos resultados (Karadag *et al.*, 2009).

Ensaio do poder redutor

Os antioxidantes são também conhecidos como redutores. A sua capacidade de doador de elétrons pode não só permitir a eliminação de radicais livres e outros derivados de oxigênio/ROS, mas também reduzir elementos de valência superior ao seu estado de valência inferior. O potencial redox ou poder redutor de antioxidantes é um indicador importante da sua eficácia antioxidante, podendo ser medida através da reação redox com vários íons metálicos, tais como ferro, cobre, cromo, entre outros.

Recentemente, o ferricianeto de potássio tem sido o reagente férrico mais popular, sendo usado em ensaios de *Ferric reducing antioxidant power* (FRAP). De uma forma geral, os antioxidantes podem reduzir o Fe^{3+} na solução a Fe^{2+} , que se liga ao ferricianeto produzindo uma coloração azul da Prússia, ou reduzir o ferricianeto a ferrocianeto, que se liga ao Fe^{3+} na solução formando azul da Prússia. O esquema simplificado destas reações é apresentado na Figura 6.

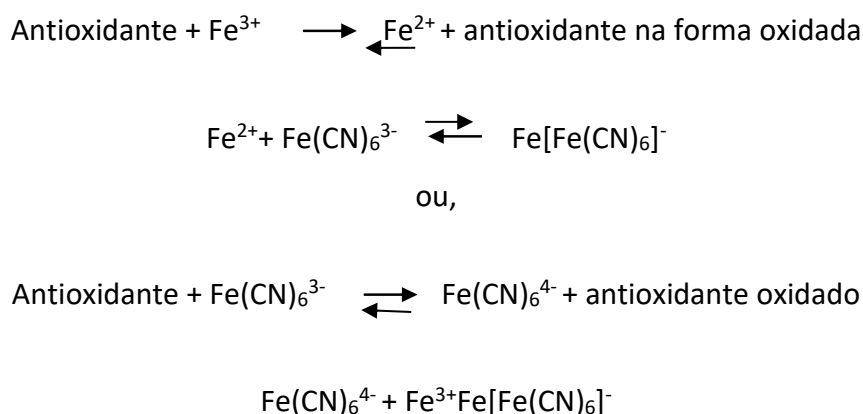


Figura 6. Esquema simplificado das reações que ocorrem no ensaio do poder redutor de antioxidantes (adaptado de Shahidi e Zhong, 2015).

Desta forma, o poder redutor de um composto antioxidante pode ser estimado por espectrofotometria, uma vez que a solução de ensaio de Fe(III)/ferricianeto [$\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$], que apresenta uma coloração amarela, ao ser reduzida a Fe(II) pelos agentes antioxidantes presentes na amostra, conduz a uma alteração da cor, podendo esta alteração ser medida a

cerca de 700 nm. A reação deve ser realizada em meio ácido (pH = 3,6) por forma a manter a solubilidade do ferro (Karadag *et al.*, 2005).

Também esta metodologia apresenta as suas limitações, nomeadamente qualquer composto (mesmo sem propriedades antioxidantes) que tenha um potencial redox inferior ao do par Fe(III)/Fe(II) pode, teoricamente, reduzir o Fe(III) a Fe(II), interferindo desta forma nos resultados. Por outro lado, nem todos os antioxidantes têm a capacidade de reduzir o Fe(III) no tempo utilizado para este ensaio, ao passo que outros podem atuar por outros mecanismos que não reações redox (Magalhães *et al.*, 2008).

Estudos realizados com o zimbro

Em trabalhos disponíveis na literatura, extratos de *Juniperus communis* apresentaram atividade de captação de radicais livres, parecendo ser, portanto, evidente que estes possam atuar como antioxidantes primários e secundários. A atividade como antioxidante primário parece estar relacionada com o teor total de polifenóis, demonstrando assim que os polifenóis, livres ou glicosilados, desempenham um papel importante na proteção contra os radicais livres. Os compostos fenólicos são um grupo importante de princípios ativos que atuam como antioxidantes primários; estes compostos, tal como é conhecido, podem reagir com os radicais de oxigênio, como radicais hidroxilo, anião superóxido e radical de peróxido, e inibir a oxidação de lípidos numa fase precoce. Verificou-se que os extratos de *J. communis* contêm quantidades elevadas de flavonoides, tais como quercetina-hexósido e hipolaetina-7-pentósido, e de biflavonóides tais como a amentoflavona. Por conseguinte, a atividade antioxidante dos extratos pode estar associada, pelo menos em parte, à presença destes compostos flavonoides (Miceliet *al.*, 2009).

1.4.2. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana de plantas, conduzida a partir dos metabolitos secundários que produzem, é importante para a existência do equilíbrio ecológico dinâmico, condição básica para a vida na Terra. (Matovic *et al.*, 2011). Nos últimos anos, determinados agentes patogénicos têm aumentado em grande escala a resistência aos antibióticos, constituindo

uma preocupação crescente. Com efeito, a seleção de estirpes resistentes ocorre tão rapidamente para algumas combinações bactéria/antibacteriano que a utilidade clínica do fármaco é severamente diminuída, o que poderá implicar que as bactérias resistentes se tornem mais populosas que as restantes.

Assim, os fármacos com atividade antimicrobiana e com origem em fontes naturais (como por exemplo, nas plantas superiores) surgem como uma fonte promissora no campo da antibioterapia, particularmente devido à sua diversidade estrutural na natureza e devido ao facto destas armas naturais terem sido compostas evolutivamente, tornando-se efetivas na erradicação de microrganismos específicos (Walsh, 2003).

Vários compostos de interesse terapêutico, provenientes de plantas, microrganismos, animais marinhos, vertebrados e invertebrados terrestres encontram-se comercialmente disponíveis. A sua importância na medicina moderna tem sido amplamente discutida em vários estudos. Com efeito, estes fármacos são usados para tratar 87% das patologias humanas e incluem: agentes antibacterianos, anticancerígenos, anticoagulantes, antiparasitários e imunossuppressores (Newman *et al* 2003).

As plantas terrestres têm uma longa história no que respeita ao seu uso no tratamento de doenças humanas, sendo reportadas como as primeiras fontes naturais de fármacos. Como princípio ativo de vários fármacos, ainda hoje, apresentam aplicabilidade no campo clínico, com são exemplos o alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*), a mirra (*Commiphora* species) e a papoila (*Papaver somniferum*) (Chin *et al* 2005 e Dewick 2002).

No caso particular das bagas da espécie *J. communis*, tradicionalmente utilizadas pela sua ação antisséptica, diversos estudos têm incidido na avaliação da sua atividade antimicrobiana (Filipowicz *et al.*, 2003; Cavaleiro *et al.*, 2006b; Pepeljnjak *et al.*, 2005; Glisic *et al.*, 2007). Alguns polifenóis, em particular flavonoides, demonstraram ser agentes antimicrobianos eficazes contra uma ampla variedade de microrganismos. Acresce que os estudos efetuados sobre o mecanismo de ação de flavonoides têm mostrado que alguns destes compostos têm múltiplos alvos celulares em vez de um local específico de ação (Miceli *et al.*, 2009). De igual forma, como referido, diversos compostos terpénicos presentes em óleos essenciais, têm demonstrado ter atividade antimicrobiana. O facto dos flavonoides e compostos terpénicos serem constituintes dos extratos da baba do zimbro, justifica o estudo da sua atividade antimicrobiana. De facto, em estudos já realizados verificou-se que o óleo do zimbro possui uma forte atividade bactericida contra bactérias gram-positivas, atividade esta superior do

que a exercida contra bactérias gram-negativas. Adicionalmente, o óleo apresentou ainda uma forte atividade fungicida contra leveduras e fungos, como dermatófitos. A maioria dos trabalhos realizados até à presente data, incidem sobre a avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais do zimbro, contudo foram também realizados estudos utilizando extratos metanólicos ou hidroalcoólicos (Sati *et al.*, 2010). No trabalho realizado por Sati *et al.* (2010), todas as estirpes bacterianas testadas foram sensíveis aos extratos testados (metanol, etanol, clorofórmio e hexano) (Sati *et al.*, 2010). Por outro lado, Miceli *et al.* (2009) avaliou a atividade de extratos metanólicos obtidos de bagas do zimbro face a diversas bactérias, nomeadamente *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus shirae*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Candida sp.* tendo verificado inibição apenas para o crescimento de bactérias Gram-positivas.

De uma forma geral, pode considerar-se que a avaliação da atividade antimicrobiana é uma técnica complexa devido às diferentes variáveis interferentes, como o método de extração da amostra, o meio de cultura, a concentração do inóculo e o método utilizado (difusão em disco, microdiluição em caldo, entre outros) (Tajkarimi *et al.*, 2010). A atividade antibacteriana de extratos de *J. communis* tem sido frequentemente avaliada utilizando o método de difusão em disco. Geralmente, é determinada a concentração mínima inibitória (MIC) e/ou a concentração mínima bactericida (MBC). Há uma tendência por parte dos autores a adotarem várias definições para MIC e MBC, sendo que alguns autores consideram a MIC como sendo a concentração de agente antimicrobiano necessária para inibir o crescimento de bactérias em 48 horas de incubação, outros como sendo a concentração inferior que permite uma redução significativa da viabilidade de um inóculo (>90%) (Tajkarimi *et al.*, 2010). Segundo a *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* a MIC define-se como sendo a concentração mais baixa de um antimicrobiano que inibe o crescimento visível de um microrganismo após incubação durante a noite e a MCB como a concentração mais baixa de um antimicrobiano que previne o crescimento de um microrganismo após a sua subcultura num meio sem antibiótico (Andrews, 2001). Em qualquer dos casos, quanto menor o valor de MIC, maior a potência antimicrobiana do composto. As MICs são muito usadas em laboratórios de diagnóstico para confirmação de resistências aos antibióticos, mas ainda mais frequentemente em trabalhos de investigação

para a determinação *in vitro* da atividade antimicrobiana de novos compostos (Andrews, 2001).

Assim, e no caso dos agentes antimicrobianos, os produtos naturais têm apresentado contribuições significativas quer como tratamento direto, quer como moléculas base para modificações sintéticas, as plantas terrestres representam uma vasta fonte de substâncias bioativas estruturalmente diversificadas e promovem uma contribuição cada vez mais importante na descoberta de agentes antibacterianos.

1.5. **Motivação e objetivos**

Atualmente, verifica-se a existência de um número crescente de consumidores que se preocupa com a qualidade e segurança dos alimentos que ingerem. Por outro lado, cada vez mais a população em geral, principalmente nos países desenvolvidos, recorre ao consumo de produtos processados provenientes da indústria agroalimentar, os quais incluem diversos aditivos nas suas formulações. Neste contexto, em que é importante garantir a segurança microbiológica dos produtos e simultaneamente estender o seu tempo de prateleira, recorrendo-se por isso à utilização de conservantes alimentares, muitos consumidores preocupam-se pelo facto de estes serem maioritariamente aditivos sintéticos. Desta forma, existe um interesse crescente em encontrar alternativas consideradas mais vantajosas e “naturais” face aos aditivos sintéticos, tais como extratos de plantas, óleos essenciais e/ou compostos purificados extraídos de plantas.

Por outro lado, tendo em conta o crescente uso de especiarias na cozinha moderna e a sua utilização ancestral com diferentes finalidades, incluindo terapêuticas, vários estudos se têm desenvolvidos em torno destas, focando principalmente as especiarias mais populares e utilizadas. Assim, têm sido descritas diferentes atividades associadas a compostos químicos maioritários de diferentes especiarias, tal como a capacidade de inibição do crescimento de determinados microrganismos patogénicos demonstrada pelo cinamaldeído e eugenol, bem como propriedades antioxidantes e antimicrobianas associadas a diferentes compostos fenólicos (Torres *et al.*, 2015). Entre as especiarias menos conhecidas e/ou utilizadas, encontra-se o zimbro, nomeadamente as suas bagas. Apesar destas serem frequentemente utilizadas na aromatização de bebidas alcoólicas, como o gin, são menos conhecidas como condimentos. Contudo, na região de Trás-os-Montes, em particular, estas bagas são

frequentemente utilizadas no tempero de carnes de caça. Assim, este trabalho pretendeu contribuir para a caracterização deste produto no que respeita a sua composição nutricional (proteínas, gordura, hidratos de carbono, humidade e cinzas), à sua composição em ácidos gordos, fenóis totais e flavonoides totais e potenciais atividades biológicas (antibacteriana e antioxidante), tendo-se avaliado bagas colhidas na natureza e bagas adquiridas comercialmente (vendidas como condimento alimentar em supermercados).

2. Material e Métodos

2.1. Amostras

Para a realização da presente dissertação foram obtidas três amostras vegetais distintas: duas foram adquiridas comercialmente em diferentes estabelecimentos (A1 e A3), e a terceira amostra (A2) foi recolhida na natureza. O material vegetal de origem comercial A1 foi obtido na ervanária Alma d'Flor (empresa portuguesa sediada em Almada que investiga, produz e comercializa produtos 100% naturais), na forma de bagas secas. Nesta ervanária foi ainda adquirido óleo essencial obtido de bagas do zimbro por hidrodestilação (lote 268/2013 com 80,4% de pureza e prazo de validade até 9/2017). A amostra A3 foi obtida na superfície comercial Continente. A amostra A2 que corresponde as bagas e folhas do zimbro colhidas em meio natural, na região de Bragança, tendo o material vegetal sido seco a 30°C, ao abrigo da luz.

2.2. Padrões e reagentes

O Butil-hidroxitolueno (BHT), o hidróxido de potássio e o sulfato de magnésio foram adquiridos à empresa Sigma-Aldrich Chemical Co.; o cloreto de sódio e o metanol p.a. foram adquiridos à empresa AnalaR Normapur; o triflureto de boro (solução de BF₃ em metanol a 14%) foi adquirido à empresa Merck Schuchardt e o *n*-heptano, com pureza adequada para GC, foi comprado ao fornecedor Chromanorm Co. Para identificação dos ácidos gordos utilizou-se uma mistura de 37 FAME puros (material de referência certificado CRM47885) da Supelco.

O padrão usado na determinação de compostos fenólicos totais foi o ácido gálico, o qual foi comprado à Merck; para a determinação de flavonoides totais utilizou-se a catequina como padrão, adquirida na Cayman Chemical Company. O reagente de Folin-Ciocalteu foi adquirido à Panreac, o 2,2-difenil-1- picrilhidrazilo (DPPH) à Sigma-Aldrich. Para a preparação das soluções de carbonato de sódio (Na₂CO₃), nitrito de sódio (NaNO₂), cloreto de alumínio (AlCl₃), hidróxido de sódio (NaOH), tampão fosfato de sódio (NaH₂PO₄.H₂O e Na₂HPO₄), ferricianeto de potássio (K₃[Fe(CN)₆]), ácido tricloroacético (CCl₃COOH), cloreto férrico (FeCl₃), ácido sulfúrico (H₂SO₄) e ácido clorídrico (HCl) foram utilizados reagentes de pureza pró-análise.

2.3. Valor Nutricional

Para a determinação do valor nutricional das amostras, procedeu-se à análise do teor em humidade, proteínas, lípidos e cinzas (minerais) com base nos procedimentos AOAC (1995). De forma sucinta, o teor de humidade foi determinado em aproximadamente 1 g de amostra, a qual foi colocada numa estufa a 100 °C até obtenção de peso constante; o teor de lípidos foi determinado em aproximadamente 5 g de amostra através de extração em Soxhlet com *n*-hexano; o teor de proteína total (N x 6,25) foi determinado em 1 g de amostra pelo método de Kjeldahl e o teor em cinzas foi determinado em aproximadamente 1 g de amostra por incineração em mufla a 500 °C, até à obtenção de cinzas esbranquiçadas. O teor em hidratos de carbono (% HC) foi estimado por diferença, utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ HC} = 100\% - (\% \text{ humidade} + \% \text{ proteína} + \% \text{ lípidos} + \% \text{ cinza})$$

Todas as análises foram realizadas, no mínimo, em duplicado. Previamente à sua realização, as amostras foram individualmente trituradas num moinho (Ika A11 basic).

2.4. Ácidos Gordos

Para a análise da composição em ácidos gordos procedeu-se à extração da gordura com *n*-hexano em aparelho de Soxhlet. Para minimizar eventuais reações de oxidação, foi adicionado ao solvente de extração 1 mL de solução BHT (1 µM). Inicialmente, procedeu-se à maceração da amostra em *n*-hexano a frio durante 1 hora, seguida de extração a quente durante 1 hora. Depois da extração da gordura, a maioria do *n*-hexano foi eliminado em rotavapor (Büchi) seguida de uma secagem em corrente de azoto. As amostras foram imediatamente utilizadas para a preparação de FAMES ou guardadas em atmosfera de azoto e protegidas da luz. Para proceder à reação de transesterificação, num vial de vidro colocaram-se 50 µL amostra, adicionaram-se 25 µL de BHT (1 µM) e 4 mL de solução metanólica de KOH (11 g/L), tendo-se homogeneizado a mistura obtida por agitação vigorosa em vórtex. Seguidamente, o vial foi colocado na estufa a 90°C, durante 15 minutos, proporcionado a ocorrência da reação de transesterificação dos ácidos gordos. Após este período, as amostras

foram retiradas da estufa e arrefecidas, adicionou-se 2 mL de solução metanólica de BF₃ e levou-se novamente o vial à estufa a 90 °C, durante um período de 30 min. Após arrefecimento do vial, adicionou-se 2 mL de *n*-heptano e 2 mL de solução saturada de NaCl, seguindo-se uma agitação vigorosa em vórtex. Após separação de fases, retirou-se a fase superior para um novo vial, ao qual foi adicionado sulfato de magnésio anidro. Cada amostra foi submetida a extração em duplicado. Após diluição da amostra em *n*-heptano (1:2), estas foram analisadas num sistema de cromatografia gasosa (GC) Bruker SCION 436-GC, equipado com um injetor *split-splitless*, um detetor de ionização em chama (FID) e um amostrador automático Bruker CP-8410. A separação dos ácidos gordos foi realizada numa coluna cromatográfica de sílica CP-Sil 88 (50m x 0.25mm i.d x 0.39mm e.d., Agilent J&W). O injetor foi colocado a 260°C, o volume de injeção foi de 1 µL de amostra. Como gás de arraste foi utilizado hélio com um caudal na coluna de 1 mL/min e utilizou-se uma razão de split de 1:25. O forno foi colocado a uma temperatura inicial de 160°C, a qual foi mantida durante três minutos, após o que foi programada para aumentar a 3°C/min até atingir a temperatura final de 229 °C, sendo esta mantida durante dois minutos. A temperatura do detetor FID foi fixada em 270°C com os seguintes fluxos de gases: Ar= 350 mL/min, Hidrogénio= 35 mL/min e Azoto= 30 mL/min. A recolha e tratamento dos dados obtidos foram efetuados utilizando o software CompassCDS 3.0 (Bruker, Alemanha). Os picos de FAMES foram identificados por comparação dos tempos de retenção com os obtidos com uma mistura de 37 FAMES (material de referência certificado CRM47885da Supelco). Alguns dos picos, nomeadamente C18:1*n*7, C22:5*n*6, C24:2*n*6, C22:5*n*3 foram identificados com base nas informações obtidas na literatura (Bicalho et al.,2008). As amostras foram analisadas em triplicado.

2.5. Avaliação da atividade antioxidante

2.5.1. Preparação dos extratos das amostras

No presente trabalho foram estudados os extratos metanólicos das amostras. Para tal, foram adicionados 50 mL de metanol a 2,5 g de cada uma das amostras previamente moídas, sendo a mistura agitada durante 3 horas, a 20 °C e 320 rpm. Após esse período, as amostras foram filtradas e os resíduos obtidos foram reextraídos sob as mesmas condições. Após junção dos extratos de cada amostra, procedeu-se à evaporação do solvente em rotavapor Buchi, a

45 °C. O resíduo obtido foi redissolvido em metanol e utilizado após diluição adequada para a determinação do teor total em fenóis, teor total em flavonoides, atividade antioxidante e poder redutor.

2.5.2. Determinação de Fenóis totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais dos extratos metanólicos de bagas e folhas do zimbro foi efetuada por um método espectrofotométrico, utilizando o reagente Folin–Ciocalteu. Para a obtenção da curva de calibração, utilizou-se uma solução metanólica de ácido gálico, composto fenólico usado como padrão, com concentrações respectivamente de 1, 5, 10, 50, 100 e 250 mg/L.

Misturou-se 500 µL de cada extrato (1 a 5 mg/mL) com 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (1:10 (v/v) em água) e 2 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (75 g/L). Os tubos foram ao vórtex por 15 segundos e deixaram-se a repousar por 30 minutos a 40°C, ao abrigo da luz, para o desenvolvimento de cor. Seguidamente, mediu-se a absorvância a 765 nm num espectrofotómetro de feixe duplo (Jasco V-530) e calculou-se a concentração utilizando a curva padrão obtida. O teor em fenóis totais foi estimado em equivalentes de ácido gálico (EAG) e expresso em mg EAG por grama de extrato, tendo as análises sido realizadas em triplicado.

2.5.3. Determinação Flavonoides totais

A determinação de flavonoides totais foi realizada por espectrofotometria segundo a metodologia descrita por Jia *et al.* (1999), tendo-se utilizado uma solução padrão de catequina com concentrações respetivas de 25, 50, 80, 100, 250 e 500 mg/L para obtenção da curva de calibração.

Misturou-se 500 µL de cada extrato (1 a 5 mg/mL) com 2 mL de água destilada e, posteriormente, com 150 µL de solução de NaNO₂ (5%). Os tubos foram ao vórtex por 15 segundos e deixou-se repousar por 6 minutos. De seguida adicionaram-se 150 µL de solução AlCl₃ (10%), voltou se a vortexar os tubos durante 15 segundos e deixaram-se repousar durante 6 minutos. Por fim, adicionaram-se 2 mL de solução de NaOH (4%) e 200 µL de água

destilada, vortexou-se por mais 15 segundos e deixaram-se repousar por mais 15 minutos para desenvolvimento de cor. Passado esse tempo, procedeu-se à leitura da absorvância em espectrofotómetro a 510 nm. A concentração de flavonoides foi calculada utilizando a curva de calibração obtida com catequina e foi expressa em mg de catequina por g de extrato. As determinações foram feitas em triplicado.

2.5.4. Poder redutor

O poder redutor dos extratos foi determinado de acordo com o método descrito por Miceli *et al.* (2009), com ligeiras modificações. Diferentes quantidades de extratos (foram preparadas concentrações entre 20 mg/mL e 0,3125 mg/mL no caso das amostras de bagas e entre 2,5 mg/mL e 0,078 mg/mL no caso da amostra de folhas), foram misturadas com 1 mL de tampão de fosfato de sódio (0,2 M a pH=6,6) e 1 mL de solução a 1% de ferricianeto de potássio. A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min e após arrefecimento adicionou-se 1mL de ácido tricloroacético (10%). Seguidamente, centrifugou-se a 3000 rpm durante 10 min e o sobrenadante resultante (2 mL) foi misturado com 2 mL de água desionizada e 0,4 mL de FeCl₃ (0,1%). A absorvância da mistura obtida foi medida a 700 nm com um espectrofotómetro de feixe duplo (Jasco V-530,2004). A concentração de extrato correspondente ao EC₅₀ foi calculada a partir do gráfico de absorvância a 700 nm em função da concentração do extrato. Como padrão de referência utilizou-se uma solução de BHT em metanol com as seguintes concentrações: 78, 156, 312,5, 625, 1250 e 2500 mg/L. Os ensaios foram realizados em triplicado.

2.5.5. Atividade captadora de radicais DPPH

A determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH foi executada num espectrofotómetro de feixe duplo (Jasco V-530,2004) tendo-se utilizado BHT como padrão de referência (com concentrações de 0,0782 a 5 mg/mL). Para as amostras de bagas (A1, A2 e A3) foram preparadas diferentes diluições (correspondendo às concentrações 0,195 mg/mL, 0,3125 mg/mL, 0,625 mg/mL, 1,25 mg/mL, 2,5 mg/mL, 5 mg/mL e 10 mg/mL), enquanto para a amostra de folhas foram utilizadas as seguintes diluições 0,078 mg/mL, 0,156 mg/mL, 0,3125

mg/mL, 0,625 mg/mL, 1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL. Misturou-se 100 µL de cada uma das diferentes concentrações de extrato com 900 µL de solução metanólica de DPPH ($6 \times 10^{-5}M$), colocando-se a mistura obtida ao abrigo da luz durante 1 hora. Procedeu-se de forma similar utilizando metanol para a preparação do branco de reação.

A redução do radical DPPH foi avaliada através da medição da absorvância a 515 nm (Figura 7). A atividade captadora de radicais livres (ACR) foi calculada em função da percentagem de descoloração do DPPH usando a equação:

$$\% \text{ ACR} = [(ADPPH - AS)/ADPPH] \times 100$$

onde AS representa a absorvância da solução na presença de extrato numa determinada concentração e ADPPH representa a absorvância da solução de DPPH (branco). A concentração de extrato correspondente a 50% da atividade captadora de radicais (EC_{50}) foi calculada por interpolação a partir do gráfico de percentagem de ACR em função da concentração da amostra.

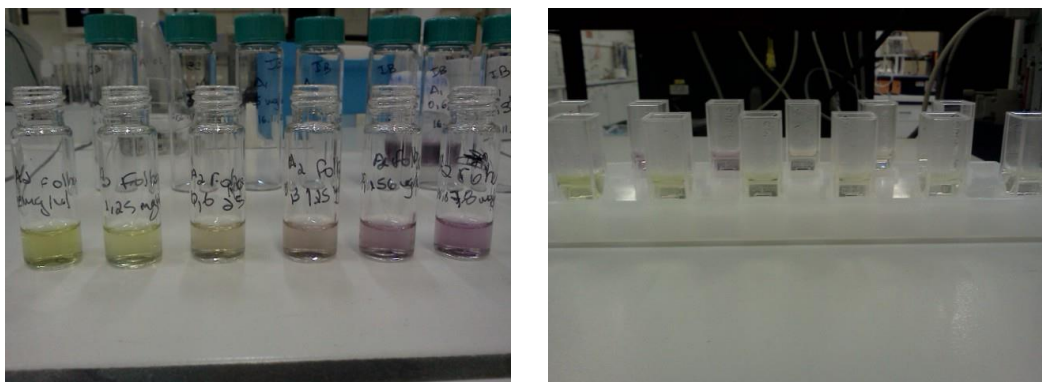


Figura 7: Determinação da atividade antioxidante com o método DPPH: preparação da amostra para leitura por espectrofotometria

2.6. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do óleo essencial do zimbro foi avaliada por duas metodologias distintas, nomeadamente pelo método da difusão em disco em placas de agar e pelo método da macrodiluição em caldo. Em ambos os casos, a atividade antimicrobiana foi avaliada usando os seguintes microrganismos de referência: *Bacillus cereus* (NCTC 10320),

Escherichia coli (ATCC 10536), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Proteus mirabilis* (ATCC 14153), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Enterococcus faecalis* (ATCC 33186), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e *Candida albicans* (obtido por isolamento, coleção ESAB). As culturas foram obtidas por crescimento em caldo nutritivo ou caldo BHI, durante 24 horas, a 37°C.

2.6.1. Método da difusão em placa

Primeiramente foram realizadas diluições seriadas (1:2) do óleo essencial em dimetilsulfóxido (DMSO) e em etanol. Com base na maior solubilidade do óleo essencial em etanol, optou-se por preparar as diluições seriadas neste solvente, tendo sido preparadas as concentrações finais de 50% (v/v), 25% (v/v), 12,5% (v/v), 5% (v/v) e 1% (v/v) de óleo essencial.

Os testes foram realizados em placas de petri esterilizadas com meio Muller-Hinton (LiofilChem). Após ajustar os inóculos a 0,5 McFarland (aproximadamente 10^8 UFC/mL), as placas foram inoculadas por sementeira à superfície utilizando uma zaragatoa estéril.

Procedeu-se à impregnação dos discos de papel (6 mm de diâmetro), previamente esterilizados, utilizando-se 10 µL do óleo essencial e respectivas diluições. Utilizou-se a penicilina (10 µg) ou canamicina (30 µg) como controlo positivo e discos impregnados com 10 µL dos solventes utilizados nas diluições (etanol ou DMSO) como controlo negativo. As placas foram seladas com parafilme, de forma a evitar a desidratação do meio e a perda de compostos voláteis e foram colocadas na estufa a 37°C durante 24 horas. Após o período de incubação, mediram-se os halos de inibição (mm). Todos os processos descritos foram realizados em câmara de segurança biológica (Telstar Bio II Advance) de modo a garantir o máximo de condições de esterilidade.

2.6.2. Método da macrodiluição em caldo

Esta metodologia foi realizada segundo os procedimentos descritos pelo *Clinical and Laboratorial Standards Institute* (CLSI, 2009), com algumas modificações. Para cada uma das estirpes testadas, o inóculo foi diluído em meio de cultura por forma a que cada tubo de ensaio contenha aproximadamente 5×10^5 CFU/mL. Os tubos foram posteriormente adicionados com

volumes iguais de amostra contendo diferentes quantidades de óleo essencial do zimbro (5% a 0,039% (v/v)). Foi ainda preparado um tubo de ensaio contendo apenas meio de cultura e outro contendo apenas inóculo. Todos os tubos de ensaio foram incubados a 37 °C durante 24 horas. Após incubação, de cada tubo retirou-se aseticamente uma amostra que foi inoculada à superfície em placas de Petri contendo agar nutritivo (NA) ou agar base para fungos (ABF), para bactérias e leveduras, respetivamente. Para cada tubo de ensaio, foram ainda realizadas diluições decimais em solução de Ringer, procedendo-se à sua inoculação por incorporação em meio NA ou ABF para contagem de colónias. Neste trabalho, considerou-se como MIC a concentração inferior que permite uma redução significativa da viabilidade de um inóculo (>90%) e a MCB como a concentração mais baixa de um antimicrobiano que permite a eliminação de todo o inóculo, traduzida na ausência de crescimento de um microrganismo após a sua subcultura num meio sem antibiótico.

3. Resultados e Discussão

3.1. Composição nutricional

Conhecer o valor nutricional dos alimentos ajuda cada pessoa a controlar a quantidade de substâncias que deseja consumir diariamente e a fazer uma dieta equilibrada. No caso das bagas do zimbros, apesar destas serem usadas sobretudo como condimento, existe pouca informação disponível no que diz respeito ao seu valor nutricional, pelo que neste trabalho as amostras foram caracterizadas relativamente à sua humidade, teor de gordura, proteínas, cinzas e glúcidos. Os resultados da composição em macronutrientes e minerais (cinzas) obtidos apresentam-se na Tabela 4.

Tabela 4. Composição nutricional das bagas do zimbros estudadas (g/100 g de amostra).

Amostra	Humidade	Proteínas	Lípidos	Cinzas	Glúcidos
A1	14,21±0,11	2,41±0,18	12,32±0,24	3,25±0,12	67,81±6,08
A2	7,59±0,18	4,28±0,00	8,71±0,25	3,82±0,22	75,60±2,42
A3	13,26±0,07	5,28±0,77	9,80±0,11	3,31±0,08	68,35±5,25

Os glúcidos foram os macronutrientes mais abundantes, sendo os valores mais elevados encontrados na amostra A2 (aproximadamente 76 g/100). Apesar da humidade ser o segundo componente mais abundante nas 3 amostras estudadas, de uma forma geral apresentou valores relativamente baixos, variando entre aproximadamente entre 8 e 14 g/100 g de matéria fresca. Os valores baixos de humidade contribuem para a sua boa conservação e qualidade sanitária, diminuindo, por exemplo, a possibilidade de crescimento de fungos. A amostra colhida na natureza e seca ao abrigo da luz foi a que apresentou um teor de humidade inferior. Comparativamente com os valores descritos na bibliografia (FEIS, 2005), ainda que estes sejam muito escassos, os valores de humidade obtidos neste trabalho foram substancialmente inferiores. No entanto, refira-se que os valores anteriores não explicitam tratar-se de bagas colhidas frescas ou após secagem.

Os níveis de lípidos variaram entre, aproximadamente 9 e 12 g/100g, tendo os mais elevados sido observados na amostra A1 (12,32 g/100g). Os resultados obtidos foram superiores aos descritos para bagas colhidas nos E.U.A em diferentes meses (4,12 a 7,51%), mas inferiores aos descritos em bagas colhidas no Canadá (14,3%) (FEIS, 2005). Tal como descrito na literatura, as amostras de bagas do zimbro mostraram ter baixo teor em proteína. As amostras apresentaram ainda um teor considerável em minerais (cinza), superior ao descrito para bagas de *J. communis*, mas similar ao descrito para bagas de *J. drupacea* (Akinci *et al.*, 2004).

3.2. Composição em Ácidos Gordos

Os resultados da composição em ácidos gordos obtidos para as 3 amostras apresentam-se na Tabela 5. De uma forma geral, para as três amostras estudadas, verificou-se que o teor de ácidos gordos insaturados nas bagas do zimbro (42,08-61,41%) é superior ao dos ácidos gordos saturados (16,03-23,24%). No total, foram detetados e quantificados 30 ácidos gordos diferentes, sendo os principais ácidos gordos identificados os ácidos: linoleico (C18:2n6, com uma variação entre 16,31 e 21,96%), gordoico (C20:1n9, com uma variação entre 12,65-14,97%) e oleico (C18:1n9, com uma variação entre 3,62 e 7,64%). Apesar das três amostras de bagas apresentarem uma composição algo similar entre si, verificou-se a existência de algumas diferenças no perfil qualitativo da segunda amostra comercial (A3), nomeadamente pela ausência de alguns compostos minoritários identificados nas restantes duas amostras (Tabela 5). Quantitativamente, a amostra A2 (colhida na natureza) foi a que apresentou um teor mais elevado de ácido palmítico (C16:0) e menor teor de ácidos insaturados oleico (C18:1n9c) e linoleico (C18:2n6). Já a amostra A1 foi a que apresentou um teor superior de ácidos polinsaturados ómega-3, destacando-se o teor elevado de ácido α -linolénico (C18:3n3, 4,06%). Nas três amostras observou-se a presença de diversos compostos não identificados. O mesmo foi descrito por Güvenç *et al.* (2012) quando analisou a composição de ácidos gordos de 5 taxa do género *Juniperus*, utilizando GC-MS. Para a espécie *J. communis* var. *communis*, em particular, os autores referem que apenas 81,6% do óleo extraído das bagas corresponde aos 24 ácidos gordos identificados.

Tabela 5. Composição em ácidos gordos (percentagem relativa) das amostras estudadas (média ± DP, n = 3).

TR(min)	Compostos	Amostras		
		A1	A2	A3
4,06	Ac. Caprílico (C8:0)	-	0,46± 0,04	0,69±0,03
4,12	N.I.	-	-	5,19±0,94
4,3	N.I.	-	-	0,89±0,22
4,45	Ac. Cáprico (C10:0)	0,84± 0,11	4,33±0,40	1,24±0,31
4,56	N.I.	-	-	1,30±0,20
4,64	N.I.	1,18± 0,10	4,60±0,11	2,50±0,14
4,73	Ac. Undecanóico (C11:0)	1,15± 0,08	3,44±0,19	1,40±0,10
5,23	Ac. Láurico (C12:0)	0,35± 0,00	0,41±0,02	0,36±0,03
5,40	N.I.	0,38± 0,05	1,80±0,06	-
5,59	N.I.	0,96± 0,07	3,85±0,06	0,56±0,51
5,96	N.I.	0,68± 0,10	4,40±0,30	0,86±0,46
5,74	Ac. Tridecanoico (C13)	-	-	4,69±0,04
6,36	Ac. Mirístico (C14:0)	1,41± 0,12	2,29±0,05	1,35±0,01
6,59	N.I.	0,89± 0,12	0,93±0,07	-
6,97	Ac. Miristoleico (C14:1)	0,25± 0,00	0,04±0,00	-
7,18	Ac. Pentadecanóico (C15:0)	0,11± 0,00	0,07±0,00	-
7,88	Ac. cis-10-Pentadecenóico (C15:1)	0,05± 0,00	0,16±0,02	-
8,21	Ac. Palmítico (C16:0)	3,62± 0,12	7,85±0,19	3,88±0,02
8,87	Ac. Palmitoléico (C16:1)	1,25± 0,06	0,12±0,01	-
9,31	Ac. Margrico (C17:0)	0,07± 0,01	0,05±0,01	0,57±0,01
10,23	Ac. Cis-10-Heptadecanoico (C17:1)	0,20± 0,01	0,12±0,01	-
10,61	N.I.	0,33± 0,04	4,39±0,22	-
10,74	Ac. Esteárico (C18:0)	2,08± 0,12	2,42±0,12	2,16±0,00
11,08	N.I.	-	1,21±0,03	-
11,54	Ac. Oleico (C18:1n9c)	6,42± 0,08	5,86±0,15	8,64±0,03
11,65	C18:1n7	2,11± 0,01	0,18±0,01	0,25±0,02
12,87	Ac. Linoleico(C18:2n6c)	19,90± 0,30	16,31±0,36	21,96±0,11
13,65	Ac. Araquídico (C20)	-	0,18±0,01	-
13,76	Ac. Pinoléico (C18:3n6)	6,89± 0,00	0,49±0,02	0,56±0,05
14,47	Ac. Gondoico (C20:1)	12,65± 0,16	14,97±0,39	13,89±0,04
14,57	Ac. Linoléico(C18:3n3)	4,84± 0,01	0,26±0,06	0,92±0,02
15,24	Ac. Heneicosanoico (C21:0)	0,51± 0,01	0,38±0,01	0,36±0,00
15,98	Ac. Cis-11,14-Eicosadienóico (C20:2)	1,50± 0,04	0,50±0,01	1,44±0,02
16,72	N.I.	5,16± 0,07	6,67±0,14	4,37±0,12
17,02	Ac. Behenico (C22:0)	1,84± 0,01	0,83±0,03	0,49±0,02
17,64	Ac. Erúico (C22:1n9)	0,88± 0,01	0,19±0,02	0,93±0,05
18,41	N.I.	11,59± 0,19	4,19±0,13	12,06±0,26
20,22	N.I.	-	-	0,16±0,14
20,34	Ac. Lignocérico (C24:0)	4,06± 0,01	0,54±0,01	0,41±0,12
21,14	Ac. Nervónico (C24:1)	1,16± 0,03	1,62±0,10	1,18±0,16
21,45	N.I.	-	1,76±0,03	-
21,89	Ac. Decosapentaenoico (C22:5n6)	0,42± 0,06	0,18±0,03	-
22,89	Ac. Clupanodónico (C22:5n3)	1,91± 0,18	0,23±0,02	1,80±0,09
23,59	Ac. DHA (C22:6n3)	0,97± 0,02	0,84±0,03	0,39±0,01
24,12	N.I.	0,71± 0,10	1,13±0,08	0,26±0,06
24,31	N.I.	0,82± 0,08	-	0,24±0,05
Σ ácidos gordos saturados totais		16,03	23,24	20,97
Σ ácidos gordos insaturados totais		61,41	42,08	51,96
Σ compostos não identificados(N.I.)		22,36	34,93	28,39
Ácidos gordos identificados totais		77,44	65,32	65,74

Neste trabalho, o valor de ácidos gordos insaturados (%) relativamente ao total de ácidos gordos identificados (64,4-79,3%) foi similar ao descrito por Güvenç *et al.* (2012) (84,3%). Os compostos maioritários descritos por este autor foram os ácidos linoleico, pinoleico e oleico. Com base na mistura padrão de 37 FAMES utilizada, apenas a amostra 1(A1) apresentou um teor elevado de ácido pinoleico. No entanto, as três amostras apresentaram teores elevados de C20:1n9, o qual não foi verificado por Güvenç *et al.* (2012). Desta forma, seria aconselhável proceder à análise das amostras por GC-MS por forma a confirmar a identificação destes dois compostos. Segundo Güvenç *et al.* (2012), outro composto caracteristicamente presente em quantidades elevadas (10,1%) é o ácido juniperónico (C20:4n3). No presente trabalho, não estando disponível a substância padrão, não foi possível proceder à identificação deste composto nas amostras. Contudo, com base na sua estrutura, seria expectável que eluísse próximo e após, o seu isómero presente na mistura de 37 FAMES (ácido araquidónico, C20:4n6, com tempo de retenção 17,91 min). Desta forma, o composto não identificado aos 18,41 min será possivelmente o ácido juniperónico, variando entre 4,19% na amostra A2 e 12,06% na amostra A3.

Tendo em conta o perfil de ácidos gordos obtido para as amostras de óleo de bagas do zimbro pode considerar-se que este apresenta algum valor dietético dado o seu teor relativamente baixo em ácidos gordos saturados e elevado em ácidos gordos mono- e polinsaturados. Contudo, verificou-se a presença de alguns ácidos gordos pouco comuns comparativamente à composição das sementes oleaginosas frequentemente usadas na alimentação humana, bem como diversos compostos não identificados na sua composição, o que pode ser um obstáculo à sua eventual utilização.

3.3. Teor total de Fenóis e de Flavonoides

Com base na literatura, selecionou-se o solvente orgânico metanol para proceder à extração de compostos fenólicos (Ozturk *et al.*, 2011; Luís *et al.*, 2011). Os compostos bioativos avaliados neste trabalho foram os compostos fenólicos e flavonoides. O teor total de fenóis foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu e expresso em equivalentes de ácido gálgico. Para tal, elaborou-se uma curva de calibração a partir da absorvância a 765 nm, tendo-se utilizado uma solução padrão de ácido gálgico com concentração definida e respetivas diluições. Para determinações realizadas em diferentes dias foram determinadas

novas curvas de calibração. Na Figura 8 apresenta-se uma das curvas obtidas, onde se pode verificar a elevada correlação obtida.

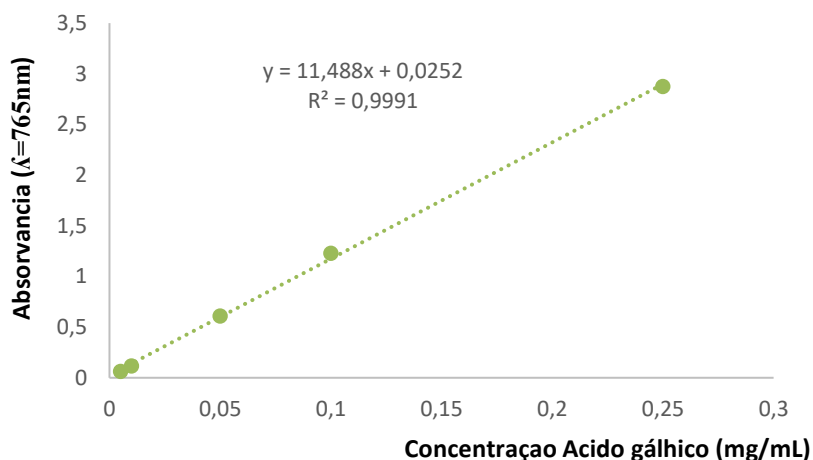


Figura 8: Curva de calibração utilizada para a determinação do teor total de compostos fenólicos nos extratos, expresso em ácido gálico.

O teor total de flavonoides foi igualmente determinado por espectrofotometria e expresso em equivalentes de catequina. A Figura 9 apresenta uma das curvas de calibração obtidas, calculada com base na absorvância a 510 nm obtida para uma solução de catequina e respectivas diluições.

A composição em compostos bioativos das amostras estudadas (fenóis e flavonoides) apresenta-se na Tabela 6. Os resultados apresentados são a média de experiências independentes, realizadas em triplicado, sendo que o erro associado corresponde ao desvio padrão.

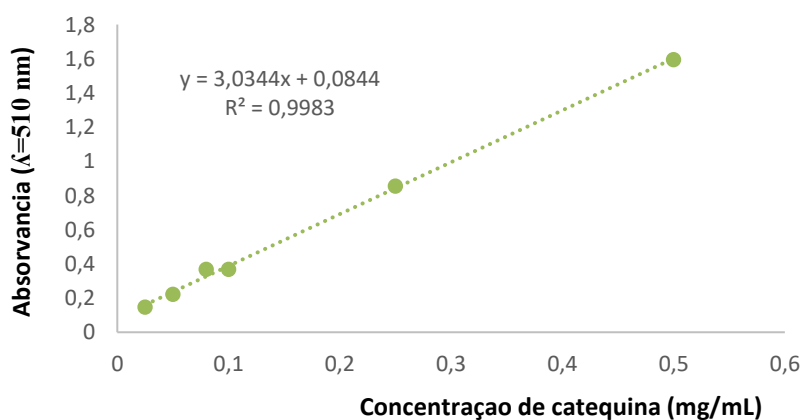


Figura 9: Curva de calibração utilizada para a determinação do teor total de flavonoides dos extratos, expresso em catequina.

Tabela 6. Quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides totais das amostras do zimbro.

Amostra	Fenóis totais (mg EAG/g extrato)	Flavonoides (mg EC/g extrato)
A1	11,13 ± 1,32	2,98 ± 0,14
A2	16,16 ± 0,64	2,32 ± 0,27
A3	13,11 ± 0,11	4,55 ± 0,36
A2 Folha	141,12 ± 9,56	37,4 ± 2,92

EAG: equivalentes de ácido gálico; EC: equivalentes de catequina.

A concentração superior de compostos fenólicos e flavonoides totais foi obtida na amostra de folhas (amostra A2 folha), tendo-se obtido 141,12 mg EAG/g de extrato e 37,36 mg EC/g de extrato, respetivamente. Nas bagas, a amostra que apresentou maior teor de fenóis e flavonoides foi a amostra A2 e A3, respetivamente. Comparativamente com as amostras comerciais, o teor total de fenóis desta amostra (A2) revelou-se apenas ligeiramente superior, enquanto o teor total de flavonoides mostrou ser similar.

Em comparação com estudos disponíveis na bibliografia, verifica-se que o teor total de fenóis e flavonoides varia conforme cada estudo, o que poderá relacionar-se com a variação da composição associada a diferentes fatores edafoclimáticos (temperatura, exposição solar, solo, etc.), bem como com a metodologia usada na determinação dos parâmetros. Os valores de fenóis totais obtidos para as bagas foram inferiores comparativamente aos descritos por Luís *et al.* (2011) para bagas colhidas na região Portuguesa da Serra da Estrela ($44,7 \pm 2,6$ mg EAG/g) e por Miceli *et al.* (2009) para bagas colhidas na Turquia ($59,17 \pm 1,65$ mg EAG/g). Já os valores obtidos para as folhas foram similares aos das amostras colhidas na Serra da Estrela ($155,6 \pm 3,2$ mg EAG/g) e superiores aos descritos por Marzt *et al.* (2009) para 125 amostras colhidas em 2006 na Finlândia ($65,1 \pm 15,5$ mg/g). Neste último caso, refira-se que a metodologia usada foi distinta à aplicada neste trabalho, tendo os autores usado HPLC-DAD para quantificação dos compostos. No que respeita o teor de flavonoides, os valores obtidos para as bagas foram similares aos reportados por Miceli *et al.* (2009) ($2,59 \pm 0,86$ mg/g extrato) e por Innocenti *et al.* (2007) ($1,46 - 3,79$ mg/g), tendo ambos os autores utilizado HPLC-DAD-ESI-MS para a identificação e quantificação de flavonoides.

3.4. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada utilizando dois métodos químicos, o ensaio da captação do radical DPPH e a avaliação do poder redutor. Como referido anteriormente, o DPPH é um radical estável que perde a sua cor roxa quando aceita um eletrão de uma molécula antioxidante. O ensaio de DPPH oferece um método conveniente, preciso e simples de *screening* da atividade captadora de radicais livres de extratos de alimentos e/ou produtos naturais. No ensaio para a determinação do poder redutor, a presença de compostos antioxidantes na amostra determina a redução de Fe^{3+} para a forma ferrosa. Esta redução é realçada pela medição espectrofotométrica da intensidade do azul prussiano obtido, o que depende da capacidade de redução do extrato. A Figura 10 apresenta os valores de percentagem de inibição do radical DPPH obtidas nos ensaios da atividade antioxidante das amostras estudadas. Os valores médios de EC_{50} apresentam-se na Tabela 7.

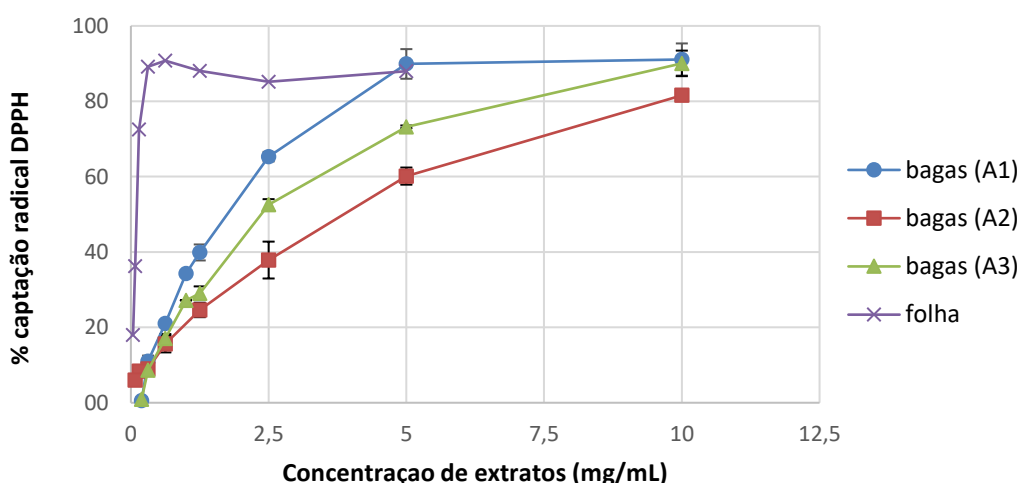


Figura 10: Percentagem de inibição do radical DPPH• de diferentes concentrações de extratos do zimbro.

Tabela 7. Atividade antioxidante (valores de EC_{50}) das amostras estudadas.

Amostra	DPPH (^a EC_{50} , mg/mL)	Poder Redutor (^b EC_{50} , mg/mL)
A1	1,74±0,04	3,33±0,09
A2	3,84±0,39	2,40±0,04
A3	2,37±0,01	3,48±0,26
A2 Folha	0,10±0,00	0,17±0,00

Valores expressos como média ± desvio padrão de três réplicas; ^a EC_{50} - Concentração para uma inibição de 50%;

^b EC_{50} - Concentração efetiva na qual a absorvância é 0,5.

As amostras mostraram atividade de captação de radicais livres, que foi muito superior para a amostra de folhas comparativamente às amostras das bagas, o que está em concordância com o teor mais elevado de fenóis e flavonoides da amostra de folhas. Esses valores confirmam os dados apresentados por diversos estudos, que demonstram que a capacidade antioxidante é dependente do teor de compostos fenólicos presentes (Niki, 2010; Miceli *et al.*, 2009). Além disso, foi evidente uma relação dose-resposta na atividade de captação do radical DPPH das amostras uma vez que a atividade aumentou com concentrações crescentes, como seria expectável.

Comparativamente com o valor de EC50 obtido para um antioxidante sintético, BHT (0,46 mg/mL), verificou-se que este apresentou melhor desempenho no que respeita à atividade de captação de radicais DPPH comparativamente aos extratos metanólicos de bagas. No entanto, verificou-se o oposto para a amostra de folhas, o que pode estar relacionado com o elevado teor de compostos fenólicos, incluindo flavonoides, determinado para esta amostra.

No que respeita aos valores obtidos para a avaliação do poder redutor, também para a amostra de folhas foi obtido um melhor resultado, como pode ser observado no gráfico apresentado na Figura 11.

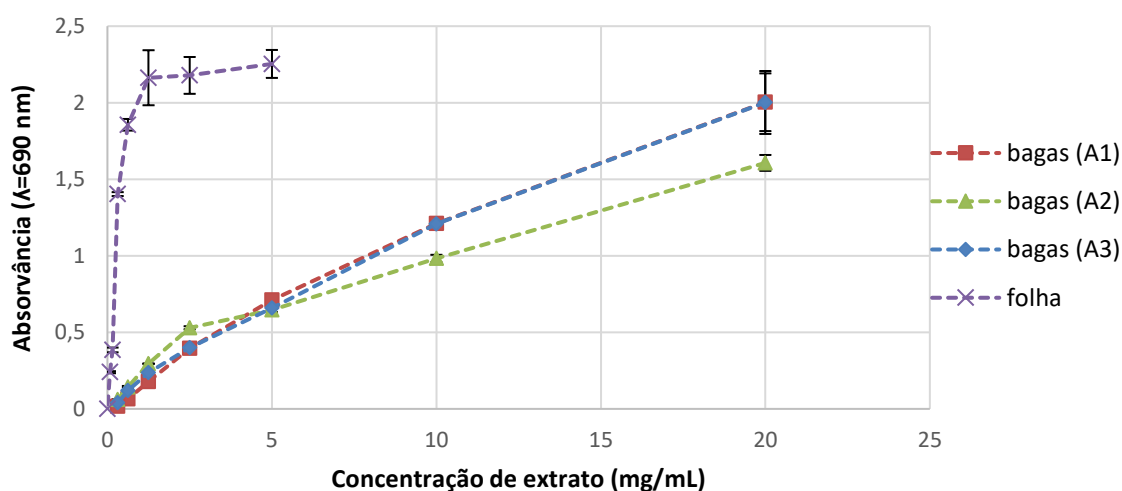


Figura 11: Poder redutor de diferentes concentrações de extratos do zimbro.

As bagas colhidas na natureza foram as que apresentaram uma menor capacidade de captação de radicais DPPH, o que poderá estar relacionado com o facto de serem aquelas com

menor teor de flavonoides. Curiosamente, no que respeita ao poder redutor, apresentaram resultados melhores comparativamente às amostras comerciais.

Comparativamente a trabalhos anteriores, refira-se que os valores relativos à captação do radical DPPH foram superiores aos descritos por Miceli *et al.* (2009) para bagas de *J. communis* ($0,63 \pm 0,09$ a $1,84 \pm 0,10$ mg/mL), não sendo possível efetuar uma comparação de resultados no que respeita aos valores do poder redutor, dado ter sido utilizada uma metodologia distinta.

Como referido, os compostos fenólicos podem contribuir diretamente para a ação antioxidante. De acordo com estudos recentes, foi encontrada uma relação altamente positiva entre o teor de fenóis totais e a atividade antioxidante em muitas espécies de plantas. Além disso, os compostos fenólicos desempenham um papel importante na estabilização da peroxidação lipídica. Outros estudos sugerem que os compostos fenólicos podem ter efeitos inibitórios na mutagénese e carcinogénese em seres humanos, quando ingeridos até 1 g diários (Elmastas *et al.*, 2007). Como referido, os extratos de *Juniperus communis* contêm quantidades elevadas de flavonoides, por conseguinte, a atividade antioxidante dos extratos pode estar associada, pelo menos em parte, à presença destes compostos (Miceli *et al.*, 2009).

3.5. Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana é uma determinação complexa e pode variar devido a múltiplas variáveis tais como o meio de cultura utilizado, a concentração do inóculo, a metodologia utilizada e, no caso de produtos naturais, o método de extração usado, entre outros (Tajkarimi *et al.*, 2010). Na maioria dos trabalhos, a atividade antimicrobiana é quantificada com base na concentração mínima inibitória (MIC) ou concentração mínima bactericida (MBC).

Inicialmente a atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de difusão em placa, um método usado como norma pelo CLSI e aprovado pela *Food and Drug Administration*, e também frequentemente utilizado para o *screening* da atividade antimicrobiana em estudos preliminares de óleos essenciais (Tajkarimi *et al.*, 2010). Foram testados dois solventes para efetuar a diluição do OE, nomeadamente etanol e DMSO. Tendo-se verificado a formação de

uma emulsão com aspeto pouco homogéneo e fácil separação de fases com o DMSO, optou-se por usar etanol nos restantes ensaios.

Contudo, este método foi abandonado uma vez que o OE revelou ser pouco solúvel nos solventes seleccionados, o que dificultou a realização das diluições seriadas do OE e conduziu a uma má difusão das amostras aplicadas nos discos, levando a resultados incoerentes (Figura 12). A título de exemplo, pode observar-se na Figura 12 a existência de um halo de inibição superior para a diluição 10% (v/v) comparativamente a 25% (v/v).



Figura 12: Atividade antimicrobiana de óleo do zimbro pelo método de difusão em placa.

Assim, a atividade antimicrobiana de óleos essenciais do zimbro foi avaliada pelo método de macrodiluição em caldo. O OE foi testado numa gama de 2,5-0,02% (v/v) (Figura 13) face a um total de nove estirpes de diferentes microrganismos, incluindo bactérias gram-positivas, gram-negativas e um fungo (ver imagens apresentadas no Anexo).

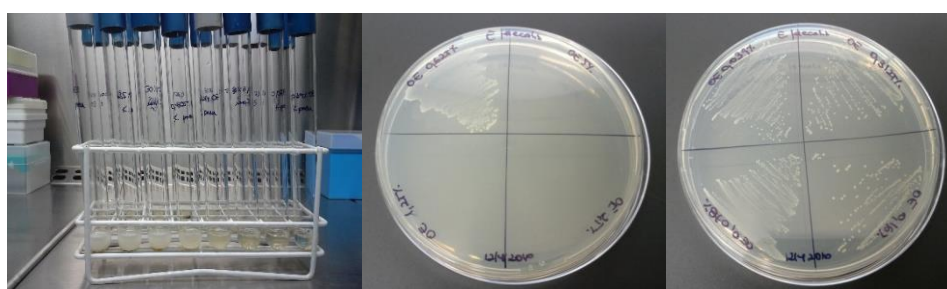


Figura 13: Atividade antimicrobiana de óleo do zimbro pelo método de macrodiluição em caldo.

Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Tabela 8. Não se verificou atividade antimicrobiana do OE do zimbro face a *P. aeruginosa* e *Proteus* sp., tendo ocorrido o oposto para as restantes bactérias e levedura, tendo o valor de MBC variado entre 0,16 e 2,5% OE (v/v). Verificou-se ainda que, para as concentrações testadas, o valor de MBC e MIC foram

considerados como sendo iguais (Tabela 8). No caso de *K. pneumoniae* apenas se verificou atividade para a concentração superior usada (2,5% OE, v/v), tendo o efeito bactericida sido superior para *B. cereus* e *B. subtilis*, seguido da levedura *C. albicans*, *E. faecalis* e *E. coli*, e *S. aureus*. De uma forma geral, os resultados sugerem uma maior atividade do OE do zimbro face a bactérias gram-positivas comparativamente a gram-negativas, o que está de acordo com o descrito na bibliografia para outros OE's face a microrganismos patogénicos e/ou deteriorantes de alimentos (Burt, 2004). Uma possível explicação para a menor suscetibilidade das bactérias gram-negativas reside na presença de uma membrana externa na parede destes microrganismos, o que pode restringir a difusão de compostos hidrofóbicos através dos lipopolissacarídeos (Burt, 2004).

Os resultados obtidos são semelhantes aos descritos por Pepeljnjak *et al.* (2005) para o óleo essencial do zimbro produzido na Croácia, uma vez que o óleo mostrou atividade superior contra bactérias gram-positivas comparativamente às estirpes gram-negativas testadas. Contudo, neste trabalho duas bactérias gram-negativas mostraram ser resistentes aos OE do zimbro, sendo uma das quais *E. coli*, a qual no presente trabalho apresentou um valor de MBC 0,75% OE (v/v). De uma forma geral os valores de MBC obtidos no trabalho de Pepeljnjak *et al.* (2005) foram muito superiores aos determinados no presente trabalho, tendo variado entre 12,5 e 75 % (v/v). Tal pode dever-se quer à diferente composição dos óleos essenciais, quer a diferenças na metodologia usada na avaliação da atividade antimicrobiana. Contrapondo os resultados obtidos, Angioni *et al.* (2003) relata que os óleos extraídos das bagas e as folhas de *J. communis* não conseguiram inibir os microrganismos na maior concentração testada (MIC e MBC >900 µg/mL), tendo sido testados contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, concluindo que a atividade antimicrobiana dos óleos testados era não significativa. Pelo contrário, Georgieva *et al.* (2014) relata que todas as espécies bacterianas gram-positivas testadas foram sensíveis ao óleo do zimbro derivado da extração com etanol, tendo as zonas de inibição variado entre 10 mm e 22 mm. A atividade bactericida foi mais forte contra *Bacillus subtilis* e menor contra *Escherichia coli*, que está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho.

Tabela 8. Resultados da atividade antimicrobiana pelo método de macrodiluição em caldo.

Microrganismos	<i>C. albicans</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>S. aureus</i>
MBC e MIC	0,31% EO	0,16% EO	0,16% EO	>2,5% EO	0,75% EO	2,5% EO	0,75% EO	>2,5% EO	1,25% EO
Log UFC/mL (% inibição)									
Controlo	7,60 ± 0,07	8,86 ± 0,04	7,08 ± 0,00	8,93 ± 0,04	8,13 ± 0,25	8,96 ± 0,17	8,95 ± 0,01	7,96 ± 0,09	8,02 ± 0,06
0,31% EO	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)	8,78±0,18 (1,7%)	nd	nd	8,18 ± 0,02 (8,6%)	8,01±0,06 (SI)	6,98 ± 0,02 (13,0%)
0,16% EO	4,57 ± 0,38 (39,9%)	0 (100%)	0 (100%)	nd	nd	nd	8,42 ± 0,01 (6,0%)	nd	7,19 ± 0,01 (10,3%)
0,08% EO	6,67 ± 0,01 (12,3%)	6,48 ± 0,01 (26,9%)	7,25 ± 0,10 (SI)	nd	nd	nd	8,67 ± 0,01 (3,2%)	nd	nd
0,04% EO	6,72 ± 0,01 (11,7%)	7,54 ± 0,06 (14,9%)	6,95 ± 0,07 (1,8%)	nd	nd	nd	8,78 ± 0,05 (1,9%)	nd	nd
0,02% EO	6,89 ± 0,03 (9,5%)	7,68 ± 0,05 (13,3%)	7,16 ± 0,06 (SI)	nd	nd	nd	8,60 ± 0,11 (4,0%)	nd	nd

UFC: unidades formadoras de colónias; SI: sem inibição; nd: não determinado (a contagem de colónias foi efetuada apenas para concentrações de OE mais elevadas).

4. Conclusão e Perspetivas futuras

Com a realização deste trabalho pretendeu-se avaliar a composição nutricional e a atividade biológica (antioxidante e antimicrobiana) de bagas do zimbro comerciais e colhidas na natureza (na região de Trás-os-Montes). Na determinação de macronutrientes analisou-se o valor nutricional em humidade, proteínas, lípidos, glúcidos e ácidos gordos. Foram ainda determinados compostos fitoquímicos com atividade antioxidante, com recurso a dois ensaios *in vitro*: atividade captadora de radicais livres e avaliação do poder redutor. Apesar de haver poucos estudos para se proceder a uma comparação fidedigna de resultados, verificou-se que, tal como descrito na literatura, as amostras estudadas revelaram um baixo teor proteico e um elevado teor em glúcidos. Tendo em conta o perfil de ácidos gordos obtido para as amostras de óleo de bagas do zimbro pode considerar-se que este apresenta algum valor dietético, dado o seu teor relativamente baixo em ácidos gordos saturados e elevado em ácidos gordos mono- e polinsaturados. Contudo, verificou-se a presença de alguns ácidos gordos pouco comuns comparativamente à composição das sementes oleaginosas frequentemente usadas na alimentação humana, bem como diversos compostos não identificados na sua composição, o que pode ser um obstáculo à sua eventual utilização.

Apesar disso, a composição das bagas é interessante do ponto de vista da sua capacidade antioxidante devido ao teor de compostos fenólicos, tendo os resultados indicado que os extratos do zimbro têm clara atividade antioxidante, com especial ênfase para as suas folhas. Os resultados obtidos sugerem que o zimbro pode ser usado como uma fonte facilmente acessível de antioxidantes naturais, os quais podem ter utilidade para a indústria de suplementos alimentares e/ou indústrias farmacêutica e de cosmética.

Comparativamente às bagas adquiridas em superfícies comerciais, as bagas colhidas na natureza apresentaram teores ligeiramente inferiores de flavonoides, mas ligeiramente superiores de fenóis totais, o que pode estar relacionado com fatores ambientais/condições edafoclimáticas associadas.

Foi ainda determinada a atividade antimicrobiana do óleo essencial de bagas do zimbro. O óleo apresentou capacidade inibitória contra a maioria das bactérias testadas, sendo igualmente capaz de, mesmo em baixas concentrações, inibir o crescimento do fungo testado

(*C. albicans*); contudo o óleo essencial não demonstrou atividade contra *P. aeruginosa* e *P. mirabilis*.

Assim, a inclusão destas bagas, na dieta contemporânea como condimento, pode ser interessante do ponto de vista da qualidade e segurança alimentar, contribuindo para a inibição de possíveis microrganismos patogénicos presentes e, simultaneamente, para uma maior capacidade antioxidante dos alimentos a que são adicionadas. Refira-se que, após o tempero com as especiarias, as carnes são frequentemente colocadas a marinar com vinho. Esta prática, para além de conferir aroma e sabor à carne, provenientes das especiarias, pode facilitar a extração destes compostos e desta forma também contribuir para o retardar de fenómenos de oxidação.

Em suma, este trabalho visou sublinhar a importância do consumo de especiarias, uma vez que tem sido demonstrado que diversas especiarias apresentam níveis de atividade antioxidante comparáveis aos conservantes sintéticos autorizados para fins alimentares. Desta forma, num contexto em que é importante garantir a segurança microbiológica dos produtos, e simultaneamente estender o seu tempo de prateleira, estas apresentam-se como uma potencial alternativa à utilização de conservantes artificiais.

Para trabalhos futuros, seria interessante aprofundar os estudos sobre a composição química das bagas, nomeadamente proceder à quantificação do teor de açúcares redutores livres, bem como à identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes (principalmente no que respeita a ácidos fenólicos e flavonoides). Seria também interessante proceder à identificação dos compostos presentes no óleo essencial através de GC-MS.

5. Bibliografia

- Adams, R. P., Beauchamp, P. S., Dev, V., Bathala, R. M. "The leaf essential oils of *Juniperus communis* L. varieties in North America and the NMR and MS data for isoabienol", *Journal of Essential Oil Research*, 22 (2010): 23-28.
- Ainsworth, E. A., Gillespie, K. M. "Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent." *Nature Protocols*, 2 (2007): 875-877.
- Akinci, I., Ozdemir, F., Topuz, A., Kabas, O., Canakci, M. "Some physical and nutritional properties of *Juniperus drupacea* fruits." *Journal of Food Engineering*, 65 (2004): 325-331.
- Angioni, A., Barra, A., Russo, M.T., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P. "Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2003): 3073–3078.
- Andrews, J., M. "Determination of minimum inhibitory concentrations." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 (2001): 5-16.
- Asili, J., Emami, S.A., Rahimizadeh, M., Fazly-Bazzaz, B.S., & Hassanzadeh, M.K. "Chemical and antimicrobial studies of *Juniperus communis* subsp. *hemisphaerica* and *Juniperus oblonga* essential oils." *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11 (2008): 96-105.
- Avci, A. B., Bilir, N. "Variation in Juniper (*Juniperus excelsa*) berries during the growth periods." *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17 (2014): 478-485.
- Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R., & Santos-Buelga, C. "Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from northeastern Portugal." *Food and Chemical Toxicology*, 50 (2012): 1576-1582.
- Bicalho, B., David, F., Rumpel, K., Kindt, E., Sandra, P. "Creating a fatty acid methyl ester database for lipid profiling in a single drop of human blood using high resolution capillary gas chromatography and mass spectrometry." *Journal of Chromatography*, 1211 (2008): 120–128.
- Braca, A., De Tommasi, N., Bari, L.D., Pizza, C., Politi, M., & Morelli, I. "Antioxidant principles from *bauhinia tarapotensis*." *Journal of Natural Products*, 64 (2001): 892-895.
- Burt, S., "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods." *International Journal of Food Microbiology*, 94 (2004): 223-253.
- Butkienė, R., Nivinskienė, O., Mockutė, D. "Differences in the essential oils of the leaves (needles), unripe and ripe berries of *Juniperus communis* L. growing wild in Vilnius district (Lithuania)." *Journal of Essential Oil Research*, 18 (2006): 489-494.
- Cabral, C., Francisco, V., Cavaleiro, C., Goncalves, M.J., Cruz, M.T., Sales, F., Batista, M.T., Salgueiro, L. "Essential oil of *Juniperus communis* subsp. *Alpina* (Suter) Celak needles: chemical composition, antifungal activity and cytotoxicity." *Phytotherapy Research*, 26 (2012): 1352–1357.

- Cavaleiro, C. "Juníperos de Portugal" potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, (2006a): 55-60.
- Cavaleiro, C., Pinto, E., Gonçalves, M.J. and Salgueiro, L. "Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, Aspergillus and Candida strain." *Journal of Applied Microbiology*, 100 (2006b): 1333–1338.
- Carpenter, C., O'Neill, T., Picot, N., Johnson, J. A., Robichaud, G. A., Webster, D., Gray, Ch. A. "Antimycobacterial natural products from the Canadian medicinal plant *Juniperus communis*." *Journal of Ethnopharmacology*, 143 (2012): 695–700.
- Carroll, J.F., Tabanca, N., Kramer, M., Elejalde, N. M., Wedge, D. E., Bernier, U. R., Coy, M., Becnel, J. J., Demirci, B., Başer, K. H. C., Zhang, J., Zhang, Sui. "Essential oils of *Cupressus funebris*, *Juniperus communis*, and *J. chinensis* (Cupressaceae) as repellents against ticks (Acari: Ixodidae) and mosquitoes (Diptera: Culicidae) and as toxicants against mosquitos." *Journal of Vector Ecology*, 36 (2011): 258-268.
- Ciesla, William M. "Non-wood forest products from conifers." Food and Agriculture Organization of the United Nations, 15 (2001): 1-118.
- Chatzopoulou, P. S., Katsiotis, S. T. "Study of the essential oil from *Juniperus communis* berries growing wild in Greece." *Planta Medica*, 59 (1993): 554-556.
- Chatzopoulou, P. S.; Katsiotis, S. T. "Chemical investigation of the leaf oil of *Juniperus communis* L." *Journal Essential Oil Research*, 5 (1993): 603-607.
- Chatzopoulou, P. S.; de Haan, A.; Katsiotis, S. T. "Investigation on the supercritical CO₂ extraction of the volatile constituents from *Juniperus communis* obtained under different treatments of the "berries" (Cones)". *Planta Medica*, 68 (2002): 827-831.
- Chatzopoulou, P.S., & Katsiotis, S.T. "Procedures influencing the yield and the quality of the essential oil from *Juniperus communis* L. berries." *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 70 (1995): 247–253.
- Damjanovic, B. M., Skala, D., Petrovic-Djakov, D., Baras, J. "A comparison between the oil, hexane extract and supercritical carbon dioxide extract of *Juniperus communis* L." *Journal of Essential Oil Research*, 15 (2003): 90–92.
- Damjanovic, B., Skala, D., Baras, J., & Petrovic-Djakov, D. "Isolation of essential oil and supercritical carbon dioxide extract of *Juniperus communis* L. fruits from Montenegro." *Flavour and Fragrance Journal*, 21 (2006): 875–880.
- El-Ghorab, A., H. A. Shaaban, K. F. El-Massry, and T. Shibamoto. "Chemical composition of volatile extract and biological activities of volatile and less-volatile extracts of Juniper berry (*Juniperus Drupacea* L.) fruit." *Journal Agricultural Food Chemistry*, 56 (2008): 5021-525
- Elmastaş, M., Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö. İ., Aboul-Enein, H. Y. "A study on the In vitro antioxidant activity of Juniper (*Juniperus communis* L.) fruit extracts." *Analytical Letters*, 39 (2007): 47-65.
- Emami, S.A., Javadi, B., and Hassanzadeh, M.K. "Antioxidant activity of the essential oils of different parts of *Juniperus communis* subsp. *hemisphaerica* and *Juniperus oblonga*." *Pharmaceutical Biology*, 45 (2007): 769–776.

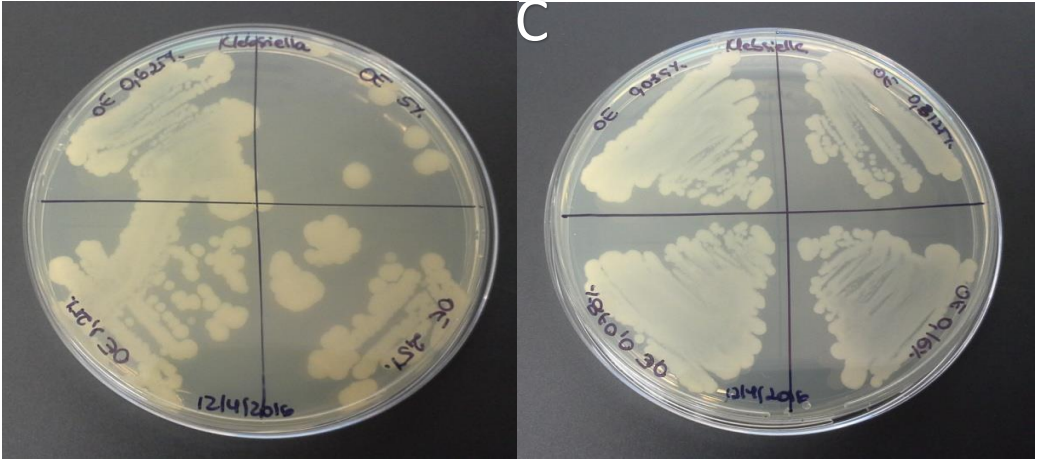
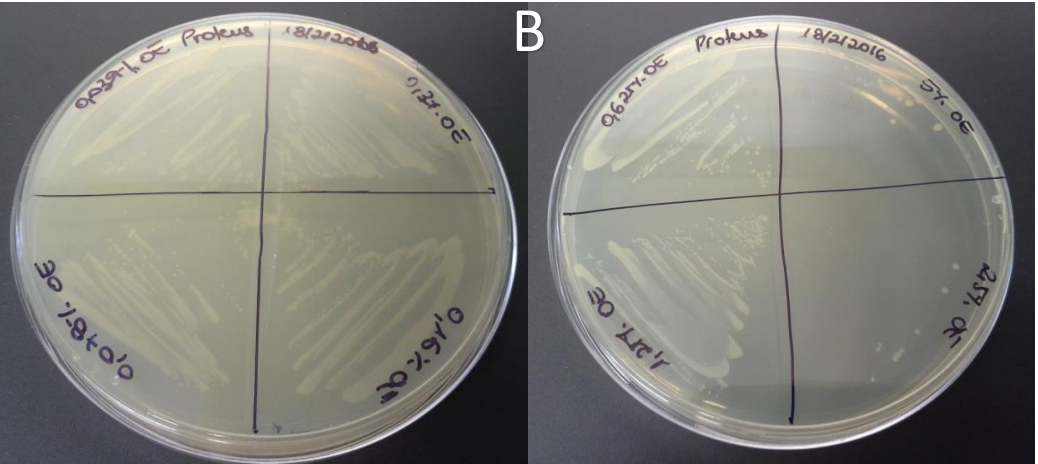
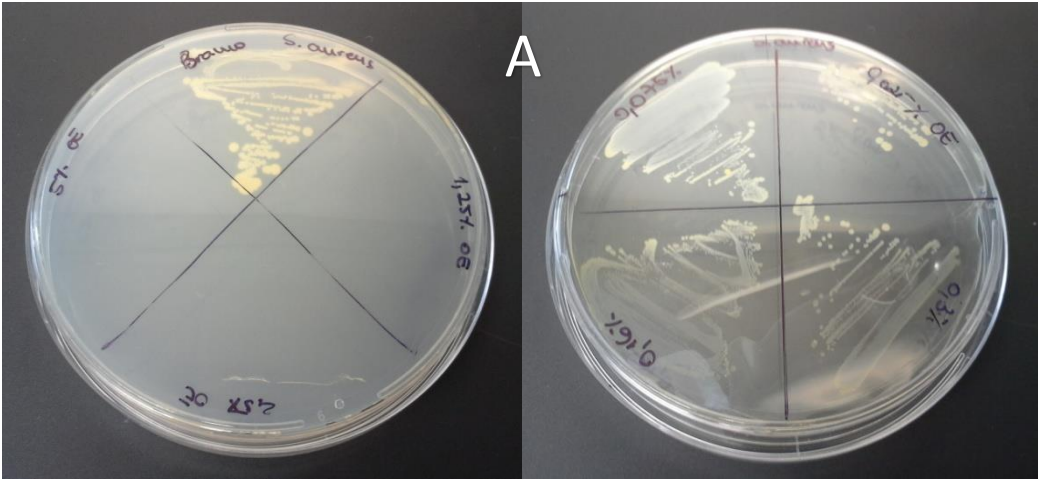
- Falasca, A., Melck, D., Paris, D., Motta, A., Saviano, G., Iorizzi, M. "Seasonal changes in the metabolic fingerprint of *Juniperus communis* L. berry extracts by ¹H NMR-based metabolomics." *Metabolomics*, 10 (2014) : 165–174.
- FAOSTAT. "FAO." Food and Agriculture Organization of the United Nations,(1943). <http://www.fao.org/about/en/> (accedido em 2016).
- Fire Effects Information System (FEIS). (s.d.). Obtido em 26 de Fevereiro de 2015, de <http://www.feis-crs.org/beta/>:
- Filipowicz, N., Kaminski, M., Kurlenda, J., Asztemborska, M., & Ochocka, J. R. "HS-SPME/GC analysis reveals the population variability of terpene contents in *Juniperus communis* needles." *Chemistry & Biodiversity*, 6 (2009): 2290-2301.
- Filipowicz, N., Kamin'ski, M., Kurlenda, J., Asztemborska, M., Ochocka, J. R. "Antibacterial and antifungal activity of Juniper berry oil and its selected components." *Phytotherapy Research*, 17 (2003): 227–231.
- Foudil-Cherif, Y., and N. Yassaa. "Enantiomeric and non-enantiomeric monoterpenes of *Juniperus communis* L. And *Juniperus oxycedrus* needles and berries determined by Hs-Spme and enantio selective Gc/Ms." *Food Chemistry*, 135 (2012): 1796-1800.
- Fraga, C. G., Galleano, M., Verstraeten, S. V., Oteiza, P. I. "Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols." *Molecular Aspects of Medicine*, 31 (2010): 435-445.
- Franco, J.A., S.Castroviejo, M.Laínz, G.López, P.Monserrat, F.Muñoz, J.Paiva & L.Villar. "Juniperus flora Iberica: Lycopodiaceae–Papaveraceae." *Real Jardín Botánico, Servicio de Publicaciones del CSIC, Madrid*, 1 (1986): 181–188.
- García, D., Zamora, R., Gómez, J. M., Jordano, P. and Hódar, J. A. "Geographical variation in seed production, predation and abortion in *Juniperus communis* throughout its range in Europe." *Journal of Ecology*, 88 (2000): 435–446.
- García, D., Zamora, R., Hódar, J.A. & Gómez, J.M. "Age structure of *Juniperus communis* L. in the Iberian peninsula: conservation of remnant populations in mediterranean mountains." *Biological Conservation*, 87 (1999): 215–220.
- Georgieva, S., Hadjieva, P., Chanev, C., Arpadjan, S. "Comparison of composition and antimicrobial Activity of Hydrodistilled and Ethanol Extracted Essential Oil of *Juniperus Communis* L." *Tome*, 67 (2014): 635-640.
- Glisic, S. B., Milojevi, S., Dimitrijevi, S., Orlovi, A. M. and Skala, D. U. " Antimicrobial activity of the essential oil and different fractions of *Juniperus communis* L. and a comparison with some commercial antibiotics." *Journal of Serbian Chemical Society*, 72 (2007): 311–320.
- Gordiena, A. Y., Graya, A. I., Franzblaub, S. G., Seidel, V. "Antimycobacterial terpenoids from *Juniperus communis* L. (Cupressaceae)." *Journal of Ethnopharmacology*, 126 (2009): 500–505.
- Gonny, M., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., and Casanova, J. "Analysis of *Juniperus communis* subsp. alpina needle, berry, wood and root oils by combination of GC, GC/MS and ¹³C-NMR." *Flavour and Fragrance Journal*, 21 (2006) : 99–106.
- Güvenç, A., Küçükboyacı, N., and Görenc, A. C. "Fatty acid composition of *Juniperus* species (*Juniperus* section) native to Turkey." *Natural Product Communications*, 7 (2012): 919 – 922.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships." *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13 (2002): 572–584.

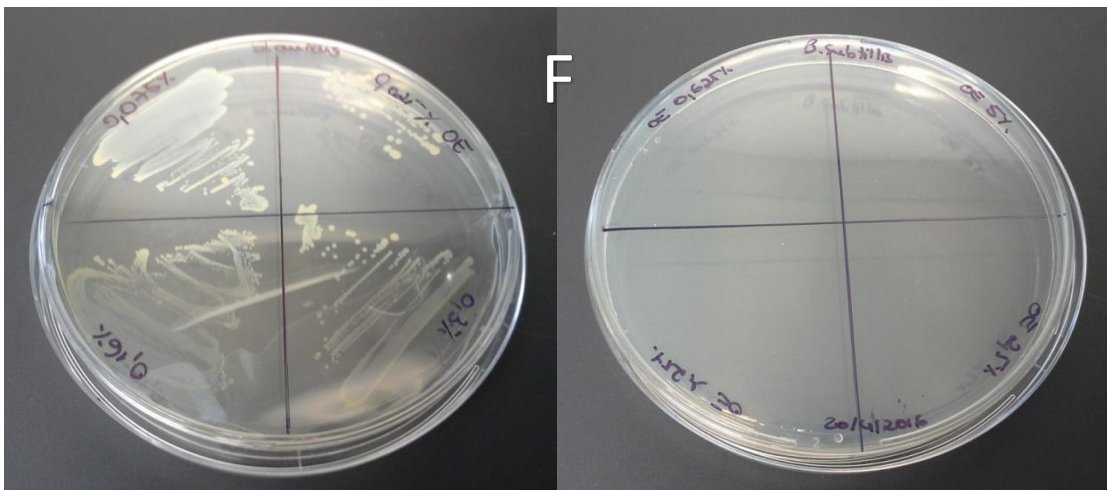
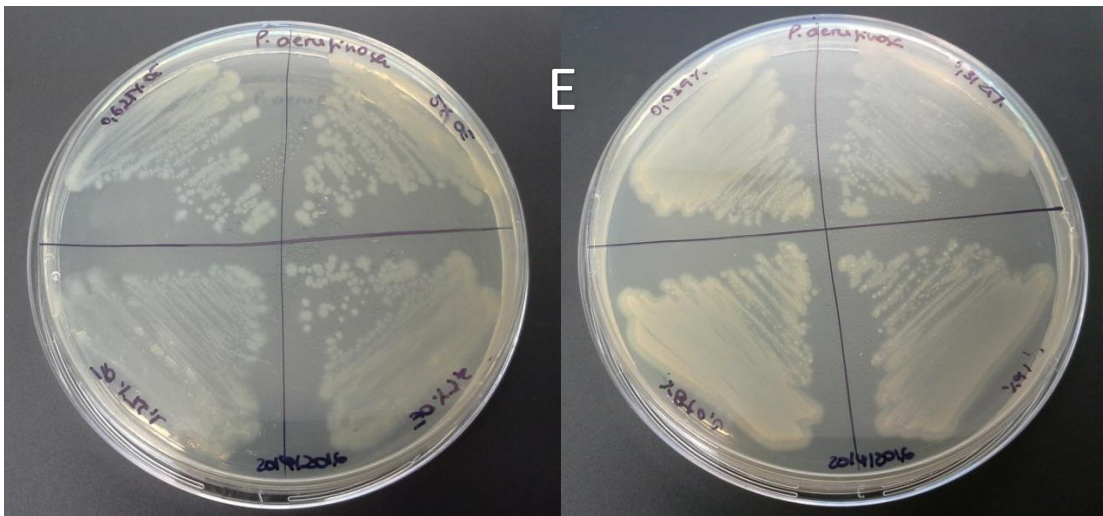
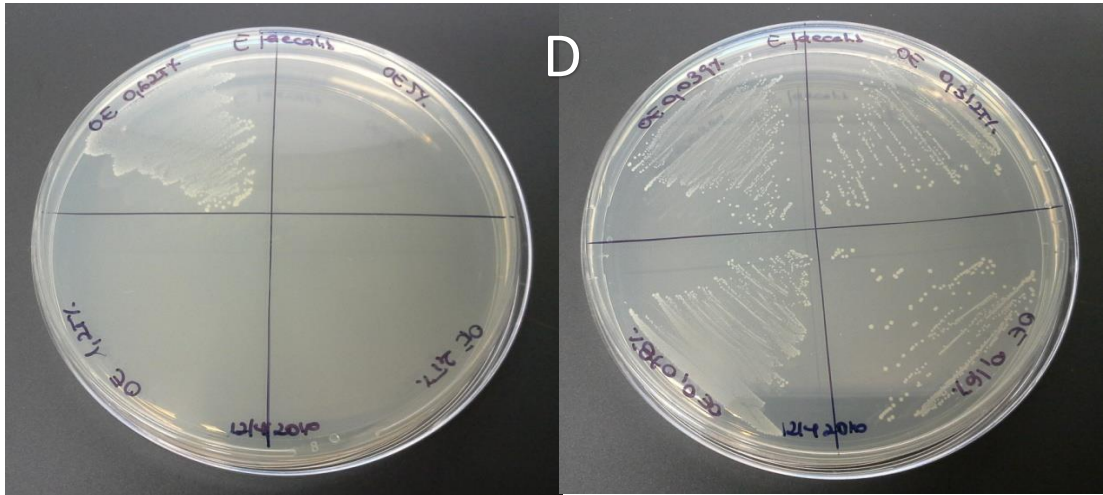
- Hossain, M.B., Brunton, N.P., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A.B., and Wilkinson, M. "Antioxidant activity of spice extracts and phenolics in comparison to synthetic antioxidants." *Rasayan Journal Chemistry*, 1 (2008): 751-756.
- Huang, D., Ou, B., and Prior, R. L. "The chemistry behind antioxidant capacity assays." *Journal Agricultural Food Chemistry*, 53 (2005): 1841–1856.
- Innocenti, M., Michelozzi, M., Giaccherini, C., Ieri, F., Vincieri, F. F., & Mulinacci, N. "Flavonoids and biflavonoids in Tuscan berries of *Juniperus communis* L.: detection and quantitation by HPLC/DAD/ESI/MS." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (2007): 6596–6602.
- Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. "Review of methods to determine antioxidant capacities." *Food Analytical Methods*, 2 (2009): 41–60.
- Kim, I.S., Yang, M.R., Lee, O.H., Kang, S.N. "Antioxidant activities of hot water extracts from various spices." *International Journal of Molecular Sciences*, 12 (2011): 4120–31.
- Klajn, V. M., Gutkoski, L. C., Fiorentini, Â. M., Elias, M. C. "Antioxidant compounds of oats." *Revista Brasileira de Agrociência*, 18 (2012): 292-303.
- Larkeche, O., Zermane, A., Meniai, A.-H., Crampon, C., Badens, E. "Supercritical extraction of essential oil from *Juniperus communis* L. needles: application of response surface methodology." *The Journal of Supercritical Fluids*, 99 (2015): 8–14.
- Lozbreveiene, K., Labokas, J., Venskutonis, P. R., Maždžierienė, R. "Chromatographic evaluation of the composition of essential oil and α -Pinene enantiomers in *Juniperus communis* L. berries during ripening." *Journal of Essential Oil Research*, 22 (2010): 453-458.
- Ložienė, K., Venskutonis, P. R. "Chapter 56 – Juniper (*Juniperus communis* L.) oils" *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, (2016): 495–500.
- Luís, A., Domingues, F., Duarte, A. P. "Bioactive compounds, RP-HPLC analysis of phenolics, and antioxidant activity of some Portuguese shrub species extracts." *Natural Product Communications*, 6 (2011): 1863-1872.
- Magalhaes, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. F. C. "Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties." *Analytica Chimica Acta*, 613 (2008): 1–19.
- Martz, F., Peltola R., Fontanay, S., Duval, E. R., Julkunen-Tiitto, R., and Stark, S. "Effect of latitude and altitude on the terpenoid and soluble phenolic composition of Juniper (*Juniperus communis*) needles and evaluation of their antibacterial activity in the boreal zone." *Journal Agricultural Food Chemistry*, 57 (2009): 9575–9584.
- Matović, M., Bojović, B. and Jušković, M., "Composition and antimicrobial activity of *Juniperus Communis* L. physiological metabolites from Serbia." *International Journal of Life Science and Medical Science*, 1 (2011): 5-8.
- Miceli, N., Trovato, A., Dugo, P., Cacciola, F., Donato, P., Marino, A., Ellinghieri, V. B., La barbera, T. M., Guvenc, A., and Taviano, M. F. "Comparative analysis of flavonoid profile, antioxidant and antimicrobial activity of the berries of *Juniperus communis* L. var. *communis* and *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. from Turkey." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (2009): 6570–6577.
- Moon, J.-K., Shibamoto, T., "Antioxidant assays for plant and food components." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (2009): 1655–1666.

- Nasri, N., Tlili, N., Elfalleh, W., Cherif, E., Ferchichi, A., Khaldi, A., & Triki, S. "Chemical compounds from phoenician Juniper berries (*Juniperus phoenicea*)". *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 25 (2011): 1733-1742.
- Nakanishia, T., Iida, N., Inatoma, Y., Murata, H., Inada, A., Murata, J., Lang, F. A., Inumad, M., Tanaka, T. "Neolignan and flavonoid glycosides in *Juniperus communis* var. *depressa*." *Phytochemistry*, 65 (2004): 207–213.
- Newman, D. J., Crag, G. M., Snader, K. M. "Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002." *Natural Products*, 66 (2003): 1022-1037.
- Nijveldt, R. J., Nood, E. v., Hoorn, D. E. v., Boelens, P. G., Norren, K. v., and Leeuwen, P. A. M. v. "Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications". *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74 (2001): 418–425.
- Niki, E. "Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo." *Free Radical Biology & Medicine*, 49 (2010): 503–515.
- Orav, A., Kailas, T., Müürisepp, M. "Chemical investigation of the essential oil from berries and needles of common juniper (*Juniperus communis* L.) growing wild in Estonia." *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 24 (2010): 1789-1799.
- Ottavioli, J., Gonny, M., Casanova, J., and Bighelli, A. "Chemical variability of the needle oil of *Juniperus communis* ssp. *alpina* from Corsica." *Chemistry & Biodiversity*, 6 (2009): 2192 -2199.
- Ozturk, M., Tumen, I., Ugur, A., Aydogmus-Ozturk, F., and Topcu, G. "Evaluation of fruit extracts of six Turkish *Juniperus* species for their antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activities." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91 (2011): 867–876.
- Pazitna, A., Španik, I. "Enantiomeric distribution of major chiral volatile organic compounds in juniper-flavored distillates." *Journal of Separation Science*, 37 (2014): 398–403.
- Pepeljnjak, S., Kosalec, I., Kaloera, Z., Blaevi, N. "Antimicrobial activity of juniper berry essential oil (*Juniperus communis* L., Cupressaceae)." *Acta Pharmaceutica*, 55 (2005): 417–422.
- Petlevski, R., Hadzija, M., Slijepcevic, M., and Juretic, D. "Effect of antidiabetic herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice." *Journal of Ethnopharmacology*, 75 (2001): 181–185.
- Plants for A Future. "Plants For A Future." *pfaf.org*. 1996. <http://www.pfaf.org/user/Default.aspx> (accessed em 2016).
- Plesa, C.-M., Hadaruga, D. I., Hadaruga, N. G., Branic, A. G., Ardelean, A., and Lupea, A. X. "Juniperus communis and Juniperus virginiana hydrophobic extracts: a multivariate analysis approach." *Revista de Chimie*, 62 (2011): 941- 946
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, (2005): 4290–4302.
- Raut, J. S., Karuppaiyil, S. M. "A status review on the medicinal properties of essential oils." *Industrial Crops and Products*, 62 (2014): 250–264.
- Regulamento CEE nº. 1576/89 do Conselho de 29 de Maio de 1989 que estabelece as regras gerais relativas à definição, à designação e à apresentação das bebidas espirituosas (1989).
- Rossi, P.-G., Berti, L., Panighi, J., Luciani, A., Maury, J. and Muselli, A. "Antibacterial action of essential oils from Corsica." *Journal of Essential Oil Research*, 19 (2007): 176–182.

- Sanchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Zevallos, L. C., and Velazquez, D. A. J-. "The folin–ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination." *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 5 (2013): 5990–5999.
- Sati, S.C., and Josh, S. "Antibacterial potential of leaf extracts of *Juniperus communis* L. from Kumaun Himalaya." *African Journal of Microbiology Research*, 4 (2010): 1291-1294.
- Schelz, Z., Molnar, J., Hohmann, J. "Antimicrobial and antiplasmodial activities of essential oils." *Fitoterapia*, 77 (2006): 279–285.
- Shahidi, F., Zhong, Y. "Measurement of antioxidant activity." *Journal of Functional Foods*, 18 (2015): 757–781
- Srinivasan, K. "Role of spices beyond food flavoring: nutraceuticals with multiple health effects." *Food Reviews International*, 21 (2005): 167-188.
- Srinivasan, K., Sambaia, K., Chandrasekhara, N. "Spices as beneficial hypolipidemic food adjuncts." *Food Reviews International*, 20 (2004): 187-220.
- Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S. A., and Cliver, D. O. "Antimicrobial herb and spice compounds in food." *Food Control*, 21 (2010): 1199–1218.
- Taviano, M. F., Marino, A., Trovato, V., Bellinghieri, A., Melchini, P., Dugo, F., Cacciola. "Juniperus oxycedrus L. subsp. oxycedrus and *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *Macrocarpa* (Sibth. & Sm.) ball. "berries" from Turkey: comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities." *Food Chemical Toxicol*, 58 (2013): 22-29.
- Thomas, P. A., El-Barghathi, M., and Polwart, A. "Biological flora of the British isles: *Juniperus communis* L." *Journal of Ecology*, 95 (2007): 1404–1440.
- Torres, J. E. De La T., Gassara, F., Kouassi, A. P., Brar, S. K., Belkacemi, K. "Spice use in food: properties and benefits." *Journal Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57 (2015): 1078-1088 .
- Vichi, S., Riu-Aumatell, M., Mora-Pons, M., Guadayol, J. M., Buxaderas, S., Lopez-Tamames, E. "HS-SPME coupled to GC/MS for quality control of *Juniperus communis* L. berries used for gin aromatization." *Food Chemistry*, 105 (2007): 1748–1754.
- Walsh, C. "Antibiotics: actions, origins, resistance." (2003): 285-295

6. Anexos





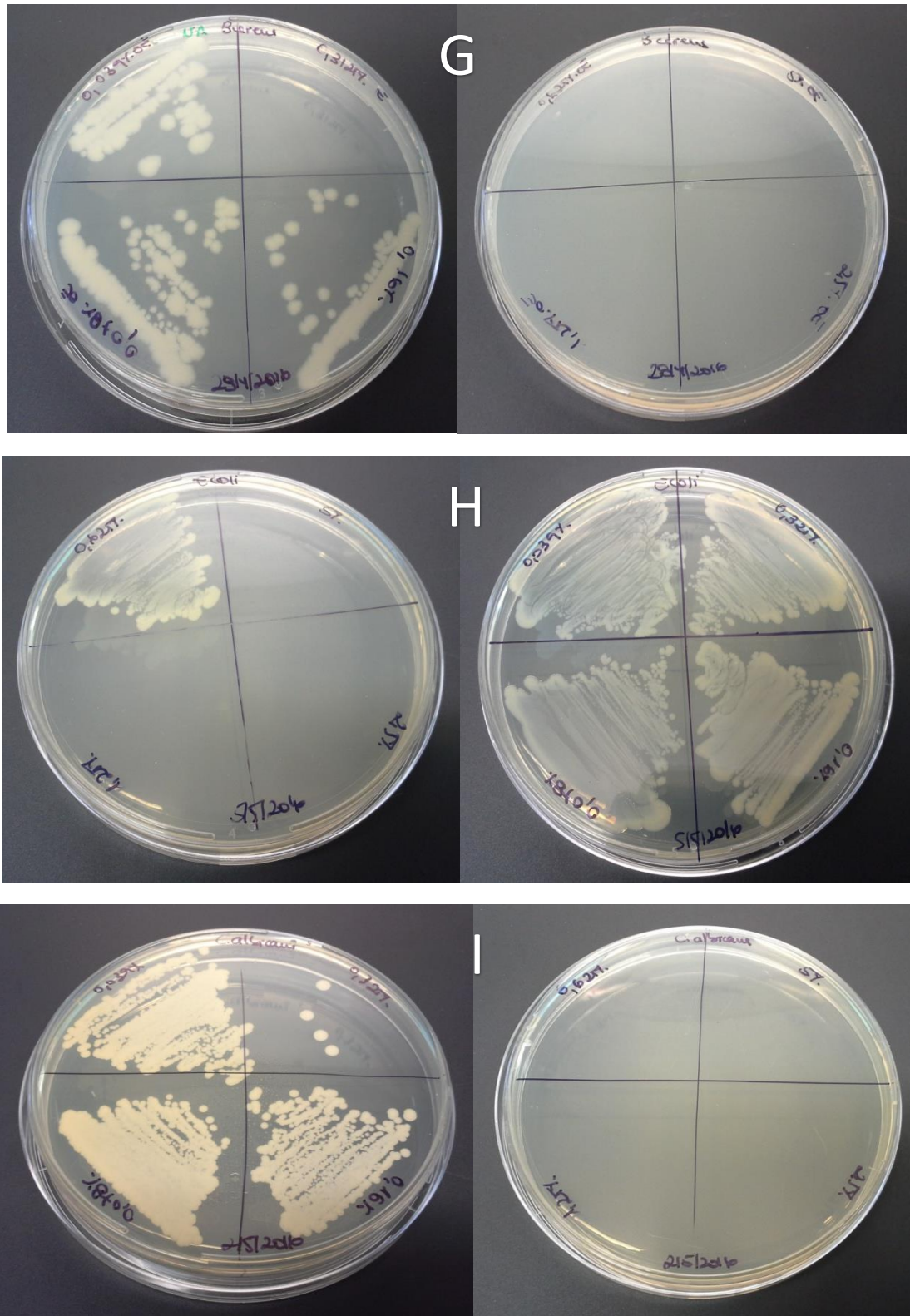


Figura 14: Método de macradulção em caldo das bactérias: **A-***S. aureus*, **B-***Proteus*, **C-***klebsiella*, **D-***E. faecalis*, **E-***P.aerogenosa*, **F-***B.subtilis* , **G-** *B.cereus*, **H-** *E.coli*, **I-***C.albicans*.