

**ESTUDO DA VIABILIDADE E  
INCORPORAÇÃO DE *MYRTUS SPP.*  
EM DIFERENTES PRODUTOS  
ALIMENTARES**

**Ana Carolina Lucas Branco**

2019



# **ESTUDO DA VIABILIDADE E INCORPORAÇÃO DE *MYRTUS SPP.* EM DIFERENTES PRODUTOS ALIMENTARES**

**Ana Carolina Lucas Branco**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora em Biotecnologia e Investigação Biomédica Maria Jorge Campos, Professora da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria – ESTM/MARE IPLeiria e coorientação da Doutora em Química Biológica Daniela Vaz, Professora da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico de Leiria – ESSLei e da Doutora em Qualidade Alimentar Vânia Ribeiro, Professora da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico de Leiria – ESSLei

*Esta página foi intencionalmente deixada em branco*

## **Estudo da Viabilidade e Incorporação de *Myrtus spp.* em diferentes produtos alimentares**

Copyright © Ana Carolina Lucas Branco

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2019

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

A presente dissertação é original, elaborada unicamente para este fim, tendo sido devidamente citados todos os autores cujos estudos e publicações contribuíram para a elaborar.

Reproduções parciais deste documento serão autorizadas na condição de que seja mencionado a Autora e feita referência ao ciclo de estudos no âmbito do qual a mesma foi realizada, a saber, Curso de Mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar, no ano letivo 2018/2019, da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria, Portugal, e, bem assim, à data das provas públicas que visaram a avaliação destes trabalhos.

O presente trabalho participou na X Conferência de Inovação e Segurança Alimentar – CISA 2019, que decorreu na ESTM – Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, pertencente ao Instituto Politécnico de Leiria e, no 5º Simpósio de Produção e Transformação de Alimentos em Ambiente Sustentável – PTAAS 2019, que decorreu na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja.

# DEDICATÓRIA

---

“Dedico esta pesquisa a todas as pessoas que estiveram ao meu lado, a apoiar durante todo o meu percurso acadêmico de Mestrado, em especial à minha família e namorado, por toda a força que me deram e por nunca terem perdido a fé nos meus sonhos e terem acreditado em mim nesta importante etapa da minha vida.”

*Esta página foi intencionalmente deixada em branco*

## AGRADECIMENTOS

---

*“Chegar até ao cimo da montanha e contemplar o imenso vazio do cume pode ser gratificante. Mas nada é superior à árdua caminhada desde o baixo terreno e às dificuldades percorridas nessa viagem, para superar os percalços da subida.”*

A elaboração desta dissertação foi muito gratificante e enriquecedora, tendo aprendido imenso no decorrer do curso. Apesar de ser um trabalho solitário, porque jamais o mérito será individual, queria agradecer publicamente:

Aos meus pais e familiares pela educação que me deram, força e motivação, fazendo de mim a pessoa que sou hoje. Por me terem sempre apoiado e deixado escolher o meu caminho livremente, dando força para alcançar os meus objetivos.

À orientadora, Doutora Maria Jorge Campos e, às coorientadoras Doutora Vânia Sofia Ribeiro e Doutora Daniela Vaz, por toda a ajuda e orientação científica, disponibilidade, dedicação e, acima de tudo, pela motivação prestada durante o período de laboratório, bem como pelo apoio na elaboração desta dissertação. Foi sem dúvida, a experiência mais enriquecedora que alguma vez tive no âmbito da formação académica, pelas ideias e esclarecimentos prestados, pelas horas despendidas na minha orientação e na transmissão de válidos conhecimentos na área, mas acima de tudo, por acreditarem em mim e no meu trabalho, obrigada.

A toda a equipa do MARE-IPLeiria – Marine and Environmental Sciences Centre – nomeadamente à Doutora Marta Neves, pela sua amabilidade e por toda a ajuda e disponibilidade relativamente ao processo de análise química instrumental por GC – *Gas Chromatography* (Cromatografia Gasosa).

Ao Dr. Pedro Cruz, por todo o apoio na realização dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), da plataforma UC-NMR, Centro de Química da Universidade de Coimbra, financiada pelo programa FEDER/ERDF-COMPETE e FCT via fundos RECI/QEQ-QFI/0168/2012, CENTRO-07-CT62-FEDER-002012, UID/QUI/00313/2019 e Rede Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (RNRMN).

Ao Professor Doutor Luís Soares Luís, coordenador do CTeSP em Alimentação Saudável da ESSLei, por todo o auxílio e partilha de conhecimentos aquando o desenvolvimento da cerveja artesanal enriquecida com *Myrtus spp.*, da Escola Superior de Saúde de Leiria – Instituto Politécnico de Leiria.

A toda a equipa do Laboratório de Química do IPL, em especial à responsável pelas instalações, Maria Carlos Rodrigues, por toda a atenção e simpatia dedicadas no decorrer dos trabalhos.

Agradeço ainda às alunas Maria Inês Romão e Inês Ferreira da Escola Secundária Francisco Rodrigues Lobo, pelo auxílio prestado na preparação de chouriços.

E a todos os professores que no decorrer do curso me transmitiram conhecimentos imprescindíveis, tanto na Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, como na Escola Superior de Saúde, ambas do Instituto Politécnico de Leiria, a oportunidade de concretizar esta importante etapa, de investigação, que eu tanto adoro.

Não menos importante, a todos os meus amigos e colegas de curso, pela amizade e companheirismo, por terem partilhado comigo as angústias, mas, principalmente, as alegrias, os conhecimentos e, sem dúvida, os melhores momentos e recordações deste mestrado.

Quero também agradecer em particular à minha colega e amiga Taciana Bertotti que foi a minha grande companheira nesta dissertação, apoiando-me e ajudando-me a crescer enquanto pessoa, e por não me ter deixado desistir, muito obrigada.

E por fim, ao meu namorado Ricardo Figueira, pelo apoio incondicional que me deu no incentivo à realização desta tese e por toda a paciência que teve de ter ao longo destes meses.

A todos, o meu enorme obrigada.

*Esta página foi intencionalmente deixada em branco*

## RESUMO

---

A dissertação apresentada, “Estudo da Viabilidade e Incorporação de *Myrtus spp.* em diferentes produtos alimentares”, foi realizada com base no desenvolvimento de novas formulações alimentares, tendo como objetivo valorizar nutricionalmente os alimentos, com o extrato de *Myrtus spp.*, recorrendo às boas práticas de gestão da qualidade e segurança alimentar.

O *Myrtus spp.*, vulgarmente conhecido em Portugal por Murta, Murteira, Murtinho ou Murtinhos, é um arbusto perene que pode atingir 1.5 metros de altura, exibindo flores brancas, folhas verdes brilhantes e frutos comestíveis. Este desenvolve-se espontaneamente por toda a área do Mediterrâneo. As suas folhas e flores providenciam um sabor aromatizante que pode ser incluído em muitos cozinhados. Contudo, encontra-se atualmente com um baixo reconhecimento sendo necessário apostar no seu estudo de forma a avaliar o seu verdadeiro potencial.

Neste estudo foram realizadas várias análises ao murtinho, no que respeita a propriedades de natureza física e química e em particular a alguns compostos com efeitos bioativos. O objetivo principal da presente dissertação foi avaliar as propriedades físico-químicas do fruto, bem como dos compostos bioativos com potenciais benefícios para a saúde. Nesse sentido, foram avaliados quanto às suas propriedades físicas (dimensões, massa específica e porção edível), propriedades químicas (humidade, acidez, °Brix e açúcares totais), atividade antimicrobiana, compostos fenólicos e atividade antioxidante, em diferentes extratos de polpas, sementes, folhas e flores.

Os extratos foram ainda submetidos a uma simulação das condições do trato digestivo, para avaliar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos e atividade antioxidante, tendo-se realizado alguns testes de viabilidade celular com células CACO-2.

No que diz respeito às propriedades físicas analisadas, o murtinho *in natura* apresenta um peso médio de  $0.22 \text{ g} \pm 0.06$ , uma altura média de  $9.89 \text{ mm} \pm 0.71$ , um diâmetro médio de  $7.66 \text{ mm} \pm 0.55$ , um calibre médio de  $0.88 \text{ cm} \pm 0.05$  e um volume médio de  $2.86 \text{ cm}^3 \pm 0.52$ . Relativamente ao número de sementes, apresenta uma média de  $5.95 \pm 1.45 \approx 6$  por fruto.

Quanto às análises químicas, o murquinho apresenta baixo teor em sólidos solúveis totais, 1.80 % °Brix  $\pm$  0.17 e baixa acidez, de 5.25 ácido tartárico/100 g  $\pm$  0.01. Foi também determinada a capacidade antioxidante, pelos métodos do ABTS, DPPH e FRAP, os polifenóis totais, pelo método de *Folin-Ciocalteu* e a determinação da atividade antimicrobiana relativamente a bactérias Gram – e Gram + (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*).

Os resultados obtidos demonstram que a murta apresenta atividade antioxidante e características físico-químicas com relevante interesse para a formulação de novos produtos alimentares. Estes atributos contribuirão para a valorização do produto e a sua introdução em alguns nichos de mercado, devido à sua história, sustentabilidade e por se tratar de um recurso nacional.

Na última etapa foram realizadas diferentes formulações com a incorporação de *Myrtus spp.* em diversos alimentos, tais como, em enchido/chouriço, em tempero/vinagre e em cerveja, com o intuito de beneficiar das propriedades da planta, encontrando assim formas mais naturais para o seu consumo. Com este estudo, concluiu-se que o murquinho é um pequeno fruto portador de um grande potencial em compostos bioativos benéficos para a saúde dos consumidores.

**Palavras-chave:** *Myrtus spp.*, inovação, planta silvestre comestível, pequenos frutos, controlo microbiológico.

*Esta página foi intencionalmente deixada em branco*

## ABSTRACT

---

*The dissertation presented, "Feasibility Study and Incorporation of Myrtus spp. in different types of food", was based on the development of new formulations, aiming at nutritional enhancement of food products with Myrtus spp., quality management practices and food safety.*

*Myrtus spp., commonly known in Portugal as Murta, Murteira, Murtinho or Murtinhos, is a perennial shrub that can reach 1.5 meters in height, displaying white flowers, bright green leaves and edible fruits. It develops spontaneously throughout the Mediterranean area. Its leaves and flowers provide a flavoring flavor that can be added to many cookings. However, it is currently under-recognized and it is necessary to focus on its study in order to assess its true potential.*

*In this study, several analyzes were performed on the myrtle, regarding its physical and chemical properties and in particular, regarding some compounds with bioactive effects. The main objective of this dissertation was to evaluate the physicochemical properties of the fruit, as well as the presence of bioactive compounds with potential health benefits. In this sense, they were evaluated for their physical properties (dimensions, specific mass and edible portion), chemical properties (moisture, acidity, °Brix and total sugars), antimicrobial activity, phenolic properties and antioxidant activity, in different extracts of pulps, seeds, leaves and flowers.*

*The extracts were also submitted to a simulation of digestive tract conditions to evaluate the bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant activity, via cell viability tests with CACO-2 cells.*

*With regard to the physical properties analyzed, the murtinho in natura demonstrates an average weight of  $0.22 \text{ g} \pm 0.06$ , an average height of  $9.89 \text{ mm} \pm 0.71$ , an average diameter of  $7.66 \text{ mm} \pm 0.55$ , an average caliber of  $0.88 \text{ cm} \pm 0.05$  and an average volume of  $2.86 \text{ cm}^3 \pm 0.52$ . Regarding the number of seeds, it shows an average of  $5.95 \pm 1.45 \approx 6$  per fruit.*

*Concerning the chemical analysis, the myrtle had a low total soluble solids,  $1.80 \% \text{ °Brix} \pm 0.17$  and low acidity of  $5.25 \text{ g tartaric acid}/100 \text{ g} \pm 0.01$ .*

*The antioxidant capacity was determined by the ABTS, DPPH and FRAP methods, and total polyphenols by the Folin-Ciocalteu method. Antimicrobial activity with respect to Gram - and Gram + bacteria (Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae and Staphylococcus aureus) was also assessed.*

*The results showed that the myrtle has antioxidant activity and physicochemical characteristics with relevant interest for the formulation of new food products. These attributes will contribute to the appreciation of the product and its introduction in some niche markets, due to its history, sustainability and because it is a national resource.*

*In the last stage, different formulations were made with the incorporation of Myrtus spp. in various foods, such as sausage/chorizo, seasoning/vinegar and beer, in order to benefit from the plant, thus finding more natural forms for its consumption. With this study it was concluded that murтинho is a small fruit carrying a great potential in several bioactive compounds, that can bring great benefits to the health of consumers.*

**Key words:** *Myrtus spp., innovation, edible wild plant, small fruits, antioxidant capacity, microbiological control.*

*Esta página foi intencionalmente deixada em branco*

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 – Biodiversidade de Myrtaceae pelo seu característico fruto de tom azul-escuro (a), as suas características folhas (b) e a sua característica flôr branca (c) (Retamales & Scharaschkin, 2015) & (Vasconcelos, et al., 2017) .....	29
Figura 2 – Fruto (a), folha (b) e flôr (c) de <i>Myrtus spp.</i> (Purser, 2019) .....	30
Figura 3 – Distribuição da espécie <i>Myrtus spp.</i> marcada a verde em Portugal (a) e a azul no Mundo (b) (Heywood, 1996) .....	31
Figura 4 – Enquadramento regional da localidade de Agroal (EMICEP, 2019) .....	32
Figura 5 – Imagens da praia fluvial do Agroal (EMICEP, 2019) .....	32
Figura 6 – Folhas infetadas com ferrugem da murta ( <i>Austropuccinia psidii</i> ) .....	34
Figura 7 – Classificação dos antioxidantes, adaptado de Ratnam (2006) .....	35
Figura 8 – Classificação conforme as classes e subclasses dos compostos fenólicos, adaptado de Fraga (2009) .....	37
Figura 9 – Licores de murta, de Itália (a) e de Portugal (b) (B2C ECOMMERCE BRASIL, 2019) (Neteuro, 2019).....	41
Figura 10 – Mapa de Portugal Continental onde se encontra assinalado o local (Agroal) de recolha das amostras sob estudo – Primeiro momento de colheita de amostra (Mapas de Portugal, 2019).....	45
Figura 11 – Mapa de Portugal Continental onde se encontra assinalado o local (Leiria) de recolha das amostras sob estudo – Segundo momento de colheita de amostra (Mapas de Portugal, 2019).....	45
Figura 12 – Representação demonstrativa da medição do diâmetro (a) e altura (b) da baga, com recurso a um Paquímetro Digital INECO L150 .....	47
Figura 13 – Reta de calibração do método de DNS com soluções padrão de D-glicose, para quantificação de açúcares redutores.....	52
Figura 14 – Amostras liofilizadas das folhas (a), das sementes (b) e da polpa (c) da murta .....	52
Figura 15 – Amostras de polpa, semente e folha de murta sob catálise ácida (2 mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 2% (v/v) em metanol) (a) e, amostras após 5 minutos de centrifugação a 1000 rpm, com sobrenadante contendo os esteres metílicos de ácidos gordos (FAME's) (b)53	

Figura 16 – Análise dos FAMES no cromatógrafo gasoso (GC) Finnigan Ultra Trace .....	54
Figura 17 – Extração dos compostos fenólicos: trituração da polpa por pressão manual mecânica com o auxílio de almofariz e pilão (a), folha, semente e polpa em frascos de vidro graduados com o solvente (b) .....	56
Figura 18 – Reta de calibração do ácido gálico para quantificação de compostos fenólicos totais pelo método <i>Folin-Ciocalteu</i> .....	58
Figura 19 – Reta de calibração do ácido ascórbico para a determinação da capacidade antioxidante pelo método ABTS .....	60
Figura 20 – Reta de calibração do ácido ascórbico, usando o solvente acetona a 70 % v/v, para determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH .....	62
Figura 21 – Reta de calibração do ácido ascórbico, usando o solvente etanol a 70 % v/v, para determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH .....	62
Figura 22 – Reta de calibração do sulfato ferroso para a determinação da capacidade antioxidante pelo método FRAP .....	64
Figura 23 – Extração no rotavapor Laborota 4000 (a) e identificação dos balões da polpa, semente e folha de <i>Myrtus spp.</i> após a extração do solvente etanol a 70 % v/v (b).....	65
Figura 24 – Diagrama da incorporação de <i>Myrtus spp.</i> em enchido/chouriço.....	71
Figura 25 – Enchido/chouriço utilizando <i>Myrtus spp.</i> como conservante natural (b), nitrato de potássio como conservante químico (a) e sem adição de conservante (c) ...	71
Figura 26 – Diagrama do procedimento de produção de vinagre com incorporação dos frutos (A) e folhas (B) de <i>Myrtus spp.</i> .....	73
Figura 27 – Diagrama do processo de produção de cerveja artesanal de <i>Myrtus spp.</i> ...	74
Figura 28 – Murtinho desidratado a uma temperatura de 60°C durante 72 horas .....	78
Figura 29 – Teor de Açúcares Redutores (mg/100g ms) em amostras de Polpa liofilizada, Semente liofilizada e Folha liofilizada, obtidas a partir do método DNS .....	79
Figura 30 – Compostos Fenólicos Totais (mg GAE/100g) em amostras da Polpa <i>in natura</i> (P), Polpa desidratada (PS), Semente desidratada (SS), Folha <i>in natura</i> (F) e Flôr <i>in natura</i> (L), com os solventes acetona a 70 % v/v e etanol a 70 % v/v, obtidos a partir do método <i>Folin-Ciocalteu</i> .....	83
Figura 31 – Capacidade Antioxidante Total (mg VCEAC/100g) em amostras amostras da Polpa <i>in natura</i> (P), Polpa desidratada (PS), Semente desidratada (SS), Folha <i>in natura</i>	

(F) e Flôr <i>in natura</i> (L), com os solventes acetona a 70 % v/v e etanol a 70 % v/v, obtidos a partir do método ABTS .....	85
Figura 32 – Capacidade Antioxidante Total (mg VCEAC/100g) em amostras amostras da Polpa <i>in natura</i> (P), Polpa desidratada (PS), Semente desidratada (SS), Folha <i>in natura</i> (F) e Flôr <i>in natura</i> (L), com os solventes acetona a 70 % v/v e etanol a 70 % v/v, obtida a partir do método DPPH .....	87
Figura 33 – Capacidade Antioxidante Total ( $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$ ) em amostras da Polpa <i>in natura</i> (P) e da Polpa desidratada (PS), obtida a partir do método FRAP .....	89
Figura 34 – Reta de correlação entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total realizada através do ensaio ABTS, para o solvente acetona a 70 % v/v .....	90
Figura 35 – Reta de correlação entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total realizada através do ensaio ABTS, para o solvente etanol a 70 % v/v .....	91
Figura 36 – Reta de correlação entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total realizada através do ensaio DPPH, para o solvente acetona a 70 % v/v .....	92
Figura 37 – Reta de correlação entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total realizada através do ensaio DPPH, para o solvente etanol a 70 % v/v .....	92
Figura 38 – Atividade antibacteriana da polpa, das sementes e das folhas de <i>Myrtus spp.</i> na estirpe <i>Staphylococcus aureus</i> .....	94
Figura 39 – Atividade antibacteriana da polpa, das sementes e das folhas de <i>Myrtus spp.</i> na estirpe <i>Escherichia coli</i> .....	96
Figura 40 – Atividade antibacteriana da polpa, das sementes e das folhas de <i>Myrtus spp.</i> na estirpe <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	97
Figura 41 – Gráfico dos resultados de viabilidade celular das células CACO-2, submetidas ao extrato de polpa de <i>Myrtus spp.</i> , ao extrato das sementes de <i>Myrtus spp.</i> e ao extrato da folha de <i>Myrtus spp.</i> , em diferentes concentrações, avaliados através do ensaio MTT, após 6 horas de incubação .....	98
Figura 42 – Espectros 1D 1H RMN de extratos de <i>Myrtus spp.</i> A figura apresenta a região do espectro associada aos sinais provenientes de grupos aromáticos (6.00 a 8.00 ppm)	

para extratos de semente desidratada em etanol 70 % v/v (A); polpa desidratada em acetona 70 % v/v (B); polpa em acetona 70 % v/v (C) e polpa em etanol 70 % v/v (D) ..... 100

Figura 43 – Espectros 1D 1H RMN de extratos de *Myrtus spp.* A figura apresenta a região do espectro associada aos sinais provenientes de grupos aromáticos (6.0 a 8.0 ppm) para extratos de flôr em acetona a 70 % v/v (A); flôr em etanol a 70 % v/v (B); folha em acetona a 70 % v/v (C) e folha em etanol a 70 % v/v (D)..... 101

Figura 44 – Resultado do produto final do enchido com incorporação de *Myrtus spp.* após a fumagem ..... 102

Figura 45 – Identificação geral de bactérias e fungos (a), identificação das bactérias ao pormenor (b), identificação dos fungos ao pormenor (c), Identificação de coliformes e *E.coli* em todas as amostras de enchidos (d), enchido com murтинho (e), enchido com nitrato de potássio (f) ..... 103

Figura 46 – Produto inicial de vinagre de sidra (a) vs produto final de vinagre de sidra com incorporação do fruto de *Myrtus spp.* (b) ..... 104

Figura 47 – Produto final da cerveja artesanal de *Myrtus spp.*..... 108

*Esta página foi intencionalmente deixada em branco*

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 – Descrição e codificação atribuída a cada extração realizada nos murтинhos	57
Tabela 2 – Resultados das Características Biométricas de <i>Myrtus spp.</i>	76
Tabela 3 – Resultados das Características Químicas de <i>Myrtus spp.</i>	77
Tabela 4 – Composição dos ácidos gordos (%) por ordem decrescente, presentes nas amostras da polpa de <i>Myrtus spp.</i>	80
Tabela 5 – Composição dos ácidos gordos (%) por ordem decrescente, presentes nas amostras das sementes de <i>Myrtus spp.</i>	81
Tabela 6 – Composição dos ácidos gordos (%) por ordem decrescente, presentes nas amostras das folhas de <i>Myrtus spp.</i>	81
Tabela 7 – Teor de compostos fenólicos totais em diversos frutos, pelo método <i>Folin-Ciocalteu</i>	84
Tabela 8 – Comparação da capacidade antioxidante total da murta com diferentes frutos, determinada pelo método ABTS, através de um estudo conduzido por <i>Floegel, et al.</i> (2011)	86
Tabela 9 – Comparação da capacidade antioxidante total da murta com diferentes frutos, determinada pelo método DPPH, através de um estudo conduzido por <i>Floegel, et al.</i> (2011)	88
Tabela 10 – Comparação da capacidade antioxidante total da murta com diferentes frutos, determinada pelo método FRAP, através de um estudo conduzido por <i>Denardin, et al.</i> (2015)	90
Tabela 11 – Compilação dos resultados do Teor de compostos fenólicos totais determinado via método <i>Folin-Ciocalteu</i> e atividade antioxidante total pelos métodos ABTS e DPPH, com a extração dos solventes acetona a 70 % v/v e etanol a 70 % v/v	93
Tabela 12 – Avaliação da atividade antibacteriana utilizados na estirpe <i>Staphylococcus aureus</i>	95
Tabela 13 – Avaliação da atividade antibacteriana dos antibióticos utilizados na estirpe <i>Staphylococcus aureus</i>	96

Tabela 14 – Resultados de viabilidade celular das células CACO-2, submetidas ao efeito dos extratos da polpa, semente e folha de <i>Myrtus spp.</i> , em diferentes concentrações, avaliados através do ensaio MTT após seis horas de incubação .....	98
Tabela 15 – Resultados de pH e °Brix dos vinagres analisados.....	105
Tabela 16 – Resultados dos métodos de <i>Folin-Ciocalteu</i> dos vinagres analisados ....	106
Tabela 17 – Resultados dos métodos de ABTS e DPPH dos vinagres analisados.....	107
Tabela 18 – Resultados de pH e °Brix das cervejas analisadas .....	109
Tabela 19 – Resultados dos métodos de <i>Folin-Ciocalteu</i> , ABTS e DPPH das cervejas analisadas .....	111

*Esta página foi intencionalmente deixada em branco*

## LISTA DE SIGLAS

---

- AA** – Ácido Ascórbico
- Abs** – Absorvância
- ABTS** – Ácido 2,2-azinobis (3 etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
- A $\beta$**  – Peptídeo  $\beta$ -amilóide
- A<sub>w</sub>** – Atividade da água
- C** – Concentração
- CFT** – Compostos Fenólicos Totais
- CH<sub>3</sub>OH** – Metanol
- CIP** – Ciprofloxacina
- D** – Diâmetro
- DMEM** – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- DNS** – Ácido 3,5-dinitrosalicílico
- DPPH** – Radical 2,2-difenil-1 picrilhidrazil
- E. coli*** – *Escherichia coli*
- ECACC** – *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (Coleção Europeia de Culturas de Células Autenticadas)
- F** – Folha *in natura*
- FA** – *Fatty acid* (ácido gordo)
- FAMES** – *Fatty acid methyl esters* (Ésteres metílicos de ácidos gordos)
- FAO** – *Food Agriculture Organization* (Organização da Alimentação e Agricultura)
- FDA** – *Food and Drug Administration* (Administração Federal de Alimentos e Medicamentos)
- FRAP** – *Ferric Reducing Antioxidant Power* (Poder Antioxidante de Redução do Ferro)
- GAE** – *Gallic Acid Equivalents* (Equivalentes em Ácido Gálico)
- GC** – Cromatógrafo gasoso (*Gas chromatograph*)
- H** – Altura
- H<sub>2</sub>O** – Água
- HCl** – Ácido clorídrico
- ISO** – *International Standard Organization* (Organização Internacional de Normalização)

**KNO<sub>3</sub>** – Nitrato de potássio

**L** – Flôr *in natura*

**L. casei** – *Lactobacillus casei*

**M. communis** – *Myrtus communis*

**MHA** – Meio Agar Muller-Hinton

**MTT** – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolio

**MUFA** – *Monounsaturated fatty acids* (Ácidos gordos monoinsaturados)

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** – Carbonato de sódio

**NEAA** – Aminoácidos não essenciais

**NP** – Norma Portuguesa

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**PBS** – Tampão fosfato salino

**pH** – Potencial hidrogeniónico

**P** – Polpa *in natura*

**PEF** – Frações enriquecidas de polifenóis

**Pi** – Peso inicial

**PI** – Percentagem de inibição

**PS** – Polpa desidratada

**PUFA** – *Polyunsaturated fatty acids* (Ácidos gordos polinsaturados)

**RMN** – Ressonância Magnética Nuclear

**ROS** – *Reactive Oxygen Species* (Espécies reativas de oxigénio)

**SFA** – *Saturated fatty acids* (Ácidos gordos saturados)

**SS** – Semente desidratada

**SSC** – *Soluble Solids Content* (Teor de Sólidos Solúveis)

**S. aureus** – *Staphylococcus aureus*

**TPC** – *Total phenolic content* (Teor de fenólicos totais)

**TPTZ** – 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina

**UE** – União Europeia

**UV** – Ultra Violeta

**VB** – Vinagre de vinho branco controlo

**VBM** – Vinagre de vinho branco com incorporação do fruto de *Myrtus spp.*

**VCEAC** – Concentração equivalente de ácido ascórbico

**VS** – Vinagre de sidra controlo

**VSF** – Vinagre de sidra com incorporação de folhas de *Myrtus spp.*

**VSM** – Vinagre de sidra com incorporação do fruto de *Myrtus spp.*

**$\alpha$  Syn** – Alfa Sinucleína

*Esta página foi intencionalmente deixada em branco*

# ÍNDICE

---

DEDICATÓRIA	
AGRADECIMENTOS .....	I
RESUMO .....	IV
ABSTRACT .....	VII
LISTA DE FIGURAS .....	X
LISTA DE TABELAS .....	XV
LISTA DE SIGLAS .....	XVIII
1. INTRODUÇÃO .....	26
2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO .....	29
2.1. Taxonomia e Caracterização da Espécie <i>Myrtus spp.</i> .....	29
2.1.1. Morfologia e caracterização.....	29
2.1.2. Localização e Prevalência Geográfica .....	30
2.1.2.1. Caracterização da Área Geográfica em estudo .....	31
2.1.3. Propagação da espécie .....	33
2.1.3.1. Fatores que representam ameaças à propagação da espécie.....	33
2.2. Avaliação do Potencial do fruto proveniente da espécie <i>Myrtus spp.</i> .....	34
2.2.1. Caracterização Físico-química e nutricional do fruto .....	34
2.2.1.1. Capacidade Antioxidante .....	34
2.2.1.2. Composição Fenólica .....	36
2.3. Avaliação do Efeito benéfico para a Saúde e Bem-estar.....	38
2.4. Utilização de <i>Myrtus spp.</i> e Comercialização.....	40
2.4.1. Estudo da Viabilidade e Incorporação de <i>Myrtus spp.</i> em produtos alimentares .....	41
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	44
3.1. Recolha e preparação de amostras .....	44
3.2. Caracterização Físico-química .....	46
3.2.1. Determinação do Peso médio .....	46
3.2.2. Determinação da Quantidade de Sementes .....	46
3.2.3. Determinação do Diâmetro e da Altura média .....	46

3.2.4. Determinação do Calibre e do Volume.....	48
3.2.5. Determinação da Parte Edível do fruto fresco.....	48
3.2.6. Determinação do Teor de Humidade .....	49
3.2.7. Determinação da Acidez do Sumo.....	49
3.2.8. Determinação do Teor de Sólidos Solúveis – SSC .....	50
3.2.9. Determinação do Teor de Açúcares Redutores .....	50
3.2.10. Análise do Perfil de Ácidos gordos .....	52
3.3. Atividade Antioxidante .....	54
3.3.1. Extração de Compostos Fenólicos .....	55
3.3.2. Quantificação dos Compostos Fenólicos Totais.....	57
3.3.3. Avaliação da Capacidade de redução do radical ABTS.....	59
3.3.4. Avaliação da Capacidade antioxidante pelo Método DPPH .....	61
3.3.5. Avaliação da Capacidade antioxidante pelo Método de Redução do Ferro (FRAP).....	62
3.4. Avaliação da Atividade Antibacteriana.....	64
3.4.1. Estirpes bacterianas.....	65
3.4.2. Extração de compostos fenólicos .....	65
3.4.3. Método de Difusão em Disco .....	66
3.5. Teste de Viabilidade Celular.....	67
3.5.1. Preparação dos extratos .....	68
3.5.2. Cultura das células.....	68
3.5.3. Ensaio MTT .....	69
3.6. Ensaio de Ressonância Magnética Nuclear.....	70
3.7. Estudo da Viabilidade e Incorporação de <i>Myrtus spp.</i> em produtos alimentares .....	70
3.7.1. Em Enchido/chouriço (como conservante natural).....	70
3.7.2. Em Tempero/vinagre .....	72
3.7.3. Em Cerveja artesanal .....	73
3.8. Tratamento de Dados e Análise Estatística.....	75
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....	76
4.1. Caracterização Físico-Química .....	76
4.1.1. Determinação das Características Biométricas.....	76

4.1.2. Caracterização Química .....	77
4.1.3. Determinação do Teor de Açúcares Redutores .....	79
3.1.4. Análise do Perfil de Ácidos Gordos .....	80
4.2. Atividade Antioxidante .....	82
4.2.1. Quantificação dos Compostos Fenólicos Totais .....	82
4.2.2. Avaliação da Capacidade de redução do radical ABTS .....	85
4.2.3. Avaliação da Capacidade antioxidante pelo Método DPPH .....	86
4.2.4. Avaliação da Capacidade antioxidante pelo Método de Redução do Ferro (FRAP).....	89
4.2.5. Correlação entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total determinada pelos ensaios ABTS, DPPH e FRAP .....	90
4.3. Avaliação da Atividade Antibacteriana .....	94
4.4. Teste de Viabilidade Celular.....	97
4.5. Ensaio de Ressonância Magnética Nuclear.....	99
4.6. Estudo da Viabilidade e Incorporação de <i>Myrtus spp.</i> em produtos alimentares .....	102
4.6.1. Em Enchido/chouriço (como conservante natural).....	102
4.6.2. Em Tempero/vinagre .....	104
4.6.2.1. Sólidos solúveis totais e Acidez .....	104
4.6.2.2. Quantificação dos compostos fenólicos totais.....	105
4.6.2.3. Capacidade Antioxidante – ABTS e DPPH .....	107
4.6.3. Em Cerveja artesanal .....	108
4.6.3.1. Teor alcoólico, Sólidos solúveis totais e Acidez.....	109
4.6.3.2. Quantificação dos compostos fenólicos totais.....	110
4.6.3.3. Capacidade Antioxidante – ABTS e DPPH .....	111
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	113
BIBLIOGRAFIA .....	115
ANEXO I .....	124
ANEXO II .....	125
ANEXO III .....	126

*Esta página foi intencionalmente deixada em branco*

# 1. INTRODUÇÃO

---

Estima-se que, cerca de 27 mil espécies de plantas apresentem potencial para serem introduzidas na alimentação humana, sendo que, apenas uma pequena parte é utilizada na alimentação, o que se traduz na dependência excessiva de várias espécies (Romojaro, Botella, Obón, & Pretel, 2013). Algumas destas plantas comestíveis confinam-se a pequenos nichos geográficos, sendo conhecidas e utilizadas apenas pela população local havendo, no entanto, outras às quais não lhes é conferida qualquer utilização (Leal, Alves, & Hanazaki, 2018).

Define-se como planta comestível aquela que possui uma ou várias partes que podem ser consumidas, como a folha, a flôr ou a semente. Para além do consumo direto da planta pode obter-se através dela óleos, temperos e condimentos utilizados na confecção de alimentos (Leal, Alves, & Hanazaki, 2018).

As plantas silvestres comestíveis fazem parte de um património cultural e genético de diferentes regiões do mundo. A sua utilização surgiu da necessidade de encontrar novos alimentos em situações de escassez alimentar, que fornecem mais vitaminas, minerais e oligoelementos, contribuindo assim para uma dieta equilibrada e rica nutricionalmente (Pinela, Carvalho, & Ferreira, 2017).

Atualmente, a conservação da biodiversidade, a utilização sustentável dos recursos e a sua distribuição equitativa têm sido questões levantadas pela humanidade. Tem-se verificado um aumento no interesse de espécies silvestres, como forma de contribuir para um maior consumo de recursos disponíveis, promovendo a sustentabilidade ecológica e a diversificação dos hábitos alimentares (Romojaro, Botella, Obón, & Pretel, 2013).

Apesar das plantas comestíveis serem alimentos benéficos, é de salientar que o seu consumo deve ser feito de forma controlada e segura, devido às substâncias tóxicas que podem conter (Pinela, Carvalho, & Ferreira, 2017). Torna-se, desta forma, de máxima importância, a investigação, a produção e a comercialização destes frutos de forma normalizada, bem como, a disponibilização de informação às populações acerca dos mesmos.

*Myrtus spp.* é um arbusto verde que cresce principalmente em climas mediterrâneos, podendo chegar aos 2.4 metros de altura (Pirbalouti, Jahanbazi, Enteshari, & Malekpoor, 2010). Vulgarmente conhecida nacionalmente como murta, murtinho ou murtinhas, pertence à família Myrtaceae, que compreende aproximadamente 145 géneros e mais de 5500 espécies (Aleksic & Knezevic, 2014). Caracteriza-se pelas suas flores brancas, delicadas e perfumadas, pelas suas folhas verdes brilhantes e a sua fruta de cor azul-escura (Aleksic & Knezevic, 2014).

Devido ao seu valor nutricional, à sua cor distinta e à sua sustentabilidade, tem potencial para ser produzido e introduzido no mercado dos pequenos frutos. Com o passar dos anos, tem ganho notoriedade, existindo já licores e cosméticos feitos à base deste fruto (Figueiredo, et al., 2013). É um recurso nacional e com alguma disponibilidade, pelo que se encontra subestimado (Pirbalouti, Jahanbazi, Enteshari, & Malekpoor, 2010). Com recurso à incorporação de plantas silvestres comestíveis em diferentes produtos alimentares, esta pode assim ser uma das respostas para o problema de biodiversidade, sustentabilidade e nutrição.

## **Objetivos de Investigação**

### **Objetivo Geral:**

O presente estudo teve como objetivo avaliar as propriedades físico-químicas do murtinho, bem como dos seus compostos bioativos com potenciais benefícios para a saúde e, as suas utilizações alimentares. Nesse sentido, o fruto foi avaliado quanto às suas propriedades físicas, químicas, microbianas e fenólicas. Este trabalho teve ainda como objetivo desenvolver novas formulações/inoações alimentares, com incorporação em enchidos/chouriço, em cerveja e aromatizando vinagre, valorizando-se assim nutricionalmente com o extrato do fruto e das folhas de *Myrtus spp.*, alguns produtos alimentares.

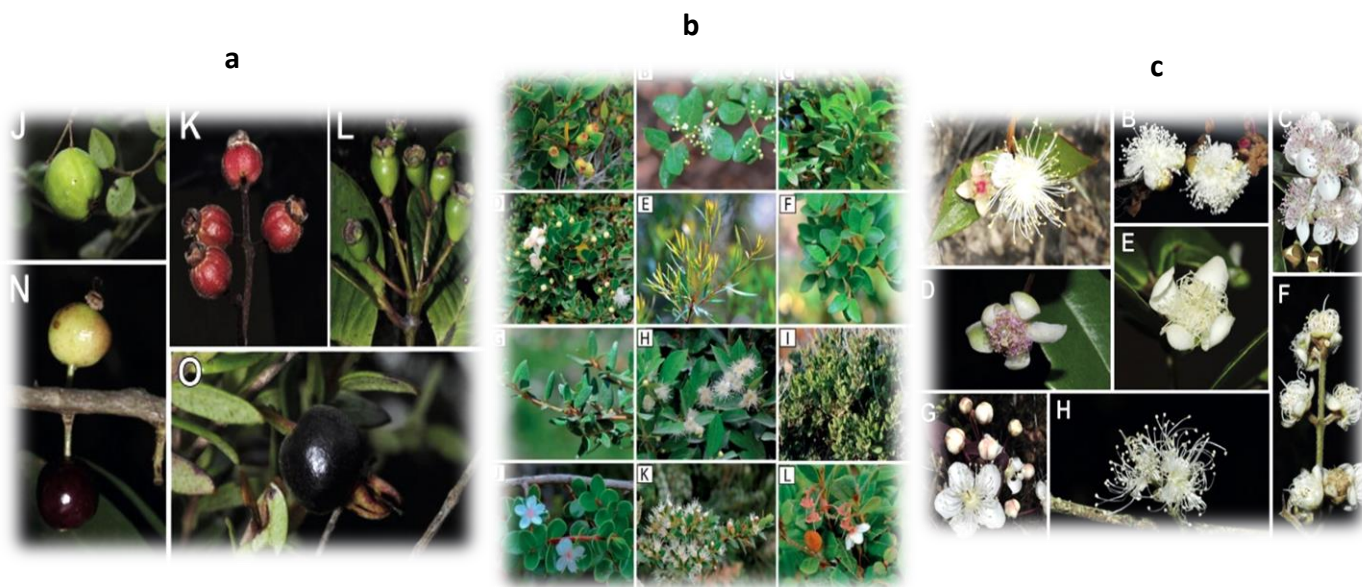
### **Objetivos Específicos:**

- ▶ Caraterizar o murtinho (*Myrtus spp.*) da região de Leiria através de análises físicas e químicas;
- ▶ Avaliar a capacidade antioxidante pelos métodos ABTS, FRAP, DPPH e teor de compostos fenólicos pelo método de *Folin-Ciocalteu*;
- ▶ Avaliar a atividade antibacteriana do extrato de *Myrtus spp.* em três estirpes de bactérias, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*;
- ▶ Conhecer a bioacessibilidade dos compostos fenólicos totais e da sua atividade antioxidante;
- ▶ Desenvolver produtos alimentares, aromatizados e/ou com incorporação de murtinhos.

## 2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

### 2.1. Taxonomia e Caracterização da Espécie *Myrtus spp.*

*Myrtus spp.* é um arbusto verde conhecido nacionalmente como murta, murtinho ou murtinhos, pertence à família Myrtaceae (Figura 1), uma grande família de angiospermas com mais de 5500 espécies, divididas em duas subfamílias e 140 géneros (Aleksic & Knezevic, 2014). No Chile, a família é representada por 26 espécies e 10 géneros distribuídos do centro norte ao extremo sul da região continental (Retamales & Scharaschkin, 2015).



**Figura 1** – Biodiversidade de Myrtaceae pelo seu característico fruto de tom azul-escuro (a), as suas características folhas (b) e a sua característica flôr branca (c) (Retamales & Scharaschkin, 2015) & (Vasconcelos, et al., 2017)

#### 2.1.1. Morfologia e caracterização

A murta é um arbusto sensivelmente pequeno, com 1.8 a 2.4 metros de altura (Mendes, Gazarini, & Rodrigues, 2001), que se caracteriza por ter ramos densamente cobertos por folhas lanceoladas e lustrosas. De aspecto muito ramoso e com ramos de secção quadrangular, os seus rebentos são pubescentes e glandulosos, tornando-se mais tarde em glabros (Mendes, Gazarini, & Rodrigues, 2001).

O fruto é de pequenas bagas elipsoides (Figura 2 (a)) de tons que, na maturação (em meados de setembro), variam entre o azul-escuro e o negro, apresentando uma ligeira coroação às sépalas (Figueiredo, et al., 2013).

As folhas, de aspecto coriáceo, são brilhantes (Figura 2 (b)), lustrosas e muito aromáticas quando esmagadas. Inserem-se de forma oposta e possuem diferentes tamanhos, de 3 a 5 centímetros, apresentando uma forma ovado-lanceolada, de cor verde-escuro na página superior e mais clara na inferior, mostrando inúmeras pontuações (Mendes, Gazarini, & Rodrigues, 2001).

As flores, solitárias e axilares, são compostas por cinco pequenas pétalas brancas e caducas e numerosos estames (Figura 2 (c)). São também aromáticas, delicadas e perfumadas e florescem a partir do final da primavera/início do verão (junho a outubro) (Figueiredo, et al., 2013).



**Figura 2** – Fruto (a), folha (b) e flôr (c) de *Myrtus spp.* (Purser, 2019)

### **2.1.2. Localização e Prevalência Geográfica**

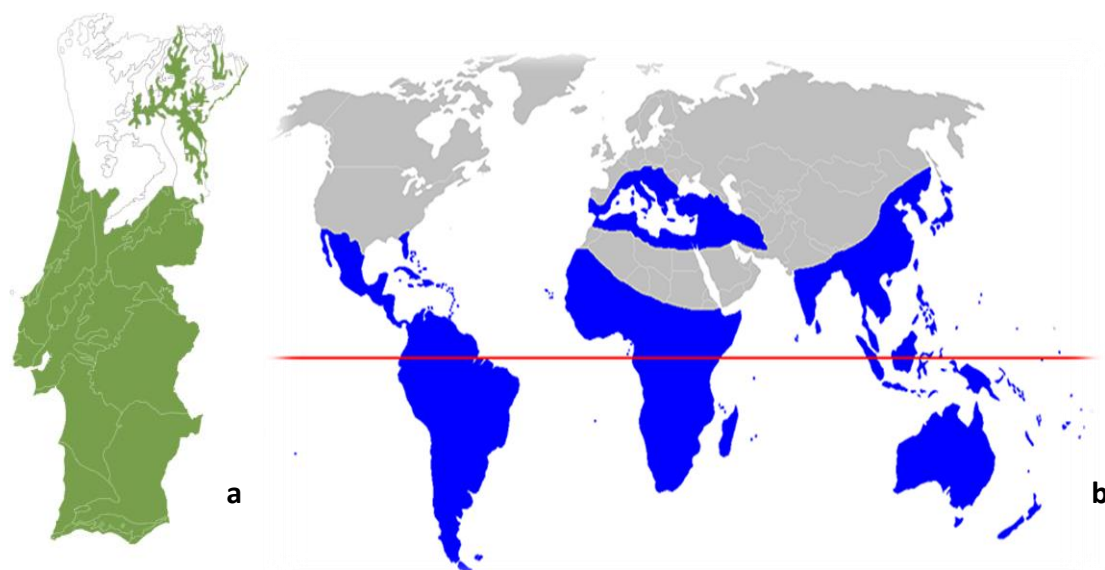
A espécie *Myrtus spp.* é uma parte comum da flora típica do Mediterrâneo. É nativa do sul da Europa, norte de África e oeste da Ásia, sendo também distribuído na América do Sul, no noroeste do Himalaia e na Austrália (Figura 3 (b)) (Aleksic & Knezevic, 2014).

Esta cresce espontaneamente em Espanha, França, Grécia, Turquia, Tunísia, Argélia, Marrocos, Croácia e Montenegro, entre outros países com clima mediterrâneo (Berka-Zougali, Ferhat, Hassani, Chemat, & Allaf, 2012).

Na Tunísia, cresce selvagememente a norte, nas áreas costeiras, nas colinas internas e nas áreas florestais (Aleksic & Knezevic, 2014).

Em Itália, cresce ao longo da costa e nas colinas internas, sendo abundante especialmente nas ilhas, onde representa uma das espécies mais características (Cannas, et al., 2013).

Em Portugal, a murta cresce de forma espontânea no centro e sul do país (Figura 3 (a)), sendo que está também presente na ilha da Madeira e em cinco das ilhas dos Açores (Faial, Pico, S. Jorge, Santa Maria e S. Miguel) (Figueiredo, et al., 2013).



**Figura 3** – Distribuição da espécie *Myrtus spp.* marcada a verde em Portugal (a) e a azul no Mundo (b) (Heywood, 1996)

### 2.1.2.1. Caracterização da Área Geográfica em estudo

O Agroal (Figura 4) é uma localidade no extremo sul da União de Freguesias da Freixianda (concelho de Ourém) e da Sabacheira (concelho de Tomar), com as coordenadas GPS 39.679065, -8.436291 – praia fluvial do Agroal (EMICEP, 2019).

Esta não é só uma praia fluvial termal de águas frias, como é também uma nascente perene de grande caudal, que alimenta o rio Nabão e, que abriga espécies de fauna e flora únicas na região e no mundo. Conhecida pelas suas águas milagrosas, foi avaliada de “boa qualidade” pela Associação de Defesa do Consumidor em 2014. (EMICEP, 2019).



**Figura 4** – Enquadramento regional da localidade de Agroal (EMICEP, 2019)

A água que abunda, vinda das rochas da montanha, brota com uma composição química rica em bicarbonatos cálcicos, conferindo-lhe propriedades curativas extraordinárias para doenças dermatológicas. A região envolvente é bastante seca e montanhosa, no entanto, o curso do rio confere um microclima muito próprio àquele lugar, mais húmido e ameno (EMICEP, 2019).

A época banhar na praia fluvial do Agroal (Figura 5) tem início a um de julho e termina a 15 de setembro.



**Figura 5** – Imagens da praia fluvial do Agroal (EMICEP, 2019)

### **2.1.3. Propagação da espécie**

A murta pode ser encontrada numa variedade de ambientes, incluindo florestas húmidas, pântanos, *habitats* ribeirinhos e matagais xeromórficos costeiros, ou seja, em solos bem drenados e férteis, mas com alguma humidade superficial (Pirbalouti, Jahanbazi, Enteshari, & Malekpoor, 2010). É frequentemente usada em intervenções paisagísticas, devido às suas flores e aroma, mas também, pelo seu potencial de controlo de erosão dos solos. É também utilizada na execução de sebes e integra arranjos em grupos de arbustos com distintas características (Figueiredo, et al., 2013).

A maioria das espécies são endémicas do Chile e da Argentina e apresentam um tipo de reprodução hermafrodita (Santos, et al., 2017).

#### **2.1.3.1. Fatores que representam ameaças à propagação da espécie**

Um estudo recente realizado na Austrália, segundo Soewarto, et al. (2019), mostra que, a principal ameaça à espécie é a ferrugem da murta, *Austropuccinia psidii*, tratando-se de um fungo invasivo que ataca as espécies da família Myrtaceae. Esta propagação é restrita às áreas costeiras leste e sul da Austrália, onde a maioria ocorreu em áreas residenciais ou jardins públicos, e uma minoria em áreas naturais. Quando o fungo infecta o hospedeiro, os sintomas da doença aparecerem em 12 dias e são caracterizados visualmente pela formação de pústulas cobertas por poros amarelos e pulverulentos (Figura 6) (Soewarto, et al., 2019).

Atualmente, 1285 espécies de Myrtaceae apresentam risco de exposição ao fungo invasivo, o qual se prevê que diminuirá para 1224 espécies no futuro, com as soluções previstas (Berthon, Esperon-Rodriguez, Beaumont, Carnegie, & Leishman, 2018). O uso de marcadores moleculares preditivos para resistência à ferrugem da murta é atualmente a abordagem mais económica e ecológica para controlar a doença, no qual se analisou o transcriptoma em três espécies de Myrtaceae endémicas da Nova Caledónia (*Arillastrum gum-miferum*, *Syzygium longifolium* e *Tristaniopsis glauca*) que

apresentam respostas contrastantes ao patógeno não infectado vs infectado (Soewarto, et al., 2019).

Em Portugal não foram encontrados quaisquer registos desta infecção (Berthon, Esperon-Rodriguez, Beaumont, Carnegie, & Leishman, 2018).



**Figura 6** – Folhas infetadas com ferrugem da murta (*Austropuccinia psidii*) (Roux, Greyling, Coutinho, Verleur, & Wingfield, 2013)

## **2.2. Avaliação do Potencial do fruto proveniente da espécie *Myrtus spp.***

### **2.2.1. Caracterização Físico-química e nutricional do fruto**

A qualidade nutricional de um fruto pode ser definida como a quantidade de compostos bioativos saudáveis presentes na matriz do mesmo. Sendo, em alguns casos, definido como uma combinação de atributos sensoriais, como a cor, a quantidade de açúcar presente, o nível de acidez, o aroma, os atributos nutricionais, como os antioxidantes, as vitaminas e os minerais presentes (Halliwell, 2011).

#### **2.2.1.1. Capacidade Antioxidante**

Os antioxidantes podem ser definidos como moléculas que protegem um alvo biológico do dano oxidativo e podem ser classificados em dois grandes grupos: enzimáticos (enzimas, moléculas de baixa massa molecular e co-fatores enzimáticos) e não

enzimáticos (obtidos de fontes alimentares), como representado na Figura 7 (Halliwell, 2011).

Estes são substâncias que, em pequenas concentrações, têm a capacidade de inibir ou retardar a oxidação de um substrato, tanto de moléculas simples como polímeros e biosistemas complexos (Halliwell, 2011).

Exemplos de antioxidantes enzimáticos são: glutathiona redutase (GSH), catalase, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e proteínas ligantes de metais (albumina, metalotioneína e ceruloplasmina). Os antioxidantes não enzimáticos podem ser sintéticos ou naturais, sendo estes obtidos por via alimentar, como é o caso do tocoferol,  $\beta$ -caroteno, vitamina C e compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides) (Ratnam, Ankola DD, Bhardwaj, Sahana DK, & Kumar, 2006).

Os antioxidantes podem também exercer um papel protetor quando sequestrarem radicais livres presentes nos alimentos e/ou que se formem durante a digestão gastrointestinal, reduzindo desta forma, a formação dos compostos potencialmente nocivos (Ratnam, Ankola DD, Bhardwaj, Sahana DK, & Kumar, 2006).

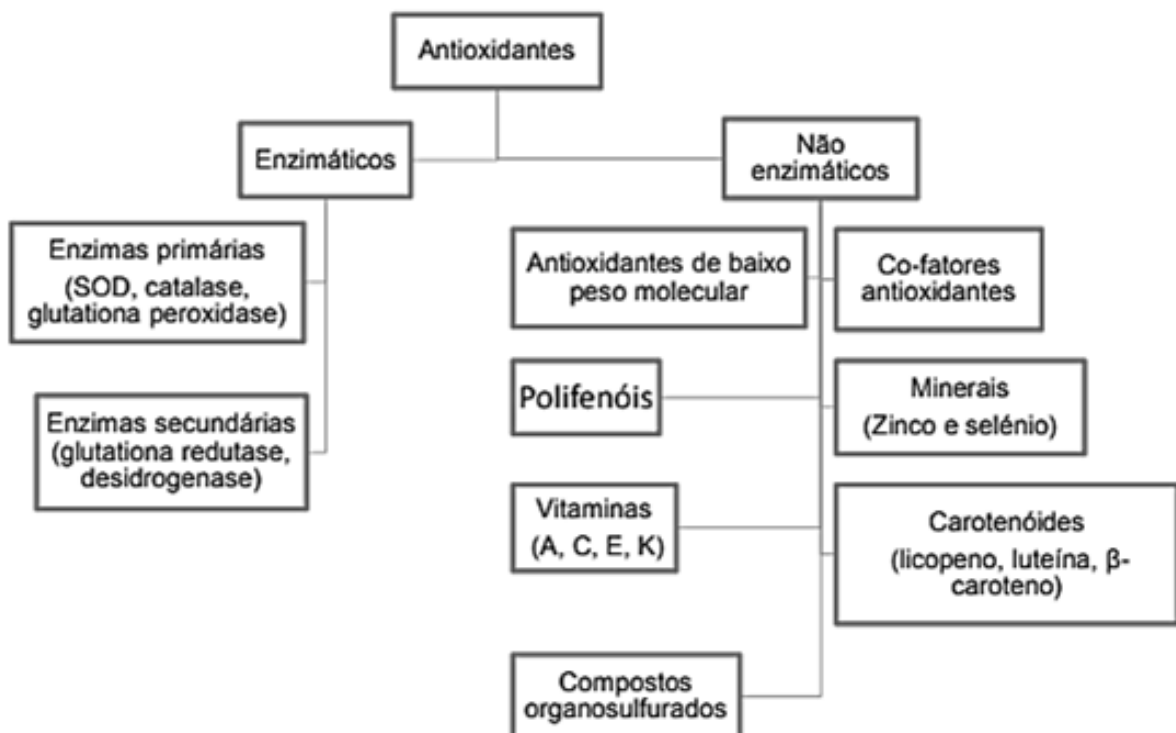


Figura 7 – Classificação dos antioxidantes, adaptado de Ratnam (2006)

### 2.2.1.2. Composição Fenólica

Relativamente aos compostos fenólicos (Figura 8), estes dividem-se em flavonóides (flavonóis, flavonas, flavanonas, antocianinas e isoflavonas) e não flavonóides (ácidos fenólicos, estilbenos, cumarinas e taninos). Estes compostos conferem cor, sabor, adstringência e estabilidade oxidativa às plantas, sendo considerados compostos bioativos não nutrientes, o que os torna uma parte importante da dieta (Fraga, 2009).

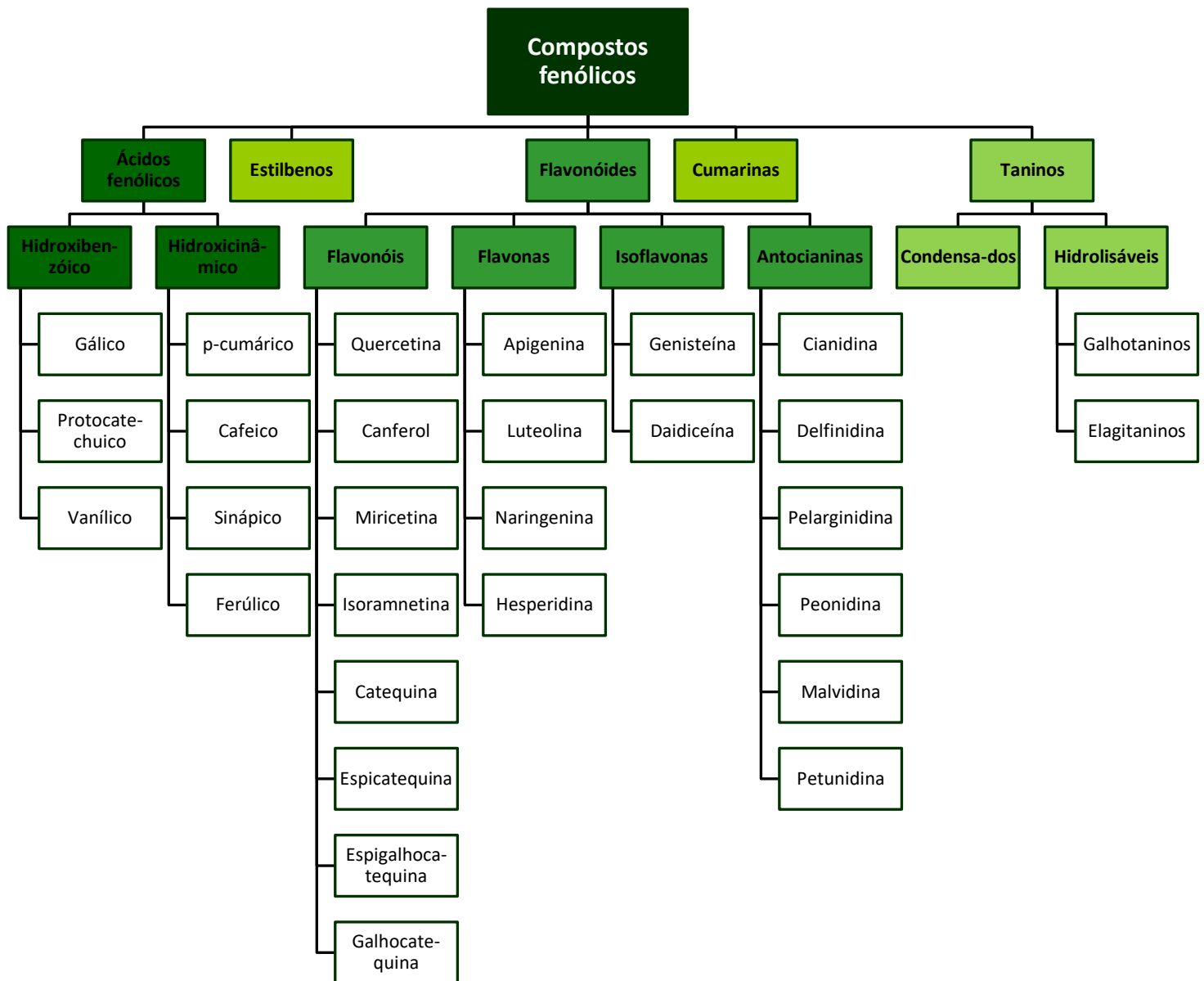
A murta apresenta na sua composição principalmente óleos voláteis, taninos, açúcares, flavonóides e ácidos orgânicos, como os ácidos cítrico e málico, apresentando alto teor de limoneno, linalol e acetato de mirtenilo como componentes principais (Sumbul, Ahmad, Asif, & Akhtar, 2011).

As suas folhas contêm taninos, flavonóides como derivados de quercetina, catequina, miricetina e óleos voláteis (Cakir, 2004). Os compostos voláteis do óleo essencial extraído das folhas são cerca de 47, sendo eles classificados em três categorias principais: terpenos (hidrocarbonetos monoterpenos e sesquiterpenos), terpenóides (monoterpenos e sesquiterpenos oxigenados) e fenilpropanóides (Anwar, Ahmed, Al Awwad, Ansari, & Wagih, 2016). Estes compostos terpenóides, estão presentes nos óleos essenciais das folhas (0.19 - 0.37 %), do fruto (0.03 - 0.13 %) e das flores (0.21 - 0.26 %), em diferentes proporções (Sumbul, Ahmad, Asif, & Akhtar, 2011).

Os principais compostos do óleo essencial são: 1,8-cineol (25.9 % no fruto e 39.5 % na folha), acetato de miretila (6.6 % no fruto e 24.8 % na folha),  $\alpha$ -pineno (9.7 % no fruto e 21.5 % na folha), linalol (36.5 % no fruto e 6.2 % na folha) e acetato de geranil (20.54 % no fruto) (Sumbul, Ahmad, Asif, & Akhtar, 2011) & (Marzouk, Mhamdi, & Wannes, 2009).

Segundo Cakir (2004), a composição de ácidos gordos presente no fruto é de 72.1 % e as sementes é de 64.1 %, sendo o ácido oléico o mais predominante (69.5 %), seguindo o palmítico (17.8 %) e o esteárico (6.4 %).

Na Figura 8 estão representados os compostos fenólicos e os sub-grupos em que se dividem.



**Figura 8** – Classificação conforme as classes e subclasses dos compostos fenólicos, adaptado de Fraga (2009)

### 2.2.1.3. Atividade Antibacteriana

As plantas são uma boa opção para obter uma grande variedade de compostos com aplicação farmacológica, sendo amplamente utilizadas na medicina popular, pois representam uma alternativa barata, acessível e podem ser aplicadas a várias

patologias. São várias as propriedades farmacológicas da murta, planta considerada medicinal, sendo as suas diferentes partes usadas pelas suas propriedades antibióticas, anti-sépticas, expectorantes, adstringentes, carminativas e hemostáticas (Pereira, Cebola, & Bernardo-Gil, 2009).

As principais indicações terapêuticas relacionam-se com o tratamento de infeções, sendo, no entanto, o seu uso muito mais vasto. Segundo um estudo de Bouzabata, et al. (2013), no qual o objetivo era desenvolver a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Myrtus nivellei*, conhecida como a murta do *Saara* e usada pelos *Touaregs* contra fungos responsáveis por infeções (diarreia e blenorreia), foi desenvolvida uma pomada de óleos essenciais de murta, para tratamento da dermatose. Graças ao seu alto teor de 1,8-cineol (33.6 a 50.4 %) e de limoneno (17.5 a 25.0 %), foi possível encontrar doses apropriadas de óleo de *Myrtus nivellei* com atividade antifúngica (Bouzabata, et al., 2013).

Noutro ensaio sobre o efeito protetor da murta em queimaduras, foram administradas 100 mg/dia de extrato de murta a ratos, por via oral e tópica, durante dois dias. Os resultados foram também bastante positivos, mostrando mais uma vez o efeito antioxidante da murta, que ajudou a regenerar a pele, reduzindo significativamente os danos induzidos pelas queimaduras na pele (Ozcan, et al., 2019).

Relativamente ao trânsito intestinal, foi igualmente realizado um estudo onde se verificou que, consumindo sumo de murta, inibia de maneira significativa a motilidade intestinal e o esvaziamento gástrico, induzindo uma proteção significativa contra a diarreia, atenuando também o stress oxidativo no intestino (Jabri, Rtibi, Sakly, Marzouki, & Sebai, 2016).

### **2.3. Avaliação do Efeito benéfico para a Saúde e Bem-estar**

A murta é usada desde os tempos mais antigos para fins medicinais, bem como tempero e em preparação de alimentos. As suas folhas são utilizadas em infusão como enxaguatório bucal, para o tratamento da candidíase, para o tratamento de doenças

crônicas das vias respiratórias (bronquites) e das vias urinárias (cistites, pielonefrites e uretrites) desde os tempos primordiais (Aleksic & Knezevic, 2014).

Na Turquia, o fruto e as folhas são usadas como remédio anti-séptico e anti-inflamatório, já em Itália, o fruto é usado no tratamento de doenças infecciosas (Aleksic & Knezevic, 2014). O óleo essencial extraído das folhas é utilizado via oral para o tratamento de dores de estômago, hipoglicemia, disbiose, tosse, constipação e falta de apetite, sendo também usado externamente para cicatrização de feridas e no tratamento de distúrbios pulmonares (Aleksic & Knezevic, 2014).

Num estudo realizado com o objetivo de encontrar uma alternativa aos antifúngicos no tratamento de infecções fúngicas, foi utilizado o óleo essencial de murta, visto este apresentar boa atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* e outras bactérias Gram negativas. Foi testada a sua atividade antifúngica contra três diferentes espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilose*), cujos resultados obtidos demonstraram uma boa atividade do extrato de óleo de murta passadas 24 e 48 horas, chegando até a serem superiores aos do antifúngico testado (Cannas, et al., 2013).

Foi também realizado outro estudo, com o objetivo de determinar a importância do óleo essencial de *Myrtus communis* no tratamento de hemorróidas, ao qual foi demonstrado que, usando o óleo essencial em creme, melhora significativamente o sangramento, a dor permanente, a dor durante a defecação, a irritação anal e o prurido anal em pacientes com hemorróidas tipo I e II (Mahboubi, 2017).

E por último, um estudo que visou melhorar o distúrbio neurodegenerativo progressivo, conhecido como doença de *Alzheimer*, em que foram investigados os fatores que desempenham um papel importante na patogênese da doença e, comparados os efeitos do tratamento de Galantamina (fármaco utilizado no tratamento da doença de *Alzheimer*) com os efeitos do tratamento de *Myrtus communis*. Os resultados mostraram que o tratamento com *M. communis* melhorou a memória a curto e longo prazo, melhorou significativamente a redução da latência e o tempo de reconhecimento de objetos induzidos, tendo-se verificado útil na prevenção do stress oxidativo no tecido cerebral, sendo tão eficaz quanto o fármaco Galantamina. Pelas razões apresentadas considera-se *M. communis* como uma possível nova abordagem terapêutica, que pode

ser uma alternativa valiosa na prevenção e tratamento da doença de *Alzheimer* (Aykaç, et al., 2019).

## 2.4. Utilização de *Myrtus spp.* e Comercialização

Atualmente, ao contrário de outros pequenos frutos, a murta não é comercializada nas grandes cadeias de distribuição do setor agroalimentar, havendo, no entanto, produtos com este fruto no mercado. Hoje em dia, as flores, os frutos, as folhas e as sementes da murta são já usados na cosmética e na alimentação, em muitos países do Mediterrâneo, devido às suas características aromáticas.

A nível cosmético, as folhas são também muito utilizadas nas indústrias de perfumaria e cosmética, particularmente em Portugal e na Turquia (Aleksic & Knezevic, 2014). São fabricados perfumes, sabonetes, cremes e máscaras de limpeza, champoos anticaspa, aclaradores e tónicos reparadores para a pele. É também preparada uma água aromatizada, de aroma mais delicado, conhecida como água d' *Angel* ou água de Murta, que era particularmente famosa no século XVII (Figueiredo, et al., 2013).

A nível alimentar, são usadas as flores frescas, de aroma delicado e sabor adocicado, para aromatizar saladas de fruta ou guarnições, enquanto as folhas e bagas são usadas em pratos de carne, especialmente para aromatizar carnes de sabor forte, como é o caso do borrego e de algumas peças de caça (Figueiredo, et al., 2013).

Em alguns países, as folhas são também usadas para envolver a carne durante o processo de cura. Os botões florais, flores e frutos, devidamente secos, são conservados em vinagre para uso culinário, podendo ser consumidos frescos e/ou secos e usados como aromatizantes em molhos e xaropes, tendo um paladar comparável ao do zimbro (Figueiredo, et al., 2013).

Foi testado um gelado de leite de cabra contendo *Lactobacillus casei*, ao qual foi adicionada polpa de *Myrtus communis* a formulações probióticas, com o objetivo de avaliar o seu potencial probiótico. Verificou-se que o número de *L. casei* diminuiu, o valor de compostos fenólicos totais aumentou e não foram detectadas quaisquer alterações na sua atividade antioxidante (Öztürk, Demirci, & Akın, 2018).

Quanto ao fruto, não se encontra grande aplicação devido à sua amargura, o sabor é muito intenso e bastante desagradável, ao invés do odor que é bastante agradável, sendo a sua aplicação culinária mais limitada à sua região de origem, Itália (Aleksic & Knezevic, 2014). Na ilha italiana Sardenha, é produzido um licor digestivo chamado *Mirto Liquore Di Sardegna* (Figura 9 (a)), que se obtém por maceração das bagas e folhas de murta em álcool, bagas essas que dão uma cor única arroxeadada. Este é característico pelo seu sabor adstringente, apresentando 30 % v/v de teor alcoólico (B2C ECOMMERCE BRASIL, 2019). São-lhe atribuídas inúmeras virtudes curativas, desde doenças da boca ao sistema digestivo (Aleksic & Knezevic, 2014).

Em Portugal é também produzido um licor, de seu nome *Licor Murta Serra do Caldeirão* (Figura 9 (b)), produzido na serra do Caldeirão, no Algarve. Este apresenta 20 % v/v de teor alcoólico.



**Figura 9** – Licores de murta, de Itália (a) e de Portugal (b) (B2C ECOMMERCE BRASIL, 2019) (Neteuro, 2019)

### **2.4.1. Estudo da Viabilidade e Incorporação de *Myrtus spp.* em produtos alimentares**

Hoje em dia, há uma procura crescente por produtos alimentares seguros e naturais que contribuam para a saúde e bem-estar do consumidor. A inovação na tecnologia alimentar com recurso à incorporação de plantas silvestres comestíveis em diferentes produtos alimentares pode ser a resposta para o problema da biodiversidade,

sustentabilidade e nutrição. Sendo o murquinho um fruto que apresenta uma baixa notoriedade é, no entanto, muito conhecido junto da população nativa das zonas da sua proliferação.

Tendo este trabalho como objetivo a valorização de *Myrtus spp.* de forma a estudar a incorporação do fruto e da folha em produtos alimentares, surgiu a necessidade de desenvolver novas formulações, designadamente:

- I) incorporar *Myrtus spp.* em enchido/chouriço (como conservante natural);
- II) incorporar *Myrtus spp.* em tempero/vinagre;
- III) produzir cerveja artesanal de *Myrtus spp.*

Habitualmente, são adicionados aos produtos alimentares conservantes químicos para garantir um prazo de conservação alargado, prevenindo o desenvolvimento de microrganismos que causem doenças ao consumidor ou que ajudem na conservação da aparência do produto. Contudo, a legislação referente aos conservantes químicos tem vindo a sofrer alterações e atualizações em consequência do conhecimento de problemas de sensibilidade e toxicidade associados à utilização destes produtos.

De forma a testar a eficácia da conservação natural de produtos alimentares contendo *Myrtus spp.*, realizou-se a experiência de incorporação em chouriço/enchidos.

Relativamente ao vinagre, sendo muito utilizado em molhos e para temperar saladas, o objetivo da incorporação do fruto neste foi torná-lo com um sabor agridoce, viscoso e mais concentrado, semelhante a um vinagre balsâmico. Foi utilizado vinagre de vinho branco e vinagre de maçã, incorporando o fruto e a folha.

Quanto à cerveja, considerada a bebida alcoólica mais consumida em todo o mundo, tendo grande aceitação devido aos seus atributos sensoriais, quando ingerida de forma moderada, esta contém valor nutritivo e diversidade de apresentação (Sampaolesi, Gamba, & Antoni, 2019).

Atualmente, é notório o interesse pela cerveja artesanal, sendo que, cada vez mais se vêem novas formulações, levando a cerveja a emergir como uma bebida funcional, com benefícios nos seus componentes, estando a indústria da cervejaria artesanal em crescimento em Portugal (Watson, Preedy, & Zibadi, 2018). A grande diferença entre cerveja artesanal e industrial é que, a artesanal não sofre qualquer processo de pasteurização, filtrações químicas nem adição de aditivos químicos para conservação

(Sampaolesi, Gamba, & Antoni, 2019). A cerveja pode ser mais doce ou mais amarga, mais ou menos frutada, mais loira ou mais escura, com grande variedade de malte, lúpulo e leveduras usadas, sendo o número de combinações extenso. Os principais ingredientes da cerveja são o lúpulo e a cevada, dos quais derivam os polifenóis da cerveja, sendo o *xanthohumol* um polifenol específico, que é encontrado exclusivamente no lúpulo, e que tem sido estudado graças aos seus efeitos benéficos no cancro, em doenças cardiovasculares e em inflamações (Watson, Preedy, & Zibadi, 2018). Rica em carboidratos, aminoácidos, minerais e compostos fenólicos, o seu consumo moderado demonstra impactos benéficos no sistema imunológico humano.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

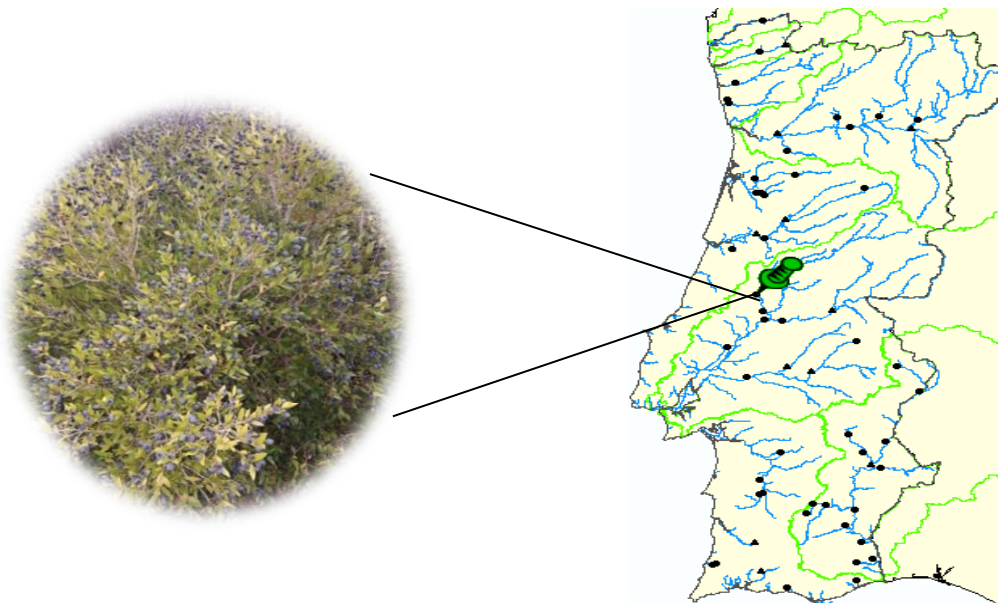
---

A planta *Myrtus spp.* é um arbusto que se desenvolve maioritariamente em pinhais, no entanto, é também muito utilizado em zonas urbanas, graças á sua resistência ao clima. Deste modo e considerando que as condições climatéricas, a poluição e o solo têm uma grande influência no crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo muitas vezes determinante na sua composição físico-química, tornou-se pertinente mencionar que a planta *Myrtus spp.* foi apanhada no Agroal e não no pinhal de Leiria, devido ao grande incêndio que queimou mais de 70 % do território no passado verão de 2017.

O plano de trabalhos da planta *Myrtus spp.* inclui: caracterização físico-química (pH, calibre/granulometria, massa específica e porção edível), capacidade antioxidante (método do ABTS, DPPH e FRAP), perfil nutricional (conteúdo proteico e perfil lipídico), polifenóis totais (*Folin-Ciocalteu*) e a determinação da atividade antimicrobiana relativamente a bactérias Gram negativas e Gram positivas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*). Uma vez caracterizadas as matérias primas base, diferentes formulações com *Myrtus spp.* serão depois preparadas e testadas, em chouriço, vinagre e cerveja.

### 3.1. Recolha e preparação de amostras

Para a realização desde trabalho foram recolhidas amostras de *Myrtus spp.* no Agroal (Latitude: 39.679065, e Longitude: -8.436291), localidade pertencente ao distrito de Leiria (Figura 10). As amostras foram colhidas junto ao pinhal que se encontra adjacente à praia fluvial, no dia 15 de dezembro de 2018. Após a colheita, os frutos e folhas foram higienizados com água destilada e armazenados a uma temperatura de aproximadamente -16°C nas instalações do Politécnico de Leiria.



**Figura 10** – Mapa de Portugal Continental onde se encontra assinalado o local (Agroal) de recolha das amostras sob estudo – Primeiro momento de colheita de amostra (Mapas de Portugal, 2019)

Após a floração da planta *Myrtus spp.*, foram novamente colhidas amostras, desta vez no pinhal de Santa Clara (Latitude: 39.739448, e Longitude 8.811279), na freguesia de Parceiros, localidade do distrito de Leiria (Figura 11). A recolha decorreu no dia 24 de junho de 2019. Após a colheita, as folhas e flores foram higienizadas com água destilada e usadas para preparação de extratos.



**Figura 11** – Mapa de Portugal Continental onde se encontra assinalado o local (Leiria) de recolha das amostras sob estudo – Segundo momento de colheita de amostra (Mapas de Portugal, 2019)

## 3.2. Caracterização Físico-química

### 3.2.1. Determinação do Peso médio

Para avaliar o peso médio do fruto (equação 1) foram selecionados aleatoriamente 50 murteiros, de forma a obter uma amostra heterogénea, sendo de seguida realizada a pesagem dos mesmos em balança analítica de precisão Mettler Toledo, modelo AE200-S.

$$\text{Peso médio do fruto} = \frac{\sum \text{Peso do fruto}}{n}$$

Equação 1

Onde n representa o número de frutos que constituem a amostra, neste caso n = 50.

### 3.2.2. Determinação da Quantidade de Sementes

De forma a obter um valor médio da quantidade de sementes por fruto (equação 2), procedeu-se à contagem dos parâmetros referidos em 50 murteiros, escolhidos aleatoriamente.

$$\text{Nº médio de sementes por fruto} = \frac{\sum \text{sementes por fruto}}{n}$$

Equação 2

Onde n representa o número de frutos que constituem a amostra, neste caso n = 50.

### 3.2.3. Determinação do Diâmetro e da Altura média

De forma a obter um valor médio do diâmetro (equação 3) e da altura média da baga (equação 4), procedeu-se à medição dos parâmetros referidos em 50 murteiros,

escolhidos aleatoriamente, com recurso a um Paquímetro Digital INECO modelo 101.01L150/E (Figura 12).

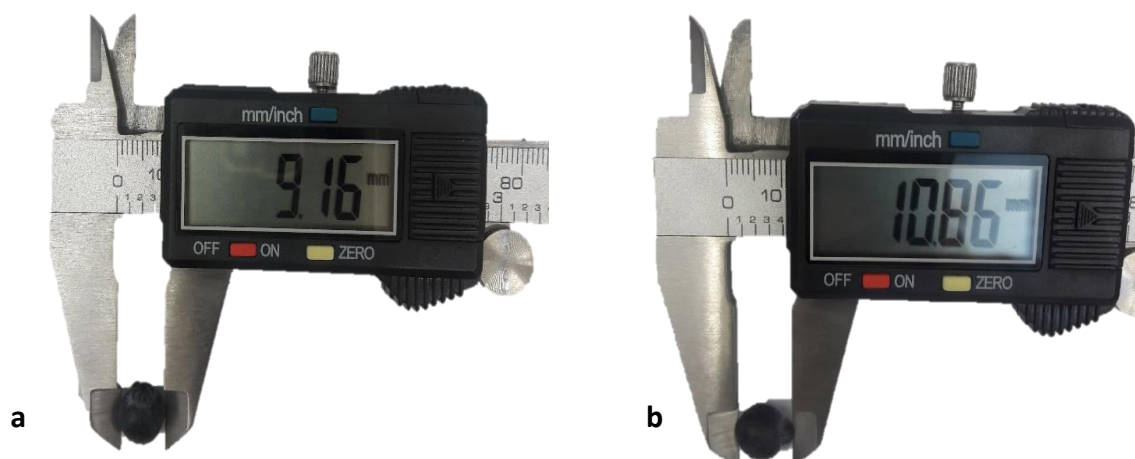
$$\text{Diâmetro médio do fruto} = \frac{\sum \text{Diâmetro do fruto}}{n}$$

Equação 3

$$\text{Altura média do fruto} = \frac{\sum \text{Altura do fruto}}{n}$$

Equação 4

Onde n representa o número de frutos que constituem a amostra, neste caso n = 50 para ambas as equações 3 e 4.



**Figura 12** – Representação demonstrativa da medição do diâmetro (a) e altura (b) da baga, com recurso a um Paquímetro Digital INECO L150

Conforme demonstrado na Figura 12, a altura da baga indica o tamanho médio na dimensão longitudinal, enquanto o diâmetro indica o tamanho médio na dimensão equatorial/transversal.

### 3.2.4. Determinação do Calibre e do Volume

Após calculados os valores do peso médio, altura e diâmetro, calculou-se o calibre (equação 5) e o volume médio do fruto (equação 6).

$$\text{Calibre} = \frac{\text{Altura do fruto} + \text{Diâmetro do fruto}}{2}$$

Equação 5

$$\text{Volume} = \pi \frac{4}{3} \text{Calibre}^3$$

Equação 6

### 3.2.5. Determinação da Parte Edível do fruto fresco

A parte edível de um alimento é expressa em percentagem e corresponde ao peso do produto que pode ser utilizado como alimento, excluindo-se tudo o que não será ingerido. Corresponde à forma como o alimento será consumido, ao seu aproveitamento, aos hábitos e gostos alimentares de cada indivíduo.

O valor calculado deve ser considerado como um valor indicativo, uma vez que na prática poderá haver variações dependendo dos fatores acima referidos (INSA, 2016).

Para a determinação da percentagem da parte edível no fruto fresco (equações 7 e 8), selecionou-se e pesou-se uma amostra constituída por 100 murtinhos. As sementes foram removidas de forma manual com recurso a duas pinças e procedeu-se à pesagem das mesmas em balança analítica de precisão Mettler Toledo, modelo AE200-S. A análise foi realizada em triplicado.

$$\begin{aligned} & \text{Peso Edível da Amostra (Polpa/Sementes)} \\ & = \text{Peso da Amostra fresca} - \text{Peso (Polpa/Sementes)} \end{aligned}$$

Equação 7

$$\% \text{ Edível do fruto fresco} = \frac{\text{Peso edível da Amostra}}{\text{Peso da Amostra fresca}} \times 100$$

Equação 8

### 3.2.6. Determinação do Teor de Humidade

A determinação do teor de humidade foi realizada através da desidratação completa, de uma amostra constituída por 5.0 g de fruto, em estufa Heraeus modelo D-6450 Hanau à temperatura constante de 60°C durante aproximadamente 72 horas, sendo depois colocada num exsicador, até o peso se manter constante.

Este método teve como objetivo medir a perda de peso, após desidratação dos murteiros. Os resultados foram expressos em percentagem de teor de humidade (equação 9).

$$\text{Teor de Humidade} = \frac{\Delta \text{Peso}}{P_i} \times 100$$

Equação 9

Onde  $\Delta$ Peso representa a diferença entre o peso inicial da amostra e peso da amostra após a secagem na estufa e  $P_i$  representa o peso inicial da amostra. A análise foi realizada em triplicado.

### 3.2.7. Determinação da Acidez do Sumo

O potencial hidrogeniónico (pH), corresponde a uma escala numérica (0-14 a 25°C), utilizada para especificar a acidez ou basicidade de uma solução, introduzido por Peter Lauritz Sorensen a 1909 (McNaught & Wilkinson, 2018).

A amostra de sumo de murteiro foi obtida por pressão manual mecânica, com o auxílio de um almofariz e pilão, adicionando água desionizada na diluição de 1:10 devido ao pouco sumo produzido. Após a obtenção do sumo procedeu-se à leitura do seu pH recorrendo a um potenciómetro de bancada Hanna instruments pH 212. A análise foi realizada em triplicado.

### 3.2.8. Determinação do Teor de Sólidos Solúveis – SSC

A quantificação dos sólidos solúveis (°Brix) ou SSC (*Soluble Solids Content*) consiste na avaliação da quantidade dos compostos que se encontram dissolvidos no sumo da fruta. A maior parte dos sólidos solúveis são açúcares e por esta razão, a análise quantitativa por refratometria é muitas vezes equiparada ao teor de açúcar do sumo do fruto. Os açúcares são utilizados como referência na colheita, devido à facilidade que existe na sua medição e também porque traduzem bem a percepção do sabor da fruta.

Os hidratos de carbono presentes, que conferem o sabor doce, são maioritariamente a glicose, a frutose e a sacarose. Durante a fase de amadurecimento ocorrem reações que vão influenciar os aspectos sensoriais como, a diminuição de ácidos, o aumento de açúcares e as alterações de cor e textura. Nesta etapa, verifica-se a ocorrência da quebra dos hidratos de carbono de reserva em açúcares simples (mono e dissacarídeos) o que confere à fruta o sabor doce (Pinto & Morais, 2000).

A unidade de medida do conteúdo de sólidos solúveis é o grau Brix, introduzido por Adolf Ferdinand Brix em 1831 (Harrill, 1998). O resíduo seco solúvel (°Brix) foi determinado de acordo com a NP-785 de 1985.

A amostra de sumo de murtininho foi obtida por pressão manual mecânica, com o auxílio de um almofariz com pilão, adicionando água desionizada previamente fervida, na diluição de 1:10 devido ao pouco sumo existente. Seguidamente realizou-se uma filtração simples em papel de filtro qualitativo, com 90 mm de diâmetro e refez-se o volume inicial. Após a obtenção do sumo procedeu-se à leitura da percentagem de sólidos solúveis e, com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur*, colocou-se uma gota de sumo sobre a superfície do prisma do refratómetro digital portátil HANNA HI 96813. Para a realização desta análise procedeu-se à leitura do índice de refração em triplicado.

### 3.2.9. Determinação do Teor de Açúcares Redutores

Para determinar o teor de açúcares redutores existem vários métodos químicos, não seletivos que fornecem resultados com elevado grau de confiabilidade, no qual o utilizado foi o método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), adaptado de Garriga, Almaraz &

Marchiaro (2017), descrito abaixo. Este método baseia-se na oxidação do grupo aldeído (H-C=O) dos açúcares redutores e simultânea redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em ácido 3-amino,5-nitrosalicílico. A monoamina produzida possui uma cor avermelhada de absorvância máxima a 540 nm, o que permite a quantificação dos açúcares redutores por espectrofotometria.

Esta determinação foi realizada em amostras liofilizadas, às quais foi retirada a humidade contida através do congelamento da parte líquida, para posterior sublimação do gelo. A liofilização é considerado o melhor método de secagem para a obtenção de produtos desidratados com elevada qualidade (Ratti, 2001).

Após a liofilização da polpa, da semente e da folha, fez-se a hidrólise de 1.00 g de peso seco da amostra em 50 mL de ácido sulfúrico 0.25N, num banho termostaticado a 50°C, durante uma hora. Juntou-se num tubo de ensaio de 10 mL, 1 mL de extrato da amostra filtrada em filtro de 110 mm e 1 mL de reagente de DNS, agitando-se de seguida num vórtex. Os tubos foram colocados num banho termostaticado a 100°C durante cinco minutos, sendo posteriormente arrefecidos e tendo-se completado o volume com 8 mL de água desionizada, agitando-se novamente num vórtex. Por fim, leu-se a absorvância da solução a 540 nm, contra uma amostra controlo composta por tampão acetato pH 4.5 que sofreu o mesmo tratamento das restantes amostras sob análise.

A reta de calibração é obtida com soluções-padrão de glicose (0.0 mg/mL – 5.0 mg/mL) preparadas em tampão acetato pH 4.5 que sofrem o mesmo tratamento das amostras de extratos. A análise foi realizada em triplicado.

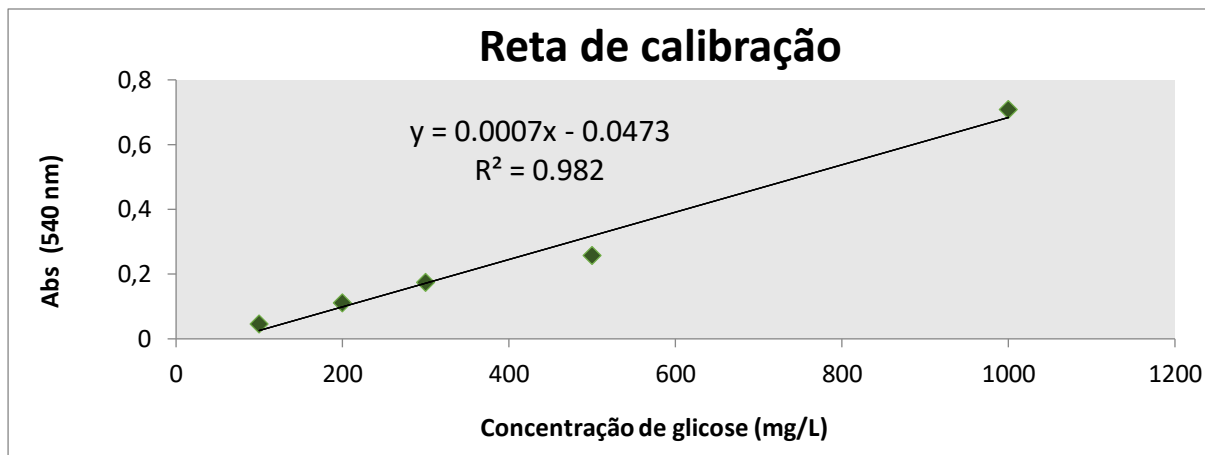
A quantificação do teor de açúcares redutores (equação 10) foi calculada através da equação correspondente à reta de calibração (Figura 13).

$$C = \frac{\text{Abs} + 0.0473}{0.0007}$$

Equação 10

Onde Abs representa o valor da absorvância de cada amostra a 540 nm e C a concentração em mg/L. O resultado final é expresso em concentração equivalente de

glicose (mg/L), utilizando a reta de calibração, com a seguinte equação:  $Abs = 0.0007 C - 0.0473$ , tendo em conta a massa da amostra e o volume do extrato.

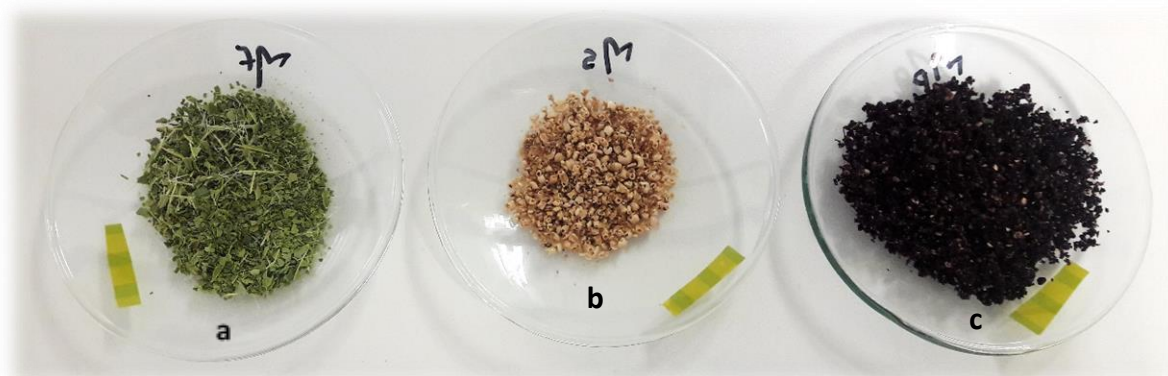


**Figura 13** – Reta de calibração do método de DNS com soluções padrão de D-glicose, para quantificação de açúcares redutores

### 3.2.10. Análise do Perfil de Ácidos gordos

Para a análise do perfil de ácidos gordos, procedeu-se á transmetilação direta das amostras seguindo um procedimento adaptado de Fernández (2015).

Este foi realizado em triplicado e os ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME's) foram obtidos por transmetilação direta a partir de amostras liofilizadas e trituradas da polpa, folhas e sementes da murta (Figura 14), sob catálise ácida. Aos tubos de vidro com rosca, adicionaram-se 2 mL de solução a 2 % (v/v) de  $H_2SO_4$  em metanol ( $CH_3OH$ ) a 50 mg da amostra liofilizada ( $m_{amostra}$ ) (Figura 15 (a)).



**Figura 14** – Amostras liofilizadas das folhas (a), das sementes (b) e da polpa (c) da murta

Seguidamente, os tubos foram devidamente fechados e colocados em banho-maria (Banho termostatzado Precistern, J.P Selecta) durante duas horas a 80°C. Após o arrefecimento, adicionou-se 1 mL de água MiliQ e 2 mL de n-Hexano, levando a mistura resultante ao vórtex durante 1 minuto e posteriormente, centrifugada (*Eppendorf Centrifuge 5810 R*) a 1000 rpm durante cinco minutos. O sobrenadante ou fase n-hexano que continha os esteres metílicos de ácidos gordos (FAMES) foi recolhida cuidadosamente para *vials* de cromatografia gasosa (Figura 15 (b)), obtendo-se uma solução incolor.



**Figura 15** – Amostras de polpa, semente e folha de murta sob catálise ácida (2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2% (v/v) em metanol) (a) e, amostras após 5 minutos de centrifugação a 1000 rpm, com sobrenadante contendo os esteres metílicos de ácidos gordos (FAME's) (b)

A análise dos FAMES (Figura 16) foi realizada no cromatógrafo gasoso (GC) *Finnigan Ultra Trace* equipado com coluna capilar *Thermo TR-FAME* (60 m × 0.25 mm ID, 0.25 µm de espessura da membrana), um *auto sampler AS 3000 da Thermo Electron Corporation* e um detetor de ionização de chama (FID), de acordo com Silva et al. (2017). As temperaturas do injetor (a operar em modo *splitless*) e do detetor foram programadas para 250°C e 280°C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada para um valor inicial de 100°C durante um minuto, aumentando 10°C min<sup>-1</sup> até aos 160°C, mantendo-se a essa temperatura durante 10 minutos. Depois procedeu-se a um novo aumento de 4°C min<sup>-1</sup> até aos 250°C, onde se manteve por mais 10 minutos. O hélio foi usado como gás de arraste, com um fluxo de 1.2 mL min<sup>-1</sup>. Para a chama do detetor utilizou-se ar sintético e hidrogénio, com um fluxo de 350 e 35 mL min<sup>-1</sup>, respectivamente.



**Figura 16** – Análise dos FAMES no cromatógrafo gasoso (GC) Finnigan Ultra Trace

O *software* Xcalibur foi usado para controlar o instrumento, aquisição de dados e análise dos dados (integração, tempos de retenção e áreas de pico).

Os ácidos gordos presentes nas amostras foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos respetivos FAMES com o dos componentes da mistura Supelco 37 (Sigma-Aldrich, lote LRAB8645). A partir da mistura comercial Supelco 37 prepararam-se soluções padrão e com base nos dados cromatográficos construíram-se curvas de calibração de área do pico *versus* concentração de FAME ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para os diferentes ácidos gordos. A identificação dos cromatógrafos (Anexo III), foi realizada através da comparação do tempo de retenção dos picos das amostras com o padrão Supelco FAME Mix C8 – C24.

A determinação do perfil dos ácidos gordos foi realizada atribuindo-se que a fração correspondente a um determinado ácido gordo é a razão entre a respectiva área do pico e a área total dos picos, representados em percentagem.

### **3.3. Atividade Antioxidante**

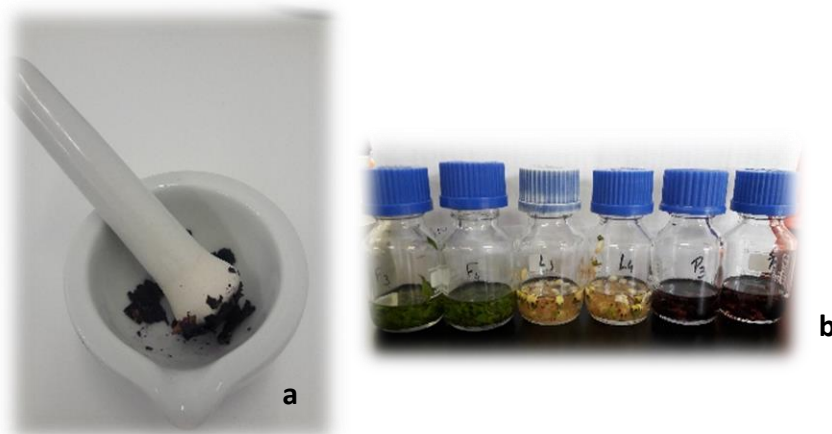
O estudo da capacidade antioxidante do fruto na presente investigação consistiu na quantificação dos compostos fenólicos totais através do método de *Folin-Ciocalteu* e na avaliação da capacidade antioxidante através dos métodos ABTS (ácido 2,2-azinobis

(3 etilbenzotiazolina-6-sulfónico)), DPPH (2,2-difenil-1 picrilhidrazil) e FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), descritos abaixo. As análises referidas foram realizadas à polpa, à semente, à folha e à flôr do fruto.

### **3.3.1. Extração de Compostos Fenólicos**

Primeiramente realizou-se a extração dos compostos fenólicos na diluição de 1:10 (1 mL de soluto em 10 mL de solvente) a qual influencia a gama de avaliação da capacidade antioxidante. Tendo-se verificado que em diversos estudos houveram diferentes resultados consoante a extração realizada e, as soluções de acetona a 70 % v/v e de etanol a 70 % v/v apresentaram bons resultados na extração de compostos fenólicos (Fonseca, Santos, & Cunha, 2015), optou-se por estes solventes neste trabalho. Os compostos fenólicos presentes no fruto foram extraídos de acordo com Ribeiro (2014), com algumas adaptações.

A extração foi realizada em 1.5g de amostra previamente higienizada com água destilada e posteriormente, pesada em balança analítica de precisão Mettler Toledo, modelo AE200-S. Foi depois triturada por pressão manual mecânica com o auxílio de almofariz e pilão (Figura 17 (a)). Seguidamente, foi colocada num frasco de vidro graduado (Figura 17 (b)), ao qual se adicionou 15 mL de solvente, acetona a 70 % v/v ou etanol a 70 % v/v. A mistura manteve-se em agitação em agitador magnético P selecta, modelo Agimatic-N, durante duas horas, a 9000 rpm, a temperatura ambiente e protegida da luz. Posteriormente, realizou-se uma filtração simples em papel de filtro qualitativo com 90 mm de diâmetro – xinxing 202 moderate, para tubos de ensaio, e mantidos a uma temperatura de aproximadamente -20°C. A análise foi realizada em duplicado.



**Figura 17** – Extração dos compostos fenólicos: trituração da polpa por pressão manual mecânica com o auxílio de almofariz e pilão (a), folha, semente e polpa em frascos de vidro graduados com o solvente (b)

Relativamente à polpa e sementes desidratadas, inicialmente foram separadas manualmente, com recurso a duas pinças, foram pesadas em balança analítica de precisão Mettler Toledo, modelo AE200-S e transferidas para cápsulas, que foram previamente mantidas em estufa Heraeus modelo D-6450 Hanau, para remoção da humidade a 70°C durante 20 horas. Após este período, as amostras desidratadas foram novamente pesadas para a realização do método de extração.

Para as amostras de polpa já desidratadas, foram pesadas aproximadamente 1.00 g (peso final após desidratação) e transferidas para um frasco de vidro rolhado, onde se adicionaram 10 mL de acetona a 70% v/v ou etanol a 70 % v/v e foi levado à agitação magnética por duas horas a 9000 rpm. Posteriormente, procedeu-se a filtração (papel filtro 90 mm de diâmetro – xinxing 202 moderate) para tubos de ensaio e o armazenamento sob refrigeração a -20°C. Em relação às sementes desidratadas, foram pesadas cerca de 1.00 g de amostra (peso final após desidratação) e foram transferidas para um frasco de vidro rolhado. Adicionou-se então 10 mL de acetona a 70% v/v ou etanol a 70 % v/v e o conteúdo foi levado a agitação magnética por duas horas a 9000 rpm. Em seguida, foi realizada a filtração (papel filtro 90 mm de diâmetro) para tubos de ensaio e o armazenamento sob refrigeração a -20°C. Este procedimento foi realizado em duplicado.

Para a quantificação dos compostos fenólicos totais (método *Folin-Ciocalteu*), assim como para a determinação da capacidade antioxidante (ABTS e DPPH), para os extratos

do fruto inteiro, folhas, flores, sumo e polpa desidratada foi realizada nova diluição de 1:10 em duplicado. Para o método FRAP, foram utilizados os extratos iniciais.

No que diz respeito às extrações obtidas para cada amostra, a codificação foi realizada segundo a Tabela 1.

**Tabela 1** – Descrição e codificação atribuída a cada extração realizada nos murtinhos

Descrição	Siglas	
	Solvente acetona a 70 % v/v	Solvente etanol a 70 % v/v
<b>Polpa <i>in natura</i></b>	P1	P2
<b>Polpa desidratada</b>	PS1	PS2
<b>Semente desidratada</b>	SS1	SS2
<b>Folha <i>in natura</i></b>	F1	F2
<b>Flôr <i>in natura</i></b>	L1	L2

### 3.3.2. Quantificação dos Compostos Fenólicos Totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais utilizou o método colorimétrico de *Folin-Ciocalteu*. Este método baseia-se na redução do reagente de *Folin-Ciocalteu*, em meio alcalino, através da reação com os compostos fenólicos presentes na amostra. Ao ocorrer a redução do reagente, existe a transformação do fosfomolibdato-fosfotungstato em molibdénio, que apresenta uma coloração azul, tornando assim possível a quantificação do valor de absorvância da solução em espectrofotómetro UV-Vis. Quanto mais forte for a cor azul, maior será a quantificação total dos compostos fenólicos (Neves, Alencar, & Carpes, 2009). A implementação do método seguiu o procedimento de Gao (2007) com algumas adaptações.

Num tubo de ensaio foi adicionado 0.250 mL do extrato e 0.250 mL de reagente de *Folin-Ciocalteu*. A solução resultante foi agitada recorrendo a vortéx e posteriormente adicionou-se 5.00 mL de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) e 7.00 mL de água desionizada. A solução foi homogeneizada no vortéx e colocou-se em repouso durante uma hora, à temperatura ambiente e protegida da luz. Por fim, realizou-se a leitura das soluções, a

760 nm em espectrofotómetro Varian Cary modelo 50 Scan UV Visible. A amostra controlo foi analisada tendo em conta o mesmo procedimento, substituindo apenas o volume da amostra por água desionizada MilliQ.

A reta de calibração foi preparada com ácido gálico como padrão e os resultados correspondentes à quantificação total dos compostos fenólicos foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico GAE/g de fruto e mg GAE/mL de sumo. A análise foi realizada em duplicado. A quantificação total de compostos fenólicos (equação 11), é calculada através da equação correspondente à reta de calibração (Figura 18).

$$C = \frac{\text{Abs} - 0.0542}{0.0023}$$

Equação 11

Onde Abs representa a absorvância de cada amostra a 750 nm e C a concentração em mg GAE/g.

O resultado final é expresso em concentração equivalente de ácido gálico (mg GAE/g), utilizando a reta de calibração, com a seguinte equação:  $\text{Abs} = 0.0023 C + 0.0542$ , tendo em conta a massa da amostra e o volume do extrato.

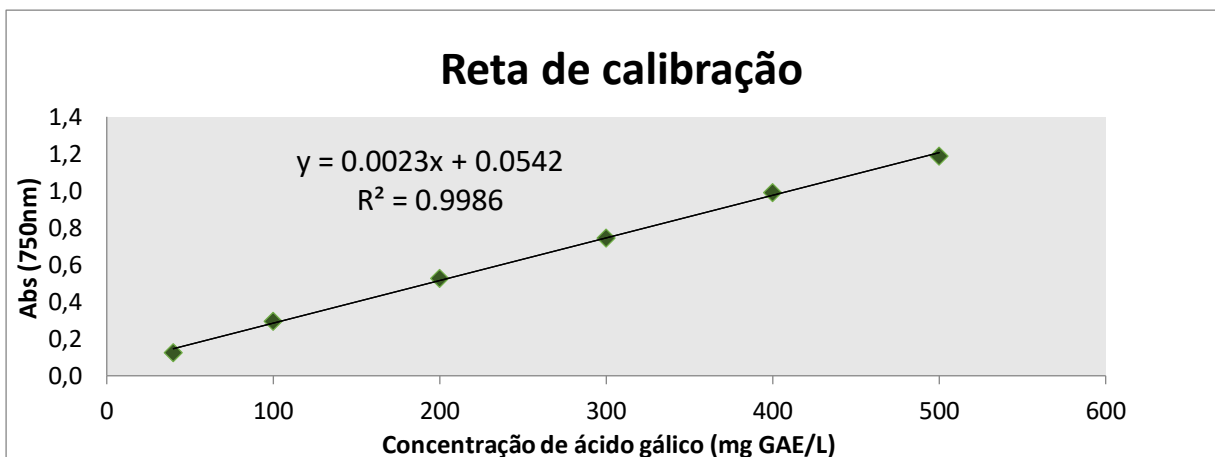


Figura 18 – Reta de calibração do ácido gálico para quantificação de compostos fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu

### 3.3.3. Avaliação da Capacidade de redução do radical ABTS

O método do radical catiónico ABTS●+ (ácido 2,2-azinobis (3 etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) foi utilizado para avaliar a capacidade antioxidante dos murtinhos, que tem sido amplamente utilizado em alimentos e bebidas, devido à sua aplicabilidade em fases aquosas. Este método, espectrofotométrico, determina a atividade antioxidante total através da captura do radical. O ABTS●+ é um radical livre sintético que apresenta uma coloração verde azulada. A capacidade antioxidante da amostra biológica depende da sua capacidade para reduzir ou eliminar o radical livre (Floegel, Kim, Chung, Koo, & Chun, 2011).

Quanto maior for a descoloração verificada no ABTS●+ maior será a atividade antioxidante existente na amostra testada. Deste modo, a extensão da descoloração permite o cálculo da percentagem de inibição (PI), determinado em função da concentração e do tempo em relação ao padrão, sob as mesmas condições (Re, et al., 1999). O método utilizado decorreu de acordo com Giao (2007) com algumas adaptações.

Para o procedimento do método ABTS, é necessário primeiramente a preparação da solução de ABTS concentrado. Assim, em ambiente escuro, foi preparada uma solução de 10 mL de ABTS (7 mmol/L) e paralelamente foi preparada uma solução de 10 mL de persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ) (2.45 mmol/L). Procedeu-se à junção das duas soluções e deixou-se em repouso durante 16 horas à temperatura ambiente, protegido da luz, originando assim o radical ABTS●+.

Após o período de espera, realizou-se a filtração de cerca de 2 mL da solução de ABTS concentrado, através de uma seringa com filtro (0.22  $\mu$ m) e diluiu-se a solução com 200 mL de água ultrapura MilliQ (com o frasco protegido da luz). Tendo como objetivo a obtenção de uma solução com valores de absorvância, de  $0.700 \pm 0.020$  para um comprimento de onda de 734 nanómetros (nm).

O método consistiu na adição de 1 mL da solução do radical ABTS a 20  $\mu$ L de extratos na mesma cuvete (descartáveis, Brand standard – PMMA semi-micro, Sigma-Aldrich). De forma a evitar o contacto com o oxigénio, colocou-se parafilm na cuvete e agitou-se manualmente. Após 6 minutos procedeu-se à leitura da absorvância das soluções, a 734

nm, no espectrofotômetro Varian Cary modelo 50 Scan UV Visible. A amostra controle foi realizada tendo em conta o mesmo procedimento, substituindo apenas a amostra por água ultrapura MilliQ. A reta de calibração (Figura 19) foi preparada com ácido ascórbico como padrão e os resultados correspondentes à atividade antioxidante foram expressos em mg equivalente em vitamina C (VCEAC/g de fruto). A análise foi realizada em triplicado com duplicados de cada solução.

Para calcular a capacidade antioxidante do fruto (equação 13) é necessário previamente calcular a percentagem de inibição (equação 12).

$$PI = \frac{Abs\ r - Abs\ a}{Abs\ r} \times 100$$

Equação 12

Onde Abs r representa a absorvância inicial da solução de ABTS e Abs a representa a absorvância da solução resultante após 6 minutos.

$$C = \frac{PI - 2.0694}{486.28}$$

Equação 13

O resultado final foi expresso em concentração equivalente de ácido ascórbico (mg VCEAC/g), utilizando uma reta de calibração, com a seguinte equação:  $Abs = 486.28 C + 2.0694$ , tendo em conta a massa da amostra e o volume do extrato.

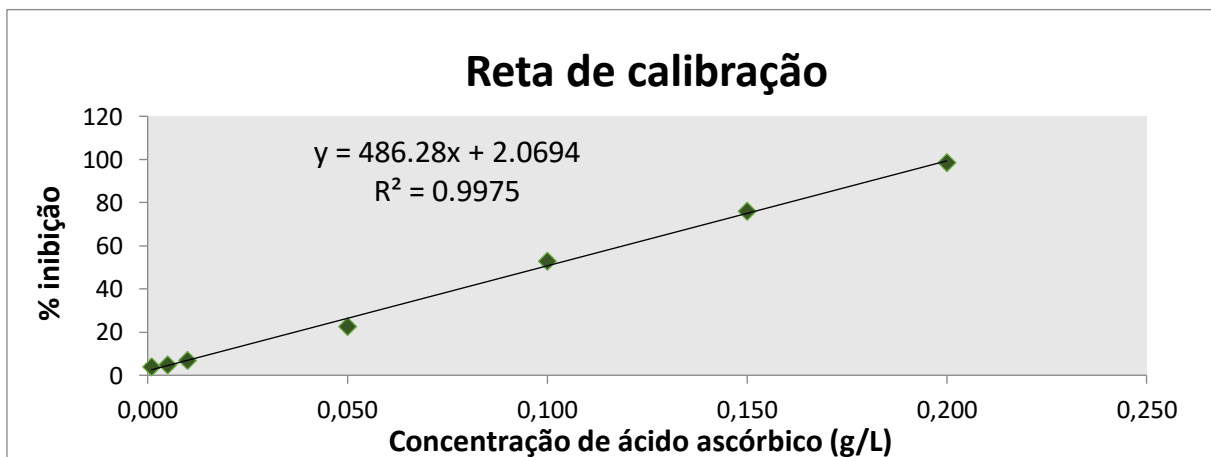


Figura 19 – Reta de calibração do ácido ascórbico para a determinação da capacidade antioxidante pelo método ABTS

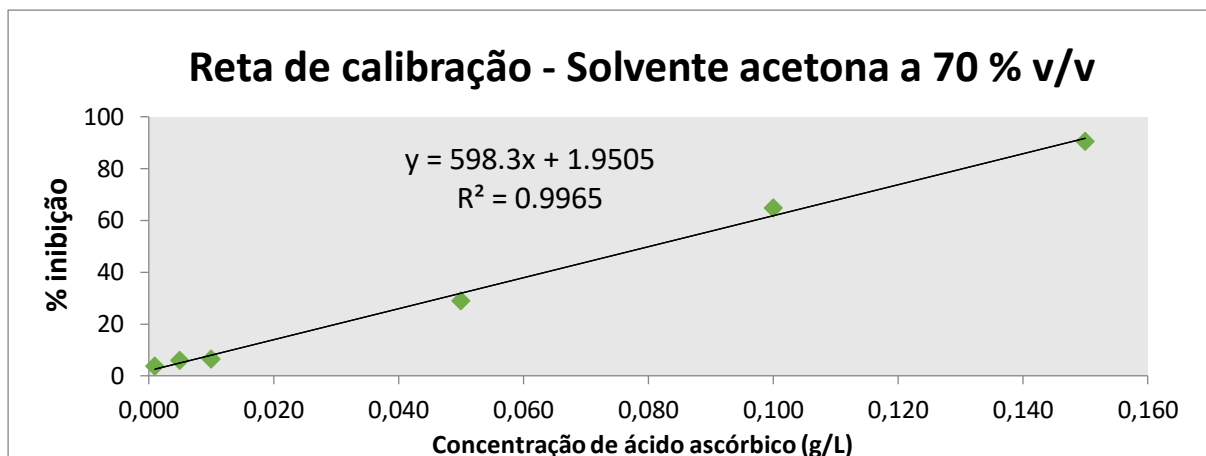
### 3.3.4. Avaliação da Capacidade antioxidante pelo Método

#### DPPH

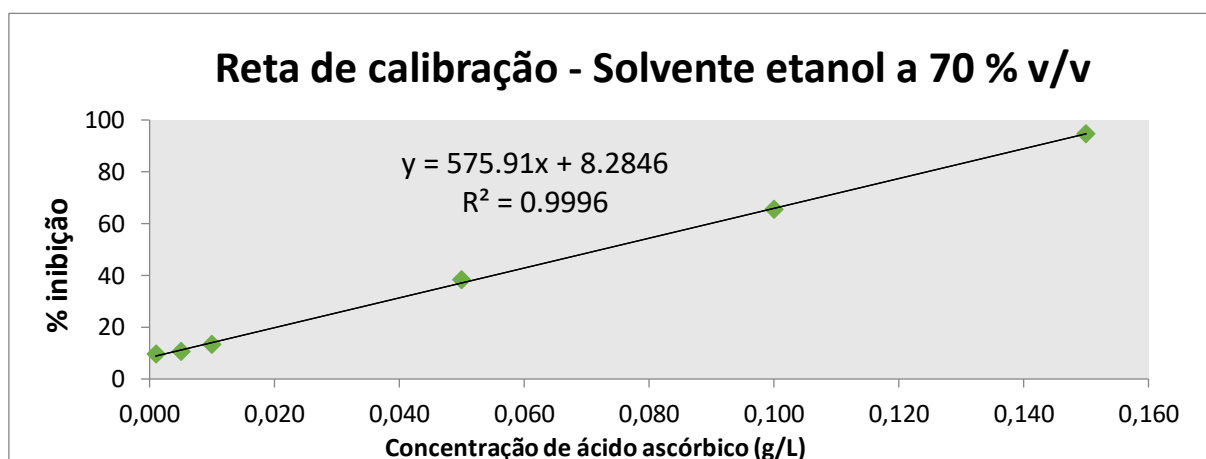
O estudo de remoção do radical DPPH• foi realizado de acordo com o método descrito por Brand-Williams (1995) com algumas modificações. O radical DPPH• sofre redução pelos antioxidantes, com mudança de coloração violeta para amarela, proporcional à concentração da substância redutora da amostra. Assim, preparou-se uma solução de DPPH com 0.0039 g em 100 mL de acetona a 70 % (v/v) que se diluiu numa proporção de 1:2 para que a absorvância se situasse na faixa de  $0.500 \pm 0.040$ , correspondente à solução controlo. Em tubos de vidro rolhados foram introduzidos 3.90 mL da solução de DPPH, diluída com 0.100 mL de extrato, e agitou-se em *vortex*, permanecendo em repouso, protegido da luz, à temperatura ambiente por 30 minutos. A absorvância foi lida a 515 nm, utilizando cuvettes de vidro, num espectrofotómetro Varian Cary modelo 50 Scan UV Visible, utilizando-se amostra controlo composta por acetona a 70 % v/v e etanol a 70 % v/v com amostra controlo de solução de DPPH diluída (absorvância:  $0.500 \pm 0.040$ ).

As análises de cada amostra foram realizadas em duplicado, para as diferentes réplicas de extratos da planta e calculadas de modo a formar um ponto de referência.

O resultado final foi expresso em concentração equivalente de ácido ascórbico (mg VCEAC/g), utilizando uma reta de calibração, com a seguinte equação:  $Abs = 598.3 C + 1.9505$  (para o solvente de acetona a 70 % v/v) (Figura 20) e  $Abs = 575.91 C + 8.2846$  (para o solvente de etanol a 70 % v/v) (Figura 21), tendo em conta a massa da amostra e o volume do extrato.



**Figura 20** – Reta de calibração do ácido ascórbico, usando o solvente acetona a 70 % v/v, para determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH



**Figura 21** – Reta de calibração do ácido ascórbico, usando o solvente etanol a 70 % v/v, para determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH

### 3.3.5. Avaliação da Capacidade antioxidante pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)

Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, presente em baixas concentrações, quando comparada com um substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação desse substrato de maneira eficaz (Shami & Moreira, 2004). O método usado foi uma adaptação de Pulido (2000), que descreve o método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) como uma alternativa desenvolvida para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. Sendo este um

procedimento adaptado para a determinação da atividade antioxidante total em frutas, apenas foi usado o extrato da polpa da murta.

Para obter o reagente FRAP, é necessário realizar diversas soluções primeiramente: solução de metanol a 50 % v/v, solução de acetona a 70 % v/v, solução de HCl 40 mM, solução de 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) 10 mM, solução de cloreto férrico 20 mM e tampão acetato 0.3 M (pH 3.6), conforme Rufino, et al. (2006).

A solução de TPTZ foi preparada dissolvendo-se 3.12 g de TPTZ (0.01 mol) em 5.00 mL de HCl 40 mM e completou-se o volume para 1.00 L em balão volumétrico, com HCl 40 mM. Em seguida, realizou-se a homogeneização e o conteúdo foi transferido para um frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetado, armazenado sob refrigeração, por um período máximo de um mês.

O reagente FRAP foi obtido a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato 0.3 M, 2.5 mL de solução de TPTZ 10 mM e 2.5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM, o qual foi utilizado imediatamente após a sua preparação.

O procedimento foi realizado em ambiente escuro, no qual se transferiu uma alíquota de 90 µL de extrato da amostra para tubos de ensaio, acrescentou-se 270 µL de água ultra pura MilliQ e misturou-se a 2.70 mL da solução de reagente FRAP. De seguida, homogeneizou-se num vortéx e, manteve-se em banho-maria a 37°C durante 30 minutos. Após decorrido o tempo, foi realizada a leitura a 595 nm, em espectrofotómetro Varian Cary modelo 50 Scan UV Visible, utilizando o reagente FRAP como branco para calibrar o mesmo. As análises de cada amostra foram realizadas em duplicado, para as diferentes réplicas de extratos da murta e calculadas de modo a formar um ponto de referência.

A atividade antioxidante (equação 14) é calculada através da equação correspondente à reta de calibração (Figura 22).

$$C = \frac{\text{Abs} - 0.1339}{0.0007}$$

Equação 14

Onde Abs corresponde à absorvância correspondente a 1000 µM de sulfato ferroso e C a concentração corresponde à diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1000 µM. O

resultado foi dividido por 1000 para ter o valor em gramas e, sequencialmente, foi efetuada uma nova divisão por 1000 para encontrar o resultado final (z) (equação 15), onde:

$$Z = \frac{x}{1000 \times 1} : 1000$$

Equação 15

O resultado final foi expresso em concentração equivalente de sulfato ferroso ( $\mu\text{M}$ ), utilizando uma reta de calibração, com a seguinte equação:  $\text{Abs} = 0.0007 C + 0.1339$  (Figura 22), tendo em conta a massa da amostra e o volume do extrato.

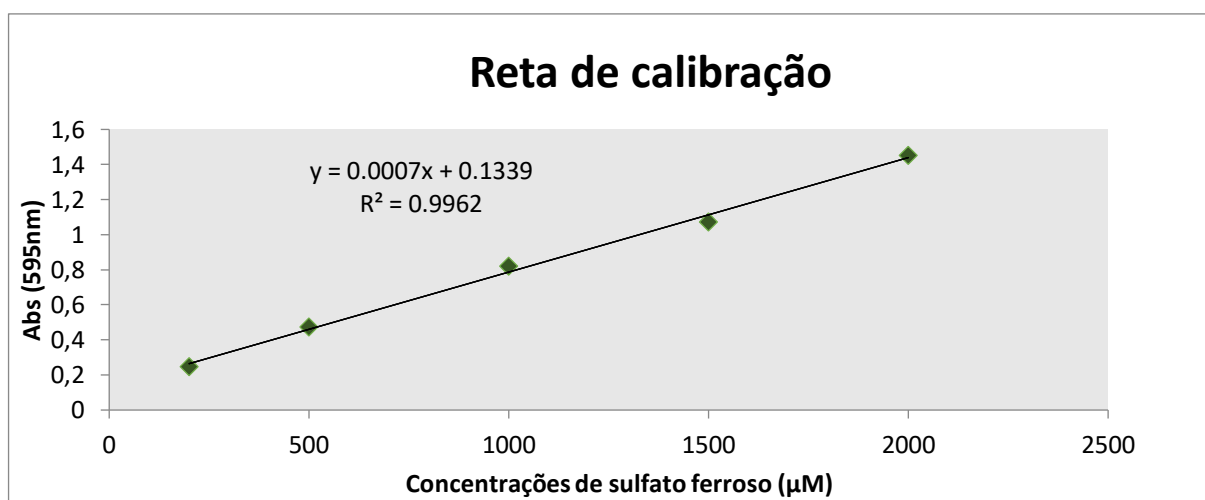


Figura 22 – Reta de calibração do sulfato ferroso para a determinação da capacidade antioxidante pelo método FRAP

### 3.4. Avaliação da Atividade Antibacteriana

Para avaliar a atividade antibacteriana do murtinho foram utilizados extratos da polpa, da semente e da folha de *Myrtus spp.* com etanol a 70 % v/v. A avaliação foi efetuada *in vitro* pelo método de difusão em disco, e estudado o seu efeito sobre diferentes estirpes de bactérias.

### 3.4.1. Estirpes bacterianas

A atividade antibacteriana do extrato de etanol a 70 % v/v do fruto, semente e folha foram testados individualmente em três estirpes de bactérias, Gram + (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213) e Gram - (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27749).

### 3.4.2. Extração de compostos fenólicos

Primeiramente realizou-se a extração dos compostos fenólicos, a qual influencia a avaliação da capacidade antioxidante, utilizando o solvente etanol a 70 % v/v. Os compostos fenólicos presentes no fruto foram extraídos de acordo com Ribeiro (2014), com algumas adaptações.

A extração foi realizada em 1.00 g de amostra, obtido por pressão manual mecânica, com recurso a almofariz e pilão, previamente pesada em balança analítica de precisão Mettler Toledo, modelo AE200-S. Seguidamente, foi colocada num frasco de vidro graduado, ao qual se adicionou 10 mL de solvente, etanol a 70 % v/v. A mistura manteve-se em agitação em agitador magnético P selecta, modelo Agimatic-N, durante uma hora, a temperatura ambiente e protegida da luz. Posteriormente, foi centrifugada em centrifugadora Centrifuge 5810 R, a uma velocidade de 1400 rpm durante 15 minutos. O conteúdo foi transferido para balões, devidamente pesados, e colocados de forma individual no rotavapor Laborota 4000 (Figura 23(a)), de modo a realizar a evaporação do solvente e assim determinar uma concentração conhecida (Figura 23(b)).



**Figura 23** – Extração no rotavapor Laborota 4000 (a) e identificação dos balões da polpa, semente e folha de *Myrtus spp.* após a extração do solvente etanol a 70 % v/v (b)

### 3.4.3. Método de Difusão em Disco

A atividade antibacteriana foi avaliada recorrendo ao método de difusão em disco, de acordo com a adaptação do procedimento de Djihane (2017). Nestes ensaios utilizou-se o meio Agar Mueller-Hinton (MHA) preparado de acordo com as indicações do fornecedor. Após esterilização, foram vertidos cerca de 15 mL do meio em placas de Petri esterilizadas obtendo-se assim uma camada-base. Através das colónias isoladas das culturas de bactérias, com auxílio de uma ansa esterilizada, realizou-se uma suspensão para cada bactéria em solução estéril de NaCl 0.85 % m/v até atingir uma densidade ótica correspondente à turbidez padrão de 0.50 na escala Mcfarland (cerca de  $1.5 \times 10^8$  bactérias/mL). Após a solidificação da camada-base, procedeu-se ao espalhamento da suspensão bacteriana, por toda a superfície de Muller-Hinton Agar (MHA), recorrendo a uma zaragatoa estéril. De seguida, foram colocados discos de papel de filtro qualitativo com 8 mm de diâmetro, esterilizados, contendo volumes conhecidos de extrato, a distâncias equitativas na superfície do agar inoculado.

Para estudar a atividade antimicrobiana do extrato de etanol a 70 % v/v foram utilizados discos com quatro volumes diferentes, 1.00 mg, 2.00 mg, 3.00 mg e 4.00 mg, de modo a avaliar o efeito da concentração dos componentes desses extratos. De forma a avaliar o possível efeito do solvente etanol a 70 % v/v na atividade antibacteriana do extrato, este foi utilizado como controlo negativo, tendo sido colocado 4.00 mg de etanol a 70 % v/v num disco de papel de filtro que depois de evaporado foi colocado na superfície do agar. Os antibióticos ciprofloxacina 5 µg (CIP 5) e cefotaxima 30 µg (CTX 30) foram utilizadas como controlo positivo permitindo-nos avaliar e quantificar os halos de inibição desenvolvidos.

Por fim, as placas de Petri foram incubadas a 37°C e foram observadas após 24 horas, de forma a verificar a existência de halos de inibição do crescimento bacteriano. A avaliação do crescimento nas respectivas placas, foi realizada através de leituras visuais, através de comparação com o controlo negativo e positivo e da medição dos halos desenvolvidos.

De forma a comprovar a esterilidade do meio de Muller-Hinton Agar (MHA), mantiveram-se duas placas de Petri sem inóculo nas mesmas condições do ensaio e

durante o mesmo período de tempo. Para comprovar a capacidade reprodutiva das estirpes bacterianas foram também mantidas duas placas de Petri inoculadas por espalhamento, com cada estirpe, nas mesmas condições e durante o mesmo período de tempo do ensaio.

### 3.5. Teste de Viabilidade Celular

Foram realizados ensaios de viabilidade celular com o intuito de avaliar a resposta de linhas celulares animais, na presença do sumo do fruto murtinho.

De forma a avaliar o efeito do sumo nas células recorreu-se ao ensaio com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolio (MTT), realizado segundo as indicações descritas no Kit No 11465001 – Sigma-aldrich, em culturas celulares tumorais CACO-2 do adenocarcinoma colorectal humano da *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC, UK). Estas células, CACO-2, possuem a capacidade de se diferenciarem de forma espontânea em condições de cultura, apresentando características semelhantes às de enterócitos humanos maduros. Apesar da sua origem cólica, estas células expressam uma morfologia e funcionalidade semelhante às células do intestino delgado. A monocamada CACO-2 apresenta vários recetores, enzimas metabólicas e transportadores (Kamiloglu, Capanoglu, Grootaert, & Van Camp, 2015).

O ensaio MTT é um método colorimétrico comumente utilizado com a finalidade de avaliar a proliferação celular e a citotoxicidade. O MTT é um corante que através da redução dos seus sais tetrazólicos origina cristais formazan, que são caracterizados pela sua cor roxa e por serem insolúveis em água. Esta redução, é efetuada por desidrogenases mitocondriais metabolicamente ativas (células viáveis). Os cristais são dissolvidos num solvente orgânico, originando assim uma solução de cor roxa, com menor ou maior intensidade, dependendo da quantidade de cristais formados e consequentemente da quantidade de células viáveis (Sigma-Aldrich, 2016). O procedimento utilizado no presente ensaio foi adaptado do método realizado por Nunes, et al., (2014) e desenvolvido em parceria com investigadores da Universidade de Coimbra – Departamento de Química.

### 3.5.1. Preparação dos extratos

O sumo de murтинho foi obtido por pressão manual mecânica, com recurso a um almofariz com pilão, seguido de filtração simples em papel de filtro qualitativo, com 90 mm de diâmetro e congelado a -20°C. De seguida, procedeu-se à liofilização do sumo em liofilizador Kinetics Ez-Dry, modelo EZ550R, acoplado a bomba de vácuo Edwards 12, à temperatura constante de -42°C, e pressão de 100 mT.

Com o objetivo de testar diferentes concentrações de sumo, foram preparadas cinco amostras, às concentrações de 2.00 %, 4.00 %, 6.00 %, 8.00 % e 10.00 % (m/v) de extrato de polpa, semente e folha de murтинho. Para preparação destas amostras, a amostra liofilizada foi ressuspensa em meio de cultura DMEM, dependendo da concentração a preparar.

### 3.5.2. Cultura das células

O modelo celular proveniente do adenocarcinoma colórectal humano (células CACO-2) utilizado neste estudo foi cedido pelos colaboradores da Universidade de Coimbra. As células foram mantidas em frasco de 75.00 cm<sup>2</sup> no meio de cultura, em incubadora Thermo Scientific BB 15, a 5.00 % CO<sub>2</sub>, 95.00 % humidade, 37°C. O meio de crescimento utilizado foi o *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) com 4500 mg/L glucose e 2.00 mM L-glutamina (sem bicarbonato de sódio), suplementado a 10.00 % v/v de soro fetal bovino inativado termicamente (FBS, Gibco), 1.00 % de aminoácidos não essenciais (NEAA) e 1.00 % penicilina (100units/mL) – estreptomomicina (10mg/mL) (Sigma-Aldrich, 2016).

O crescimento decorreu sob condições controladas durante aproximadamente sete dias. Realizou-se a mudança de meio de cultura de três em três dias de forma a garantir a reposição dos nutrientes necessários ao crescimento celular.

### 3.5.3. Ensaio MTT

Após 7 dias de desenvolvimento celular procedeu-se ao levantamento das células com solução a 2.5 % (m/V) tripsina-EDTA (10x solution). Realizou-se a contagem das células com recurso ao corante Azul de Tripán, em câmara de contagem de Neubauer. De seguida, procedeu-se ao plaqueamento das células em placas de 96 poços, com uma densidade de  $1 \times 10^4$  células/poço em 300  $\mu$ l de meio e incubou-se numa incubadora de CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific BB 15) com 5.00 % CO<sub>2</sub>, 95.00 % de humidade e temperatura constante, 37°C, durante aproximadamente cinco dias, até se atingir confluência celular total, com renovação de meio de cultura ao fim de três dias.

Após incubação, o meio foi retirado das placas e substituído pelas amostras de extrato de murtinho previamente preparadas e diluídas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), a diferentes concentrações. As placas foram colocadas na incubadora durante aproximadamente seis horas, tendo-se posteriormente removido o meio e o extrato das placas, lavando-se com solução de lavagem, tampão fosfato salino (PBS).

Após este procedimento, foram adicionados 50  $\mu$ l/ poço de solução 0.50 mg/mL MTT, previamente preparada. As placas foram novamente colocadas na incubadora durante aproximadamente três horas. Após este período, verificou-se a formação de cristais, sujeitos a solubilização para efeito de quantificação. As soluções resultantes foram quantificadas espectrofotometricamente a 570 nm com recurso a um leitor de placas Elisa (BioTek), com vista ao cálculo da viabilidade celular (equação 16). O ensaio foi realizado em duplicado, com quaduplicados de cada concentração. As amostras controlo correspondiam a poços que continham apenas o meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM).

$$\text{Viabilidade celular (\% do controlo)} = \frac{\text{Abs amostra a testar}}{\text{Abs controlo}} \times 100$$

Equação 16

## 3.6. Ensaio de Ressonância Magnética Nuclear

As amostras analisadas no ensaio de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram preparadas por diluição direta da solução dos extratos com água deuterada D<sub>2</sub>O 10.00 % (v/v), para um volume final de 500 µL. Os espectros 1D <sup>1</sup>H RMN foram adquiridos a 25°C, num espectrómetro Bruker Avance III 400 MHz, utilizando a sequência de impulso *zgpr*.

Foi adquirida uma janela espectral de 6402 Hz com um total de 512 scans e um tempo de relaxação de dois segundos, foi utilizado também o método de pré-saturação para supressão do sinal de solvente. O ensaio foi adaptado de Christophoridou & Dias (2009).

## 3.7. Estudo da Viabilidade e Incorporação de *Myrtus spp.* em produtos alimentares

### 3.7.1. Em Enchido/chouriço (como conservante natural)

A produção de chouriços teve por base dois conservantes distintos, designadamente nitrato de potássio (conservante químico – Figura 25 (a)) e *Myrtus spp.* (conservante natural – Figura 25 (b)), tendo-se realizado um controlo no qual não foi utilizado qualquer conservante (Figura 25 (c)).

Os enchidos foram executados de forma a testar a máxima eficácia de *Myrtus spp.* como agente antimicrobiano, pelo que foi colocado somente pimentão doce (condimento), cujo não altera a capacidade antimicrobiana do produto.

Em primeiro lugar realizou-se o corte da carne de porco (390g), previamente pesada em balança analítica de precisão Mettler Toledo, modelo AE200-S. Seguindo o processamento da matéria-prima, efetuando-se a higienização de folhas de *Myrtus spp.* com água desionizada e posteriormente a sua trituração, obtida por pressão manual mecânica com recurso a almofariz e pilão, previamente pesada em balança analítica de precisão Mettler Toledo, modelo AE200-S.

Abaixo seguem as etapas de produção do enchido, descritas no fluxograma (Figura 24).

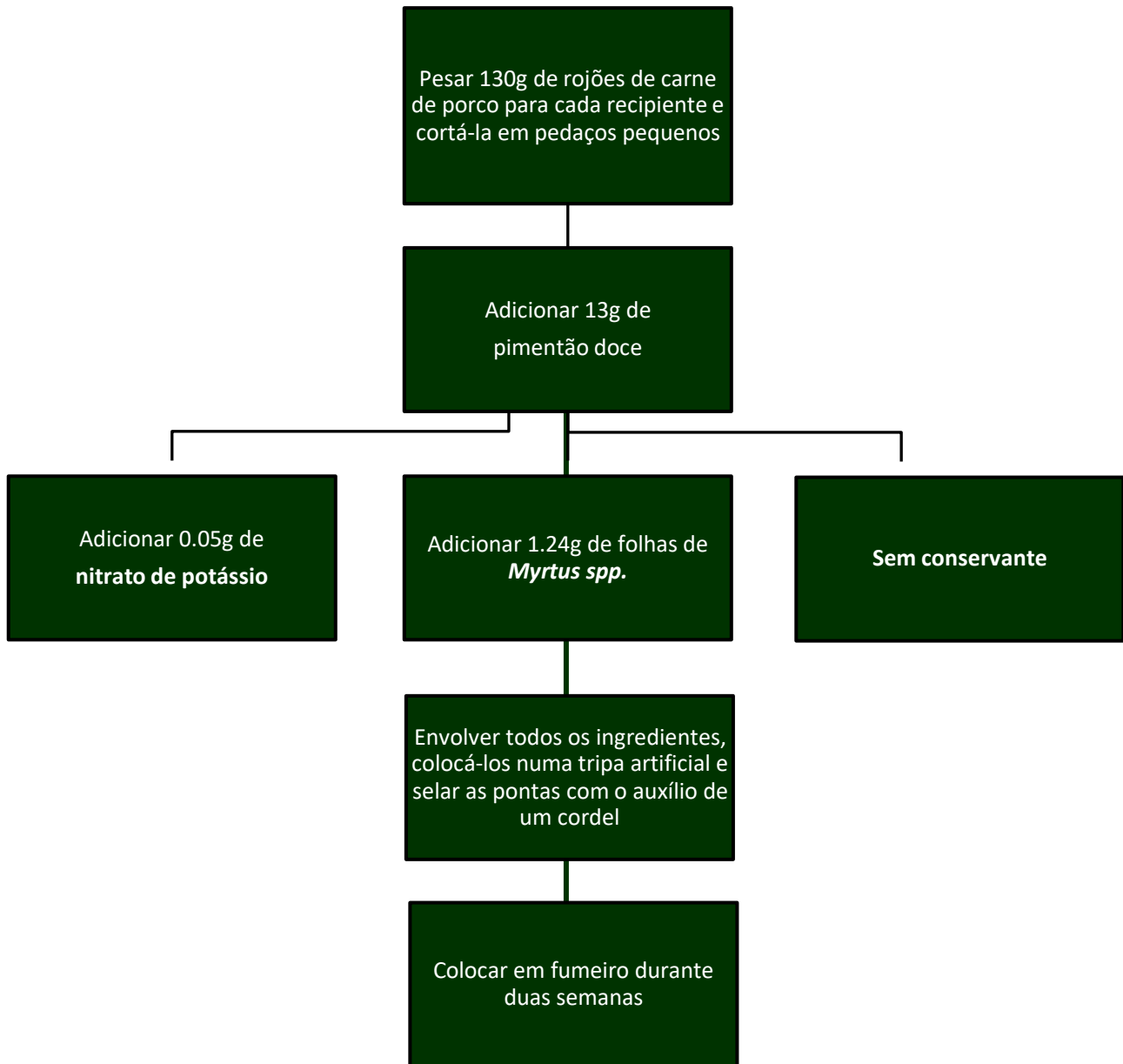


Figura 24 – Diagrama da incorporação de *Myrtus spp.* em enchido/chouriço

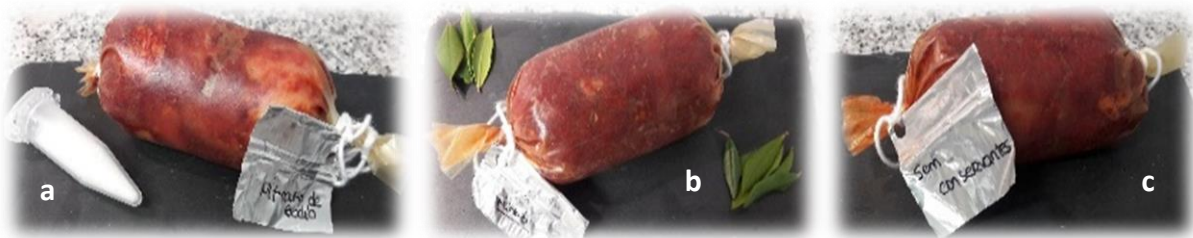


Figura 25 – Enchido/chouriço utilizando *Myrtus spp.* como conservante natural (b), nitrato de potássio como conservante químico (a) e sem adição de conservante (c)

Após as duas semanas de fumeiro, onde a carne é desidratada, de modo a aumentar a sua durabilidade e a preservar os seus sabores e aromas caraterísticos, efetuou-se uma avaliação visual e procedeu-se ao teste de controlo de qualidade, com o objetivo de avaliar a carga microbiana dos chouriços.

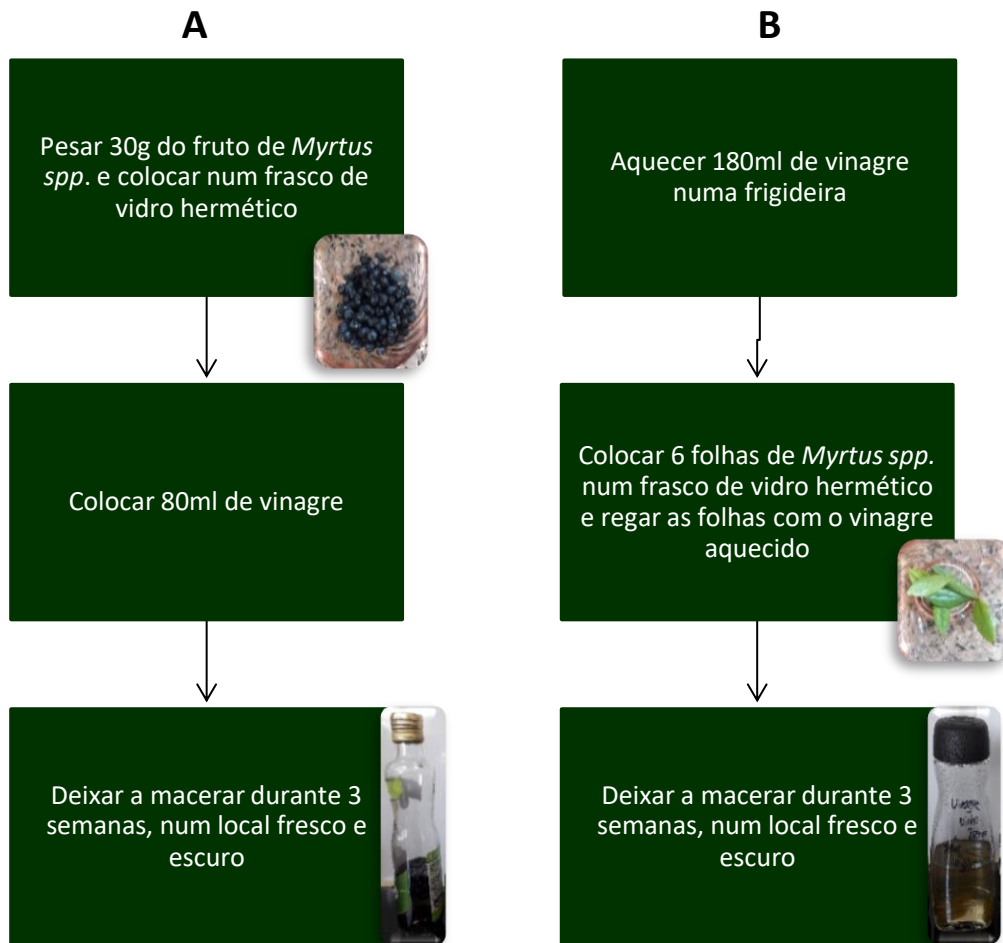
Este teste baseia-se na presença e enumeração de coliformes e bactérias *Escherichia coli* pois, aquando ingeridos e absorvidos pelo organismo humano são os responsáveis pela existência de toxinfecções, nomeadamente a intoxicação alimentar.

Primeiramente, foram feitos os meios de cultura, um meio não seletivo agar nutritivo (NA), para determinar o número de microrganismos totais (bactérias e fungos) e um meio seletivo, *Coliform ChromoSelect Agar*, para avaliar quantitativamente o número de coliformes. Os meios servem para proporcionar as condições ótimas para o desenvolvimento de microrganismos através de uma preparação nutritiva.

De seguida, foram triturados 10.00 g de chouriço com o auxílio de uma picadora e adicionados a 90 mL de solução salina 0.85 %, a mistura foi homogeneizada num saco Stomacker durante um min a 1400 rpm de modo a promover a libertação dos microrganismos para a solução. Seguidamente, realizaram-se diluições decimais em solução salina 0.85 % , tendo-se inoculado 100 µl de cada uma das diluições realizadas nos meios de cultura. A incubação realizou-se a 37°C durante 48h.

### **3.7.2. Em Tempero/vinagre**

Foram também realizadas várias formulações (Figura 26) com vinagre branco e de sidra, com incorporação dos frutos e folhas de *Myrtus spp.*



**Figura 26** – Diagrama do procedimento de produção de vinagre com incorporação dos frutos (A) e folhas (B) de *Myrtus spp.*

Passadas as três semanas, obteve-se o produto final, no qual foram analisados parâmetros físico-químicos como: acidez, teor de sólidos solúveis ( $^{\circ}$ Brix), compostos fenólicos totais pelo método *Folin-Ciocalteu* e capacidade antioxidante total pelos métodos ABTS e DPPH.

### 3.7.3. Em Cerveja artesanal

A utilização de frutas na sua produção garante uma doçura residual, aroma e sabor característico. De forma a estudar a incorporação do fruto em produtos alimentares, foi realizada também uma formulação de cerveja artesanal de *Myrtus spp.*, onde o principal objetivo foi desenvolver uma nova alternativa face à cerveja tradicional, de modo a valorizar o potencial do fruto e as suas propriedades funcionais.

A fabricação de cerveja é feita há milhares de anos, sendo as suas etapas básicas: maltagem, processamento de mosto, fermentação, condicionamento e acabamento, descritas no fluxograma (Figura 27). Na 1ª etapa, maltagem, são produzidos açúcares fermentativos a partir do grão. Este é aquecido, com o objetivo de matar microrganismos indesejados, inativar enzimas que não são necessárias e contribuir para as características de cor e sabor do produto acabado. Em seguida, é adicionada levedura (*Saccharomyce cerevisiae*) e, em condições controladas ocorre a fermentação. Posteriormente, ocorre a clarificação e o desenvolvimento de sabor (Harrison & Albanese, 2019).

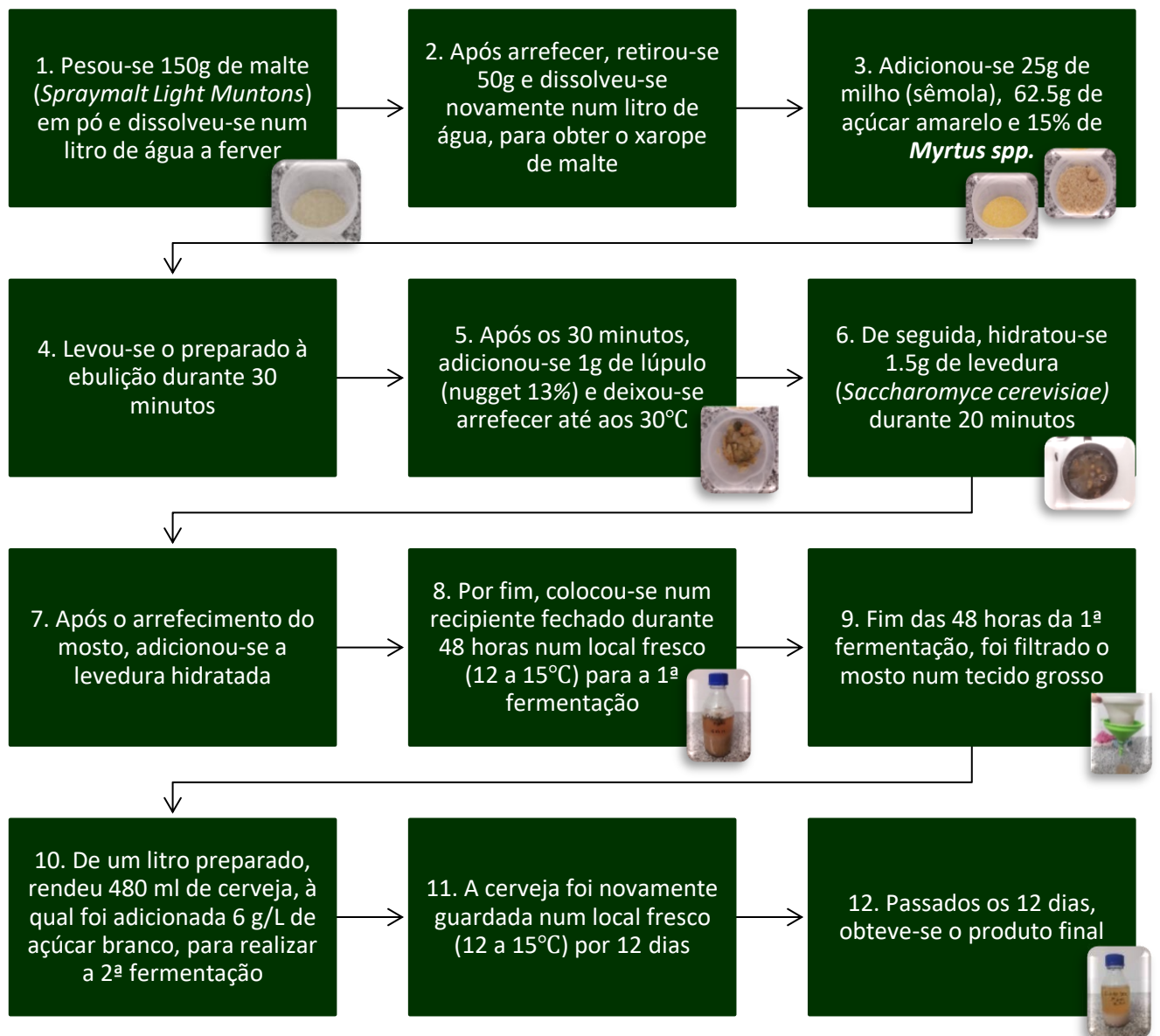


Figura 27 – Diagrama do processo de produção de cerveja artesanal de *Myrtus spp.*

As cervejas podem ser classificadas como *Ale* ou *Larger*, de alta ou baixa fermentação, respectivamente, sendo que, devido às altas temperaturas usadas no processo, tanto os sabores quanto os aromas das cervejas tipo *larger* são mais suaves e leves em comparação às cervejas tipo *ale* (Harrison & Albanese, 2019).

Para a cerveja de *Myrtus spp.* queria-se um grau de carbonatação mais baixo, denominado *Ale*, pela qual foi adicionada pouca quantidade de açúcar (5.00 a 6.00 g/L).

Após a 2ª fermentação, obteve-se o produto final, no qual foram analisados parâmetros físico-químicos: acidez, teor de sólidos solúveis (°Brix), teor alcoólico (% v/v), compostos fenólicos totais pelo método *Folin-Ciocalteu* e a capacidade antioxidante total pelos métodos ABTS e DPPH.

### **3.8. Tratamento de Dados e Análise Estatística**

Os resultados realizados no presente estudo foram submetidos a análise recorrendo ao programa *Microsoft Excel* 2019. Para efeito de tratamento dos dados obtidos, apresenta-se média  $\pm$  desvio padrão. As retas de calibração foram determinadas por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

### 4.1. Caracterização Físico-Química

#### 4.1.1. Determinação das Características Biométricas

Os resultados obtidos, relativos às características biométricas dos murteiros, encontraram-se representados na Tabela 2.

**Tabela 2** – Resultados das Características Biométricas de *Myrtus spp.*

<b>Características Biométricas</b>	<b>Resultados (média ± desvio padrão)</b>
<b>Peso médio do fruto (g)</b>	0.22 ± 0.06
<b>Quantidade de sementes por fruto</b>	5.95 ≈ 6 ± 1.45
<b>Diâmetro médio do fruto (mm)</b>	7.66 ± 0.55
<b>Altura média do fruto (mm)</b>	9.89 ± 0.71
<b>Calibre (cm)</b>	0.88 cm ± 0.05
<b>Volume (cm<sup>3</sup>)</b>	2.86 cm <sup>3</sup> ± 0.52

Relativamente ao peso médio do fruto, o resultado obtido no presente estudo (0.22 g ± 0.06) foi semelhante aos valores encontrados para o mirtilo, um fruto muito semelhante ao estudado, sendo o seu peso de 0.21 g ± 0.02 (Vuon , et al., 2018).

Quanto ao nº de sementes, a murta apresenta uma média de 6.00 ± 1.45 sementes por fruto mas, segundo a literatura, apresenta nove (Mhamdi, Wannas, Sriti, & Marzouk, 2010).

Em relação ao diâmetro e à altura entre a murta recolhida no Agroal (diâmetro 7.66 mm ± 0.55 e altura 9.89 mm ± 0.71), a murta colhida na Turquia (diâmetro 7.57 mm ± 1.14 e altura 13.75 mm ± 1.90) (Aydın & Özcan, 2007) e a murta desenvolvida e colhida em Itália (diâmetro 7.00 a 10.0 mm) (Ciccarelli, Garbari, & Pagni, 2008), todos os resultados se aproximam. O que também acontece com o mirtilo, que apresenta um diâmetro de 6.81 mm ± 0.29 (Vuon , et al., 2018).

Quanto ao calibre e ao volume, os resultados dos frutos colhidos no Agroal são  $0.88 \text{ cm} \pm 0.05$  e  $2.86 \text{ cm}^3 \pm 0.52$  para o calibre e o volume, respectivamente.

Os resultados das características biométricas verificados nos estudos descritos anteriormente, apresentaram-se, de uma forma geral, bastante semelhantes aos resultados reportados na literatura. No entanto, existem diversos fatores abióticos que condicionam os resultados como a localização e as condições edafoclimáticas, bem como o grau de maturação dos frutos no momento da colheita e à forma como a amostra foi selecionada (Cicarelli, Garbari, & Pagni, 2008).

#### 4.1.2. Caracterização Química

Os resultados obtidos, relativos às características químicas dos murinhos, encontraram-se representados na Tabela 3.

**Tabela 3** – Resultados das Características Químicas de *Myrtus spp.*

<b>Características Químicas</b>	<b>Resultados (média <math>\pm</math> desvio padrão)</b>
<b>% Edível da Polpa</b>	29.12 % $\pm$ 1.20
<b>% Edível da Semente</b>	76.64 % $\pm$ 0.86
<b>Teor de Humidade</b>	67.03 % $\pm$ 0.57
<b>Acidez (pH)</b>	5.25 $\pm$ 0.01 a 20°C
<b>Teor de Sólidos Solúveis (% Brix)</b>	1.80 % $\pm$ 0.17 a 24.7°C

A determinação do teor da parte edível do fruto fresco é uma análise bastante relevante, para uma futura comercialização do fruto e rentabilidade, correspondendo ao peso do produto que pode ser integralmente considerado como alimento. No presente estudo foi calculado o teor da parte edível do fruto fresco (%), considerando que todo o fruto é consumido, inclusive as sementes.

Nesta análise, comparando o resultado da murta ( $29.12 \% \pm 1.20$  – polpa e  $76.64 \% \pm 0.86$  – semente) com o resultado do fruto inteiro mirtilo ( $51.71 \% \pm 2.25$ ), verifica-se que os valores do fruto inteiro se apresentam entre os valores da murta, uma vez que neste

caso não foi separada a semente, apresentando uma edibilidade elevada (Vuon , et al., 2018). Contrariamente à murta, em que apenas a edibilidade das sementes é elevada e, por se tratar de uma baga de dimensões reduzidas e com baixa proporção da polpa, pode interferir de forma negativa na adesão à compra para possíveis comercializações. Sendo o murtinho um fruto sazonal e típico da Península Ibérica, a desidratação seria uma opção para a valorização deste fruto e para garantir o seu consumo durante todo o ano. Os resultados obtidos nesta análise demonstram que, tanto o teor de humidade (%) entre os frutos recolhidos no Agroal ( $67.03 \% \pm 0.57$ ) (Figura 28), como os frutos colhidos na Turquia ( $74.44 \%$ ) (Aydın & Özcan, 2007) e os frutos colhidos em Itália ( $72 \%$ ) (Marzouk, Mhamdi, & Wannes, 2009), apresentam valores muito semelhantes.



**Figura 28** – Murtinho desidratado a uma temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas

O pH do sumo de murtinho foi medido diretamente em amostra de sumo sem recorrer à diluição do mesmo. Os resultados obtidos nesta análise demonstram que, tanto o pH dos frutos recolhidos no Agroal ( $\text{pH}=5.25 \pm 0.01$ ) como os frutos colhidos na Turquia ( $\text{pH}=6.56$ ) são conformes (Aydın & Özcan, 2007), sendo ambos ácidos.

Para a determinação do teor dos sólidos solúveis totais no presente estudo, o sumo foi diluído na diluição de 1:10. Os resultados de  $^{\circ}\text{Brix}$  dos frutos recolhidos no Agroal foram de  $1.80 \% \pm 0.17$ , demonstrando serem superiores aos reportados na literatura, em relação ao fruto mirtilo ( $0.89 \%$ ) (Qiao, et al., 2019). No entanto, ambos os frutos apresentam um baixo nível de doçura, fator relevante para o desenvolvimento das propriedades organolépticas e interesse comercial deste tipo de frutos.

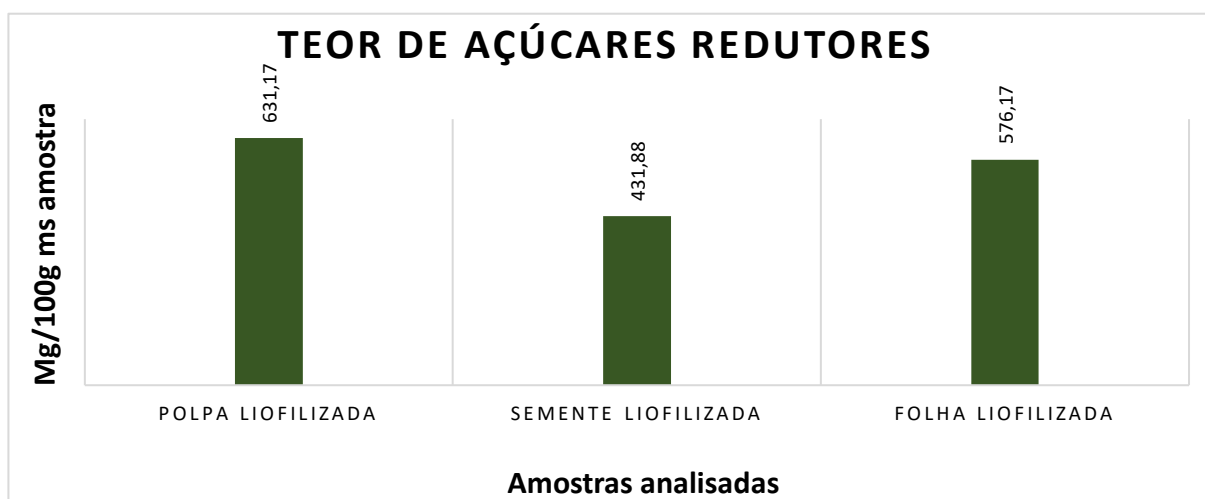
As diferenças verificadas na comparação dos estudos, podem também resultar de fatores abióticos como a quantidade, a duração, a temperatura e a intensidade da luz, exercendo estes uma grande influência na qualidade do produto final. Esta influência

depende do fruto, contudo, para uma grande parte dos frutos o aumento da temperatura incrementa o amadurecimento (Ciccarelli, Garbari, & Pagni, 2008).

### 4.1.3. Determinação do Teor de Açúcares Redutores

Os resultados da determinação dos açúcares redutores, pelo Método DNS, foram expressos em mg/100g ms (matéria seca).

Os valores obtidos para as amostras da polpa liofilizada, da semente liofilizada e da folha liofilizada estão representadas na Figura 29.



**Figura 29** – Teor de Açúcares Redutores (mg/100g ms) em amostras de Polpa liofilizada, Semente liofilizada e Folha liofilizada, obtidas a partir do método DNS

Os resultados obtidos para as amostras de polpa liofilizada, semente liofilizada e folha liofilizada foram 631.17 mg/100g  $\pm$  0.03, 431.88 mg/100g  $\pm$  0.07 e 576.17 mg/100g  $\pm$  0.05, respectivamente. Verificou-se que o teor de açúcares redutores da polpa foi consideravelmente superior às restantes partes do fruto, apresentando esta os níveis de açúcares mais altos, como se verifica na Figura 29.

Os resultados podem variar dependendo da localização geoclimática e das condições de cultivo, incluindo a concentração de nutrientes, a temperatura, a humidade, o tipo de solo, a duração do dia, o clima, a altitude e a quantidade de água disponível (Aleksic & Knezevic, 2014).

### 3.1.4. Análise do Perfil de Ácidos Gordos

Esta análise foi realizada em triplicado e os ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME's) foram obtidos por transmetilação direta, a partir de amostras liofilizadas e posteriormente trituradas.

A identificação dos cromogramas (Anexo III), foi realizada através da comparação do tempo de retenção dos picos das amostras com o padrão Supelco FAME Mix C8 – C24. O perfil dos ácidos gordos foi realizado atribuindo-se que a fração correspondente a um determinado ácido gordo é a razão entre a respectiva área do pico e a área total dos picos, representados em percentagem.

A composição dos ácidos gordos (%) para as amostras da polpa de murta encontra-se apresentada na Tabela 4.

**Tabela 4** – Composição dos ácidos gordos (%) por ordem decrescente, presentes nas amostras da polpa de *Myrtus spp.*

Ácidos gordos Nomenclatura	Polpa de <i>Myrtus spp.</i> Média (%) ± DP
<b>Linoleico (C18:2 n6) – PUFA<sup>c</sup></b>	41.00 ± 14.00
<b>Palmítico (C16) – SFA<sup>a</sup></b>	32.8 ± 6.30
<b>Esteárico (C18) – SFA<sup>a</sup></b>	15.00 ± 11.00
<b>Araquídico (C20) – SFA<sup>a</sup></b>	6.70 ± 2.10
<b>Oleico (C18:1 n9) – MUFA<sup>b</sup></b>	4.50 ± 1.90

<sup>a</sup>SFA: Ácidos gordos saturados (*Saturated fatty acids*)

<sup>b</sup>MUFA: Ácidos gordos monoinsaturados (*Monounsaturated fatty acids*)

<sup>c</sup>PUFA: Ácidos gordos polinsaturados (*Polyunsaturated fatty acids*)

A partir dos valores obtidos, é possível verificar que, em termos de quantidade absoluta, o ácido linoleico (C18:2 n6) – PUFA foi identificado em maior abundância, representando 41.00 % ± 14.00 do total dos ácidos gordos, seguido pelo ácido palmítico (C16) a 32.8 % ± 6.30.

Relativamente aos SFAs, o ácido palmítico (C16) é predominante (32.8 % ± 6.30), seguido pelo ácido esteárico (C18) a 15.00 % ± 11.00 e pelo ácido araquídico (C20) a 6.70 % ± 2.10, totalizando 54.5 %. Em relação aos MUFAs, o ácido oleico (C18:1 n9) é predominante (4.50 % ± 1.90).

A composição dos ácidos gordos (%) para as amostras das sementes de murta encontra-se apresentada na Tabela 5.

**Tabela 5** – Composição dos ácidos gordos (%) por ordem decrescente, presentes nas amostras das sementes de *Myrtus spp.*

Ácidos gordos Nomenclatura	Sementes de <i>Myrtus spp.</i> Média (%) ± DP
<b>Linoleico (C18:2 n6) – PUFA<sup>c</sup></b>	82.80 ± 1.50
<b>Oleico (C18:1 n9) – MUFA<sup>b</sup></b>	8.33 ± 0.94
<b>Palmítico (C16) – SFA<sup>a</sup></b>	5.49 ± 0.42
<b>Esteárico (C18) – SFA<sup>a</sup></b>	1.86 ± 0.37
<b>Araquídico (C20) – SFA<sup>a</sup></b>	0.23 ± 0.05

<sup>a</sup>SFA: Ácidos gordos saturados (*Saturated fatty acids*)

<sup>b</sup>MUFA: Ácidos gordos monoinsaturados (*Monounsaturated fatty acids*)

<sup>c</sup>PUFA: Ácidos gordos polinsaturados (*Polyunsaturated fatty acids*)

Assim como para o perfil dos ácidos gordos presentes na polpa da murta, na semente os PUFAs também constituem o grupo dominante, representando 82.80 % do total dos ácidos gordos. O MUFA oleico (C18:1 n9) representa 8.33 %, enquanto os SFAs representam 7.58 % do total de ácidos gordos.

A composição dos ácidos gordos (%) para as amostras das folhas de murta encontra-se apresentada na Tabela 6.

**Tabela 6** – Composição dos ácidos gordos (%) por ordem decrescente, presentes nas amostras das folhas de *Myrtus spp.*

Ácidos gordos Nomenclatura	Folhas de <i>Myrtus spp.</i> Média (%) ± DP
<b>Araquídico (C20) – SFA<sup>a</sup></b>	60.73 ± 0.51
<b>Palmítico (C16) – SFA<sup>a</sup></b>	19.76 ± 0.51
<b>Linoleico (C18:2 n6) – PUFA<sup>c</sup></b>	12.12 ± 0.76
<b>Oleico (C18:1 n9) – MUFA<sup>b</sup></b>	4.97 ± 0.15
<b>Esteárico (C18) – SFA<sup>a</sup></b>	2.42 ± 0.42

<sup>a</sup>SFA: Ácidos gordos saturados (*Saturated fatty acids*)

<sup>b</sup>MUFA: Ácidos gordos monoinsaturados (*Monounsaturated fatty acids*)

<sup>c</sup>PUFA: Ácidos gordos polinsaturados (*Polyunsaturated fatty acids*)

O perfil dos ácidos gordos das folhas de murta, conforme apresentado na Tabela 6, revelou que, em termos de quantidade absoluta, o ácido araquídico (C20) foi o ácido gordo identificado em maior abundância, representando  $60.73 \% \pm 0.51$  do total dos ácidos gordos, seguido pelo ácido palmítico (C16) a  $19.76 \% \pm 0.51$ , sendo também os SFAs mais abundantes. Foi também identificado em menor quantidade o ácido esteárico (C18) a  $2.42 \% \pm 0.42$ , sendo o SFA menos abundante.

É possível verificar que na folha de murta os SFAs predominaram em relação aos MUFAs, representando  $82.91 \%$  do total dos ácidos gordos, enquanto os MUFAs representaram apenas  $4.97 \%$  do total, sendo o ácido oleico (C18:1 n9) o único MUFA presente ( $4.97 \pm 0.15$ ). Os PUFAs representam  $12.12 \%$  do total de ácidos gordos das folhas de murta.

De um modo geral, os PUFAs (ácidos gordos polinsaturados) foram o grupo predominante na polpa e nas sementes da murta, aparecendo também nas sementes.

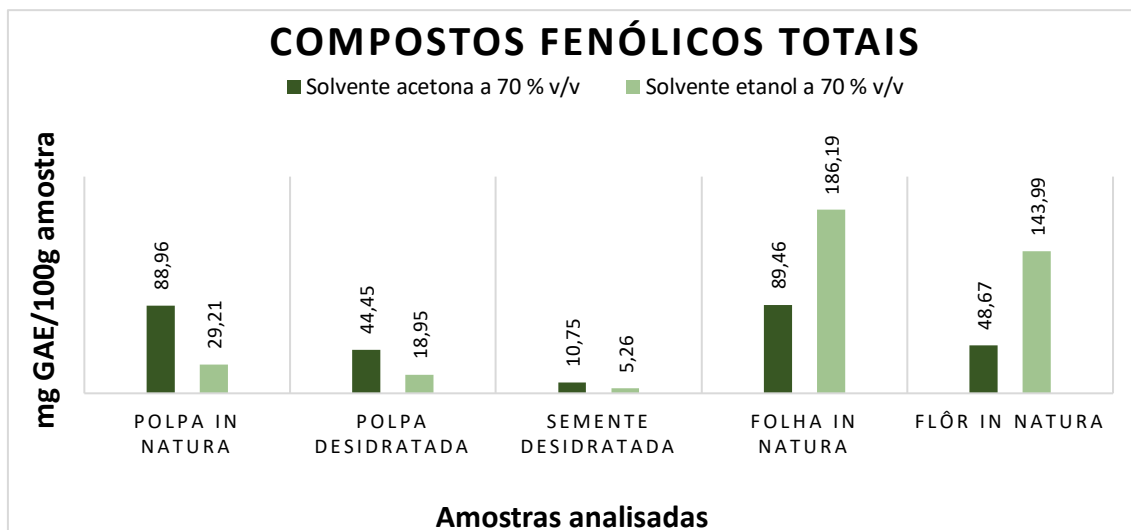
De acordo com Cakir (2004), os principais ácidos gordos presente no fruto *Myrtus communis* são o ácido oleico (C18:1 n9) –  $69.5 \%$ , o ácido palmítico (C16) –  $17.8 \%$  e o ácido esteárico (C18) –  $6.4 \%$ , como verificado nos resultados acima.

## 4.2. Atividade Antioxidante

### 4.2.1. Quantificação dos Compostos Fenólicos Totais

Para a quantificação dos compostos fenólicos totais foi utilizado o método colorimétrico de *Folin-Ciocalteu*. Este método foi aplicado em extratos da polpa *in natura* (P), polpa desidratada (PS), semente desidratada (SS), folha *in natura* (F) e flôr *in natura* (L), com os solventes acetona a  $70 \% v/v$  e etanol a  $70 \% v/v$ . Os extratos foram preparados em duas soluções orgânicas (acetona e etanol) de modo a averiguar o efeito de cada um dos solventes, no processo de extração e solubilização de compostos fenólicos.

Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de amostra (mg GAE/100g), conforme demonstrado na Figura 30.



**Figura 30** – Compostos Fenólicos Totais (mg GAE/100g) em amostras da Polpa *in natura* (P), Polpa desidratada (PS), Semente desidratada (SS), Folha *in natura* (F) e Flôr *in natura* (L), com os solventes acetona a 70 % v/v e etanol a 70 % v/v, obtidos a partir do método *Folin-Ciocalteu*

No que diz respeito à análise realizada na polpa *in natura* (P), na polpa desidratada (PS) e na semente desidratada (SS), apresentando os valores 88.96 mg GAE/100g  $\pm$  0.01 (P1), 44.45 mg GAE/100g  $\pm$  0.01 (PS1) e 10.75 mg GAE/100g  $\pm$  0.00 (SS1) respectivamente, verifica-se que os compostos fenólicos totais, usando para a extração o solvente acetona a 70 % v/v foram bastante superiores aos valores apresentados para a extração com o solvente etanol a 70 % v/v, sendo 29.21 mg GAE/100g  $\pm$  0.01 – P2, 18.95 mg GAE/100g  $\pm$  0.01 – PS2 e 5.26 mg GAE/100g  $\pm$  0.03 – SS2.

Relativamente aos valores dos compostos fenólicos totais encontrados na literatura, de outros pequenos frutos semelhantes (Tabela 7), 128.03 mg GAE/100g  $\pm$  1.87 para o fruto *Myrtus nivellei* (Ramdane, et al., 2017), 274.48 mg GAE/100g  $\pm$  5.63 para o fruto mirtilo cultivado no Brasil (Rodrigues, et al., 2012), 104.47 mg GAE/100g  $\pm$  9.01 para o fruto mirtilo cultivado na Austrália (Vuon , et al., 2018) e 126.00 mg GAE/100g  $\pm$  0.30 para o fruto amora (Moyer, Hummer, Finn, Frei, & Wrolstad, 2002), demonstram ser bastante inferiores ao resultado encontrado para a polpa *in natura* (P), 88.96 mg GAE/100g  $\pm$  0.01 (P1).

A diferença encontrada pode estar relacionada com as características edafoclimáticas de cada região de colheita, a localização geoclimática e as condições de cultivo, as condições de crescimento, incluindo concentração de nutrientes, o estado de

maturação dos frutos mas, principalmente, com o método e o solvente de extração adotado (Aleksic & Knezevic, 2014).

**Tabela 7** – Teor de compostos fenólicos totais em diversos frutos, pelo método *Folin-Ciocalteu*

Frutos	Compostos Fenólicos Totais (mg GAE/100g do fruto)
<b><i>Myrtus nivellei</i></b> (Ramdane, et al., 2017)	128.03 ± 1.87
<b>Mirtilo</b> (Rodrigues, et al., 2012)	274.48 ± 5.63
<b>Mirtilo</b> (Vuon , et al., 2018)	104.47 ± 9.01
<b>Amora</b> (Moyer, Hummer, Finn, Frei, & Wrolstad, 2002)	126.00 ± 0.30

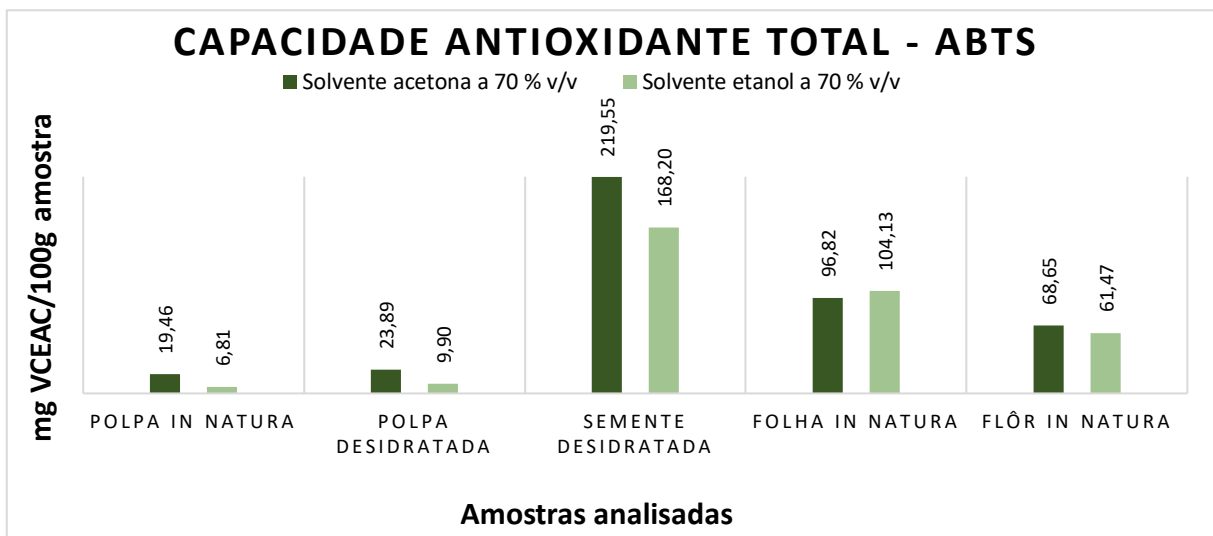
Quanto às folhas *in natura* (F) e às flores *in natura* (L), os valores da extração com o solvente acetona a 70 % v/v foram bastante inferiores aos apresentados com o solvente etanol a 70 % v/v (Figura 30), sendo eles, 89.46 mg GAE/100g ± 0.01 – F1 e 48.67 mg GAE/100g ± 0.01 – L1 e, 186.19 mg GAE/100g ± 0.07 – F2 e 143.99 mg GAE/100g ± 0.03 – L2, das folhas e flores respectivamente. No entanto, as folhas *in natura* (F) e as flores *in natura* (L), foram as partes da murta que apresentaram maior quantidade de compostos fenólicos totais, dizendo isto que, são as partes que melhor actuam como inibidores em vários processos.

Segundo a literatura, a capacidade fenólica total das folhas de *Myrtus communis* foi de 162.49 mg GAE/100g ± 16.95 para o solvente etanol a 70 % v/v, aproximando-se bastante dos valores analisados, para as folhas de *Myrtus spp.* de 186.19 mg GAE/100g ± 0.07 (Dahmoune, Nayak, Moussi, Remini, & Madani, 2015).

As razões para a diferença dos valores encontrados no estudo referido, em relação ao obtido no presente estudo para a murta, deve-se não somente ao facto de serem frutos com características peculiares e de identidades diferentes, mas também ao seu método de extração e solvente utilizado. Deste modo, foi possível verificar que, dependendo da composição fenólica das diferentes partes da planta analisadas, a solução de acetona (70 % v/v), mostrou-se mais eficiente na extração de compostos fenólicos contidos no fruto (polpa e semente), enquanto a solução de etanol (70 % v/v) mostrou-se mais eficiente na extração de compostos fenólicos presentes na flôr e folha.

#### 4.2.2. Avaliação da Capacidade de redução do radical ABTS

A avaliação da capacidade antioxidante do fruto foi estudada através do método do radical catiónico ABTS<sup>●+</sup> recorrendo a ácido ascórbico como padrão. Este método foi aplicado em extratos da polpa *in natura* (P), polpa desidratada (PS), semente desidratada (SS), folha *in natura* (F) e flôr *in natura* (L). Os resultados foram expressos em mg VCEAC/100g de amostra (VCEAC: Equivalente em Vitamina C), conforme demonstrado na Figura 31.



**Figura 31** – Capacidade Antioxidante Total (mg VCEAC/100g) em amostras amostras da Polpa *in natura* (P), Polpa desidratada (PS), Semente desidratada (SS), Folha *in natura* (F) e Flôr *in natura* (L), com os solventes acetona a 70 % v/v e etanol a 70 % v/v, obtidos a partir do método ABTS

Relativamente à análise realizada na polpa *in natura* (P), na polpa desidratada (PS), na semente desidratada (SS) e na flôr *in natura* (L), apresentando os valores 19.46 mg VCEAC/100g  $\pm$  0.72 (P1), 23.89 mg VCEAC/100g  $\pm$  1.19 (PS1), 219.55 mg VCEAC/100g  $\pm$  0.60 (SS1) e 68.65 mg VCEAC/100g  $\pm$  1.31 (L1) respectivamente, verifica-se que os compostos antioxidantes totais, usando para a extração o solvente acetona a 70 % v/v foram superiores mas muito semelhantes aos valores apresentados para a extração com o solvente etanol a 70 % v/v, sendo 6.81 mg VCEAC/100g  $\pm$  0.57 (P2), 9.90 mg VCEAC/100g  $\pm$  0.98 (PS2), 168.20 mg VCEAC/100g  $\pm$  0.50 (SS2) e 61.47 mg VCEAC/100g  $\pm$  1.28 (L2).

Como verificado na Figura 31, os resultados obtidos mostraram que a semente desidratada (SS) apresentou uma maior atividade antioxidante, quando comparada às restantes partes do fruto, tendo um poder maior de atrasar ou inibir a oxidação de um substrato oxidável.

Segundo Floegel, et al. (2011), que avaliou a capacidade antioxidante total de outros pequenos frutos semelhantes (Tabela 8), 476.60 mg VCEAC/100g  $\pm$  28.90 para o fruto mirtilo e 194.20 mg VCEAC/100g  $\pm$  22.00 para o fruto cereja, demonstram ser bastante superiores ao resultado encontrado para a polpa *in natura* (P), 19.46 mg VCEAC/100g  $\pm$  0.72 (P1) (Floegel, Kim, Chung, Koo, & Chun, 2011).

**Tabela 8** – Comparação da capacidade antioxidante total da murta com diferentes frutos, determinada pelo método ABTS, através de um estudo conduzido por Floegel, et al. (2011)

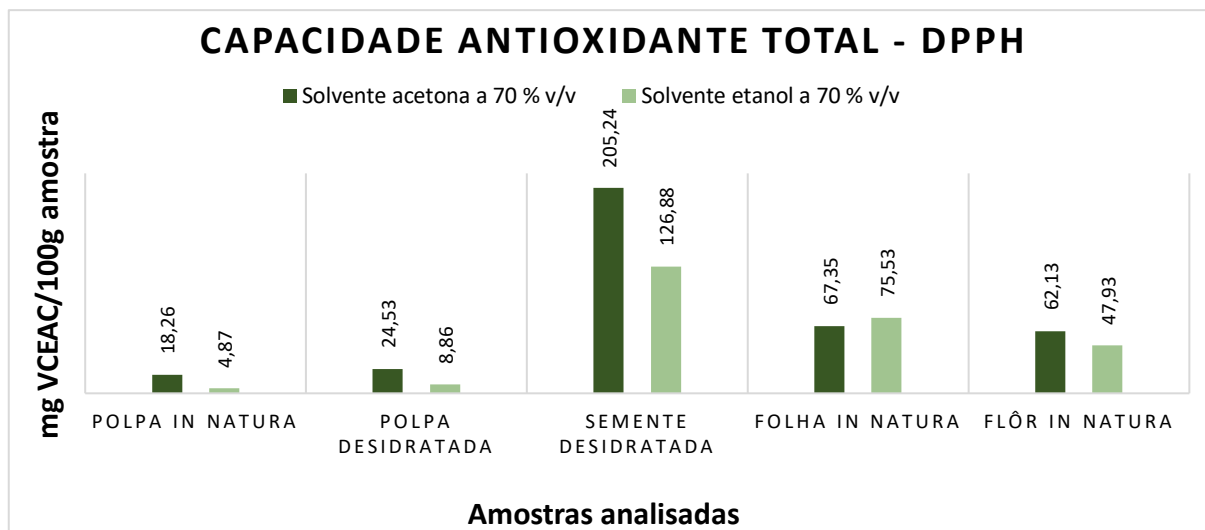
Frutos	Capacidade antioxidante – ABTS (mg VCEAC/100g do fruto)
Mirtilo	476.60 mg VCEAC/100g $\pm$ 28.90
Cereja	194.20 mg VCEAC/100g $\pm$ 22.00

Quanto à folha *in natura* (F), o valor da extração com o solvente acetona a 70 % v/v foi inferior mas também muito próximo ao apresentado com o solvente etanol a 70 % v/v (Figura 31), sendo ele, 96.82 mg VCEAC /100g  $\pm$  0.79 – F1 e 104.13 mg VCEAC /100g  $\pm$  0.40 (F2), respectivamente.

### 4.2.3. Avaliação da Capacidade antioxidante pelo Método

#### DPPH

O estudo de remoção do radical DPPH• foi realizado de acordo com o método descrito por Brand-Williams (com algumas modificações), para determinar a capacidade antioxidante total da polpa *in natura* (P), da polpa desidratada (PS), da semente desidratada (S), da folha *in natura* (F) e da flôr *in natura* (L), sendo que os resultados foram expressos em mg VCEAC/100g de amostra (VCEAC: Equivalente em Vitamina C), conforme demonstrado na Figura 32.



**Figura 32** – Capacidade Antioxidante Total (mg VCEAC/100g) em amostras amostras da Polpa *in natura* (P), Polpa desidratada (PS), Semente desidratada (SS), Folha *in natura* (F) e Flôr *in natura* (L), com os solventes acetona a 70 % v/v e etanol a 70 % v/v, obtida a partir do método DPPH

Relativamente à análise realizada na polpa *in natura* (P), na polpa desidratada (PS), na semente desidratada (SS) e na flôr *in natura* (L), apresentando os valores 18.26 mg VCEAC/100g  $\pm$  1.57 (P1), 24.53 mg VCEAC/100g  $\pm$  0.98 (PS1), 205.24 mg VCEAC/100g  $\pm$  2.57 (SS1) e 62.13 mg VCEAC/100g  $\pm$  0.29 (L1) respectivamente, verifica-se que demonstram uma maior atividade antioxidante, usando para a extração o solvente acetona a 70 % v/v foram superiores mas relativamente semelhantes aos valores apresentados para a extração com o solvente etanol a 70 % v/v, sendo 4.87 mg VCEAC/100g  $\pm$  2.40 (P2), 8.86 mg VCEAC/100g  $\pm$  2.27 (PS2), 126.88 mg VCEAC/100g  $\pm$  0.81 (SS2) e 47.93 mg VCEAC/100g  $\pm$  2.09 (L2).

Segundo Wannes, et al. (2010), a capacidade antioxidante total da flôr de *Myrtus communis* foi de 15.70 mg GAE/100g  $\pm$  2.01 para o solvente etanol a 70 % v/v, sendo bastante inferior ao valor apresentado no estudo com o solvente etanol a 70 % v/v, 47.93 mg VCEAC/100g  $\pm$  2.09 (L2) (Dahmoune, Nayak, Moussi, Remini, & Madani, 2015).

Como verificado na Figura 32, os resultados obtidos mostraram que a semente desidratada (SS) apresentou uma maior atividade antioxidante, quando comparada às restantes partes do fruto, tendo um poder maior capaz de atrasar ou inibir a oxidação de um substrato oxidável.

Segundo Floegel, et al. (2011), que avaliou a capacidade antioxidante total de outros pequenos frutos semelhantes (Tabela 9), 383.50 mg VCEAC/100g  $\pm$  16.00 para o fruto mirtilo e 165.00 mg VCEAC/100g  $\pm$  12.80 para o fruto cereja, demonstram ser bastante superiores ao resultado encontrado para a polpa *in natura* (P), 18.26 mg VCEAC/100g  $\pm$  1.57 (P1).

**Tabela 9** – Comparação da capacidade antioxidante total da murta com diferentes frutos, determinada pelo método DPPH, através de um estudo conduzido por Floegel, et al. (2011)

Frutos	Capacidade antioxidante – DPPH (mg VCEAC/100g do fruto)
Mirtilo	383.50 mg VCEAC/100g $\pm$ 16.00
Cereja	165.00 mg VCEAC/100g $\pm$ 12.80

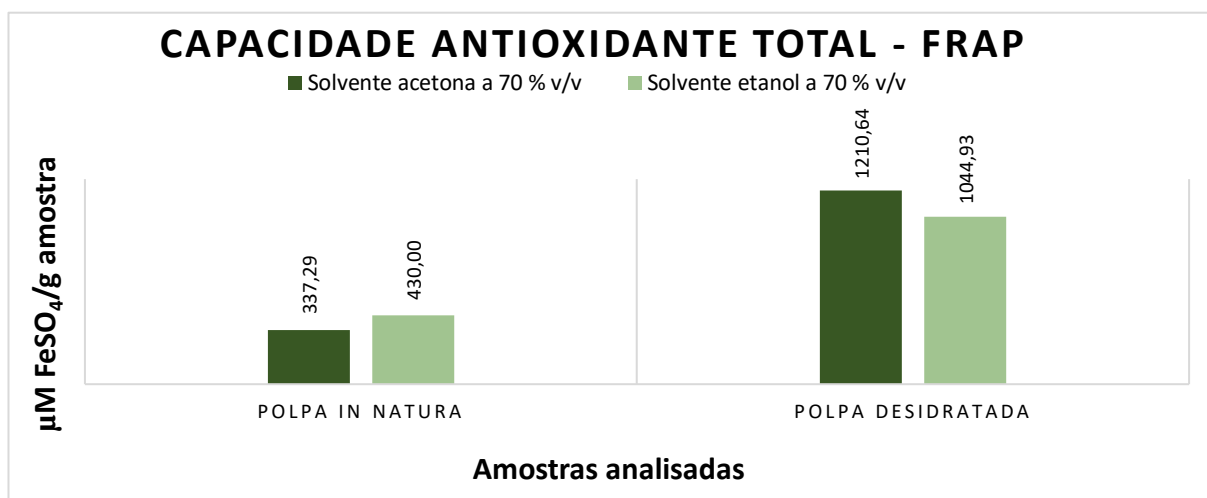
Quanto à folha *in natura* (F), o valor da extração com o solvente acetona a 70 % v/v foi inferior, no entanto, foi também muito próximo ao apresentado com o solvente etanol a 70 % v/v (Figura 32), sendo ele, 67.35 mg VCEAC /100g  $\pm$  1.16 – F1 e 75.53 mg VCEAC/100g  $\pm$  1.26 (F2), respectivamente.

Segundo Wannes, et al. (2010), a capacidade antioxidante total das folhas de *Myrtus communis* foi de 33.67 mg GAE/100g  $\pm$  1.20 para o solvente metanol a 70 % v/v, muito semelhante a Dahmoune, et al. (2015), sendo 38.20 mg GAE/100g  $\pm$  1.08 para o solvente etanol a 70 % v/v. Os valores da literatura foram bastante semelhantes, todavia, o valor apresentado no estudo com o solvente etanol a 70 % v/v foi sensivelmente o dobro, sendo 67.35 mg VCEAC/100g  $\pm$  1.16.

As razões para a diferença dos valores encontrados no estudo referido, em relação ao obtido no presente estudo para a murta, deve-se não somente ao facto de serem frutos com características peculiares e de identidades diferentes, mas também ao seu método de extração e solvente utilizado.

#### 4.2.4. Avaliação da Capacidade antioxidante pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)

O método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) usado foi uma adaptação de Pulido *et al.* (2000), para determinar a capacidade antioxidante total da polpa *in natura* (P) e da polpa desidratada (PS), sendo que os resultados foram expressos em  $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$  de amostra, conforme demonstrado na Figura 33, onde  $\text{FeSO}_4$  – sulfato ferroso.



**Figura 33** – Capacidade Antioxidante Total ( $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$ ) em amostras da Polpa *in natura* (P) e da Polpa desidratada (PS), obtida a partir do método FRAP

O resultado obtido para a polpa *in natura* (P) foi de  $337.29 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 0,00$  (P1) e  $430.00 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 0,00$  (P2), usando o solvente acetona a 70 % v/v e o solvente etanol a 70 % v/v, respectivamente, apresentando resultados muito próximos.

Relativamente à polpa desidratada (PS), os resultados foram de  $1210 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 0.00$  (PS1) e  $1044.93 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 0.01$  (PS2), usando o solvente acetona a 70 % v/v e o solvente etanol a 70 % v/v, respectivamente, apresentando também resultados muito próximos. Contudo, é visível na Figura 33, que a capacidade antioxidante é muito superior na polpa desidratada (PS).

Segundo a literatura que avaliou a capacidade antioxidante total de outros pequenos frutos semelhantes (Tabela 10), duas variedades de amoras, sendo os resultados de  $52.51 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 3.30$  para a amora *Xavante* e  $66.60 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 4.30$  para a amora

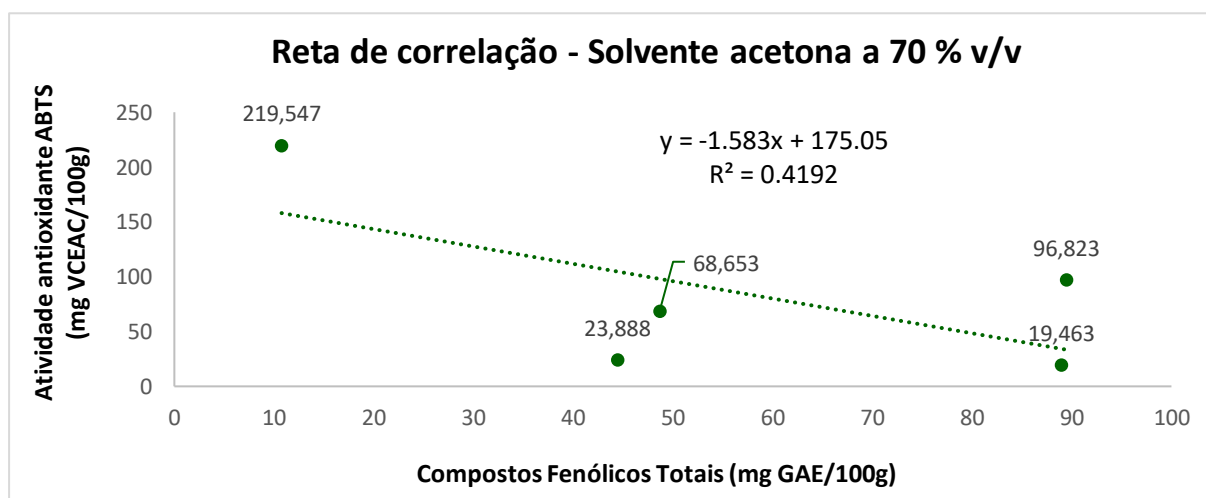
*Cherokee*, demonstraram resultados de atividade antioxidante muitíssimo inferiores ao fruto da murta ( $1044.93 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 0.01$ ) (Denardin, et al., 2015).

**Tabela 10** – Comparação da capacidade antioxidante total da murta com diferentes frutos, determinada pelo método FRAP, através de um estudo conduzido por Denardin, et al. (2015)

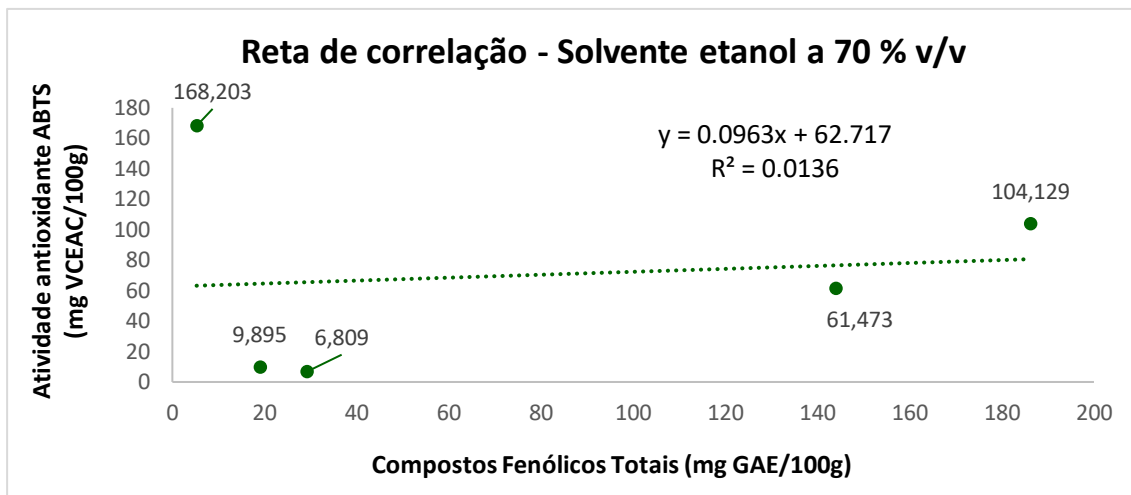
Frutos	Capacidade antioxidante – FRAP (mg VCEAC/100g do fruto)
Mirtos selvagens	34.45 a 57.92 $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$
Mirtos cultivados	7.41 a 13.69 $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$
<i>Amora Xavante</i>	52.51 $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 3.30$
<i>Amora Cherokee</i>	66.60 $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g} \pm 4.30$

#### 4.2.5. Correlação entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total determinada pelos ensaios ABTS, DPPH e FRAP

A correlação entre o teor de compostos fenólicos totais (mg GAE/100g de amostra) e a atividade antioxidante total determinada pelo ensaio ABTS (mg VCEAC/100g) foi obtida pela reta de correlação, usando o solvente acetona a 70 % v/v (Figura 34) e etanol a 70 % v/v (Figura 35), respectivamente.



**Figura 34** – Reta de correlação entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total realizada através do ensaio ABTS, para o solvente acetona a 70 % v/v



**Figura 35** – Reta de correlação entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total realizada através do ensaio ABTS, para o solvente etanol a 70 % v/v

De acordo com o valor encontrado para o coeficiente de determinação do solvente acetona ( $R^2=0.4192$ ), foi obtido o valor do coeficiente de correlação ( $R=0.6474$ ), onde é possível verificar que existe uma correlação positiva entre os valores de compostos fenólicos totais e os valores de atividade antioxidante total obtidos através do método ABTS, contrariamente ao valor encontrado para o coeficiente de determinação do solvente etanol ( $R^2=0.0136$ ), no qual foi também obtido o valor do coeficiente de correlação ( $R=0.1166$ ), onde é possível verificar que existe uma correlação fraca entre os valores de compostos fenólicos totais e os valores de atividade antioxidante total obtidos através do método ABTS.

O método *Folin-Ciocalteu* deteta polifenóis totais, como flavanóis, antocianinas, ácidos fenólicos e taninos, estando apresentados na polpa *in natura* e na folha *in natura*, na sua maioria, taninos e flavonóides, como verificado na Tabela 12, sendo estas as partes de *Myrtus spp.* com valores mais elevados, para o solvente acetona a 70 % v/v e, apenas a folha *in natura* para o solvente etanol a 70 % v/v, como se verifica na correlação.

Os antioxidantes, tais como vitaminas, carotenos e polifenóis, apresentam os mesmos resultados que o método *Folin-Ciocalteu*, mostrando a folha *in natura*, a flôr *in natura* e a semente desidratada com uma maior atividade antioxidante, para ambos os solventes.

A correlação entre o teor de compostos fenólicos totais (mg GAE/100g de amostra) e a atividade antioxidante total (mg VCEAC/100g) determinada pelo ensaio DPPH foi obtida pela reta de correlação, usando o solvente acetona a 70 % v/v (Figura 36) e etanol a 70 % v/v (Figura 37), respectivamente.

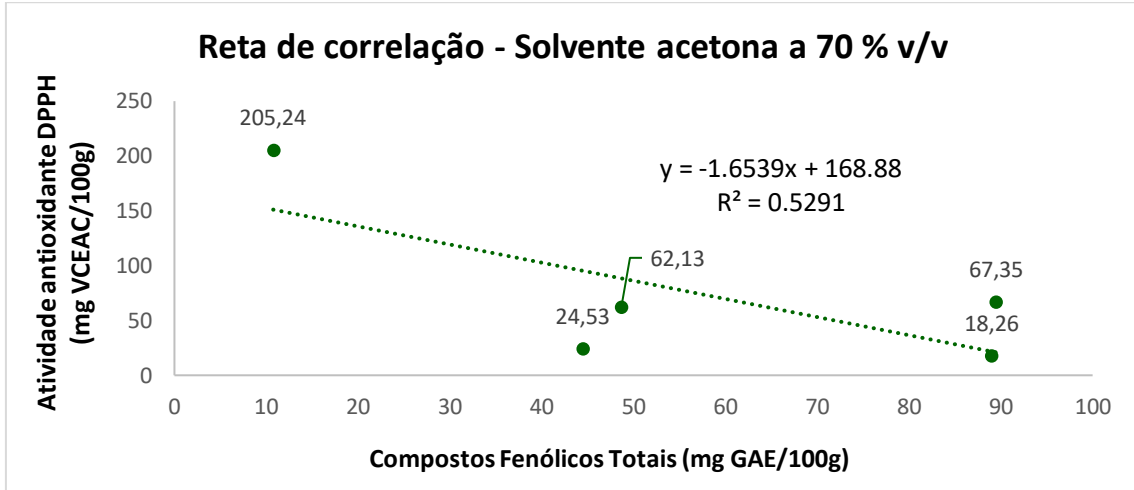


Figura 36 – Reta de correlação entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total realizada através do ensaio DPPH, para o solvente acetona a 70 % v/v

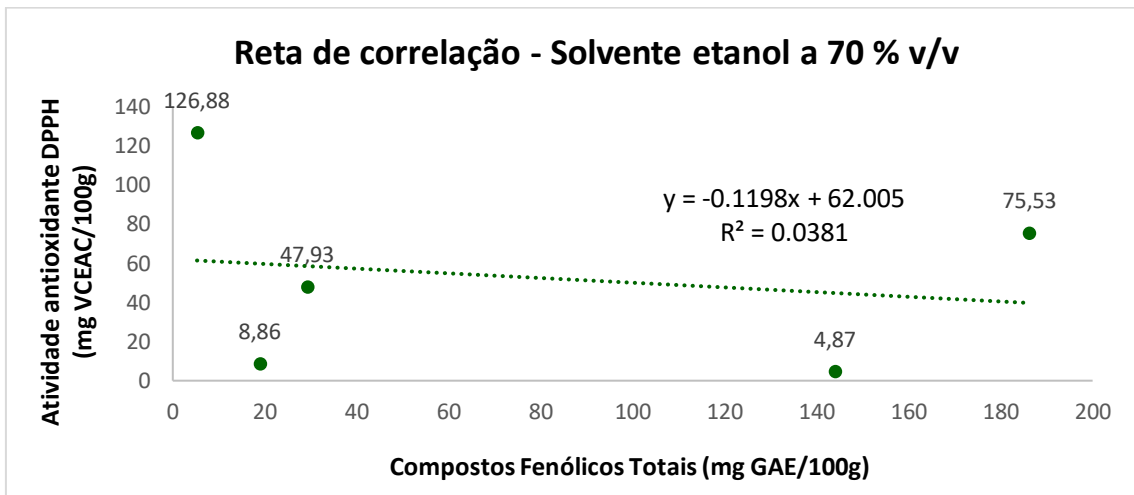


Figura 37 – Reta de correlação entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total realizada através do ensaio DPPH, para o solvente etanol a 70 % v/v

De acordo com o valor encontrado para o coeficiente de determinação do solvente acetona ( $R^2=0.5291$ ), foi obtido o valor do coeficiente de correlação ( $R=0.7274$ ), onde é possível verificar que existe uma correlação positiva forte entre os valores de compostos fenólicos totais e os valores de atividade antioxidante pelo método DPPH,

contrariamente ao valor encontrado para o coeficiente de determinação do solvente etanol ( $R^2=0.0381$ ), no qual foi também obtido o valor do coeficiente de correlação ( $R=0.1952$ ), onde é possível verificar que existe uma correlação muito fraca entre os valores de compostos fenólicos totais e os valores de atividade antioxidante total obtidos através do método DPPH.

Tal como nos métodos anteriores (*Folin-Ciocalteu* e ABTS), apresentando os métodos ABTS e DPPH um mecanismo de reação de oxidação-redução semelhante, também os resultados foram semelhantes, revelando uma maior atividade antioxidante para a folha *in natura*, a flôr *in natura* e a semente desidratada, com a mesma relação e proporção para ambos os solventes.

A correlação entre o teor de compostos fenólicos totais (mg GAE/100g de amostra) e a atividade antioxidante total determinada pelo ensaio FRAP (mg  $\text{FeSO}_4$ /100g), não foi possível calcular.

Abaixo encontra-se a Tabela 11 com a compilação de todos os métodos e os seus respectivos valores.

**Tabela 11** – Compilação dos resultados do Teor de compostos fenólicos totais determinado via método *Folin-Ciocalteu* e atividade antioxidante total pelos métodos ABTS e DPPH, com a extração dos solventes acetona a 70 % v/v e etanol a 70 % v/v

<i>Myrtus spp.</i>	GAE (mg/100g) Fenólicos Totais		VCEAC (mg/100g) ABTS		VCEAC (mg/100g) DPPH	
	Acetona 70 % v/v	Etanol 70 % v/v	Acetona 70 % v/v	Etanol 70 % v/v	Acetona 70 % v/v	Etanol 70 % v/v
<b>Polpa <i>in natura</i> (P)</b>	88.96 ± 0.01	29.21 ± 0.01	19.46 ± 0.72	6.81 ± 0.57	18.26 ± 1.57	4.87 ± 2.40
<b>Polpa desidratada (PS)</b>	44.45 ± 0.01	18.95 ± 0.01	23.89 ± 1.19	9.90 ± 0.98	24.53 ± 0.98	8.86 ± 2.27
<b>Semente desidratada (SS)</b>	10.75 ± 0.00	5.26 ± 0.03	219.55 ± 0.60	168.20 ± 0.50	205.24 ± 2.57	126.88 ± 0.81
<b>Folha <i>in natura</i> (F)</b>	89.46 ± 0.01	186.19 ± 0.07	36.82 ± 0.79	104.13 ± 0.40	67.35 ± 1.16	75.53 ± 1.26
<b>Flôr <i>in natura</i> (L)</b>	48.67 ± 0.01	143.99 ± 0.03	68.65 ± 1.31	61.47 ± 1.28	62.13 ± 0.29	4.93 ± 2.09

Os resultados obtidos revelaram diferenças significativas entre os tipos de solventes, verificando-se que, os valores para o coeficiente de determinação com o solvente

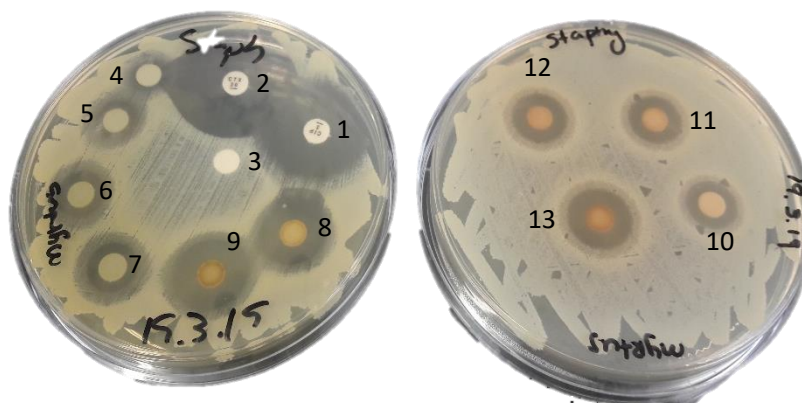
acetona a 70 % v/v foi mais forte comparativamente ao valor para o coeficiente de determinação com o solvente etanol a 70 % v/v.

Quanto aos métodos, ambos apresentaram uma correlação forte com os compostos fenólicos totais (*Folin-Ciocalteu*) existindo, no entanto, uma correlação mais forte com os valores de atividade antioxidante obtidos através do método DPPH.

### 4.3. Avaliação da Atividade Antibacteriana

Os resultados obtidos do método de difusão em disco permitiram verificar que o meio de cultura se manteve estéril nas placas de Petri não inoculadas e que as estirpes bacterianas se desenvolveram cobrindo a superfície das placas inoculadas.

A atividade antibacteriana da polpa, das sementes e das folhas de *Myrtus spp.* em etanol a 70 % v/v, foi testada com três estirpes bacterianas selecionadas, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, pelo método de difusão em disco, e estão representadas nas Figuras 38, 39 e 40.



**Figura 38** – Atividade antibacteriana da polpa, das sementes e das folhas de *Myrtus spp.* na estirpe *Staphylococcus aureus*

**Legenda:** 1 – Antibiótico CIP 5 (controlo positivo), 2 – Antibiótico CT 10 (controlo positivo), 3 – 4.00 mg de etanol a 70 % v/v (controlo negativo), 4 – 1.00 mg de extrato de sementes de *Myrtus spp.*, 5 – 2.00 mg de extrato de sementes de *Myrtus spp.*, 6 – 3.00 mg de extrato de sementes de *Myrtus spp.*, 7 – 4.00 mg de extrato de sementes de *Myrtus spp.*, 8 – 1.00 mg de extrato de folhas de *Myrtus spp.*, 9 – 2.00 mg de extrato de

folhas de *Myrtus spp.*, 10 – 1.00 mg de extrato de polpa de *Myrtus spp.*, 11 – 2.00 mg de extrato de polpa de *Myrtus spp.*, 12 – 3.00 mg de extrato de polpa de *Myrtus spp.*, 13 – 4.00 mg de extrato de polpa de *Myrtus spp.*

As medições dos halos de inibição referentes à estirpe *Staphylococcus aureus* estão representadas na Tabela 12.

**Tabela 12** – Avaliação da atividade antibacteriana utilizados na estirpe *Staphylococcus aureus*

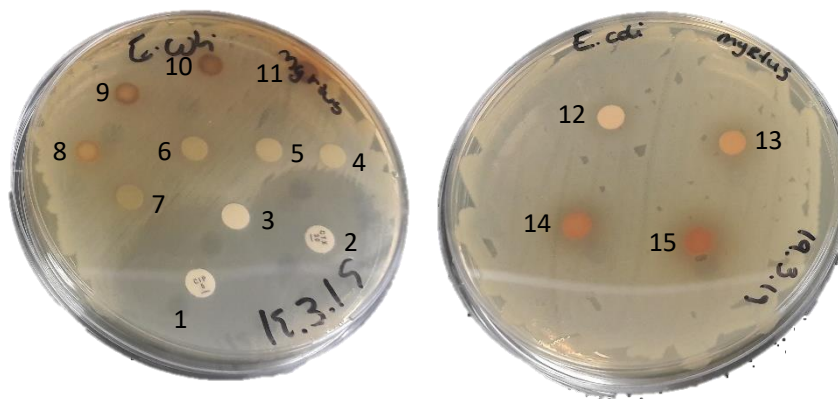
Extrato	Volume (mg)	Halo de inibição (mm)
<b>Polpa de <i>Myrtus spp.</i></b>	1.00	10.00
	2.00	11.00
	3.00	12.00
	4.00	13.00
<b>Sementes de <i>Myrtus spp.</i></b>	1.00	8.00
	2.00	10.00
	3.00	11.00
	4.00	12.00
<b>Folhas de <i>Myrtus spp.</i></b>	1.00	12.00
	2.00	14.00

Segundo a literatura, a atividade antibacteriana de 6.00 mg de extrato das folhas de *Myrtus communis* na estirpe *Staphylococcus aureus*, foi de 14.00 mm, usando como solvente o metanol 70 % v/v (Aleksic & Knezevic, 2014), igual à atividade antibacteriana de 2.00 mg de extrato das folhas de *Myrtus spp.* na estirpe *Staphylococcus aureus*, usando como solvente o etanol 70 % v/v.

As medições dos halos de inibição referentes aos antibióticos utilizados Ciprofloxacina (CIP 5) e Cefotaxima (CTX 30) na estirpe *Staphylococcus aureus*, encontram-se referidas na Tabela 13.

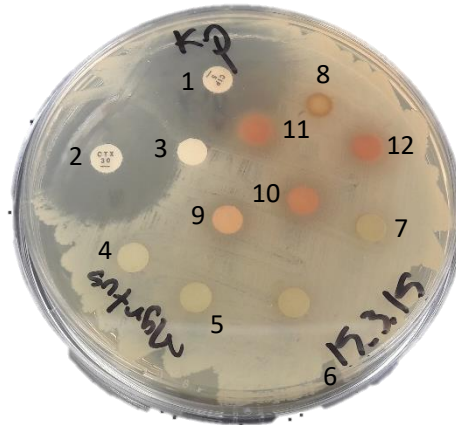
**Tabela 13** – Avaliação da atividade antibacteriana dos antibióticos utilizados na estirpe *Staphylococcus aureus*

Antibióticos	Halo de inibição (mm)
Ciprofloxacina (CIP 5)	26.00
Cefotaxima (CTX 30)	30.00



**Figura 39** – Atividade antibacteriana da polpa, das sementes e das folhas de *Myrtus spp.* na estirpe *Escherichia coli*

**Legenda:** 1 – Antibiótico CIP 5 (controlo positivo), 2 – Antibiótico CT 10 (controlo positivo), 3 – 4.00 mg de etanol a 70 % v/v (controlo negativo), 4 – 1.00 mg de extrato de sementes de *Myrtus spp.*, 5 – 2.00 mg de extrato de sementes de *Myrtus spp.*, 6 – 3.00 mg de extrato de sementes de *Myrtus spp.*, 7 – 4.00 mg de extrato de sementes de *Myrtus spp.*, 8 – 1.00 mg de extrato de folhas de *Myrtus spp.*, 9 – 2.00 mg de extrato de folhas de *Myrtus spp.*, 10 – 3.00 mg de extrato de folhas de *Myrtus spp.*, 11 – 4.00 mg de extrato de folhas de *Myrtus spp.*, 12 – 1.00 mg de extrato de polpa de *Myrtus spp.*, 13 – 2.00 mg de extrato de polpa de *Myrtus spp.*, 14 – 3 mg de extrato de polpa de *Myrtus spp.*, 15 – 4 mg de extrato de polpa de *Myrtus spp.*



**Figura 40** – Atividade antibacteriana da polpa, das sementes e das folhas de *Myrtus spp.* na estirpe *Klebsiella pneumoniae*

**Legenda:** 1 – Antibiótico CIP 5 (controlo positivo), 2 – Antibiótico CT 10 (controlo positivo), 3 – 4.00 mg de etanol a 70 % v/v (controlo negativo), 4 – 1.00 mg de extrato de sementes de *Myrtus spp.*, 5 – 2.00 mg de extrato de sementes de *Myrtus spp.*, 6 – 3.00 mg de extrato de sementes de *Myrtus spp.*, 7 – 4.00 mg de extrato de sementes de *Myrtus spp.*, 8 – 1.00 mg de extrato de folhas de *Myrtus spp.*, 9 – 1.00 mg de extrato de polpa de *Myrtus spp.*, 10 – 2.00 mg de extrato de polpa de *Myrtus spp.*, 11 – 3.00 mg de extrato de polpa de *Myrtus spp.*, 12 – 4.00 mg de extrato de polpa de *Myrtus spp.*

Através da análise destes resultados, é possível verificar que existem halos de inibição associados ao extrato de etanol a 70 % v/v do fruto, encontrados indícios de atividade antibacteriana de *Myrtus spp.* apenas com *Staphylococcus aureus*.

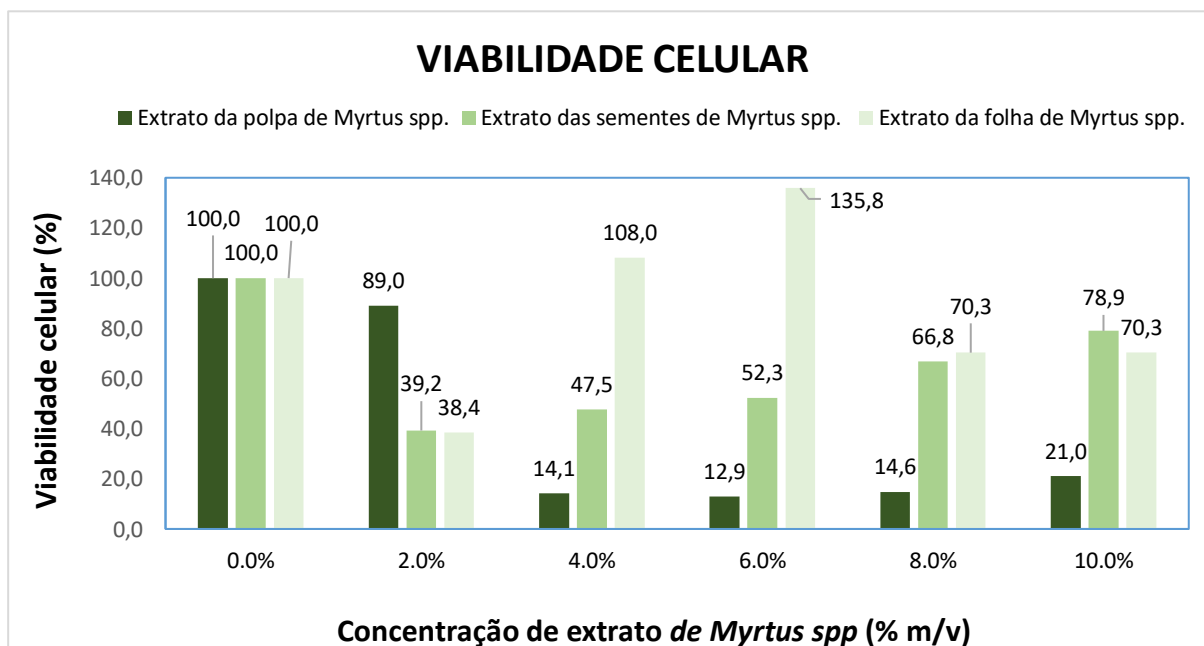
#### 4.4. Teste de Viabilidade Celular

A avaliação da toxicidade dos extratos da semente, polpa e folha de *Myrtus spp.* sobre a viabilidade celular das células CACO-2 foi realizada. Procedeu-se à incubação das células com os extratos em 5 concentrações diferentes, para que fosse possível avaliar a toxicidade dos extratos sobre a viabilidade celular das células CACO-2 após seis horas de incubação (Tabela 14).

**Tabela 14** – Resultados de viabilidade celular das células CACO-2, submetidas ao efeito dos extratos da polpa, semente e folha de *Myrtus spp.*, em diferentes concentrações, avaliados através do ensaio MTT após seis horas de incubação

Concentração % (m/v)	Viabilidade celular da polpa de <i>Myrtus spp.</i> (%)	Viabilidade celular da semente de <i>Myrtus spp.</i> (%)	Viabilidade celular da folha de <i>Myrtus spp.</i> (%)
<b>0.00 (controlo)</b>	100.00 ± 0.32	100.00 ± 0.32	100.00 ± 0.32
<b>2.00</b>	89.00 ± 0.10	39.20 ± 0.13	38.40 ± 0.12
<b>4.00</b>	14.10 ± 0.24	47.50 ± 0.09	108.00 ± 0.49
<b>6.00</b>	12.90 ± 0.16	52.30 ± 0.11	135.80 ± 0.34
<b>8.00</b>	14.60 ± 0.12	66.80 ± 0.10	70.30 ± 0.26
<b>10.00</b>	21.00 ± 0.08	78.90 ± 0.14	70.30 ± 0.07

Os resultados obtidos para o teste de viabilidade celular das células CACO-2, a partir de diferentes concentrações – 2.00, 4.00, 6.00, 8.00 e 10.00 (%/m/v), estão apresentados na Figura 41, representando a percentagem da viabilidade celular em função das diferentes concentrações dos extratos, onde é possível verificar que, para concentrações mais elevadas de extrato conduziram a uma menor viabilidade celular.



**Figura 41** – Gráfico dos resultados de viabilidade celular das células CACO-2, submetidas ao extrato de polpa de *Myrtus spp.*, ao extrato das sementes de *Myrtus spp.* e ao extrato da folha de *Myrtus spp.*, em diferentes concentrações, avaliados através do ensaio MTT, após 6 horas de incubação

Conforme exposto na Figura 41, as concentrações de 4.00 % m/v ( $14.10 \pm 0.24$ ), 6.00 % m/v ( $12.90 \pm 0.16$ ) e 8.00 % m/v ( $14.60 \pm 0.12$ ) e 10.00 % m/v ( $21.00 \pm 0.08$ ) foram as que apresentaram menores níveis de viabilidade celular, referentes ao extrato da polpa de *Myrtus spp.*, sendo a concentração de 2.00 % m/v ( $89.00 \pm 0.10$ ) com maior nível de viabilidade celular.

Relativamente ao extrato das sementes de *Myrtus spp.* e ao extrato da folha de *Myrtus spp.*, a concentração de 2.00 % m/v ( $39.20 \pm 0.13$  e  $38.40 \pm 0.12$ ) representa o menor nível de viabilidade celular em ambos. Quanto aos níveis mais altos, para o extrato das sementes de *Myrtus spp.* são as concentrações de 8.00 % m/v ( $66.80 \pm 0.10$ ) e 10.00 % m/v ( $78.90 \pm 0.14$ ) e, para o extrato das folhas de *Myrtus spp.* são as concentrações de 4.00 % m/v ( $108.00 \pm 0.49$ ) e 6.00 % m/v ( $135.80 \pm 0.34$ ).

Quanto ao extrato sob concentração mais alta (10.00 % m/v), demonstrou não ser o que apresenta maior toxicidade em todos os extratos, apenas no extrato das sementes de *Myrtus spp.* ( $78.90 \pm 0.14$ ). Aquando comparado com a concentração inferior, de 8.00 % m/v, os valores de viabilidade celular apresentam-se semelhantes.

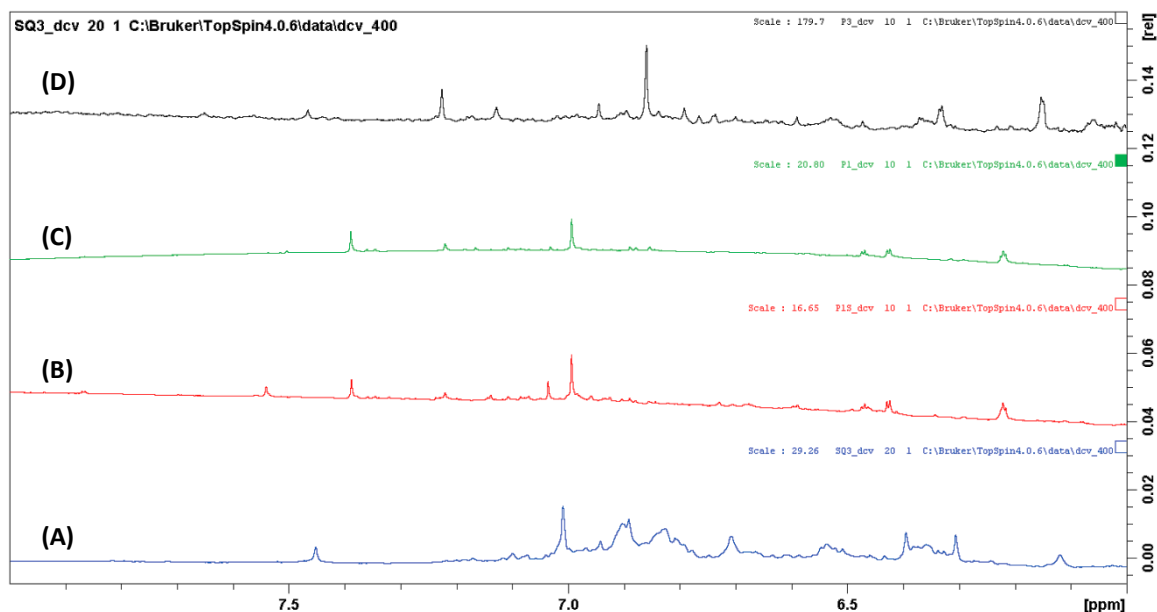
Neste caso, sob uma perspectiva futura, a realização de um maior número de ensaios, aliado a uma gama maior de concentrações, seria fundamental como forma de clarificar os resultados, de acordo com o devido comportamento celular. De um modo geral, a partir dos resultados obtidos, é possível inferir que, concentrações superiores a 4.00 % (m/v) são celularmente benéficas, já que apresentaram níveis de viabilidade celular maiores que 70 % (à excepção do extrato das sementes de *Myrtus spp.*), sendo este um parâmetro apreciável para estudos futuros e para a elaboração de produtos destinados à alimentação humana.

## 4.5. Ensaio de Ressonância Magnética Nuclear

A análise das amostras de extratos de murta por espectroscopia de ressonância nuclear, permite proceder à identificação da presença de alguns grupos aromáticos, do tipo polifenol, em extratos de polpa desidratada em acetona 70 % v/v, de polpa em acetona 70 % v/v e em etanol 70 % v/v, de semente desidratada em etanol 70 % v/v, de flôr em

acetona a 70 % v/v e em etanol a 70 % v/v e, de folha em acetona a 70 % v/v e em etanol a 70 % v/v.

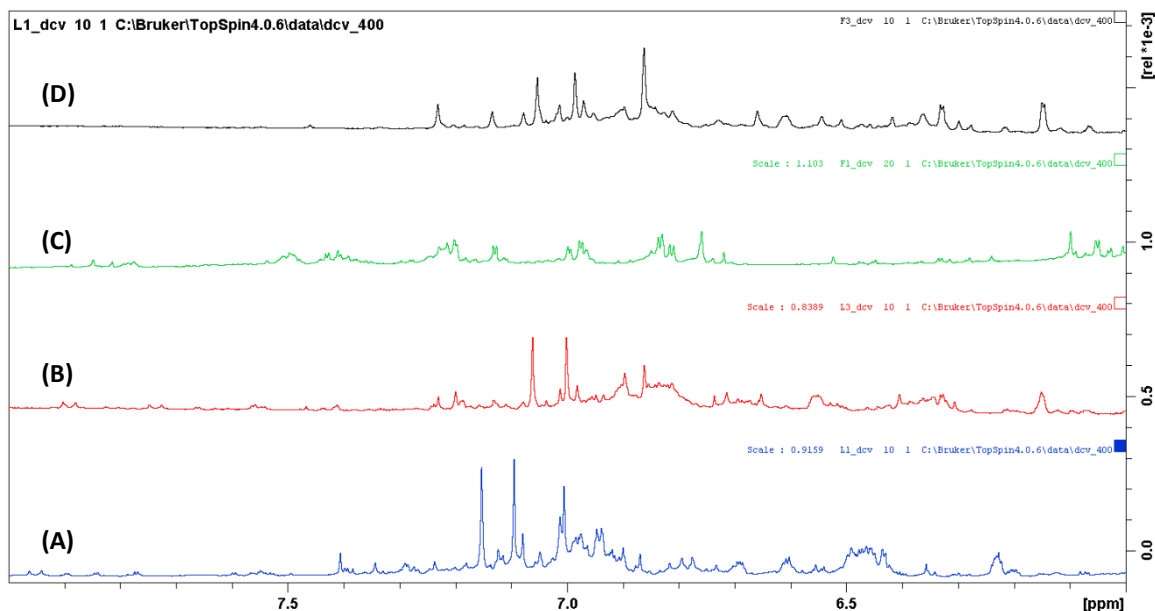
A Figura 42 apresenta em destaque a região de sinais associada a prótons constituintes de grupos aromáticos (6.00 a 8.00 ppm) do espectro 1D 1H NMR de amostra de extratos.



**Figura 42** – Espectros 1D 1H RMN de extratos de *Myrtus spp.* A figura apresenta a região do espectro associada aos sinais provenientes de grupos aromáticos (6.00 a 8.00 ppm) para extratos de semente desidratada em etanol 70 % v/v (A); polpa desidratada em acetona 70 % v/v (B); polpa em acetona 70 % v/v (C) e polpa em etanol 70 % v/v (D)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear recolhidos para extratos de amostras de *Myrtus spp.*, nomeadamente sob a forma de semente desidratada em etanol a 70 % v/v, polpa desidratada em acetona a 70 % v/v, polpa em acetona a 70 % v/v e polpa em etanol a 70 % v/v apresentam-se, sob expansão da região de sinais provenientes de prótons localizados em grupos aromáticos na Figura 42. O extrato de amostra de semente desidratada (Figura 42.A) apresenta bastantes sinais na região dos grupos aromáticos, que podem ser atribuídos a ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido 3-hidroxi-4-metoxicinâmico, ácido sináptico, ácido vanílico e tirosol (Christophoridou & Dais, 2009). Adicionalmente, os espectros de polpa desidratada (Figura 42.B) e polpa (Figura 42.C) em acetona a 70 % v/v permitem identificar um mesmo perfil com sinais associados ao ácido cumárico, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido siríngico, tirosol e hidroxitirosol (Figura 42.B e Figura 42.C). O espectro de extrato de polpa em acetona a 70 % v/v, evidencia, no entanto, a presença de uma menor quantidade de ácido cumárico e ácido

cafeico. Curiosamente, extratos de polpa em etanol a 70 % v/v (Figura 42.D), apresentam outro perfil de sinais, onde é possível identificar a presença de ácido gentístico.



**Figura 43** – Espectros 1D 1H RMN de extratos de *Myrtus spp.* A figura apresenta a região do espectro associada aos sinais provenientes de grupos aromáticos (6.0 a 8.0 ppm) para extratos de flôr em acetona a 70 % v/v (A); flôr em etanol a 70 % v/v (B); folha em acetona a 70 % v/v (C) e folha em etanol a 70 % v/v (D)

De igual modo, a análise por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de extratos de flôr e folha *Myrtus spp.*, em acetona a 70 % v/v e etanol a 70 % v/v (Figura 43) permitiu proceder à identificação de mais compostos fenólicos em outras partes da planta (Christophoridou & Dais, 2009).

Extratos da flôr de murta em acetona a 70 % v/v (Figura 43.A) apontam para a presença de ácido cumárico, ácido cafeico e tirosol, enquanto que extratos em etanol a 70 % v/v (Figura 43.B) evidenciam a presença de ácido hidroxifenilacético. Espectros de folhas de murta, apresentam perfil essencialmente idêntico e apontam para a presença de ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido siríngico e ácido gentístico, extraídos mais eficazmente quando em meio alcoólico (etanol a 70 % v/v).

Segundo o estudo de Chidouh et al. (2014), o espectro de 1D 1H RMN indicou sinais característicos em extratos de sementes de *Myrtus communis L.* em etanol a 70 % v/v, para a presença de polissacarídeos e monossacarídeos, entre os quais ácido urónico, ácido galacturónico e ácido glucurónico.

Através deste ensaio, foi possível identificar algumas das moléculas que podem contribuir para o teor de compostos polifenólicos totais e para a capacidade antioxidante, identificados através dos métodos químicos por *Folin-Ciocalteu*, *ABTS*, *DPPH* e *FRAP*.

## 4.6. Estudo da Viabilidade e Incorporação de *Myrtus spp.* em produtos alimentares

### 4.6.1. Em Enchido/chouriço (como conservante natural)

Após o período de fumeiro, verificou-se: um odor mais intenso a pimentão doce (condimento) no chouriço sem conservantes e no chouriço com nitrato de potássio (conservante químico) e uma presença acentuada de fungos nas aberturas do chouriço com incorporação de *Myrtus spp.*, como se pode verificar na Figura 44.

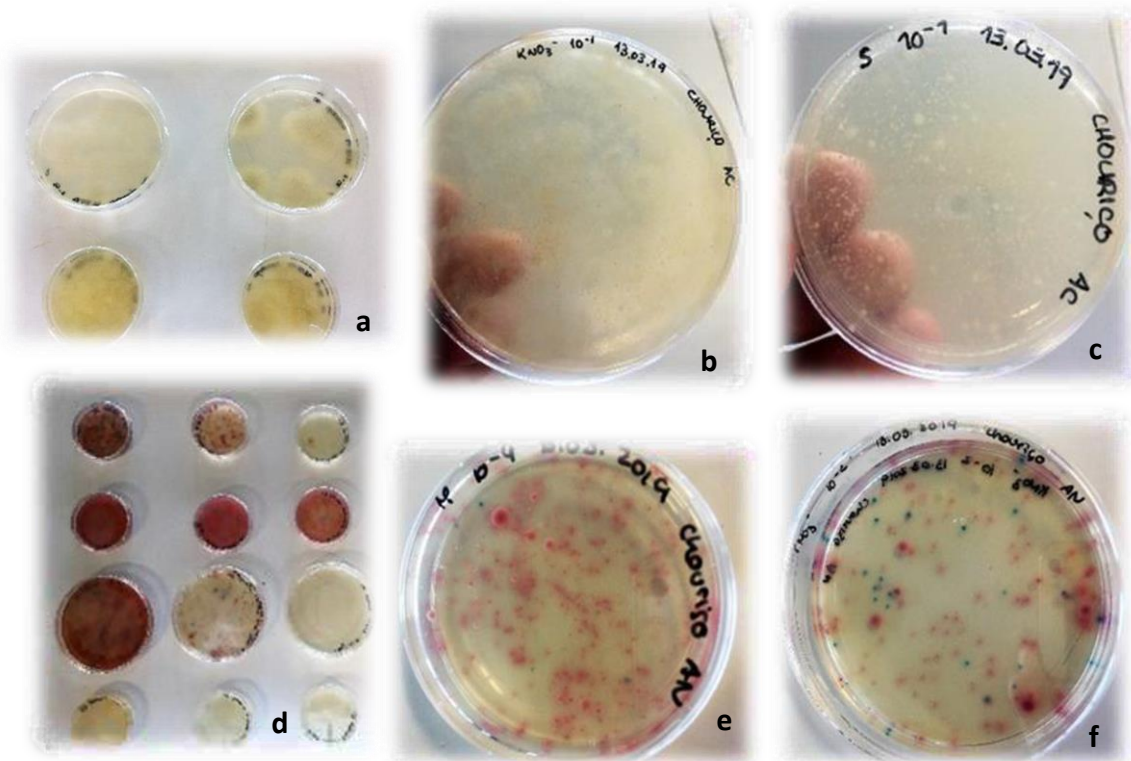
Contudo, o chouriço encontrava-se maturado e com um aspecto agradável.



**Figura 44** – Resultado do produto final do enchido com incorporação de *Myrtus spp.* após a fumagem

Foi depois realizado o teste de controlo de qualidade, no qual se verificou que: em todas as amostras foram detectadas bactérias e fungos (Figura 45), nas diluições mais baixas e também na amostra em que foi utilizado o conservante químico; no meio específico para a detecção de coliformes e *E. coli*, a sua presença foi detectada em todas as amostras que utilizaram os conservantes (Figura 45 (d)); as bactérias de *E. coli* aparecem

com uma tonalidade azul e o seu nº é diminuto (Figura 45 (e) e Figura 45 (f)) e, o conservante natural de *Myrtus spp.*, quando comparado com o conservante químico ( $KNO_3$ ), apresenta potencial controlo microbiano.



**Figura 45** – Identificação geral de bactérias e fungos (a), identificação das bactérias ao pormenor (b), identificação dos fungos ao pormenor (c), Identificação de coliformes e *E.coli* em todas as amostras de enchidos (d), enchido com murtinho (e), enchido com nitrato de potássio (f)

Embora se identifique crescimento microbiano de bactérias e fungos, é possível identificar efeito protetor de *Myrtus spp.* apresentando este um controlo microbiano semelhante ao do nitrato de potássio (conservante químico).

A ser utilizado no futuro em produtos cárneos, as plantas podem assim vir a ser usadas como conservantes naturais. Contudo, há que realizar mais testes de controlo (concentração de extratos, secagem e conservação) de modo a aperfeiçoar cada vez mais o processo de produção para que não ocorra desenvolvimento de nenhum microrganismo prejudicial.

Alguns cuidados a ter na optimização do fabrico de modo a reduzir a carga de fungos e de coliformes seriam: cortar a carne em pedaços mais pequenos, promover a fermentação da carne durante algum tempo antes de encher a tripa, reduzir as folhas a

pó de modo a que a sua presença não seja detectada no enchido aquando o corte e furar a tripa aquando a fumagem.

#### 4.6.2. Em Tempero/vinagre

O produto final (Figura 46) contém a incorporação do fruto e de folhas de *Myrtus spp.* em vinagre de sidra e em vinagre de vinho branco, que foi comparado com o vinagre controlo. Foram analisados parâmetros físico-químicos como o teor de sólidos solúveis (% °Brix), o teor alcoólico (% v/v) e a acidez. E avaliado o efeito sobre o conteúdo fenólico total pelo método *Folin-Ciocalteu* e a capacidade antioxidante total pelos métodos ABTS e DPPH.



**Figura 46** – Produto inicial de vinagre de sidra (a) vs produto final de vinagre de sidra com incorporação do fruto de *Myrtus spp.* (b)

A quantificação dos sólidos solúveis (°Brix) do vinagre de murta foi determinado com o auxílio de um refractómetro digital modelo HI 96813 e o pH com o auxílio de um potenciómetro de bancada *Hanna* modelo pH 212.

Foram também realizadas análises a um vinagre de sidra (VS) e um vinagre de vinho branco (VB), ambos de fabricação nacional, que foram usados como controlo (Tabela 15). As análises foram realizadas em triplicado.

**Tabela 15** – Resultados de pH e °Brix dos vinagres analisados

<b>Amostra</b>	<b>pH (a 22,7 °C)</b>	<b>% °Brix (a 22,3 °C)</b>
<b>Vinagre de sidra controlo</b>	3.13 ± 0.01	4.03 ± 0.12
<b>Vinagre de sidra com incorporação do fruto de <i>Myrtus spp.</i></b>	3.10 ± 0.01	7.00 ± 0.01
<b>Vinagre de sidra com incorporação de folhas de <i>Myrtus spp.</i></b>	2.81 ± 0.01	4.47 ± 0.15
<b>Vinagre de vinho branco controlo</b>	2.64 ± 0.01	4.00 ± 0.01
<b>Vinagre de vinho branco com incorporação do fruto de <i>Myrtus spp.</i></b>	3.16 ± 0.01	6.63 ± 0.06

De acordo com os resultados presentes na Tabela 15, o valor obtido para a acidez é bastante semelhante para todos os vinagres, sendo todos ácidos. O valor de pH obtido para o fruto de murta foi de  $5.25 \pm 0.01$  (valor obtido a partir das análises prévias), verificando-se que, com a adição do fruto durante o processo de produção de vinagre, o resultado foi influenciado, tornando o produto mais ácido.

Quanto ao teor de sólidos solúveis (% °Brix), tanto o vinagre de sidra com incorporação do fruto de *Myrtus spp.* (VSM) como o vinagre de vinho branco também com incorporação do fruto de *Myrtus spp.* (VBM), apresentaram valores muito próximos, de  $7.00 \% \pm 0.01$  e  $6.63 \% \pm 0.06$ , respectivamente. Já o vinagre de sidra com incorporação de folhas de *Myrtus spp.* (VSF), apresenta igual teor de sólidos solúveis que ambos os vinagres de controlo.

Os frutos de murta utilizados apresentaram um valor de °Brix reduzido de 1.80 % (valor obtido a partir das análises prévias), que aumentou no processo de produção de vinagre, verificando-se que, a adição do fruto de murta teve efeito significativo para os atributos analisados.

#### **4.6.2.2. Quantificação dos compostos fenólicos totais**

A determinação do teor de compostos fenólicos totais do vinagre foram efetuados através do método *Folin-Ciocalteu* (4.2.1.).

Foram também realizadas análises a um vinagre de sidra (VS) e um vinagre de vinho branco (VB), ambos de fabricação nacional, que foram usados como controlo (Tabela 16). As análises foram realizadas em triplicado.

**Tabela 16** – Resultados dos métodos de *Folin-Ciocalteu* dos vinagres analisados

<b>Amostra</b>	<b>Teor total de compostos fenólicos (mg GAE/100g de fruto)</b>
<b>Vinagre de sidra controlo</b>	125.31 ± 0.22
<b>Vinagre de sidra com incorporação do fruto de <i>Myrtus spp.</i></b>	227.45 ± 0.01
<b>Vinagre de sidra com incorporação de folhas de <i>Myrtus spp.</i></b>	495.73 ± 0.02
<b>Vinagre de vinho branco controlo</b>	79.71 ± 0.01
<b>Vinagre de vinho branco com incorporação do fruto de <i>Myrtus spp.</i></b>	248.49 ± 0.09

Ambos os vinagres de controlo apresentaram um teor de compostos fenólicos totais bastante inferiores aos com incorporação de *Myrtus spp.*, sendo o vinagre de sidra com incorporação de folhas de *Myrtus spp.*, bastante superiores aos vinagres com incorporação do fruto de *Myrtus spp.*

A folha *in natura* foi a que apresentou o valor mais alto de teor de compostos fenólicos totais, de 89.46 mg GAE/100g de fruto ± 0.01 e 186.19 mg GAE/100g de fruto ± 0.07, para o solvente acetona a 70 % v/v e etanol a 70 % v/v, respectivamente, aquando comparação com as restantes partes do fruto.

Segundo um estudo de *Mansour, et al.* (2017), a determinação dos compostos fenólicos da infusão obtida das folhas secas de *Myrtus nivellei*, consumidas como chá na região do Saara, foi de 102.6 mg GAE/100g de fruto, valor bastante inferior comparado ao estudado.

### 4.6.2.3. Capacidade Antioxidante – ABTS e DPPH

A capacidade antioxidante dos vinagres foi determinada através dos ensaios ABTS (4.2.2.) e DPPH (4.2.3.). Os resultados foram expressos em mg VCEAC/100 g de amostra. Foram também realizadas análises a um vinagre de sidra (VS) e um vinagre de vinho branco (VB), ambos de fabricação nacional, que foram usados como controlo (Tabela 17). As análises foram realizadas em triplicado.

**Tabela 17** – Resultados dos métodos de ABTS e DPPH dos vinagres analisados

Amostra	ABTS (mg/VCEAC/1g amostra)	DPPH (mg/VCEAC/1g amostra)
Vinagre de sidra controlo	2.11 ± 1.06	9.71 ± 0.21
Vinagre de sidra com incorporação do fruto de <i>Myrtus spp.</i>	15.91 ± 1.06	16.84 ± 2.19
Vinagre de sidra com incorporação de folhas de <i>Myrtus spp.</i>	4.43 ± 0.82	14.59 ± 0.43
Vinagre de vinho branco controlo	7.07 ± 1.04	4.00 ± 1.26
Vinagre de vinho branco com incorporação do fruto de <i>Myrtus spp.</i>	21.82 ± 1.56	17.81 ± 0.63

Relativamente à determinação da capacidade antioxidante total através do método ABTS, o vinagre de sidra com incorporação do fruto de *Myrtus spp.* e o vinagre de vinho branco com incorporação do fruto de *Myrtus spp.* são os que apresentam valores de capacidade antioxidante total mais elevados, de 15.91 mg VCEAC/100 g ± 1.06 e 21.82 mg VCEAC/100 g ± 1.56, respectivamente.

Relativamente à determinação da capacidade antioxidante total, através do método DPPH, os resultados encontrados foram os esperados, uma vez que o vinagre de sidra com incorporação do fruto de *Myrtus spp.* e o vinagre de vinho branco com incorporação do fruto de *Myrtus spp.*, foram os que apresentaram valores de capacidade antioxidante total mais elevados, de 16.84 mg VCEAC/100 g ± 2.19 e 17.81 mg VCEAC/100 g ± 0.63, respectivamente, assim como no método ABTS.

Em ambos os métodos, os valores dos vinagres controlo foram bastante inferiores aos com incorporação de *Myrtus spp.*, revelando pouca atividade antioxidante.

A polpa *in natura* não foi a que apresentou o valor mais alto de capacidade antioxidante total, de 19.46 mg GAE/100g de fruto  $\pm$  0.72 e 6.81 mg GAE/100g de fruto  $\pm$  0.57, para o solvente acetona a 70 % v/v e etanol a 70 % v/v, do método ABTS e, de 18.26 mg GAE/100g de fruto  $\pm$  15.68 e 4.87 mg GAE/100g de fruto  $\pm$  2.40, para o solvente acetona a 70 % v/v e etanol a 70 % v/v, do método DPPH, respectivamente. No entanto, aquando a incorporação em vinagre, foi a que revelou melhores resultados.

### 4.6.3. Em Cerveja artesanal

O produto final (Figura 47), uma cerveja artesanal de *Myrtus spp.* com um sabor amargo suave e delicado, foi obtido após o período de fermentação do segundo estágio. Foram analisados parâmetros físico-químicos como o teor de sólidos solúveis (% °Brix), o teor alcoólico (% v/v), a acidez e, avaliado o efeito sobre o conteúdo fenólico total pelo método *Folin-Ciocalteu* e a capacidade antioxidante total pelos métodos ABTS e DPPH.



**Figura 47** – Produto final da cerveja artesanal de *Myrtus spp.*

#### 4.6.3.1. Teor alcoólico, Sólidos solúveis totais e Acidez

Para a determinação do teor alcoólico, foi realizado o mesmo método que para a quantificação dos sólidos solúveis (3.2.8.), tendo-se procedido à leitura do índice de refração em triplicado. O teor alcoólico e °Brix da cerveja de murta foram determinados com o auxílio de um refractómetro digital modelo HI 96813 e o pH com o auxílio de um potenciómetro de bancada *Hanna* modelo pH 212.

Foram também realizadas análises a uma cerveja tipo *Ale* de fabricação nacional, que foi usada como controlo (Tabela 18). As análises foram realizadas em triplicado.

**Tabela 18** – Resultados de pH e °Brix das cervejas analisadas

Amostra	% v/v (a 23,0 °C)	% °Brix (a 22,3 °C)	pH (a 22,7 °C)
<b>Cerveja controlo</b>	3.10 ± 0.01	5.63 ± 0.06	4.40 ± 0.01
<b>Cerveja de <i>Myrtus spp.</i></b>	1.70 ± 0.01	3.07 ± 0.06	4.07 ± 0.01

De acordo com os resultados presentes na Tabela 18, o valor obtido para o teor alcoólico (% v/v) da cerveja de murta foi de 1.70 % ± 0.01, enquanto que para a cerveja controlo foi de 3.10 % ± 0.01. Relativamente ao teor de sólidos solúveis (% °Brix), a cerveja de murta apresentou um valor de 3.07 % ± 0.06 e a cerveja controlo 5.63 % ± 0.06.

A partir dos resultados obtidos, verificou-se que, para ambos os parâmetros analisados, a cerveja de murta obteve valores inferiores aos do controlo, podendo-se concluir que a adição do fruto durante o processo de produção da cerveja não teve efeito significativo para os atributos analisados.

Relativamente ao teor de sólidos solúveis, os frutos de murta utilizados apresentaram um valor de °Brix reduzido de 1.80 % (valor obtido a partir das análises prévias), que aumentou no processo de produção de cerveja. Neste sentido, é possível concluir que um aumento na quantidade de frutos utilizados durante este processo seria viável para o aumento do valor.

O valor de pH obtido para a cerveja de murta foi de  $4.07 \pm 0.01$ , enquanto que para a cerveja controlo foi  $4.40 \pm 0.01$ , valores muito semelhantes.

Nardini & Garaguso (2019) analisaram vários tipos de cervejas de pequenos frutos, como cereja, framboesa e uva. Os valores de pH variaram entre 3.73 e 4.86, valores semelhantes aos da cerveja de murta ( $\text{pH}=4.07 \pm 0.01$ ), sendo superior às cervejas com adição de cereja ( $\text{pH}=3.86$ ) e de framboesa ( $\text{pH}=3.73$ ), e inferior à cerveja com adição de uva ( $\text{pH}=4.86$ ). Podendo-se afirmar que, a adição da murta durante o processo de produção da cerveja pode ter influenciado o resultado da determinação da acidez.

#### **4.6.3.2. Quantificação dos compostos fenólicos totais**

A determinação do teor de compostos fenólicos totais da cerveja controlo e da cerveja de murta foram efetuadas através do método *Folin-Ciocalteu* (4.2.1.).

A cerveja de murta apresentou um teor de compostos fenólicos totais de 474.02 mg GAE/L  $\pm 0.01$ , demonstrando ser bastante inferior à cerveja controlo (617.67 mg GAE/L  $\pm 0.01$ ).

No estudo realizado por Nardini & Garaguso (2019), para diferentes cervejas de pequenos frutos (cereja, framboesa e uva) os valores do conteúdo fenólico total variaram de 399.00 mg GAE/L  $\pm 11.00$  a 767.01 mg GAE/L  $\pm 13.00$ , consideravelmente superiores à cerveja de murta. É possível considerar um aumento na quantidade de frutos utilizados durante o processo de produção da mesma, visto estar estudado que, cervejas com maior quantidade de antioxidantes fenólicos exibem melhor qualidade, maior estabilidade de aroma, sabor e espuma (Nardini & Garaguso, 2019).

Quanto a um estudo sobre licores, de Tuberoso, et al. (2013), obtidos por maceração a frio de bagas de murta (*Myrtus communis* L.), os valores da determinação quantitativa dos compostos fenólicos (Folin-Ciocalteu) foram bastante superiores aos valores da cerveja de murta (1741.01 mg GAE/100 g de fruto  $\pm 150$ ).

### 4.6.3.3. Capacidade Antioxidante – ABTS e DPPH

A capacidade antioxidante da cerveja controlo e da cerveja de murta foi determinada através dos ensaios ABTS (4.2.2.) e DPPH (4.2.3.). Os resultados foram expressos em mg VCEAC/100 g de amostra e estão apresentados na Tabela 19.

**Tabela 19** – Resultados dos métodos de *Folin-Ciocalteu*, ABTS e DPPH das cervejas analisadas

Amostra	ABTS (mg/VCEAC/1g amostra)	DPPH (mg/VCEAC/1g amostra)
Cerveja controlo	16.37 ± 1.02	4.06 ± 1.08
Cerveja de <i>Myrtus spp.</i>	8.89 ± 0.61	0.00 ± 0.60

Relativamente à determinação da capacidade antioxidante total através do método ABTS, a cerveja de murta apresentou uma capacidade antioxidante total de 8.89 mg VCEAC/100 g ± 0.61 e a cerveja controlo 16.37 mg VCEAC/100 g ± 1.02, resultados esperados, uma vez que, a cerveja de murta também apresentou um menor conteúdo fenólico em relação à cerveja controlo.

Segundo um estudo de Floegel, et al. (2011), a capacidade antioxidante pelo método ABTS de uma cerveja convencional (46.10 mg VCEAC/100 g ± 0.30) e de uma cerveja leve (29.30 mg VCEAC/100 g ± 0.30), é bastante superior à capacidade antioxidante da cerveja de murta (8.89 mg VCEAC/100 g ± 0.61).

Quanto ao estudo sobre licores, de Tuberoso, et al. (2013), obtidos por maceração a frio de bagas de murta (*Myrtus communis* L.), os valores da capacidade antioxidante foram de 61.7 mg/VCEAC/1g amostra ± 4.1, bastante superiores aos valores da cerveja de murta (8.89 mg VCEAC/100 g ± 0.61).

Relativamente à determinação da capacidade antioxidante total da cerveja controlo e da cerveja de murta, através do ensaio DPPH, os resultados encontrados foram 4.06 mg VCEAC/100 g ± 1.08 e 0.00 mg VCEAC/100 g ± 0.60, respectivamente. Assim como para o método ABTS, a cerveja controlo apresentou atividade antioxidante superior à cerveja de murta.

Floegel, et al. (2011), também avaliou a capacidade antioxidante de uma cerveja leve (12.20 mg VCEAC/100g  $\pm$  0.50), sendo superior ao valor da cerveja controlo (4.06 mg VCEAC/100 g  $\pm$  1.08).

Quanto ao estudo sobre licores, de Tuberoso, et al. (2013), obtidos por maceração a frio de bagas de murta (*Myrtus communis* L.), os valores da capacidade antioxidante total foram de 53.0 mg/VCEAC/1 g amostra  $\pm$  3.0.

De forma a melhorar a qualidade nutricional da cerveja artesanal de *Myrtus spp.*, vários fatores teriam que ser alterados: relativamente ao malte e ao cereal não maltado (milho), as quantidades que foram utilizadas na produção podem ter contribuído para um baixo teor alcoólico, sendo necessário aumentar a quantidade dos mesmos, ou incorporar outros tipos de cereais adjuntos ao processo de produção, aumentando também a quantidade de açúcares fermentáveis; os tempos de cozedura e temperaturas de processamento e fermentação; o tipo de levedura e as etapas de condicionamento e acabamento, que podem refletir diferenças no teor final de álcool e nas características sensoriais do produto (Nardini & Garaguso, 2019).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

A murta (*Myrtus spp.*) é uma planta com grande potencial de crescimento e de aplicações junto de diferentes setores do mercado. A utilização da murta no tratamento de doenças e alimentação data desde o antigamente, através da preparação de extratos e de uso *in natura*, no tempero de carnes e saladas, incorporação em licores e cervejas, entre outras preparações. Na sequência, e dada a necessidade de contribuir com um estudo científico aprofundado e de valorização, desenvolveu-se a presente caracterização nutricional e físico-química da planta, nas suas diferentes partes edíveis (polpa, semente, folha e flôr).

Os resultados demonstraram que a murta é um fruto constituído por pouca água, apresentando baixo teor de sólidos solúveis, uma acidez típica, com sabor um pouco adstringente e elevado teor de açúcares redutores.

Relativamente aos compostos fenólicos totais (método *Folin-Ciocalteu*) e capacidade antioxidante (métodos ABTS, DPPH e FRAP), os resultados demonstraram que a folha *in natura* apresentou melhores resultados/valores mais elevados em todos os métodos, seguida da semente *in natura*. Pôde-se também concluir que, para a extração dos compostos da polpa *in natura* (P), polpa desidratada (PS) e semente desidratada (SS), o melhor solvente foi a acetona a 70 % v/v, contrariamente à folha *in natura* (F) e à flôr *in natura* (L), em que o solvente etanol 70 % v/v se apresentou mais eficiente na extração de compostos fenólicos e antioxidantes, facto também verificado no ensaio de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), que confirmou que os extratos de etanol se apresentaram mais ricos em compostos polifenólicos, explicando as diferenças detetadas no método *Folin-Ciocalteu*. Alguns estudos científicos já reportados na literatura sugerem que os compostos fenólicos presentes no fruto, folha e seus óleos essenciais, contribuem para o melhoramento de algumas doenças, como a doença de *Alzheimer* e de condições de stress oxidativo, bem como para a promoção de processos de regeneração da pele, minoração de problemas intestinais, entre outros problemas de saúde.

Quanto ao perfil de ácidos gordos, os ácidos gordos mais abundantes nas diferentes partes da planta (polpa, folha e semente), foram os ácidos Linoleico (C18:2 n6), Oleico (C18:1 n9), Palmítico (C16), Esteárico (C18) e Araquídico (C20).

Em relação ao estudo da toxicidade dos extratos de murta, quanto à sua viabilidade celular em células CACO-2, os resultados demonstraram que, concentrações superiores a 4.00 % (m/v) são celularmente benéficas, já que apresentaram níveis de viabilidade celular maiores que 70 % (à exceção do extrato das sementes de *Myrtus spp.*), sendo este um parâmetro apreciável para estudos futuros e para a elaboração de produtos destinados à alimentação humana.

Relativamente à análise da atividade antibacteriana, foram encontrados indícios de atividade antibacteriana de *Myrtus spp.* com a estirpe *Staphylococcus aureus*, associados ao extrato de etanol 70 % v/v do fruto.

Quanto à aplicação da murta, desenvolveram-se 3 produtos com incorporação de *Myrtus spp.*, um enchido (chouriço), um tempero (vinagre) e um produto de fermentação (cerveja), cuja finalidade foi valorizar o potencial nutricional e económico do fruto. Os resultados apresentaram-se positivos, com enriquecimento do valor nutricional e medicinal relativamente aos produtos controlo.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Aleksic, V., & Knezevic, P. (2014). Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiological Research*, 240-254.
- Anwar, S., Ahmed, N., Al Awwad, N., Ansari, S., & Wagih, M. (2016). Chapter 66 - Myrtle (*Myrtus communis* L.) Oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, 581-592.
- Aydın, C., & Özcan, M. (2007). Determination of nutritional and physical properties of myrtle (*Myrtus communis*L.) fruits growing wild in Turkey. *Journal of Food Engineering*, 453-458.
- Aykac, A., Ozbeyli, D., Uncu, M., Ertaş, B., Kılınc, O., Şen, A., . . . Sener, G. (2019). Evaluation of the protective effect of *Myrtus communis* in scopolamine-induced Alzheimer model through cholinergic receptors. *Gene*, 194-201.
- B2C ECOMMERCE BRASIL. (2019). *PrimeVinho*. Obtido de PrimeVinho: [www.primevinho.com.br](http://www.primevinho.com.br)
- Berka-Zougali, B., Ferhat, M., Hassani, A., Chemat, F., & Allaf, K. (2012). Comparative study of essential oils extracted from Algerian *Myrtus communis* L. leaves using microwaves and hydrodistillation. *International Journal of Molecular Sciences*, 4673–4695.
- Berthon, K., Esperon-Rodriguez, M., Beaumont, L., Carnegie, A., & Leishman, M. (2018). Assessment and prioritisation of plant species at risk from myrtle rust (*Austropuccinia psidii*) under current and future climates in Australia. *Biological Conservation*, 154-162.
- Bouzabata, A., Bazzali, O., Cabral, C., Gonçalves, M., Cruz, M., Bighelli, A., . . . Tomi, F. (2013). New compounds, chemical composition, antifungal activity and cytotoxicity of the essential oil from *Myrtus nivellei* Batt. & Trab., an endemic species of Central Sahara. *Journal of Ethnopharmacology*, 613-620.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 25-30.

- Cakir, A. (2004). Essential oil and fatty acid composition of the fruits of *Hippophae rhamnoides* L. (Sea Buckthorn) and *Myrtus communis* L. from Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, 809-816.
- Cannas, S., Molicotti, P., Ruggeri, M., Cubeddu, M., Sanguinetti, M., Marongiu, B., & Zanetti, S. (2013). Antimycotic activity of *Myrtus communis* L. towards *Candida* spp. from clinical isolates. *Journal of Infection in Developing Countries*, 295-298.
- Chalchat, J.-C., Garry, R.-P., & Michet, A. (2011). Essential Oils of Myrtle (*Myrtus communis* L.) of the Mediterranean Littoral. *Journal of Essential Oil Research*, 613-617. Obtido de Essential Oils of Myrtle (*Myrtus communis* L.) of the Mediterranean Littoral.
- Chidouh, A., Aouadi, S., & Heyraud, A. (2014). Extraction, fractionation and characterization of water-soluble polysaccharide fractions from myrtle (*Myrtus communis* L.) fruit. *Food Hydrocolloids*, 733-739.
- Christophoridou, S., & Dais, P. (2009). Detection and quantification of phenolic compounds in olive oil by high resolution <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal Chim Acta*, 283-292.
- Chrysavgi, G., Vassiliki, P., Athanasios, M., Kibouris, T., & Komaitis, M. (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry*, 1120-1130.
- Ciccarelli, D., Garbari, F., & Pagni, A. (2008). The flower of *Myrtus communis* (Myrtaceae): Secretory structures, unicellular papillae, and their ecological role. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 85-93.
- Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H., & Madani, K. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chemistry*, 585-595.
- Denardin, C., Hirsch, G., Rocha, R., Vizzotto, M., Henriques, A., Moreira, J., . . . Emanuelli, T. (2015). Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. *Jornal Food Drug Analyses*, 387-398.
- Djihane, B., Wafa, N., Elkhamssa, S., Pedro, H., Maria, A., & Mohamed, M. (2017). Chemical constituents of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil and their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative

- bacteria, filamentous fungi and *Candida albicans*. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 780-787.
- EMICEP. (2019). *Câmara Municipal de Ourém*. Obtido de Câmara Municipal de Ourém: [www.ourem.pt/areas-de-acao/cultura-e-desporto/cultura/parque-natureza-do-agroal/](http://www.ourem.pt/areas-de-acao/cultura-e-desporto/cultura/parque-natureza-do-agroal/)
- Figueiredo, A., Pedro, L., Barroso, J., Trindade, H., Sanches, J., Oliveira, C., & Correia, M. (2013). *Myrtus communis* L. *Agrotec*, 29-30.
- Floegel, A., Kim, D.-O., Chung, S.-J., Koo, S., & Chun, O. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 1043-1048.
- Fonseca, M., Santos, V., & Cunha, M. (2015). Determinação de Compostos Fenólicos, Antocianinas e Atividade Antioxidante de Mirtilos em Protocolos com Diferentes Agentes Extratores. *V Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia - VSIMBBTEC*, 370.
- Fraga, C. (2009). *Plant Phenolics and Human Health : Biochemistry, Nutrition and Pharmacology*. WILEY.
- Garriga, M., Almaraz, M., & Marchiaro, A. (2017). Determination of reducing sugars in extracts of *Undaria pinnatifida* (harvey) algae by UV-visible spectrophotometry (DNS method). *Actas de Ingeniería*, 173-179.
- Gião, M., González-Sanjosé, M., Rivero-Pérez, M., Pereira, C., Pintado, M., & Malcata, F. (2007). Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 2638-2647.
- Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends in Pharmacological Sciences*, 125-130.
- Harrill, R. (1998). Using a refractometer to test the quality of fruits & vegetables. *Pineknoll Publishing*, 7-21. Obtido de [www.nutritionsecurity.org/PDF/Brix](http://www.nutritionsecurity.org/PDF/Brix).
- Harrison, M., & Albanese, J. (2019). Beer/Brewing. *Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition)*, 467-477.
- Heywood. (1996). *Myrtaceae - A família do Eucalipto*. Obtido de RAIZ Instituto de Investigação da Floresta e Papel: <http://raiz-iifp.pt/myrtaceae-a-familia-do-eucalipto/>

- Jabri, M.-A., Rtibi, K., Sakly, M., Marzouki, L., & Sebai, H. (2016). Role of gastrointestinal motility inhibition and antioxidant properties of myrtle berries (*Myrtus communis* L.) juice in diarrhea treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 1937-1944.
- Kamiloglu, S., Capanoglu, E., Grootaert, C., & Van Camp, J. (2015). Anthocyanin Absorption and Metabolism by Human Intestinal CACO-2 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21555-21574.
- Leal, M., Alves, R., & Hanazaki, N. (2018). Knowledge, use, and disuse of unconventional food plants. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10-49.
- Mahboubi, M. (2017). Effectiveness of *Myrtus communis* in the treatment of hemorrhoids. *Journal of Integrative Medicine*, 351-358.
- Mahmoud, I., El-Sayed, A., Rania, F., Ezzel-Din, A.-K., Khaled, M., & Amany, A. (2010). Secondary metabolites and bioactivities of *Myrtus communis*. *Pharmacognosy Research*, 325–329.
- Mansour, A., Celano, R., Mencherini, T., Picerno, P., Piccinelli, A., Foudil-Cherif, Y., . . . Rastrelli, L. (2017). A new cineol derivative, polyphenols and norterpenoids from Saharan myrtle tea (*Myrtus nivellei*): Isolation, structure determination, quantitative determination and antioxidant activity. *Fitoterapia*, 32-39.
- Marzouk, B., Mhamdi, B., & Wannes, W. (2009). Variations in essential oil and fatty acid composition during *Myrtus communis* var. *italica* fruit maturation. *Food Chemistry*, 621-626.
- McNaught, A., & Wilkinson, A. (2018). *Gold Book - pH*. Obtido de Gold Book: [goldbook.iupac.org/html/P/P04524](http://goldbook.iupac.org/html/P/P04524)
- Mendes, M., Gazarini, L., & Rodrigues, M. (2001). Acclimation of *Myrtus communis* to contrasting Mediterranean light environments: effects on structure and chemical composition of foliage and plant water relations. *Environmental and Experimental Botany Journal*, 165-178.
- Mhamdi, B., Wannes, W., Sriti, J., & Marzouk, B. (2010). Glycerolipid and fatty acid distribution in pericarp, seed and whole fruit oils of *Myrtus communis* var. *italica*. *Industrial Crops and Products*, 77-83.

- Moyer, R., Hummer, K., Finn, C., Frei, B., & Wrolstad, R. (2002). Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: vaccinium, rubus, and ribes. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 519-525.
- Nardini, M., & Garaguso, I. (2019). Characterization of bioactive compounds and antioxidant activity of fruit beers. *Food Chemistry*, 125437.
- Neteuro. (2019). *Catuna & Silva, Lda.* Obtido de Catuna & Silva, Lda.: <https://catuna-silva.pt/produto/licor-murta-serra-do-caldeirao/>
- Neves, L., Alencar, S., & Carpes, S. (2009). Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. *Brazilian Journal of Food Technology*, 107-110.
- Nunes, R., Rodrigues, S., Pasko, P., Carvalho, I., Grenha, A., & Tyszka-Czochara, M. (Nunes, R., Rodrigues, S., Pasko, P., Tyszka-Czochara, M., Grenha, A., Carvalho, I. (2014). Effect of *Erica australis* extract on CACO-2 cells, fibroblasts and selected pathogenic bacteria responsible for wound infection. *Industrial Crops and Products*, 52, de 2014). Effect of *Erica australis* extract on CACO-2 cells, fibroblasts and selected pathogenic bacteria responsible for wound infection. *Industrial Crops and Products*, 99-104.
- Ozcan, O., Ipekci, H., Alev, B., Ustundag, U., Ak, E., Sen, A., . . . Akbay, T. (2019). Protective effect of Myrtle (*Myrtus communis*) on burn induced skin injury. *Burns*, 8.
- Öztürk, H., Demirci, T., & Akın, N. (2018). Production of functional probiotic ice creams with white and dark blue fruits of *Myrtus communis*: The comparison of the prebiotic potentials on *Lactobacillus casei* 431 and functional characteristics. *LWT*, 339-345.
- Pereira, P., Cebola, M., & Bernardo-Gil, G. (2009). Evaluation of the yields and composition of essential oil from Portuguese myrtle (*Myrtus communis* L.) through the vegetative cycle. *Molecules*, 3094-3105.
- Pinela, J., Carvalho, A., & Ferreira, I. (2017). Wild edible plants: Nutritional and toxicological characteristics, retrieval strategies and importance for today's society. *Food and Chemical Toxicology*, 165–188.
- Pinto, P., & Morais, A. (2000). Boas Práticas para Conservação de Produtos Hortofrutícolas. *AESBUC - Associação para a escola superior de biotecnologia da universidade católica*, 32.

- Pirbalouti, A., Jahanbazi, P., Enteshari, S., & Malekpoor, F. (2010). Antimicrobial activity of some of the Iranian medicinal plants. *Archives of Biological Science*, 633–642.
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 3396-3402.
- Purser, J. (2019). *Forestfarm*. Obtido de Forestfarm: [www.forestfarm.com/myrtus-communis-compacta-myco100](http://www.forestfarm.com/myrtus-communis-compacta-myco100)
- Qiao, S., Tian, Y., Gu, W., He, K., Yao, P., Song, S., . . . Zhang, F. (2019). Research on simultaneous detection of SSC and FI of blueberry based on hyperspectral imaging combined MS-SPA. *Engineering in Agriculture, Environment and Food*.
- Ramdane, F., Essid, R., Fares, N., Ouassis, D., Aziz, S., Mahammed, M., . . . Limam, F. (2017). Antioxidant antileishmanial cytotoxic and antimicrobial activities of a local plant. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*.
- Ratnam, D., Ankola DD, D., Bhardwaj, V., Sahana DK, D., & Kumar, M. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Control Release*, 189-207.
- Ratti, C. (2001). Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *Journal of Food Engineering*, 311-319.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant aFree Radical Biology & Medicine*, 1231-1237.
- Retamales, H., & Scharaschkin, T. (2015). Comparative leaf anatomy and micromorphology of the Chilean Myrtaceae: Taxonomic and ecological implications. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 138-154.
- Ribeiro, V., Leitão, A., Ramalho, J., & Lidon, F. (2014). Chemical characterization and antioxidant properties of a new coffee blend with cocoa, coffee silverskin and green coffee minimally processed. *Food Research International*, 39–47.
- Rodrigues, E., Poerner, N., Rockenbach, I., Gonzaga, L., Mendes, C., & Fett, R. (2012). Phenolic compounds and antioxidant activity of blueberry cultivars grown in Brazil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31.

- Romojaro, A., Botella, M., Obón, C., & Pretel, M. (2013). Nutritional and antioxidant properties of wild edible plants and their use as potential ingredients in the modern diet. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 944-952.
- Roux, J., Greyling, I., Coutinho, T., Verleur, M., & Wingfield, M. (2013). The Myrtle rust pathogen, *Puccinia psidii*, discovered in Africa. *IMA FUNGUS*, 155-159.
- Rufino, M., Alves, R., Brito, E., Morais, S., Sampaio, C., Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2006). Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). *Embrapa Agroindústria Tropical*.
- Sampaolesi, S., Gamba, R., & Antoni, G. (2019). Potentiality of yeasts obtained as beer fermentation residue to be used as probiotics. *LWT*, 108251.
- Santos, M., Lucas, E., Sano, P., Buerki, S., Staggemeier, V., & Forest, F. (2017). Biogeographical patterns of *Myrcia s.l.* (Myrtaceae) and their correlation with geological and climatic history in the Neotropics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34-48.
- Shami, N., & Moreira, E. (2004). Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutrição*, 227-236.
- Sigma-Aldrich. (2016). *Cell Proliferation Kit 1 (MTT)*. Obtido de Merck: [www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11465007001?lang=pt&region=PT](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11465007001?lang=pt&region=PT)
- Soewarto, J., Hamelin, C., Bocs, S., Mournet, P., Vignes, H., Berger, A., . . . Maggia, L. (2019). Transcriptome data from three endemic Myrtaceae species from New Caledonia displaying contrasting responses to myrtle rust (*Austropuccinia psidii*). *Data in Brief*, 794-811.
- Sumbul, S., Ahmad, M., Asif, M., & Akhtar, M. (2011). *Myrtus communis* Linn. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 395-402.
- Tuberoso, C., Boban, M., Bifulco, E., Budimir, D., & Pirisi, F. (2013). Antioxidant capacity and vasodilatory properties of Mediterranean food: The case of Cannonau wine, myrtle berries liqueur and strawberry-tree honey. *Food Chemistry*, 686-691.
- Vasconcelos, T., Proença, C., Ahmad, B., Aguilar, D., Aguilar, R., Amorim, B., . . . Lucas, E. (2017). Myrteae phylogeny, calibration, biogeography and diversification

patterns: Increased understanding in the most species rich tribe of Myrtaceae.

*Molecular Phylogenetics and Evolution*, 113-137.

Vuon , Q., Pham, H., Vu, H., Dang, T., Ngo, T., & Chalmers, A. (2018). Fruit characteristics, phytochemical and antioxidant properties of blueberry ash (*Elaeocarpus reticulatus*). *Heliyon*, 834.

Wannes, W., Mhamdi, B., Sriti, J., Jemia, M., Ouchikh, O., Hamdaoui, G., . . . Marzouk, B. (2010). Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology*, 1362-1370.

Watson, R., Preedy, V., & Zibadi, S. (2018). Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease. *Academic Press*, 19-32.

*Esta página foi intencionalmente deixada em branco*

# ANEXO I

Poster para a participação na X Conferência de Inovação e Segurança Alimentar - CISA 2019. que decorreu na ESTM – Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar. pertencente ao Instituto Politécnico de Leiria.

## INCORPORAÇÃO DE CONSERVANTE NATURAL (*MYRTUS SPP.*) EM ENCHIDOS

Ana Carolina L. Branco<sup>1</sup>; Taciana R. Bertotti<sup>1</sup>; Maria Jorge G. Campos<sup>2</sup>; Vânia Ribeiro<sup>3</sup>; Daniela C. Vaz<sup>3</sup>; Ana C. Rodrigues<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>ESTM – Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Instituto Politécnico de Leiria; <sup>2</sup>MARE – Marine and Environmental Sciences Centre – Instituto Politécnico de Leiria; <sup>3</sup>ESSLei – Escola Superior de Saúde de Leiria – Instituto Politécnico de Leiria

### INTRODUÇÃO



Hoje em dia, há uma procura crescente por produtos alimentares seguros e naturais que contribuam para a saúde e bem-estar do consumidor, tendo por isso, surgido a necessidade de desenvolver novas formulações. Habitualmente, são adicionadas aos produtos alimentares conservantes químicos para garantir um prazo de conservação alargado, prevenindo o desenvolvimento de microorganismos que causem doenças ao consumidor ou que ajudem na conservação da aparência do produto. Contudo, a legislação referente aos conservantes químicos tem vindo a sofrer alterações e atualizações em consequência do conhecimento de problemas de sensibilidade e toxicidade associadas à utilização destes produtos<sup>1</sup>.

Este trabalho, tem como objetivo a valorização de plantas autóctones portuguesas, nomeadamente *Myrtus spp.*, incluindo-a em formulações locais, a fim de avaliar as suas capacidades como conservante natural. Foi realizada a produção de chouriços com dois conservantes distintos, nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub> - conservante químico) e *Myrtus spp.* (conservante natural), tendo-se realizado um controlo no qual não foi utilizado qualquer conservante.

### MATERIAL & MÉTODOS

-  Pesar 130,00g de carne, cortada em pedaços pequenos, para 3 recipientes;
-  Adicionar 13,00g de pimentão doce a cada um dos recipientes;
-  Preparar o conservante: num recipiente incorporar 0,05g de nitrato de potássio, noutra 1,24g de *Myrtus spp.* e outro sem qualquer conservante;
-  Envolver todos os ingredientes, colocá-los numa tripa artificial e selar as pontas com o auxílio de um cordel;
-  Colocar em fumeiro cerca de duas semanas.

  
Chouriço com adição de nitrato de potássio (conservante químico)

  
Chouriço com adição de *Myrtus spp.* (conservante natural)

  
Chouriço sem conservante

### DISCUSSÃO DE RESULTADOS

De forma a perceber qual o enchido mais indicado, foi realizada a quantificação de nitratos (gráfico I), através do método Kjeldahl<sup>2</sup>:



Foi escolhido o chouriço de marca branca para o teste preliminar.

Após as 2 semanas no fumeiro foi verificado um odor intenso a pimentão doce (condimento) no chouriço sem conservantes e no chouriço com KNO<sub>3</sub>, e a presença acentuada de fungos nas aberturas do chouriço com *Myrtus spp.*

Foi depois realizado o teste de controlo de qualidade (contagem de coliformes totais e *Escherichia coli*), no qual se identificou crescimento microbiano de bactérias e fungos e, se identificou efeito protetor de *Myrtus spp.*

### CONCLUSÃO

Tendo-se identificado efeito protetor de *Myrtus spp.*, semelhante ao do nitrato de potássio (conservante químico), no futuro poderá vir a ser usada em produtos cárneos. As plantas poderão vir a ser utilizadas como conservantes naturais, contudo, há que realizar mais testes de controlo de maneira a aperfeiçoar cada vez mais o processo de produção, de modo a que não ocorra a presença de nenhum microorganismo prejudicial.

**Bibliografia:** <sup>1</sup> W., Wissem et al. *Journal of food and drug analysis*, 2016; <sup>2</sup> Nitrogen Determination by Kjeldahl Method, PanReacApplichem.

# ANEXO II

Poster para a participação no 5º Simpósio: Produção e Transformação de Alimentos em Ambiente Sustentável. que decorreu na ESTM – Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja.

## Desenvolvimento de Cerveja tipo Ale com a incorporação de duas frutas nativas portuguesas: Camarinha (*Corema album ssp. album*) e *Myrtus spp.*

Taciana R. Bertotti<sup>1</sup>; Ana Carolina L. Branco<sup>1</sup>; Maria Jorge G. Campos<sup>2</sup>; Vânia Ribeiro<sup>3</sup>; Daniela C. Vaz<sup>3</sup>; Luís F. Soares Luís<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ESTM – Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Instituto Politécnico de Leiria; <sup>2</sup>MARE – Marine and Environmental Sciences Centre - Instituto Politécnico de Leiria; <sup>3</sup>ESL – Escola Superior de Saúde de Leiria – Instituto Politécnico de Leiria

E-mail: 4170196@my.iplleiria.pt

### INTRODUÇÃO

A espécie *Corema album* (L.) D. Don, originária da costa atlântica da Península Ibérica, inclui duas subespécies em Portugal, sendo estas a *Corema album azoricum* (Azevedo) e a *Corema album ssp. album* (Contenteal) (Andrade, Gonçalves; PF Guiné, 2017). A *Corema album* é uma das espécies endémicas mais características de sistemas dunares da Costa Atlântica da Península Ibérica, porém devido ao avanço do desenvolvimento urbano nas zonas costeiras, impacto do turismo e de algumas espécies invasoras (*Acacia sp.*), a camarinha encontra-se atualmente em situação de risco (Calviño-Cancela, 2005).

*Myrtus spp.*, popularmente conhecido em Portugal como murta ou murtinho, é um arbusto perene que pode atingir até 5 metros de altura, exibindo flores brancas, folhas verdes brilhantes e frutos comestíveis. Cresce espontaneamente em toda a área do Mediterrâneo e pertence à família Myrtaceae (Zanetti, Stefania et. al., 2010).

A cerveja é uma das bebidas alcoólicas mais consumidas no mundo e tem grande aceitação devido aos seus atributos sensoriais. Quando ingerida de forma moderada, a cerveja apresenta valor nutritivo e diversidade de apresentação. Embora com elevado teor de compostos antioxidantes, fibras, minerais e vitaminas (Barnforth, 2009), ainda pouco se conhece sobre os seus benefícios e componentes.

A utilização de frutas na produção de cerveja garante uma doçura residual, aroma e sabor característico e aumenta o caráter vinoso da cerveja, devido à presença de uma maior gama de compostos aromáticos (Zambelli, Santos Junior, 2015).

### OBJETIVOS

- Desenvolver uma nova alternativa à cerveja tradicional, procurando um nicho de mercado;
- Valorizar o potencial comercial e económico da camarinha (*Corema album* (L.) D. Don) e do murtinho (*Myrtus spp.*), associando a bebida formulada ao aumento das propriedades funcionais conferidas pelos frutos.

### ANÁLISES DOS FRUTOS

**Análise efetuada em amostras de frutos desidratados, para garantir a eliminação total do teor de água.**

As amostras (5g) de cada fruto foram colocadas em estufa onde permaneceram a temperatura constante de 60°C por 72 horas.

**Teor de Humidade**

Quantificação dos compostos fenólicos totais via método Folin-Ciocalteu.

Método aplicado aos extratos da polpa e das sementes da camarinha e do murtinho. Os resultados estão expressos em miligramas de ácido gálico por 100 ml de extrato da polpa e das sementes.

**Antioxidantes Totais**

Extração do sumo de 3 camarinhas, escolhidas aleatoriamente, por pressão manual mecânica.

Após a calibração do refratómetro com água destilada, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, colocou-se 1 gota de sumo das camarinhas sobre a superfície do prisma.

**Grau Brix**

### FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO

- Mosturação
- Adição de cereal não maltado e açúcar
- Adição da polpa de fruta
- Cozimento
- Adição do lúpulo
- Arrefecimento
- Adição de levedura
- Envase
- Fermentação<sub>1</sub>
- Filtração
- Carbonatação
- Envase
- Fermentação<sub>2</sub>

### MATERIAIS E MÉTODOS

**MATÉRIA PRIMA**

**IMAGENS DO PROCESSO**

Imagens do processo: mosturação, cozimento, fermentação, filtração, carbonatação, envase.

### RESULTADOS ANALÍTICOS

**Legenda:**

- 1 - Antibiótico CIP-5 (controlo positivo)
- 2 - Antibiótico CT-X30 (controlo positivo)
- 3 - 40 µL de etanol (controlo negativo)
- 4 - 20 µL de extrato de sementes de Myrtus spp.
- 5 - 20 µL de extrato de sementes de Myrtus spp.
- 6 - 30 µL de extrato de sementes de Myrtus spp.
- 7 - 40 µL de extrato de sementes de Myrtus spp.
- 8 - 20 µL de extrato de folhas de Myrtus spp.
- 9 - 20 µL de extrato de folhas de Myrtus spp.
- 10 - 10 µL de extrato de polpa de Myrtus spp.
- 11 - 20 µL de extrato de polpa de Myrtus spp.
- 12 - 30 µL de extrato de polpa de Myrtus spp.
- 13 - 40 µL de extrato de polpa de Myrtus spp.

**Placas de Petri após incubação por 24 horas a 37°C**

Imagens de placas de Petri com culturas de *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em extratos de camarinha e murtinho.

**Atividade Antibacteriana**

### CONCLUSÃO

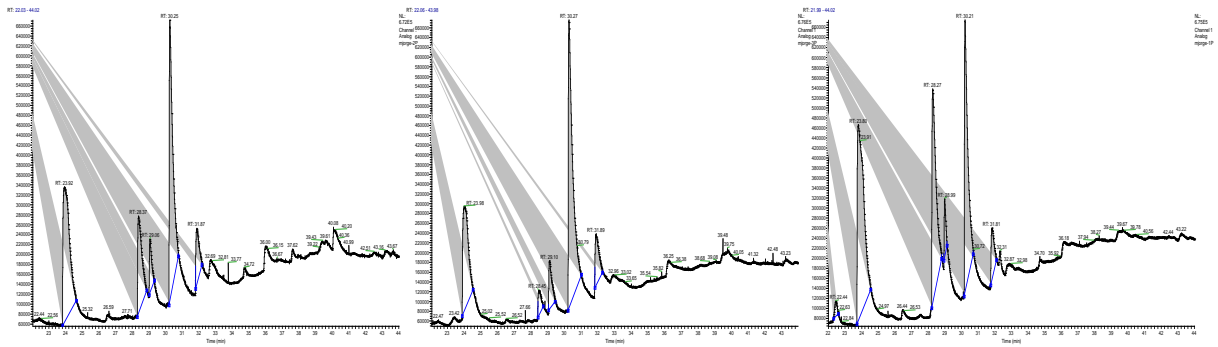
Os resultados obtidos via Método Folin-Ciocalteu, para determinação da composição fenólica, sugerem que tanto a polpa quanto as sementes dos frutos apresentam elevado teor em antioxidantes totais, especialmente relacionados aos extratos das sementes de murtinho (147,43 mg GAE/100ml - ANAG 1375,23 mg GAE/200ml - ENAG).

Quanto a avaliação da capacidade antimicrobiana, os resultados obtidos permitem verificar que, relativamente à camarinha, não existem qualquer halos de inibição associados aos extratos de fruto e folhas para as espécies selecionadas. Em relação ao murtinho, foram encontrados halos de atividade antibacteriana apenas para a espécie *Staphylococcus aureus*, conforme descrito nos resultados. Verificou-se ainda que, em extratos das folhas do murtinho (4 e 9), apresenta-se maior efeito antibacteriano em relação aos cereais, mesmo em volumes menores de extrato (10µL e 20µL).

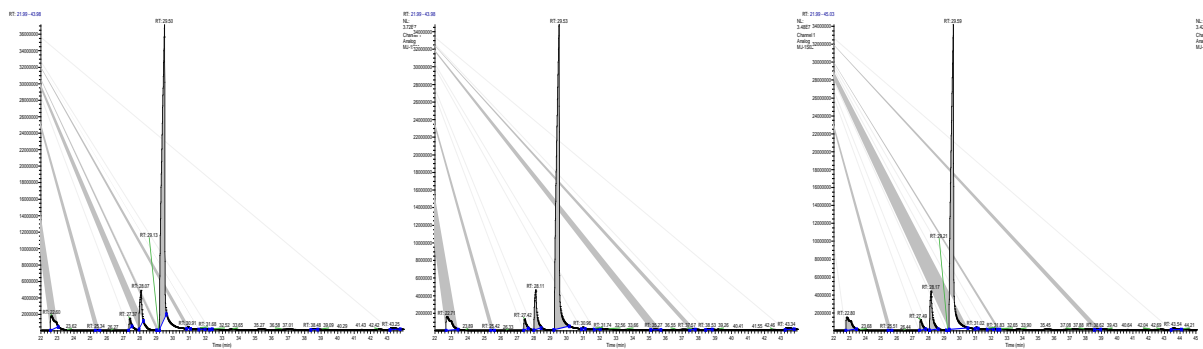
A partir do grupo de produtos final, foram analisados, a potencial definir que ambas as cervejas possuem valores semelhantes de açúcar e álcool em um mesmo envasagem.

## ANEXO III

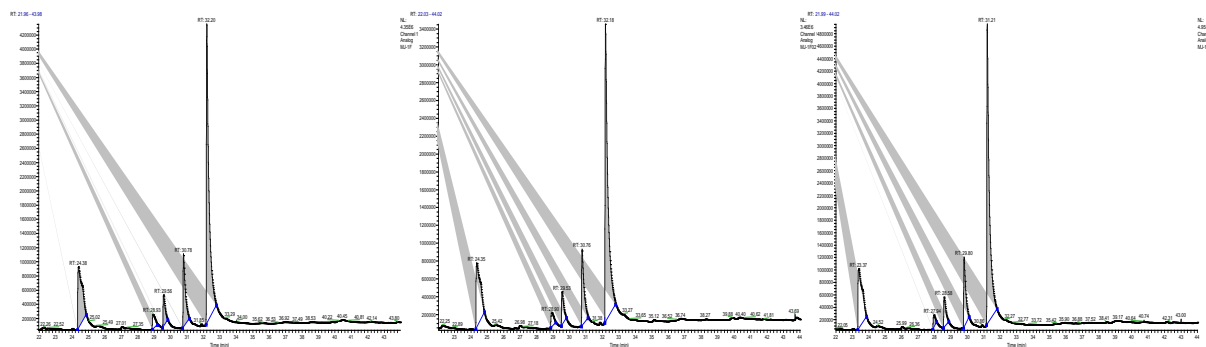
A)



B)



C)



**Anexo 1:** Cromatogramas (triplicado) obtidos no *software Xcalibur* após a leitura no GC *Finnigan Ultra Trace*. **A)** cromatogramas das amostras de polpa de murta, **B)** cromatogramas das amostras de sementes de murta e **C)** cromatogramas das amostras de folhas de murta

*Esta página foi intencionalmente deixada em branco*