



III CIBAP Azores 2013

III Congresso Iberoamericano de Peloides
III Congreso Iberoamericano de Peloides
3rd Iberoamerican Congress of Peloids

Ponta Delgada, São Miguel, Açores
1-7.10.2013

LIVRO DE ACTAS LIBRO DE ACTAS PROCEEDINGS



INSTITUTO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DOS AÇORES

João Carlos Nunes, João Baptista Silva, Celso Figueiredo Gomes
(editores)





III Congresso Iberoamericano de Peloides
III Congreso Iberoamericano de Peloides
3rd Iberoamerican Congress of Peloids

Ponta Delgada, São Miguel, Açores
1-7.10.2013

LIVRO DE ACTAS LIBRO DE ACTAS PROCEEDINGS



João Carlos Nunes, João Baptista Silva, Celso Figueiredo Gomes
(editores)

Valorização das folhas de louro (*L. nobilis* L. e *L. azorica* (Feub.) Franco)

Lucena C. Pereira¹, Ana F. Vinha², Anabela Costa³, Rita C. Alves⁴, Valentina Domingues⁵, Filipa Pimentel⁶, M. Cristina Delerue-Matos⁷, M. Beatriz P. P. Oliveira⁸

¹ Aluna do Mestrado em Segurança Alimentar, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Pólo das Ciências da Saúde, Azinhaga de Santa Comba, 3000-548 Coimbra; REQUIMTE/ Dep. Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto, Portugal.

² Engenheira Alimentar (PhD), REQUIMTE/ Dep. Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto, Portugal; FCS, Faculdade de Ciências da Saúde, Univ. Fernando Pessoa, 296, 4200-150, Porto, Portugal, anafvinha@gmail.com

³ Engenheira Química (MSc), REQUIMTE/ Dep. Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto, Portugal, acostaff.up.pt

⁴ Farmacêutica (PhD), REQUIMTE/ Dep. Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto, Portugal/ Instituto Superior de Engenharia do Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 431, 4200-072 Porto, Portugal, rita.c.alves@gmail.com

⁵ Farmacêutica (PhD), Prof. Adjunto REQUIMTE/ Instituto Superior de Engenharia do Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 431, 4200-072 Porto Portugal, vfd@isep.ipp.pt

⁶ Nutricionista (MSc), REQUIMTE/ Dep. Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto, Portugal, filipabpimentel@gmail.com

⁷ Engenheira Química (PhD) Prof. Coordenadora, REQUIMTE/ Instituto Superior de Engenharia do Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 431, 4200-072 Porto Portugal, cmm@isep.ipp.pt

⁸ Farmacêutica (PhD), Prof. Associada, REQUIMTE/ Dep. Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto, Portugal, beatoliv@ff.up.pt

RESUMO

As folhas de louro (*Laurus* sp.) são, frequentemente, usadas na gastronomia da zona mediterrânica como ingrediente aromático. A sua riqueza em fitoquímicos bioativos tem justificado a utilização do óleo essencial na medicina tradicional e na cosmética.

Neste trabalho, analisaram-se duas espécies autóctones desta planta: *L. nobilis* L. (continente) e *L. azorica* (Feub.) Franco (Açores). Com este estudo pretendeu-se caracterizar e comparar os extratos hidroalcoólicos destas espécies, obtidos por processos sustentáveis, visando a sua valorização e incorporação em produtos de cosmética. Foi também analisado o perfil de voláteis das folhas frescas e secas por HS-SPME/GC-MS.

Os resultados mostraram diferenças entre o perfil de voláteis. Os extratos de *L. azorica* (Feub.) Franco apresentaram teores superiores de compostos bioativos (fenólicos totais, flavonoides e proantocianidinas). A incorporação de louro (folhas e/ou extratos) em pelóides poderá ser benéfica dada a elevada atividade antioxidante e a fragância desta matriz.

Palavras chave

Plantas autóctones; *L. nobilis* L.; *L. azorica* (Feub.) Franco; Compostos bioativos; Voláteis.

ABSTRACT

Bay leaves (*Laurus* sp.) are often used in Mediterranean culinary as an aromatic ingredient. Their richness in bioactive phytochemicals justifies the use of the essential oil in folk medicine and cosmetic field.

In this work, we analyzed two native species of this plant: *L. nobilis* L. (Mainland) and *L. azorica* (Feub.) Franco (Azores). This study aimed to characterize and compare hydroalcoholic extracts of these species, obtained by a sustainable way, having in view their valorization and incorporation in cosmetic products. The volatile profile of fresh and dried leaves was also analyzed by HS-SPME/GC-MS.

The results showed differences between volatile profiles. Extracts of *L. azorica* (Feub.) Franco showed higher contents of bioactive compounds (total phenolics, flavonoids and proanthocyanidins). The incorporation of bay leaves and/or extracts in peloids can be beneficial due to the high antioxidant activity and fragrance of this matrix.

Keywords

Native plants; *L. nobilis* L.; *L. azorica* (Feub.) Franco; Bioactive compounds; Volatiles.

INTRODUÇÃO

As plantas aromáticas são reconhecidas pela sua riqueza em vitaminas (A, C e complexo B), minerais (cálcio, fósforo, sódio, potássio e ferro), fibras, componentes voláteis (óleos essenciais) e substâncias fitoquímicas (compostos bioativos). O loureiro, nativo da região mediterrânica, pertence à família das Lauraceae, caracterizada por árvores de folhas aromáticas, flores pequenas e pouco vistosas, tendo como fruto uma drupa (Proença da Cunha et al., 2009). Em Portugal continental encontra-se predominantemente a espécie *Laurus nobilis* L. No entanto, no arquipélago dos Açores está descrita outra espécie de loureiro, de natureza autóctone, o *Laurus azorica* (Feub.) Franco (Ballabio e Goetz, 2010).

A produção e a extração de compostos bioativos de natureza volátil e não volátil têm, atualmente, um elevado interesse económico para a indústria em geral, e em particular para a indústria farmacêutica. No entanto, a produção destes compostos, por parte das plantas, requiere algumas condições específicas, por vezes de difícil controlo, tais como as condições edafoclimáticas (Jemâa et al., 2012). O arquipélago dos Açores é reconhecido pelo seu clima temperado, fator que pode exercer um papel fundamental no metabolismo da planta, concretamente na espécie *L. azorica*. Nos últimos anos, o *Laurus* sp. tem sido alvo de investigação, nomeadamente, na caracterização química e quantificação de metabolitos secundários importantes para diversas atividades biológicas. Vários estudos provaram que os extratos das folhas de *L. nobilis* L. e os óleos essenciais têm atividades biológicas distintas, de entre as quais se salientam a antifúngica (Marzouki et al., 2009), antibacteriana (Marzouki et al., 2009; Ramos et al., 2012), inseticida (Jemâa et al., 2012), antioxidante (Kaurinovic et al., 2010; Ramos et al., 2012; Saab et al., 2012.), anti-inflamatória e analgésica (Sayyah et al., 2003; Kaileh et al., 2007), anticonvulsiva (Sayyah et al., 2002), antitumoral (Saab et al., 2012), inibição da proliferação de doenças alérgicas e inflamatórias (Kim et al., 2011), inibição da acetilcolinesterase (Ferreira et al., 2006) e inibição da produção de óxido nítrico (De Marino et al., 2004).

Pelas razões supracitadas, foram analisadas neste trabalho duas espécies autóctones do *Laurus* sp., mais concretamente, *L. nobilis* L. (continente) e *L. azorica* (Feub.) Franco (Açores). Foi realizada a análise fitoquímica dos extratos hidroalcoólicos destas duas espécies, obtidos por processos sustentáveis e visando a sua valorização. Efetuou-se, ainda, a análise do perfil de compostos voláteis das folhas por HS-SPME/GC-MS.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

As folhas de loureiro foram recolhidas em 2012 em Freixieiro do Soutelo, Distrito de Viana do Castelo (*L. nobilis* L.) e Ilha do Pico, Açores (*L. azorica*). As folhas foram submetidas a uma secagem em estufa a 25°C durante 72 horas, sendo posteriormente trituradas (GM 200, RETSCH, Haan, Germany) e analisadas.

Análise dos compostos fitoquímicos

Para a análise dos compostos bioativos procedeu-se à extração hidroalcoólica (1 g/50 ml; 50:50 (v/v)) em placa de agitação constante (600 rpm), durante 1h, a 40°C.

A determinação do teor de fenólicos totais foi realizada espectrofotometricamente, ($\lambda=765$ nm) utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, segundo Alves et al. (2010). Os flavonóides totais foram quantificados segundo a metodologia descrita por Barroso et al. (2011), com ligeiras modificações. Para a reta de calibração utilizou-se a epicatequina como padrão e as absorvências foram registadas a 510 nm. A quantificação do teor de proantocianidinas totais seguiu o método descrito por Tamilselvi et al. (2012), com ligeiras modificações. O ácido tânico foi usado como padrão e as leituras foram realizadas a 725 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

Análise do perfil de compostos voláteis

Os compostos voláteis foram analisados por um método de microextração em fase sólida combinado com cromatografia gasosa acoplada a um espectrómetro de massa (HS-SPME/GC-MS).

Pesaram-se cerca de 170 mg de amostra para vial de 10 ml com cápsula de septo de Teflon (Teflon coated) e equipado com uma barra magnética. Os compostos voláteis libertados para o espaço livre do vial foram adsorvidos por uma fibra de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB, Supelco, Inc., Bellefonte, PA) de 65 μm , previamente acondicionada a 250°C durante 30 minutos no injetor de cromatógrafo. A adsorção dos compostos voláteis das amostras, pela fibra, decorreu durante 45 minutos à temperatura ambiente. Após este período, a fibra foi introduzida no injetor de um cromatógrafo GC TRACE Ultra Polaris Q acoplado a um espectrómetro de massa com *ion trap* (Thermo Fisher Scientific) com ionização por impacto de eletrões a 70 eV. O gás de arraste utilizado foi o hélio (Linde Sógas purity $\geq 99,999\%$) a 1 mL/min.

A separação dos compostos voláteis decorreu numa coluna capilar de ZB-XLB de Phenomenex® (30m \times 0,25mm \times 0,25 μm) a temperatura programada: 40°C (durante 1 minuto), aumento de 30°C/min até 220°C (mantidos 5 minutos), aumento de 10°C/min até 250°C (mantidos 20 min) e, finalmente, aumentada de novo a 5°C/min até 285°C (mantidos 5 min). A temperatura da fonte de iões foi de 250°C e o multiplicador de eletrões foi programado a 1900V. Os compostos voláteis obtidos foram identificados, como os mais prováveis, através dos espectros de massa das bibliotecas para voláteis NIST e Wiley 275.

Todos os testes foram realizados em triplicado, tanto para as folhas secas como para as folhas frescas de cada espécie.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor dos compostos bioativos presentes nos extratos das plantas é influenciado pela natureza química do analito de interesse, o método analítico, a seleção de padrões e a presença de substâncias interferentes na amostra (Naczek e Shahidi, 2006).

Os resultados (Tabela 1) mostraram diferenças significativas entre as amostras para os três grupos de fitoquímicos estudados ($p < 0,05$). O *L. azorica* apresentou valores significativamente superiores de compostos fenólicos totais e flavonóides totais. Curiosamente, a nível de teores de proantocianidinas, a espécie *L. nobilis* apresentou um teor, aproximadamente, 30% mais elevado.

Tabela 1. Teor de compostos bioativos (mg/L) de extratos hidroalcoólicos de folhas de *L. nobilis* e *L. azorica*, colhidas no Continente e Açores, respetivamente.

	Compostos bioativos (mg/L)		
	Fenólicos totais	Flavonóides totais	Proantocianidinas
<i>L. nobilis</i> L.	4754 \pm 150 ^a	268 \pm 31 ^a	6948 \pm 46 ^a
<i>L. azorica</i>	6751 \pm 190 ^b	419 \pm 16 ^b	4857 \pm 12 ^b

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna, considerando o mesmo grupo de compostos, representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

As diferenças encontradas em todos os grupos de compostos bioativos analisados provam que a espécie botânica e as condições edafoclimáticas são fatores condicionantes para a síntese de metabolitos secundários nas matrizes vegetais.

Estes, para além de conferirem proteção à planta, podem representar uma mais-valia em futuras aplicações na indústria alimentar, farmacêutica ou cosmética devido às suas atividades

biológicas. Por exemplo, as características adstringentes das proantocianidinas, que derivam da precipitação de proteínas, conferem-lhes propriedades biológicas específicas (cicatrizante, anti-inflamatória, antimicrobiana).

Os compostos fenólicos e os flavonóides são metabolitos secundários com maior representação e destaque no reino vegetal. Habitualmente são reconhecidos pelas suas propriedades antioxidantes, no entanto, estão descritos alguns efeitos mais abrangentes, tais como, antimicrobianos, antivirais, vasodilatadores e antimuta-génicos, entre outros (Crozier et al. 2009).

As folhas de loureiro são conhecidas pelo seu odor agradável e característico, sendo por essa razão utilizadas na culinária portuguesa e na indústria alimentar. Os compostos voláteis presentes nas folhas de *Laurus* sp. são responsáveis pelas suas características distintas e aroma picante específico (Sellami et al., 2011; Ramos et al., 2012).

A identificação dos compostos voláteis foi realizada para as folhas frescas e secas de ambas as espécies. As Figuras 1 e 2 mostram os respetivos cromatogramas obtidos por GC-MS.

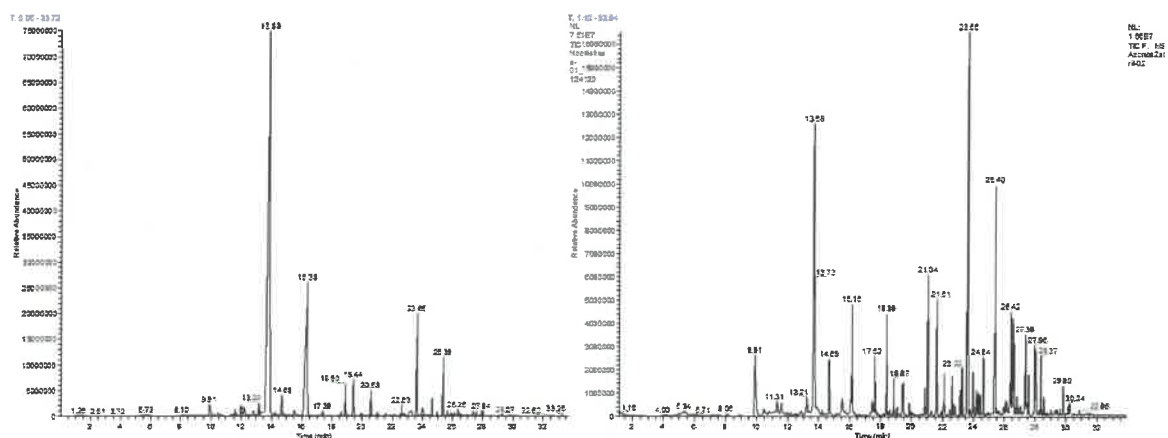


Figura 1. Cromatogramas das folhas frescas e secas de *L. nobilis* L., respetivamente.

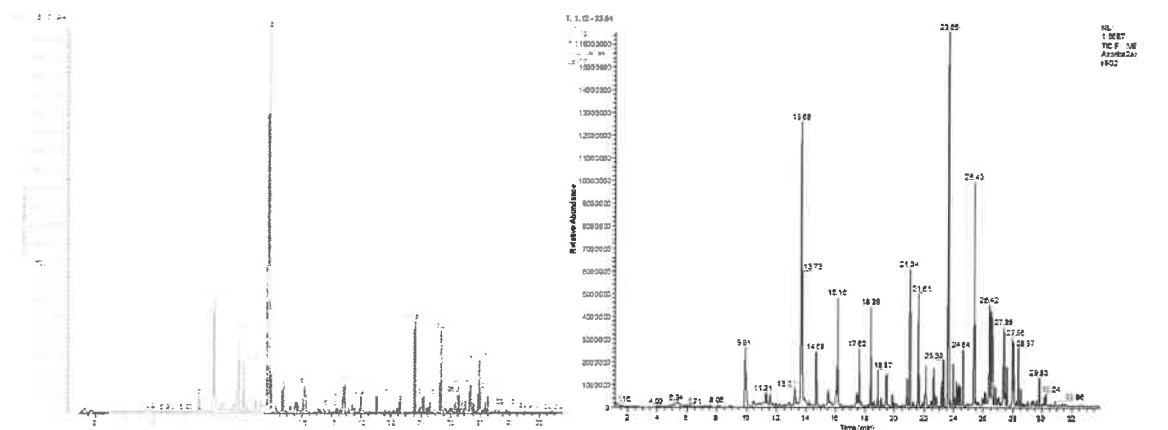


Figura 2. Cromatogramas das folhas frescas e secas de *L. azorica*, respetivamente.

Para cada espécie analisada, os compostos voláteis das folhas frescas e secas foram semelhantes, tendo o perfil obtido diferido essencialmente nas percentagens relativas da maioria dos compostos.

Nas folhas frescas de *L. nobilis* L. foram determinados 25 compostos voláteis. Dos maioritários, identificaram-se o cineol (52,09%) e o 2-careno (6,64%). Nas respetivas folhas secas, os voláteis

predominantes foram o 2-careno (24,79%), o éster metílico do ácido linálico (10,62%), o cariofileno (8,93%), o canfeno (6,88%) e o 1-terpineol (6,86%).

Nas folhas frescas de *L. azorica* foi possível identificar também 25 compostos voláteis, sendo os maioritários: cineol (38,36%), α -felandreno (10,98%), β -felandreno (5,84%), 2-careno (4,37%) e cariofileno (4,01%). Nas folhas secas, os compostos predominantes foram o 2-careno (13,66%), seguido do 1-terpineol (8,96%), o cariofileno (7,84%) e o α -felandreno (3,36%). Identificou-se, ainda, o espatulenol nas folhas frescas e secas de *L. azorica*, não tendo sido encontrado nas folhas de *L. nobilis*.

CONCLUSÃO

A análise fitoquímica dos extratos hidroalcoólicos destas duas espécies mostrou que as folhas de *L. azorica* apresentam teores superiores de compostos bioativos (fenólicos totais, flavonoides e proantocianidinas). Os perfis de voláteis das duas espécies analisadas diferiram ligeiramente e foram influenciados pelo processo de secagem. Não obstante, todas as matrizes analisadas apresentaram um elevado teor de compostos bioativos e riqueza em compostos voláteis. Deste modo, a incorporação de louro (folhas e/ou extratos) em peloides poderá ser benéfica, dada a elevada atividade antioxidante e a fragância desta matriz.

AGRADECIMENTOS

R. C. Alves agradece à FCT a bolsa de pós-doutoramento (SFRH/BPD/68883/2010) financiada por POPH - QREN - Tipologia 4.1 - Formação Avançada, subsidiada pelo FSE e MCTES. Este trabalho foi financiado pela FCT (PEst-C/EQB/LA0006/2011).

REFERÊNCIAS

- Alves, R., Costa, A., Jerez, M., Casal, S., Sineiro, J., Núñez, M. & Oliveira, M.B.P.P. 2010. Antiradical activity, phenolic profile, and hydroxymethylfurfural in expresso coffee: influence of technological factors. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **58**: 12221-12229.
- Ballabio, R. & Goetz, P. 2010. Huile de graine/fruit de laurier *Laurus nobilis* L., *Laurus azorica* (Seub.) Franco, *Laurus novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar. *Phytothérapie*. **8**: 141-144.
- Barroso, M., Noronha, J., Delerue-Matos, C. & Oliveira, M.B.P.P. 2011. Flavored waters: influence of ingredients on antioxidante capacity and terpenoid profile by HS-SPME/GC-MS. *Journal Agricultural Food Chemistry*. **59**: 5062-5072.
- Crozier, A., Jaganath, I.B. & Clifford, M. N. 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health, *Natural Product Reports*. **26**: 1001-1043.
- De Marino, S., Borbone, N., Zollo, F., Ianaro, A., Di Meglio, P. & Iorizzi, M. 2004. Megastigmane and phenolic components from *Laurus nobilis* L. leaves and their inhibitory effects on nitric oxide production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52**: 7525-7531.
- Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M.L.M. & Araújo, M.E.M. 2006. The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*. **108**: 31-37.
- Jemâa, J.M.B., Tersim, N., Toudert, K.T. & Khouja, M.L. 2012. Insecticidal activities of essential oils from leaves of *Laurus nobilis* L. from Tunisia, Algeria and Marocco, and comparative chemical composition. *Journal Stored Products Research*. **48**: 97-104.
- Kaileh, M., Berghe, W.V., Boone, E., Essawi, T. & Haegeman, G. 2007. Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. *Journal of Ethnopharmacology*. **113**: 510-516.

- Kaurinovic, B., Popovic, M. & Vlajsavljevic, S. 2010. *In vitro* and *in vivo* effects of *Laurus nobilis* L. leaf extracts. *Molecules*. **15**: 3378-3390.
- Kim, T.J., Nam, K.W., Kim, B., Lee, S.J., Oh, K.B., Kim, K.H., Mar, W. & Shin, J. 2011. Inhibitory effects of costunolide isolated from *Laurus nobilis* on IgE-induced degranulation of mast cell-like RBL-2H3 cells and the growth of Y16 pro-B cells. *Phytotherapy Research*. **25**: 1392-1397.
- Marzouki, H., Elaissi, A., Khaldi, A., Bouzid, S., Falconieri, D., Marongiu, B., Piras, A. & Porcedda, S. 2009. Seasonal and geographical variation of *Laurus nobilis* L. essential oil from Tunisia. *The Open Natural Products Journal*. **2**: 86-91.
- Naczka, M. & Shahidi, F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis*. **41**: 1523-1542.
- Pronça da Cunha, A., Ribeiro, J. A., & Roque, O. R. 2009. Plantas aromáticas em Portugal caracterização e utilizações: O emprego das plantas aromáticas desde as antigas civilizações até ao presente. 2ª Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Matos, O., Serrano, C., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Nunes, M. L. & Marques, A. (2012). Antioxidant and antibacterial activity of essential oil and extracts of bay laurel (*Laurus nobilis* Linnaeus (Lauraceae) from Portugal. *Natural Product Research*. **26**: 518-529.
- Saab A. M., Tundis, R., Loizzo, M. R., Lampronti, I., Borgatti, M., Gambari, R., Menichini, F. & Esseily, F. 2012. Antioxidant and antiproliferative activity of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) leaves and seeds essential oils against K562 human chronic myelogenous leukemia cells. *Natural Product Research*. **26**: 1741-1745.
- Sayyah, M., Valizadeh, J. & Kamalinejad, M. 2002. Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* against pentylenetetrazole-and maximal electroshock-induced seizures. *Phytomedicine*. **9**: 212-216.
- Sellami, I. H., Wannes, W.A., Bettaieb, I., Berrima, S., Chahed, T., Marzouk, B. & Limam, F. 2011. Qualitative and quantitative changes in the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves as affected by different drying methods. *Food Chemistry*. **126**: 691-697.
- Tamilselvi, N., P Krishnamoorthy, P., Dhamotharan, R. & Arumugam, P. 2012. Analysis of total phenols, total tannins and screening of phytochemicals in *Indigofera aspalathoides* (Shivanar Vembu) Vahl EX DC. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. **4(6)**:3259-3262.