



Ana Sofia Miranda Oliveira

Estudo de Plantas Aromáticas para Potencial Aplicação a Embalagens Alimentares Activas

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Maria da Conceição Gonçalves Barreto Oliveira Castilho e co-orientada pela Professora Doutora Ana Teresa Sanches Silva e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Sofia Miranda Oliveira

Estudo de Plantas Aromáticas para Potencial Aplicação a Embalagens Alimentares Activas

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Maria da Conceição Gonçalves Barreto Oliveira Castilho e co-orientada pela Professora Doutora Ana Teresa Sanches Silva e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

O presente trabalho de investigação insere-se no projecto “Rose4Pack: Embalagem biodegradável activa com extrato de alecrim para incrementar a vida útil dos alimentos”, financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade – COMPETE (FCOMP-01-0124-FEDER-028015) e por Fundos nacionais da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia (PTDC/AGR-TEC/3366/2012) e é coordenado pela Doutora Ana Sanches Silva.

A presente dissertação não foi escrita ao abrigo do novo acordo ortográfico.



UNIÃO EUROPEIA

**Fundo Europeu
de Desenvolvimento Regional**

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria da Conceição Castilho, por ter aceite ser orientadora desta dissertação, pela sua disponibilidade, pelo apoio, pelos conhecimentos transmitidos, pela compreensão e motivação, por todo o acompanhamento ao longo da realização desta dissertação.

À Doutora Ana Sanches Silva, por ter aceite ser co-orientadora deste projecto, agradeço por todos os seus ensinamentos, por toda a disponibilidade e compreensão, por todo o esforço e apoio incondicional.

Ao Professor Doutor Fernando Ramos, pelo apoio e pelos conhecimentos transmitidos.

À Doutora Maria Antónia Calhau, agradeço pelo acolhimento e pela oportunidade de poder concretizar uma parte deste trabalho no Departamento de Alimentação e Nutrição.

À Doutora Helena Soares Costa, pelo acolhimento e pelo contributo prestado neste trabalho.

À Denise e à Regiane, agradeço pelo excelente acolhimento, pela ajuda, pela boa disposição e motivação.

À Karine, à Inês e à Mafalda, pela amizade, pela ajuda e pelo apoio incondicional demonstrados ao longo da realização desta dissertação.

À Alexandra e à Nádia, pela amizade, pelo apoio incondicional e pelos momentos inesquecíveis ao longo destes anos.

A todos os meus amigos, pelos bons momentos, pela amizade e pela compreensão nas ausências.

Aos meus pais, agradeço pelo apoio incondicional, pela compreensão e por tudo o que fizeram por mim.

Ao meu irmão, pela boa disposição e pela motivação.

À minha irmã, pelo carinho, pelos momentos inesquecíveis, pelo apoio incondicional, quero agradecer por TUDO.

A todos vocês, um sincero obrigado!

RESUMO

Uma das principais causas da deterioração da qualidade dos alimentos é a peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica dá origem à formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e radicais livres. A oxidação tem consequências negativas a nível da qualidade nutricional e propriedades organolépticas dos alimentos, nomeadamente, diminuição do valor nutricional pela destruição de ácidos gordos essenciais e de vitaminas A, D, E e K (solúveis em lípidos), desenvolvimento de maus sabores e odores, mudanças de cor e a perda de aroma. Assim, o uso de antioxidantes em alimentos que contêm lípidos, minimiza a degradação oxidativa, retarda a formação de produtos oxidantes tóxicos e mantém a qualidade nutricional dos alimentos.

Na indústria alimentar são bastante utilizados antioxidantes sintéticos, tais como, o BHA (butil-hidroxianisole), o BHT (butil-hidroxitolueno), o PG (galato de propilo) e o TBHQ (*terc*-butil-hidroquinona). No entanto, têm sido gradualmente substituídos por antioxidantes naturais, uma vez que o consumo de antioxidantes sintéticos tem sido associado a efeitos adversos para a saúde humana. Assim, as plantas aromáticas são vastamente estudadas por serem ricas em antioxidantes naturais, apresentando na sua constituição compostos fenólicos, que desempenham um papel fundamental para a saúde humana, actuando como possíveis agentes protectores, ajudando o corpo humano na redução dos danos oxidativos.

Neste contexto, a indústria alimentar tem demonstrado um interesse crescente em compostos fenólicos, por prevenirem a degradação oxidativa dos lípidos, melhorando a qualidade e o valor nutricional dos alimentos e, deste modo, o aumento da vida útil dos produtos alimentares.

Na primeira parte do presente estudo, analisaram-se dez espécies de plantas aromáticas (frescas e secas) recorrendo a quatro ensaios: sistema de inibição do radical DPPH, teste do branqueamento do β -caroteno e determinação do conteúdo em compostos fenólicos totais e flavonóides totais. As plantas aromáticas seleccionadas pertencem maioritariamente à família das Lamiáceas, nomeadamente, o alecrim, a hortelã, a hortelã-pimenta, o manjericão, a manjerona, o orégão, o tomilho e o tomilho-limão. As restantes espécies pertencem à família das Asteráceas, designadamente, o estragão e a stevia. Das espécies de plantas aromáticas seleccionadas, analisaram-se 15 espécies de agricultura convencional (7 amostras secas e 8 amostras frescas) e 6 de agricultura biológica (amostras secas) para posterior comparação com as plantas de agricultura convencional.

No sistema de inibição do radical DPPH, o extracto metanólico de alecrim seco foi o que apresentou maior capacidade antioxidante (2,22 mg peso seco/mL) sendo que no teste do branqueamento do β -caroteno, o extracto metanólico de manjeriço fresco foi o que apresentou maior capacidade antioxidante (AAC = 1083). Relativamente ao conteúdo em fenólicos totais, o extracto metanólico de orégão fresco foi o que apresentou maior quantidade destes compostos (26,27 mg GAE/g peso seco) e o conteúdo em flavonóides totais mais elevado foi apresentado pelo extracto metanólico de stevia fresca (53,75 mg ECE/g peso seco).

Na segunda parte do presente estudo, foi desenvolvido e validado um método em Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com Detector de Díodos (UHPLC-DAD), que permite quantificar simultaneamente dezanove compostos fenólicos, nomeadamente, ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido clorogénico, ácido cafeico, epicatequina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido 2-hidroxicinâmico, ácido rosmarínico, miricetina, resveratrol, ácido *trans*-hidroxicinâmico, quercetina, hesperetina, eugenol, carvacrol, timol, carnosol e ácido carnósico. A pré-coluna utilizada neste método foi uma UPLC[®] BEH C₁₈ (2,1 x 5 mm, 1,7 μ m de tamanho de partícula) e a coluna foi uma ACQUITY[™] UHPLC[®] BEH C₁₈ RPI8 (2,1 x 50 mm, 1,7 μ m de tamanho de partícula). As fases móveis do método foram: Solvente A - fase móvel (aquosa) constituída por água com ácido acético a 0,1 % (v/v); Solvente B - fase móvel (orgânica) constituída por acetonitrilo com ácido acético a 0,1 % (v/v), com eluição em gradiente. Para a validação do método avaliou-se os seguintes parâmetros: especificidade, gama de trabalho e linearidade, limite de detecção e de quantificação, precisão e exactidão. Quanto aos limites de detecção e quantificação, o método desenvolvido permite detectar e quantificar os compostos fenólicos em concentrações muito baixas (< 0,15 μ g/mL, com excepção do carnosol e ácido carnósico). Considera-se ainda que o método foi validado em termos de precisão e exactidão (recuperação 82,8 - 103,9 %), tendo em consideração o fim pretendido da utilização do método desenvolvido em UHPLC-DAD.

O método validado em UHPLC-DAD foi posteriormente aplicado a extractos metanólicos de 21 amostras de plantas aromáticas, para a determinação simultânea de 19 compostos fenólicos. Dos resultados obtidos, o extracto metanólico de tomilho seco foi o que apresentou maior diversidade em compostos fenólicos, apresentando 10 dos 19 compostos fenólicos estudados. O extracto desta planta apresentou elevadas quantidades de ácido rosmarínico e de timol. Para além do extracto de tomilho seco, outros extractos metanólicos de plantas apresentaram elevadas quantidades de carnosol e ácido carnósico (alecrim seco), timol (orégão seco), ácido rosmarínico (alecrim fresco), timol (tomilho fresco)

e ácido clorogénico (stevia fresca). Verificou-se ainda que o ácido rosmarínico está presente em todas as amostras analisadas, à excepção das amostras secas de orégão e estragão, ambas de agricultura biológica.

Assim, é possível verificar que as plantas aromáticas estudadas são excelentes fontes de compostos antioxidantes fenólicos, revelando deste modo uma elevada capacidade antioxidante, destacando o alecrim seco, o manjeriço fresco, o orégão fresco e a stevia fresca, além de outras que também apresentaram uma capacidade antioxidante relevante. Neste contexto, estas plantas podem ser incluídas na lista de plantas potenciais a ser utilizadas para preparar extractos que se possam incorporar a embalagens alimentares activas.

Palavras-chave: Plantas Aromáticas, Agricultura Convencional, Agricultura Biológica, Capacidade Antioxidante, Compostos Fenólicos, Oxidação Lipídica, Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência, Embalagem Activa.

ABSTRACT

One of the main causes for the deterioration of food quality is the lipid peroxidation. The lipid peroxidation leads to the formation of reactive oxygen species (ROS) and free radicals. The oxidation has negative consequences at nutritional and organoleptic properties of the food, namely, decreasing nutritional value by reducing the essential fatty acids and of vitamins A, D, E and K (lipid soluble), originating unpleasant tastes and odors, changes in color and the loss of aroma. Thus, the use of antioxidants in foods containing lipids minimizes the oxidative degradation, reduces the formation of toxic oxidants and maintains the nutritional quality of foods.

In food industry, the synthetic antioxidants are widely used, such as BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene), PG (propyl gallate) and TBHQ (tertiary butylhydroquinone). Nevertheless, they have been gradually replaced by natural antioxidants considering that the consumption of synthetic antioxidants has been associated with adverse effects for human health. Therefore, the aromatic plants are extensively studied due to be good sources of natural antioxidants, exhibiting phenolics in its composition, which plays a fundamental role for human health, acting as possible protecting agents, helping the human body to reduce the oxidative damage.

In this context, food industry has demonstrated a growing interest on phenolics, due to prevent lipid oxidative degradation, enhancing food quality and nutritional value and, so, increasing shelf life of food.

In the first part of this study ten species of aromatic plants were analysed (dried and fresh) using four assays: inhibition system of the DPPH radical, the β -carotene bleaching (BCB) test, and determination of total phenolic compounds and total flavonoids contents. The selected aromatic plants mostly belong to the Lamiaceae family, namely: rosemary, spearmint, basil, oregano, thyme and lemon thyme. The remaining species of aromatic plants belong to the Asteraceae family, particularly tarragon and stevia. Of the species of aromatic plants selected, 15 species were analyzed from conventional agriculture (7 dried samples and 8 fresh samples) and 6 from organic farming (dried samples) for subsequent comparison with the plants in the conventional agriculture.

In the inhibition system of the DPPH radical, the methanolic extract of dried rosemary presented the highest antioxidant capacity (2.22 mg dry weight/mL) while in β -carotene bleaching test, the methanolic extract of fresh basil showed the highest antioxidant capacity

(AAC = 1083). Concerning the content of total phenolic compounds, the methanolic extract of fresh oregano exhibited the highest content of these compounds (26.27 mg GAE/g dry weight) and the highest content of total flavonoids was presented by the methanolic extract of fresh stevia (53.75 mg ECE/g dry weight).

In the second part of this study, a method of Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled with Diode Array detector (UHPLC-DAD) was developed and validated, which allows quantifying nineteen phenolic compounds simultaneously, including gallic acid, protocatechuic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, epicatechin, *p*-coumaric acid, ferulic acid, 2-hydroxycinnamic acid, rosmarinic acid, myricetin, resveratrol, *trans*-hydroxycinnamic acid, quercetin, hesperetin, eugenol, carvacrol, thymol, carnosol and carnosic acid. The precolumn used in this method was a UPLC[®] BEH C₁₈ (2.1 × 5 mm, 1.7 μm particle size) and the column was an ACQUITY[™] UHPLC[®] BEH C₁₈ RP18 (2.1 × 50 mm, 1.7 μm particle size). The mobile phases of the method were: Solvent A - water with acetic acid at 0.1% (v/v); Solvent B - acetonitrile with acetic acid at 0.1% (v/v), with gradient elution. For the validation of the method the following parameters were evaluated: specificity, working range and linearity, limit of detection and quantification, precision and accuracy. Regarding the limits of detection and quantification, the developed method allows to detect and quantify the phenolic compounds at very low concentrations (< 0.15 μg/mL, with exception of carnosol and carnosic acid). It is further considered that the method was validated in terms of precision and accuracy (recovery 82.8 - 103.9 %), whereby the values are valid, considering the intended purpose of the developed UHPLC-DAD method.

The validated UHPLC-DAD method was applied to methanolic extracts of 21 aromatic plant samples to determine 19 phenolic compounds simultaneously. From the obtained results, the methanolic extract of dried thyme presented highest diversity of phenolic compounds, showing 10 out of 19 studied phenolic compounds. This plant extract showed high amounts of rosmarinic acid and thymol. Besides the dry thyme, other aromatic plants methanolic extracts presented high amounts of carnosol and carnosic acid (dry rosemary), thymol (dry oregano), rosmarinic acid (fresh rosemary), thymol (fresh thyme) and chlorogenic acid (fresh stevia). There was still the presence of rosmarinic acid in all samples, with exception of dried oregano and tarragon, both from organic farming.

Therefore, is possible to verify that the aromatic plants studied are excellent sources of antioxidant phenolic compounds, thereby revealing a high antioxidant capacity, besides others which also showed a relevant antioxidant capacity, it is possible to highlight dry rosemary, fresh basil, fresh oregano and fresh stevia. In this context, these plants can be

included in the list with potential plants to be used to prepare extracts that may incorporate active food packaging.

Keywords: Aromatic Plants, Conventional Agriculture, Organic Farming, Antioxidant Capacity, Phenolic Compounds, Lipid Oxidation, Ultra High Performance Liquid Chromatography, Active Packaging.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAC – Coeficiente de Actividade Antioxidante (do inglês *Antioxidant Activity Coefficient*)

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

BHA – Butil-hidroxianisole

BHT – Butil-hidroxitolueno

C18 – Sílica Modificada com Hidrocarboneto Linear C18, octadecilsilano

CAS – *Chemical Abstracts Service*

DAD – Detector de Arranjo de Díodos (do inglês *Diode Array Detector*)

DPPH[•] – 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

ECE – Equivalentes de Epicatequina (do inglês *Epicatechin Equivalents*)

FDA – Food and Drug Administration

GAE – Equivalentes de Ácido Gálico (do inglês *Gallic Acid Equivalents*)

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês *High Pressure Liquid Chromatography*)

ICH – International Conference on Harmonisation

LOD – Limite de Detecção (do inglês *Limit of Detection*)

LOQ – Limite de Quantificação (do inglês *Limit of Quantification*)

M – Molar (mol/L)

m/v – Massa por Volume

MS – Espectrometria de Massas (do inglês *Mass Spectrometry*)

n.d. – Não Detectado

p/v – Peso por Volume

PG – Galato de Propilo

r² – Coeficiente de determinação

ROS – Espécies Reactivas de Oxigénio (do inglês *Reactive Oxygen Species*)

RSD – Desvio Padrão Relativo (do inglês *Relative Standard Deviation*)

t_R - Tempo de Retenção

TBHQ – *Terc*-butil-hidroquinona

TFC – Conteúdo de Fenólicos Totais (do inglês *Total Phenolic Content*)

UHPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography*)

UV-Vis – Espectroscopia ultravioleta-visível

v/v – Volume por Volume

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
1.1. Plantas aromáticas	1
1.2. Agricultura Biológica.....	13
1.3. Oxidação lipídica de alimentos.....	14
1.4. Compostos bioactivos: Compostos fenólicos	15
1.4.1. Principais grupos de compostos fenólicos.....	15
1.4.2. Efeitos dos compostos fenólicos na saúde humana.....	20
1.4.3. Compostos fenólicos na indústria alimentar.....	23
1.4.4. Métodos para determinar compostos fenólicos.....	24
1.4.4.1. Fenólicos totais.....	24
1.4.4.2. Flavonóides totais.....	25
1.4.4.3. Determinação cromatográfica de compostos fenólicos.....	25
1.5. Métodos para determinar a capacidade antioxidante in vitro	26
1.5.1. Sistema de inibição do radical DPPH	26
1.5.2. Teste do branqueamento do β -Caroteno	27
1.6. Embalagens alimentares activas com antioxidantes naturais	28
2 OBJECTIVOS	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Amostras	33
3.2. Determinação da humidade por perda de peso.....	34
3.3. Preparação dos extractos das plantas aromáticas.....	35
3.4. Determinação da capacidade antioxidante in vitro, compostos fenólicos totais e flavonóides totais.....	36
3.4.1. Reagentes, solventes e padrões.....	36
3.4.2. Equipamentos	36
3.4.3. Determinação da capacidade antioxidante in vitro	37
3.4.3.1. Sistema de inibição do radical livre DPPH.....	37
3.4.3.2. Teste do branqueamento do β -caroteno	39
3.4.4. Determinação de compostos fenólicos totais e de flavonóides totais.....	40
3.4.4.1. Determinação dos compostos fenólicos totais.....	40

3.4.4.1.1. Preparação da curva padrão do ácido gálico	41
3.4.4.2. Determinação dos flavonóides totais	41
3.4.4.2.1. Preparação da curva padrão de epicatequina	42
3.5. Determinação de compostos fenólicos por UHPLC-DAD	43
3.5.1. Reagentes, solventes e padrões.....	43
3.5.2. Equipamentos	44
3.5.3. Preparação das soluções stock dos padrões.....	44
3.5.4. Optimização das condições de extracção e cromatográficas para determinação dos compostos fenólicos em plantas aromáticas	45
3.5.4.1. Determinação do comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx.}}$) dos dezanove compostos fenólicos	45
3.5.4.2. Optimização e selecção das condições cromatográficas.....	46
3.5.4.3. Optimização do processo de extracção das plantas aromáticas.....	47
3.5.5. Validação	47
3.5.5.1. Especificidade.....	47
3.5.5.2. Gama de trabalho e Linearidade	48
3.5.5.3. Limite de detecção	48
3.5.5.4. Limite de quantificação.....	49
3.5.5.5. Precisão.....	49
3.5.5.5.1. Repetibilidade e precisão intermédia da amostra.....	49
3.5.5.5.2. Repetibilidade e precisão intermédia do equipamento	50
3.5.5.6. Exactidão	50
3.6. Análise estatística	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1. Humidade das diversas plantas aromáticas.....	53
4.2. Determinação da capacidade antioxidante in vitro, conteúdo em compostos fenólicos totais e flavonóides totais.....	56
4.2.1. Determinação da capacidade antioxidante in vitro	56
4.2.1.1. Sistema de inibição do radical DPPH.....	56
4.2.1.2. Teste do branqueamento do β -Caroteno.....	66
4.2.2. Determinação do conteúdo em fenólicos totais e de flavonóides totais	72
4.2.2.1. Conteúdo de compostos fenólicos totais.....	72
4.2.2.2. Conteúdo de flavonóides totais	86
4.3. Determinação de compostos fenólicos por UHPLC-DAD	97
4.3.1. Validação do método cromatográfico	97
4.3.1.1. Especificidade.....	97
4.3.1.2. Gama de trabalho, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação.....	98
4.3.1.3. Precisão.....	102
4.3.1.3.1. Repetibilidade e precisão intermédia da amostra.....	102
4.3.1.3.2. Repetibilidade e precisão intermédia do equipamento	103

4.3.1.4. Exactidão	104
4.3.2. Quantificação dos compostos fenólicos em plantas aromáticas.....	105
5 CONCLUSÃO.....	123
6 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	127
7 BIBLIOGRAFIA.....	129
8 ANEXOS.....	149

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	3
Figura 2: <i>Mentha spicata</i> L.	4
Figura 3: <i>Mentha x piperita</i> L.	5
Figura 4: <i>Ocimum basilicum</i> L.	6
Figura 5: <i>Origanum majorana</i> L.	7
Figura 6: <i>Origanum vulgare</i> L.	8
Figura 7: <i>Thymus vulgaris</i> L.	9
Figura 8: <i>Thymus x citriodora</i>	10
Figura 9: <i>Artemisia dracunculus</i> L.	11
Figura 10: <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	13
Figura 11: Estrutura básica de um ácido hidroxibenzóico (adaptado de: Ignat, Volf e Popa, 2011).	16
Figura 12: Estrutura básica de um ácido hidroxicinâmico (adaptado de: Ignat, Volf e Popa, 2011)..	16
Figura 13: Estrutura química do ácido gálico (C ₇ H ₆ O ₅) (adaptado de: Brewer, 2011).	17
Figura 14: Estrutura química do ácido protocatecuico (C ₇ H ₆ O ₄) (adaptado de: Brewer, 2011).	17
Figura 15: Estrutura química do ácido clorogénico (C ₁₆ H ₁₈ O ₉) (adaptado de: Hwang et al., 2015). 17	17
Figura 16: Estrutura química do ácido cafeico (C ₉ H ₈ O ₄) (adaptado de: Brewer, 2011).	17
Figura 17: Estrutura química do ácido ferúlico (C ₁₀ H ₁₀ O ₄) (adaptado de: Maruf et al., 2015).	18
Figura 18: Estrutura química do ácido p-cumárico (C ₉ H ₈ O ₃) (adaptado de: Brewer, 2011).	18
Figura 19: Estrutura química do ácido rosmarínico (C ₁₈ H ₁₆ O ₈) (adaptado de: Brewer, 2011).	18
Figura 20: Estrutura química da miricetina (C ₁₅ H ₁₀ O ₈) (adaptado de: Hong et al., 2014).	18
Figura 21: Estrutura química da hesperetina (C ₁₆ H ₁₄ O ₆) (adaptado de: Iranshahi et al., 2015).	18
Figura 22: Estrutura química da epicatequina (C ₁₅ H ₁₄ O ₆) (adaptado de: Brewer, 2011).	19
Figura 23: Estrutura química da quercetina (C ₁₅ H ₁₀ O ₇) (adaptado de: Brewer, 2011).	19
Figura 24: Estrutura química do resveratrol (C ₁₄ H ₁₂ O ₃) (adaptado de: Brewer, 2011).	19
Figura 25: Estrutura química do carnosol (C ₂₀ H ₂₆ O ₄) (adaptado de: Brewer, 2011).	19
Figura 26: Estrutura química do ácido carnósico (C ₂₀ H ₂₈ O ₄) (adaptado de: Brewer, 2011).	19

Figura 27: Estrutura química do eugenol (C ₁₀ H ₁₂ O ₂) (adaptado de: Brewer, 2011).....	20
Figura 28: Estrutura química do carvacrol (C ₁₀ H ₁₄ O) (adaptado de: Brewer, 2011).....	20
Figura 29: Estrutura química do timol (C ₁₀ H ₁₄ O) (adaptado de: Brewer, 2011).....	20
Figura 30: Algumas das plantas aromáticas seleccionadas para o estudo.	33
Figura 31: Amostras secas.....	35
Figura 32: Exsicador com amostras.....	35
Figura 33: Extractos de alecrim orgânico (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.).	35
Figura 34: Picadora Krups, com amostra de manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i> L.) fresco.....	37
Figura 35: Agitador horizontal.....	37
Figura 36: Evaporador rotativo Büchi.	37
Figura 37: Centrífuga Sigma.....	37
Figura 38: Tubos contendo diferentes concentrações do extracto em DPPH*.....	38
Figura 39: Emulsão estável de β-caroteno.....	39
Figura 40: Ensaio do branqueamento do β-caroteno. A e B, tubos contendo amostra de manjerona (<i>Origanum majorana</i> L.), ao tempo zero e após duas horas, respectivamente.	40
Figura 41: Tubos contendo soluções padrão para a determinação da curva padrão do ácido gálico.	41
Figura 42: Tubos contendo soluções padrão para a determinação da curva padrão de epicatequina.	43
Figura 43: Comparação da capacidade antioxidante, EC ₅₀ (mg amostra/mL), dos extractos das plantas aromáticas secas e frescas.....	58
Figura 44: Comparação da actividade antioxidante, EC ₅₀ (mg peso seco/mL), das plantas aromáticas secas e frescas.	59
Figura 45: Comparação da capacidade antioxidante, EC ₅₀ (mg amostra/mL), das plantas aromáticas secas de agricultura biológica (designadas aromáticas secas orgânicas) e das plantas aromáticas secas de agricultura convencional (designadas apenas por plantas aromáticas secas).	60
Figura 46: Comparação da actividade antioxidante, EC ₅₀ (mg amostra/mL), entre as plantas aromáticas secas orgânicas.....	61
Figura 47: Comparação do coeficiente de actividade antioxidante (AAC) das plantas aromáticas secas e frescas.	68
Figura 48: Comparação do coeficiente de actividade antioxidante (AAC) das plantas aromáticas secas e frescas, tendo em consideração a humidade de cada planta aromática.....	69

Figura 49: Comparação do coeficiente de actividade antioxidante (AAC) das plantas aromáticas secas de agricultura biológica (orgânicas) e de agricultura convencional.	70
Figura 50: Comparação do coeficiente de actividade antioxidante (AAC) entre as plantas aromáticas secas orgânicas.	71
Figura 51: Comparação do conteúdo de fenólicos totais (mg GAE/g amostra) das plantas aromáticas secas e frescas.	74
Figura 52: Comparação do conteúdo de fenólicos totais (mg GAE/g peso seco) das plantas aromáticas secas e frescas.	75
Figura 53: Comparação do conteúdo de fenólicos totais (mg GAE/g amostra) das plantas aromáticas secas de agricultura biológica (orgânicas) e de agricultura convencional.	76
Figura 54: Comparação do conteúdo de fenólicos totais (mg GAE/g amostra) entre as plantas aromáticas secas orgânicas.	77
Figura 55: Comparação do conteúdo de flavonóides totais (mg ECE/g amostra) das plantas aromáticas secas e frescas.	88
Figura 56: Comparação do conteúdo de flavonóides totais (mg ECE/g peso seco) das plantas aromáticas secas e frescas.	89
Figura 57: Comparação do conteúdo de flavonóides totais (mg ECE/g amostra) das plantas aromáticas secas de agricultura biológica (orgânicas) e de agricultura convencional.	90
Figura 58: Comparação do conteúdo de flavonóides totais (mg ECE/g amostra) entre as plantas aromáticas secas orgânicas.	91
Figura 59: Cromatograma obtido por UHPLC-DAD para os compostos fenólicos presentes no tomilho seco, a $\lambda = 270\text{nm}$: (1) Ácido protocatecuico; (2) Ácido clorogénico; (3) Ácido cafeico; (4) Epicatequina; (5) Ácido 2-hidroxicinâmico; (6) Ácido rosmarínico; (7) Quercetina; (8) Carvacrol; (9) Timol.	97
Figura 60: Cromatograma da solução mistura dos dezanove compostos fenólicos a $\lambda = 270\text{nm}$: (1) Ácido gálico (51,2 $\mu\text{g/mL}$); (2) Ácido protocatecuico (49,0 $\mu\text{g/mL}$); (3) Ácido clorogénico (127,0 $\mu\text{g/mL}$); (4) Ácido cafeico (50,2 $\mu\text{g/mL}$); (5) Epicatequina (126,0 $\mu\text{g/mL}$); (6) Ácido <i>p</i> -cumárico (49,6 $\mu\text{g/mL}$); (7) Ácido ferúlico (74,7 $\mu\text{g/mL}$); (8) Ácido 2-hidroxicinâmico (25,1 $\mu\text{g/mL}$); (9) Ácido rosmarínico (99,6 $\mu\text{g/mL}$); (10) Miricetina (3,2 $\mu\text{g/mL}$); (11) Resveratrol (49,2 $\mu\text{g/mL}$); (12) Ácido <i>trans</i> -hidroxicinâmico (25,7 $\mu\text{g/mL}$); (13) Quercetina (128,0 $\mu\text{g/mL}$); (14) Hesperetina (49,2 $\mu\text{g/mL}$); (15) Eugenol (74,7 $\mu\text{g/mL}$); (16) Carvacrol (126,0 $\mu\text{g/mL}$); (17) Timol (124,5 $\mu\text{g/mL}$); (18) Carnosol (190,0 $\mu\text{g/mL}$); (19) Ácido carnósico (80,0 $\mu\text{g/mL}$).	98
Figura 61: Cromatograma dos compostos fenólicos presentes no tomilho seco a $\lambda = 270\text{nm}$: (1) Ácido protocatecuico; (2) Ácido clorogénico; (3) Ácido cafeico; (4) Epicatequina; (5) Ácido 2-hidroxicinâmico; (6) Ácido rosmarínico; (7) Quercetina; (8) Carvacrol; (9) Timol.	105
Figura 62: Cromatograma dos compostos fenólicos presentes no estragão fresco a $\lambda = 270\text{nm}$: (1) Ácido gálico; (2) Ácido clorogénico; (3) Ácido ferúlico; (4) Ácido rosmarínico; (5) Resveratrol; (6) Ácido <i>trans</i> -hidroxicinâmico.	106

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos na saúde humana dos diversos compostos fenólicos estudados no presente trabalho.	22
Tabela 2: Gradiente de eluição otimizado para análise cromatográfica dos dezanove compostos fenólicos seleccionados para este estudo.	46
Tabela 3: Percentagem média de humidade determinada para cada planta aromática.	53
Tabela 4: Parâmetros das curvas de calibração para cada planta aromática seca.	57
Tabela 5: Parâmetros das curvas de calibração para cada planta aromática orgânica seca.....	57
Tabela 6: Parâmetros das curvas de calibração para cada planta aromática fresca.....	57
Tabela 7: Coeficiente de actividade antioxidante (AAC) obtido pelas diversas plantas aromáticas estudadas.	67
Tabela 8: Solvente utilizado, gama de concentrações (mg/mL), equação da curva e respectivo coeficiente de determinação (r^2).	72
Tabela 9: Conteúdo de compostos fenólicos totais expressos em equivalentes de ácido gálico (mg GAE/ g de amostra).....	73
Tabela 10: Solvente utilizado, gama de concentrações (mg/mL), equação da curva e respectivo coeficiente de determinação (r^2).	86
Tabela 11: Conteúdo de flavonóides totais expressos em equivalentes de epicatequina (mg ECE/g de amostra).....	87
Tabela 12: Parâmetros das curvas de calibração, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) obtidos para cada composto fenólico.	99
Tabela 13: Repetibilidade e precisão intermédia do processo de extracção para as amostras de tomilho seco.....	102
Tabela 14: Repetibilidade e precisão intermédia do equipamento.	103
Tabela 15: Percentagem de recuperação obtida para cada um dos compostos fenólicos na amostra fortificada de tomilho seco.....	104
Tabela 16: Concentração (mg/100g de peso seco) dos compostos fenólicos nas plantas aromáticas secas.	107
Tabela 17: Concentração (mg/100g de peso seco) dos compostos fenólicos nas plantas aromáticas frescas.....	108
Tabela 18: Concentração (mg/100g de peso seco) dos compostos fenólicos nas plantas aromáticas secas orgânicas.	109

I INTRODUÇÃO

I.1. Plantas aromáticas

As plantas aromáticas têm sido usadas desde a antiguidade pelas suas qualidades aromatizantes (melhoram o aroma e sabor dos alimentos), e também, pelas suas propriedades conservantes e medicinais. O registo mais antigo da utilização de plantas aromáticas foi descoberto num túmulo do Neolítico entre 5000 e 2500 anos a. C. (antes de Cristo). Neste período, os seus extractos eram utilizados no Médio Oriente para curar várias doenças, como tosse, bronquite, laringite, amigdalite e actuando como carminativo e agentes diuréticos (Christaki *et al.*, 2012; Cunha, Roque e Nogueira, 2012; Gonçalves *et al.*, 2013; Nabavi *et al.*, 2015; Roby *et al.*, 2013). No entanto, durante as últimas décadas surgiu um interesse crescente por plantas aromáticas, pela procura de antioxidantes naturais e agentes antibacterianos (Jabri-Karoui *et al.*, 2012).

As plantas aromáticas, possuem diversos fitoquímicos (compostos bioactivos), que são considerados fontes potenciais de antioxidantes naturais (como flavonóides, ácidos fenólicos, taninos e diterpenos fenólicos) (Erkan, Ayranci e Ayranci, 2008; Ferreira e Abreu, 2007). Os fitoquímicos são divididos em diversas classes: compostos fenólicos, carotenóides, alcalóides, compostos azotados e compostos organossulfurados. Os compostos fenólicos e os carotenóides são as classes de fitoquímicos mais estudadas (Ferreira e Abreu, 2007). Os compostos fenólicos possuem actividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e anti-cancerígena (Erkan, Ayranci e Ayranci, 2008; Luthria, 2008).

Devido à actividade antioxidante e antimicrobiana dos constituintes das plantas medicinais e aromáticas, estas podem actuar como agentes estabilizadores (Salgueiro, Martins e Correia, 2010), podendo inibir a degradação oxidativa e retardar o desenvolvimento de sabores desagradáveis em alguns produtos e, pela presença de antimicrobianos contribuem para inibir o crescimento microbiano em alimentos (Christaki *et al.*, 2012), tendo assim um papel importante no tempo de vida útil de alimentos e bebidas (Salgueiro, Martins e Correia, 2010). Deste modo, as plantas aromáticas são matérias-primas de enorme importância para a indústria alimentar, podendo ser utilizadas como uma fonte de óleos essenciais e de extractos aromáticos para alimentos, bebidas, suplementos alimentares e novos alimentos (Salgueiro,

Martins e Correia, 2010). A indústria alimentar tem demonstrado um enorme interesse em plantas aromáticas, especialmente da família Lamiaceae, devido à crescente procura dos consumidores por alimentos saudáveis de origem natural. As plantas da família Lamiaceae são fontes ricas em compostos antioxidantes podendo ser utilizadas na conservação de alimentos contra danos oxidativos (Hossain *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2013). Além da indústria alimentar, também existe uma grande procura pela indústria farmacêutica, cosmética, perfumaria, tingimento (Hossain *et al.*, 2010; Pande e Gupta, 2013). As plantas da família Asteraceae são muito aplicadas pelas suas propriedades medicinais (Karimi *et al.*, 2015a).

Alecrim

O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), da família Lamiaceae, é proveniente da região mediterrânica (**Figura 1**). É um arbusto vigoroso com caules lenhosos, variando entre 0,5 a 2,0 m de altura. As folhas desta planta apresentam uma tonalidade verde-vivo-escuro e as flores azul-pálidas. Este subarbusto cresce em solos secos e pobres, normalmente calcários, bem drenados e permeáveis. O alecrim possui um aroma característico balsâmico canforáceo. As partes utilizadas desta planta são as partes aéreas floridas e as folhas. Esta planta aromática tem como principais constituintes, nas folhas e partes aéreas floridas, flavonóides (luteolina, apigenina, diosmetina), lactonas diterpénicas (carnosol e rosmanol), ácidos polifenólicos e derivados do ácido cafeico (ácido rosmarínico), taninos, ácidos triterpénicos e álcoois triterpénicos (Cunha, Ribeiro e Roque, 2014; Cunha, Roque e Gaspar, 2013; Cunha, Roque e Nogueira, 2012).

Tem-se verificado que o alecrim possui actividade hepatoprotectora, colerética, colagoga, e antiespasmódica. Estas actividades são atribuídas aos flavonóides e outros constituintes polifenólicos (Cunha, Ribeiro e Roque, 2014).

Em **fitoterapia**, as partes aéreas floridas e as folhas usam-se para normalizar perturbações digestivas ligeiras, particularmente quando associadas a alterações hepatobiliares. A nível externo o alecrim é usado no tratamento de reumatismos articulares e musculares, nevralgias, inflamações osteoarticulares, como analgésico e anti-inflamatório nas mialgias. O extracto de alecrim também é usado em diversos champôs com a finalidade de estimular o couro cabeludo. Esta planta também tem aplicações em **balneoterapia**, é anti-reumatisal e activa a circulação. Na **cosmética**, extractos glicólicos da planta florida são incorporados em cremes, que são úteis nas dermatites seborreicas e também no tratamento de estrias. Em **aromaterapia** o óleo essencial de alecrim aplica-se para combater problemas

respiratórios e no tratamento da colite. O óleo essencial de alecrim também se aplica em **perfumaria**. Quando associado a outras plantas aromáticas (estragão, alho), o pó da folha de alecrim pode inibir a oxidação da manteiga e ser utilizado para aromatizar. A parte florida da planta é muito utilizada na culinária para aromatizar diversos alimentos, como carneiro, coelho, carnes brancas, peixe, molhos e omeletes. Na indústria agro-alimentar, os extractos de alecrim são usados como antioxidante (Cunha, Ribeiro e Roque, 2014; Cunha, Roque e Nogueira, 2012).

O extracto de alecrim é um aditivo alimentar (E 392) autorizado pela União Europeia (Directivas 2010/67/UE e 2010/69/UE).



Figura 1: *Rosmarinus officinalis* L.

Fonte: <https://www.plantes-shopping.fr/medias/boutique/rosmarinus-officinalis-capri/rosmarinus-capri.jpg>

Hortelã

A hortelã (*Mentha spicata* L.), da família Lamiaceae, é uma espécie de origem híbrida, cultivada por todo o mundo apesar de proveniente da região mediterrânica (**Figura 2**). É uma espécie vigorosa, com folhas lisas a rugosas, flores em espigas delgadas, corola lilacénea branca ou rosada e frutos castanho-avermelhados a negros. Como todos os géneros *Mentha*, locais frescos e húmidos favorecem o seu desenvolvimento, sendo cultivada sobretudo em quintais, jardins e hortas. A hortelã tem um aroma forte e agradável. A parte mais utilizada desta planta aromática são as folhas. As folhas têm como principais constituintes, flavonóides (apigenol e rutósido), taninos, ácidos fenólicos e triterpenos (Cunha, Ribeiro e Roque, 2014; Cunha, Roque e Nogueira, 2012).

A hortelã tem acção espasmolítica, anti-séptica e estimulante das secreções gástricas. Os flavonóides presentes na hortelã são responsáveis por estas acções (Cunha, Ribeiro e Roque, 2014).

Em **fitoterapia**, as folhas de hortelã são usadas em problemas digestivos. O óleo essencial é aplicado em fricções nas dores reumáticas e musculares e também nas bronquites. As folhas da planta são muito utilizadas na culinária para aromatizar diversos pratos da gastronomia portuguesa, como sopas e açordas. Devido ao seu gosto agradável também são usadas em infusões, “coktails” e bebidas (Cunha, Ribeiro e Roque, 2014; Cunha, Roque e Nogueira, 2012).



Figura 2: *Mentha spicata* L.

Fonte: <http://img.botanicayjardines.com/mentha-spicata-4161/01-mentha-spicata-flor-medium.jpg>

Hortelã-Pimenta

A hortelã-pimenta (*Mentha x piperita* L.), da família Lamiaceae, é uma espécie híbrida, cultivada na Europa, América do Norte e Ásia por via vegetativa (híbrido infecundo e estável) (Figura 3). É uma planta herbácea vigorosa, variando entre 50 a 70 cm de altura, com flores de tonalidade púrpura, corola rosa-lilacénea e folhas serradas. Desenvolve-se em solos férteis, bem drenados e areno-argilosos, com pH compreendido entre 6 a 7,5. A hortelã-pimenta possui um aroma picante. A parte mais utilizada desta planta aromática são as folhas. As folhas têm como principais constituintes, flavonóides sob forma livre (flavonas fortemente metoxiladas) e sob a forma de heterósidos, ácidos fenólicos (*p*-cumárico, cafeico, rosmarínico, fenílico, clorogénico), constituintes amargos, resinas, triterpenos e taninos (Cunha, Ribeiro e Roque, 2014; Cunha, Roque e Gaspar, 2013; Cunha, Roque e Nogueira, 2012).

As folhas da hortelã-pimenta têm diversas ações farmacológicas devidas principalmente aos polifenóis. Os polifenóis têm ação expectorante, espasmolítica e descongestionante nasal (Cunha, Ribeiro e Roque, 2014).

Em **fitoterapia**, as folhas desta planta aromática são usadas para inibir espasmos da musculatura lisa (tracto gastrointestinal). O óleo essencial é usado externamente em mialgias e internamente em inflamações da mucosa oral. Pelas suas propriedades anti-sépticas, o óleo essencial de hortelã-pimenta é empregue como aromatizante em alimentos e na cosmética. O mentol (constituente maioritário do óleo essencial 30 a 55 %), faz parte de diversos produtos usados na higiene bucal (elixires bucais, dentífricos, etc). A hortelã-pimenta também é usada em infusões, como aromatizante de bebidas e como condimento (Cunha, Ribeiro e Roque, 2014; Cunha, Roque e Nogueira, 2012).



Figura 3: *Mentha x piperita* L.

Fonte: http://farm4.static.flickr.com/3152/2871924525_2ae1a6ac58.jpg

Manjeriço

O manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), da família Lamiaceae, diz-se ser proveniente da África e da Índia, sendo cultivado em todo o mundo nos dias de hoje (**Figura 4**). É uma planta herbácea anual, varia entre 20 a 60 cm de altura, com folhas de tonalidade verde-escura e flores com corola de cor branca a rosada. Desenvolve-se em solos férteis, prefere locais húmidos e não demasiado frios. A parte mais utilizada desta planta aromática são as folhas. As folhas têm como principais constituintes, flavonóides (campferol, esculósido, quercetrósido), ácidos fenólicos (cafeico), sais minerais, saponósidos e taninos (Cunha, Ribeiro e Roque, 2014).

As folhas do manjeriço têm diversas acções farmacológicas, têm um efeito estimulante do apetite e da digestão. O óleo essencial de manjeriço possui acção cicatrizante e anti-séptica (Cunha, Ribeiro e Roque, 2014).

Em **fitoterapia**, as folhas desta planta aromática são utilizadas em dificuldades digestivas e em náuseas. O extracto glicólico das partes aéreas floridas ou das folhas, incorporado em cremes e loções, são úteis como rejuvenescedor da pele e actuam também como protector solar. Em **aromaterapia**, o óleo essencial é usado no alívio de sintomas reumáticos. O óleo essencial da espécie de *Ocimum basilicum* é frequentemente usado em perfumes e para aromatizar géneros alimentícios, sendo também aplicado na cosmética e em detergentes. As folhas de manjeriço também são utilizadas na culinária, como condimento em alimentos, nomeadamente em saladas (Cunha, Ribeiro e Roque, 2014; Cunha, Roque e Nogueira, 2012).



Figura 4: *Ocimum basilicum* L.

Fonte: <http://silvestris-essentialoils.com/wp-content/uploads/2014/09/basil-oil.jpg>

Manjerona

A manjerona (*Origanum majorana* L.), da família Lamiaceae, é proveniente da região mediterrânica e Próximo Oriente, sendo cultivada em solos não muito ácidos e prefere locais de clima quente (**Figura 5**). Esta espécie é um caméfito sublenhoso, variando entre 40 a 60 cm de altura, as folhas apresentam uma tonalidade verde esbranquiçada e flores com corola de cor branca ou rosada. A manjerona possui um aroma ligeiramente amargo, tanto pelas suas folhas como pela parte florida (apesar de muito aromáticas). A parte mais utilizada desta planta aromática são as sumidades floridas. A manjerona tem como principais constituintes, nas partes floridas, flavonóides (derivados do apigenol, campferol, diosmetol vitexina e luteolol), ácidos fenólicos (clorogénico, rosmarínico cerca de 2 % e cafeico), fitoesteróis, hidroquinona,

taninos (4,5 %) e constituintes amargos (Cunha, Ribeiro e Roque, 2014; Cunha, Roque e Nogueira, 2012).

A manjerona tem diversas acções farmacológicas principalmente devidas aos flavonóides, ácidos fenólicos e hidroquinona. Estes constituintes possuem actividade anti-séptica urinária e a nível externo actuam como cicatrizante (Cunha, Ribeiro e Roque, 2014; Cunha, Roque e Nogueira, 2012).

Em **fitoterapia**, as partes floridas desta planta aromática são empregues para combater a ansiedade, cólicas gastrointestinais, flatulência e em digestões difíceis. Em **aromaterapia**, o óleo essencial é usado no tratamento de sinusites e bronquites crónicas. As partes floridas da manjerona também são utilizadas na culinária, como condimento, em saladas e em produtos de charcutaria. O óleo essencial desta espécie é empregue principalmente a nível industrial, para aromatizar molhos e alimentos pré-preparados sendo também usado para obter licores (Cunha, Ribeiro e Roque, 2014; Cunha, Roque e Nogueira, 2012).



Figura 5: *Origanum majorana* L.

Fonte: <http://pantrygardenherbs.com/files/2010/12/June-July-089.jpg>

Orégão

O orégão (*Origanum vulgare* L.), da família Lamiaceae, é proveniente da Europa e subespontânea no Médio Oriente (**Figura 6**). Esta espécie prefere solos calcários, bem drenados, pedregosos em zonas montanhosas e clima ameno. Em Portugal, esta planta aromática desenvolve-se espontaneamente nas margens do rio Minho, noutros locais do Noroeste, em matos e sebes (locais frescos com pouca humidade). É uma planta herbácea vigorosa, varia entre 30 a 50 cm de altura, tem folhas planas com limbo oval e corola com tonalidade branca ou rosada (cor variável nesta espécie). A parte mais utilizada desta planta

aromática são as partes aéreas floridas. O orégão tem como principais constituintes, nas partes aéreas floridas, flavonóides (derivados do apigenol, campferol, luteolol, diosmetol), ácidos polifenólicos (clorogénico, rosmarínico, cafeico), constituintes amargos, taninos e triterpenos (Cunha, Ribeiro e Roque, 2014; Cunha, Roque e Gaspar, 2013; Cunha, Roque e Nogueira, 2012).

O óleo essencial de orégão possui actividade farmacológica devido principalmente ao carvacrol e timol actuando assim como antifúngico e antibacteriano. Os compostos polifenólicos presentes no orégão são responsáveis pela acção antioxidante e anti-inflamatória, sendo o ácido rosmarínico o constituinte com maior importância nestas acções (Cunha, Roque e Gaspar, 2013; Cunha, Roque e Nogueira, 2012).

Em **fitoterapia**, esta planta é utilizada para combater cólicas gastrointestinais, afecções broncopulmonares e perda de apetite. A parte aérea florida do orégão também é muito utilizada na culinária como aromatizante em diversos tipos de alimentos, sendo bastante adicionado em pizzas. O óleo essencial de *Origanum vulgare* é usado pela indústria alimentar em alimentos pré-preparados, licores e em molhos. Também é aplicado a variados perfumes. Um estudo realizado, comprova que este óleo essencial manifestou uma intensa actividade contra *Aspergillus*, revelando a sua possível aplicação como antifúngico na conservação de alimentos (Cunha, Ribeiro e Roque, 2014; Cunha, Roque e Gaspar, 2013; Cunha, Roque e Nogueira, 2012).



Figura 6: *Origanum vulgare* L.

Fonte: <http://www.floristtaxonomy.com/wp-content/uploads/2015/05/8-24-04-073.jpg>

Tomilho

O tomilho (*Thymus vulgaris* L.), da família Lamiaceae, é proveniente da Europa Meridional e cultivado em todo o mundo (Figura 7). Este subarbusto, varia entre 10 a 30 cm de porte, com folhas pequenas e ovais e flores com corola purpúrea ou vermelha (raramente brancas). As partes utilizadas desta planta aromática são as folhas e as partes aéreas floridas. Na parte aérea florida o tomilho tem como principais constituintes, ácidos fenólicos (rosmarínico e cafeico), flavonóides (derivados do apigenol e luteolol), saponósidos triterpénicos de geninas dos ácidos ursólico e oleanólico, taninos (10 %) (Cunha, Roque e Gaspar, 2013; Cunha, Roque e Nogueira, 2012).

O tomilho possui diversas actividades farmacológicas devidas aos seus constituintes fenólicos, como flavonóides e ácidos fenólicos, tendo actividade antioxidante, antifúngica e antibacteriana como também acção expectorante e antiespasmódica (Cunha, Roque e Gaspar, 2013; Cunha, Roque e Nogueira, 2012).

Em **fitoterapia**, a parte aérea florida do tomilho é utilizada para combater problemas das vias respiratórias como bronquite, catarros e gripe. Esta espécie é muito utilizada na culinária, para aromatizar peixe, queijo, carne, caça, saladas e na elaboração de molhos. Também o óleo essencial é empregue para aromatizar alimentos pré-preparados, detergentes e perfumes. O óleo essencial de *Thymus vulgaris* evidencia propriedades fungicidas e bactericidas, indicando a sua possível aplicação na preservação de alimentos (Cunha, Roque e Gaspar, 2013; Cunha, Roque e Nogueira, 2012).



Figura 7: *Thymus vulgaris* L.

Fonte: <http://esa.ipb.pt/biochemcore/images/images/Listagem/Tomilho%20vulgar.jpg>

Tomilho-Limão

O tomilho-limão (*Thymus x citriodora*), da família Lamiaceae, é uma espécie híbrida cultivada unicamente por via vegetativa, na região mediterrânica (Figura 8). Desenvolve-se em solos bem drenados, prefere solos calcários e clima quente (Cunha, Roque e Gaspar, 2013; Pereira et al., 2011).

Esta planta aromática é extensivamente cultivada em jardins, destacando-se pelo seu forte e agradável aroma cítrico (óleo essencial tem na sua constituição citral), também é utilizada em tisanas como digestivo. O óleo essencial obtido a partir desta planta é de enorme interesse para aplicação em perfumes (Cunha, Roque e Gaspar, 2013). A espécie *Thymus x citriodora* é utilizada desde há várias décadas no tratamento de variados problemas respiratórios e actua como agente antifúngico e anti-séptico (Pereira et al., 2011).



Figura 8: *Thymus x citriodora*

Fonte: <http://fotos.sapo.pt/fatimarocha/fotos/?uid=zaQGRqqDtqOOOR2hwhuH#grande>

Estragão

O estragão (*Artemisia dracunculus* L.), da família Asteraceae, é uma espécie proveniente da Rússia meridional, Himalaias, Sibéria e Mongólia (Figura 9). Esta planta aromática é cultivada por toda a Europa, sendo também cultivada em Portugal. É uma planta vigorosa, varia entre 1,00 a 1,20 m de altura, ramosa, de folhas inteiras, diferenciando-se por isso das outras espécies do género *Artemisia*, em que as suas folhas são normalmente mais ou menos

recortadas. O aroma de *Artemisia dracunculus* é menos apreciado. A parte mais utilizada desta planta aromática são as folhas. As folhas têm como principais constituintes, flavonóides, hidroxycumarinas, taninos e constituintes amargos (Cunha, Ribeiro e Roque, 2014; Cunha, Roque e Nogueira, 2012).

As folhas de estragão possuem diversas acções farmacológicas, nomeadamente, acções espasmolíticas e eupépticas. Já ao seu óleo essencial são atribuídas acções anti-sépticas, estrogénica e ligeiramente vermífugas (Cunha, Ribeiro e Roque, 2014; Cunha, Roque e Nogueira, 2012).

Em **fitoterapia**, esta planta aromática é utilizada nas más digestões, na flatulência, nas dispepsias hipossecretoras e como estimulante do apetite. A nível externo, o óleo essencial pode ser usado em fricções para combater dores reumáticas e musculares. Em **aromaterapia**, tem-se empregue o óleo essencial como estimulante, vermífugo e estomáquico. Esta espécie também é usada na composição de diversos perfumes. Na **cosmética**, extractos glicólicos da planta são incorporados em cremes e loções, que são úteis para combater as rugas e a pele inflamada mas também ajudam a estimular a circulação sanguínea. O estragão é muito utilizado na culinária, pelo sabor intenso e fresco das suas folhas, em saladas, grelhados, estufados e em molhos (preferencialmente folhas frescas ou congeladas). Também é empregue na aromatização de azeites, vinagres e bebidas (Cunha, Ribeiro e Roque, 2014; Cunha, Roque e Nogueira, 2012; Karimi *et al.*, 2015b).



Figura 9: *Artemisia dracunculus* L.

Fonte: http://thefreerangelife.com/wp-content/uploads/2013/10/IMG_0594.jpg

Stevia

A stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), da família Asteraceae (Rao *et al.*, 2014; Thiyagarajan e Venkatachalam, 2012; Yadav *et al.*, 2011), é uma espécie proveniente das regiões montanhosas do Nordeste do Paraguai, na fronteira com o Brasil (Figura 10) (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012; Pande e Gupta, 2013; Yoda *et al.*, 2003). É uma planta subtropical semi-húmida (Madan *et al.*, 2010), que prefere teores médios de matéria orgânica, pH do solo de 6,5 a 7, boa permeabilidade e drenagem. A stevia não tolera solos excessivamente húmidos ou com muita matéria orgânica (Bernardi, 2012). É uma pequena planta perene (Bondarev, Reshetnyak e Nosov, 2001; Brandle, Starratt e Gijzen, 1998), que cresce até 65 cm de altura (Brandle, Starratt e Gijzen, 1998), possui pequenas folhas elípticas (Goettemoeller e Ching, 1999) e flores pequenas (7-15 mm) de tonalidade branca (Brandle, Starratt e Gijzen, 1998; Lemus-Mondaca *et al.*, 2012) com corolas de garganta roxa pálida (Gupta *et al.*, 2013; Lemus-Mondaca *et al.*, 2012; Pande e Gupta, 2013).

A *Stevia rebaudiana* Bertoni é uma planta natural, não calórica e é utilizada em todo o mundo devido ao seu sabor doce intenso (Thiyagarajan e Venkatachalam, 2012). É uma das 230 espécies do género de *Stevia* e uma das duas únicas que produzem glicosídeos de steviol doces. Para além da *Stevia rebaudiana* Bertoni, apenas a espécie *Stevia phlebophylla* produz glicosídeos de steviol doces (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012). Os glicosídeos de steviol presentes nas folhas de stevia, são cerca de 300 vezes mais doces do que a sacarose (Bondarev, Reshetnyak e Nosov, 2001; Goettemoeller e Ching, 1999; Phansawan e Pounbangpho, 2007). Desde 1970 que os extractos de stevia têm sido amplamente utilizados em muitos países como substituto do açúcar (Abdullateef e Osman, 2011; Goettemoeller e Ching, 1999).

Além dos glicosídeos, as folhas de stevia contêm outros constituintes, nomeadamente, flavonóides, ácidos fenólicos, vitaminas, proteínas e ácidos gordos. Devido ao alto teor destes constituintes, os extractos de stevia demonstraram possuir actividade antimicrobiana, anti-hipertensiva, anti-tumoral, anti-inflamatória, hepatoprotectora e imunomoduladora (Gawel-Beben *et al.*, 2015).

A stevia é utilizada para a produção de adoçantes não calóricos, sendo uma alternativa natural aos agentes edulcorantes sintéticos (Pande e Gupta, 2013). As folhas podem ser consumidas frescas ou secas e podem ser fervidas no chá para libertar o edulcorante (Abdullateef e Osman, 2011). Os glicosídeos de steviol são actualmente usados como adoçante em vários alimentos industriais, nomeadamente, refrigerantes ou sumos de fruta, sobremesas, produtos de confeitaria frios, molhos, iguarias, milho doce, pães, biscoitos e edulcorantes de mesa (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012).



Figura 10: *Stevia rebaudiana* Bertoni

Fonte: <http://pollynoble.com/wp-content/uploads/2013/08/stevia3.jpg>

1.2. Agricultura Biológica

A agricultura biológica é uma prática agrícola que tem como finalidade produzir alimentos de elevada qualidade, saudáveis e em simultâneo promover práticas sustentáveis e impacto positivo no ecossistema agrícola (Agrobio, 2011). Assim, através do uso adequado de técnicas preventivas e culturais, tais como, a rotação de culturas, adubos verdes (sideração), controlo biológico das doenças e pragas, cobertura de solo com substratos vivos, recurso às consociações, instalação de sebes vivas, promover a melhoria da fertilidade do solo e a biodiversidade (Agrobio, 2011; Cunha, Roque e Gaspar, 2013).

Na agricultura biológica não é permitido o uso de plantas transgênicas e a utilização de produtos químicos de síntese (fertilizantes), e há restrições no uso de antibióticos, auxiliares tecnológicos e aditivos alimentares. Assim, a agricultura biológica apresenta várias vantagens comparativamente à agricultura convencional, uma vez aplica técnicas de cultivo que visam a preservação do ambiente e da qualidade dos alimentos (pelo uso limitado de químicos), enquanto que na agricultura convencional utilizam tecnologias para produzir em grande escala, usam herbicidas e fertilizantes sintéticos, diminuindo assim a qualidade dos alimentos e causando um grande impacto a nível ambiental (Cunha, Roque e Gaspar, 2013; Pimentel *et al.*, 2005).

Se fossem adoptadas várias tecnologias orgânicas (produção biológica) em sistemas de produção convencionais actuais, seria provavelmente benéfico. Essas tecnologias incluem: empregar culturas fora de época; utilizar rotações de culturas mais prolongadas, que actuam tanto na conservação dos recursos solo e água, como na redução de insectos, doenças e problemas com ervas daninhas; aumentar o nível de matéria orgânica do solo, o que ajuda a

conservar os recursos hídricos e mitigar os efeitos da seca nas culturas; empregar biodiversidade natural para reduzir ou eliminar o uso de fertilizantes de azoto, herbicidas, insecticidas e fungicidas. Algumas ou todas estas tecnologias têm o potencial de aumentar a sustentabilidade ecológica, energética e económica de todos os sistemas de cultivo agrícola, não apenas nos sistemas orgânicos (Pimentel *et al.*, 2005).

A agricultura biológica está legislada segundo o Regulamento (CE) n.º 834/2007, relativo à produção biológica e à rotulagem dos produtos biológicos. O Regulamento (CE) n.º 889/2008 estabelece normas de execução do Regulamento (CE) n.º 834/2007, no que respeita à produção biológica, à rotulagem e ao controlo. A agricultura biológica já é uma prática habitual na cultura de plantas aromáticas, especialmente nas plantas utilizadas para a preparação de infusões (Cunha, Ribeiro e Roque, 2014).

1.3. Oxidação lipídica de alimentos

Uma das principais causas da deterioração da qualidade dos alimentos é a peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica dá origem à formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e radicais livres. As ROS e os radicais livres estão associados a doenças cardiovasculares, carcinogénese, mutagénese, inflamações, mudanças no ADN e também ao envelhecimento (Roby *et al.*, 2013).

A oxidação tem consequências negativas a nível da qualidade nutricional e propriedades organolépticas dos alimentos: diminuição do valor nutricional, nomeadamente, a destruição de ácidos gordos essenciais e de vitaminas A, D, E e K, solúveis em lípidos; diminuição do teor calórico; desenvolvimento de maus sabores e odores em consequência da degradação oxidativa lipídica; mudanças de cor, tais como, o escurecimento de gorduras e óleos, mitigação de pigmentos e a perda de aroma (Nerín, Tovar e Salafranca, 2008; Nićiforović *et al.*, 2010). No entanto, os alimentos com um teor de gordura baixo, mesmo aqueles com menos de 1%, também são afectados por reacções de degradação oxidativa (Nerín, Tovar e Salafranca, 2008). Assim, o uso de antioxidantes em lípidos ou em alimentos que contêm lípidos, minimiza a degradação oxidativa, retarda a formação de produtos oxidantes tóxicos, mantém a qualidade nutricional e aumenta o prazo validade (vida útil) dos alimentos (Roby *et al.*, 2013).

Os antioxidantes podem ser classificados como antioxidantes naturais ou sintéticos. Os antioxidantes fenólicos sintéticos, nomeadamente, o BHA (butil-hidroxianisole), o BHT (butil-hidroxitolueno), o PG (galato de propilo) e o TBHQ (*terc*-butil-hidroquinona) são bastante utilizados na indústria alimentar, uma vez que inibem eficazmente a oxidação. No

entanto, tem sido associado a estas substâncias efeitos adversos para a saúde humana (Brewer, 2011; Roby *et al.*, 2013; Rockenbach, 2008). As plantas aromáticas e especiarias são ricas em antioxidantes naturais, apresentando um teor elevado em compostos fenólicos (Gaweł-Bęben *et al.*, 2015).

A indústria alimentar tem demonstrado um interesse crescente em compostos fenólicos, por prevenirem a degradação oxidativa dos lípidos, melhorando a qualidade e o valor nutricional dos alimentos e, deste modo, o aumento da vida útil dos produtos alimentares (Kaushik *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011).

1.4. Compostos bioactivos: Compostos fenólicos

1.4.1. Principais grupos de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos, uma grande classe de substâncias biologicamente activas, são metabolitos secundários de plantas (Balasundram, Sundram e Samman, 2006; Ignat, Volf e Popa, 2011; Iranshahi *et al.*, 2015; Maruf *et al.*, 2015), que são determinantes na qualidade nutricional e sensorial de frutas, legumes e outras plantas (Ignat, Volf e Popa, 2011). São caracterizados por apresentarem pelo menos um anel aromático (C6) ligado a um ou mais grupos hidroxilo (Balasundram, Sundram e Samman, 2006; Ignat, Volf e Popa, 2011; Kruma *et al.*, 2008; Maruf *et al.*, 2015; Suh *et al.*, 2014). As estruturas dos compostos fenólicos podem variar bastante, desde uma molécula fenólica simples a um polímero complexo de elevada massa molecular, existindo assim uma grande diversidade destes compostos (Balasundram, Sundram e Samman, 2006; Ignat, Volf e Popa, 2011).

A actividade antioxidante dos compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redox, que lhes permitem actuar como agentes redutores, doadores de hidrogénio e desactivadores de oxigénio singleto (Barchan *et al.*, 2014), eliminando assim espécies reactivas de oxigénio (ROS), como radicais superóxido, peróxido de hidrogénio e hidroxilo (Yoo *et al.*, 2008), tendo sido reportado o seu papel preventivo no desenvolvimento de cancro e doenças cardiovasculares (Kim *et al.*, 2011).

A actividade antioxidante das plantas aromáticas deve-se principalmente ao elevado teor de ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido cafeico e ácido rosmarínico), flavonóides (quercetina, catequina, naringenina e campferol), diterpenos fenólicos (carnosol, ácido carnósico, rosmanol e rosmadial) e óleos voláteis (eugenol, carvacrol, timol e mentol) (Gaweł-Bęben *et al.*, 2015).

Os ácidos fenólicos dividem-se em dois grupos: ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos. Os ácidos hidroxibenzóicos mais comuns são o ácido protocatecuico, o ácido *p*-hidroxibenzóico, o ácido gálico, o ácido vanílico e o ácido sirínico, apresentando em comum a estrutura C6-C1 (**Figura 11**). Os ácidos hidroxicinâmicos mais comuns são o ácido cafeico, o ácido *p*-cumárico, o ácido ferúlico e o ácido sinápico. Os ácidos hidroxicinâmicos são compostos aromáticos com uma cadeia lateral de três carbonos (C3-C6) (**Figura 12**) (Balasundram, Sundram e Samman, 2006; Ignat, Volf e Popa, 2011).

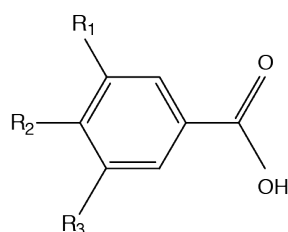


Figura 11: Estrutura básica de um ácido hidroxibenzóico (adaptado de: Ignat, Volf e Popa, 2011).

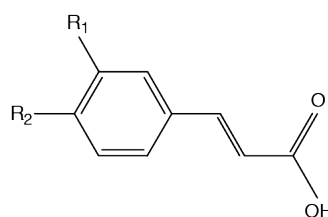


Figura 12: Estrutura básica de um ácido hidroxicinâmico (adaptado de: Ignat, Volf e Popa, 2011).

Os flavonóides constituem o maior grupo de compostos fenólicos em plantas. Já foram identificados mais de 8000 compostos fenólicos, sendo que mais de 4000 são flavonóides. Os flavonóides podem ser classificados em flavonas, antocianinas, flavonóis, flavanonas e isoflavonas, sendo constituídos por quinze átomos de carbono, apresentando a estrutura C6-C3-C6. Os flavonóides são compostos de baixo peso molecular e a sua estrutura é composta por dois anéis aromáticos, unidos por uma ponte de carbono, normalmente na forma de um anel heterocíclico (Balasundram, Sundram e Samman, 2006; Ignat, Volf e Popa, 2011). Os flavonóides estão presentes em vários alimentos, especialmente em frutas e legumes. Estes compostos apresentam características anticancerígenas, podendo ser capazes de diminuir o risco de aparecimento de cancro, através de mecanismos de prevenção da oxidação e da inflamação, diminuindo a angiogénese e a proliferação celular (Huang *et al.*, 2015).

Os estilbenos estão presentes na dieta humana em pequenas quantidades e o principal representante é o resveratrol. Este composto existe em ambas as formas *cis* e *trans* (em formas glicosiladas). O resveratrol é produzido pelas plantas em resposta a várias condições de *stress* ou por infecções por patogénicos (Ignat, Volf e Popa, 2011).

De seguida, apresentam-se as estruturas químicas dos compostos fenólicos estudados no presente trabalho. Os compostos fenólicos antioxidantes estudados, provenientes de diversas plantas aromáticas, podem ser divididos em 5 grupos: ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e ácido rosmarínico) (Figuras 13 - 19), flavonóides (miricetina, hesperetina, epicatequina e quercetina) (Figuras 20 - 23), estilbeno (resveratrol) (Figura 24), diterpenos fenólicos (carnosol e ácido carnósico) (Figuras 25 - 26) e óleos voláteis (eugenol, carvacrol e timol) (Figuras 27 - 29) (Brewer, 2011; Cunha, Roque e Gaspar, 2013; Hong *et al.*, 2014; Ignat, Volf e Popa, 2011; Iranshahi *et al.*, 2015; Srinivasan, Sudheer e Menon, 2007).

Ácidos fenólicos

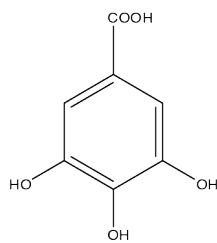


Figura 14: Estrutura química do ácido gálico ($C_7H_6O_5$) (adaptado de: Brewer, 2011).

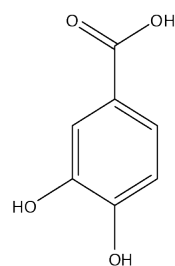


Figura 13: Estrutura química do ácido protocatecuico ($C_7H_6O_4$) (adaptado de: Brewer, 2011).

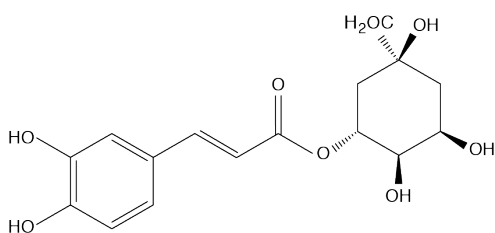


Figura 16: Estrutura química do ácido clorogénico ($C_{16}H_{18}O_9$) (adaptado de: Hwang *et al.*, 2015).

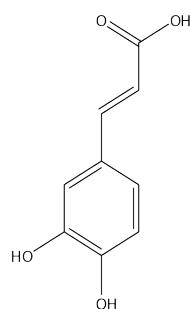


Figura 15: Estrutura química do ácido cafeico ($C_9H_8O_4$) (adaptado de: Brewer, 2011).

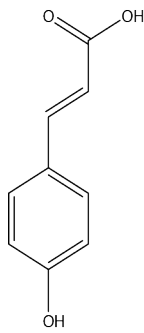


Figura 18: Estrutura química do ácido *p*-cumárico ($C_9H_8O_3$) (adaptado de: Brewer, 2011).

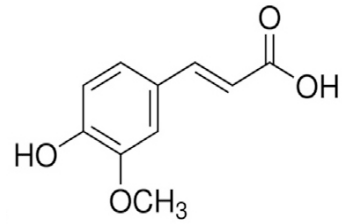


Figura 17: Estrutura química do ácido ferúlico ($C_{10}H_{10}O_4$) (adaptado de: Maruf et al., 2015).

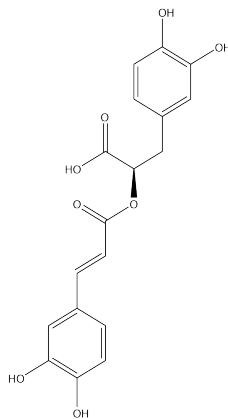


Figura 19: Estrutura química do ácido rosmarínico ($C_{18}H_{16}O_8$) (adaptado de: Brewer, 2011).

Favonóides

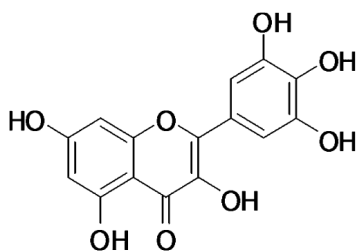


Figura 21: Estrutura química da miricetina ($C_{15}H_{10}O_8$) (adaptado de: Hong et al., 2014).

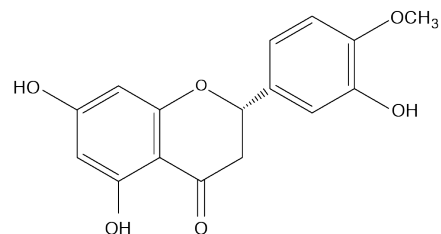


Figura 20: Estrutura química da hesperetina ($C_{16}H_{14}O_6$) (adaptado de: Iranshahi et al., 2015).

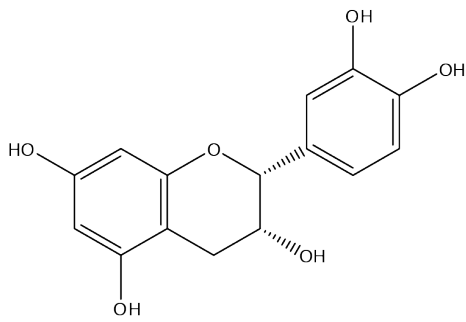


Figura 23: Estrutura química da epicatequina ($C_{15}H_{14}O_6$) (adaptado de: Brewer, 2011).

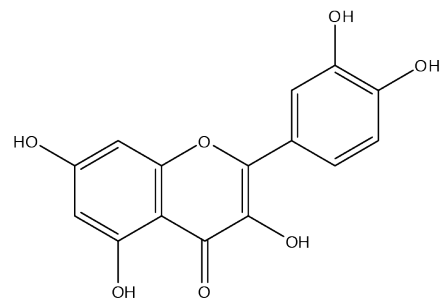


Figura 22: Estrutura química da quercetina ($C_{15}H_{10}O_7$) (adaptado de: Brewer, 2011).

Estilbeno

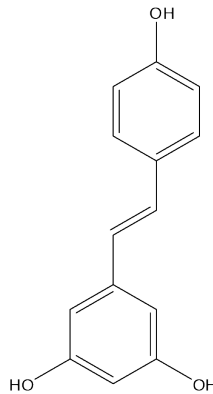


Figura 24: Estrutura química do resveratrol ($C_{14}H_{12}O_3$) (adaptado de: Brewer, 2011).

Diterpenos fenólicos

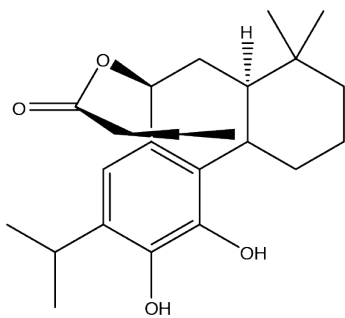


Figura 25: Estrutura química do carnosol ($C_{20}H_{26}O_4$) (adaptado de: Brewer, 2011).

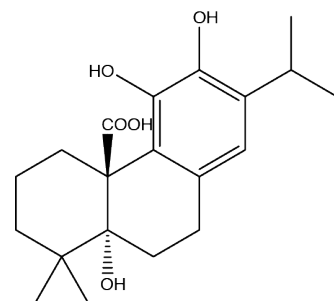


Figura 26: Estrutura química do ácido carnólico ($C_{20}H_{28}O_4$) (adaptado de: Brewer, 2011).

Óleos voláteis

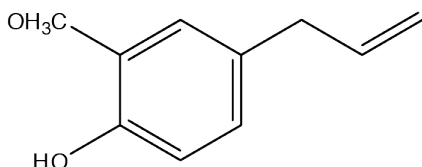


Figura 28: Estrutura química do eugenol (C₁₀H₁₂O₂) (adaptado de: Brewer, 2011).

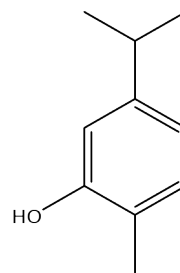


Figura 27: Estrutura química do carvacrol (C₁₀H₁₄O) (adaptado de: Brewer, 2011).

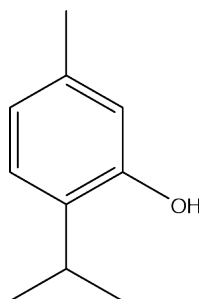


Figura 29: Estrutura química do timol (C₁₀H₁₄O) (adaptado de: Brewer, 2011).

1.4.2. Efeitos dos compostos fenólicos na saúde humana

No corpo humano, o desequilíbrio entre a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e as defesas antioxidantes, resultante de uma produção excessiva de espécies reactivas de oxigénio ou de uma deficiência nas defesas antioxidantes, pode causar danos oxidativos em lípidos celulares, proteínas e ADN. Este desequilíbrio denomina-se de *stress oxidativo*, estando associado a diversas doenças, nomeadamente, vários tipos de cancro, desordens do foro neurológico, doenças cardiovasculares, diabetes, cirrose, e também tem sido relacionado com o processo de envelhecimento (Barchan *et al.*, 2014; Ferreira e Abreu, 2007; Hamidpour *et al.*, 2014).

Existem dois principais mecanismos de defesas antioxidantes: defesas antioxidantes enzimáticas e defesas antioxidantes não enzimáticas. As defesas antioxidantes enzimáticas incluem enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GPH-Px), a

catalase (CAT) e a glutathione redutase (GPH-R). As defesas antioxidantes não enzimáticas incluem compostos como o α -tocoferol (vit. E), a glutathione (GSH), o ácido lipóico, o ácido ascórbico (vit. C), os carotenóides e os flavonóides (Ferreira e Abreu, 2007; Yoo *et al.*, 2008).

Os diterpenos fenólicos e os ácidos fenólicos são os principais responsáveis pela actividade biológica (Sedighi *et al.*, 2015). Os flavonóides exibem efeitos benéficos na saúde humana, devido às suas propriedades biológicas, nomeadamente, propriedade antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana e imunoestimulante (Halliwell, Rafter e Jenner, 2005; Iranshahi *et al.*, 2015).

Assim, os antioxidantes presentes na dieta são de enorme importância, uma vez que actuam como possíveis agentes protectores, ajudando o corpo humano na redução dos danos oxidativos (Ferreira e Abreu, 2007). Na **Tabela I** estão apresentados alguns dos efeitos dos compostos fenólicos estudados na saúde humana.

Tabela 1: Efeitos na saúde humana dos diversos compostos fenólicos estudados no presente trabalho.

Grupos de Compostos Fenólicos	Compostos	Efeitos na saúde humana	Referências
Ácidos fenólicos	Ácido gálico	Actividade antioxidante; Propriedades anti-inflamatórias; Actuam contra várias doenças como cancro, diabetes e doenças neurodegenerativas. Diminuição do risco cardiovascular.	Huang <i>et al.</i> , 1988; Jabri-Karoui <i>et al.</i> , 2012; Kakkar e Bais, 2014; Monti <i>et al.</i> , 2011; Ozguner, Bardak e Comlekci, 2006; Reis, 2014; Soong e Barlow, 2006; Srinivasan, Sudheer e Menon, 2007; Zhao e Hu, 2013
	Ácido protocatecuico		
	Ácido clorogénico		
	Ácido cafeico		
	Ácido <i>p</i> -cumárico		
	Ácido ferúlico		
	Ácido <i>trans</i> -hidroxicinâmico		
	Ácido rosmarínico		
Flavonóides	Miricetina	Actividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, anticancerígena e efeito antialérgico; Redução da artrite reumatóide e da perda progressiva de memória; Indução da apoptose, antimutagénese e inibição da lipoxigenase; Diminuição de doenças cardíacas; Reforça os vasos sanguíneos e a imunidade.	Bruneton, 2001; Formica e Regelson, 1995; Iranshahi <i>et al.</i> , 2015; Maiti <i>et al.</i> , 2005
	Hesperetina		
	Epicatequina		
	Quercetina		
Estilbeno	Resveratrol	Previne doenças cardiovasculares; Protecção contra vários tipos de cancro, diabetes e doenças neurodegenerativas (ex. doença de Alzheimer).	Kiselev, 2011
Terpenos	Eugenol	Acção anticancerígena; Antioxidante e hepatoprotector.	Bruneton, 2001; Kumaravelu <i>et al.</i> , 1996
	Carvacrol		
	Timol		
	Carnosol		
	Ácido carnósico		

1.4.3. Compostos fenólicos na indústria alimentar

O desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis nos alimentos, a perda de ácidos gordos polinsaturados, a perda de vitaminas solúveis em gordura e de pigmentos e, a menor aceitação pelos consumidores, são um resultado directo da oxidação lipídica (Christaki *et al.*, 2012; Formanek *et al.*, 2001). Assim, os problemas relacionados com a oxidação de alimentos têm-se resolvido pela adição de antioxidantes naturais ou sintéticos ao produto alimentar, que podem ser incorporados durante o processo ou no fim da produção (Nerín, Tovar e Salafranca, 2008).

Os antioxidantes sintéticos, nomeadamente, o BHA, o BHT, o TBHQ e o PG são bastante utilizados na indústria alimentar para a conservação de alimentos. Os antioxidantes sintéticos são eficazes e menos dispendiosos relativamente aos antioxidantes naturais. Contudo, a segurança dos antioxidantes sintéticos tem sido questionada, uma vez que estão associados ao BHA e ao BHT efeitos adversos na saúde, designadamente a nível carcinogénico. Assim, com o interesse crescente na substituição de antioxidantes sintéticos por naturais, têm sido desenvolvidos vários estudos em plantas, pela procura de antioxidantes naturais seguros e eficazes (Ahmad *et al.*, 2011; Barchan *et al.*, 2014; Formanek *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2013; Moure *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 2012; Roby *et al.*, 2013; Urbančič *et al.*, 2014; Yanishlieva, Marinova e Pokorný, 2006; Zhang *et al.*, 2006).

A utilização de antioxidantes naturais, nomeadamente de compostos fenólicos, em produtos alimentares está relacionada com a melhoria do valor nutricional dos alimentos e com o aumento do seu prazo de validade (Santos, 2009). Várias plantas aromáticas e especiarias, designadamente, o alecrim, o orégão, o pimento, o tomilho, a salva, o manjerição, o cravinho, a canela e a noz-moscada, assim como algumas vitaminas (ácido ascórbico e α -tocoferol), contêm componentes antioxidantes. Os antioxidantes fenólicos naturais, assim como os sintéticos, são capazes de absorver a luz ultravioleta (UV), eliminar os radicais livres e quelar metais, inibindo ou mesmo parando a progressão de danos auto-oxidativos e o desenvolvimento de odores e sabores desagradáveis (Brewer, 2011). Os extractos fenólicos mais utilizados na indústria alimentar, são provenientes de diferentes produtos vegetais e de plantas aromáticas, como o alecrim (Nerín, Tovar e Salafranca, 2008). As propriedades antioxidantes das plantas aromáticas estão relacionadas principalmente com a sua estrutura fenólica, deste modo, a sua acção antioxidante é semelhante à dos antioxidantes fenólicos sintéticos (BHA, BHT, TBHQ e PG) (Formanek *et al.*, 2001). Assim, os extractos de especiarias, plantas aromáticas e outros produtos vegetais têm um grande interesse para a

indústria alimentar, principalmente os que contêm um teor elevado em compostos fenólicos (Wojdyło, Oszmiański e Czemerys, 2007).

Os antioxidantes sintéticos estão aprovados como aditivos alimentares, apesar da legislação estabelecer cada vez mais restrições da sua utilização nos géneros alimentícios, encontrando-se limitados segundo o Regulamento (CE) n.º. 1129/2011 da Comissão Europeia. Devido à preocupação crescente com a segurança dos antioxidantes sintéticos, tornou-se fundamental procurar uma alternativa aos antioxidantes sintéticos, nomeadamente de substâncias antioxidantes naturais (Formanek *et al.*, 2001). No entanto, os consumidores também exigem cada vez mais alimentos naturais (sem aditivos químicos) (Bentayeb *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2007), preferindo evitar os aditivos sintéticos, devido à maior segurança e menor toxicidade dos antioxidantes naturais (Nerín, Tovar e Salafranca, 2008). A indústria apresenta uma necessidade de produzir alimentos com um tempo de vida útil maior com a finalidade de expandir a distribuição comercial dos seus produtos. Assim, tanto os interesses dos consumidores como os da indústria são salvaguardados (Bentayeb *et al.*, 2007).

1.4.4. Métodos para determinar compostos fenólicos

1.4.4.1. Fenólicos totais

O método mais utilizado para determinar a quantidade de compostos fenólicos totais é o método de Folin-Ciocalteu. São vários os estudos publicados recentemente na literatura em que os autores utilizam este método para determinar o conteúdo em compostos fenólicos totais em plantas aromáticas, nomeadamente, Hossain *et al.* (2010), Miron *et al.* (2011), Bianchin e Carpes (2012), Chan *et al.* (2012), Jordán *et al.* (2013), Malik, Sharma e Soni (2013), Roby *et al.* (2013), Scherer *et al.* (2013), Zeng *et al.* (2013), Barchan *et al.* (2014), Akhtar, Ihsan-ul-Haq e Mirza (2015), Gawel-Bęben *et al.* (2015), entre outros.

O sistema é caracterizado por uma mistura de ácidos, fosfotungstíco e fosfomolibídico (tonalidade amarelada) (Rivelli, 2010; Sousa *et al.*, 2007; Tomei e Salvador, 2007), em meio básico. Os compostos fenólicos contidos nas amostras são oxidados em meio básico, o que resulta na formação de O_2^- . O O_2^- formado na solução, devido à oxidação dos fenólicos, ao reagir com os ácidos origina o desenvolvimento de uma coloração azul na solução, com intensa absorvância (Rivelli, 2010; Tomei e Salvador, 2007), medida a 725 nm.

1.4.4.2. Flavonóides totais

O método mais utilizado para determinar a quantidade de flavonóides totais é um ensaio espectrofotométrico. Este ensaio baseia-se na formação de um complexo entre o íon Al^{+3} e um grupo carbonilo (Rivelli, 2010), formando-se uma coloração rosada na solução, com absorção a 510 nm. Foram encontrados diversos trabalhos publicados na literatura em que os autores utilizam esta metodologia para determinar o conteúdo de flavonóides totais em plantas aromáticas, tais como, Bianchin e Carpes (2012), Chan *et al.* (2012), Jabri-Karoui *et al.* (2012), Nickavar e Esbati (2012), Durić *et al.* (2013), Sutradhar *et al.* (2013), Khaled-Khodja, Boulekbache-Makhlouf e Madani (2014), Akhtar, Ihsan-ul-Haq e Mirza (2015), Gaweł-Bęben *et al.* (2015) e Megdiche-Ksouri *et al.* (2015), entre outros estudos.

1.4.4.3. Determinação cromatográfica de compostos fenólicos

Entre outras técnicas cromatográficas disponíveis, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC - *High Pressure Liquid Chromatography*) é a técnica analítica mais utilizada para a análise de plantas (Tistaert, Dejaegher e Heyden, 2011). A HPLC ocupa uma posição de enorme importância na determinação de compostos fenólicos (Spáčil, Nováková e Solich, 2008). Esta técnica é fácil de operar e permite obter uma elevada resolução, sensibilidade e selectividade (Tistaert, Dejaegher e Heyden, 2011). Geralmente, em HPLC são utilizadas colunas C18 de fase reversa, um gradiente binário de solventes e as fases móveis são compostas por água acidificada e um solvente orgânico polar (acetoneitrilo ou metanol). Podem ser utilizados diferentes detectores, nomeadamente um detector ultravioleta-visível (UV-Vis) ou um detector de arranjo de díodos (DAD), sendo que o detector MS (espectrometria de massas) é o mais usado para identificar compostos fenólicos (Spáčil, Nováková e Solich, 2008).

No entanto, nos últimos anos foram desenvolvidas melhorias nesta técnica (HPLC) pela necessidade de diminuir o tempo de análise e manter ou melhorar o desempenho analítico, tendo como principais modificações, a redução do tamanho das colunas cromatográficas e das partículas da fase estacionária (Maldaner e Jardim, 2012; Tistaert, Dejaegher e Heyden, 2011). Destas modificações surgiu a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC - *Ultra High Performance Liquid Chromatography*), sendo que esta técnica se fundamenta nos mesmos princípios de separação da HPLC. As principais vantagens da UHPLC relativamente à HPLC, devem-se à utilização de colunas cromatográficas de dimensões reduzidas, de fases estacionárias com partículas inferiores a 2 μ m, elevadas velocidades lineares da fase móvel e um sistema capaz de operar a pressões elevadas (até 15000 psi), aumentando

a resolução e detectabilidade, diminuindo consideravelmente o tempo de análise (Maldaner e Jardim, 2012; Tistaert, Dejaegher e Heyden, 2011). Foram desenvolvidos detectores, com as modificações necessárias, para serem utilizados nas determinações por UHPLC, nomeadamente, detectores UV-Vis, DAD e MS (Maldaner e Jardim, 2012).

Para a análise dos compostos fenólicos em plantas aromáticas, o método mais utilizado é o HPLC-DAD (Akhtar, Ihsan-ul-Haq e Mirza, 2015; Babovic *et al.*, 2010; Dorman *et al.*, 2004; Erkan, Ayranci e Ayranci, 2008; Gawęł-Bęben *et al.*, 2015; Hossain *et al.*, 2010; Hossain *et al.*, 2011; Justesen e Knuthsen, 2001; Martins *et al.*, 2015; Papageorgiou, Mallouchos e Komaitis, 2008; Shan *et al.*, 2005; Wang, Provan e Helliwell, 2004; Zheng e Wang, 2001), seguindo-se de HPLC-UV (Fecka e Turek, 2008; Jabri-Karoui *et al.*, 2012; Kosar *et al.*, 2003; Muanda *et al.*, 2011; Proestos *et al.*, 2005; Roby *et al.*, 2013; Sroka, Fecka e Cisowski, 2005; Terpinč, Bezjak e Abramovič, 2009; Wojdyło, Oszmiański e Czemerzys, 2007), LC-MS (Ghanta *et al.*, 2007; Miron *et al.*, 2011; Shivanna *et al.*, 2013) e HPLC-MS (Martins *et al.*, 2015). Da revisão bibliográfica realizada, apenas foram encontrados três métodos desenvolvidos em UHPLC e todos foram com detector MS. Um dos métodos permite quantificar o ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido rosmarínico, carnosol e ácido carnósico (Herrero *et al.*, 2010), outro método permite quantificar o ácido carnósico e carnosol (Bentayeb *et al.*, 2007), enquanto que o outro permite quantificar apenas ácido clorogénico (Melo e Sawaya, 2015).

1.5. Métodos para determinar a capacidade antioxidante *in vitro*

1.5.1. Sistema de inibição do radical DPPH

O sistema de inibição do radical DPPH é um dos métodos mais utilizados para determinar a actividade antioxidante em plantas aromáticas (Akhtar, Ihsan-ul-Haq e Mirza, 2015; Barchan *et al.*, 2014; Durić *et al.*, 2013; Gawęł-Bęben *et al.*, 2015; Jordán *et al.*, 2013; Khaled-Khodja, Boulekbache-Makhlouf e Madani, 2014; Mandal e Madan, 2013; Martins *et al.*, 2015; Megdiche-Ksouri *et al.*, 2015; Nickavar e Esbati, 2012; Scherer *et al.*, 2013; Shukla *et al.*, 2012).

O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) é um radical livre, que ao reagir com um antioxidante se reduz a 1,1-difenil-1-picril-hidrazilo, tornando-se numa molécula estável (Ahmad *et al.*, 2010; Barchan *et al.*, 2014; Jabri-Karoui *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2007), com absorção a 517 nm. A reacção baseia-se na perda da cor púrpura da solução, que ocorre

quando o átomo de azoto do DPPH· se reduz ao receber um átomo de hidrogénio a partir do componente antioxidante (Barchan *et al.*, 2014; Scherer *et al.*, 2013), desenvolvendo-se uma coloração amarela na solução (Barchan *et al.*, 2014; Sousa *et al.*, 2007).

O desaparecimento do DPPH· é directamente proporcional à quantidade de antioxidante presente na mistura (Ghanta *et al.*, 2007). A concentração de extracto que é necessária para causar uma inibição de 50 % DPPH· é definida pelo valor de EC₅₀ (Khaled-Khodja, Boulekbache-Makhlouf e Madani, 2014). O DPPH· proporciona um método para avaliar a actividade antioxidante num tempo relativamente mais curto, comparativamente a outros métodos (Ghanta *et al.*, 2007).

1.5.2. Teste do branqueamento do β-Caroteno

O teste do branqueamento do β-Caroteno é um método competitivo directo (Roginsky e Lissi, 2005). Este método baseia-se na perda da cor laranja (descoloração/branqueamento) do β-caroteno devido à reacção com os radicais livres (radicais peróxilos) formados pela oxidação do ácido linoleico na emulsão (Barchan *et al.*, 2014; Terpinč, Bezjak e Abramovič, 2009), monitorizada espectrofotometricamente pelo decréscimo de absorvância na região visível a 470 nm (Roginsky e Lissi, 2005).

A taxa de branqueamento do β-caroteno pode ser retardada na presença de um antioxidante (Barchan *et al.*, 2014), que doa um átomo de hidrogénio para desactivar o radical livre, resultando na formação de um radical antioxidante e um derivado lipídico (Terpinč, Bezjak e Abramovič, 2009).

I.6. Embalagens alimentares activas com antioxidantes naturais

A crescente procura dos consumidores por alimentos minimamente processados, mais naturais, produtos alimentares frescos e convenientes, assim como inovações no processamento industrial, representam grandes desafios para a segurança e a qualidade dos alimentos (Realini e Marcos, 2014). Assim, a indústria de embalagens desempenha um papel relevante na disponibilização de soluções inovadoras para lidar com as novas exigências da indústria alimentar e dos consumidores (Realini e Marcos, 2014).

Neste contexto, as embalagens alimentares activas são um excelente exemplo de inovação na área das embalagens alimentares nas últimas décadas. As funções das embalagens alimentares activas vão para além das funções das embalagens tradicionais, no qual a embalagem, o produto e o seu ambiente interagem para prolongar a vida útil dos alimentos, melhorar a sua segurança e propriedades sensoriais, mantendo ou melhorando simultaneamente a qualidade do alimento embalado (Braga e Peres, 2010; Hosseinejad, 2014; Realini e Marcos, 2014).

A embalagem activa inclui aditivos que são capazes de absorver ou eliminar oxigénio, dióxido de carbono, etileno, humidade e/ou compostos que causam maus odores e sabores nos alimentos. Outras incluem libertadores de antioxidantes e/ou outros agentes de conservação, aromas e agentes antimicrobianos (Hosseinejad, 2014; Nerín, Tovar e Salafranca, 2008; Trzcińska *et al.*, 2007).

Nas embalagens activas, uma alternativa para evitar a oxidação de alimentos é a incorporação de antioxidantes nos materiais de embalagem (Realini e Marcos, 2014). Os agentes antioxidantes podem ser aplicados em sistemas de embalagem de diferentes formas, sendo uma delas a incorporação na matriz do polímero (Realini e Marcos, 2014). A finalidade da utilização destas embalagens é de preservar e manter a qualidade dos alimentos, impedindo a deterioração e a patogenicidade, ao longo da cadeia de distribuição e no período de armazenamento, até chegar ao consumidor (Wani, Singh e Langowski, 2014).

O uso de aditivos alimentares em alimentos frescos e em muitos produtos utilizados como matéria-prima não é permitido. Assim, a incorporação de antioxidantes ao material de embalagem apresenta vantagens comparativamente à adição directa de antioxidantes a alimentos, nomeadamente, requer quantidades mais baixas de substâncias activas, apresenta actividade localizada à superfície do alimento, permite a libertação controlada de antioxidantes e a eliminação de passos no processamento (mistura, imersão ou pulverização). Deste modo, a embalagem activa representa uma estratégia inovadora para incorporar antioxidantes num

polímero com a finalidade de evitar processos de oxidação e aumentar a vida útil de produtos alimentares (Bentayeb *et al.*, 2007; Realini e Marcos, 2014; Sarantópoulos e Dantas, 2012).

A utilização de embalagens activas na União Europeia é permitida segundo o Regulamento (CE) n.º. 1935/2004, relativo aos materiais e objectos destinados a entrar em contacto com os alimentos e segundo o Regulamento (CE) n.º. 450/2009, relativo aos materiais e objectos activos e inteligentes destinados a entrar em contacto com os alimentos.

2 OBJECTIVOS

Na primeira parte do presente estudo, o objectivo principal é analisar dez espécies de plantas aromáticas (secas e frescas) recorrendo a quatro ensaios: sistema de inibição do radical DPPH, teste do branqueamento do β -caroteno e determinação do conteúdo em compostos fenólicos totais e flavonóides totais. Estes métodos permitem verificar quais as plantas que apresentam maior capacidade antioxidante, conteúdo em fenólicos totais e flavonóides totais. As plantas aromáticas seleccionadas pertencem maioritariamente à família das Lamiáceas, nomeadamente, o alecrim, a hortelã, a hortelã-pimenta, o manjeriço, a manjerona, o orégão, o tomilho e o tomilho-limão. As espécies restantes pertencem à família das Asteráceas, designadamente, o estragão e a stevia. Pretende-se analisar, das espécies de plantas aromáticas seleccionadas, plantas de agricultura biológica para posterior comparação com as plantas de agricultura convencional.

Na segunda parte do presente estudo, pretende-se desenvolver e validar um método em Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com detector de fotodíodos (UHPLC-DAD), que permita quantificar simultaneamente dezanove compostos fenólicos, nomeadamente, ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido clorogénico, ácido cafeico, epicatequina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido 2-hidroxicinâmico, ácido rosmarínico, miricetina, resveratrol, ácido *trans*-hidroxicinâmico, quercetina, hesperetina, eugenol, carvacrol, timol, carnosol e ácido carnósico. O método validado, será aplicado para a quantificação dos compostos antioxidantes presentes nas plantas aromáticas seleccionadas na fase inicial deste estudo.

Os estudos realizados na presente dissertação têm como objectivo final verificar quais as plantas aromáticas (das seleccionadas) que possuem maior capacidade antioxidante e consequentemente quais teriam maior potencial para serem usadas para preparar extractos a ser incorporados em embalagens alimentares activas antioxidantes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os métodos elaborados neste estudo, foram realizados entre o laboratório de bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e o laboratório do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P..

3.1. Amostras

Na preparação dos extractos das diferentes plantas aromáticas estudadas, foram utilizadas amostras secas e frescas de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), hortelã (*Mentha spicata* L.), manjerona (*Origanum majorana* L.), orégão (*Origanum vulgare* L.), tomilho (*Thymus vulgaris* L.), estragão (*Artemisia dracunculus* L.) e manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) (**Figura 30**). Para a stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), apenas foram adquiridas amostras da planta fresca.

Analisou-se também amostras (secas) provenientes de agricultura biológica, nomeadamente, de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), hortelã-pimenta (*Mentha x piperita* L.), manjerona (*Origanum majorana* L.), orégão (*Origanum vulgare* L.), tomilho-limão (*Thymus x citriodora*) e estragão (*Artemisia dracunculus* L.). No decurso da presente dissertação, estas amostras serão referidas como amostras orgânicas.

As amostras das plantas aromáticas secas e frescas foram adquiridas desde Janeiro até Abril de 2015, entre Coimbra e Lisboa, em lojas e num mercado local.



Figura 30: Algumas das plantas aromáticas seleccionadas para o estudo.

3.2. Determinação da humidade por perda de peso

Inicialmente procedeu-se à determinação da humidade das plantas aromáticas com a finalidade de comparar (em peso seco) as amostras frescas e secas. Tanto as amostras frescas como as secas foram levadas à secura até peso constante. O procedimento foi idêntico para as amostras no estado fresco e seco, apenas com pequenas modificações. A determinação da humidade foi realizada em duplicado.

Para cada amostra de planta aromática fresca, colocou-se numa cápsula areia calcinada, com o intuito de aumentar a superfície de evaporação, e uma vareta para auxiliar na desagregação da amostra. Colocou-se este conjunto na estufa a 100 °C durante uma hora. Após uma hora na estufa, retirou-se com uma pinça metálica e deixou-se arrefecer o conjunto (cápsula + areia + vareta) num exsiccador (**Figura 32**), anotou-se imediatamente o peso. Começou-se por pesar para a cápsula 5 g de amostra homogeneizada e misturou-se bem com a areia calcinada. De seguida, colocou-se a cápsula que contém a amostra na estufa de vácuo a 70 °C, para que não ocorressem perdas dos constituintes voláteis aromáticos presentes nas plantas, durante duas horas. Após as duas horas, retirou-se a cápsula, deixou-se arrefecer num exsiccador e anotou-se o peso imediatamente. A secagem da amostra prosseguiu-se, com mais duas idas sucessivas à estufa de vácuo, uma durante três horas, e como o peso ainda era variável, colocou-se novamente a cápsula durante duas horas e anotou-se o peso final (peso constante em relação à última pesagem), deixando-se sempre arrefecer a cápsula em exsiccador antes de cada pesagem.

Para cada amostra de planta aromática seca, procedeu-se como descrito anteriormente, apenas com algumas alterações. Para a amostra seca, utilizou-se apenas a cápsula (**Figura 31**) e não o conjunto (cápsula + areia + vareta). O tempo de secagem também se modificou, mantendo-se a temperatura do ar de secagem a 70 °C. Inicialmente colocou-se a cápsula durante uma hora na estufa de vácuo, depois durante três horas, e para se obter peso constante, colocou-se a cápsula mais uma hora.

Para a determinação da percentagem de humidade recorreu-se à seguinte fórmula (1):

$$\%Humidade = \frac{Perda\ de\ Peso}{Peso\ da\ Amostra} \times 100 \quad (1)$$

Onde, a *perda de peso* é a diferença entre o peso inicial e peso final da amostra e o *peso da amostra* é o peso inicial da amostra.

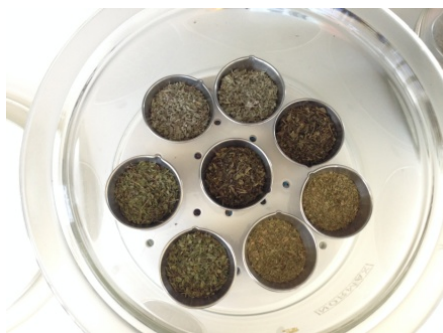


Figura 31: Amostras secas.



Figura 32: Exsicador com amostras.

3.3. Preparação dos extractos das plantas aromáticas

Na extracção das diversas plantas aromáticas foram realizadas duas extracções consecutivas. O solvente utilizado na extracção foi o metanol. Começou-se por homogeneizar a amostra recorrendo a uma picadora. De seguida, pesou-se 0,25 g de planta seca ou 2 g de planta fresca para um tubo de centrifuga e adicionou-se 25 mL de metanol. Agitou-se as soluções durante 10 minutos num agitador. Após agitação, as soluções foram centrifugadas durante 10 minutos a 2000 x g. Retirou-se o sobrenadante, com uma pipeta de Pasteur, para um balão de evaporação. Ao resíduo da amostra, adicionou-se novamente 25 mL de metanol, prosseguindo-se com a segunda extracção, com o mesmo procedimento que a primeira. Depois de terminadas as duas extracções, colocou-se o balão de evaporação no evaporador rotativo a 40 °C, e deixou-se evaporar até se obter um volume final inferior mas próximo de 10 mL. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, retirou-se o extracto obtido para um balão volumétrico de 10 mL e perfez-se com metanol. As extracções foram realizadas em triplicado (Figura 33).



Figura 33: Extractos de alecrim orgânico (*Rosmarinus officinalis* L.).

3.4. Determinação da capacidade antioxidante *in vitro*, compostos fenólicos totais e flavonóides totais

Nesta secção estão descritos os procedimentos utilizados para a determinação da actividade antioxidante *in vitro*, pelo sistema de inibição do radical livre DPPH e pelo teste do branqueamento/descoloração do β -caroteno. Também estão referidas as metodologias utilizadas para a determinação do conteúdo em compostos fenólicos totais e o conteúdo em flavonóides totais.

3.4.1. Reagentes, solventes e padrões

Os reagentes utilizados foram hidróxido de sódio da marca Merck (Darmstadt, Alemanha), carbonato de sódio da May & Baker (Dagenham, Inglaterra), cloreto de alumínio (Sigma-Aldrich Co. LLC., USA), clorofórmio da marca Fisher Scientific (UK Limited, UK). O reagente fenol Folin & Ciocalteu's, nitrito de sódio, DPPH', β -caroteno, ácido linoleico e tween 40 foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

O solvente utilizado foi o metanol de grau HPLC da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

Os padrões utilizados para preparar as curvas padrão foram o ácido gálico e a epicatequina adquiridos à Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A água ultrapura utilizada era proveniente de um sistema de purificação da Milli-Q (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

3.4.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados para a realização dos métodos foram: uma estufa Schutzart DIN 40050-ip20 (Schwabath, Alemanha), uma estufa de vácuo (vacuo term) da Selecta e bomba Edwards (Mod. BS2208, GEC LTD, Inglaterra), uma trituradora Krups (Mod. GVA241/6R0, Group SEB S.A., França) (**Figura 34**), uma balança analítica AG285 Mettler Toledo (Lisboa, Portugal), um bloco de aquecimento SHT I da Stuart Scientific (Burlington, USA), agitador horizontal HS 501D da IKA®-Labortechnik (Staufen, Alemanha) (**Figura 35**), uma centrífuga Sigma modelo 3-16 K (Harz, Alemanha) (**Figura 37**), um evaporador rotativo RE-111 e bomba de vácuo V-700 da Büchi (Flawil, Suíça) (**Figura 36**), um agitador magnético Agimatic 243 (Barcelona, Espanha) e um espectrofotómetro U-3900 da Hitachi (Tóquio, Japão).



Figura 34: Picadora Krups, com amostra de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) fresco.

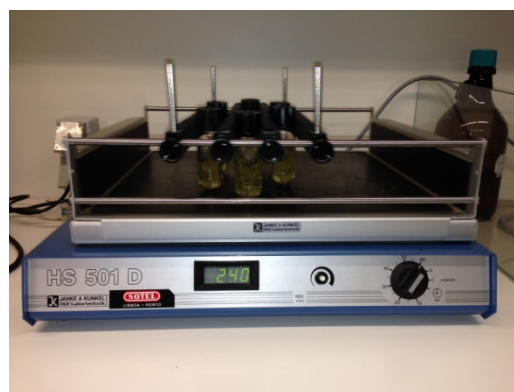


Figura 35: Agitador horizontal.



Figura 37: Evaporador rotativo Büchi.



Figura 36: Centrífuga Sigma.

3.4.3. Determinação da capacidade antioxidante *in vitro*

3.4.3.1. Sistema de inibição do radical livre DPPH

Para a realização deste método seguiu-se a metodologia descrita por Moure *et al.*, (2001). Inicialmente, preparou-se uma solução metanólica de DPPH[•] ($3,6 \times 10^{-5}$ M). Fizeram-se seis diluições (em duplicado) com diferentes concentrações, a partir dos extractos preparados previamente (em triplicado), para cada planta aromática (descrito em 3.3.).

Adicionou-se 100 μ L de cada diluição a tubos contendo 4 mL da solução de DPPH[•]. Preparou-se o branco adicionando-se 100 μ L de metanol a 4 mL da solução DPPH[•]. Guardaram-se as soluções ao abrigo da luz, durante 30 minutos. Após este período, mediram-se as absorvâncias a 517 nm num espectrofotómetro, verificando-se o decréscimo das absorvâncias em relação ao valor do branco (Figura 38).

Determinou-se a percentagem de inibição do radical DPPH, para as várias concentrações de cada amostra, segundo a equação (2):

$$\%Inibição = \frac{Abs\ Branco - Abs\ 30\ min}{Abs\ Branco} \times 100 \quad (2)$$

Onde, Abs_{branco} é a absorvância do branco e Abs_{30min} é a absorvância da amostra a $t=30$ minutos (Roby *et al.*, 2013).

A partir dos resultados, elaborou-se curvas de calibração de percentagem de inibição (IP %) *versus* concentração (mg/mL), obtendo-se uma equação linear para cada curva. A partir desta equação, determinou-se a concentração que ocasionava uma percentagem de inibição de 50 % (EC_{50}) (Scherer *et al.*, 2013).

Assim, o valor de EC_{50} , corresponde à concentração de extracto que é necessária para causar uma inibição de 50 % do radical DPPH. Os valores mais baixos de EC_{50} correspondem a uma actividade antioxidante mais elevada da amostra (Khaled-Khodja, Boulekbache-Makhlouf e Madani, 2014).

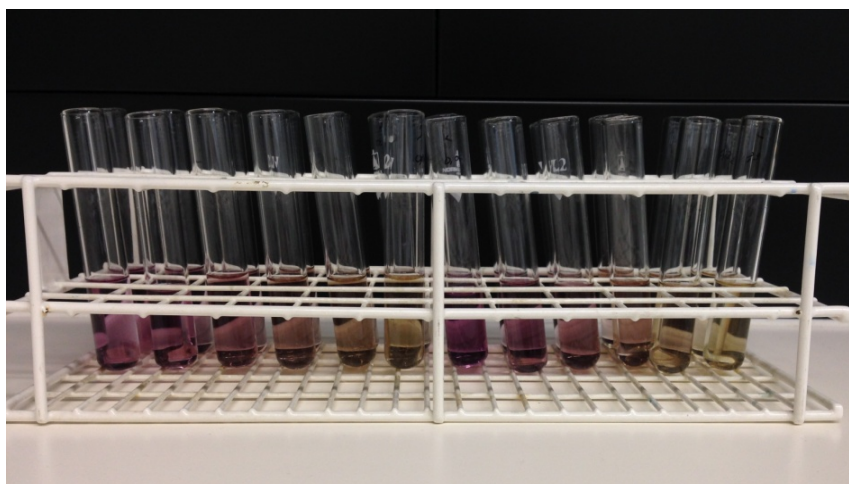


Figura 38: Tubos contendo diferentes concentrações do extracto em DPPH*.

3.4.3.2. Teste do branqueamento do β -caroteno

Para a realização deste ensaio seguiu-se a metodologia desenvolvida por Miller (1971), apenas com algumas modificações. Num balão volumétrico de 10 mL, começou-se por preparar uma solução de β -caroteno (2,0 mg) dissolvido em clorofórmio. A um balão de evaporação, adicionou-se 200 mg de Tween 40, 20 mg de ácido linoleico e 1 mL da solução de β -caroteno. De seguida, colocou-se o balão no evaporador rotativo a 40 °C, para a remoção do clorofórmio. De modo a evaporar totalmente o clorofórmio, colocou-se o balão sob corrente de azoto. Adicionou-se ao balão 50 mL de água ultrapura (previamente oxigenada) e agitou-se vigorosamente para formar uma emulsão estável (**Figura 39**).

Para cada tubo, adicionou-se uma alíquota de 5 mL da emulsão de β -caroteno e 0,2 mL de amostra. Para fazer o branco, adicionou-se 5 mL da emulsão de β -caroteno e 0,2 mL de metanol. A absorvância do branco no tempo zero, foi lida a 470 nm num espectrofotómetro, e usou-se metanol como controlo. Seguidamente colocaram-se as amostras e os brancos num bloco de aquecimento a 50 °C. Após duas horas, registou-se a absorvância das amostras e dos brancos a 470 nm. Realizou-se o ensaio em triplicado (**Figura 40**).

Para este ensaio, recorreu-se ao coeficiente de actividade antioxidante (AAC) para a determinação da actividade antioxidante das amostras. O AAC calculou-se segundo a equação (3):

$$AAC = \left(\frac{A_{E120} - A_{b120}}{A_{b0} - A_{b120}} \right) \times 1000 \quad (3)$$

Onde, A_{E120} é a absorvância do extracto aos 120 minutos, a A_{b120} é a absorvância do branco aos 120 minutos e A_{b0} é a absorvância do branco no tempo zero.



Figura 39: Emulsão estável de β -caroteno.

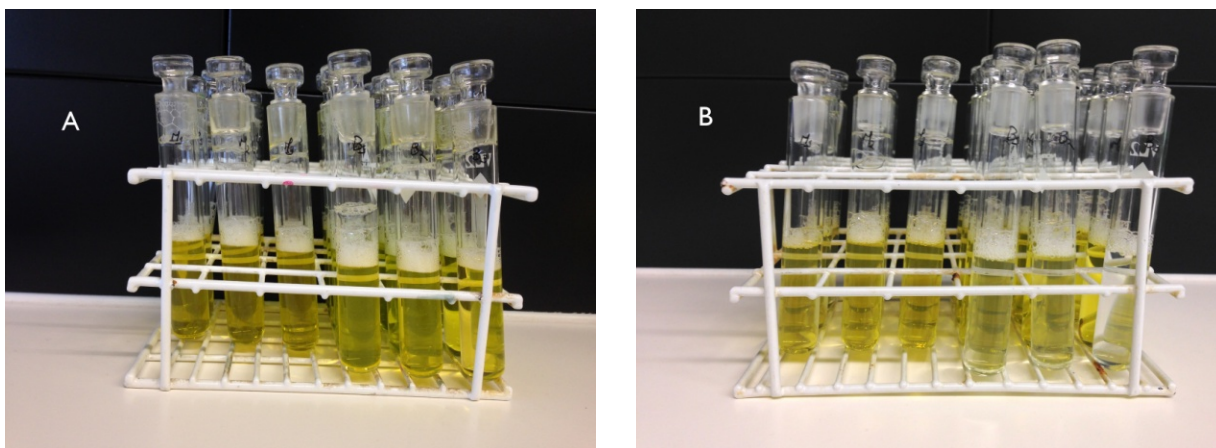


Figura 40: Ensaio do branqueamento do β -caroteno. A e B, tubos contendo amostra de manjerona (*Origanum majorana* L.), ao tempo zero e após duas horas, respectivamente.

3.4.4. Determinação de compostos fenólicos totais e de flavonóides totais

3.4.4.1. Determinação dos compostos fenólicos totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais foi realizada segundo a metodologia descrita por Erkan, Ayranci e Ayranci (2008). Inicialmente preparou-se uma solução de reagente Folin-Ciocalteu diluído dez vezes em água ultrapura e uma solução aquosa de carbonato de sódio (Na_2CO_3) com uma concentração de 60 mg/mL.

A uma alíquota de 1 mL de cada extracto de planta (descrito em 3.3.), misturou-se 7,5 mL da solução de reagente Folin-Ciocalteu. Depois de repousar durante 5 minutos à temperatura ambiente, adicionou-se 7,5 mL da solução aquosa de Na_2CO_3 . Guardou-se as soluções ao abrigo da luz, durante duas horas. Após as duas horas, mediu-se a absorvância das soluções a 725 nm num espectrofotómetro e usou-se metanol como branco. Realizou-se o ensaio em triplicado. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg GAE/g amostra).

Calculou-se os equivalentes de ácido gálico (GAE) por grama de amostra, de acordo com a equação (4):

$$C = c \times \frac{vf}{m} \quad (4)$$

Onde, C é o conteúdo de compostos fenólicos totais (mg de GAE/g de amostra), c é a concentração de ácido gálico (mg/mL), vf é o volume final de extracto (mL) e m é a quantidade de amostra usada na extracção (g).

3.4.4.1.1. Preparação da curva padrão do ácido gálico

Preparou-se uma solução *stock* de ácido gálico, dissolvido em metanol, com a concentração de 10 mg/mL. A partir da solução *stock*, fez-se uma solução intermédia com a concentração de 0,5 mg/mL. A partir da solução intermédia de ácido gálico, prepararam-se seis soluções com diferentes concentrações. De modo a que as absorvâncias das amostras estivessem inseridas no intervalo da curva padrão, verificou-se que as concentrações compreendidas entre 0,015 mg/mL e 0,12 mg/mL, originavam absorvâncias no intervalo necessário para determinar a concentração das amostras.

De seguida, procedeu-se como descrito em 3.4.4.1., para as soluções de diferentes concentrações (P1 a P6). Realizou-se o ensaio em triplicado. A curva de calibração absorvância versus concentração de ácido gálico (mg/mL), foi elaborada com a média das absorvâncias obtidas para cada concentração (Figura 41).



Figura 41: Tubos contendo soluções padrão para a determinação da curva padrão do ácido gálico.

3.4.4.2. Determinação dos flavonóides totais

A determinação do conteúdo em flavonóides totais foi realizada segundo a metodologia descrita por Yoo *et al.* (2008), apenas com algumas modificações. Inicialmente preparou-se uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2) a 5 % (p/v), uma solução de cloreto de alumínio (AlCl_3) a 10 % (p/v) e uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 M, em água ultrapura.

Adicionou-se uma alíquota de 1 mL de cada extracto de planta (descrito em 3.3.), aos tubos contendo 4 mL de água ultrapura, perfazendo-se um volume de 5 mL. No tempo zero,

adicionou-se 0,3 mL de NaNO₂ a 5 % (p/v) e homogeneizou-se a solução. Após 5 minutos, adicionou-se 0,6 mL de AlCl₃ a 10 % (p/v) e voltou-se a homogeneizar a solução. Após um período de 6 minutos, adicionou-se 2 mL de NaOH 1 M e 2,1 mL de água ultrapura, perfazendo-se um volume de 10 mL. Mediu-se as absorvâncias de imediato, a um comprimento de onda de 510 nm num espectrofotómetro e usou-se metanol como branco. Realizou-se o ensaio em triplicado. Os resultados foram expressos em equivalentes de epicatequina por grama de amostra (mg ECE/g amostra).

Calculou-se os equivalentes de epicatequina (ECE) por grama de amostra, de acordo com a equação (5):

$$C = c \times \frac{vf}{m} \quad (5)$$

Onde, *C* é o conteúdo de flavonóides totais (mg de ECE/g de amostra), *c* é a concentração de epicatequina (mg/mL), *vf* é o volume final de extracto (mL) e *m* é a quantidade de amostra usada na extracção (g).

3.4.4.2.1. Preparação da curva padrão de epicatequina

Preparou-se uma solução *stock* de epicatequina, dissolvida em metanol, com a concentração de 10 mg/mL. A partir da solução *stock*, fez-se uma solução intermédia com a concentração de 0,5 mg/mL. A partir da solução intermédia de epicatequina, fizeram-se oito diluições de diferentes concentrações. De modo a que as absorvâncias das amostras estivessem inseridas no intervalo da curva padrão, verificou-se que as concentrações compreendidas entre 0,05 mg/mL e 0,45 mg/mL, originavam absorvâncias no intervalo necessário para determinar a concentração das amostras.

De seguida, procedeu-se como descrito em 3.4.4.2., para as diluições de diferentes concentrações (P1 a P8). Realizou-se o ensaio em triplicado. A curva de calibração absorvância *versus* concentração de epicatequina (mg/mL) foi elaborada com a média das absorvâncias obtidas para cada concentração (Figura 42).

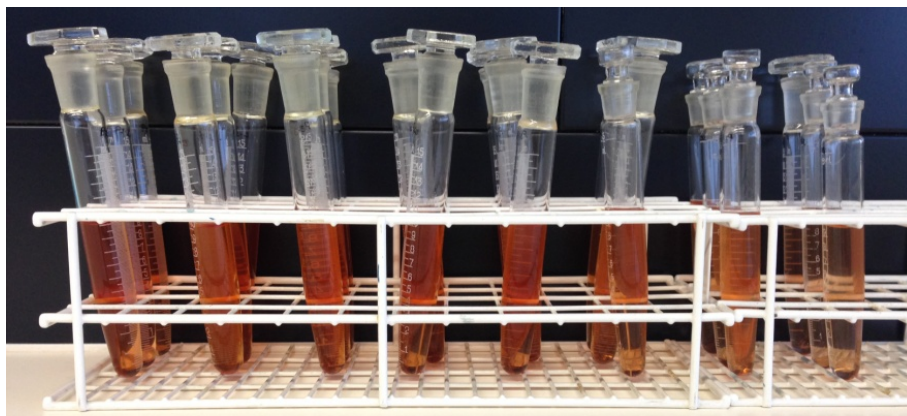


Figura 42: Tubos contendo soluções padrão para a determinação da curva padrão de epicatequina.

3.5. Determinação de compostos fenólicos por UHPLC-DAD

Nesta secção estão descritos os procedimentos e as condições cromatográficas optimizadas para o desenvolvimento e validação do método de 19 compostos fenólicos. A determinação dos compostos fenólicos foi realizada para as amostras descritas em 3.1..

3.5.1. Reagentes, solventes e padrões

Os solventes de grau HPLC, acetonitrilo e metanol, foram adquiridos à BDH Prolabo (Leuven, Bélgica). Utilizou-se também, ácido acético da marca Panreac Química (Barcelona, Espanha). A água ultrapura era proveniente de um sistema de purificação da Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, EUA).

Utilizaram-se 19 padrões analíticos, adquiridos à Sigma-Aldrich (Madrid, Espanha): ácido gálico (CAS n° 149-91-7), ácido protocatecuico (CAS n° 99-50-3), ácido clorogénico (CAS n° 327-97-9), ácido cafeico (CAS n° 331-39-5), epicatequina (CAS n° 490-46-0), ácido *p*-cumárico (CAS n° 7400-08-0), ácido ferúlico (CAS n° 1135-24-6), ácido 2-hidroxicinâmico (CAS n° 583-17-5), ácido rosmarínico (CAS n° 20283-92-5), miricetina (CAS n° 529-44-2), resveratrol (CAS n° 501-36-0), ácido *trans*-hidroxicinâmico (CAS n° 140-10-3), quercetina (CAS n° 117-39-5), hesperetina (CAS n° 520-33-2), eugenol (CAS n° 97-53-0), carvacrol (CAS n° 499-75-2), timol (CAS n° 89-83-8), carnosol (CAS n° 5957-80-2) e ácido carnósico (CAS n° 3650-09-7).

3.5.2. Equipamentos

Utilizou-se um sistema cromatográfico UHPLC[®] ACQUITY[™] da marca Waters (Milford, MA, EUA) para proceder ao desenvolvimento e validação do método para determinar 19 compostos fenólicos nas diversas plantas aromáticas estudadas.

O UHPLC[®] ACQUITY[™] encontrava-se equipado com um detector de arranjo de díodos (DAD), um sistema de termostato para a coluna, um injetor automático e uma bomba binária. A pré-coluna empregue neste método foi uma UPLC[®] BEH C₁₈ (2,1 x 5 mm, 1,7 µm de tamanho de partícula) e a coluna foi uma ACQUITY[™] UHPLC[®] BEH C₁₈ RP18 (2,1 x 50 mm, 1,7 µm de tamanho de partícula), ambas da marca Waters (Milford, MA, EUA). O *software* Empower[™] versão 2.0 da Waters (Milford, MA, EUA) foi utilizado para realizar o tratamento de dados.

Os restantes equipamentos utilizados foram: um agitador compacto da marca Edmund Bühler GmbH e modelo KS-15 B (Hechingen, Alemanha); uma balança analítica da marca Mettler Toledo e modelo XP205 Delta Range, com precisão de ± 0,01 mg (Columbus, EUA); uma centrífuga da marca Eppendorf AG e modelo 5804 R (Hamburgo, Alemanha); um evaporador rotativo da marca Büchi e modelo R-210 (Labortechnik, Suíça); um banho ultrassónico da marca Branson e modelo Branson 3510 (Dietzenbach, Alemanha); um ultracongelador da marca Thermo Scientific Revco e modelo ULT 2586-3-V36 (Reino Unido).

3.5.3. Preparação das soluções stock dos padrões

Prepararam-se soluções *stock* dos dezanove padrões analíticos selecionados para este método com as seguintes concentrações: ácido gálico (5,12 mg/mL); ácido protocatecuico (1,96 mg/mL); ácido clorogénico (5,08 mg/mL); ácido cafeico (5,02 mg/mL); epicatequina (5,04 mg/mL); ácido *p*-cumárico (4,96 mg/mL); ácido ferúlico (4,98 mg/mL); ácido 2-hidroxicinâmico (5,02 mg/mL); ácido rosmarínico (4,98 mg/mL); miricetina (0,08 mg/mL); resveratrol (4,92 mg/mL); ácido *trans*-hidroxicinâmico (5,14 mg/mL); quercetina (5,12 mg/mL); hesperetina (4,92 mg/mL); eugenol (4,98 mg/mL); carvacrol (5,04 mg/mL); timol (4,98 mg/mL); carnosol (2,00 mg/mL) e ácido carnósico (1,00 mg/mL).

Em balões volumétricos de 5 mL, procedeu-se à pesagem das quantidades definidas para cada composto (mg) e fez-se o volume com metanol de grau HPLC. Para uso posterior, armazenaram-se as soluções a -80 °C.

3.5.4. Optimização das condições de extrac o e cromatográficas para determina o dos compostos fenólicos em plantas aromáticas

A partir das solu es *stock* de cada padrão analítico, obtidas em 3.5.3., prepararam-se dilui es em metanol a 50 % (v/v) com ácido acético a 0,1 % e injectaram-se no UHPLC-DAD para analisar cada composto separadamente, com as seguintes concentra es:  cido gálico (51,2 µg/mL); ácido protocatecuico (49,0 µg/mL); ácido clorog nico (127,0 µg/mL); ácido cafeico (50,2 µg/mL); epicatequina (126,0 µg/mL); ácido *p*-cumárico (49,6 µg/mL); ácido ferúlico (74,7 µg/mL); ácido 2-hidroxicinâmico (25,1 µg/mL); ácido rosmarínico (99,6 µg/mL); miricetina (3,2 µg/mL); resveratrol (49,2 µg/mL); ácido *trans*-hidroxicinâmico (25,7 µg/mL); quercetina (128,0 µg/mL); hesperetina (49,2 µg/mL); eugenol (74,7 µg/mL); carvacrol (126,0 µg/mL); timol (124,5 µg/mL); carnosol (190,0 µg/mL); ácido carnósico (80,0 µg/mL). Analisou-se o tempo de reten o (t_r) e o espectro de absor o característico de cada composto fenólico.

Seguidamente, preparou-se uma soluço mistura contendo os dezanove compostos fenólicos, em metanol a 50 % (v/v) com ácido acético a 0,1 % e injectou-se no UHPLC-DAD. Depois, analisou-se o cromatograma respectivo   soluço mistura (visualizando-se diversos picos cromatográficos que correspondem   separa o dos componentes da mistura), e comparou-se os tempos de reten o (t_r) e os espectros de absor o desses componentes com os tempos de reten o e espectros de absor o dos padrões analíticos analisados anteriormente. Assim, foi possível verificar a ordem de elui o dos compostos fenólicos.

Para otimizar as condi es cromatográficas, procedeu-se   injecc o da soluço mistura, aplicando-se diferentes condi es de opera o, tais como: varia o no fluxo da fase móvel (0,3 - 0,8 mL/min), temperatura da coluna (20 - 40  C), utiliza o de diferentes fases móveis orgânicas (metanol e acetonitrilo) com diferentes modificadores da mesma ( cido acético e ácido fórmico) e diversos gradientes de elui o (iniciando a análise cromatográfica com diferentes propor es de fase móvel aquosa/orgânica). Deste modo, seleccionou-se as condi es ideais de separa o dos dezanove compostos fenólicos estudados.

3.5.4.1. Determina o do comprimento de onda de máxima absor o ($\lambda_{máx.}$) dos dezanove compostos fenólicos

Utilizando as solu es *stock* de cada padrão analítico, obtidas em 3.5.3., prepararam-se novas solu es com as concentra es referidas em 3.5.4., e injectaram-se as solu es para analisar isoladamente cada composto.

A partir do espectro de absorção (210 a 500 nm) de cada composto, procedeu-se à determinação do comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx.}}$) dos dezanove compostos fenólicos.

Posteriormente, na análise dos cromatogramas referentes às amostras de plantas aromáticas, comparou-se os espectros de absorção dos picos cromatográficos obtidos pelas amostras com os espectros de absorção dos padrões puros, para identificar cada composto correctamente. Deste modo, identificaram-se e quantificaram-se os compostos fenólicos presentes em cada espécie estudada, sempre tendo em consideração o comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx.}}$) relativo a cada composto.

3.5.4.2. Optimização e selecção das condições cromatográficas

Depois de testadas diversas condições de operação, descritas sumariamente em 3.5.4., seleccionou-se as seguintes fases móveis, para uma melhor separação dos compostos fenólicos e melhor resolução dos respectivos picos cromatográficos:

- A fase móvel (aquosa) (correspondente ao solvente A), constituída por água com ácido acético a 0,1 % (v/v).
- A fase móvel (orgânica) (correspondente ao solvente B), constituída por acetonitrilo com ácido acético a 0,1 % (v/v).

Após testar diferentes proporções de fase aquosa e fase orgânica, optimizou-se o gradiente de eluição para este método cromatográfico (Tabela 2).

Tabela 2: Gradiente de eluição optimizado para análise cromatográfica dos dezanove compostos fenólicos seleccionados para este estudo.

Tempo (min.)	% Solvente A	% Solvente B
0	78	22
6	78	22
10	68	32
20	60	40
29	25	75
30	78	22

Previamente à utilização no equipamento cromatográfico, a fase móvel aquosa (solvente A) e a fase orgânica (solvente B) foram filtradas recorrendo a um sistema de filtração a vácuo, através de um filtro de membrana 0,22 µm (GH Polypro, Gelman Laboratory, Canadá). Após filtração, procedeu-se à degaseificação das soluções durante 30 minutos num banho ultrassónico. Seguidamente armazenou-se os solventes em frascos adequados, de vidro escuro, devidamente rotulados.

Seleccionou-se a temperatura do forno da coluna de 20 °C. Determinou-se que o fluxo da fase móvel ideal para a separação dos diversos compostos fenólicos e melhores resoluções dos picos cromatográficos, seria de 0,5 mL/min. Assim, utilizou-se este fluxo constante ao longo do tempo de análise. Utilizou-se um volume de injeção de 10 µL.

3.5.4.3. Optimização do processo de extracção das plantas aromáticas

Procedeu-se à extracção, conforme descrito em 3.3., das 21 amostras de plantas aromáticas (referidas em 3.1.). As quantidades de amostra de planta seca (0,25 g) e de planta fresca (2 g) foram previamente optimizadas.

Após a extracção, retirou-se 5 mL de cada extracto para balões volumétricos de 10 mL, perfazendo-se o volume com água contendo ácido acético a 0,2 % (v/v). De seguida, procedeu-se à filtração de cada amostra com filtros de seringa PTFE (0,22 µm) para viais.

3.5.5. Validação

A validação do método foi seguida pelas directrizes publicadas pela International Conference on Harmonization (ICH) (ICH Q2A, 1995; ICH Q2B, 1996), estas directrizes são publicadas pela FDA. Os parâmetros avaliados foram a especificidade, a gama de trabalho e linearidade, o limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), a precisão e a exactidão.

3.5.5.1. Especificidade

Este parâmetro foi avaliado pela comparação dos espectros de absorção dos picos cromatográficos obtidos pelas amostras com os espectros de absorção dos padrões analíticos, de modo a identificar cada composto correctamente.

3.5.5.2. Gama de trabalho e Linearidade

Para a avaliação deste parâmetro foram preparadas curvas de calibração para cada composto fenólico. Para isso, prepararam-se soluções *stock* de cada um dos padrões analíticos individualmente, com as concentrações apresentadas 3.5.3., e posteriormente preparou-se uma solução mistura contendo os dezanove compostos fenólicos. Realizaram-se várias diluições a partir da solução mistura, obtendo-se a seguinte gama de concentrações para cada composto fenólico: ácido gálico (0,01 - 51,2 µg/mL); ácido protocatecuico (0,01 - 49,0 µg/mL); ácido clorogénico (0,03 - 127,0 µg/mL); ácido cafeico (0,01 - 50,2 µg/mL); epicatequina (0,03 - 126,0 µg/mL); ácido *p*-cumárico (0,01 - 49,6 µg/mL); ácido ferúlico (0,01 - 74,7 µg/mL); ácido 2-hidroxicinâmico (0,01 - 25,1 µg/mL); ácido rosmarínico (0,02 - 99,6 µg/mL); miricetina (0,01 - 3,2 µg/mL); resveratrol (0,01 - 49,2 µg/mL); ácido *trans*-hidroxicinâmico (0,01 - 25,7 µg/mL); quercetina (0,03 - 128,0 µg/mL); hesperetina (0,05 - 49,2 µg/mL); eugenol (0,15 - 74,7 µg/mL); carvacrol (0,13 - 126,0 µg/mL); timol (0,12 - 124,5 µg/mL); carnosol (0,38 - 190,0 µg/mL); ácido carnósico (0,48 - 80,0 µg/mL).

Filtraram-se as soluções com filtros de seringa PTFE (0,22 µm) e injectaram-se no cromatógrafo (condições descritas em 3.5.4.), sendo realizadas duas injeções para cada solução.

Posteriormente, integraram-se os picos cromatográficos de cada composto, obtendo-se assim a área correspondente. Traçou-se as curvas de calibração área *versus* concentração (µg/mL), obtendo-se uma equação linear para cada uma das dezanove rectas, sendo a linearidade expressa pelo coeficiente de determinação (r^2).

3.5.5.3. Limite de detecção

O limite de detecção (LOD) corresponde à concentração mínima que é possível detectar um composto (Ferreira, 2010). A determinação do LOD foi efectuada pelo método da relação sinal/ruído da linha de base. A razão sinal/ruído de 3:1 é considerada aceitável para determinar os limites de detecção, tendo-se calculado os limites de detecção para os dezanove compostos fenólicos pela razão sinal/ruído de 3:1 (ICH Q2B, 1996). Para determinar a relação sinal/ruído comparou-se os sinais medidos dos dezanove compostos a partir de amostras com baixas concentrações conhecidas de cada analito, com o ruído da linha de base de um branco.

3.5.5.4. Limite de quantificação

O limite de quantificação corresponde à menor concentração que é possível quantificar de um composto, com precisão e exactidão (Ferreira, 2010). A determinação do LOQ seguiu os mesmos critérios que os utilizados para determinar o LOD. No entanto, a razão sinal/ruído utilizada é de 10:1. Assim, o limite de quantificação para os dezanove compostos fenólicos foi determinado pela razão sinal/ruído de 10:1 (ICH Q2B, 1996).

3.5.5.5. Precisão

A precisão do método cromatográfico foi avaliada através de ensaios de repetibilidade (precisão intra-dia) e de precisão intermédia (precisão inter-dia). A precisão do método é determinada pelo desvio padrão relativo [RSD (%)], através da equação (6):

$$RSD(\%) = \frac{s}{X_m} \times 100 \quad (6)$$

Onde, s é estimativa do desvio padrão absoluto e X_m é a média dos replicados.

3.5.5.5.1. Repetibilidade e precisão intermédia da amostra

Para avaliar a repetibilidade, prepararam-se 6 extractos metanólicos de tomilho seco (25 mg/mL) (descrito em 3.3.), de modo a injectar como descrito em 3.5.4.3. (cada amostra foi injectada duas vezes). A precisão foi determinada em tomilho seco porque foi a amostra que apresentou maior diversidade de compostos fenólicos (entre os 19 compostos fenólicos do método). As repetições efectuaram-se no mesmo dia, sob as mesmas condições de medição, nomeadamente, o mesmo procedimento, local, método, analista e equipamento.

Para avaliar a precisão intermédia, prepararam-se extractos metanólicos de tomilho seco (25 mg/mL) (descrito em 3.3.), em três dias diferentes, de modo a injectar como descrito em 3.5.4.3. (cada amostra foi injectada duas vezes). Foram realizadas 4 extracções no segundo e terceiro dias de análise, obtendo-se um total de 14 extracções.

3.5.5.5.2. Repetibilidade e precisão intermédia do equipamento

Para avaliar a repetibilidade, prepararam-se 6 soluções mistura contendo os dezanove compostos fenólicos e filtraram-se com filtros de seringa PTFE (0,22 μm) e, seguidamente injectaram-se no cromatógrafo (cada solução foi injectada duas vezes). Os resultados foram obtidos sob as mesmas condições, nomeadamente, o mesmo local, analista, procedimento, método e equipamento, no mesmo dia.

Para avaliar a precisão intermédia, prepararam-se soluções mistura contendo os dezanove compostos fenólicos, em três dias diferentes, de modo a injectar como descrito anteriormente (cada amostra foi injectada duas vezes). Foram realizadas 6 soluções por dia, obtendo-se um total de 18 soluções.

3.5.5.6. Exactidão

A exactidão foi avaliada através de ensaios de recuperação. A partir de cada solução *stock* dos padrões preparados previamente (descrito em 3.5.3.), efectuaram-se diluições de 1:10, à excepção do ácido rosmarínico e do timol que se adicionaram directamente.

Preparou-se uma solução mistura de 10 mL, adicionando-se diferentes quantidades dos padrões analíticos. Esta solução foi preparada tendo em consideração as quantidades já conhecidas de cada composto fenólico presente na amostra de tomilho seco, adicionando-se também quantidades conhecidas de cada padrão.

Para a fortificação da amostra de tomilho seco (foram fortificadas 4 amostras), adicionou-se 2 mL da solução mistura a 0,25 g de amostra de tomilho seco. De seguida, procedeu-se à extração (descrita em 3.3.) e prepararam-se os extractos fortificados como descrito em 3.5.4.3., e injectou-se no cromatógrafo para análise (cada amostra foi injectada duas vezes).

A partir das quantidades já conhecidas de cada composto fenólico presente na amostra de tomilho seco e das quantidades de cada padrão adicionado à amostra de tomilho, após análise dos cromatogramas obtidos, é possível determinar a recuperação de cada composto fenólico presente no extracto fortificado.

Assim, a exactidão do método foi avaliada através da percentagem de recuperação para cada composto, determinando-se segundo a equação (7):

$$\%Recuperação = \frac{C1-C2}{C3} \times 100 \quad (7)$$

Onde, $C1$ é a concentração determinada na amostra fortificada, $C2$ é a concentração determinada na amostra não fortificada e $C3$ é a concentração da solução padrão adicionada.

3.6. Análise estatística

Determinaram-se as médias, o desvio-padrão e o desvio-padrão relativo para todos os dados, com recurso ao *software* Microsoft Excel 2008.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo apresentam-se os resultados dos diversos métodos realizados assim como a discussão dos mesmos.

4.1. Humidade das diversas plantas aromáticas

Determinou-se a humidade das plantas aromáticas estudadas como descrito em 3.2., os resultados apresentam-se em seguida na **Tabela 3**. As plantas de agricultura biológica são designadas por plantas orgânicas.

Os valores de percentagem de humidade obtidos serão utilizados posteriormente para comparar as plantas secas *versus* frescas.

Tabela 3: Percentagem média de humidade determinada para cada planta aromática.

Plantas	Nome Vulgar	Média (%) Humidade (n=2)	Desvio Padrão (%)
Plantas Secas	Alecrim	5,13	0,023
	Tomilho	4,67	0,012
	Orégão	6,38	0,163
	Estragão	2,59	0,011
	Manjerona	6,59	0,025
	Hortelã	6,50	0,084
	Manjericão	6,13	1,012
Plantas Secas Orgânicas	Alecrim	4,92	0,001
	Tomilho-Limão	6,60	0,031
	Orégão	5,89	0,015
	Estragão	7,33	0,028
	Manjerona	5,72	0,088
	Hortelã-Pimenta	6,86	0,057
Plantas Frescas	Alecrim	83,86	0,161
	Tomilho	89,90	0,264
	Orégão	89,55	0,556
	Estragão	86,91	0,079
	Manjerona	80,10	0,102
	Hortelã	90,95	0,102
	Manjericão	92,92	0,088
	Stevia	89,29	0,353

Na tabela de composição nutricional do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA), encontram-se para a maior parte das plantas estudadas os valores de humidade, tanto na planta fresca como seca.

Para o alecrim seco e fresco no presente estudo, as amostras apresentaram um valor de humidade média de 5,13 g/100 g de amostra e de 83,86 g/100 g de amostra, respectivamente. Na tabela de composição nutricional do USDA, a humidade apresentada para o alecrim seco é de 9,31 g/100 g de amostra, superior à humidade determinada para o alecrim seco no presente estudo. Para o alecrim fresco, a humidade apresentada é de 67,77 g/100 g de amostra, inferior à humidade determinada para o alecrim fresco no presente estudo.

Para o tomilho seco e fresco no presente trabalho, as amostras apresentaram um valor de humidade média de 4,67 g/100 g de amostra e de 89,90 g/100 g de amostra, respectivamente. Na tabela de composição nutricional do USDA, a humidade apresentada para o tomilho seco é de 7,79 g/100 g de amostra, superior à humidade determinada para o tomilho seco no presente trabalho. Para o tomilho fresco, a humidade apresentada é de 65,11 g/100 g de amostra, inferior à humidade determinada para o tomilho fresco no presente trabalho.

Para o orégão seco e fresco no presente estudo, as amostras apresentaram um valor de humidade média de 6,38 g/100 g de amostra e de 89,55 g/100 g de amostra, respectivamente. Na tabela de composição nutricional do USDA, a humidade apresentada para o orégão seco é de 9,93 g/100 g de amostra, superior à humidade determinada para o orégão seco no presente estudo. A tabela de composição nutricional do USDA não apresenta valores para o orégão fresco.

Para o estragão seco e fresco no presente trabalho, as amostras apresentaram um valor de humidade média de 2,59 g/100 g de amostra e de 86,91 g/100 g de amostra, respectivamente. Na tabela de composição nutricional do USDA, a humidade apresentada para o estragão seco é de 7,74 g/100 g de amostra, superior à humidade determinada para o estragão seco no presente trabalho. A tabela de composição nutricional do USDA não apresenta valores para o estragão fresco.

Para a manjerona seca e fresca no presente estudo, as amostras apresentaram um valor de humidade média de 6,59 g/100 g de amostra e de 80,10 g/100 g de amostra, respectivamente. Na tabela de composição nutricional do USDA, a humidade apresentada

para a manjerona seca é de 7,64 g/100 g de amostra, ligeiramente superior à humidade determinada para manjerona seca no presente estudo. Para a manjerona fresca não são apresentados valores nesta tabela de composição de alimentos.

Para a hortelã seca e fresca no presente trabalho, as amostras apresentaram um valor de humidade média de 6,50 g/100 g de amostra e de 90,95 g/100 g de amostra, respectivamente. Na tabela de composição nutricional do USDA, a humidade apresentada para a hortelã seca é de 11,30 g/100 g de amostra, superior à humidade determinada para hortelã seca no presente trabalho. Para a hortelã fresca, a humidade apresentada é de 85,55 g/100 g de amostra, inferior à humidade determinada para a hortelã fresca no presente trabalho.

Para o manjeriço seco e fresco no presente estudo, as amostras apresentaram um valor de humidade média de 6,13 g/100 g de amostra e de 92,92 g/100 g de amostra, respectivamente. Na tabela de composição nutricional do USDA, a humidade apresentada para o manjeriço seco é de 10,35 g/100 g de amostra, superior à humidade determinada para o manjeriço seco no presente estudo. Para o manjeriço fresco, a humidade apresentada é de 92,06 g/100 g de amostra, similar à humidade determinada para o manjeriço fresco no presente estudo.

Para a hortelã-pimenta seca de agricultura biológica no presente trabalho, a amostra apresentou um valor de humidade média de 6,86 g/100 g de amostra. Na tabela de composição nutricional do USDA, apenas é apresentada a humidade para a hortelã-pimenta fresca.

Em geral, as amostras secas obtiveram menor humidade que as da tabela USDA, enquanto as amostras frescas obtiveram valores de humidade superiores à da base de dados da USDA.

4.2. Determinação da capacidade antioxidante *in vitro*, conteúdo em compostos fenólicos totais e flavonóides totais

Mediu-se a capacidade antioxidante das plantas estudadas realizando dois testes *in vitro*, o sistema de inibição do radical DPPH e teste do branqueamento do β -Caroteno. Determinou-se o conteúdo em fenólicos totais e o conteúdo de flavonóides totais, pelos métodos mencionados em 3.4.4.1. e em 3.4.4.2..

4.2.1. Determinação da capacidade antioxidante *in vitro*

Nesta secção são apresentados e discutidos os valores de capacidade antioxidante obtidos para as diversas plantas aromáticas estudadas.

4.2.1.1. Sistema de inibição do radical DPPH

Avaliou-se a capacidade antioxidante das plantas aromáticas, realizando-se o método descrito em 3.4.3.1.. A extracção das 21 amostras de plantas foi efectuada de acordo com o descrito anteriormente (3.3.).

Inicialmente, procedeu-se à realização das curvas de calibração percentagem de inibição *versus* concentração (mg/mL) para cada uma das amostras (em triplicado), como descrito em 3.4.3.1.. A partir de cada equação linear, determinou-se o EC_{50} (mg amostra/mL) para cada amostra. De modo a poder comparar as plantas secas com as frescas, também se calculou o EC_{50} (mg peso seco/mL), tendo em consideração a percentagem de humidade determinada para cada uma das plantas (4.1.) (Figura 44).

Na Tabela 4, Tabela 5 e Tabela 6, apresentam-se os parâmetros obtidos das curvas de calibração, para as plantas secas, plantas secas orgânicas e para as plantas frescas, respectivamente.

Tabela 4: Parâmetros das curvas de calibração para cada planta aromática seca.

Nome Vulgar	Extractos metanólicos	Gama de concentrações (mg/mL)	Equação da curva	Coefficiente de determinação (r ²)
Alecrim	1	0,25 - 3,25	$y = 21,358x - 1,6726$	0,9978
	2		$y = 23,624x - 3,4301$	0,9984
	3		$y = 22,046x - 1,8894$	0,9999
Tomilho	1	1,00 - 6,00	$y = 11,628x + 1,2837$	0,9983
	2		$y = 11,760x + 0,9365$	0,9991
	3		$y = 12,464x + 0,2998$	0,9992
Orégão	1	2,00 - 9,50	$y = 6,8412x + 1,3456$	0,9974
	2		$y = 6,6829x - 1,5434$	0,9978
	3		$y = 7,0989x - 1,4669$	0,9981
Estragão	1	2,00 - 17,00	$y = 4,7686x - 0,7419$	0,9996
	2		$y = 4,4577x + 1,8202$	0,9971
	3		$y = 4,6943x + 0,0361$	0,9993
Manjerona	1	1,25 - 8,75	$y = 8,1836x + 2,3059$	0,9998
	2		$y = 8,2230x + 3,5160$	0,9979
	3		$y = 8,3989x + 0,5708$	0,9991
Hortelã	1	1,00 - 11,00	$y = 6,1844x - 0,3318$	0,9996
	2		$y = 6,2757x + 0,0082$	0,9987
	3		$y = 7,3296x - 2,4543$	0,9969
Manjericão	1	7,50 - 22,50	$y = 2,4225x + 1,3128$	0,9971
	2		$y = 2,2750x - 0,3927$	0,9990
	3		$y = 2,1656x + 6,6777$	0,9984

Tabela 5: Parâmetros das curvas de calibração para cada planta aromática orgânica seca.

Nome Vulgar	Extractos metanólicos	Gama de concentrações (mg/mL)	Equação da curva	Coefficiente de determinação (r ²)
Alecrim	1	4,50 - 12,00	$y = 6,1335x + 1,5242$	0,9982
	2		$y = 6,0776x + 0,4429$	0,9994
	3		$y = 7,0429x - 4,6802$	0,9993
Tomilho-Limão	1	1,25 - 10,00	$y = 6,1373x - 1,0508$	0,9990
	2		$y = 6,0576x - 0,6070$	0,9993
	3		$y = 6,2568x - 0,3104$	0,9995
Orégão	1	2,00 - 8,00	$y = 9,4270x + 5,4318$	0,9982
	2		$y = 10,186x + 0,0646$	0,9992
	3		$y = 9,4108x + 2,5827$	0,9984
Estragão	1	2,50 - 17,50	$y = 3,4863x + 0,6179$	0,9999
	2		$y = 3,5763x + 0,4140$	0,9993
	3		$y = 3,5513x - 0,7598$	0,9995
Manjerona	1	1,25 - 12,50	$y = 5,0539x - 0,0902$	0,9996
	2		$y = 4,9652x - 1,6005$	0,9997
	3		$y = 5,1245x + 0,5049$	0,9970
Hortelã-Pimenta	1	1,25 - 12,50	$y = 4,5729x - 0,2217$	0,9998
	2		$y = 4,8234x + 0,8528$	0,9988
	3		$y = 5,0574x + 0,7383$	0,9988

Tabela 6: Parâmetros das curvas de calibração para cada planta aromática fresca.

Nome Vulgar	Extractos metanólicos	Gama de concentrações (mg/mL)	Equação da curva	Coefficiente de determinação (r^2)
Alecrim	1	10,00 - 28,00	$y = 2,0583x + 1,3160$	0,9994
	2		$y = 2,1729x - 2,2468$	0,9977
	3		$y = 2,1173x + 4,4206$	0,9954
Tomilho	1	8,00 - 128,00	$y = 0,4481x + 1,1898$	0,9988
	2		$y = 0,4494x + 1,6836$	0,9991
	3		$y = 0,4484x + 2,0986$	0,9991
Orégão	1	16,00 - 76,00	$y = 0,8853x + 1,7675$	0,9993
	2		$y = 0,9476x + 2,4982$	0,9989
	3		$y = 0,9596x - 0,3726$	0,9990
Estragão	1	16,00 - 136,00	$y = 0,5909x + 0,3181$	0,9980
	2		$y = 0,5923x - 2,2401$	0,9994
	3		$y = 0,5598x - 0,2415$	0,9994
Manjerona	1	14,00 - 50,00	$y = 1,1522x + 2,3807$	0,9978
	2		$y = 1,2418x + 3,1975$	0,9987
	3		$y = 1,2297x + 1,8115$	0,9990
Hortelã	1	8,00 - 72,00	$y = 1,2203x + 3,1144$	0,9977
	2		$y = 1,1394x + 0,4025$	0,9985
	3		$y = 1,0925x + 0,2331$	0,9994
Manjerição	1	10,00 - 140,00	$y = 0,4366x - 1,5170$	0,9984
	2		$y = 0,4318x - 2,1658$	0,9991
	3		$y = 0,4387x - 1,6099$	0,9997
Stevia	1	14,00 - 46,00	$y = 1,2664x + 3,2004$	0,9998
	2		$y = 1,2698x + 3,6835$	0,9988
	3		$y = 1,2029x + 4,7485$	0,9987

Para uma melhor visualização dos resultados, devido à variedade de plantas aromáticas estudadas e diversidade de resultados, elaboraram-se quatro gráficos comparativos da capacidade antioxidante das diferentes amostras. Na **Figura 43**, apresenta-se a comparação da capacidade antioxidante, EC_{50} (mg amostra/mL), das plantas secas e frescas.

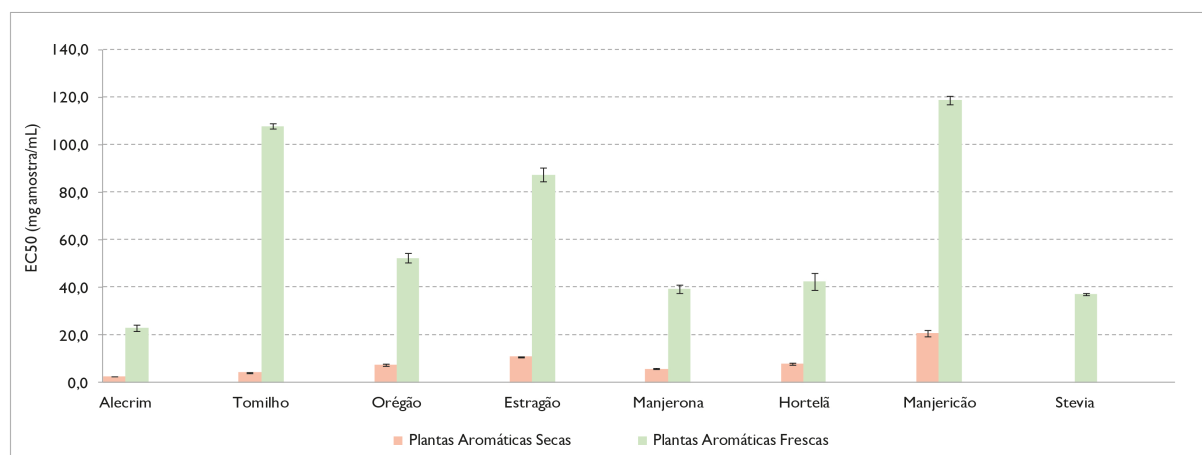


Figura 43: Comparação da capacidade antioxidante, EC_{50} (mg amostra/mL), dos extractos das plantas aromáticas secas e frescas.

Visualizando a **Figura 43.**, que apresenta os resultados em EC_{50} (mg amostra/mL), verifica-se que as amostras de plantas aromáticas secas apresentam capacidade antioxidante muito superior comparativamente às amostras de plantas aromáticas frescas, comparando a mesma espécie. Os valores mais baixos de EC_{50} correspondem a uma actividade antioxidante mais elevada da amostra (Khaled-Khodja, Boulekbache-Makhlouf e Madani, 2014). Verifica-se ainda que o manjeriço seco apresenta capacidade antioxidante cerca de 6 vezes superior em relação ao manjeriço fresco, enquanto o tomilho seco apresenta uma capacidade antioxidante cerca de 26 vezes superior à do tomilho fresco.

Para as amostras secas, o alecrim foi o que apresentou maior capacidade antioxidante. Em termos de capacidade antioxidante verificou-se a seguinte ordem decrescente: alecrim > tomilho > manjerona > orégão \approx hortelã > estragão > manjeriço.

No que respeita às amostras frescas, o alecrim foi também o que apresentou maior capacidade antioxidante pelo ensaio. Em termos de capacidade antioxidante verificou-se a seguinte ordem decrescente: alecrim > stevia > manjerona > hortelã > orégão > estragão > tomilho > manjeriço.

O facto das amostras analisadas serem secas e frescas, pode influenciar na diferente capacidade antioxidante verificada, uma vez que as amostras frescas apresentam um elevado teor de água na sua composição (determinado em 4.1.). Assim, na **Figura 44**, apresenta-se a comparação da actividade antioxidante em EC_{50} (mg peso seco/mL) das plantas secas e frescas.

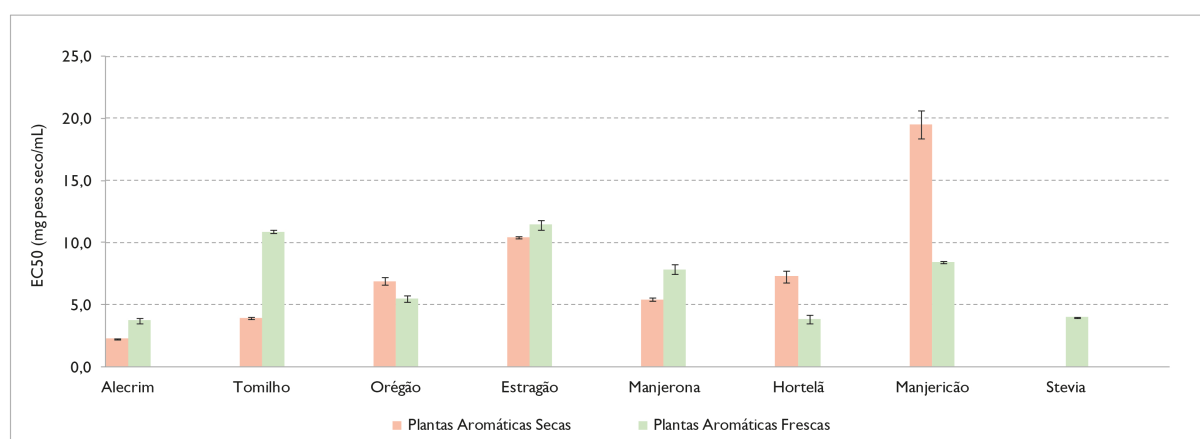


Figura 44: Comparação da actividade antioxidante, EC_{50} (mg peso seco/mL), das plantas aromáticas secas e frescas.

Pela análise da **Figura 44**, que apresenta os resultados em EC_{50} (mg peso seco/mL), verifica-se que já não existe uma grande discrepância na capacidade antioxidante entre as plantas aromáticas secas e frescas, à excepção do tomilho e do manjeriço, comparando com a mesma espécie. No entanto, a maior capacidade antioxidante foi demonstrada pelo alecrim seco, seguido pelo alecrim fresco, hortelã fresca, tomilho seco e stevia fresca.

Para as amostras secas, verificou-se a seguinte ordem de capacidade antioxidante: alecrim > tomilho > manjerona > orégão \approx hortelã > estragão >> manjeriço.

Para as amostras frescas, verificou-se a seguinte ordem de capacidade antioxidante: alecrim \approx hortelã \approx stevia > orégão > manjerona > manjeriço > tomilho > estragão.

Apesar de apenas se ter analisado amostras de planta fresca de stevia, verifica-se que possui uma elevada capacidade antioxidante, apresentando um valor de EC_{50} de 3,96 mg peso seco/mL. Dados anteriores e o obtido no presente estudo, indicam que as folhas de stevia têm um potencial significativo, podendo ser usadas como uma fonte natural de antioxidantes em várias indústrias (Gawel-Beben *et al.*, 2015).

Também foram analisadas seis espécies de plantas secas orgânicas. Assim, na **Figura 45**, apresenta-se a comparação da actividade antioxidante em EC_{50} (mg amostra/mL) das plantas secas orgânicas e secas.

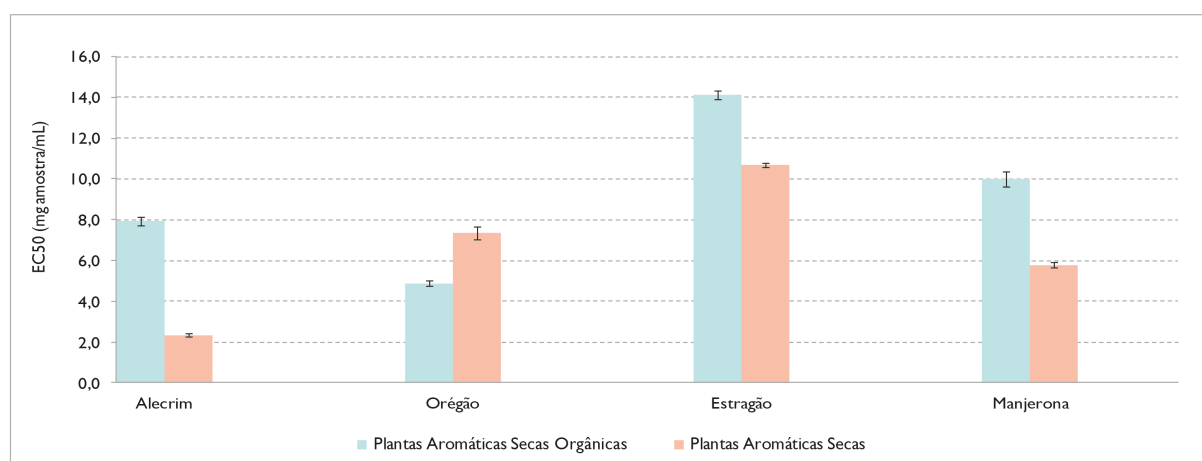


Figura 45: Comparação da capacidade antioxidante, EC_{50} (mg amostra/mL), das plantas aromáticas secas de agricultura biológica (designadas aromáticas secas orgânicas) e das plantas aromáticas secas de agricultura convencional (designadas apenas por plantas aromáticas secas).

Visualizando a **Figura 45**, verifica-se que a amostra de orégão seco de agricultura biológica, apresenta uma capacidade antioxidante superior comparativamente à amostra de orégão seco de agricultura convencional. Relativamente às amostras secas, designadamente o alecrim, o estragão e a manjerona, apresentam valores de EC_{50} inferiores, comparativamente às amostras secas orgânicas das correspondentes espécies, o que indica que possuem maior capacidade antioxidante.

Para as amostras secas orgânicas, o orégão foi o que apresentou maior capacidade antioxidante. Em termos de capacidade antioxidante verificou-se a seguinte ordem decrescente: orégão > alecrim > manjerona > estragão.

No que respeita às amostras secas, o alecrim foi o que apresentou maior capacidade antioxidante. Em termos de capacidade antioxidante verificou-se a seguinte ordem decrescente: alecrim > manjerona > orégão > estragão.

Relativamente às plantas de agricultura biológica, era expectável que apresentassem valores de EC_{50} inferiores em comparação aos das plantas de agricultura convencional, o que não se verificou. Apenas a amostra seca de orégão orgânico apresentou um valor inferior de EC_{50} (4,89 mg amostra/mL), comparativamente ao orégão seco.

As seis espécies de plantas secas orgânicas também foram comparadas entre si. A **Figura 46**, apresenta a comparação da capacidade antioxidante, EC_{50} (mg amostra/mL), entre as plantas secas orgânicas.

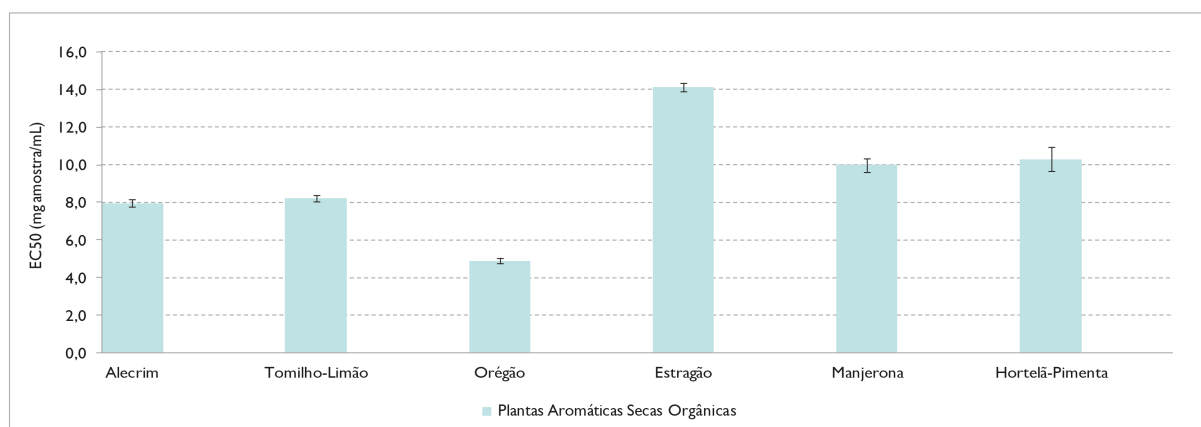


Figura 46: Comparação da actividade antioxidante, EC_{50} (mg amostra/mL), entre as plantas aromáticas secas orgânicas.

Visualizando a **Figura 46**, verifica-se que o orégão seco de agricultura biológica demonstrou uma maior capacidade antioxidante em comparação com as outras plantas secas orgânicas, apresentando um valor de EC_{50} de 4,89 mg amostra/mL.

Para as amostras secas orgânicas, como já referido, o orégão foi o que apresentou maior capacidade antioxidante. Em termos de capacidade antioxidante verificou-se a seguinte ordem decrescente: orégão > alecrim \approx tomilho-limão > manjerona \approx hortelã-pimenta > estragão.

Na literatura estão disponíveis diversas publicações em que se avaliou a capacidade antioxidante em plantas aromáticas. De seguida, descrevem-se alguns dos resultados desses estudos.

Relativamente ao alecrim, Erkan, Ayranci e Ayranci (2008) determinaram a capacidade antioxidante de um extracto metanólico de folhas secas de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), obtendo um valor de EC_{50} de 0,054 mg/mL, sendo inferior ao valor obtido presente estudo (EC_{50} de 2,34 mg/mL) para o alecrim seco. Jordán et al. (2013) analisaram extractos metanólicos de várias amostras de alecrim fresco (em plena floração), obtendo valores de EC_{50} de 0,598 e 0,534 mg/mL. O valor obtido no presente trabalho para o alecrim fresco é superior ao valor obtido por estes autores. Terpinc, Bezjak e Abramovič (2009) determinaram a capacidade antioxidante de vários extractos de folhas alecrim, obtendo valores de EC_{50} entre 0,0066 a 0,0274 mg/mL, sendo inferiores aos valores obtidos no presente estudo para o alecrim seco (EC_{50} de 2,34 mg/mL), fresco (EC_{50} de 23,07 mg/mL) e orgânico (EC_{50} de 7,94 mg/mL). Babovic et al. (2010) determinaram a capacidade antioxidante de um extracto de alecrim seco, obtendo um valor de EC_{50} (0,23 mg/mL) inferior ao valor obtido no presente trabalho para o alecrim seco. Mata et al. (2007) determinaram a capacidade antioxidante de extractos de alecrim fresco, obtendo valores de EC_{50} de 0,0373 e de 0,0360 mg extracto seco/mL para o extracto de alecrim aquoso e etanólico, respectivamente. Pérez, Calderón e Croci (2007) determinaram a capacidade antioxidante de um extracto metanólico de alecrim fresco, obtendo um valor de EC_{50} (4,63 mg de amostra seca/mL) superior ao valor obtido no presente trabalho para o alecrim fresco (EC_{50} de 3,72 mg peso seco/mL). Dorman et al. (2003) determinaram a capacidade antioxidante de um extracto aquoso de alecrim seco, obtendo um valor de EC_{50} (0,2365 mg/mL) inferior ao valor obtido no presente estudo para o alecrim seco. Herrero et al. (2010) determinaram a capacidade antioxidante de extractos etanólicos de folhas secas de alecrim (temperaturas de extracção de 50, 100, 150 e 200 °C), obtendo

valores de EC_{50} (0,0088 - 0,0114 mg/mL) inferiores ao valor obtido no presente trabalho para o alecrim seco.

Quanto ao tomilho, Jabri-Karoui *et al.* (2012) avaliaram a capacidade antioxidante de extractos metanólicos de partes floridas frescas de uma espécie do género *Thymus* (*Thymus capitatus* L.), obtendo um valor de EC_{50} (0,012 mg/mL) inferior ao valor obtido no presente estudo para o tomilho fresco. Miron *et al.* (2011) analisaram várias amostras de tomilho fresco silvestre (*Thymus serpyllum* L.) extraídas com diferentes solventes e diferentes temperaturas. Para a temperatura de extracção de 50 °C, obtiveram-se valores de EC_{50} de 0,0138 e 0,0175 mg/mL para o extracto aquoso e etanólico, respectivamente. O valor obtido no presente trabalho para o tomilho fresco é superior aos valores obtidos por Miron *et al.* (2011). Martins *et al.* (2015) determinaram a capacidade antioxidante de um extracto hidroalcoólico de tomilho seco, obtendo um valor de EC_{50} (0,279 mg/mL) inferior ao valor obtido no presente estudo para o tomilho seco (EC_{50} de 4,12 mg/mL). Nickavar e Esbati (2012) determinaram a capacidade antioxidante de extractos etanólicos de amostras frescas de *T. daenensis*, *T. kotschyanus* e *T. pubescens*, obtendo valores de EC_{50} de 0,0487, 0,0472 e de 0,0315 mg/mL, respectivamente. O valor obtido no presente trabalho para o tomilho fresco é superior aos valores obtidos por Nickavar e Esbati (2012). Babovic *et al.* (2010) determinaram a capacidade antioxidante de um extracto de tomilho seco, obtendo um valor de EC_{50} (0,08 mg/mL) inferior ao valor obtido no presente estudo para o tomilho seco. Mata *et al.* (2007) determinaram a capacidade antioxidante de extractos aquosos e etanólicos de tomilho silvestre fresco (*Thymus serpyllum* L.), obtendo valores de EC_{50} de 0,0316 e de 0,0132 mg extracto seco/mL, respectivamente. Dorman *et al.* (2003) determinaram a capacidade antioxidante de um extracto aquoso de tomilho seco, obtendo um valor de EC_{50} (0,3824 mg/mL) inferior ao valor obtido no presente trabalho para o tomilho seco.

Relativamente à hortelã-pimenta, Akhtar, Ihsan-ul-Haq e Mirza (2015) determinaram a capacidade antioxidante de extractos de hortelã-pimenta fresca (*Mentha piperita* L.), em água destilada e em M/C (mistura de metanol e clorofórmio), obtendo valores de EC_{50} de 0,0238 e de 0,0230 mg/mL, respectivamente. O valor obtido no presente trabalho para a hortelã-pimenta orgânica seca (EC_{50} de 10,30 mg/mL) é superior aos valores obtidos por estes autores. No entanto, estes autores analisaram amostras frescas de hortelã-pimenta, enquanto no presente trabalho as amostras adquiridas de hortelã-pimenta eram secas e provenientes de agricultura biológica. Barchan *et al.* (2014)

avaliaram a capacidade antioxidante de extractos metanólicos de amostras frescas de *Mentha piperita*, obtendo um valor de EC₅₀ (0,40 mg/mL) inferior ao valor obtido no presente estudo para a hortelã-pimenta orgânica seca.

Quanto à hortelã, Scherer *et al.* (2013) determinaram a capacidade antioxidante de extractos metanólicos de hortelã fresca (*Mentha spicata* L.), obtendo um valor de EC₅₀ (0,01799 mg/mL) inferior ao valor obtido no presente estudo para a hortelã fresca. Barchan *et al.* (2014) avaliaram a capacidade antioxidante de extractos metanólicos de amostras frescas de *Mentha spicata* e *Mentha pulegium*, obtendo valores de EC₅₀ de 0,16 e de 0,49 mg/mL, respectivamente. O valor obtido no presente estudo para a hortelã fresca é superior aos valores obtidos por estes autores. Khaled-Khodja, Boulekbache-Makhlouf e Madani (2014) analisaram extractos metanólicos de amostras frescas de *Mentha pulegium* L., obtendo um valor de EC₅₀ (0,051 mg/mL) inferior ao valor obtido no presente estudo para a hortelã fresca. Mata *et al.* (2007) avaliaram a capacidade antioxidante de amostras frescas de *Mentha spicata* e *Mentha pulegium*. Para o extracto etanólico de *Mentha spicata* e *Mentha pulegium*, obtiveram-se valores de EC₅₀ de 0,0652 e de 0,0249 mg extracto seco/mL, respectivamente.

Relativamente ao orégão, Miron *et al.* (2011) analisaram várias amostras de orégão fresco (*Origanum vulgare* L.) extraídas com diferentes solventes e diferentes temperaturas. Para a temperatura de extracção de 50 °C, obtiveram-se valores de EC₅₀ de 0,00698 e 0,0171 mg/mL, para o extracto aquoso e etanólico, respectivamente. Os valores obtidos por Miron *et al.* (2011) são inferiores ao valor obtido no presente estudo para o orégão fresco. Dorman *et al.* (2003) determinaram a capacidade antioxidante de um extracto aquoso de orégão seco, obtendo um valor de EC₅₀ (0,335 mg/mL) inferior ao valor obtido no presente trabalho para o orégão seco (EC₅₀ de 7,36 mg/mL).

Quanto ao manjeriço, Akhtar, Ihsan-ul-Haq e Mirza (2015) determinaram a capacidade antioxidante de extractos de manjeriço fresco (*Ocimum basilicum* L.), em água destilada e em M/C (mistura de metanol e clorofórmio), obtendo valores de EC₅₀ de 0,0713 e de 0,0910 mg/mL, respectivamente. O valor obtido no presente estudo para o manjeriço fresco é superior aos valores obtidos por estes autores. Hinneburg, Dorman e Hiltunen (2006) analisaram um extracto hidrodestilado de manjeriço seco, obtendo um valor de EC₅₀ (0,49 mg/mL) inferior ao valor obtido no presente trabalho para o manjeriço seco.

Relativamente ao estragão, Durić *et al.* (2013) determinaram a capacidade antioxidante de extractos de estragão fresco (*Artemisia dracunculus* L.), obtendo valores de EC₅₀ de 1,062 e 0,766 mg/mL, para extracção a frio e a quente, respectivamente. O valor obtido no presente estudo para o estragão fresco (EC₅₀ de 87,34 mg/mL) é superior aos valores obtidos por estes autores. Miron *et al.* (2011) analisaram várias amostras de estragão fresco (*Artemisia dracunculus* L.) extraídas com diferentes solventes e diferentes temperaturas. Para a temperatura de extracção de 50 °C, obtiveram-se valores de EC₅₀ de 0,0243 e 0,0295 mg/mL, para o extracto aquoso e etanólico, respectivamente. Os valores obtidos por Miron *et al.* (2011) são inferiores ao valor obtido no presente estudo para o estragão fresco. Megdiche-Ksouri *et al.* (2015) determinaram a capacidade antioxidante de amostras frescas de *Artemisia campestris* L., obtendo valores de EC₅₀ de 0,006, 0,010 e 0,028 mg/mL, para extractos em metanol, acetato de etilo e água, respectivamente. O valor obtido no presente trabalho para o estragão fresco é superior aos valores obtidos por Megdiche-Ksouri *et al.* (2015).

Quanto à stevia, Ghanta *et al.* (2007) avaliaram a capacidade antioxidante de folhas frescas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, obtendo valores de EC₅₀ de 0,0477, 0,0453 e 0,00926 mg/mL para o extracto metanólico, aquoso e extracto em acetato de etilo, respectivamente. Shukla *et al.* (2012) avaliaram a capacidade antioxidante de um extracto aquoso de folhas frescas de stevia, obtendo um valor de EC₅₀ de 0,0835 mg/mL. Shukla *et al.* (2009) avaliaram a capacidade antioxidante de um extracto etanólico de folhas frescas de stevia, obtendo um valor de EC₅₀ de 0,0935 mg/mL. Os valores obtidos por Ghanta *et al.* (2007), por Shukla *et al.* (2012) e por Shukla *et al.* (2009) são inferiores ao valor obtido no presente estudo para a stevia fresca. Mandal e Madan (2013) analisaram extractos metanólicos de cinco variedades de folhas secas de stevia adquiridas a diferentes fornecedores, obtendo valores de EC₅₀ entre 0,054 e 0,068 mg/mL. Gawel-Bęben *et al.* (2015) analisaram amostras de folhas secas de stevia. A capacidade dos extractos de stevia para eliminar o radical DPPH foi comparada com o teor de componentes bioactivos. Para os extractos de stevia aquoso, etanólico e extracto aquoso-glicol, obtiveram-se valores de EC₅₀ de 0,00346, 0,00473 e 0,00199 mg/mL de fenólicos totais e de 0,001, 0,00263 e 0,00038 mg/mL de flavonóides, respectivamente. Jahan *et al.* (2010) analisaram folhas secas de stevia, obtendo um valor de EC₅₀ de 0,00802 mg/mL, para o extracto de stevia etanólico a 80 % (v/v). Muanda *et al.* (2011) avaliaram a capacidade antioxidante de um extracto aquoso e de um extracto M/A (mistura de metanol e água) de folhas secas de *Stevia*

rebaudiana, obtendo valores de EC₅₀ de 0,005 e de 0,0029 mg/mL, respectivamente. Os valores obtidos por Mandal e Madan (2013), por Gawel-Beben *et al.* (2015), por Jahan *et al.* (2010) e por Muanda *et al.* (2011) são inferiores ao valor obtido no presente estudo para a stevia fresca. No entanto, estes autores analisaram folhas secas desta planta aromática enquanto no presente estudo se analisaram folhas frescas de stevia. Gopalakrishnan *et al.* (2006) analisaram folhas frescas stevia, obtendo um valor de EC₅₀ de 0,14 mg, para o extracto etanólico desta planta. Shivanna *et al.* (2013) analisaram folhas de *Stevia rebaudiana*, obtendo um valor de EC₅₀ de 0,0106 mg. Tadhani, Patel e Subhash (2007) avaliaram a capacidade antioxidante de extractos aquosos e metanólicos de folhas e caules de *Stevia rebaudiana*. Para o extracto aquoso de stevia, obtiveram-se valores de EC₅₀ de 0,753 e 0,541 mg para as folhas e caules, respectivamente. Para o extracto metanólico de stevia, obtiveram-se valores de EC₅₀ de 0,904 e 0,528 mg para as folhas e caules, respectivamente. Os valores obtidos por Gopalakrishnan *et al.* (2006), por Shivanna *et al.* (2013) e por Tadhani, Patel e Subhash (2007) estão apresentados em mg, não sendo possível comparar com o resultado obtido no presente estudo.

4.2.1.2. Teste do branqueamento do β-Caroteno

Realizou-se o teste do branqueamento do β-Caroteno de acordo com o descrito em 3.4.3.2., avaliando-se assim a actividade antioxidante das plantas aromáticas estudadas. A extracção das 21 plantas aromáticas estudadas foi efectuada como o descrito anteriormente (3.3.).

A partir da equação referida em 3.4.3.2., determinou-se o coeficiente de actividade antioxidante (AAC) para cada amostra. De modo a poder comparar as plantas secas com as frescas, também se calculou o AAC tendo em consideração a percentagem de humidade determinada para cada uma das plantas (4.1.) (Figura 48). De seguida, na Tabela 7, apresenta-se o valor de AAC obtido para as diferentes plantas aromáticas.

Tabela 7: Coeficiente de actividade antioxidante (AAC) obtido pelas diversas plantas aromáticas estudadas.

Plantas	Nome Vulgar	Média AAC \pm DP
Plantas Secas	Alecrim	431,8 \pm 21,9
	Tomilho	440,7 \pm 4,12
	Orégão	391,9 \pm 34,1
	Estragão	220,1 \pm 15,9
	Manjerona	249,4 \pm 21,5
	Hortelã	162,8 \pm 11,1
	Manjericão	92,72 \pm 7,28
Plantas Secas Orgânicas	Alecrim	397,8 \pm 22,8
	Tomilho-Limão	235,6 \pm 11,2
	Orégão	155,5 \pm 18,5
	Estragão	290,4 \pm 18,9
	Manjerona	120,4 \pm 9,17
	Hortelã-Pimenta	219,8 \pm 10,6
Plantas Frescas	Alecrim	72,27 \pm 1,22
	Tomilho	60,35 \pm 2,58
	Orégão	77,11 \pm 1,71
	Estragão	113,8 \pm 7,16
	Manjerona	75,80 \pm 0,80
	Hortelã	64,95 \pm 2,21
	Manjericão	76,65 \pm 4,31
	Stevia	90,74 \pm 7,24

Para facilitar a interpretação dos resultados, devido à variedade de plantas estudadas e diversidade de resultados, elaboraram-se quatro gráficos comparativos da capacidade antioxidante verificada pelas plantas aromáticas, utilizando o teste do branqueamento do β -Caroteno. Na **Figura 47**, apresenta-se a comparação do coeficiente de actividade antioxidante (AAC) das plantas secas e frescas.

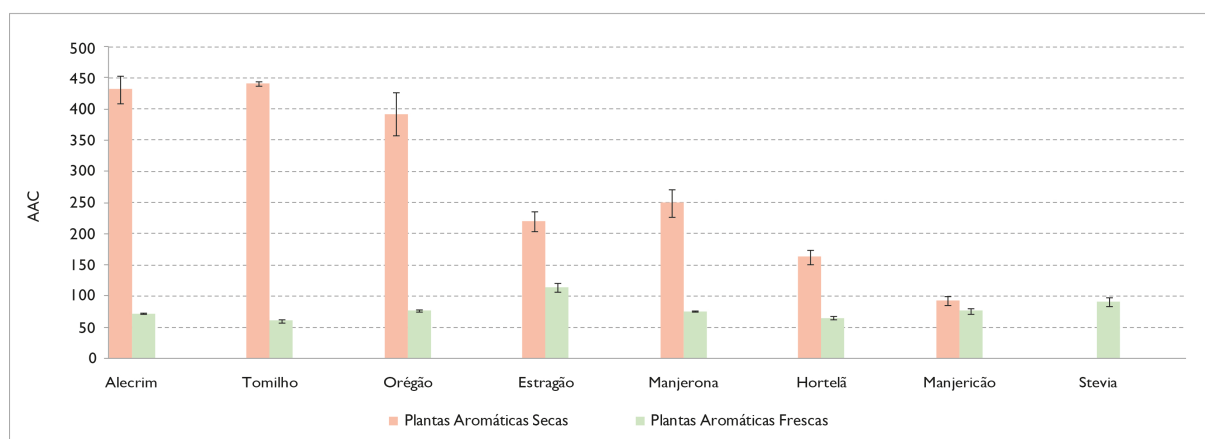


Figura 47: Comparação do coeficiente de actividade antioxidante (AAC) das plantas aromáticas secas e frescas.

Visualizando a **Figura 47**, verifica-se que as amostras de plantas aromáticas secas apresentam capacidade antioxidante muito superior comparativamente às amostras de plantas aromáticas frescas, comparando com a mesma espécie, com excepção do manjeriço seco que apresenta um valor superior mas relativamente próximo em relação ao manjeriço fresco.

Para as amostras secas, o tomilho foi o que apresentou maior capacidade antioxidante. Em termos de capacidade antioxidante verificou-se a seguinte ordem decrescente: tomilho \approx alecrim > orégão > manjerona > estragão > hortelã > manjeriço.

Relativamente às amostras frescas, o estragão fresco foi o que apresentou maior capacidade antioxidante. Apesar do estragão fresco ter apresentado um valor maior de AAC, todas as amostras frescas apresentarem valores idênticos de AAC.

Devido às amostras analisadas serem secas e frescas, também pode influenciar na diferente capacidade antioxidante demonstrada, uma vez que as amostras frescas apresentam um elevado teor de água na sua composição (determinado em 4.1.). Assim,

na **Figura 48**, apresenta-se a comparação do coeficiente da actividade antioxidante (AAC) das plantas secas e frescas, tendo em consideração a percentagem de humidade determinada para cada planta (4.1.).

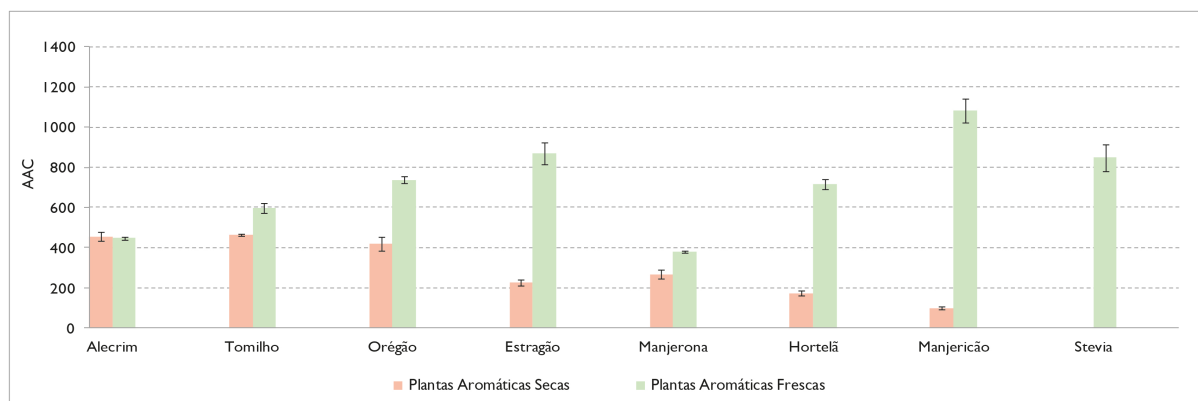


Figura 48: Comparação do coeficiente de actividade antioxidante (AAC) das plantas aromáticas secas e frescas, tendo em consideração a humidade de cada planta aromática.

Através a **Figura 48**, verifica-se que ao invés do constatado na figura anterior, a capacidade antioxidante foi superior para as plantas aromáticas frescas, à excepção do alecrim que apresentou valores de AAC muito próximos, comparando com a mesma espécie. No entanto, verifica-se ainda que o estragão fresco e o manjeriçõo fresco apresentam capacidade antioxidante cerca de três e cinco vezes superior em relação ao estragão seco e ao manjeriçõo seco, respectivamente.

Para as amostras secas, verificou-se a seguinte ordem de capacidade antioxidante: tomilho \approx alecrim > orégão > manjerona > estragão > hortelã > manjeriçõo.

Para as amostras frescas, verificou-se a seguinte ordem de capacidade antioxidante: manjeriçõo > estragão \approx stevia > orégão \approx hortelã > tomilho > alecrim > manjerona.

Apesar de apenas se ter analisado amostras de planta fresca de stevia, verifica-se que possui uma elevada capacidade antioxidante, apresentando um valor de AAC de 847,60. Também foram analisadas seis espécies de plantas secas orgânicas. Assim, na **Figura 49**, apresenta-se a comparação do coeficiente de actividade antioxidante (AAC) das plantas secas orgânicas e secas.

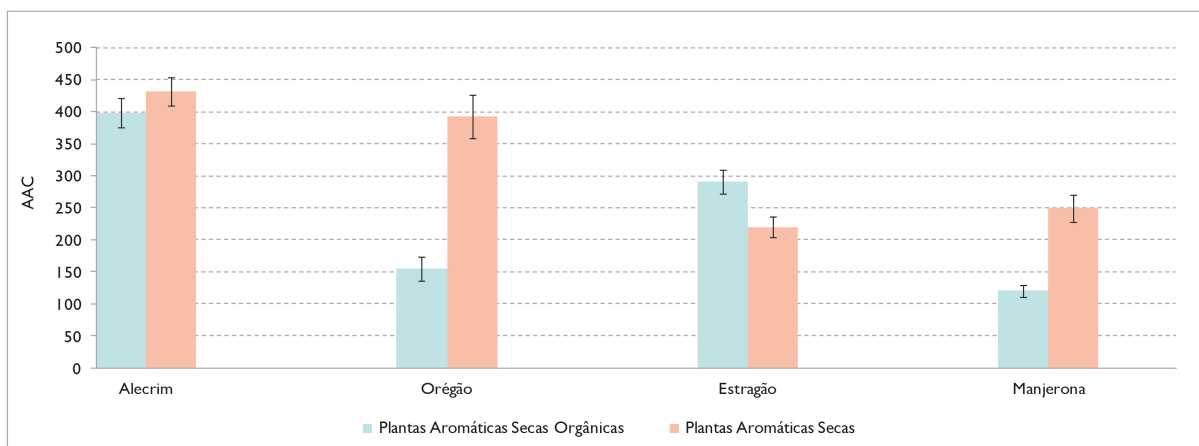


Figura 49: Comparação do coeficiente de actividade antioxidante (AAC) das plantas aromáticas secas de agricultura biológica (orgânicas) e de agricultura convencional.

Visualizando a **Figura 49**, verifica-se que a amostra seca de estragão orgânico (AAC de 290,41), apresenta uma capacidade antioxidante superior comparativamente à amostra seca de estragão. Relativamente às plantas aromáticas secas de agricultura convencional, designadamente o alecrim, o orégão e a manjerona, apresentam valores de AAC superiores, comparativamente às amostras secas orgânicas de alecrim, orégão e manjerona de agricultura biológica, o que indica que as plantas de agricultura convencional possuem maior capacidade antioxidante.

Para as amostras secas orgânicas, verificou-se a seguinte ordem de capacidade antioxidante: alecrim > estragão > orégão > manjerona.

Para as amostras secas, verificou-se a seguinte ordem de capacidade antioxidante: alecrim > orégão > manjerona > estragão.

Na **Figura 50**, apresenta-se comparação do coeficiente de actividade antioxidante (AAC) entre as plantas secas orgânicas.

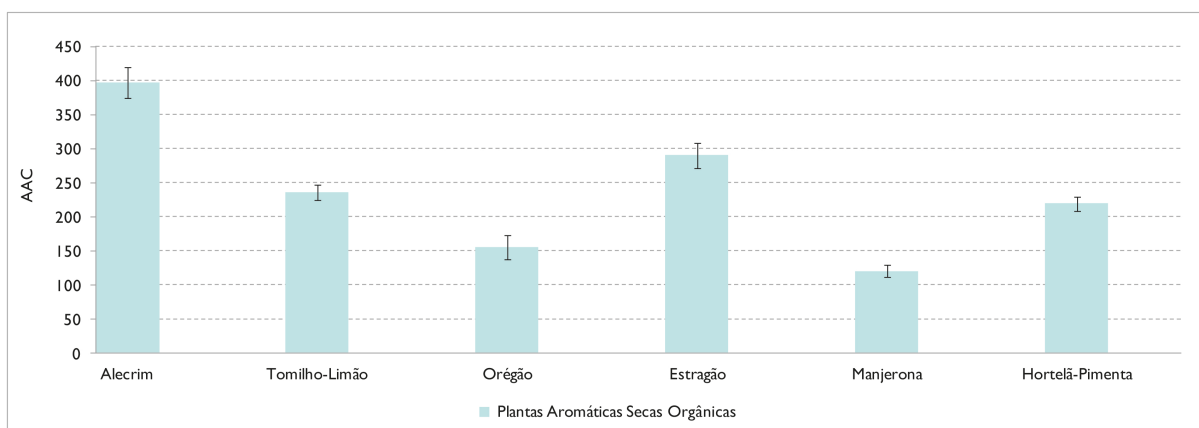


Figura 50: Comparação do coeficiente de actividade antioxidante (AAC) entre as plantas aromáticas secas orgânicas.

Analisando a **Figura 50**, verifica-se que o alecrim seco orgânico demonstrou uma maior capacidade antioxidante em comparação com as outras plantas secas orgânicas, apresentando um valor de AAC de 397,81.

Para as amostras secas orgânicas, como já referido, o alecrim foi o que apresentou maior capacidade antioxidante. Em termos de capacidade antioxidante verificou-se a seguinte ordem decrescente: alecrim > estragão > tomilho-limão \approx hortelã-pimenta > orégão > manjerona.

Na literatura estão disponíveis diversas publicações em que se avaliou a capacidade antioxidante pelo ensaio do branqueamento do β -Caroteno em plantas aromáticas. No entanto, existem diferenças na metodologia entre o presente estudo e os estudos publicados, que não permite fazer comparação entre os resultados obtidos para as diversas plantas aromáticas.

No presente estudo, o coeficiente de actividade antioxidante (AAC) foi determinado através da fórmula descrita em 3.4.3.2., enquanto que estudos publicados na literatura determinaram a capacidade antioxidante através de fórmulas diferentes. São inúmeros os estudos encontrados em que os autores avaliam a capacidade antioxidante em plantas aromáticas com recurso a outras fórmulas, como por exemplo, estudos realizados por Barchan *et al.* (2014), por Bianchin e Carpes (2012), por Jabri-Karoui *et al.* (2012), por Lopes-Lutz *et al.* (2008), por Martins *et al.* (2015), por Mata *et al.* (2007), por

Nickavar e Esbati (2012), por Nikolić *et al.* (2014) e por Terpinc, Bezjak e Abramovič (2009).

4.2.2. Determinação do conteúdo em fenólicos totais e de flavonóides totais

Nesta secção são apresentados e discutidos os valores relativos ao conteúdo de fenólicos totais e ao conteúdo de flavonóides totais.

4.2.2.1. Conteúdo de compostos fenólicos totais

Determinou-se o conteúdo de fenólicos totais, realizando-se o método descrito anteriormente (3.4.4.1). A extracção das 21 amostras de plantas aromáticas foi efectuada de acordo com o descrito previamente (3.3.).

Inicialmente, procedeu-se à realização da curva de calibração absorvância *versus* concentração de ácido gálico (mg GAE/mL) (descrito em 3.4.4.1.1.). De seguida, na Tabela 8, apresentam-se os parâmetros obtidos para a curva de calibração (Anexo I).

Tabela 8: Solvente utilizado, gama de concentrações (mg/mL), equação da curva e respectivo coeficiente de determinação (r^2).

Solvente	Gama de concentrações (mg/mL)	Equação da curva	Coefficiente de determinação (r^2)
Metanol	0,015 - 0,12	$y = 8,6495x - 0,0379$	0,9998

Assim, a partir da equação linear determinou-se o conteúdo de fenólicos totais expressos em equivalentes de ácido gálico (mg GAE/mL) para cada amostra. Através da equação referida em 3.4.4.1., determinou-se o conteúdo existente por cada grama de amostra (mg de GAE/g de amostra). Também são apresentados os resultados em mg de GAE/g de peso seco, tendo em consideração a percentagem de humidade determinada para cada uma das plantas (4.1.) (Figura 52). Na Tabela 9 apresenta-se conteúdo em compostos fenólicos totais obtido para as diversas plantas aromáticas (mg de GAE/g de amostra).

Tabela 9: Conteúdo de compostos fenólicos totais expressos em equivalentes de ácido gálico (mg GAE/ g de amostra).

Plantas	Nome Vulgar	Média (mg GAE/g amostra) ± DP
Plantas Secas	Alecrim	20,1 ± 0,63
	Tomilho	18,0 ± 1,02
	Orégão	18,5 ± 1,50
	Estragão	8,55 ± 0,27
	Manjerona	15,5 ± 0,90
	Hortelã	8,18 ± 0,24
	Manjericão	4,66 ± 0,24
Plantas Secas Orgânicas	Alecrim	10,9 ± 0,34
	Tomilho-Limão	7,19 ± 0,23
	Orégão	19,2 ± 1,59
	Estragão	11,1 ± 0,97
	Manjerona	12,3 ± 1,08
	Hortelã-Pimenta	6,85 ± 0,25
Plantas Frescas	Alecrim	3,61 ± 0,27
	Tomilho	1,54 ± 0,16
	Orégão	2,75 ± 0,06
	Estragão	1,49 ± 0,11
	Manjerona	4,89 ± 0,22
	Hortelã	1,45 ± 0,07
	Manjericão	1,00 ± 0,02
	Stevia	2,39 ± 0,08

Para uma melhor visualização dos resultados, foram elaborados quatro gráficos comparativos do conteúdo de fenólicos totais. Na **Figura 5 I**, apresenta-se a comparação do conteúdo de fenólicos totais (mg GAE/g amostra) das plantas secas e frescas.

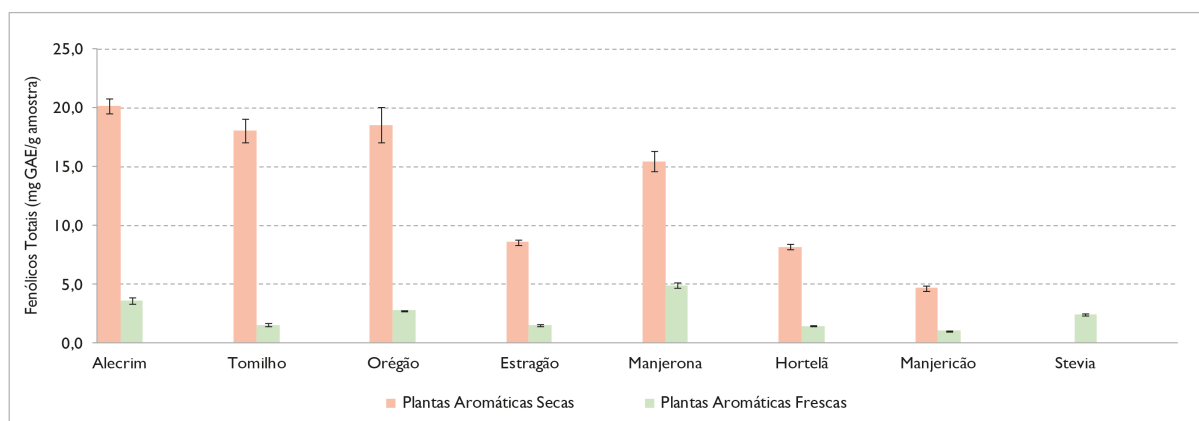


Figura 51: Comparação do conteúdo de fenólicos totais (mg GAE/g amostra) das plantas aromáticas secas e frescas.

Visualizando a **Figura 51**, verifica-se que as amostras de plantas aromáticas secas apresentam quantidades de fenólicos totais muito superiores às amostras de plantas aromáticas frescas, comparando com a mesma espécie.

Para as amostras secas, o alecrim foi o que apresentou maior quantidade de fenólicos, verificando-se a seguinte ordem decrescente: orégão \approx tomilho > manjerona > estragão \approx hortelã > manjericão.

Para as amostras frescas, a manjerona foi a que apresentou maior quantidade de compostos fenólicos obtendo-se a seguinte ordem decrescente: alecrim > orégão \approx stevia > tomilho \approx estragão \approx hortelã > manjericão.

O facto das plantas comparadas serem frescas e secas, pode influenciar na grande diferença constatada entre elas, uma vez que as plantas frescas apresentam um elevado teor de água na sua composição (4.1.). Assim, na **Figura 52**, apresenta-se a comparação do conteúdo de fenólicos totais (mg GAE/g peso seco) das plantas secas e frescas.

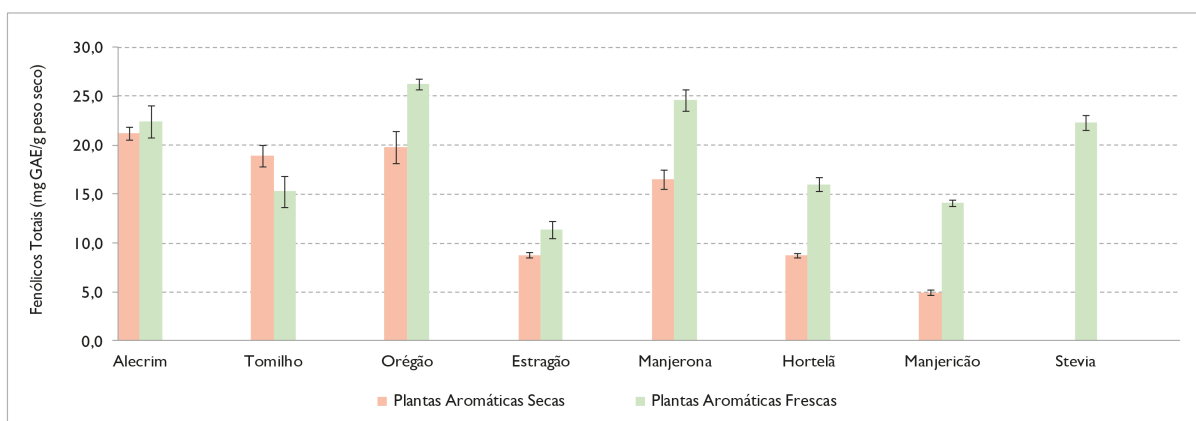


Figura 52: Comparação do conteúdo de fenólicos totais (mg GAE/g peso seco) das plantas aromáticas secas e frescas.

Visualizando a **Figura 52**, constata-se na generalidade, que já não existe uma enorme discrepância no teor de fenólicos totais, entre as amostras de plantas secas e frescas, comparando a mesma espécie. As amostras de plantas aromáticas frescas apresentam quantidades de fenólicos totais superiores às amostras de plantas aromáticas secas, à excepção do *Thymus vulgaris* L., que apresenta maior teor destes compostos no estado seco.

Para as amostras secas, o alecrim foi o que apresentou maior quantidade de fenólicos, verificando-se a seguinte ordem decrescente: orégão > tomilho > manjerona > estragão ≈ hortelã > manjericão.

Para as amostras frescas, o orégão foi o que apresentou maior quantidade de compostos fenólicos, obtendo-se a seguinte ordem decrescente: manjerona > alecrim ≈ stevia > hortelã > tomilho > manjericão > estragão.

O orégão fresco foi o que apresentou maior conteúdo de compostos fenólicos totais (26,27 mg GAE/g peso seco).

Apesar de apenas se ter analisado a stevia fresca, verifica-se que esta possui um elevado conteúdo em fenólicos totais (22,29 mg GAE/g peso seco). Também foram analisadas seis espécies de plantas secas orgânicas. Assim, na **Figura 53**, apresenta-se a comparação do conteúdo de fenólicos totais (mg GAE/g amostra) das plantas secas orgânicas e secas.

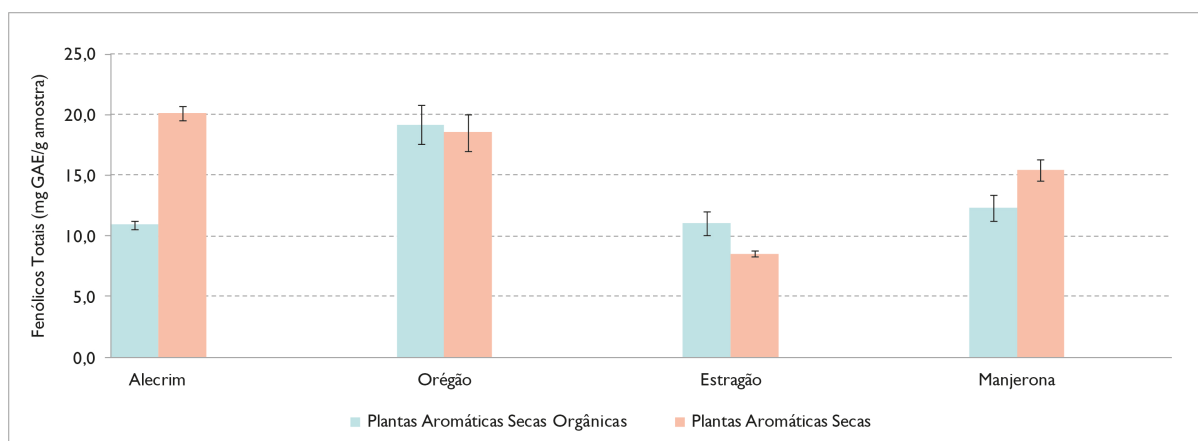


Figura 53: Comparação do conteúdo de fenólicos totais (mg GAE/g amostra) das plantas aromáticas secas de agricultura biológica (orgânicas) e de agricultura convencional.

Através da **Figura 53**, verifica-se que as amostras secas orgânicas, nomeadamente o estragão e o orégão, apresentam valores de fenólicos totais superiores comparativamente às amostras secas de agricultura convencional de estragão e orégão, apesar de este último apresentar uma quantidade muito próxima destes compostos. Relativamente às amostras secas, de alecrim e manjerona, estas apresentam valores de fenólicos totais superiores comparativamente às correspondentes amostras secas de agricultura biológica.

Para as amostras secas orgânicas, o orégão foi o que apresentou maior quantidade destes compostos seguindo-se a ordem decrescente: manjerona > estragão ≈ alecrim.

Para as amostras secas, o alecrim foi o que apresentou maior quantidade de compostos fenólicos seguindo-se a ordem: orégão > manjerona > estragão.

Em relação às plantas de agricultura biológica, seria expectável que estas apresentassem valores de fenólicos totais superiores comparativamente às plantas de agricultura convencional, no entanto isso não se verificou em todos os casos. Apenas se verificaram valores superiores de fenólicos totais para as amostras orgânicas de estragão e orégão (11,05 e 19,18 mg GAE/g amostra, respectivamente), comparativamente às amostras secas da mesma espécie.

Também foram comparadas as seis espécies de plantas secas orgânicas entre si. Na **Figura 54**, apresenta-se a comparação do conteúdo de fenólicos totais (mg GAE/g amostra) entre as plantas secas orgânicas.

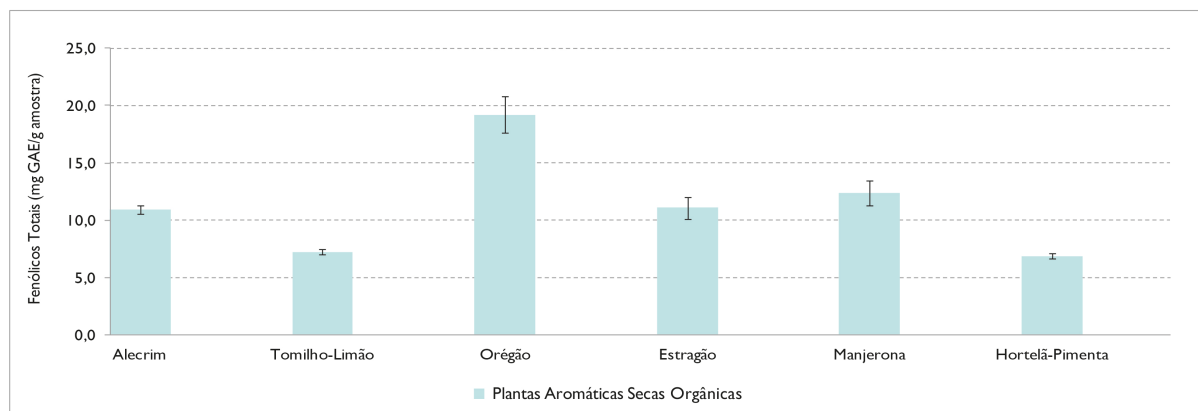


Figura 54: Comparação do conteúdo de fenólicos totais (mg GAE/g amostra) entre as plantas aromáticas secas orgânicas.

Para as amostras secas orgânicas, como já referido, o orégão foi o que apresentou maior quantidade destes compostos, verificando-se a seguinte ordem: manjerona > estragão \approx alecrim > tomilho-limão \approx hortelã-pimenta (**Figura 54**).

Na literatura estão disponíveis diversas publicações em que se determinaram o conteúdo de compostos fenólicos totais em plantas aromáticas. De seguida, descrevem-se alguns dos resultados desses estudos.

Relativamente ao alecrim, Erkan, Ayranci e Ayranci (2008) determinaram o conteúdo de fenólicos totais (TFC) para um extracto metanólico de alecrim seco (*Rosmarinus officinalis* L.), obtendo um valor de 162 mg GAE/g amostra, obtendo um valor superior ao valor obtido no presente estudo para o alecrim seco (20,12 mg GAE/g amostra). No trabalho realizado por Yoo *et al.* (2008) foi determinado o TFC para um extracto em metanol a 70 % (v/v) de alecrim fresco, obtendo um valor de 7,66 mg GAE/g de planta fresca, sendo superior ao valor obtido no presente trabalho. Jordán *et al.* (2013) analisaram extractos metanólicos de várias amostras de alecrim fresco (em plena floração), obtendo valores de TFC (3,53 e 3,4 mg GAE/g amostra) similares ao valor obtido no presente trabalho para o alecrim fresco (3,61 mg GAE/g amostra). Chan *et al.* (2012) analisaram extractos metanólicos de alecrim fresco e seco (em estufa), obtendo um TFC

de 14,40 mg GAE/g de amostra fresca (peso fresco) e de 24,90 mg GAE/g de amostra seca (peso seco), respectivamente. Comparando os valores obtidos no presente estudo para o alecrim fresco (3,61 mg GAE/g amostra) e para o alecrim seco (21,21 mg GAE/g peso seco) com os valores obtidos por estes autores verifica-se que são inferiores. Hossain et al. (2010) analisaram extractos metanólicos de alecrim fresco e seco, obtendo um TFC aproximadamente de 19 e 95 mg GAE/g de peso seco de amostra, respectivamente. Comparando com os valores obtidos no presente trabalho para o alecrim fresco (22,40 mg GAE/g peso seco) e alecrim seco (21,21 mg GAE/g peso seco), verifica-se que o valor obtido para o alecrim fresco é ligeiramente superior e o obtido para o alecrim seco é inferior. Wojdyło, Oszmiański e Czemerz (2007) analisaram um extracto de alecrim fresco em 80 % (v/v) de metanol, obtendo um TFC de 0,0171 mg GAE/g de peso seco. O valor obtido no presente estudo para o alecrim fresco (22,40 mg GAE/g peso seco) é superior ao valor obtido por estes autores. Shan et al. (2005) determinaram o TFC no alecrim fresco, obtendo um valor (50,7 mg GAE/g de peso seco), superior ao do presente trabalho. Uma das causas desta diferença pode estar relacionada com o solvente de extracção. Shan et al. (2005) utilizou metanol a 80 % (v/v) e o presente trabalho usou metanol como solvente de extracção. Proestos et al. (2005) determinaram o conteúdo em fenólicos totais em alecrim seco, obtendo um valor coincidente com o do presente estudo (21 mg GAE/g de amostra seca). Papageorgiou, Mallouchos e Komaitis (2008) analisaram extractos metanólicos de alecrim fresco (amostras em diferentes estados vegetativos colhidas em diferentes épocas do ano), obtendo valores de TFC (42,40 - 120,25 mg GAE/g de peso seco) superiores ao do presente trabalho para o alecrim fresco (22,40 mg GAE/g peso seco). Dorman et al. (2003) determinaram o TFC de um extracto aquoso de alecrim seco, obtendo um valor (185 mg GAE/g amostra) superior ao valor obtido no presente trabalho para o alecrim seco. Bianchin e Carpes (2012) determinaram o TFC de um extracto etanólico de alecrim fresco, obtendo um valor (40,15 mg GAE/g de amostra), superior ao valor obtido no presente trabalho para o alecrim fresco. Teruel et al. (2015) analisaram três extractos de folhas de *Rosmarinus officinalis* L., extracto de alecrim em pó obtido usando acetona como solvente, óleo de alecrim obtido usando metanol como solvente e óleo de alecrim obtido usando acetona como solvente, obtendo TFC de 0,2323, 0,2041 e 0,1862 mg GAE/g de extracto, respectivamente. Tsai, Tsai e Ho (2007) determinaram a quantidade de fenólicos totais para um extracto metanólico de folhas secas de alecrim, tendo obtido um teor de 58,1 mg GAE/g de extracto. Herrero et al. (2010) determinaram o teor de fenólicos totais em extractos etanólicos de folhas secas

de alecrim (temperaturas de extracção de 50, 100, 150 e 200 °C), obtendo valores entre 78 e 120 mg GAE/g de extracto. Mata *et al.* (2007) analisaram um extracto aquoso e um extracto etanólico de alecrim fresco, obtendo valores de TFC de 58,4 e de 73,5 mg de equivalentes de pirogalol/g de extracto, respectivamente. Terpinc, Bezjak e Abramovič (2009) analisaram vários extractos de folhas de alecrim, obtendo valores de fenólicos totais entre 278 a 966 mg de equivalentes de ácido carnósico/g de extracto. Os valores obtidos por Teruel *et al.* (2015), por Tsai, Tsai e Ho (2007), por Herrero *et al.* (2010), por Mata *et al.* (2007) e por Terpinc, Bezjak e Abramovič (2009) estão apresentados em unidades diferentes do presente estudo não sendo possível a comparação com o presente estudo.

Quanto ao tomilho, Yoo *et al.* (2008) determinaram o TFC para um extracto de tomilho fresco (*Thymus vulgaris* L.) em metanol a 70 % (v/v), obtendo um valor (6,79 mg GAE/g de planta fresca) superior ao valor obtido no presente trabalho para o tomilho fresco (1,54 mg GAE/g amostra). Jabri-Karoui *et al.* (2012) determinaram o TFC para extractos metanólicos de partes floridas frescas de uma espécie do género *Thymus* (*Thymus capitatus* L.), obtendo um valor (15,06 mg GAE/g peso seco) muito semelhante ao valor obtido no presente estudo para o tomilho fresco (15,26 mg GAE/g peso seco). Miron *et al.* (2011) analisaram vários extractos de tomilho silvestre fresco (*Thymus serpyllum* L.) (diferentes solventes e temperaturas de extracção). Para a temperatura de extracção de 50 °C, obtiveram-se um TFC de 79,02 e 34,57 mg GAE/g matéria seca, para o extracto aquoso e etanólico, respectivamente. O valor obtido no presente trabalho para o tomilho fresco (15,26 mg GAE/g peso seco) é inferior aos valores obtidos por estes autores. Chan *et al.* (2012) analisaram extractos metanólicos de tomilho fresco e seco (em estufa), obtendo TFC de 11,60 mg GAE/g de amostra fresca (peso fresco) e de 20,10 mg GAE/g de amostra seca (peso seco), respectivamente. Apesar do valor em TFC para o tomilho fresco ser inferior ao obtido por Chan *et al.* (2012), o resultado para o tomilho seco (18,91 mg GAE/g peso seco) é muito semelhante. Hossain *et al.* (2010) analisaram extractos metanólicos de tomilho fresco e seco, obtendo um TFC aproximadamente de 19 e 112 mg GAE/g de peso seco de amostra, respectivamente. Ambos os valores obtidos por Hossain *et al.* (2010) são superiores ao do presente estudo, embora o do tomilho fresco seja mais próximo (15,26 mg GAE/g peso seco). Zheng e Wang (2001) analisaram um extracto de tomilho fresco, obtendo um valor em TFC (2,13 mg GAE/g de peso fresco) superior ao valor obtido no presente estudo para o tomilho fresco (1,54 mg GAE/g

amostra). Wojdyło, Oszmiański e Czemyers (2007) analisaram um extracto de tomilho fresco em metanol a 80 % (v/v), obtendo um TFC (0,0058 mg GAE/g de peso seco) consideravelmente inferior ao valor obtido no presente estudo para o tomilho fresco (15,26 mg GAE/g peso seco). Shan *et al.* (2005) determinaram o TFC para um extracto metanólico a 80 % (v/v) de tomilho fresco, obtendo um valor (45,2 mg GAE/g de peso seco) superior ao do presente trabalho para o tomilho fresco (15,26 mg GAE/g peso seco). Proestos *et al.* (2005) determinaram o TFC do tomilho seco, obtendo um valor (19,2 mg GAE/g de amostra seca) muito similar ao valor obtido no presente estudo para o tomilho seco (18,91 mg GAE/g peso seco). Dorman *et al.* (2003) determinaram o TFC de um extracto aquoso de tomilho seco, tendo obtido um valor (95,6 mg GAE/g amostra) superior ao valor obtido no presente trabalho para o tomilho seco (18,03 mg GAE/g amostra). Roby *et al.* (2013) determinaram o conteúdo em fenólicos totais para extractos de tomilho fresco em metanol, etanol, éter dietílico e em hexano, obtendo valores de 8,10, 7,30, 6,15 e 4,75 mg GAE/g extracto seco, respectivamente. Os melhores resultados foram obtidos com metanol, o solvente usado no presente estudo. Mata *et al.* (2007) analisaram extractos aquosos e etanólicos de tomilho silvestre fresco (*Thymus serpyllum* L.), obtendo valores de TFC de 74,9 e de 113,0 mg de equivalentes de pirogalol/g de extracto, respectivamente. Nickavar e Esbati (2012) analisaram extractos etanólicos de amostras frescas de *T. daenensis*, *T. kotschyanus* e *T. pubescens*, obtendo valores de TFC de 295,93, 337,00 e de 295,57 mg de equivalentes de rutina/g de extracto, respectivamente. Os resultados obtidos por Roby *et al.* (2013) por Mata *et al.* (2007) e por Nickavar e Esbati (2012) estão em unidades diferentes do presente estudo não sendo possível comparar os mesmos.

Relativamente à hortelã-pimenta, Yoo *et al.* (2008) determinaram o conteúdo de fenólicos totais para extractos de hortelã-pimenta fresca (*Mentha x piperita* L.) em metanol a 70 % (v/v), obtendo um valor (6,38 mg GAE/g de planta fresca) semelhante ao valor obtido no presente estudo para a hortelã-pimenta seca orgânica (6,85 mg GAE/g amostra). Akhtar, Ihsan-ul-Haq e Mirza (2015) também determinaram o TFC para extractos de hortelã-pimenta fresca, em M/C (mistura de metanol e clorofórmio) e em água destilada. Para o extracto aquoso e para o extracto em M/C, obtiveram-se valores de 55,1 e de 71,8 mg GAE/g peso seco de planta, respectivamente. O valor obtido no presente estudo para a hortelã-pimenta seca orgânica (7,36 mg GAE/g peso seco) é inferior aos valores obtidos por estes autores. As diferenças verificadas podem dever-se

à utilização de solventes diferentes do presente estudo. Zheng e Wang (2001) analisaram um extracto de hortelã-pimenta fresca, obtendo um valor de TFC (2,26 mg GAE/g de peso fresco) inferior ao valor obtido no presente estudo para a hortelã-pimenta seca orgânica (6,85 mg GAE/g amostra). No entanto, Yoo *et al.* (2008) Akhtar, Ihsan-ul-Haq e Mirza (2015) e Zheng e Wang (2001) analisaram amostras frescas de hortelã-pimenta, enquanto no presente estudo se analisaram amostras secas de hortelã-pimenta provenientes de agricultura biológica. Chan *et al.* (2012) analisaram extractos metanólicos de hortelã-pimenta fresca e seca (em estufa), obtendo um TFC de 3,38 mg GAE/g de amostra fresca (peso fresco) e de 9,74 mg GAE/g de amostra seca (peso seco), respectivamente. O valor obtido no presente trabalho para a hortelã-pimenta seca orgânica (7,36 mg GAE/g peso seco) é inferior ao valor obtido por Chan *et al.* (2012) para a hortelã-pimenta seca.

No que concerne à hortelã, Malik, Sharma e Soni (2013) determinaram o conteúdo de fenólicos totais para duas espécies de *Mentha* (*Mentha spicata* L. e *Mentha longifolia* L.). As amostras de folhas frescas foram colhidas na primeira e na segunda geração de folhas destas espécies. Para as amostras da segunda geração de folhas, os resultados obtidos demonstraram o TFC (em ambas as espécies) mais elevado em relação às amostras da primeira geração de folhas. Assim, para os extractos metanólicos de *Mentha spicata* L. e *Mentha longifolia* L., obtiveram-se teores de 11,8 e 6,1 mg GAE/g amostra, respectivamente. O valor obtido no presente trabalho para a hortelã fresca (1,45 mg GAE/g amostra) é inferior ao valor obtido por estes autores. Chan *et al.* (2012) analisaram extractos metanólicos de hortelã fresca e seca (em estufa), obtendo um TFC de 6,55 mg GAE/g de amostra fresca (peso fresco) e de 23,40 mg GAE/g de amostra seca (peso seco), respectivamente. Os valores obtidos no presente estudo para a hortelã fresca (1,45 mg GAE/g amostra) e hortelã seca (8,75 mg GAE/g peso seco) são inferiores aos obtidos por estes autores. Shan *et al.* (2005) determinaram para um extracto em metanol a 80 % (v/v) de uma espécie do género *Mentha* (*Mentha canadensis* L.) o TFC na planta fresca, obtendo um valor (51,5 mg GAE/g de peso seco) superior ao valor obtido no presente estudo para a hortelã fresca (16,00 mg GAE/g de peso seco). Mata *et al.* (2007) analisaram amostras frescas de *Mentha spicata* e de *Mentha pulegium*. Para o extracto etanólico de *Mentha spicata* e *Mentha pulegium*, obtiveram-se TFC de 81,2 e de 71,7 mg de equivalentes de pirogalol/g de extracto, respectivamente. Barchan *et al.* (2014) analisaram amostras frescas de três espécies do género *Mentha*, obtendo teores de fenólicos totais de 302,8, 167,2 e

266,2 mg de equivalentes de ácido tânico/g, para os extractos metanólicos de *Mentha spicata*, *Mentha pulegium* e *Mentha piperita*, respectivamente. Scherer et al. (2013) determinaram o TFC para extractos de hortelã fresca, em metanol e em acetona, obtendo valores de fenólicos totais de 76,32 e 37,84 mg GAE/g de extracto seco, respectivamente. Khaled-Khodja, Boulekbache-Makhlouf e Madani (2014) analisaram extractos metanólicos de amostras frescas de *Mentha pulegium* L., obtendo um teor de fenólicos totais de 72,84 mg GAE/g extracto seco. Os valores obtidos por Mata et al. (2007), por Barchan et al. (2014), por Scherer et al. (2013) e por Khaled-Khodja, Boulekbache-Makhlouf e Madani (2014) estão apresentados em unidades diferentes do presente estudo, pelo que não é possível compará-los directamente.

Relativamente à manjerona, Chan et al. (2012) analisaram extractos metanólicos de manjerona (*Origanum majorana* L.) fresca e seca (em estufa), obtendo teores de fenólicos totais de 10,10 mg GAE/g de amostra fresca (peso fresco) e de 55,30 mg GAE/g de amostra seca (peso seco), respectivamente. Os valores obtidos no presente estudo para a manjerona fresca (4,89 mg GAE/g amostra) e seca (16,55 mg GAE/g peso seco) são inferiores aos valores obtidos por estes autores. Hossain et al. (2010) analisaram extractos metanólicos de manjerona fresca e seca, obtendo um TFC aproximadamente de 25 e 65 mg GAE/g de peso seco de amostra, respectivamente. O valor obtido por Hossain et al. (2010) para a manjerona fresca é muito semelhante ao valor obtido no presente trabalho para a manjerona fresca (24,58 mg GAE/g peso seco) e o valor obtido no presente trabalho para a manjerona seca (16,55 mg GAE/g peso seco) é inferior ao obtido por estes autores. Proestos et al. (2005) determinaram o TFC da manjerona seca, obtendo um valor (16,9 mg GAE/g de amostra seca) muito semelhante ao valor obtido no presente estudo para a manjerona seca (16,55 mg GAE/g peso seco). Papageorgiou, Mallouchos e Komaitis (2008) analisaram extractos metanólicos de manjerona fresca (amostras em diferentes estados vegetativos colhidas em diferentes épocas do ano), obtendo valores de fenólicos totais entre 64,50 e 125,80 mg GAE/g de peso seco. Este estudo apresentou TFC superiores ao do presente trabalho. Dorman et al. (2004) determinaram o conteúdo de fenólicos totais na manjerona doce (*Majorana hortensis* Moench) seca, obtendo um valor de 97,9 mg GAE/g de peso seco de extracto. Roby et al. (2013) determinaram o TFC para extractos de manjerona fresca (*Origanum majorana* L.) em metanol, etanol, éter dietílico e em hexano, obtendo valores de fenólicos totais de 5,20, 4,65, 4,55 e 3,90 mg GAE/g extracto seco, respectivamente. Não é possível comparar os valores obtidos no presente estudo com os

obtidos por Dorman *et al.* (2004) e por Roby *et al.* (2013) porque os resultados estão apresentados noutras unidades.

Quanto ao conteúdo de fenólicos totais no orégão, Miron *et al.* (2011) analisaram vários extractos de orégão fresco (*Origanum vulgare* L.) em diferentes solventes e para diferentes temperaturas de extracção. Para a temperatura de extracção de 50 °C, obtiveram-se valores de TFC de 184,90 e de 68,30 mg GAE/g matéria seca, para o extracto aquoso e etanólico, respectivamente. Os valores obtidos por Miron *et al.* (2011) são superiores ao valor obtido no presente estudo para o orégão fresco (26,27 mg GAE/g peso seco). Chan *et al.* (2012) analisaram extractos metanólicos de orégão (*Origanum vulgare* L.) fresco e seco (em estufa), obtendo um TFC de 8,57 mg GAE/g de amostra fresca (peso fresco) e de 61,20 mg GAE/g de amostra seca (peso seco), respectivamente. Os valores obtidos no presente trabalho para o orégão fresco (2,75 mg GAE/g amostra) e seco (19,80 mg GAE/g peso seco) são inferiores aos valores obtidos por estes autores. Hossain *et al.* (2010) analisaram extractos metanólicos de orégão fresco e seco, obtendo um TFC aproximadamente de 23 e 95 mg GAE/g de peso seco de amostra, respectivamente. O valor obtido no presente estudo para o orégão fresco (26,27 mg GAE/g peso seco) é semelhante ao valor obtido por Hossain *et al.* (2010), o mesmo não se verifica para o orégão seco que apresentou um valor inferior no presente estudo. Wojdyło, Oszmiański e Czemerys (2007) analisaram um extracto de orégão fresco em metanol a 80 % (v/v), obtendo um TFC (0,0015 mg GAE/g de peso seco) consideravelmente inferior ao valor obtido no presente estudo para o orégão fresco. Shan *et al.* (2005) determinaram o TFC para um extracto metanólico a 80 % (v/v) de orégão fresco, obtendo um valor (101,7 mg GAE/g de peso seco), superior ao valor obtido no presente trabalho para o orégão fresco. Dorman *et al.* (2003) determinaram o TFC de um extracto aquoso de orégão seco, tendo obtido um valor (149 mg GAE/g amostra), superior ao valor obtido no presente trabalho para o orégão seco (18,54 mg GAE/g amostra). Skotti *et al.* (2014) analisaram um extracto aquoso de orégão seco, obtendo um teor de fenólicos totais de 0,643 mg de ácido cafeico/mL.

Relativamente ao manjeriço, Akhtar, Ihsan-ul-Haq e Mirza (2015) determinaram o teor de fenólicos totais para extractos de manjeriço fresco (*Ocimum basilicum* L.), em M/C (mistura de metanol e clorofórmio) e em água destilada. Para o extracto aquoso e para o extracto em M/C, obtiveram-se teores de fenólicos totais de 39,8 e de 33,7 mg GAE/g peso seco de planta, sendo superiores aos do presente estudo. Chan *et al.* (2012)

analisaram extractos metanólicos de manjeriço fresco e seco (em estufa), obtendo TFC de 2,99 mg GAE/g de amostra fresca (peso fresco) e de 4,66 mg GAE/g de amostra seca (peso seco), respectivamente. O valor obtido no presente trabalho para o manjeriço fresco (1,00 mg GAE/g amostra) é inferior ao valor obtido por Chan *et al.* (2012) no entanto, o valor obtido no presente trabalho para o manjeriço seco (4,96 mg GAE/g peso seco) é semelhante ao valor obtido por estes autores para esta planta no estado seco. Hossain *et al.* (2010) analisaram extractos metanólicos de manjeriço fresco e seco, obtendo TFC aproximadamente de 20 e 43 mg GAE/g de peso seco de amostra, respectivamente. Os valores obtidos no presente estudo para o manjeriço fresco (14,08 mg GAE/g peso seco) e seco (4,96 mg GAE/g peso seco) são inferiores aos obtidos por estes autores. Shan *et al.* (2005) determinaram o TFC para o extracto metanólico a 80 % (v/v) de manjeriço fresco, obtendo um valor (36,4 mg GAE/g de peso seco), superior ao valor obtido no presente trabalho para o manjeriço fresco. Proestos *et al.* (2005) determinaram o TFC para o manjeriço seco, obtendo um valor (7,4 mg GAE/g de amostra seca), superior ao valor obtido no presente estudo para a mesma amostra. Hinneburg, Dorman e Hiltunen (2006) analisaram um extracto hidrodestilado de manjeriço seco, obtendo um teor de fenólicos totais de 147 mg GAE/g de extracto.

Quanto ao conteúdo de fenólicos totais no estragão, Durić *et al.* (2013) determinaram no estragão fresco (*Artemisia dracuncululus* L.) o TFC, obtendo teores de 30,27 e 35,19 mg GAE/g de amostra, para extracção a frio e a quente, respectivamente. Os valores obtidos por Durić *et al.* (2013) são superiores ao valor obtido no presente trabalho para o estragão fresco (1,49 mg GAE/g amostra). Miron *et al.* (2011) analisaram várias amostras de estragão fresco (*Artemisia dracuncululus* L.) extraídas com diferentes solventes e diferentes temperaturas. Para a temperatura de extracção de 50 °C, obtiveram-se TFC de 44,75 e 16,80 mg GAE/g matéria seca, para o extracto aquoso e etanólico, respectivamente. Comparando os valores obtidos por Miron *et al.* (2011) com o valor obtido no presente estudo para o estragão fresco (11,35 mg GAE/g peso seco), verifica-se que o valor obtido no presente estudo é inferior. Megdiche-Ksouri *et al.* (2015) analisaram amostras frescas de *Artemisia campestris* L., obtendo teores de fenólicos totais de 158,75, 94,17 e 10,63 mg GAE/g extracto seco, para extractos em metanol, acetato de etilo e água, respectivamente. O solvente que apresentou o melhor resultado foi o metanol, sendo o solvente utilizado no presente estudo.

Relativamente à stevia, Ghanta *et al.* (2007) determinaram o conteúdo de fenólicos

totais de um extracto de folhas frescas de *Stevia rebaudiana* Bertoni em acetato de etilo, obtendo um teor de fenólicos totais de 860 mg GAE/g de peso seco. O valor obtido por Ghanta *et al.* (2007) é superior ao valor obtido no presente estudo para a stevia fresca (22,29 mg GAE/g peso seco). Zeng *et al.* (2013) analisaram extractos etanólicos de amostras frescas de folhas e caules de diferentes variedades de *Stevia rebaudiana*, obtendo valores de TFC (55,64 - 58,35 mg de ácido gálico/g de peso seco) superiores ao valor obtido no presente trabalho para a stevia fresca. Muanda *et al.* (2011) analisaram um extracto aquoso e um extracto M/A (mistura de metanol e água) de folhas secas de *Stevia rebaudiana*, obtendo valores de TFC de 20,85 e de 25,25 mg GAE/g de peso seco, respectivamente. O valor obtido no presente estudo para a stevia fresca (22,29 mg GAE/g peso seco) é superior ao valor obtido por Muanda *et al.* (2011) para o extracto aquoso, sendo inferior ao valor do extracto M/A. Gawel-Bęben *et al.* (2015) analisaram amostras de folhas secas de stevia, obtendo valores de TFC de 3,85, 7,65 e 15,50 mg GAE/g de folhas de stevia secas, para o extracto aquoso, etanólico e extracto aquoso-glicol, respectivamente. Os valores obtidos por Gawel-Bęben *et al.* (2015) são superiores ao valor obtido no presente estudo para a stevia fresca (2,39 mg GAE/g amostra). No entanto, no presente estudo analisaram-se apenas amostras frescas desta planta aromática, enquanto Muanda *et al.* (2011) e Gawel-Bęben *et al.* (2015) analisaram amostras de folhas secas de stevia. Shukla *et al.* (2012) analisaram um extracto aquoso de folhas frescas de stevia, obtendo um teor de fenólicos totais de 56,74 mg GAE/g de extracto seco. Shukla *et al.* (2009) analisaram um extracto etanólico de folhas frescas de stevia, obtendo um teor de fenólicos totais de 61,50 mg GAE/g de extracto seco. Jahan *et al.* (2010) analisaram um extracto etanólico a 80 % (v/v) de folhas secas de stevia, obtendo um teor de fenólicos totais de 65,21 mg GAE/g de extracto seco. Mandal e Madan (2013) analisaram extractos metanólicos de cinco variedades de folhas secas de stevia adquiridas a diferentes fornecedores, obtendo valores de TFC entre 3,64 a 5,87 mg GAE/L. Kim *et al.* (2011) analisaram extractos aquosos de amostras frescas de folhas e caules de stevia, obtendo um teor de fenólicos totais de 130,67 e 43,99 mg de equivalentes de catequina/g extracto para as folhas e caules, respectivamente. Kaushik *et al.* (2010) analisaram extractos aquosos de folhas frescas de stevia colhidas em épocas diferentes do ano. O conteúdo de fenólicos totais obtido variou entre 41 a 42 mg de equivalentes de ácido tânico/g de folhas secas. Sutradhar *et al.* (2013) analisaram dois extractos de folhas frescas de *Stevia rebaudiana*, obtendo teores de fenólicos totais de 280 e de 810 mg de equivalentes de ácido tânico/g, para o extracto metanólico e para o extracto etanólico das folhas de stevia,

respectivamente. Shivanna *et al.* (2013) analisaram um extracto de folhas de *Stevia rebaudiana*, obtendo um teor de fenólicos totais de 91,0 mg/g. Tadhani, Patel e Subhash (2007) analisaram extractos de folhas e caules de *Stevia rebaudiana*, obtendo um teor de fenólicos totais de 25,18 e 35,86 mg/g de folhas e caules de stevia em base de peso seco, respectivamente. Os valores obtidos por Shukla *et al.* (2012), por Shukla *et al.* (2009), por Jahan *et al.* (2010), por Mandal e Madan (2013), por Kim *et al.* (2011), por Kaushik *et al.* (2010), por Sutradhar *et al.* (2013), por Shivanna *et al.* (2013) e por Tadhani, Patel e Subhash (2007) são apresentados em unidades diferentes do presente estudo impossibilitando uma comparação dos resultados.

4.2.2.2. Conteúdo de flavonóides totais

Determinou-se o conteúdo de flavonóides totais, realizando-se o método descrito previamente (3.4.4.2.). A extração das 21 plantas aromáticas foi efectuada de acordo com o descrito anteriormente (3.3.).

Primeiramente, realizou-se a curva de calibração absorvância *versus* concentração de epicatequina (mg ECE/mL) (descrito em 3.4.4.2.1.). A Tabela 10 apresenta os parâmetros obtidos para a curva de calibração (Anexo I).

Tabela 10: Solvente utilizado, gama de concentrações (mg/mL), equação da curva e respectivo coeficiente de determinação (r^2).

Solvente	Gama de concentrações (mg/mL)	Equação da curva	Coefficiente de determinação (r^2)
Metanol	0,05 - 0,45	$y = 1,6475x + 0,0333$	0,9971

Assim, a partir da equação linear determinou-se conteúdo de flavonóides totais expressos em equivalentes de epicatequina (mg ECE/mL) para cada amostra. Através da equação apresentada em 3.4.4.2., determinou-se o conteúdo existente por cada grama de amostra (mg de ECE/g de amostra). Também são apresentados os resultados em mg de ECE/g de peso seco, tendo em consideração a percentagem de humidade determinada

para cada uma das plantas (4.1.) (Figura 56). Na Tabela II apresenta-se o conteúdo em flavonóides totais obtido para as diversas plantas aromáticas (mg de ECE/g de amostra)

Tabela II: Conteúdo de flavonóides totais expressos em equivalentes de epicatequina (mg ECE/g de amostra).

Plantas	Nome Vulgar	Média (mg ECE/g amostra) \pm DP
Plantas Secas	Alecrim	21,0 \pm 0,46
	Tomilho	16,1 \pm 0,80
	Orégão	11,8 \pm 1,01
	Estragão	16,4 \pm 1,00
	Manjerona	13,1 \pm 0,16
	Hortelã	9,53 \pm 0,49
	Manjericão	6,99 \pm 0,45
Plantas Secas Orgânicas	Alecrim	10,8 \pm 1,23
	Tomilho-Limão	8,42 \pm 0,11
	Orégão	13,9 \pm 0,83
	Estragão	10,2 \pm 0,75
	Manjerona	8,39 \pm 0,95
	Hortelã-Pimenta	8,32 \pm 0,36
Plantas Frescas	Alecrim	5,83 \pm 0,41
	Tomilho	2,48 \pm 0,04
	Orégão	4,25 \pm 0,19
	Estragão	2,49 \pm 0,01
	Manjerona	3,59 \pm 0,21
	Hortelã	3,03 \pm 0,23
	Manjericão	2,72 \pm 0,00
	Stevia	5,75 \pm 0,14

Para uma melhor comparação dos resultados obtidos pelas diversas plantas, elaboraram-se quatro gráficos comparativos do conteúdo de flavonóides totais. Na **Figura 55**, apresenta-se a comparação do conteúdo de flavonóides totais (mg ECE/g amostra) das plantas secas e frescas.

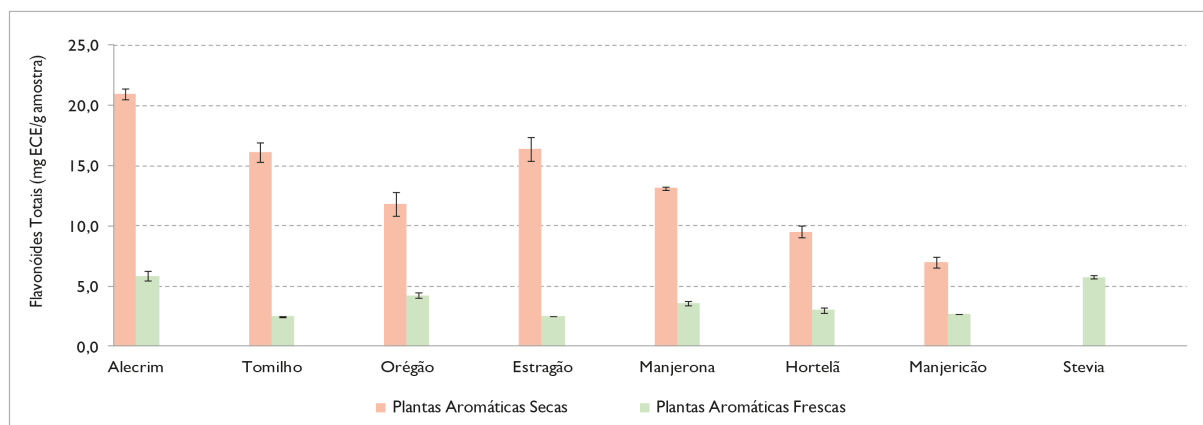


Figura 55: Comparação do conteúdo de flavonóides totais (mg ECE/g amostra) das plantas aromáticas secas e frescas.

Visualizando a **Figura 55**, verifica-se que as amostras de plantas aromáticas secas apresentam quantidades de flavonóides totais muito superiores às amostras de plantas aromáticas frescas, comparando com a mesma espécie.

Para as amostras secas, o alecrim foi o que apresentou maior quantidade de flavonóides totais, verificando-se a seguinte ordem decrescente: estragão \approx tomilho > manjerona > orégão > hortelã > manjeriçã.

Para as amostras frescas, o alecrim foi o que apresentou maior teor de flavonóides totais, obtendo-se a seguinte ordem decrescente: stevia > orégão > manjerona > hortelã \approx manjeriçã \approx estragão \approx tomilho.

Sendo as amostras analisadas frescas e secas, também pode influenciar na grande diferença constatada entre elas, uma vez que as amostras frescas apresentam um elevado teor de água na sua composição (como verificado em **4.1.**). Assim, na **Figura 56**, apresenta-se a comparação do conteúdo de flavonóides totais (mg ECE/g peso seco) das plantas secas e frescas.

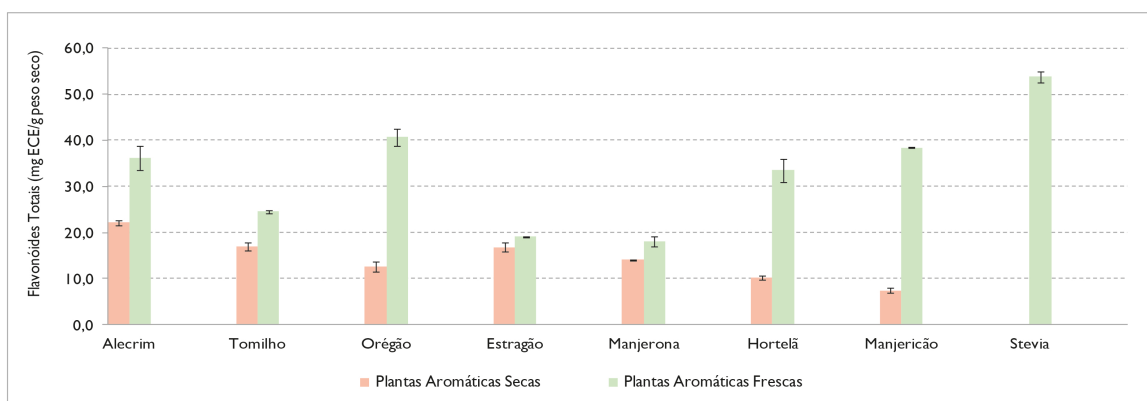


Figura 56: Comparação do conteúdo de flavonóides totais (mg ECE/g peso seco) das plantas aromáticas secas e frescas.

Visualizando a **Figura 56**, verifica-se que se mantém uma enorme discrepância no conteúdo de flavonóides totais, comparando com a mesma espécie. No entanto, ao invés do que se demonstrou anteriormente, constata-se que as amostras de plantas aromáticas frescas apresentaram valores muito superiores de flavonóides totais comparativamente às amostras de plantas aromáticas secas. De notar que a espécie *Artemisia dracunculul* L., obteve valores relativamente próximos para a amostra seca e fresca, 16,83 e 19,05 mg ECE/g peso seco, respectivamente.

Para as amostras secas, o alecrim foi o que apresentou maior quantidade de flavonóides totais, obtendo-se a seguinte ordem decrescente: tomilho \approx estragão > manjerona > orégão > hortelã > manjericão.

Para as amostras frescas, a stevia foi a que apresentou maior teor de flavonóides totais, verificando-se a seguinte ordem decrescente: orégão > manjericão > alecrim > hortelã > tomilho > estragão > manjerona.

Apesar de apenas se ter analisado amostras de stevia fresca, verifica-se que possui o conteúdo mais elevado de flavonóides totais, comparando com todas as outras espécies estudadas, amostras secas e frescas, apresentando um teor de 53,75 mg ECE/g peso seco. Também foram analisadas seis espécies de plantas secas orgânicas. Assim, na **Figura 57**, apresenta-se a comparação do conteúdo de flavonóides totais (mg ECE/g amostra) das plantas secas orgânicas e secas.

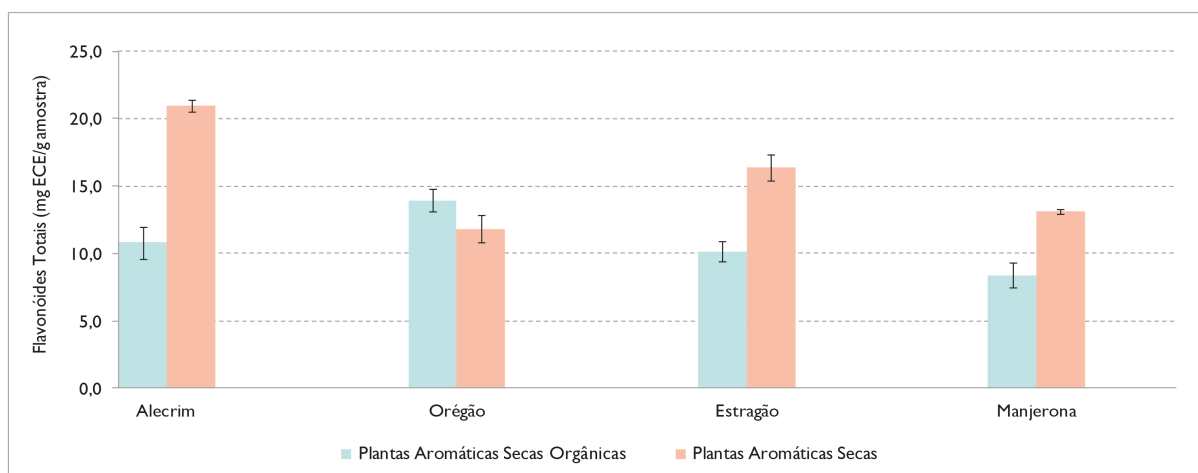


Figura 57: Comparação do conteúdo de flavonóides totais (mg ECE/g amostra) das plantas aromáticas secas de agricultura biológica (orgânicas) e de agricultura convencional.

Através da **Figura 57**, verifica-se que a amostra seca orgânica de orégão (13,93 mg ECE/g amostra), apresenta um conteúdo de flavonóides totais superior comparativamente à amostra seca de orégão. Relativamente às amostras secas de agricultura convencional, nomeadamente, o alecrim, o estragão e a manjerona, apresentam valores de flavonóides totais superiores comparativamente às correspondentes amostras secas de agricultura biológica (orgânicas).

Para as amostras secas orgânicas, o orégão foi o que apresentou maior quantidade de flavonóides totais, obtendo-se a seguinte ordem decrescente: alecrim > estragão > manjerona.

Para as amostras secas, o alecrim foi o que apresentou maior quantidade de flavonóides totais, verificando-se a seguinte ordem decrescente: estragão > manjerona > orégão.

Também foram comparadas as seis espécies de plantas secas orgânicas entre si. Na **Figura 58**, apresenta-se a comparação do conteúdo de flavonóides totais (mg ECE/g amostra) entre as plantas secas orgânicas.

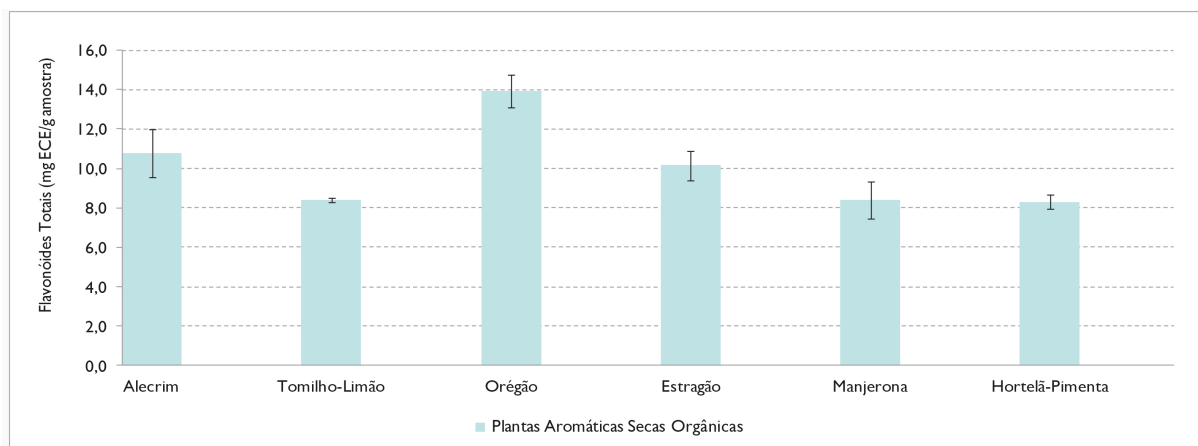


Figura 58: Comparação do conteúdo de flavonóides totais (mg ECE/g amostra) entre as plantas aromáticas secas orgânicas.

Para as amostras secas orgânicas, como já referido, o orégão foi o que apresentou maior quantidade de flavonóides totais, verificando-se a seguinte ordem decrescente: alecrim > estragão > tomilho-limão ≈ manjerona ≈ hortelã-pimenta (**Figura 58**).

Na literatura estão disponíveis diversas publicações em que se determinaram o conteúdo de flavonóides totais em plantas aromáticas. De seguida, descrevem-se alguns dos resultados desses estudos.

Relativamente ao alecrim, Yoo *et al.* (2008) determinaram o teor de flavonóides totais para um extracto de alecrim fresco (*Rosmarinus officinalis* L.) em metanol a 70 % (v/v), obtendo um valor de 4,48 mg de equivalentes de catequina/g de planta fresca, sendo inferior ao valor obtido no presente estudo para o alecrim fresco (5,83 mg ECE/g amostra). Chan *et al.* (2012) analisaram extractos metanólicos de alecrim fresco e seco (em estufa), obtendo um teor de flavonóides totais de 3,4 mg de equivalentes de quercetina/g de amostra fresca (peso fresco) e de 5,3 mg de equivalentes de quercetina/g de amostra seca (peso seco), respectivamente. Tsai, Tsai e Ho (2007) determinaram a quantidade de flavonóides totais para um extracto metanólico de folhas secas de alecrim, tendo obtido um teor de 60,7 mg de equivalentes de catequina/g de extracto. Papageorgiou, Mallouchos e Komaitis (2008) analisaram extractos metanólicos de alecrim fresco (amostras em diferentes estados vegetativos colhidas em diferentes épocas do ano), obtendo valores de flavonóides totais entre quantidades vestigiais e 25,10 mg ECE/g de peso seco. O valor obtido no presente trabalho para o alecrim fresco (36,14 mg ECE/g peso seco) é superior ao intervalo de valores obtido por estes autores. Bianchin e Carpes

(2012) determinaram o conteúdo de flavonóides para um extracto etanólico de alecrim fresco, obtendo um valor (24,38 mg de equivalentes de quercetina/g de amostra).

Quanto aos flavonóides totais no tomilho, Yoo *et al.* (2008) determinaram o teor de flavonóides totais para um extracto de tomilho fresco (*Thymus vulgaris* L.) em metanol a 70 % (v/v), obtendo um valor (3,00 mg de equivalentes de catequina/g de planta fresca) superior ao valor obtido no presente estudo para o tomilho fresco (2,48 mg ECE/g amostra). Jabri-Karoui *et al.* (2012) determinaram o teor de flavonóides totais para extractos metanólicos de amostras frescas (partes floridas) de uma espécie do género *Thymus* (*Thymus capitatus* L.), obtendo um valor (10,62 mg equivalentes de catequina/g peso seco) inferior ao valor obtido no presente trabalho para o tomilho fresco (24,57 mg ECE/g peso seco). Chan *et al.* (2012) analisaram extractos metanólicos de tomilho fresco e seco (em estufa), obtendo teores de flavonóides totais de 5,8 mg de equivalentes de quercetina/g de amostra fresca (peso fresco) e de 8,71 mg de equivalentes de quercetina/g de amostra seca (peso seco), respectivamente. Nickavar e Esbati (2012) analisaram extractos etanólicos de amostras frescas de *T. daenensis*, *T. kotschyanus* e *T. pubescens*, obtendo valores de 35,21, 37,11 e de 50,39 mg de equivalentes de rutina/g de extracto, respectivamente. Os resultados apresentados por estes autores estão em unidades diferentes dos apresentados neste estudo impossibilitando a sua comparação.

Relativamente à hortelã-pimenta, Yoo *et al.* (2008) determinaram o conteúdo em flavonóides totais para extractos de hortelã-pimenta fresca (*Mentha piperita* L.) em metanol a 70 % (v/v), obtendo um valor (3,16 mg de equivalentes de catequina/g de planta fresca) inferior ao valor obtido no presente estudo para a hortelã-pimenta seca orgânica (8,32 mg ECE/g amostra). No entanto, Yoo *et al.* (2008) analisaram amostras frescas de hortelã-pimenta e no presente estudo as amostras adquiridas de hortelã-pimenta eram secas e provenientes de agricultura biológica. Akhtar, Ihsan-ul-Haq e Mirza (2015) determinaram o teor de flavonóides totais para extractos de hortelã-pimenta fresca, em M/C (mistura de metanol e clorofórmio) e em água destilada. Para o extracto aquoso e para o extracto em M/C, obtiveram-se valores de flavonóides totais de 37,1 e de 33,5 mg de equivalentes de quercetina/g peso seco de amostra, respectivamente. Chan *et al.* (2012) analisaram extractos metanólicos de hortelã-pimenta fresca e seca (em estufa), obtendo um teor de flavonóides totais de 1,24 mg de equivalentes de quercetina/g de amostra fresca (peso fresco) e de 8,68 mg de equivalentes de quercetina/g de amostra seca (peso seco), respectivamente.

Quanto à hortelã, Khaled-Khodja, Boulekbache-Makhlouf e Madani (2014) analisaram extractos metanólicos de amostras frescas de *Mentha pulegium* L., obtendo um valor de flavonóides totais de 13,82 mg de equivalentes de quercetina/g extracto seco. O resultado obtido por estes autores não está nas mesmas unidades do resultado apresentado no presente estudo, impossibilitando a sua comparação. Malik, Sharma e Soni (2013) determinaram o conteúdo de flavonóides totais para duas espécies de *Mentha* (*Mentha spicata* L. e *Mentha longifolia* L.). As amostras de folhas frescas foram colhidas na primeira e na segunda geração de folhas destas espécies. Para as amostras da segunda geração de folhas, os resultados obtidos demonstraram um teor de flavonóides totais (em ambas as espécies) mais elevado em relação às amostras da primeira geração de folhas. Assim, para os extractos metanólicos de *Mentha spicata* L. e *Mentha longifolia* L., obtiveram-se valores de 3,9 e 4,1 mg de equivalentes de rutina/g amostra, respectivamente. Os valores obtidos por estes autores estão apresentados em mg de equivalentes de rutina/g amostra, impossibilitando a comparação com o valor obtido no presente estudo. Chan et al. (2012) analisaram extractos metanólicos de hortelã fresca e seca (em estufa), obtendo teores de flavonóides totais de 1,65 mg de equivalentes de quercetina/g de amostra fresca (peso fresco) e de 11,40 mg de equivalentes de quercetina/g de amostra seca (peso seco), respectivamente.

Relativamente à manjerona, Papageorgiou, Mallouchos e Komaitis (2008) analisaram extractos metanólicos de manjerona fresca (amostras em diferentes estados vegetativos colhidas em diferentes épocas do ano), obtendo valores de flavonóides totais entre 0,40 e 28,80 mg ECE/g de peso seco. O valor obtido no presente estudo para a manjerona fresca (18,03 mg ECE/g peso seco) encontra-se dentro do intervalo de valores obtido por estes autores. Chan et al. (2012) analisaram extractos metanólicos de manjerona (*Origanum majorana* L.) fresca e seca (em estufa), obtendo teores de flavonóides totais de 1,96 mg de equivalentes de quercetina/g de amostra fresca (peso fresco) e de 15,80 mg de equivalentes de quercetina/g de amostra seca (peso seco), respectivamente.

Quanto ao orégão, Chan et al. (2012) analisaram extractos metanólicos de orégão (*Origanum vulgare* L.) fresco e seco (em estufa), obtendo teores de flavonóides totais de 1,89 mg de equivalentes de quercetina/g de amostra fresca (peso fresco) e de 17,90 mg de equivalentes de quercetina/g de amostra seca (peso seco), respectivamente.

Relativamente ao manjericão, Akhtar, Ihsan-ul-Haq e Mirza (2015) determinaram o teor de flavonóides totais para extractos de manjericão fresco (*Ocimum basilicum* L.), em

M/C (mistura de metanol e clorofórmio) e em água destilada. Para o extracto aquoso e para o extracto em M/C, obtiveram-se valores de flavonóides totais de 20,0 e de 6,9 mg de equivalentes de quercetina/g peso seco de amostra, respectivamente. Chan *et al.* (2012) analisaram extractos metanólicos de manjeriço fresco e seco (em estufa), obtendo teores de flavonóides totais de 1,09 mg de equivalentes de quercetina/g de amostra fresca (peso fresco) e de 4,04 mg de equivalentes de quercetina/g de amostra seca (peso seco), respectivamente. Os valores obtidos por Akhtar, Ihsan-ul-Haq e Mirza (2015) e por Chan *et al.* (2012) estão apresentados em mg de equivalentes de quercetina, impossibilitando a comparação com o presente estudo.

Quanto ao estragão, Durić *et al.* (2013) determinaram no estragão fresco (*Artemisia dracunculus* L.) o conteúdo em flavonóides totais, obtendo valores de 0,717 e de 1,179 mg de equivalentes de quercetina/g de amostra, para extracção a frio e a quente, respectivamente. Megdiche-Ksouri *et al.* (2015) analisaram amostras frescas de *Artemisia campestris* L., obtendo teores de flavonóides totais de 175,23, 67,46 e 63,82 mg de equivalentes de catequina/g extracto seco, para extractos em metanol, acetato de etilo e água, respectivamente. O solvente que apresentou o melhor resultado foi o metanol, sendo o solvente utilizado no presente estudo.

Relativamente à stevia, Muanda *et al.* (2011) analisaram um extracto aquoso e um extracto M/A (mistura de metanol e água) de folhas secas de *Stevia rebaudiana*, obtendo valores de flavonóides totais de 20,68 e de 23,46 mg de equivalentes de catequina/g de peso seco, respectivamente. O valor obtido no presente estudo para a stevia fresca (53,75 mg ECE/g peso seco) é superior aos valores obtidos por Muanda *et al.* (2011). No entanto, estes autores analisaram folhas secas de stevia enquanto no presente estudo se analisaram folhas frescas desta planta aromática. Ghanta *et al.* (2007) determinaram o conteúdo de flavonóides totais de um extracto em acetato de etilo de folhas frescas de stevia, obtendo um valor de 830 mg de equivalentes de quercetina/g de peso seco. O valor obtido por Ghanta *et al.* (2007) é superior ao valor obtido no presente estudo para a stevia fresca. Gawęł-Bęben *et al.* (2015) analisaram extractos de folhas secas de stevia: aquoso, etanólico e extracto aquoso-glicol. O conteúdo de flavonóides totais obtido variou entre 2,03 a 3,85 mg de equivalentes de quercetina/g de folhas de stevia secas, tendo o extracto aquoso-glicol apresentado o valor mais elevado destes compostos. O valor obtido no presente trabalho para a stevia fresca (5,75 mg ECE/g amostra) é superior ao intervalo de valores obtido por Gawęł-Bęben *et al.* (2015), apesar de estes autores terem analisado amostras

de folhas secas de stevia e no presente trabalho se ter analisado amostras de folhas frescas. Zeng *et al.* (2013) analisaram extractos etanólicos de amostras frescas de folhas e caules de diferentes variedades de *Stevia rebaudiana*, obtendo valores de flavonóides totais entre 48,29 a 60,33 mg de equivalentes de rutina/g de peso seco. Sutradhar *et al.* (2013) analisaram dois extractos de folhas frescas de *Stevia rebaudiana*, obtendo um teor de flavonóides totais de 12 e 15 mg de equivalentes de curcumina/g amostra, para o extracto metanólico e para o extracto etanólico, respectivamente. No entanto, os valores obtidos por Ghanta *et al.* (2007), por Gawęł-Bęben *et al.* (2015), por Zeng *et al.* (2013) e por Sutradhar *et al.* (2013) são apresentados em unidades diferentes aos valores apresentados no presente estudo. Mandal e Madan (2013) analisaram extractos metanólicos de cinco variedades de folhas secas de stevia adquiridas a diferentes fornecedores, obtendo valores de flavonóides totais entre 39,86 a 62,22 mg de equivalentes de quercetina/L. Kim *et al.* (2011) analisaram extractos aquosos de amostras frescas de folhas e caules de stevia, obtendo um teor de flavonóides totais de 15,64 e de 1,57 mg de equivalentes de quercetina/g extracto para as folhas e caules, respectivamente. Jahan *et al.* (2010) analisaram um extracto etanólico a 80 % (v/v) de folhas secas de stevia, obtendo um teor de flavonóides totais de 125,64 mg de equivalentes de quercetina/g de extracto seco. Shivanna *et al.* (2013) analisaram um extracto de folhas de *Stevia rebaudiana*, obtendo um teor de flavonóides totais de 23,0 mg/g amostra. Tadhani, Patel e Subhash (2007) analisaram extractos de folhas e caules de *Stevia rebaudiana*, obtendo um teor de flavonóides totais de 21,73 e 31,99 mg/g de folhas e caules de stevia em base de peso seco, respectivamente. Os valores obtidos por Mandal e Madan (2013), por Kim *et al.* (2011), por Jahan *et al.* (2010), por Shivanna *et al.* (2013) e por Tadhani, Patel e Subhash (2007) são apresentados em unidades diferentes do presente estudo, não sendo possível fazer uma comparação dos resultados.

Para os quatro métodos realizados, há uma grande variabilidade de resultados, nomeadamente, na capacidade antioxidante (EC_{50}), no coeficiente de actividade antioxidante (AAC), assim como para o conteúdo em fenólicos totais e flavonóides totais.

No presente estudo, as discrepâncias existentes entre os resultados obtidos para as plantas da mesma espécie (para os vários métodos), podem dever-se a diferentes factores, nomeadamente, às diferentes condições edafoclimáticas, como a temperatura, o solo, a humidade, de onde cada planta é proveniente, assim como a época do ano em que a planta é colhida e o tempo de armazenamento. Relativamente às diferenças

verificadas entre os resultados encontrados na literatura e os do presente estudo, podem dever-se a diversos factores, tais como: diferentes solventes, diferenças na metodologia utilizada no processo de extracção e também na determinação (capacidade antioxidante, conteúdo de fenólicos totais e flavonóides totais), espécies de plantas aromáticas diferentes e também a variação das condições edafoclimáticas (Aronne, Micco e Scala, 2006; Bianchin e Carpes, 2012; Farzaneh e Carvalho, 2015; Khaled-Khodja, Boulekbache-Makhlouf e Madani, 2014; Miliuskas, Venskutonis e Beek, 2004; Zaouali, Bouzaine e Boussaid, 2010).

Comparando os resultados obtidos no presente estudo (em todos os métodos) para as plantas de agricultura convencional com os resultados obtidos para as plantas de agricultura biológica, verifica-se na generalidade, que plantas provenientes de agricultura convencional apresentam maior conteúdo em compostos fenólicos e conseqüentemente maior actividade antioxidante. Uma vez que na agricultura biológica não é permitida a utilização de produtos químicos de síntese (produtos fitofarmacêuticos e fertilizantes), existe uma maior formação de compostos fenólicos para defesa da planta, pelo que era expectável resultar numa maior actividade antioxidante demonstrada pelas plantas provenientes de agricultura biológica (Cunha, Roque e Gaspar, 2013; Cunha, Roque e Nogueira, 2012). Deste modo, verifica-se que possivelmente os princípios de agricultura biológica possam não ter sido cumpridos, podendo ter sido empregues alguns tratamentos químicos durante a produção das plantas de agricultura biológica (Cunha, Roque e Gaspar, 2013; Cunha, Roque e Nogueira, 2012).

No entanto, na realidade não estamos a comparar exactamente a mesma planta. As plantas de agricultura biológica não crescem com as mesmas condições climáticas e geográficas que as plantas de agricultura convencional. Para além de não terem sido submetidas exactamente ao mesmo processo de secagem. Outros factores importantes a evidenciar, é o facto de não se saber (pela informação da embalagem), há quanto tempo é que as amostras estariam embaladas e até mesmo se o material de embalagem, sendo diferente, não poderá ter influenciado o conteúdo em compostos com capacidade antioxidante.

4.3. Determinação de compostos fenólicos por UHPLC-DAD

4.3.1. Validação do método cromatográfico

A validação do método desenvolvido em UHPLC-DAD no presente estudo, foi realizada com amostras de tomilho seco. O equipamento e as condições cromatográficas utilizadas estão descritas em 3.5.2. e 3.5.4.2.. Os parâmetros avaliados seguiram-se pelas directrizes da ICH (ICH Q2A, 1995; ICH Q2B, 1996), sendo publicadas pela FDA.

4.3.1.1. Especificidade

A especificidade foi avaliada pela comparação dos espectros de absorção na região do ultravioleta-visível dos picos cromatográficos obtidos pelas amostras com os espectros de absorção dos padrões analíticos. O intuito é evitar a identificação incorrecta de compostos, devido à possível presença de interferentes com o mesmo tempo de retenção e espectros semelhantes aos dos compostos de interesse. Assim, na análise de todas as amostras a identificação foi realizada com base nos tempos de retenção e nos espectros de absorção na região UV-visível. Na **Figura 59** apresenta-se um cromatograma obtido para a amostra de tomilho seco.

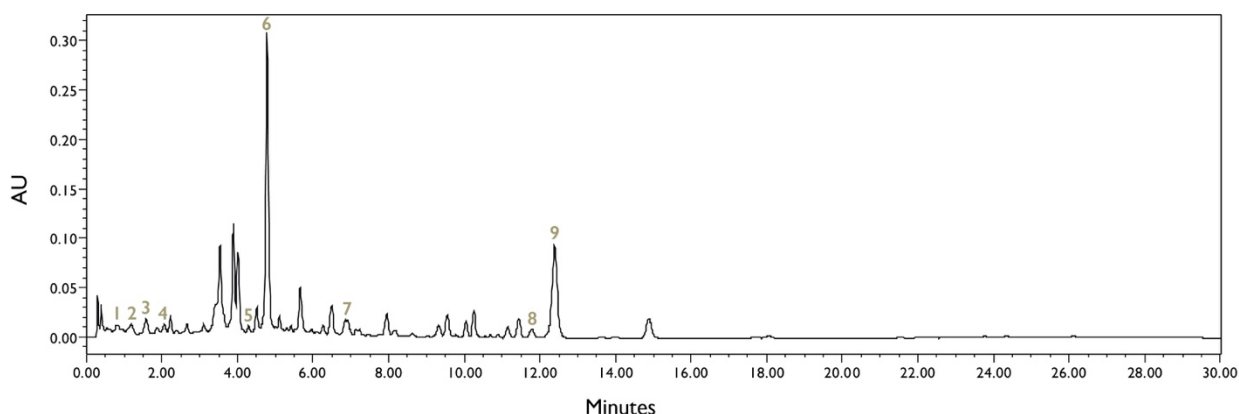


Figura 59: Cromatograma obtido por UHPLC-DAD para os compostos fenólicos presentes no tomilho seco, a $\lambda = 270\text{nm}$: (1) Ácido protocatecuico; (2) Ácido clorogénico; (3) Ácido cafeico; (4) Epicatequina; (5) Ácido 2-hidroxicinâmico; (6) Ácido rosmarínico; (7) Quercetina; (8) Carvacrol; (9) Timol.

Como podemos verificar, conseguem-se identificar os picos dos compostos presentes no tomilho seco. Os picos apresentam uma boa separação, dada a complexidade da amostra. Deste modo, é possível afirmar que o método apresenta especificidade.

4.3.1.2. Gama de trabalho, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

Para a quantificação dos dezanove compostos fenólicos, preparou-se uma solução mistura (descrito em 3.5.4.). A **Figura 60** apresenta um cromatograma típico de uma mistura padrão. Na **Tabela 12**, apresentam-se os parâmetros das curvas de calibração, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$), obtidos para cada composto fenólico. No **Anexo I** apresentam-se as curvas de calibração padrão de cada composto fenólico.

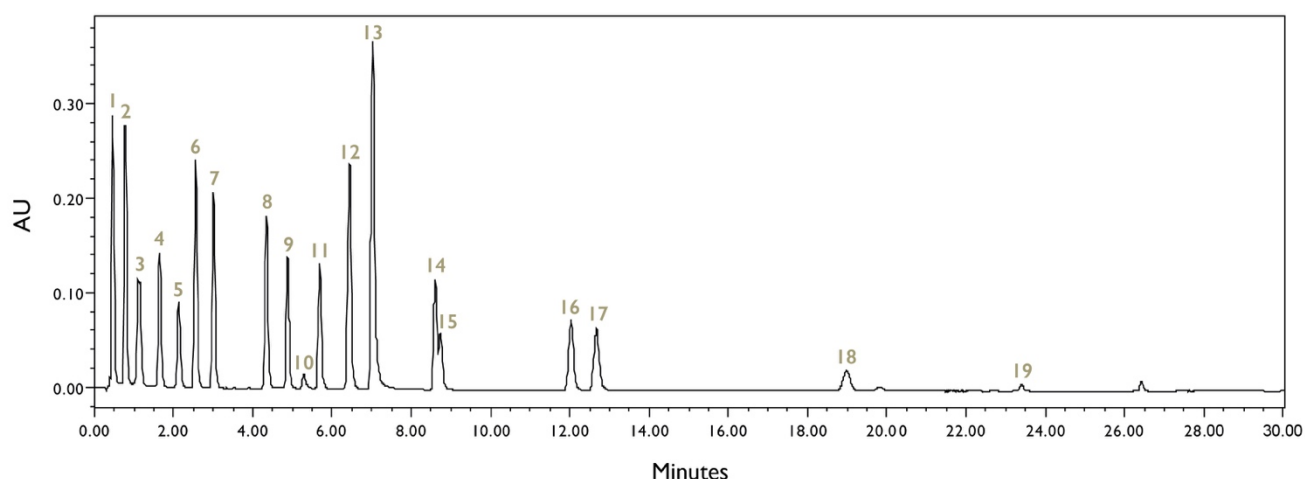


Figura 60: Cromatograma da solução mistura dos dezanove compostos fenólicos a $\lambda = 270\text{nm}$: (1) Ácido gálico ($51,2 \mu\text{g/mL}$); (2) Ácido protocatecuico ($49,0 \mu\text{g/mL}$); (3) Ácido clorogénico ($127,0 \mu\text{g/mL}$); (4) Ácido cafeico ($50,2 \mu\text{g/mL}$); (5) Epicatequina ($126,0 \mu\text{g/mL}$); (6) Ácido p-cumárico ($49,6 \mu\text{g/mL}$); (7) Ácido ferúlico ($74,7 \mu\text{g/mL}$); (8) Ácido 2-hidroxicinâmico ($25,1 \mu\text{g/mL}$); (9) Ácido rosmarínico ($99,6 \mu\text{g/mL}$); (10) Miricetina ($3,2 \mu\text{g/mL}$); (11) Resveratrol ($49,2 \mu\text{g/mL}$); (12) Ácido trans-hidroxicinâmico ($25,7 \mu\text{g/mL}$); (13) Quercetina ($128,0 \mu\text{g/mL}$); (14) Hesperetina ($49,2 \mu\text{g/mL}$); (15) Eugenol ($74,7 \mu\text{g/mL}$); (16) Carvacrol ($126,0 \mu\text{g/mL}$); (17) Timol ($124,5 \mu\text{g/mL}$); (18) Carnosol ($190,0 \mu\text{g/mL}$); (19) Ácido carnósico ($80,0 \mu\text{g/mL}$).

Tabela 12: Parâmetros das curvas de calibração, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) obtidos para cada composto fenólico.

Compostos Fenólicos	Gama de concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	Equação da curva	Coefficiente de determinação (r^2)	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	$\lambda_{\text{máx}}$
Ácido gálico	0,10-30,72	$y = 61280x - 6394,3$	0,9999	0,03	0,10	272
Ácido protocatecuico	0,05-49,00	$y = 99250x - 10830$	0,9995	0,02	0,05	260
Ácido clorogénico	0,13-127,00	$y = 57328x - 40473$	0,9990	0,06	0,13	325
Ácido cafeico	0,10-30,12	$y = 109117x - 6582,6$	0,9998	0,03	0,10	325
Epicatequina	0,50-126,00	$y = 14083x - 3037$	0,9998	0,13	0,50	280
Ácido β -cumárico	0,05-49,60	$y = 159531x - 419,24$	0,9999	0,02	0,05	310
Ácido ferúlico	0,04-74,70	$y = 109802x - 4121,6$	0,9998	0,01	0,04	325
Ácido 2-hidroxicinâmico	0,05-25,10	$y = 106257x - 1439,7$	0,9999	0,02	0,05	280
Ácido rosmarínico	0,20-99,60	$y = 51826x - 30132$	0,9991	0,06	0,20	330
Miricetina	0,16-1,92	$y = 134322x - 9934$	0,9993	0,03	0,16	370
Resveratrol	0,05-49,20	$y = 149091x - 10527$	0,9997	0,02	0,05	310
Ácido <i>trans</i> -hidroxicinâmico	0,05-25,70	$y = 151435x - 2548,9$	0,9998	0,02	0,05	280
Quercetina	0,26-128,00	$y = 74870x - 45111$	0,9996	0,08	0,26	370
Hesperetina	0,10-49,20	$y = 75769x - 1383,9$	0,9998	0,05	0,10	285
Eugenol	0,30-74,70	$y = 22137x - 2433,7$	0,9997	0,15	0,30	280
Carvacrol	0,50-126,00	$y = 15250x - 679,83$	0,9998	0,13	0,50	275
Timol	0,50-124,50	$y = 15833x - 976,92$	0,9998	0,12	0,50	275
Carnosol	1,14-114,00	$y = 6744,3x - 4458,5$	0,9994	0,38	1,14	285
Ácido carnósico	4,00-48,00	$y = 3016,5x - 5794,1$	0,9992	1,60	4,00	285

A linearidade atesta a proporcionalidade entre as áreas obtidas dos cromatogramas e as concentrações existentes nas amostras. Quanto mais próximo de 1,0 for o valor do coeficiente de determinação (r^2) maior será esta relação, ou seja, menor é a dispersão do conjunto de pontos.

As curvas de calibração foram desenvolvidas através do método de calibração com padrões externos e os respectivos coeficientes de determinação (r^2), pelo método dos mínimos quadrados. Os coeficientes de determinação obtidos para cada composto fenólico foram superiores ou iguais a 0,999. Os coeficientes de determinação obtidos estão de acordo com as directrizes da ICH (ICH Q2A, 1995; ICH Q2B, 1996). Assim, verifica-se que os resultados da avaliação da linearidade foram adequados, como evidenciado pelos coeficientes de determinação obtidos, concluindo-se que o método é linear na gama de trabalho utilizada para os dezanove compostos fenólicos. Relativamente ao intervalo de linearidade obtido para cada composto fenólico, verifica-se na generalidade, uma ampla gama de concentrações em que se pode aplicar este método.

Fecka e Turek (2008) desenvolveram e validaram um método em HPLC-UV, para a determinação de 18 compostos fenólicos, sendo que três desses compostos correspondem aos estudados no presente trabalho. Analisando a gama linear obtida por Fecka e Turek (2008), para o ácido rosmarínico (10 - 150 $\mu\text{g/mL}$), para o ácido clorogénico (25 - 200 $\mu\text{g/mL}$) e para o ácido cafeico (10 - 150 $\mu\text{g/mL}$), verifica-se que o limite inferior da gama de trabalho utilizada é relativamente superior aos limites inferiores das gamas de trabalho utilizadas no presente estudo para estes compostos fenólicos.

Wang, Provan e Helliwell (2004) desenvolveram e validaram um método em HPLC-DAD, para a determinação de ácido rosmarínico e ácido cafeico. Analisado a gama linear obtida por Wang, Provan e Helliwell (2004), para o ácido rosmarínico (2 - 100 $\mu\text{g/mL}$) e para o ácido cafeico (0,4 - 100 $\mu\text{g/mL}$), verifica-se que o limite inferior da gama linear utilizada para o ácido rosmarínico é ligeiramente superior ao limite inferior da gama de trabalho utilizada para o ácido rosmarínico no presente estudo. No entanto, o limite inferior da gama linear obtida para o ácido cafeico é similar ao limite inferior obtido no presente estudo.

Melo e Sawaya (2015) desenvolveram e validaram um método em UHPLC-MS, para a determinação de ácido clorogénico. Analisando a gama linear obtida para o ácido clorogénico (10,0 - 550,0 $\mu\text{g/mL}$), verifica-se que o limite inferior da gama de trabalho

obtida é relativamente superior ao limite inferior da gama de trabalho obtida no presente estudo para o ácido clorogénico.

Herrero *et al.* (2010) desenvolveram e validaram um método em UHPLC-MS, para a determinação de ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido rosmarínico, carnosol e ácido carnósico.

Relativamente aos limites de detecção e quantificação, o método desenvolvido permite detectar e quantificar os compostos fenólicos em concentrações muito baixas. O limite de detecção (LOD) representa a menor concentração da substância de interesse em análise que pode ser detectada, utilizando um determinado procedimento experimental, mas não sendo necessariamente quantificada. O LOD foi determinado pela razão sinal/ruído de 3:1. O limite de quantificação (LOQ) representa a concentração mais baixa da substância em análise, utilizando um determinado procedimento experimental, que pode ser quantificada. O LOQ foi determinado pela razão sinal/ruído de 10:1 (Ribani *et al.*, 2004; Taverniers, Loose e Bockstaele, 2004).

No trabalho realizado por Herrero *et al.* (2010) o limite de detecção do ácido *p*-cumárico (0,07 µg/mL) é superior ao do presente estudo e o limite de detecção do ácido gálico (0,03 µg/mL) é igual ao do presente estudo. Os limites de detecção do ácido clorogénico (0,01 µg/mL), ácido cafeico (0,01 µg/mL), ácido rosmarínico (0,004 µg/mL), carnosol (0,01 µg/mL) e ácido carnósico (0,002 µg/mL) são inferiores aos limites de detecção obtidos no presente estudo para os mesmos compostos fenólicos. No entanto, estes autores utilizaram um método em UHPLC-MS, pelo que seria expectável obter limites de detecção e quantificação inferiores, comparando com métodos em que se utilizem HPLC-DAD.

Melo e Sawaya (2015) obtiveram um limite de detecção para o ácido clorogénico de 4,18 µg/mL. O limite de detecção obtido é superior ao limite de detecção do presente trabalho para o ácido clorogénico.

Wang, Provan e Helliwell (2004) obtiveram um limite de detecção para o ácido rosmarínico de 0,708 µg/mL e para o ácido cafeico de 0,150 µg/mL, sendo que os limites de detecção obtidos são superiores aos limites de detecção obtidos para estes compostos no presente estudo.

4.3.1.3. Precisão

A precisão do método desenvolvido foi avaliada através de ensaios de repetibilidade (precisão intra-dia) e de precisão intermédia (precisão inter-dia), seguindo-se as directrizes da ICH (ICH Q2B, 1996). A precisão foi determinada através do RSD (%) de cada composto.

4.3.1.3.1. Repetibilidade e precisão intermédia da amostra

Para avaliar a repetibilidade (precisão intra-dia), prepararam-se 6 extractos metanólicos de tomilho seco. Os compostos apresentam valores de RSD (%) inferiores a 5,7 %, pelo que os valores estão de acordo com os critérios de validação.

Para avaliar a precisão intermédia (precisão inter-dia), prepararam-se 6 extractos metanólicos de tomilho seco no primeiro dia. No segundo e terceiro dia prepararam-se 4 extractos metanólicos de tomilho seco. Os compostos apresentam valores de RSD (%) inferiores a 8,7 %, pelo que os valores estão de acordo com os critérios de validação, tendo em consideração o fim pretendido da utilização do método desenvolvido em UHPLC-DAD. Na Tabela 13 apresentam-se os resultados obtidos para a repetibilidade e precisão intermédia do processo de extracção para as amostras de tomilho seco.

Tabela 13: Repetibilidade e precisão intermédia do processo de extracção para as amostras de tomilho seco.

Compostos Fenólicos	Repetibilidade (n=6) RSD (%)	Precisão Intermédia (n=14) RSD (%)
Ácido clorogénico	1,38	3,52
Ácido cafeico	0,70	4,75
Epicatequina	1,23	8,75
Ácido ferúlico	2,67	3,69
Ácido 2-hidroxicinâmico	2,06	7,18
Ácido rosmarínico	5,73	6,76
Quercetina	2,19	6,74
Carvacrol	2,14	5,52
Timol	1,66	4,45

4.3.1.3.2. Repetibilidade e precisão intermédia do equipamento

Para avaliar a repetibilidade (precisão intra-dia), prepararam-se 6 soluções. Os compostos apresentam valores de RSD (%) inferiores a 2,75 %, estando de acordo com os critérios de validação.

Para avaliar a precisão intermédia (precisão inter-dia), prepararam-se 6 soluções por dia, em três dias diferentes. Os compostos apresentam valores de RSD (%) inferiores a 5 %, verificando-se que os valores estão de acordo com os critérios de validação. Na **Tabela 14** apresentam-se os resultados repetibilidade e precisão intermédia do equipamento.

Tabela 14: Repetibilidade e precisão intermédia do equipamento.

Compostos Fenólicos	Repetibilidade (n=6) RSD (%)	Precisão Intermédia (n=18) RSD (%)
Ácido gálico	0,36	0,75
Ácido protocatecuico	0,13	0,58
Ácido clorogénico	0,41	0,95
Ácido cafeico	0,16	1,09
Epicatequina	0,88	1,34
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,19	2,00
Ácido ferúlico	0,14	1,00
Ácido 2-hidroxicinâmico	0,29	0,86
Ácido rosmarínico	0,68	1,72
Miricetina	0,38	4,61
Resveratrol	0,29	3,12
Ácido <i>trans</i> -hidroxicinâmico	0,15	2,43
Quercetina	0,16	1,75
Hesperetina	2,75	5,03
Eugenol	0,93	4,67
Carvacrol	0,08	1,16
Timol	0,10	3,06
Carnosol	0,34	5,04
Ácido carnósico	1,09	2,77

4.3.1.4. Exactidão

Para avaliar este parâmetro, a recuperação foi determinada através da razão entre a quantidade de amostra adicionada e a quantidade de amostra recuperada, expressa em percentagem (Ahmida *et al.*, 2006). Foram fortificadas 4 amostras de tomilho seco com quantidades conhecidas de cada padrão analítico.

Os intervalos aceitáveis de recuperação devem estar compreendidos entre 70 % a 120 %, com precisão até ± 20 % (Melo e Sawaya, 2015; Ribani *et al.*, 2004). Na Tabela 15 apresentam-se as médias das recuperações (%) para cada composto, desvio-padrão (%) e RSD (%). Como se pode verificar, as percentagens de recuperação dos compostos fenólicos estão compreendidas entre 82,8 - 103,9 %, pelo que está de acordo com o intervalo mencionado. Relativamente aos valores de RSD (%), os compostos apresentam valores inferiores ou ligeiramente superiores a 5 %. Considera-se que os resultados obtidos para a exactidão do método foram satisfatórios, tendo em consideração o fim pretendido da utilização do método desenvolvido em UHPLC-DAD.

Tabela 15: Percentagem de recuperação obtida para cada um dos compostos fenólicos na amostra fortificada de tomilho seco.

Compostos Fenólicos	% Recuperação (n=4)	SD (%)	RSD (%)
Ácido gálico	92,24	4,07	4,42
Ácido protocatecuico	95,35	2,15	2,26
Ácido clorogénico	96,4	1,15	1,19
Ácido cafeico	94,36	7,27	7,7
Epicatequina	84,52	3,89	4,6
Ácido <i>p</i> -cumárico	103,9	1,42	1,36
Ácido ferúlico	94,8	2,14	2,26
Ácido 2-hidroxicinâmico	84,05	2,34	2,79
Ácido rosmarínico	86,42	1,47	1,71
Miricetina	90,1	3,32	3,69
Resveratrol	85,64	3,93	4,59
Ácido <i>trans</i> -hidroxicinâmico	93,62	0,87	0,93
Quercetina	83,33	4,28	5,15
Hesperetina	92,53	0,93	1,01
Eugenol	95,34	4,7	4,93
Carvacrol	103,3	3,52	3,41
Timol	99,89	5,59	5,6
Carnosol	89,07	3,66	4,11
Ácido carnósico	82,8	4,58	5,53

4.3.2. Quantificação dos compostos fenólicos em plantas aromáticas

O método desenvolvido e validado em Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC), com detector de díodos (DAD), permitiu determinar os compostos fenólicos presentes nos extractos de plantas aromáticas. A identificação dos compostos fenólicos nas diversas plantas, foi sustentada pela comparação com os tempos de retenção (t_r) e pelos espectros UV-Vis dos padrões analíticos analisados anteriormente. De seguida, são apresentados dois cromatogramas obtidos pelas amostras de tomilho seco e estragão fresco. Assim, na **Figuras 61** e na **Figura 62**, são identificados (sempre que possível) os compostos fenólicos presentes nestas amostras. No **Anexo 2** estão apresentados alguns cromatogramas obtidos pelas diferentes plantas aromáticas analisadas neste estudo.

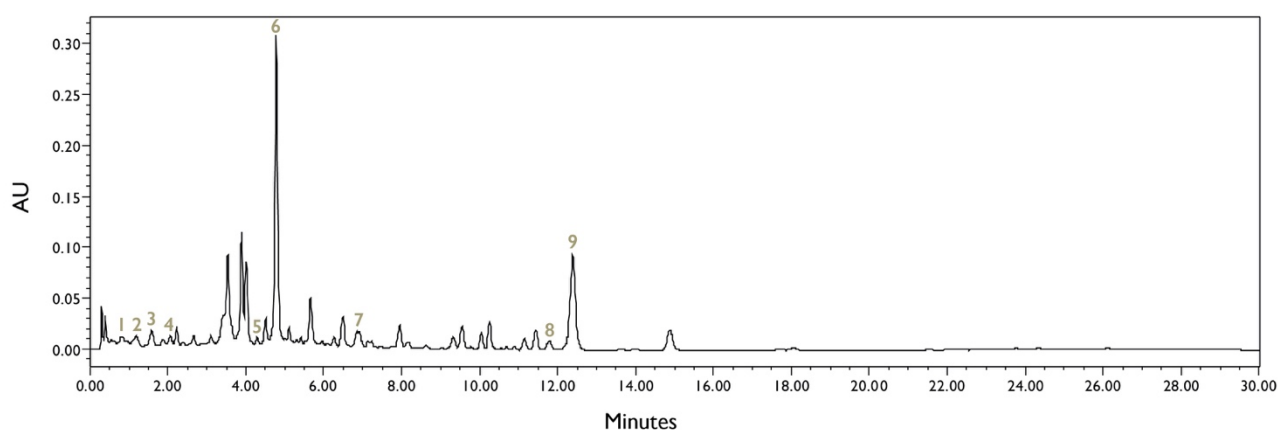


Figura 61: Cromatograma dos compostos fenólicos presentes no tomilho seco a $\lambda = 270\text{nm}$: (1) Ácido protocatecuico; (2) Ácido clorogénico; (3) Ácido cafeico; (4) Epicatequina; (5) Ácido 2-hidroxicinâmico; (6) Ácido rosmarínico; (7) Quercetina; (8) Carvacrol; (9) Timol.

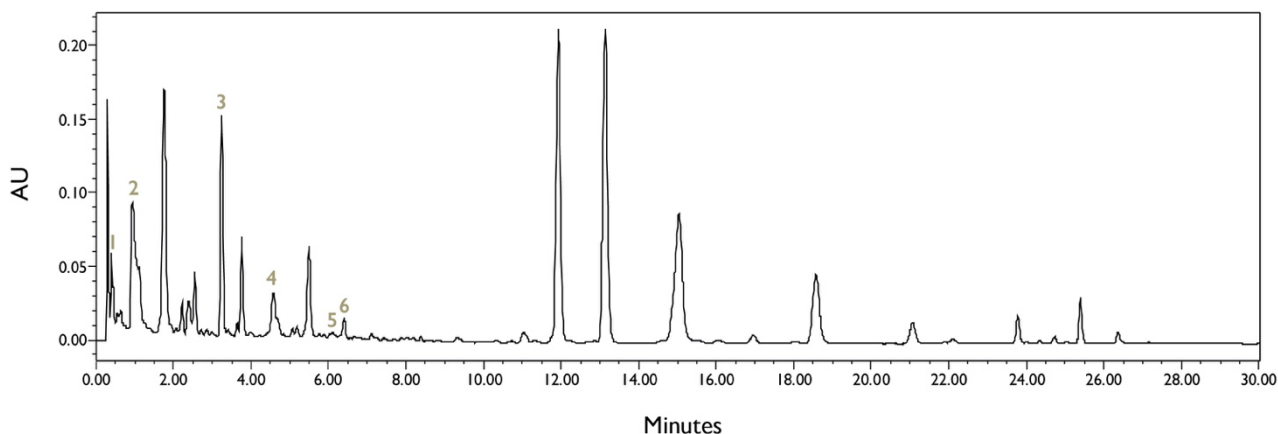


Figura 62: Cromatograma dos compostos fenólicos presentes no estragão fresco a $\lambda = 270\text{nm}$: (1) Ácido gálico; (2) Ácido clorogénico; (3) Ácido ferúlico; (4) Ácido rosmarínico; (5) Resveratrol; (6) Ácido *trans*-hidroxicinâmico.

Os compostos fenólicos presentes nas plantas aromáticas foram quantificados no presente estudo. Os resultados obtidos para as plantas aromáticas secas, frescas e orgânicas, apresentam-se na **Tabela 16**, na **Tabela 17** e na **Tabela 18**, respectivamente.

Tabela 16: Concentração (mg/100g de peso seco) dos compostos fenólicos nas plantas aromáticas secas.

Compostos Fenólicos	Alecrim	Tomilho	Orégão	Estragão	Manjerona	Hortelã	Manjeriçã
	Concentração (mg/100g de peso seco)						
Ácido gálico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido protocatecuico	n.d.	4,27 ± 0,17	1,65 ± 0,03	2,15 ± 0,07	1,69 ± 0,07	2,27 ± 0,00	2,07 ± 0,01
Ácido clorogénico	n.d.	12,50 ± 0,22	22,91 ± 1,66	395,48 ± 0,68	n.d.	7,75 ± 0,25	n.d.
Ácido cafeico	n.d.	9,09 ± 0,42	5,31 ± 0,23	n.d.	3,33 ± 0,13	7,72 ± 0,12	4,09 ± 0,26
Epicatequina	n.d.	28,13 ± 1,44	11,38 ± 0,35	n.d.	n.d.	6,05 ± 0,16	n.d.
Ácido p-cumárico	n.d.	n.d.	n.d.	10,86 ± 0,12	n.d.	1,04 ± 0,06	n.d.
Ácido ferúlico	n.d.	1,84 ± 0,08	n.d.	123,42 ± 0,13	n.d.	0,71 ± 0,02	n.d.
Ácido 2-hidroxicinâmico	n.d.	3,33 ± 0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido rosmarínico	218,08 ± 2,99	654,95 ± 35,68	206,72 ± 12,51	211,38 ± 0,68	293,76 ± 6,24	276,82 ± 13,37	82,03 ± 11,67
Miricetina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Resveratrol	n.d.	n.d.	n.d.	1,17 ± 0,03	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido trans-hidroxicinâmico	n.d.	n.d.	n.d.	0,79 ± 0,02	n.d.	n.d.	2,52 ± 0,22
Quercetina	n.d.	14,61 ± 0,24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Hesperetina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Eugenol	n.d.	n.d.	n.d.	8,01 ± 0,06	n.d.	n.d.	n.d.
Carvacrol	n.d.	41,97 ± 0,75	117,35 ± 4,31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Timol	n.d.	588,23 ± 10,15	1763,3 ± 69,21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Carnosol	717,36 ± 26,54	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido carnósico	1166,8 ± 118,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.- não detectado.

Tabela 17: Concentração (mg/100g de peso seco) dos compostos fenólicos nas plantas aromáticas frescas.

Compostos Fenólicos	Alecrim	Tomilho	Orégão	Estragão	Manjerona	Hortelã	Manjerição	Stevia
	Concentração (mg/100g de peso seco)							
Ácido gálico	4,68 ± 0,51	4,54 ± 0,04	n.d.	7,28 ± 0,35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido protocatecuico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido clorogénico	n.d.	n.d.	n.d.	239,21 ± 3,83	n.d.	15,64 ± 0,71	n.d.	1160,4 ± 27,3
Ácido cafeico	8,89 ± 0,35	n.d.	n.d.	n.d.	2,41 ± 0,06	4,60 ± 0,06	11,51 ± 0,81	n.d.
Epicatequina	n.d.	12,21 ± 0,18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido p-cumárico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,85 ± 0,10	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido ferúlico	0,85 ± 0,08	n.d.	n.d.	105,90 ± 9,70	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido 2-hidroxicinâmico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido rosmarínico	587,49 ± 0,49	300,26 ± 1,28	399,02 ± 12,78	105,41 ± 10,81	223,49 ± 7,80	336,93 ± 20,96	271,87 ± 18,13	351,86 ± 18,14
Miricetina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Resveratrol	n.d.	n.d.	n.d.	2,37 ± 0,05	n.d.	4,07 ± 0,27	n.d.	n.d.
Ácido trans-hidroxicinâmico	n.d.	n.d.	n.d.	3,77 ± 0,14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Hesperetina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Eugenol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	58,46 ± 1,82	n.d.
Carvacrol	n.d.	26,79 ± 0,13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Timol	n.d.	566,47 ± 1,27	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Carnosol	417,51 ± 23,50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido carnósico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.- não detectado.

Tabela 18: Concentração (mg/100g de peso seco) dos compostos fenólicos nas plantas aromáticas secas orgânicas.

Compostos Fenólicos	Alecrim	Tomilho-Limão	Orégão	Estragão	Manjerona	Hortelã-Pimenta
	Concentração (mg/100g de peso seco)					
Ácido gálico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	58,32 ± 4,32	n.d.
Ácido protocatecuico	n.d.	n.d.	n.d.	2,74 ± 0,14	3,71 ± 0,27	1,92 ± 0,18
Ácido clorogénico	13,42 ± 1,53	n.d.	n.d.	11,01 ± 0,26	n.d.	7,58 ± 0,35
Ácido cafeico	2,04 ± 0,24	4,14 ± 0,09	n.d.	47,52 ± 2,01	4,30 ± 0,47	2,75 ± 0,08
Epicatequina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido p-cumárico	n.d.	n.d.	0,49 ± 0,01	n.d.	<LOQ	0,55 ± 0,01
Ácido ferúlico	<LOQ	1,39 ± 0,17	n.d.	17,68 ± 0,84	n.d.	n.d.
Ácido 2-hidroxicinâmico	0,99 ± 0,09	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido rosmarínico	135,38 ± 2,90	267,15 ± 8,96	n.d.	n.d.	266,97 ± 11,18	57,77 ± 6,35
Miricetina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Resveratrol	n.d.	n.d.	2,67 ± 0,21	1,89 ± 0,11	n.d.	1,04 ± 0,01
Ácido trans-hidroxicinâmico	n.d.	1,61 ± 0,07	n.d.	n.d.	3,56 ± 0,33	8,80 ± 0,19
Quercetina	<LOQ	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Hesperetina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,36 ± 0,06
Eugenol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Carvacrol	n.d.	n.d.	n.d.	8,95 ± 0,86	n.d.	n.d.
Timol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Carnosol	219,36 ± 13,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido carnósico	<LOQ	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.- não detectado.

Através dos resultados obtidos no presente estudo, é possível verificar que o tomilho seco foi a planta aromática que apresentou maior diversidade de compostos fenólicos, apresentando dez dos dezanove compostos fenólicos estudados. Relativamente aos teores mais elevados destes compostos, foram demonstrados pelo ácido rosmarínico (654,95 mg/100 g de peso seco) e pelo timol (588,23 mg/100 g de peso seco). Para as plantas frescas, o estragão fresco foi o que apresentou maior diversidade de compostos fenólicos, apresentando seis dos dezanove compostos fenólicos estudados. Relativamente aos teores mais elevados destes compostos, foram demonstrados pelo ácido clorogénico (239,21 mg/100 g de peso seco), pelo ácido ferúlico (105,90 mg/100 g de peso seco) e pelo ácido rosmarínico (105,41 mg/100 g de peso seco). Para as plantas secas orgânicas, a hortelã-pimenta foi a que apresentou maior diversidade de compostos fenólicos, apresentando oito dos dezanove compostos fenólicos estudados. O teor mais elevado destes compostos foi demonstrado pelo ácido rosmarínico (57,77 mg/100 g de peso seco).

O ácido rosmarínico está presente em todas as plantas aromáticas estudadas, à excepção do orégão e do estragão orgânicos, nos quais não se identificou este composto fenólico. O teor mais elevado de ácido rosmarínico foi apresentado pelo tomilho seco (654,95 mg/100 g de peso seco), pelo alecrim fresco (587,49 mg/100 g de peso seco), pelo orégão fresco (399,02 mg/100 g de peso seco) e pela stevia fresca (351,86 mg/100 g de peso seco).

É importante salientar o teor elevado de ácido clorogénico apresentado pela stevia fresca (1160,4 mg/100 g de peso seco), seguindo-se pelo estragão seco (395,48 mg/100 g de peso seco). Também se verificou teores elevados de timol apresentados pelo orégão seco (1763,3 mg/100 g de peso seco), pelo tomilho seco (588,23 mg/100 g de peso seco) e pelo tomilho fresco (566,47 mg/100 g de peso seco). Constata-se ainda teores elevados de carnosol apresentados pelo alecrim seco (717,36 mg/100 g de peso seco) e pelo alecrim fresco (417,51 mg/100 g de peso seco). É também importante evidenciar o teor elevado de ácido carnósico apresentado pelo alecrim seco (1166,8 mg/100 g de peso seco).

Comparando as plantas aromáticas de agricultura biológica com as de agricultura convencional, verifica-se para o estragão orgânico um valor superior ao do estragão seco (apesar de próximos), de ácido protocatecuico (2,74 e 2,15 mg/100 g de peso seco, respectivamente) e de resveratrol (1,89 e 1,17 mg/100 g de peso seco, respectivamente). Relativamente à manjerona orgânica, apresenta um teor superior ao da manjerona seca, de ácido protocatecuico (3,71 e 1,69 mg/100 g de peso seco, respectivamente) e de ácido

cafeico (4,30 e 3,33 mg/100 g de peso seco, respectivamente). Comparando também a manjerona orgânica seca com a manjerona fresca, apresenta um teor superior de ácido cafeico (4,30 e 2,41 mg/100 g de peso seco, respectivamente) e de ácido rosmarínico (266,97 e 223,49 mg/100 g de peso seco, respectivamente).

Na literatura estão disponíveis diversas publicações em que se identificaram e quantificaram compostos fenólicos em plantas aromáticas. De seguida, descrevem-se algumas dessas publicações, de modo a poder comparar com os resultados obtidos no presente estudo.

Relativamente ao alecrim, Hossain *et al.* (2010) determinaram para extractos metanólicos de alecrim fresco e seco, a presença de ácido rosmarínico obtendo valores de 695 mg/100 g de peso seco e 2270 mg/100 g de peso seco, respectivamente. Os valores obtidos no presente trabalho para o ácido rosmarínico no alecrim seco (218,08 mg/100 g de peso seco) e no alecrim fresco (587,49 mg/100 g de peso seco) são inferiores aos valores obtidos por Hossain *et al.* (2010). Wojdyło, Oszmiański e Czemyrys (2007) determinaram a presença de ácido cafeico (406 mg/100 g peso seco) e ácido ferúlico (36,2 mg/100 g peso seco) no alecrim fresco. No presente estudo, o ácido cafeico e o ácido ferúlico também foram quantificados no alecrim fresco, apesar de em menores quantidades. Shan *et al.* (2005) determinaram no alecrim fresco, a presença de ácido cafeico (40,1 mg/100 g peso seco), ácido rosmarínico (1286,4 mg/100 g peso seco), carnosol (801,6 mg/100 g peso seco) e ácido carnósico (655,2 mg/100 g peso seco). No presente trabalho também se quantificou ácido cafeico, ácido rosmarínico e carnosol no alecrim fresco, apesar de em quantidades inferiores. No presente estudo quantificou-se no alecrim seco ácido carnósico (1166,8 mg/100 g peso seco). Proestos *et al.* (2005) determinaram no alecrim seco a presença de ácido cafeico (2 mg/100 g amostra seca) e de ácido ferúlico (5,2 mg/100 g amostra seca). Estes dois compostos fenólicos não foram detectados no alecrim seco no presente estudo. Papageorgiou, Mallouchos e Komaitis (2008) determinaram para extractos metanólicos de alecrim fresco, a presença de ácido gálico (20 - 90 mg/100 g de peso seco), ácido cafeico (40 - 140 mg/100 g de peso seco), ácido ferúlico (85 - 755 mg/100 g de peso seco), ácido rosmarínico (10 - 300 mg/100 g de peso seco) e quercetina (20 - 600 mg/100 g de peso seco). Destes compostos fenólicos detectados por Papageorgiou, Mallouchos e Komaitis (2008), apenas a quercetina não foi quantificada no presente estudo no alecrim fresco. As quantidades obtidas por estes autores são superiores às obtidas no presente estudo. Wang, Provan e Helliwell (2004)

determinaram para três amostras diferentes de folhas secas de alecrim, a presença de ácido rosmarínico, obtendo valores muito próximos entre as três amostras de alecrim (1000 - 1100 mg/100 g de amostra). Estes autores determinaram ainda a presença de ácido cafeico, obtendo também valores muito similares entre as três amostras (10 - 20 mg/100 g de amostra). Dos compostos fenólicos quantificados por Wang, Provan e Helliwell (2004) também se identificou, no presente trabalho, ácido rosmarínico no alecrim seco. Hossain *et al.* (2011) determinaram para um extracto de alecrim seco em metanol a 80 % (v/v), a presença de ácido rosmarínico (1450 mg/100 g), ácido cafeico (12 mg/100 g), ácido gálico (27,8 mg/100 g), ácido carnósico (958,3 mg/100 g) e carnosol (566,0 mg/100 g). Dos compostos fenólicos quantificados por Hossain *et al.* (2011), no presente estudo quantificou-se também o ácido rosmarínico, carnosol e ácido carnósico no alecrim seco. Babovic *et al.* (2010) determinaram para um extracto de alecrim seco, a presença de carnosol (3,94 g/100 g de extracto) e de ácido carnósico (4,76 g/100 g de extracto), sendo que estes compostos fenólicos também foram identificados no presente trabalho no alecrim seco. Zheng e Wang (2001) determinaram a presença de ácido cafeico (2,95 mg/100 g peso fresco), de ácido rosmarínico (32,8 mg/100 g de peso fresco), de ácido carnósico (126,6 mg/100 g de peso fresco) e de outros compostos fenólicos, para um extracto de alecrim fresco. No presente estudo também se identificaram estes compostos fenólicos no alecrim fresco, à excepção do ácido carnósico. Jordán *et al.* (2013) analisaram várias amostras de alecrim fresco e detectaram a presença de ácido cafeico (5,33 - 19,73 mg/100 g de extracto seco), ácido ferúlico (19,09 - 1081,52 mg/100 g de extracto seco), ácido rosmarínico (116,67 - 367,11 mg/100 g de extracto seco), carnosol (126,46 - 987,01 mg/100 g de extracto seco) e ácido carnósico (277,31 - 1106,01 mg/100 g de extracto seco). Dos compostos fenólicos quantificados por Jordán *et al.* (2013) no alecrim fresco, apenas não foi identificado ácido carnósico no presente trabalho. Herrero *et al.* (2010) identificaram vários compostos fenólicos presentes em extractos etanólicos de folhas secas de alecrim (temperaturas de extracção de 50, 100, 150 e 200 °C). Estes autores determinaram a presença de ácido clorogénico (4,4 - 6,3 mg/100 g de extracto), ácido cafeico (9,2 - 31,4 mg/100 g de extracto), ácido *p*-cumárico (0,3 - 5,0 mg/100 g de extracto), ácido rosmarínico (911,9 - 1678,1 mg/100 g de extracto), carnosol (10426,9 - 13748,0 mg/100 g de extracto) e ácido carnósico (5287,4 - 7628,4 mg/100 g de extracto), sendo que no presente estudo também se identificaram ácido rosmarínico, carnosol e ácido carnósico no alecrim seco. Muchuweti *et al.* (2007) detectaram no alecrim seco a presença de ácido cafeico, o ácido *p*-cumárico e ácido vanílico. Estes compostos fenólicos

não foram detectados no alecrim seco no presente estudo. Erkan, Ayranci e Ayranci (2008) determinaram para um extracto de alecrim seco em metanol, a presença de ácido carnósico (6 %) e ácido rosmarínico (8 %). No presente trabalho também se identificou estes compostos fenólicos no alecrim seco.

Quanto ao tomilho, Jabri-Karoui *et al.* (2012) analisaram amostras frescas de uma espécie do género *Thymus* (*Thymus capitatus* L.). Estes autores determinaram a presença de ácido gálico (170 mg/100 g de amostra seca), clorogénico (29 mg/100 g de amostra seca), ácido cafeico (10 mg/100 g de amostra seca), ácido *p*-cumárico (40 mg/100 g de amostra seca), ácido ferúlico (174 mg/100 g de amostra seca), ácido *trans*-2-hidroxicinâmico (74 mg/100 g de amostra seca), ácido rosmarínico (118 mg/100 g de amostra seca), quercetina (70 mg/100 g de amostra seca) e timol (334 mg/100 g de amostra seca). Dos compostos fenólicos quantificados por Jabri-Karoui *et al.* (2012), também se quantificaram no presente estudo ácido gálico, ácido rosmarínico e timol no tomilho fresco. Hossain *et al.* (2010) determinaram para extractos metanólicos de tomilho fresco e seco, a presença de ácido rosmarínico obtendo valores de 1090 mg/100 g de peso seco e 2460 mg/100 g de peso seco, respectivamente. As quantidades de ácido rosmarínico obtidas no presente trabalho para o tomilho fresco e seco, são inferiores às obtidas por estes autores. Wojdyło, Oszmiański e Czemyers (2007) determinaram a presença de ácido cafeico (517 mg/100 g peso seco) no tomilho fresco. Estes autores determinaram ainda a presença de ácido ferúlico (90,5 mg/100 g peso seco) para esta planta fresca, a qual não foi quantificada no tomilho fresco no presente estudo. Shan *et al.* (2005) determinaram no tomilho fresco, a presença de ácido gálico (37,5 mg/100 g peso seco), ácido cafeico (54,8 mg/100 g peso seco), ácido *p*-cumárico (55,9 mg/100 g peso seco), ácido rosmarínico (681,1 mg/100 g peso seco) e timol (591,4 mg/100 g peso seco). No presente trabalho não se identificou ácido cafeico e ácido *p*-cumárico no tomilho fresco. As quantidades de ácido gálico, ácido rosmarínico e timol obtidas no presente trabalho para o tomilho fresco, são inferiores às obtidas por estes autores. Proestos *et al.* (2005) determinaram no tomilho seco a presença de ácido cafeico (5,8 mg/100 g amostra seca), ácido *p*-cumárico (1,2 mg/100 g amostra seca) e epicatequina (0,3 mg/100 g amostra seca). No presente estudo apenas não se identificou ácido *p*-cumárico no tomilho seco. Fecka e Turek (2008) determinaram em 27 amostras de tomilho seco a presença de ácido cafeico (34 - 70 mg/100 g de amostra) e de ácido rosmarínico (1104 - 3531 mg/100 g de amostra). No presente trabalho também se identificou ácido cafeico e ácido rosmarínico no tomilho

seco. Roby *et al.* (2013), determinaram para um extracto de tomilho fresco (*Thymus vulgaris* L.) em metanol, a presença de ácido cafeico (1,4 %), ácido *p*-cumárico (0,96 %), ácido ferúlico (3,66 %) e ácido carnósico (7,57 %), não tendo sido identificados no presente estudo estes compostos fenólicos no tomilho fresco. Miron *et al.* (2011) identificaram para um extracto de tomilho fresco silvestre, a presença de ácido clorogénico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico e ácido rosmarínico, tendo sido apenas identificado o ácido rosmarínico no tomilho fresco analisado no âmbito do presente trabalho. Martins *et al.* (2015) determinaram para um extracto hidroalcoólico de tomilho seco, a presença de ácido protocatecuico (76 mg/100 g de extracto), ácido cafeico (184 mg/100 g de extracto) e ácido rosmarínico (2226 mg/100 g de extracto). Estes compostos fenólicos também foram identificados no presente estudo no tomilho seco. Zheng e Wang (2001) determinaram para um extracto de tomilho fresco, a presença de ácido cafeico (11,7 mg/100 g peso fresco) e de ácido rosmarínico (91,8 mg/100 g de peso fresco), entre outros compostos fenólicos não estudados no presente trabalho, sendo que também foi determinado o ácido rosmarínico no tomilho fresco analisado no presente estudo. Wang, Provan e Helliwell (2004) determinaram para duas amostras diferentes de tomilho seco, a presença de ácido rosmarínico (450 e 870 mg/100 g de amostra) e ácido cafeico (10 e 30 mg/100 g de amostra). Estes compostos fenólicos quantificados por Wang, Provan e Helliwell (2004), também foram detectados no presente estudo no tomilho seco.

Quanto aos compostos fenólicos encontrados na hortelã-pimenta, Muchuweti *et al.* (2007) determinaram na hortelã-pimenta seca, a presença de ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido vanílico, ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico. No presente estudo também se identificou ácido protocatecuico e ácido *p*-cumárico na hortelã-pimenta seca orgânica. Akhtar, Ihsan-ul-Haq e Mirza (2015) determinaram para um extracto de hortelã-pimenta fresca (*Mentha piperita* L.) em M/C (mistura de metanol e clorofórmio), a presença de ácido cafeico (3 mg/100 g de peso seco), miricetina (428 mg/100 g de peso seco) e quercetina (25 mg/100 g de peso seco). Para um extracto aquoso de hortelã-pimenta fresca, determinaram a presença de ácido gálico (2 mg/100 g de peso seco), ácido cafeico (2 mg/100 g de peso seco) e quercetina (67 mg/100 g de peso seco), sendo que no presente estudo também se quantificou ácido cafeico na hortelã-pimenta seca orgânica. Sroka, Fecka e Cisowski (2005) determinaram num extracto aquoso de folhas secas de hortelã-pimenta, a presença de ácido cafeico (4 mg/100 g de peso seco de folhas), ácido rosmarínico (290 mg/100 g de peso seco de folhas) e hesperetina (230 mg/100 g de peso

seco de folhas). As quantidades de ácido cafeico, ácido rosmarínico e hesperetina obtidas no presente trabalho para a hortelã-pimenta seca orgânica são inferiores às quantidades obtidas por Sroka, Fecka e Cisowski (2005) para estes compostos fenólicos.

Relativamente à hortelã, Wang, Provan e Helliwell (2004), determinaram para duas amostras diferentes de hortelã seca (*Mentha spicata* L.), a presença de ácido rosmarínico (710 e 1430 mg/100 g de amostra), verificando-se uma grande variabilidade de concentrações para o ácido rosmarínico das amostras de hortelã estudadas. Estes autores também determinaram para as folhas secas de hortelã a presença de ácido cafeico (20 e 30 mg/100 g de amostra). Os compostos fenólicos quantificados por Wang, Provan e Helliwell (2004) também foram identificados no presente estudo na hortelã seca. Shan et al. (2005), determinaram para outra espécie do género *Mentha* (*Mentha canadensis* L.), a presença de ácido cafeico (27,1 mg/100 g peso seco) e ácido rosmarínico (1908,5 mg/100 g peso seco), na planta fresca desta espécie. Os valores obtidos por Shan et al. (2005) são superiores aos obtidos no presente trabalho para a hortelã fresca.

Quanto aos fenólicos encontrados na manjerona, Kosar et al. (2003) determinaram para um extracto aquoso de manjerona doce (*Majorana hortensis* Moench), a presença de ácido cafeico (12 mg/100 g peso seco) e de ácido rosmarínico (509 mg/100 g peso seco). Comparando os valores obtidos por Kosar et al. (2003) com os valores obtidos no presente estudo para a manjerona seca e fresca, verifica-se que os valores obtidos por Kosar et al. (2003) são superiores. Hossain et al. (2010), determinaram para extractos metanólicos de manjerona (*Origanum majorana* L.) fresca e seca, a presença de ácido rosmarínico obtendo valores de 430 mg/100 g de peso seco e 1330 mg/100 g de peso seco, respectivamente. As quantidades obtidas de ácido rosmarínico no presente trabalho para a manjerona fresca e seca são inferiores às quantidades obtidas por estes autores. Proestos et al. (2005) determinaram na manjerona seca a presença de ácido cafeico (4,2 mg/100 g amostra seca) e de ácido ferúlico (9,2 mg/100 g amostra seca). O valor obtido no presente estudo para o ácido cafeico na manjerona seca é ligeiramente inferior ao valor obtido por Proestos et al. (2005). O ácido ferúlico não foi identificado na manjerona seca. Papageorgiou, Mallouchos e Komaitis (2008) analisaram extractos metanólicos de manjerona fresca e determinaram a presença de ácido gálico (115 - 250 mg/100 g de peso seco), ácido cafeico (10 - 200 mg/100 g de peso seco), ácido ferúlico (120 - 490 mg/100 g de peso seco), ácido rosmarínico (15 - 155 mg/100 g de peso seco) e quercetina (quantidades vestigiais e 230 mg/100 g de peso seco), sendo que, dos compostos fenólicos

quantificados por Papageorgiou, Mallouchos e Komaitis (2008), também se detectou ácido cafeico e ácido rosmarínico na manjerona fresca no presente trabalho. O valor obtido de ácido cafeico (2,41 mg/100 g de peso seco) no presente trabalho para a manjerona fresca é inferior ao limite inferior do intervalo encontrado por estes autores para o ácido cafeico. No entanto, comparando o valor obtido de ácido rosmarínico (223,49 mg/100 g de peso seco) na manjerona fresca, com o valor obtido por Papageorgiou, Mallouchos e Komaitis (2008), verifica-se que o valor obtido no presente trabalho é superior ao limite superior do intervalo encontrado por Papageorgiou, Mallouchos e Komaitis (2008) para o ácido rosmarínico. Dorman *et al.* (2004) determinaram na manjerona doce seca, a presença de ácido cafeico (12 mg/100 g de peso seco) e ácido rosmarínico (509 mg/100 g de peso seco), sendo superiores aos valores obtidos no presente estudo para estes compostos fenólicos. Muchuweti *et al.* (2007) identificaram vários compostos fenólicos na manjerona seca, entre eles o ácido protocatecuico, o ácido vanílico, o ácido cafeico e o ácido ferúlico, sendo que, destes compostos fenólicos, também se identificou no presente estudo, o ácido protocatecuico e o ácido cafeico na manjerona seca. Hossain *et al.* (2011) determinaram para um extracto de manjerona seca em metanol a 80 % (v/v), a presença de ácido rosmarínico (1453 mg/100 g), ácido cafeico (8 mg/100 g), ácido gálico (46,4 mg/100 g), ácido carnósico (533,3 mg/100 g) e carnosol (448,0 mg/100 g), sendo que, destes compostos fenólicos, também se identificou ácido rosmarínico e ácido cafeico na manjerona seca, no presente estudo. Fecka e Turek (2008) determinaram em 35 amostras de manjerona doce seca, a presença de ácido cafeico (22 - 135 mg/100 g de amostra). Estes autores também determinaram a presença de ácido rosmarínico (400 - 1948 mg/100 g de amostra), tendo também sido identificados ácido cafeico e ácido rosmarínico no presente trabalho. Roby *et al.* (2013) determinaram para um extracto de manjerona fresca (*Origanum majorana* L.) em metanol, a presença de ácido gálico (0,29 %), ácido clorogénico (0,25 %), ácido cafeico (0,16 %), ácido *p*-cumárico (0,38 %) e ácido ferúlico (0,12 %), tendo sido também identificados no presente estudo ácido cafeico e ácido *p*-cumárico na manjerona fresca.

Relativamente ao orégão, Kosar *et al.* (2003) determinaram para um extracto aquoso de orégão (*Origanum vulgare* L.), a presença de ácido cafeico (54 mg/100 g peso seco) e de ácido rosmarínico (1325 mg/100 g peso seco). Os valores obtidos no presente estudo para o ácido rosmarínico no orégão seco e fresco são inferiores aos obtidos por estes autores. No presente estudo, o ácido cafeico foi quantificado no orégão seco,

apresentando uma quantidade inferior à obtida por Kosar et al. (2003). Hossain et al. (2010) determinaram para extractos metanólicos de orégão fresco e seco, a presença de ácido rosmarínico obtendo valores de 578 mg/100 g de peso seco e 1840 mg/100 g de peso seco, respectivamente. As quantidades obtidas de ácido rosmarínico no presente trabalho para o orégão fresco e seco, são inferiores às quantidades obtidas por estes autores. Dorman et al. (2004) determinaram para outras espécies do género *Origanum* secas (*Origanum syriacum* L., *Origanum minutiflorum* O. Schwarz et P. H. Davis e *Origanum onites* L.), a presença de ácido cafeico (12 - 21 mg/100 g de peso seco) e ácido rosmarínico (396 - 784 mg/100 g de peso seco). Os valores obtidos por Dorman et al. (2004) são superiores aos valores obtidos no presente estudo para estes compostos fenólicos quantificados no orégão seco. Wojdyło, Oszmiański e Czemerys (2007) também determinaram a presença de ácido cafeico (649 mg/100 g peso seco) no orégão fresco. Este composto não foi identificado no orégão fresco no presente estudo. Shan et al. (2005) determinaram no orégão fresco, a presença de ácido cafeico (50,0 mg/100 g peso seco), ácido *p*-cumárico (214,8 mg/100 g peso seco), ácido rosmarínico (2562,7 mg/100 g peso seco) e carvacrol (108,3 mg/100 g peso seco), sendo que, destes compostos fenólicos, também foi quantificado ácido rosmarínico no presente estudo no orégão fresco, no entanto, a concentração encontrada é inferior à obtida por Shan et al. (2005). Hossain et al. (2011) determinaram para um extracto de orégão seco em metanol a 80 % (v/v), a presença de ácido rosmarínico (570 mg/100 g), ácido cafeico (14 mg/100 g), ácido gálico (48,3 mg/100 g), ácido carnósico (753,3 mg/100 g) e carnosol (558,1 mg/100 g), sendo que, também foram identificados no presente estudo ácido rosmarínico e ácido cafeico no orégão seco. Zheng e Wang (2001) determinaram a presença de ácido cafeico (10,4 mg/100 g peso fresco) e de ácido rosmarínico (154,6 mg/100 g de peso fresco) em orégão italiano fresco (*Origanum majoricum*), no entanto, apenas foi identificado este último em orégão fresco no presente trabalho. Muchuweti et al. (2007) determinaram no orégão seco a presença de *p*-hidroxibenzaldeído, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico. Nenhum destes compostos fenólicos detectados por Muchuweti et al. (2007) foram identificados em orégão seco no presente estudo. Miron et al. (2011) identificaram para um extracto de orégão fresco (*Origanum vulgare* L.), a presença de ácido protocatecuico, ácido clorogénico, ácido cafeico e ácido rosmarínico, no entanto, apenas foi identificado este último em orégão fresco no presente trabalho.

Relativamente ao manjeriço, Hossain *et al.* (2010) determinaram para extractos metanólicos de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) fresco e seco, a presença de ácido rosmarínico obtendo valores de 471 mg/100 g de peso seco e 1220 mg/100 g de peso seco, respectivamente. As quantidades obtidas de ácido rosmarínico no presente trabalho para o manjeriço fresco e seco, são inferiores às quantidades obtidas por Hossain *et al.* (2010) para o manjeriço fresco e seco. Shan *et al.* (2005), determinaram no manjeriço fresco, a presença de ácido protocatecuico (41,5 mg/100 g peso seco), ácido cafeico (30,4 mg/100 g peso seco), ácido *p*-cumárico (27,9 mg/100 g peso seco), ácido rosmarínico (1086,1 mg/100 g peso seco), eugenol (189,6 mg/100 g peso seco) e carvacrol (111,6 mg/100 g peso seco). No presente trabalho não se identificou ácido protocatecuico, ácido *p*-cumárico e carvacrol no manjeriço fresco. As quantidades de ácido cafeico, ácido rosmarínico e eugenol obtidas no presente trabalho no manjeriço fresco são inferiores às quantidades obtidas por Shan *et al.* (2005). Proestos *et al.* (2005) determinaram no manjeriço seco a presença de ácido cafeico (2,8 mg/100 g amostra seca) e de ácido ferúlico (4 mg/100 g amostra seca). Muchuweti *et al.* (2007) determinaram no manjeriço seco a presença de ácido protocatecuico, ácido *p*-hidroxibenzóico, *p*-hidroxibenzaldeído, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico, sendo que, destes compostos fenólicos detectados por Muchuweti *et al.* (2007), também foram identificados no presente estudo ácido protocatecuico e ácido cafeico no manjeriço seco.

Quanto ao estragão, Durić *et al.* (2013) determinaram no estragão fresco (*Artemisia dracunculus* L.), a presença de ácido gálico (3 e 18 mg/100 g de amostra, para extracção a frio e a quente, respectivamente), ácido sinápico (40 e 73 mg/100 g de amostra, para extracção a frio e a quente, respectivamente), ácido cafeico (210 e 731 mg/100 g de amostra, para extracção a frio e a quente, respectivamente) e ácido clorogénico (91 e 141 mg/100 g de amostra, para extracção a frio e a quente, respectivamente). Dos compostos fenólicos quantificados por Durić *et al.* (2013) no estragão fresco, no presente estudo, identificou-se ácido gálico e ácido clorogénico para a mesma planta aromática fresca. Miron *et al.* (2011) identificaram também para um extracto de estragão fresco (*Artemisia dracunculus* L.), a presença de ácido clorogénico e quercetina, não tendo a quercetina sido identificada no presente estudo no estragão fresco. Justesen e Knuthsen (2001) determinaram no estragão fresco a presença de quercetina (10 mg/100 g de peso fresco), entre outros flavonóides não estudados no presente trabalho, não tendo sido identificado este composto fenólico no estragão fresco. Obolskiy *et al.* (2011) realizaram uma revisão

bibliográfica para o estragão, identificando 17 flavonóides e 7 fenilpropanóides, como a quercetina, a rutina, o kaempferol, o ácido clorogénico, o ácido cafeico, entre outros constituintes presentes nesta planta aromática. Dos compostos fenólicos identificados por Obolskiy *et al.* (2011), o ácido clorogénico foi identificado no estragão seco, fresco e no estragão seco orgânico analisado no presente estudo, enquanto o ácido cafeico apenas foi identificado no estragão seco.

Relativamente à stevia, Ghanta *et al.* (2007) determinaram para um extracto de folhas frescas de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) em acetato de etilo, a presença de luteolina, apigenina, apigenina-4-O-glucósido, quercetina-3-O-arabinosídeo, kaempferol-3-O-ramnosídeo e quercitrina. Gawel-Bęben *et al.* (2015) analisaram extractos de folhas secas de *Stevia rebaudiana* Bertoni para a determinação de diversos compostos fenólicos: aquoso e etanólico. Para o extracto aquoso de stevia, determinaram a presença de derivados do ácido benzóico (10 mg/100 g de stevia), ácido cafeico (29 mg/100 g de stevia), derivados do ácido cafeico (6 mg/100 g de stevia), ácido protocatecuico (12 mg/100 g de stevia), derivados do ácido salicílico (6 mg/100 g de stevia), catequina (24 mg/100 g de stevia) e derivados da catequina (29 mg/100 g de stevia). Para o extracto etanólico de stevia, determinaram a presença de derivados do ácido benzóico (5 mg/100 g de stevia), ácido cafeico (6 mg/100 g de stevia), derivados do ácido cafeico (3 mg/100 g de stevia), ácido clorogénico (30 mg/100 g de stevia), derivados do ácido clorogénico (14 mg/100 g de stevia), derivados do ácido ferúlico (86 mg/100 g de stevia), ácido rosmarínico (36 mg/100 g de stevia), derivados do ácido rosmarínico (42 mg/100 g de stevia), derivados do campferol (15 mg/100 g de stevia), derivados da catequina (12 mg/100 g de stevia), epicatequina (11 mg/100 g de stevia), luteolina (3 mg/100 g de stevia), derivados da luteolina (1 mg/100 g de stevia) e derivados da rutina (12 mg/100 g de stevia). Destes compostos fenólicos detectados por Gawel-Bęben *et al.* (2015), também foram quantificados no presente estudo, o ácido clorogénico e o ácido rosmarínico, em extractos metanólicos de stevia fresca. Kim *et al.* (2011) determinaram para o extracto aquoso de folhas frescas de stevia a presença de pirogalol (951,27 mg/100 g de extracto seco), ácido 4-metoxibenzóico (33,80 mg/100 g extracto seco), ácido *p*-cumárico (30,47 mg/100 g extracto seco), 4-metilcatecol (25,61 mg/100 extracto seco), ácido sinápico (9,03 mg/100 extracto seco) e ácido cinâmico (2,42 mg/100 extracto seco). Muanda *et al.* (2011) analisaram um extracto aquoso e um extracto M/A (mistura de metanol e água) de folhas secas de *Stevia rebaudiana*. Para o extracto aquoso de stevia, determinaram a presença de

ácido gálico (0,17 mg/mL), ácido protocatecuico (1,46 mg/mL), ácido clorogénico (0,32 mg/mL), ácido cafeico (0,08 mg/mL), epicatequina (0,53 mg/mL), ácido *p*-cumárico (0,05 mg/mL) e quercetina (0,45 mg/mL). Para o extracto M/A de stevia, determinaram a presença de ácido gálico (0,04 mg/mL), ácido protocatecuico (0,49 mg/mL), ácido clorogénico (1,03 mg/mL), epicatequina (0,52 mg/mL), ácido *p*-cumárico (0,07 mg/mL) e quercetina (0,27 mg/mL). Como já referido, para os extractos de folhas frescas de stevia analisados no presente estudo, identificou-se ácido clorogénico e ácido rosmarínico. Os valores obtidos por Gawet-Beben *et al.* (2015), por Kim *et al.* (2011) e por Muanda *et al.* (2011) estão apresentados noutras unidades não sendo possível a comparação com os valores obtidos no presente estudo para a stevia fresca.

Quanto às diferenças verificadas entre os resultados encontrados na literatura e os do presente estudo para a determinação dos compostos fenólicos individuais, podem dever-se a diversos factores, como a utilização de solventes diferentes na extracção, diferenças na metodologia utilizada no processo de extracção e também na determinação dos compostos fenólicos (diferentes equipamentos, detectores, solventes da fase móvel, coluna analítica), também a variação das espécies de plantas aromáticas e as diferentes condições edafoclimáticas podem influenciar nas diferenças verificadas (Aronne, Micco e Scala, 2006; Bianchin e Carpes, 2012; Farzaneh e Carvalho, 2015; Khaled-Khodja, Boulekbache-Makhlouf e Madani, 2014; Miliauskas, Venskutonis e Beek, 2004; Zaouali, Bouzaine e Boussaid, 2010).

5 CONCLUSÃO

O estudo desenvolvido na primeira parte desta dissertação, teve como objectivo a determinação da capacidade antioxidante através de dois ensaios *in vitro* (sistema de inibição do radical DPPH e teste do branqueamento do β -caroteno) e a determinação do conteúdo em fenólicos e flavonóides totais, de extractos metanólicos de 21 amostras de plantas aromáticas (7 secas e 8 frescas de agricultura convencional e 6 secas de agricultura biológica).

Verificou-se que a capacidade antioxidante demonstrada pelos extractos de plantas aromáticas variou consideravelmente de espécie para espécie. No entanto, no sistema de inibição do radical DPPH, o extracto metanólico de alecrim seco foi o que apresentou maior capacidade antioxidante (2,22 mg peso seco/mL). Outros extractos metanólicos de plantas apresentaram valores de EC_{50} inferiores a 5 mg peso seco/mL, nomeadamente, extractos de tomilho seco, alecrim fresco, hortelã fresca, stevia fresca e ainda, o extracto metanólico de orégão seco de agricultura biológica. Relativamente ao teste do branqueamento do β -caroteno, o extracto metanólico de manjeriço fresco foi o que apresentou maior capacidade antioxidante (AAC = 1083). Outros extractos metanólicos de plantas apresentaram valores de AAC elevados, nomeadamente, extractos de alecrim seco, tomilho (fresco e seco), orégão fresco, estragão fresco, hortelã fresca e stevia fresca.

Relativamente ao conteúdo em fenólicos totais, o extracto metanólico de orégão fresco foi o que apresentou maior quantidade destes compostos (26,27 mg GAE/g peso seco). Outros extractos metanólicos de plantas apresentaram teores de fenólicos totais superiores a 15 mg GAE/mg peso seco, nomeadamente, extractos de alecrim (fresco e seco), tomilho (fresco e seco), orégão seco, manjeriço (fresco e seco), hortelã fresca, stevia fresca e ainda, o extracto metanólico de orégão seco de agricultura biológica. Relativamente ao conteúdo em flavonóides totais, o extracto metanólico de stevia fresca foi o que apresentou maior quantidade destes compostos (53,75 mg ECE/g peso seco). Outros extractos metanólicos de plantas apresentaram teores de flavonóides totais superiores a 15 mg ECE/mg peso seco, nomeadamente, extractos de alecrim (fresco e seco), tomilho (fresco e seco), orégão fresco, estragão (fresco e seco), manjeriço fresca, hortelã

fresca, manjeriço fresco e ainda, o extracto metanólico de orégão seco de agricultura biológica.

Na segunda parte deste estudo o objectivo principal foi o desenvolvimento e validação de um método cromatográfico de UHPLC-DAD que permite quantificar simultaneamente dezanove compostos fenólicos, em 30 minutos de análise, sendo aplicado para a determinação dos compostos fenólicos em extractos metanólicos de 21 amostras de plantas aromáticas.

Durante o desenvolvimento do método de UHPLC-DAD, foram optimizadas várias condições cromatográficas, como a coluna analítica, a composição das fases móveis e o gradiente de eluição, o fluxo da fase móvel e a temperatura da coluna. Após a optimização do método, foram avaliados os seguintes parâmetros de validação: especificidade, gama de trabalho e linearidade, limite de detecção e de quantificação, precisão e exactidão.

O método desenvolvido revelou ser específico e na avaliação da linearidade, realizaram-se curvas de calibração para cada um dos 19 compostos fenólicos na gama de trabalho definida. Os coeficientes de determinação obtidos para cada composto fenólico foram superiores ou iguais a 0,999. Relativamente à gama de trabalho obtida para cada composto fenólico, verifica-se na generalidade, uma ampla gama de concentrações em que se pode aplicar este método.

Quanto aos limites de detecção e quantificação, o método desenvolvido permite detectar e quantificar os compostos fenólicos em concentrações muito baixas, pelo que se poderá aplicar ao estudo de plantas aromáticas, nas quais baixas concentrações de compostos fenólicos podem ser detectadas e quantificadas.

A precisão do método foi avaliada através de ensaios de repetibilidade (precisão intra-dia) e de precisão intermédia (precisão inter-dia). A precisão do método de extracção foi determinada pelo RSD (%) do conteúdo de cada composto fenólico na amostra de tomilho seco, verificando-se que apresentou valores aceitáveis (< 5,7 % em termos de repetibilidade e < 8,7 % em termos de precisão intermédia).

Relativamente à avaliação da exactidão, esta foi avaliada através de ensaios de recuperação. Para isso, foram fortificadas quatro amostras de tomilho seco com quantidades conhecidas de cada padrão analítico. As percentagens de recuperação dos compostos fenólicos variaram entre 82,8 - 103,9 %, com valores de RSD (%) inferiores ou

ligeiramente superiores a 5 %, pelo que os resultados obtidos para a exactidão do método são satisfatórios.

O método de UHPLC-DAD validado foi aplicado a extractos metanólicos de 21 amostras de plantas aromáticas, para a determinação simultânea de 19 compostos fenólicos. Dos resultados obtidos, o tomilho seco foi a planta que apresentou maior diversidade em compostos fenólicos, apresentando 10 dos 19 compostos fenólicos estudados. Esta planta apresentou elevadas quantidades em ácido rosmarínico e em timol. Para além do extracto de tomilho seco, outros extractos metanólicos de plantas apresentaram elevadas quantidades de carnosol e ácido carnósico (alecrim seco), timol (orégão seco), ácido rosmarínico (alecrim fresco), timol (tomilho fresco) e ácido clorogénico (stevia fresca). Verificou-se ainda que o ácido rosmarínico está presente em todas as amostras analisadas, à excepção das amostras secas de orégão e estragão, ambas de agricultura biológica.

O trabalho desenvolvido na presente dissertação, revela um contributo determinante para o estudo do conteúdo em compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de extractos de plantas aromáticas, devido à diversidade de plantas estudadas e aos métodos de análise aplicados e/ou desenvolvidos. O método UHPLC-DAD desenvolvido e validado poderá ser aplicado futuramente para determinação de compostos fenólicos a outras plantas aromáticas ou matrizes alimentares.

Com o presente estudo, foi possível avaliar o potencial de utilização de algumas plantas aromáticas na produção de extractos a ser incorporados a embalagens alimentares activas. Verificou-se que as plantas aromáticas estudadas são excelentes fontes de compostos antioxidantes fenólicos, revelando boa capacidade antioxidante, destacando-se o alecrim, tomilho, orégão, manjerição e stevia como aquelas que apresentam maior potencial para a produção de embalagens activas antioxidantes.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar do estudo realizado na presente dissertação reunir uma diversidade de plantas aromáticas, seria de enorme importância a continuidade destes estudos, recorrendo a outros ensaios de capacidade antioxidante. Seria fundamental a continuidade destes estudos compreendendo outras espécies de plantas aromáticas, que ainda não tenham sido estudadas ou que para as quais existe escassa informação sobre as suas propriedades antioxidantes. Também seria interessante a determinação de outros componentes das plantas aromáticas, tais como vitaminas e carotenóides.

Das plantas aromáticas estudadas, o tomilho seco foi o que apresentou maior diversidade em compostos fenólicos, apresentando uma elevada quantidade em ácido rosmarínico e em timol. Para além do tomilho seco, outras plantas apresentaram elevadas quantidades de compostos antioxidantes, nomeadamente, o alecrim seco, o orégão seco, o alecrim fresco, o tomilho fresco e a stevia fresca. Aprofundar estudos nestas plantas aromáticas futuramente, preparando extractos muito concentrados e avaliando a sua capacidade antioxidante, seria útil e determinante para possível incorporação destes extractos de plantas a embalagens alimentares activas.

7 BIBLIOGRAFIA

ABDULLATEEF, R.A., OSMAN, M. (2011) – Effects of Visible Light Wavelengths on Seed Germinability in *Stevia Rebaudiana* Bertoni. *International Journal of Biology*. 3, 4 (2011), 83-91.

AGROBIO (2011) - O que é a Agricultura Biológica?. [Em linha]. [Acedido a 31 de Agosto de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.agrobio.pt/pt/o-que-e-a-agricultura-biologica.T136.php>.

AHMAD, N., FAZAL, H., ABBASI, B.H., FAROOQ, S. (2010)– Efficient free radical scavenging activity of *Ginkgo biloba*, *Stevia rebaudiana* and *Parthenium hysterophorous* leaves through DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). *International Journal of Phytomedicine*. 2 (2010), 231-239.

AHMAD, N., FAZAL, H., ABBASI, B.H., INAYAT-UR-RAHMAN, ANWAR, S., KHAN, M.A., BASIR, A., INAYAT, H., ZAMEER, R., KHALIL, S.A., KHAN, K.Y. (2011) – DPPH-scavenging antioxidant potential in regenerated tissues of *Stevia rebaudiana*, *Citrus sinensis* and *Saccharum officinarum*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5, 14 (2011), 3293-3297.

AHMIDA, H.S.M., BERTUCCI, P., FRANZÒ, L., MASSOUD, R., CORTESE, C., LALA, A., FEDERICI, G. (2006) – Simultaneous determination of plasmatic phytosterols and cholesterol precursors using gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) with selective ion monitoring (SIM). *Journal of Chromatography B*. 842 (2006), 43-47.

AKHTAR, N., IHSAN-UL-HAQ, MIRZA, B. (2015) – Phytochemical analysis and comprehensive evaluation of antimicrobial and antioxidant properties of 61 medicinal plant species. *Arabian Journal of Chemistry*. *In Press* (2015).

ARONNE, G., MICCO, V., SCALA, M. (2006) – Effects of relative humidity and temperature conditions on pollen fluorochromatic reaction of *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae). *Protoplasma*. 228 (2006), 127-130.

BABOVIC, N., DJILAS, S., JADRANIN, M., VAJS, V., IVANOVIC, J., PETROVIC, S., ZIZOVIC, I. (2010) – Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidant capacity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 11 (2010), 98-107.

BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K., SAMMAN, S. (2006) – Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99 (2006), 191-203.

BARCHAN, A., BAKKALI, M., ARAKRAK, A., PAGÁN, R., LAGLAOUI, A. (2014) – The effects of solvents polarity on the phenolic contents and antioxidant activity of three *Mentha* species extracts. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3, 11 (2014), 399-412.

BENTAYEB, K., RUBIO, C., BATLLE, R., NERÍN, C. (2007) – Direct determination of carnosic acid in a new active packaging based on natural extract of rosemary. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 389 (2007), 1989-1996.

BERNARDI, L.A. (2012) – Stevia rebaudiana o Kaá heé: una dulce alternativa. *Heladería Panadería Latinoamericana*. 217 (2012), 56-58.

BIANCHIN, M., CARPES, S.T. (2012) – Propriedades Antioxidante e Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos e Óleo Essencial de *Rosmarinus Officinalis*. In: SICITE, 17, Paraná. Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR. [S.l.]: [s.n.], 2012.

BONDAREV, N., RESHETNYAK, O., NOSOV, A. (2001) – Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in vitro cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Science*. 161 (2001), 155-163.

BRAGA, L.R., PERES, L. (2010) – Novas tendências em embalagens para alimentos: revisão. *Boletim do CEPPA*. 28, 1 (2010), 69-84.

BRANDLE, J.E., STARRATT, A.N., GIJZEN, M. (1998) – *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. *The Canadian Journal of Plant Science*. 78 (1998), 527-536.

BREWER, M.S. (2011) – Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 10 (2011), 221-247.

BRUNETON, J. (2001) – *Farmacognosia: Fitoquímica, Plantas medicinales*. 2ª Ed. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S.A. (2001).

CHAN, E.W.C., KONG, L.Q., YEE, K.Y., CHUA, W.Y., LOO, T.Y. (2012) – Rosemary and Sage Outperformed Six other Culinary Herbs in Antioxidant and Antibacterial Properties. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*. 1 (2012), 142-151.

CHRISTAKI, E., BONOS, E., GIANNENAS, I., FLOROU-PANERI, P. (2012) – Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds. *Agriculture*. 2 (2012), 228-243.

CUNHA, A.P., RIBEIRO, J.A., ROQUE, O.R. (2014) – *Plantas Aromáticas em Portugal Caracterização e Utilizações*. 3ª Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian (2014), ISBN 978-972-31-1170-5.

CUNHA, A.P., ROQUE, O.R., GASPAR, N. (2013) – *Cultura e Utilização das Plantas Medicinais e Aromáticas*. 2ª Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian (2013), ISBN 978-972-31-1372-3.

CUNHA, A.P., ROQUE, O.R., NOGUEIRA, M.T. (2012) – *Plantas Aromáticas e Óleos Essenciais Composição e Aplicações*. 1ª Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian (2012), ISBN 978-972-31-1450-8.

Directiva 2010/67/UE da Comissão de 20 de Outubro de 2010 que altera a Directiva 2008/84/CE que estabelece os critérios de pureza específicos dos aditivos alimentares com excepção dos corantes e dos edulcorantes. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 277: 17-26, 21 de Outubro de 2010. União Europeia.

Directiva 2010/69/UE da Comissão de 22 de Outubro de 2010 que altera os anexos da Directiva 95/2/CE do Parlamento Europeu e do Conselho relativa aos aditivos alimentares

com exceção dos corantes e dos edulcorantes. Jornal Oficial da União Europeia, L 279: 22-31, 23 de Outubro de 2010. União Europeia.

DORMAN, H.J.D., BACHMAYER, O., KOSAR, M., HILTUNEN, R. (2004) – Antioxidant Properties of Aqueous Extracts from Selected Lamiaceae Species Grown in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (2004), 762-770.

DORMAN, H.J.D., PELTOKETO, A., HILTUNEN, R., TIKKANEN, M.J. (2003)– Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*. 83 (2003), 255-262.

DURIĆ, K., KOVAČ-BEŠOVIĆ, E., NIKŠIĆ, H., SOFIĆ, E. (2013) – Antioxidant activity of water extracts and essential oil of *Artemisa Dracunculus* L., Asteraceae. *Medical Journal*. 19, 2 (2013), 94-99.

ERKAN, N., AYRANCI, G., AYRANCI, E. (2008) – Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*. 110 (2008), 76-82.

FARZANEH, V., CARVALHO, I.S. (2015) – A review of the health benefit potentials of herbal plant infusions and their mechanism of actions. *Industrial Crops and Products*. 65 (2015), 247-258.

FECKA, I., TUREK, S. (2008) – Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chemistry*. 108 (2008), 1039-1053.

FERREIRA, A.F.P.V. (2010) – Desenvolvimento farmacêutico e validação do método analítico de uma suspensão contendo paracetamol. Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Mestre em Química. Coimbra (2010).

FERREIRA, I.C.F.R., ABREU, R.M.V. (2007) – Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise*. 2 (2007), 32-39.

FORMANEK, Z., KERRY, J.P., HIGGINS, F.M., BUCKLEY, D.J., MORRISSEY, P.A., FARKAS, J. (2001) – Addition of synthetic and natural antioxidants to α -tocopheryl acetate

supplemented beef patties: effects of antioxidants and packaging on lipid oxidation. *Meat Science*. 58 (2001), 337-341.

FORMICA, J.V., REGELSON, W. (1995) – Review of the Biology of Quercetin and Related Bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*. 33, 12 (1995), 1061-1080.

GAWEŁ-BĘBEN, K., BUJAK, T., NIZIOŁ-ŁUKASZEWSKA, Z., ANTOSIEWICZ, B., JAKUBCZYK, A., KARAŚ, M., RYBCZYŃSKA, K. (2015) – *Stevia Rebaudiana* Bert. Leaf Extracts as a Multifunctional Source of Natural Antioxidants. *Molecules*. 20 (2015), 5468-5486.

GHANTA, S., BANERJEE, A., PODDAR, A., CHATTOPADHYAY, S. (2007) – Oxidative DNA Damage Preventive Activity and Antioxidant Potential of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, a Natural Sweetener. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 (2007), 10962-10967.

GOETTEMOELLER, J., CHING, A. (1999) – Seed Germination in *Stevia rebaudiana*. In: Janick, J. *Perspectives on New Crops and New Uses*. Alexandria, VA: ASHS Press, 1999. ISBN 0-9615027-0-3, p. 510-511.

GONÇALVES, S., GOMES, D., COSTA, P., ROMANO, A. (2013) – The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products*. 43 (2013), 465-471.

GOPALAKRISHNAN, B., BAWANE, A.A., AKKI, K.S., HUKKERI, V.I. (2006) – Free radical scavenging activity of flavonoid containing leaf extracts of *Stevia rebaudiana* Bert. *Ancient Science of Life*. 25, 3&4 (2006), 44-48.

GUPTA, E., PURWAR, S., SUNDARAM, S., RAI, G.K. (2013) – Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana*: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*. 7, 46 (2013), 3343-3353.

HALLIWELL, B., RAFTER, J., JENNER, A. (2005) – Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 81 (2005), 268S–276S.

HAMIDPOUR, R., HAMIDPOUR, S., HAMIDPOUR, M., SHAHLARI, M., SOHRABY, M. (2014) – Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 4, 3 (2014), 140–144.

HERRERO, M., PLAZA, M., CIFUENTES, A., IBÁÑEZ, E. (2010) – Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. *Journal of Chromatography A*. 1217 (2010), 2512-2520.

HINNEBURG, I., DORMAN, H.J.D., HILTUNEN, R. (2006) – Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*. 97 (2006), 122-129.

HONG, C., DANG, Y., LIN, G., YAO, Y., LI, G., JI, G., SHEN, H., XIE, Y. (2014) – Effects of stabilizing agents on the development of myricetin nanosuspension and its characterization: An in vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*. 477 (2014), 251-260.

HOSSAIN, M.B., BARRY-RYAN, C., MARTIN-DIANA, A.B., BRUNTON, N.P. (2010) – Effect of drying method on the antioxidant capacity of six Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*. 123 (2010), 85-91.

HOSSAIN, M.B., BARRY-RYAN, C., MARTIN-DIANA, A.B., BRUNTON, N.P. (2011) – Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. *Food Chemistry*. 126 (2011), 339-346.

HOSSEINNEJAD, M. (2014) – Active packaging for food applications - A review. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*. 2, 4 (2014), 1174-1180.

HUANG, H., CHEN, A.Y., ROJANASAKUL, Y., YE, X., RANKIN, G.O., CHEN, Y.C. (2015) – Dietary compounds galangin and myricetin suppress ovarian cancer cell angiogenesis. *Journal of Functional Foods*. 15 (2015), 464-475.

HUANG, M.-T., SMART, R.C., WONG, C.-Q., CONNEY, A.H. (1988) – Inhibitory Effect of Curcumin, Chlorogenic Acid, Caffeic Acid, and Ferulic Acid on Tumor Promotion in Mouse Skin by 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Research*. 48 (1988), 5941-5946.

HWANG, S.J., JUN, S.H., PARK, Y., CHA, S.-H., YOON, M., CHO, S., LEE, H.-J., PARK, Y. (2015) – Green synthesis of gold nanoparticles using chlorogenic acid and their enhanced performance for inflammation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 11 (2015), 1677-1688.

ICH (1996) – International Conference on Harmonization: Guidance for Industry. ICH Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology.

ICH (1995) – International Conference on Harmonization: Guideline for Industry. ICH Q2A: Text on Validation of Analytical Procedures.

IGNAT, I., VOLF, I., POPA, V.I. (2011) – A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 126 (2011), 1821-1835.

IRANSHAHI, M., REZAEI, R., PARHIZ, H., ROOHBAKHSH, A., SOLTANI, F. (2015) – Protective effects of flavonoids against microbes and toxins: The cases of hesperidin and hesperetin. *Life Sciences*. 137 (2015), 125-132.

JABRI-KAROUI, I., BETTAIEB, I., MSAADA, K., HAMMAMI, M., MARZOUK, B. (2012) – Research on the phenolic compounds and antioxidant activities of Tunisian *Thymus capitatus*. *Journal of Functional Foods*. 4 (2012), 661-669.

JAHAN, I.A., MOSTAFA, M., HOSSAIN, H., NIMMI, I., SATTAR, A., ALIM, A., MOEIZ, S.M.I. (2010) – Antioxidant activity of *Stevia rebaudiana* Bert. Leaves from Bangladesh. *Bangladesh Pharmaceutical Journal*. 13, 2 (2010), 67-75.

JORDÁN, M.J., LAX, V., ROTA, M.C., LORÁN, S., SOTOMAYOR, J.A. (2013) – Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant

properties of *Rosmarinus officinalis* L essential oil and its polyphenolic extract. *Industrial Crops and Products*. 48 (2013), 144-152.

JUSTESEN, U., KNUTHSEN, P. (2001) – Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chemistry*. 73 (2001), 245-250.

KAKKAR, S., BAIS, S. (2014) – A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. *ISRN Pharmacology*. (2014), 1-9.

KARIMI, A., HADIAN, J., FARZANEH, M., KHADIVI-KHUB, A. (2015a) – Evaluation of genetic variability, rust resistance and marker-detection in cultivated *Artemisia dracunculus* from Iran. *Gene*. 554 (2015), 224–232.

KARIMI, A., HADIAN, J., FARZANEH, M., KHADIVI-KHUB, A. (2015b) – Phenotypic diversity and volatile composition of Iranian *Artemisia dracunculus*. *Industrial Crops and Products*. 65 (2015), 315–323.

KAUSHIK, R., PRADEEP, N., VAMSHI, V., GEETHA, M., USHA, A. (2010) – Nutrient composition of cultivated stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts. *Journal of Food Science and Technology*. 47, 1 (2010), 27-33.

KHALED-KHODJA, N., BOULEKBACHE-MAKHLOUF, L., MADANI, K. (2014) – Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Industrial Crops and Products*. 61 (2014), 41-48.

KIM, H., CADWALLADER, K.R., KIDO, H., WATANABE, Y. (2013) – Effect of addition of commercial rosemary extracts on potent odorants in cooked beef. *Meat Science* . 94 (2013), 170-176.

KIM, I.-S., YANG, M., LEE, O.-H., KANG, S.-N. (2011) – The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *Food Science and Technology*. 44 (2011), 1328-1332.

KISELEV, K.V. (2011) – Perspectives for production and application of resveratrol. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 90 (2011), 417-425.

KOSAR, M., DORMAN, H.J.D., BACHMAYER, O., BASER, K.H.C., HILTUNEN, R. (2003) – An improved on-line HPLC-DPPH* method for the screening of free radical scavenging compounds in water extracts of Lamiaceae plants. *Chemistry of Natural Compounds*. 39, 2 (2003), 161-166.

KRUMA, Z., ANDJELKOVIC, M., VERHE, R., KREICBERGS, V. (2008) – Phenolic Compounds in Basil, Oregano and Thyme. *Foodbalt*. (2008), 99-103.

KUMARAVELU, P., SUHRAMANIYAM, S., DAKSHINAMOORTHY, D.P., DEVARAJ, N.S. (1996) – The antioxidant effect of eugenol on CCl₄-induced erythrocyte damage in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 7 (1996), 23-28.

LEMUS-MONDACA, R., VEGA-GÁLVEZ, A., ZURA-BRAVO, L., AH-HEN, K. (2012) – *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*. 132 (2012), 1121-1132.

LOPES-LUTZ, D., ALVIANO, D.S., ALVIANO, C.S., SERRALHEIRO, M.L.M., KOLODZIEJCZYK, P.P. (2008) – Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*. 69 (2008), 1732-1738.

LUTHRIA, D.L. (2008) – Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. *Food Chemistry*. 107 (2008), 745-752.

MADAN, S., AHMAD, S., SINGH, G.N., KOHLI, K., KUMAR, Y., SINGH, R., GARG, M. (2010) – *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni — A Review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*. 1, 3 (2010), 267-286.

MAITI, K., MUKHERJEE, K., GANTAIT, A., AHAMED, H.N., SAHA, B.P., MUKHERJEE, P.K. (2005) – Enhanced Therapeutic Benefit of Quercetin- Phospholipid Complex in

Carbon Tetrachloride- Induced Acute Liver Injury in Rats: A Comparative Study. Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics. 4 (2005), 84-90.

MALDANER, L., JARDIM, I.C.S.F. (2012) – UHPLC - Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. Scientia Chromatographica. 4, 3 (2012), 197-207.

MALIK, B., SHARMA, N.R., SONI, G. (2013) – Influence of agro-climatic conditions on antioxidant potential of *Mentha* species. Journal of Pharmacy Research. 7 (2013), 427-432.

MANDAL, B., MADAN, S. (2013) – Preliminary Phytochemical Screening and Evaluation of Free Radical Scavenging Activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni From Different Geographical Sources. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2, 1 (2013), 14-19.

MARTINS, N., BARROS, L., SANTOS-BUELGA, C., SILVA, S., HENRIQUES, M., FERREIRA, I.C.F.R. (2015) – Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme: Antioxidant and antibacterial activities, and phenolic characterisation. Food Chemistry. 167 (2015), 131-137.

MARUF, A.A., LIP, H., WONG, H., O'BRIEN, P.J. (2015) – Protective effects of ferulic acid and related polyphenols against glyoxal- or methylglyoxal-induced cytotoxicity and oxidative stress in isolated rat hepatocytes. Chemico-Biological Interactions. 234 (2015), 96-104.

MATA, A.T., PROENÇA, C., FERREIRA, A.R., SERRALHEIRO, M.L.M., NOGUEIRA, J.M.F., ARAÚJO, M.E.M. (2007) – Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. Food Chemistry. 103 (2007), 778-786.

MEGDICHE-KSOURI, W., TRABELSI, N., MKADMINI, K., BOURGOU, S., NOUMI, A., SNOUSSI, M., BARBRIA, R., TEBOURBI, O., KSOURI, R. (2015) – *Artemisia campestris* phenolic compounds have antioxidant and antimicrobial activity. Industrial Crops and Products. 63 (2015), 104-113.

MELO, L.V., SAWAYA, A.C.H.F. (2015) – UHPLC-MS quantification of coumarin and chlorogenic acid in extracts of the medicinal plants known as guaco (*Mikania glomerata* and *Mikania laevigata*). Revista Brasileira de Farmacognosia. 25 (2015), 105-110.

MILIAUSKAS, G., VENSKUTONIS, P.R., BEEK, T.A.V. (2004) – Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*. 85 (2004), 231-237.

MILLER, H.E. (1971) – A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 48, 2 (1971), 91-91.

MIRON, T.L, PLAZA, M., BHRIM, G., IBÁÑEZ, E., HERRERO, M. (2011) – Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants. *Journal of Chromatography A*. 1218 (2011), 4918-4927.

MONTI, D., TAMPUCCI, S., CHETONI, P., BURGALASSI, S., SAINO, V., CENTINI, M., STALTARI, L., ANSEMI, C. (2011) – Permeation and Distribution of Ferulic Acid and Its α -Cyclodextrin Complex from Different Formulations in Hairless Rat Skin. *AAPS PharmSciTech*. 12, 2 (2011), 514-520.

MOURE, A., CRUZ, J.M., FRANCO, D., DOMÍNGUEZ, J.M., SINEIRO, J., DOMÍNGUEZ, H., NÚÑEZ, M.J., PARAJÓ, J.C. (2001) – Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 72 (2001), 145-171.

MUANDA, F.N., SOULIMANI, R., DIOP, B., DICKO, A. (2011) – Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Science and Technology*. 44 (2011), 1865-1872.

MUCHUWETI, M., KATIVU, E., MUPURE, C.H., CHIDEWE, C., NDHLALA, A.R., BENHURA, M.A.N. (2007) – Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Some Spices. *American Journal of Food Technology*. 2, 5 (2007), 414-420.

NABAVI, S.M., MARCHESE, A., IZADI, M., CURTI, V., DAGLIA, M., NABAVI, S.F. (2015) – Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food Chemistry*. 173 (2015), 339-347.

NERÍN, C., TOVAR, L., SALAFRANCA, J. (2008) – Behaviour of a new antioxidant active film versus oxidizable model compounds. *Journal of Food Engineering*. 84 (2008), 313-320.

NIĆIFOROVIĆ, N., MIHAILOVIĆ, V., MAŠKOVIĆ, P., SOLUJIĆ, S., STOJKOVIĆ, A., MURATSPAHIĆ, D.P. (2010) – Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*. 48 (2010), 3125–3130.

NICKAVAR, B., ESBATI, N. (2012) – Evaluation of the Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Three *Thymus* Species. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*. 5, 3 (2012), 119-125.

NIKOLIĆ, M., GLAMOČLIJA, J., FERREIRA, I.C.F.R., CALHELHA, R.C., FERNANDES, Â., MARKOVIĆ, T., MARKOVIĆ, D., GIWELI, A., SOKOVIĆ, M. (2014) – Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*. 52 (2014), 183-190.

OBOLSKIY, D., PISCHEL, I., FEISTEL, B., GLOTOV, N., HEINRICH, M. (2011) – *Artemisia dracunculus* L. (Tarragon): A Critical Review of Its Traditional Use, Chemical Composition, Pharmacology, and Safety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59 (2011), 11367-11384.

OZGUNER, F., BARDAK, Y., COMLEKCI, S. (2006) – Protective effects of melatonin and caffeic acid phenethyl ester against retinal oxidative stress in long-term use of mobile phone: A comparative study. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 282 (2006), 83-88.

PANDE, S.S., GUPTA, P. (2013) – Plant tissue culture of *Stevia rebaudiana* (Bertoni): A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*. 5, 1 (2013), 26-33.

PAPAGEORGIYOU, V., MALLOUCHOS, A., KOMAITIS, M. (2008) – Investigation of the Antioxidant Behavior of Air- and Freeze-Dried Aromatic Plant Materials in Relation to Their Phenolic Content and Vegetative Cycle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56 (2008), 5743-5752.

PEREIRA, O.R., PERES, A.M., DOMINGUES, M.R.M., CARDOSO, S.M. (2011) – Perfil fenólico de um extracto de Tomilho limão. In: XXII Encontro Nacional SPQ, 22, Braga. [S.l.]: [s.n.], 2011.

PÉREZ, M.B., CALDERÓN, N.L., CROCI, C.A. (2007) – Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Food Chemistry. 104 (2007), 585-592.

PHANSAWAN, B., POUNGBANGPHO, S. (2007) – Antioxidant Capacities of *Pueraria mirifica*, *Stevia rebaudiana* Bertoni, *Curcuma longa* Linn., *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees. and *Cassia alata* Linn. for the Development of Dietary Supplement. Kasetsart Journal (Natural Science). 41 (2007), 548-554.

PIMENTEL, D., HEPPELY, P., HANSON, J., DOUDS, D., SEIDEL, R. (2005) – Environmental, Energetic, and Economic Comparisons of Organic and Conventional Farming Systems. BioScience. 55, 7 (2005), 573-582.

PROESTOS, C., CHORIANOPOULOS, N., NYCHAS, G.-J.E., KOMAITIS, M. (2005) – RP-HPLC Analysis of the Phenolic Compounds of Plant Extracts. Investigation of Their Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53 (2005), 1190-1195.

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, 6 (2012), 518-529.

RAO, G.N., RAO, P.P., BALASWAMY, K., SATYANARAYANA, A. (2014) – Antioxidant Activity of Stevia (*Stevia rebaudiana* L.) Leaf Powder and A Commercial Stevioside Powder. Journal of Food and Pharmaceutical Sciences. 2 (2014), 32-38.

REALINI, C.E., MARCOS, B. (2014) – Active and intelligent packaging systems for a modern society. Meat Science. 98 (2014), 404-419.

Regulamento (CE) n° 450/2009 da Comissão, de 29 de Maio de 2009 relativo aos materiais e objectos activos e inteligentes destinados a entrar em contacto com os alimentos. Jornal Oficial da União Europeia, L 135, 30 de Maio de 2009. União Europeia.

Regulamento (CE) n.º 889/2008 da Comissão de 5 de Setembro de 2008 que estabelece normas de execução do Regulamento (CE) n.º 834/2007 do Conselho relativo à produção biológica e à rotulagem dos produtos biológicos, no que respeita à produção biológica, à rotulagem e ao controlo. Jornal Oficial da União Europeia, L 250, 18 de Setembro de 2008. União Europeia.

Regulamento (CE) n.º 834/2007 do Conselho, de 28 de Junho de 2007 relativo à produção biológica e à rotulagem dos produtos biológicos e que revoga o Regulamento (CEE) n.º 2092/91. Jornal Oficial da União Europeia, L 189, 20 de Julho de 2007. União Europeia.

Regulamento (CE) n.º 1935/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 27 de Outubro de 2004, relativo aos materiais e objectos destinados a entrar em contacto com os alimentos e que revoga as Directivas 80/590/CEE e 89/109/CEE. Jornal Oficial da União Europeia, L 338, 13 de Novembro de 2004. União Europeia.

Regulamento (UE) n.º 1129/2011 da Comissão, de 11 de Novembro de 2011 que altera o anexo II do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho mediante o estabelecimento de uma lista da União de aditivos alimentares. Jornal Oficial da União Europeia, L 295, 12 de Novembro de 2011. União Europeia.

REIS, A.R.S. (2014) – Estudo de compostos bioactivos e vitaminas de plantas aromáticas e sua aplicação em embalagens alimentares activas. Dissertação apresentada à Universidade de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Biologia Humana e Ambiente. Lisboa (2014).

RIBANI, M., BOTTOLI, C.B.G., COLLINS, C.H., JARDIM, I.C.S.F., MELO, L.F.C. (2004) – Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. Química Nova. 27, 5 (2004), 771-780.

RIVELLI, D.P. (2010) – Biodisponibilidade, distribuição tecidual e atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis* hidrolisado e não hidrolisado. Tese apresentada à Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Doutor em Fármaco e Medicamentos na Área de Insumos Farmacêuticos, São Paulo (2010).

ROBY, M.H.H., SARHAN, M.A., SELIM, K.A.-H., KHALEL, K.I. (2013) – Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*. 43 (2013), 827-831.

ROCKENBACH, I.I. (2008) – Compostos Fenólicos, Ácidos Graxos e Capacidade Antioxidante do Bagaço da Vinificação de Uvas Tintas (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.). Dissertação apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do grau de Mestre em Ciência dos Alimentos. Florianópolis (2008).

RODRÍGUEZ, J., ORTUÑO, C., BENEDITO, J., BON, J. (2013) – Optimization of the antioxidant capacity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) extracts: Management of the drying process. *Industrial Crops and Products*. 46 (2013), 258-263.

ROGINSKY, V., LISSI, E.A. (2005) – Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*. 92 (2005), 235-254.

SALGUEIRO, L., MARTINS, A.P., CORREIA, H. (2010) – Raw materials: the importance of quality and safety. A review. *Flavour and Fragrance Journal*. 25 (2010), 253-271.

SANTOS, R.D. (2009) – Compostos Fenólicos de Ervas *Lamiaceae* na Estabilidade Oxidativa da Manteiga e Avaliação da Toxicidade de Extrato de Alecrim (*Rosemarinus officinalis* L.). Tese apresentada à Universidade Estadual de Londrina para obtenção do grau de Doutor em Ciência de Alimentos. Londrina (2009).

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L., DANTAS, T.B.H. (2012) – Qualidade e novas tecnologias. In: SARANTÓPOULOS, C.I.G.L., REGO, R.A. *Brasil Pack Trends 2020*. 1ª Ed. Campinas: ITAL, 2012. ISBN 978-85-7029-117-2, p. 141-171.

SCHERER, R., LEMOS, M.F., LEMOS, M.F., MARTINELLI, G.C., MARTINS, J.D.L., SILVA, A.G. (2013) – Antioxidant and antibacterial activities and composition of Brazilian spearmint (*Mentha spicata* L.). *Industrial Crops and Products*. 50 (2013), 408-413.

SEDIGHI, R., ZHAO, Y., YERKE, A., SANG, S. (2015) – Preventive and protective properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in obesity and diabetes mellitus of metabolic disorders: a brief review. *Current Opinion in Food Science*. 2 (2015), 58-70.

SHAN, B., CAI, Y.Z., SUN, M., CORKE, H. (2005) – Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (2005), 7749-7759.

SHIVANNA, N., NAIKA, M., KHANUM, F., KAUL, V.K. (2013) – Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Diabetes and Its Complications*. 27 (2013), 103-113.

SHUKLA, S., MEHTA, A., BAJPAI, V.K., SHUKLA, S. (2009) – *In vitro* antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Food and Chemical Toxicology*. 47 (2009), 2338-2343.

SHUKLA, S., MEHTA, A., MEHTA, P., BAJPAI, V.K. (2012) – Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 64 (2012), 807-811.

SKOTTI, E., ANASTASAKI, E., KANELLOU, G., POLISSIOU, M., TARANTILIS, P.A. (2014) – Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*. 53 (2014), 46-54.

SOONG, Y.-Y., BARLOW, P.J. (2006) – Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. *Food Chemistry*. 97 (2006), 524-530.

SOUSA, C.M.M., SILVA, H.R., VIEIRA-JR., G.M., AYRES, M.C.C., COSTA, C.L.S., ARAÚJO, D.S., CAVALCANTE, L.C.D., BARROS, E.D.S., ARAÚJO, P.B.M., BRANDÃO, M.S., CHAVES, M.H. (2007) – Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. *Química Nova*. 30, 2 (2007), 351-355.

SOUZA, E.L., STAMFORD, T.L.M., LIMA, E.O., TRAJANO, V.N. (2007) – Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control*. 18 (2007), 409–413.

SPÁČIL, Z., NOVÁKOVÁ, L., SOLICH, P. (2008) – Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography. *Talanta*. 76 (2008), 189-199.

SRINIVASAN, M., SUDHEER, A.R., MENON, V.P. (2007) – Ferulic Acid: Therapeutic Potential Through Its Antioxidant Property. *Journal of Clinical Biochemistry*. 40 (2007), 92-100.

SROKA, Z., FECKA, I., CISOWSKI, W. (2005) – Antiradical and Anti-H₂O₂ Properties of Polyphenolic Compounds from an Aqueous Peppermint Extract. *Journal for Nature Research*. 60c (2005), 826-832.

SUH, S.-S., HWANG, J., PARK, M., PARK, H.-S., LEE, T.-K. (2014) – Phenol content, antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mangrove plants in Micronesia. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. (2014), 531-535.

SUTRADHAR, S., PREETI, U., HUMERA, A., MUNEEM, A.M. (2013) – Comparative study of Antioxidant Activity of Methanolic and Ethanolic Extracts of *Stevia rebaudiana* Leaves. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 4, 2 (2013), 674-679.

TADHANI, M.B., PATEL, V.H., SUBHASH, R. (2007) – *In vitro* antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis*. 20 (2007), 323-329.

TAVERNIERS, I., LOOSE, M., BOCKSTAELE, E.V. (2004) – Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*. 23, 8 (2004), 535-552.

TERPINC, P., BEZJAK, M., ABRAMOVIČ, H. (2009) – A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. *Food Chemistry*. 115 (2009), 740-744.

TERUEL, M.R., GARRIDO, M.D., ESPINOSA, M.C., LINARES, M.B. (2015) – Effect of different format-solvent rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis*) on frozen chicken nuggets quality. *Food Chemistry*. 172 (2015), 40-46.

THIYAGARAJAN, M., VENKATACHALAM, P. (2012) – Large scale *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (bert) for commercial application: Pharmaceutically important and antidiabetic medicinal herb. *Industrial Crops and Products*. 37 (2012), 111-117.

TISTAERT, C., DEJAEGER, B., HEYDEN, Y.V. (2011) – Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review. *Analytica Chimica Acta*. 690 (2011), 148-161.

TOMEI, R.R., SALVADOR, M.J. (2007) – Metodologias Analíticas Atuais para Avaliação da Atividade Antioxidante de Produtos Naturais. In: XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação. Urbanova, São José dos Campos. [S.l.]: [s.n.], 2007.

TRZCIŃSKA M., SIELIWANOWICZ, B., HAŁASINSKA, A.G., CZUPRYŃSKI, B. (2007) – Application of Physicochemically Modified Polymeric Foil to Develop Antioxidant Packaging. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 57, 2 (2007), 173-176.

TSAI, P.-J., TSAI, T.-H., HO, S.-C. (2007) – *In vitro* inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. *Food Chemistry*. 105 (2007), 311-316.

URBANČIČ, S., KOLAR, M.H., DIMITRIJEVIČ, D., DEMŠAR, L., VIDRIH, R. (2014) – Stabilisation of sunflower oil and reduction of acrylamide formation of potato with rosemary extract during deep-fat frying. *LWT - Food Science and Technology*. 57 (2014), 671-678.

U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service (2015) - USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 27. Nutrient Data Laboratory. [Acedido a 15 de Agosto de 2015]. Disponível na Internet: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/256>.

WANG, H., PROVAN, G.J., HELLIWELL, K. (2004) – Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chemistry*. 87 (2004), 307-311.

WANI, A.A., SINGH, P., LANGOWSKI, H.-C. (2014) – Food Technologies: Packaging. *Encyclopedia of Food Safety*. 3 (2014), 211-218.

WOJDYŁO, A., OSZMIAŃSKI, J., CZEMERYS, R. (2007) – Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*. 105 (2007), 940-949.

YADAV, A.K., SINGH, S., DHYANI, D., AHUJA, P.S. (2011) – A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *The Canadian Journal of Plant Science*. 91 (2011), 1-27.

YANISHLIEVA, N.V., MARINOVA, E., POKORNÝ, J. (2006) – Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 108 (2006), 776-793.

YODA, S.K., MARQUES, M.O.M., PETENATE, A.J., MEIRELES, M.A.A. (2003) – Supercritical fluid extraction from *Stevia rebaudiana* Bertoni using CO₂ and CO₂ + water: extraction kinetics and identification of extracted components. *Journal of Food Engineering*. 57 (2003), 125–134.

YOO, K.M., LEE, C.H., LEE, H., MOON, B., LEE, C.Y. (2008) – Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry*. 106 (2008), 929-936.

ZAOUALI, Y., BOUZAINÉ, T., BOUSSAÏD, M. (2010) – Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology*. 48 (2010), 3144-3152.

ZENG, J., CAI, W., YANG, W., WU, W. (2013) – Antioxidant Abilities, Phenolics and Flavonoids Contents in the Ethanolic Extracts of the Stems and Leaves of Different *Stevia rebaudiana* Bert Lines. *Sugar Tech*. 15, 2 (2013), 209-213.

ZHANG, H., CHEN, F., WANG, X., YAO, H.-Y. (2006) – Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. *Food Research International*. 39 (2006), 833–839.

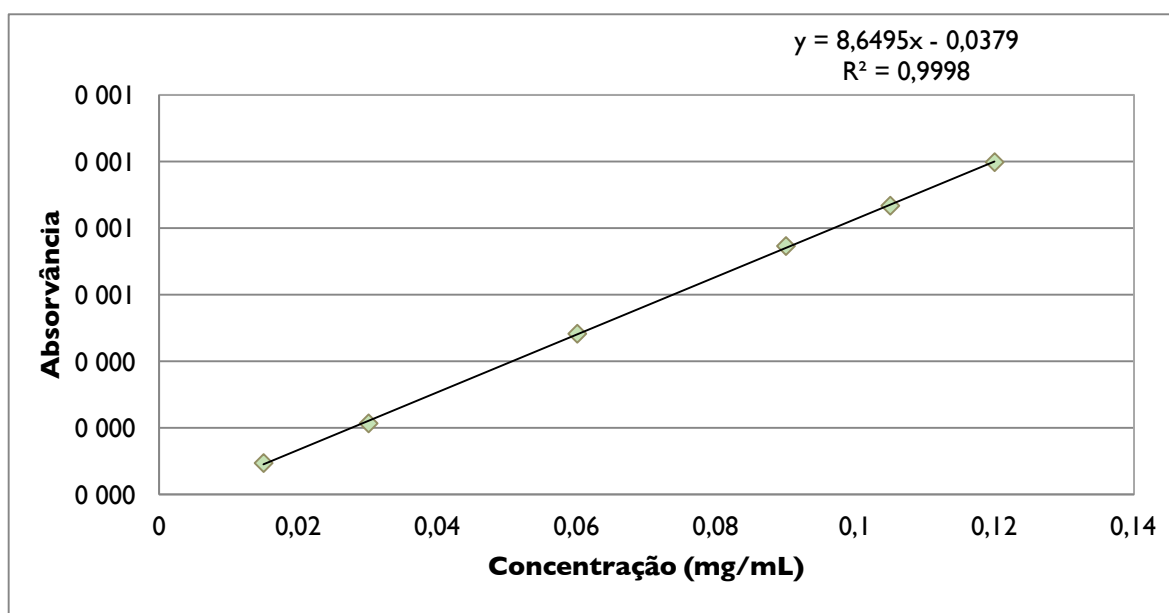
ZHAO, B., HU, M. (2013) – Gallic acid reduces cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human cervical cancer cells. *Oncology Letters*. 6 (2013), 1749-1755.

ZHENG, W., WANG, S.Y. (2001) – Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49 (2001), 5165-5170.

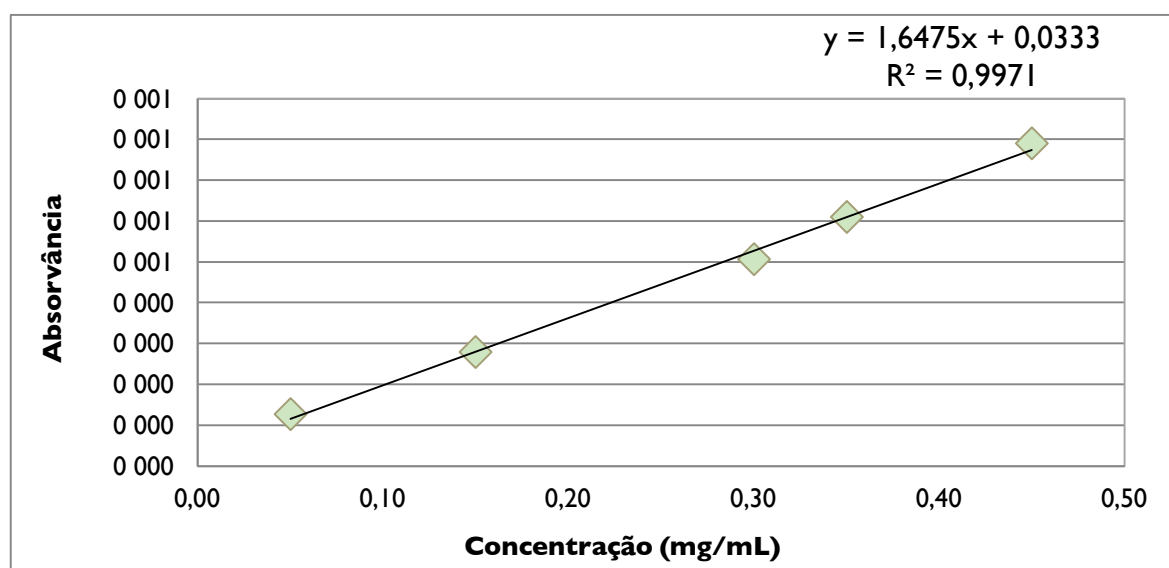
8 ANEXOS

Anexo I: Curvas de Calibração dos Padrões

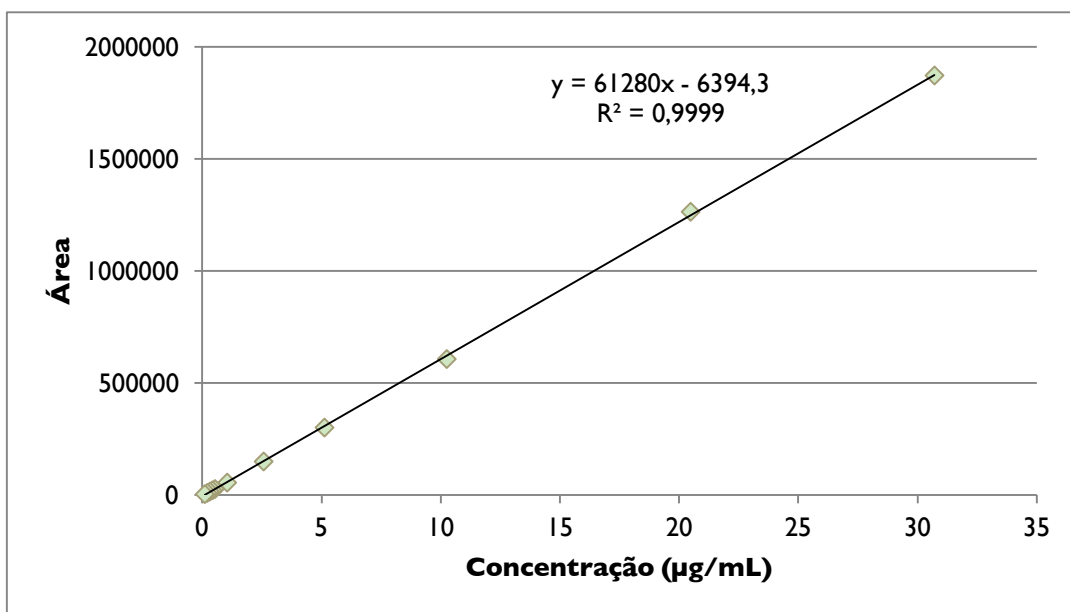
Fenólicos Totais



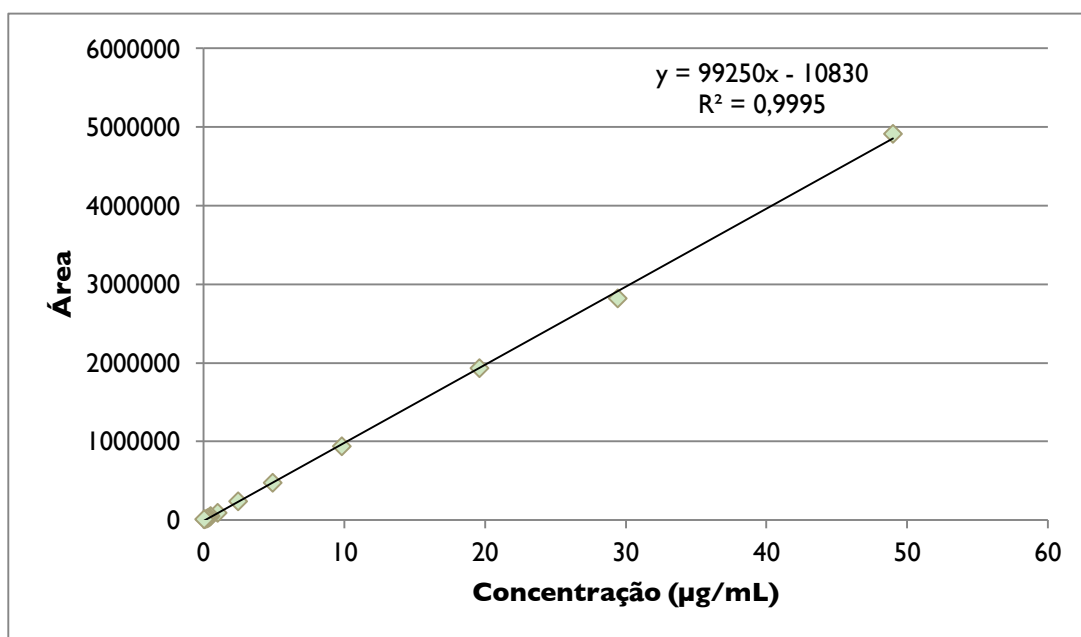
Flavonóides Totais



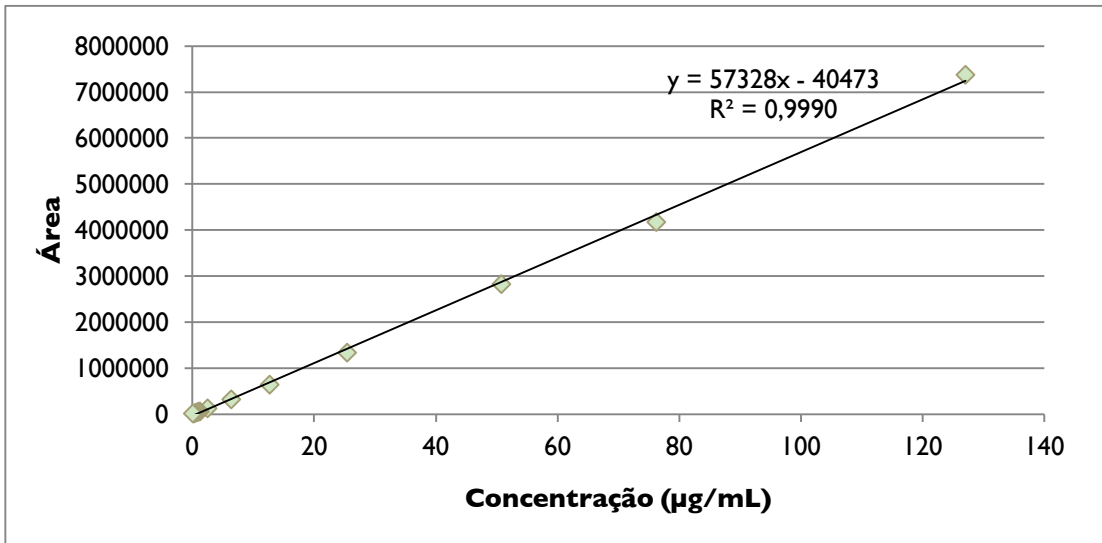
Ácido Gálico



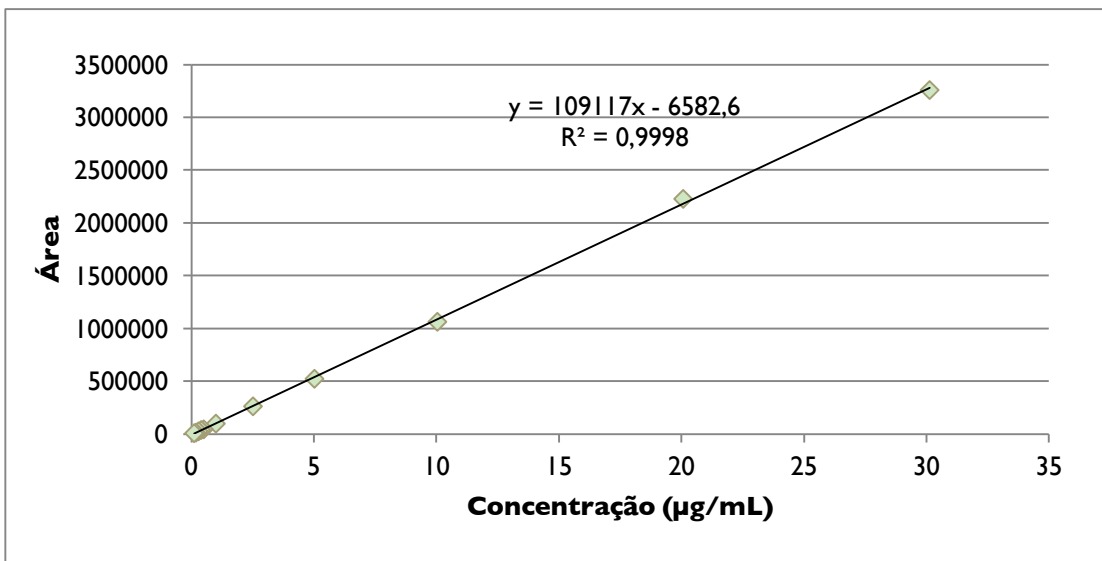
Ácido protocatecuico



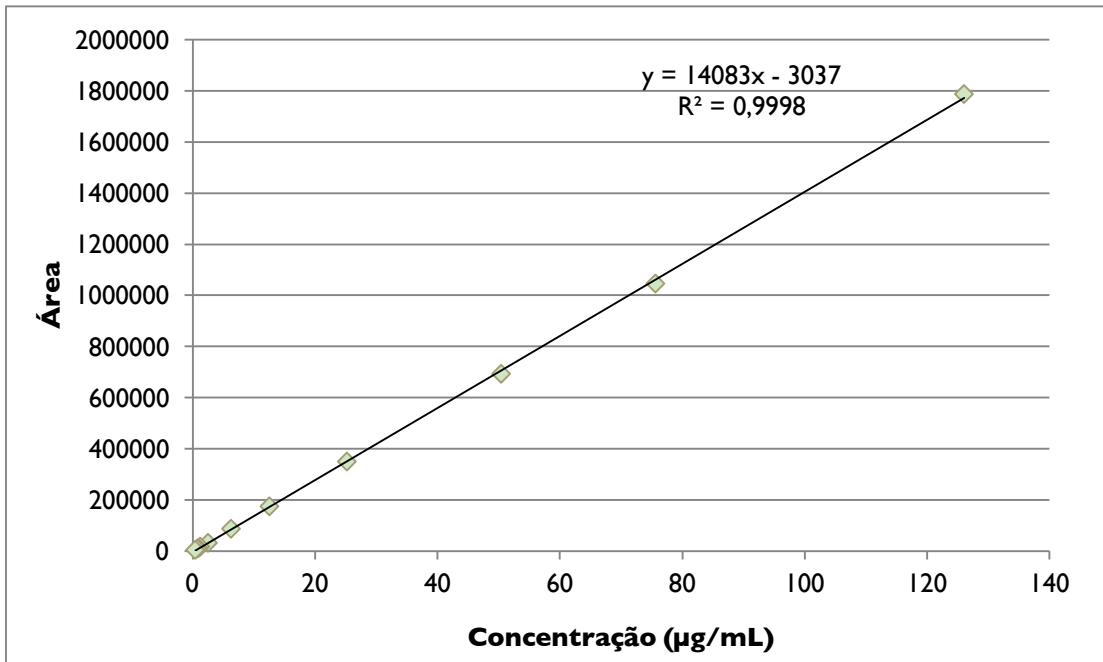
Ácido clorogénico



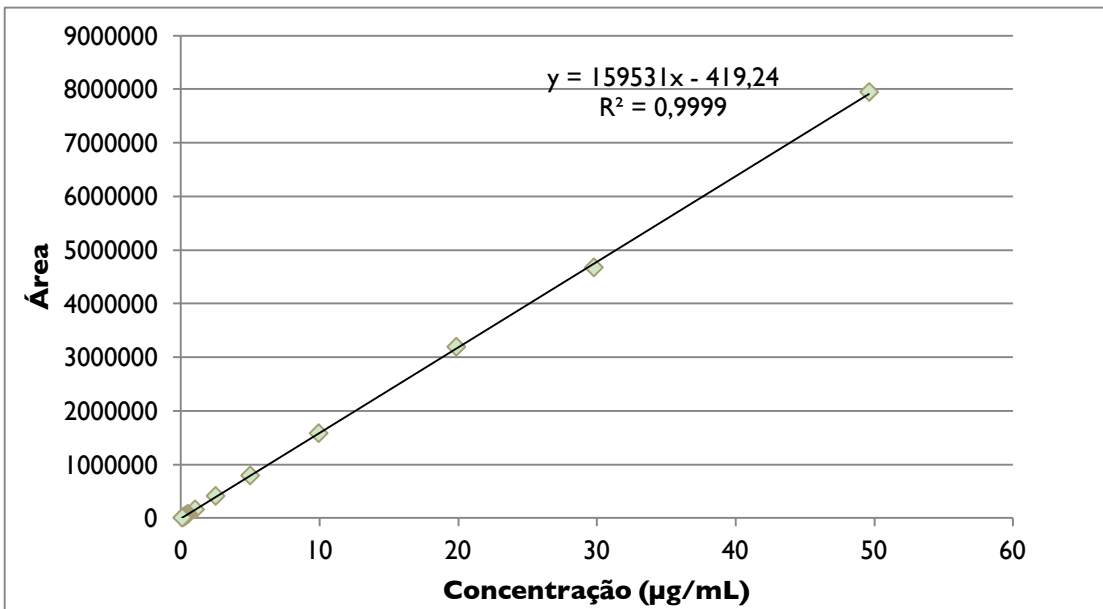
Ácido cafeico



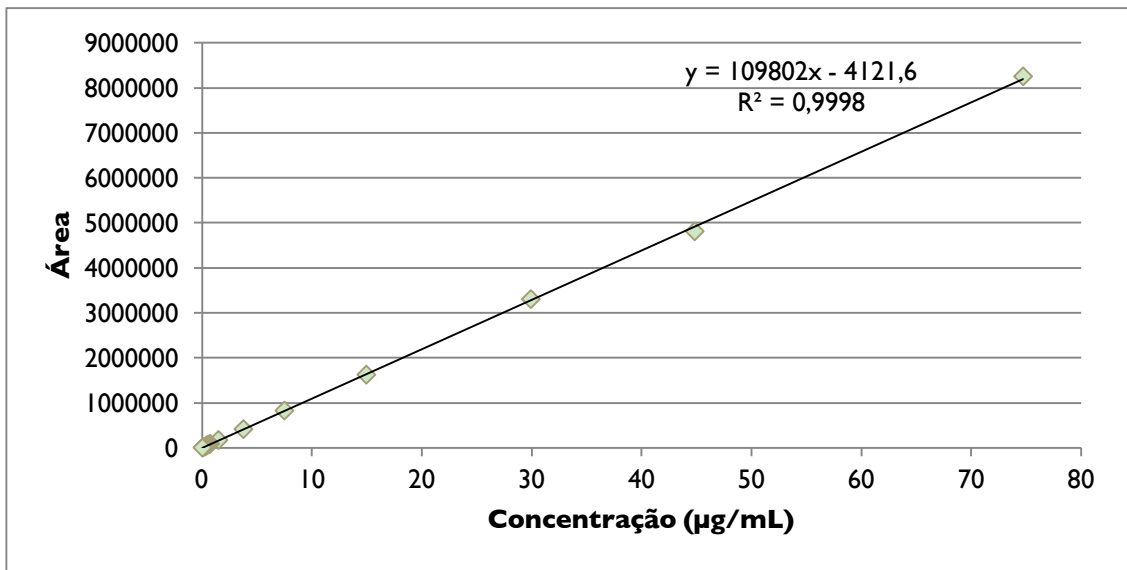
Epicatequina



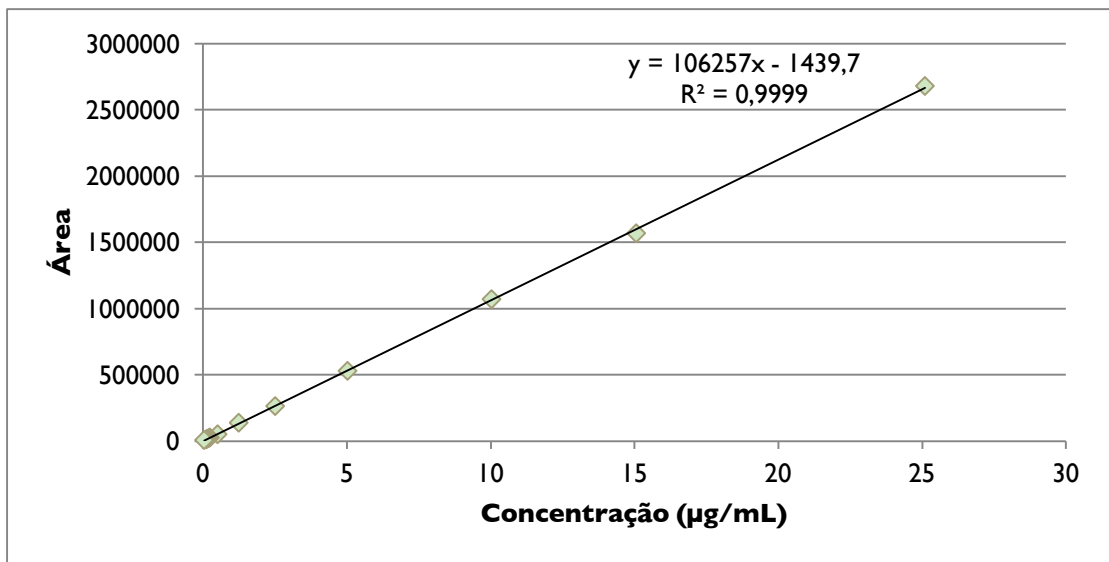
Ácido p-cumárico



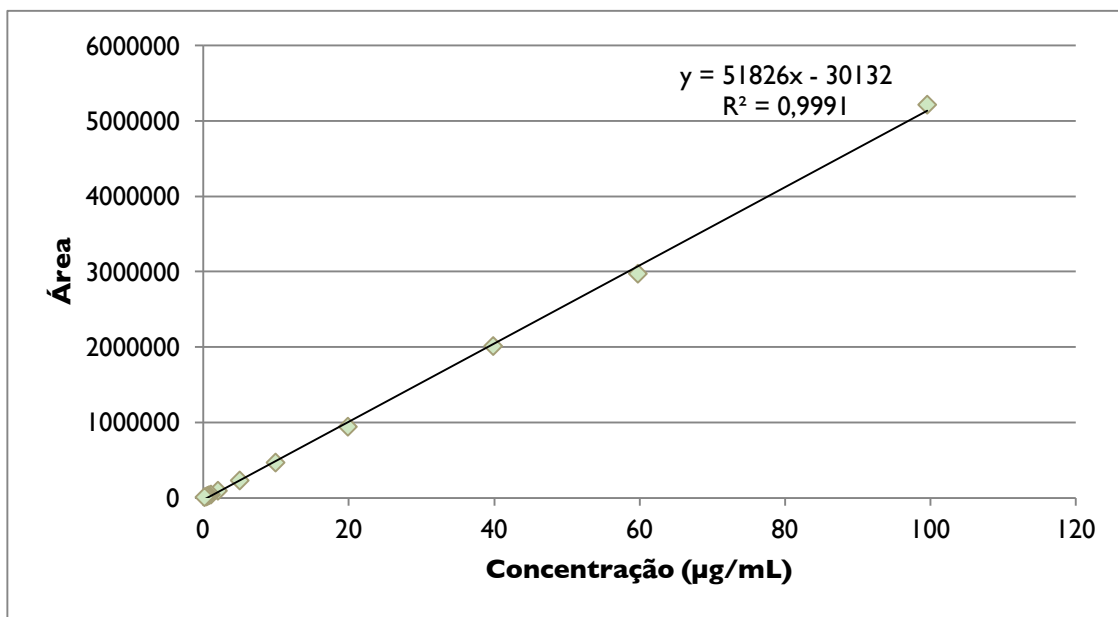
Ácido ferúlico



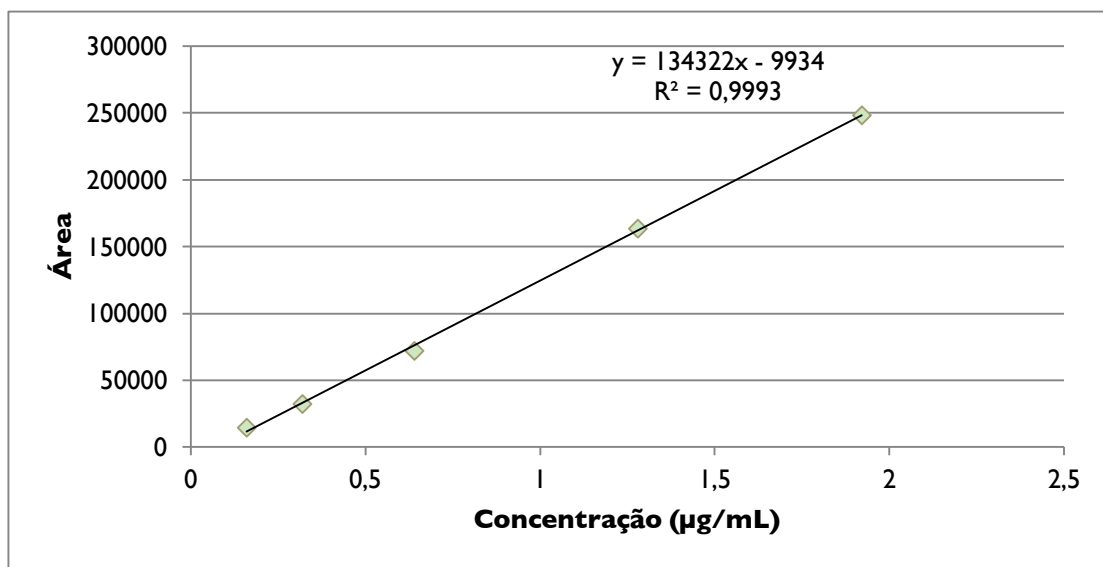
Ácido 2-hidroxicinâmico



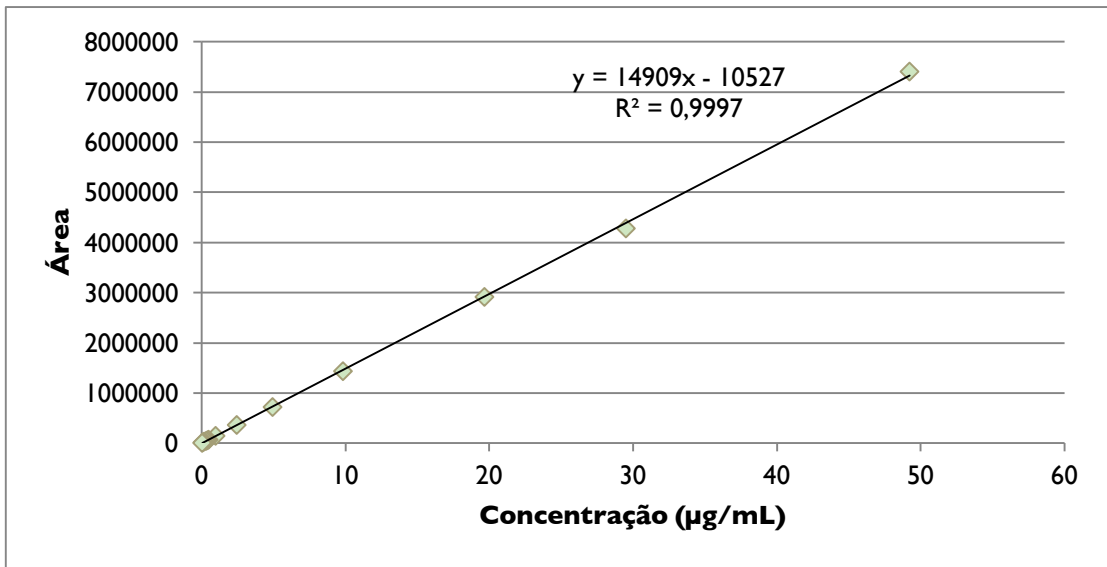
Ácido rosmarínico



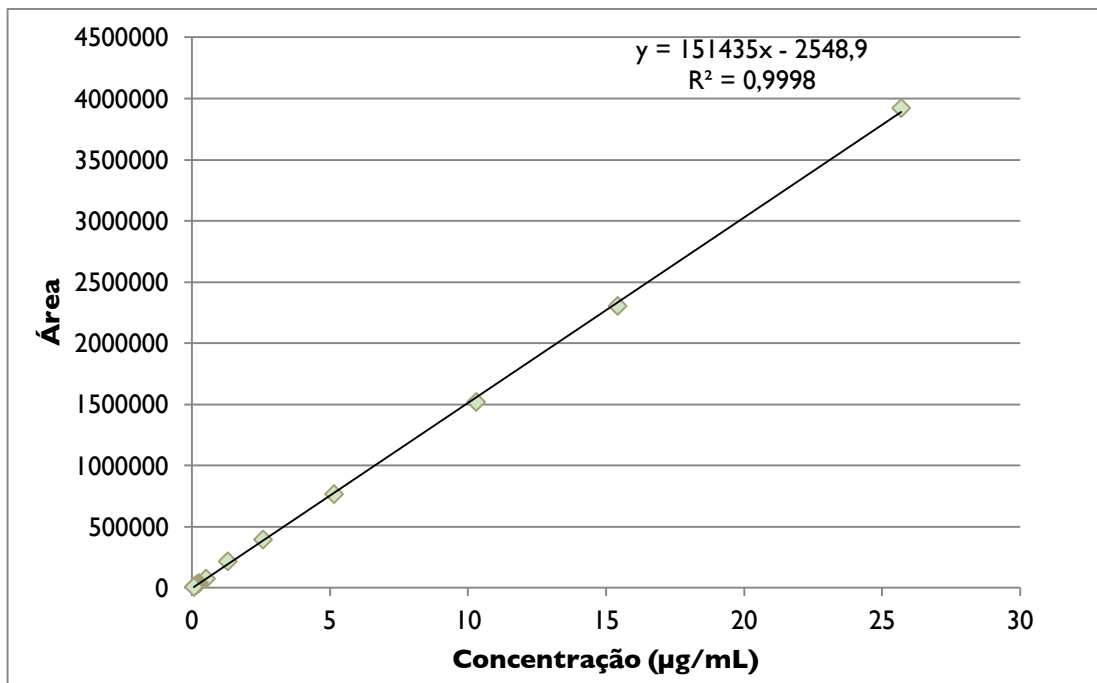
Miricetina



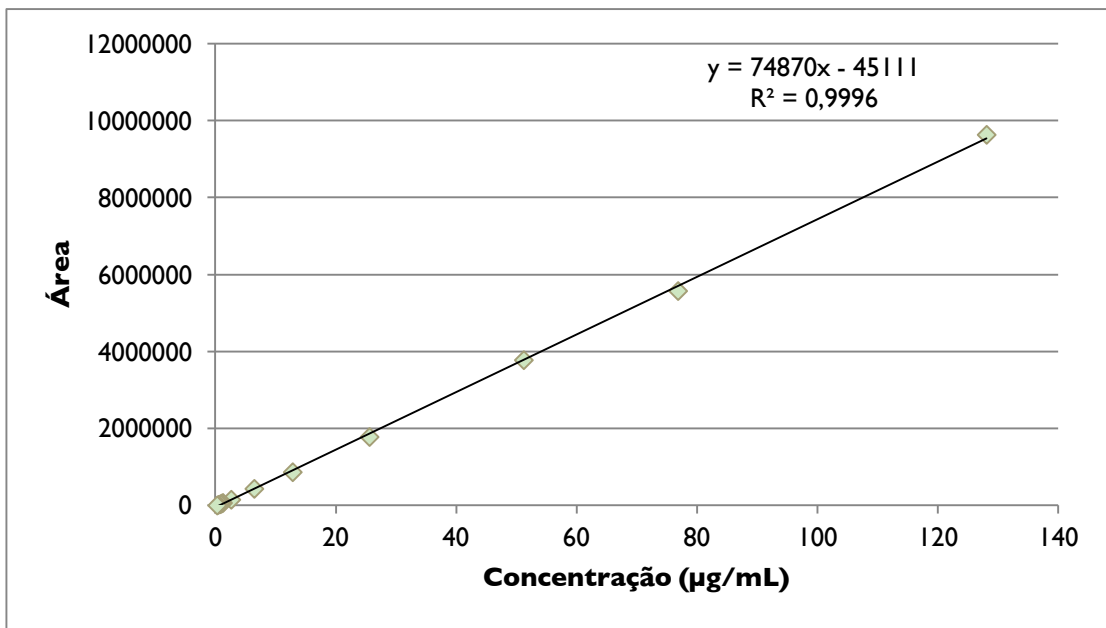
Resveratrol



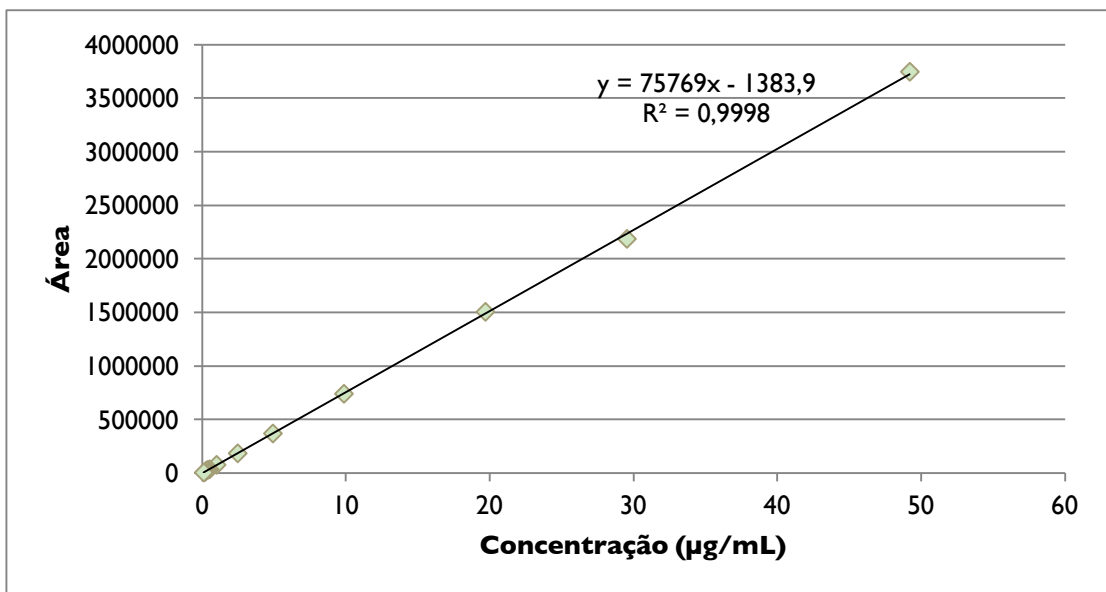
Ácido *trans*-hidroxicinâmico



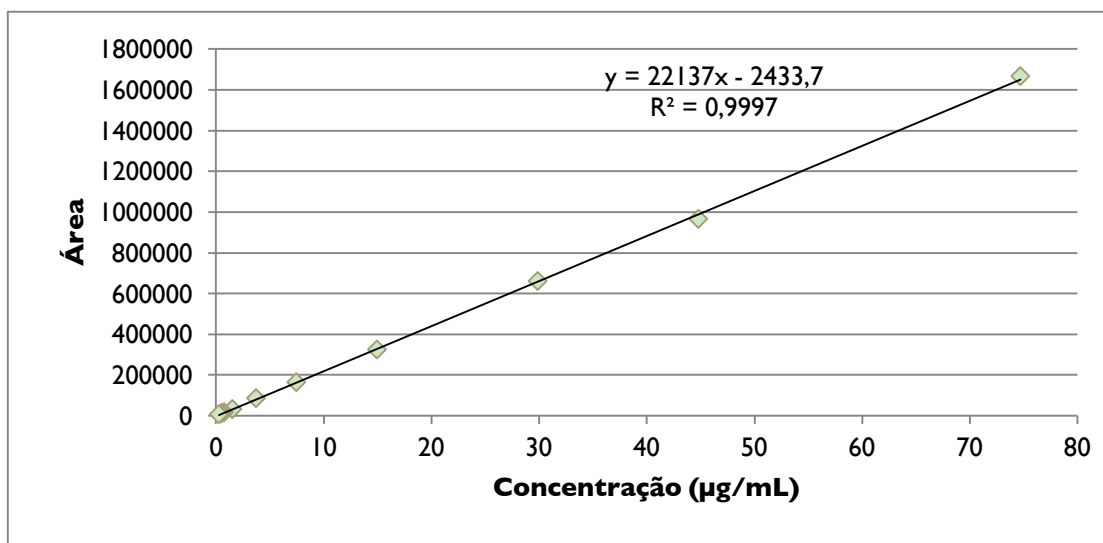
Quercetina



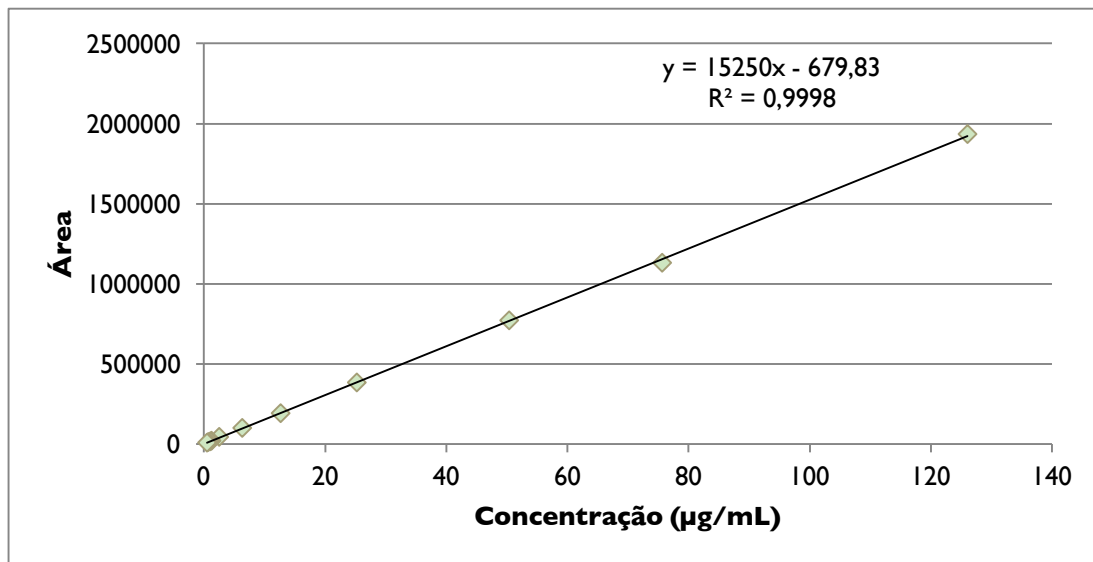
Hesperetina



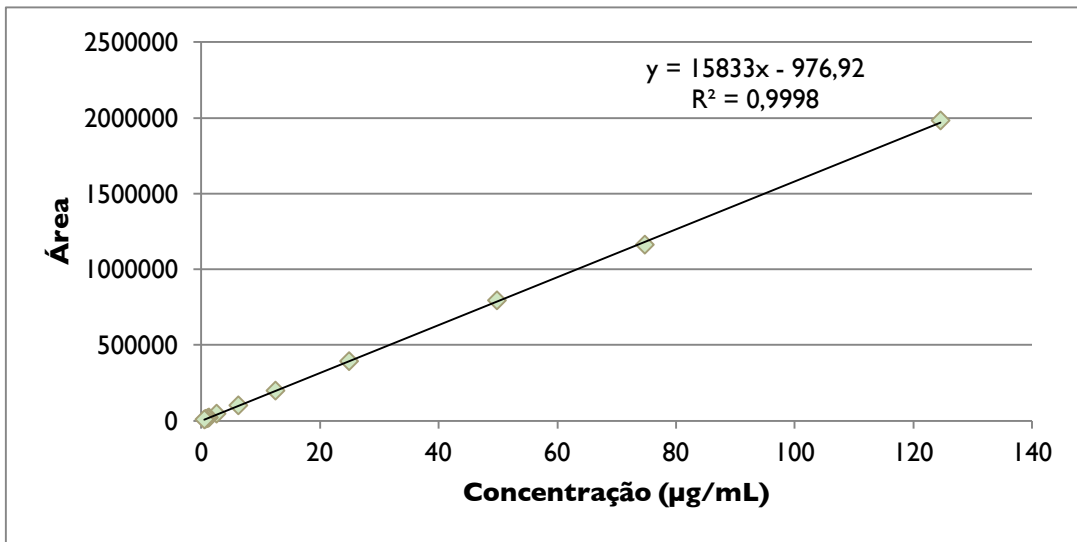
Eugenol



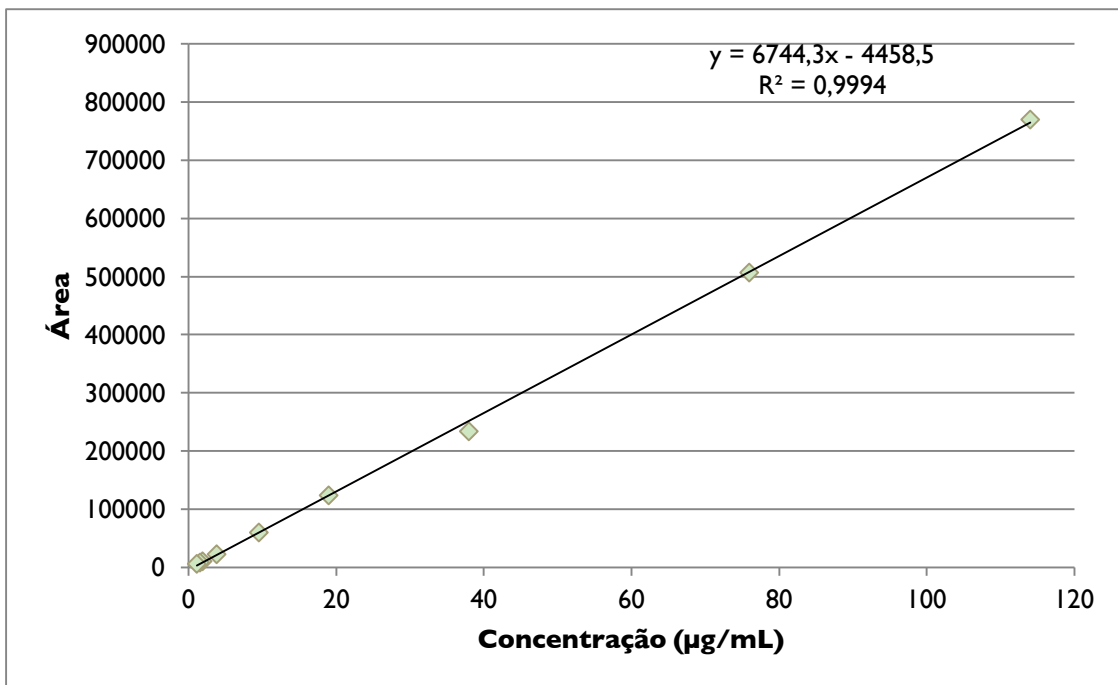
Carvacrol



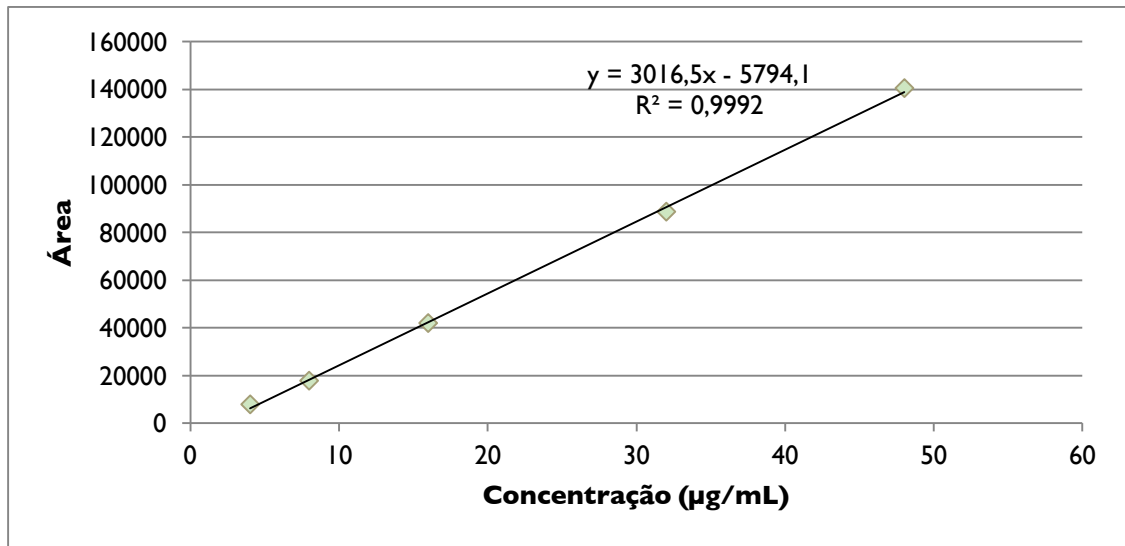
Timol



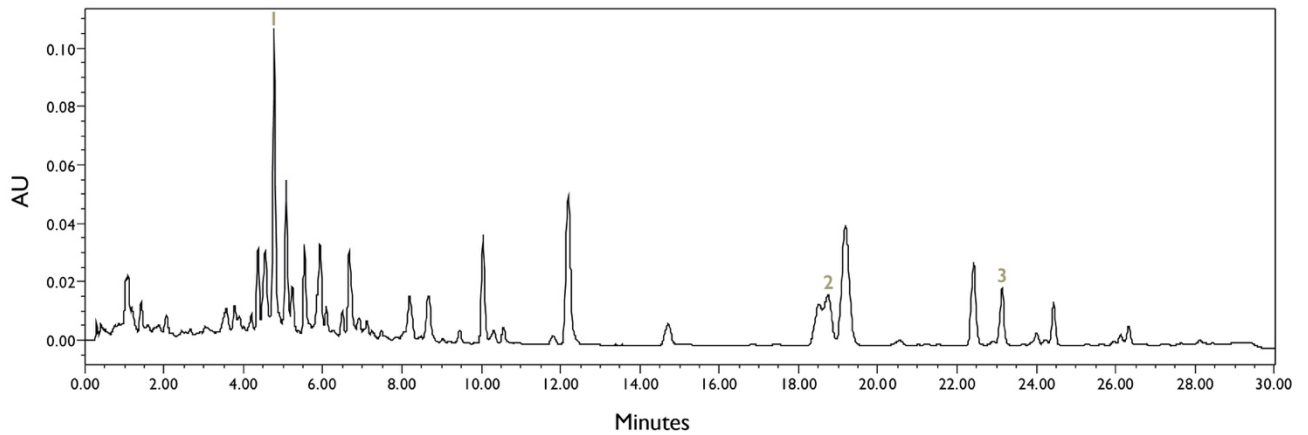
Carnosol



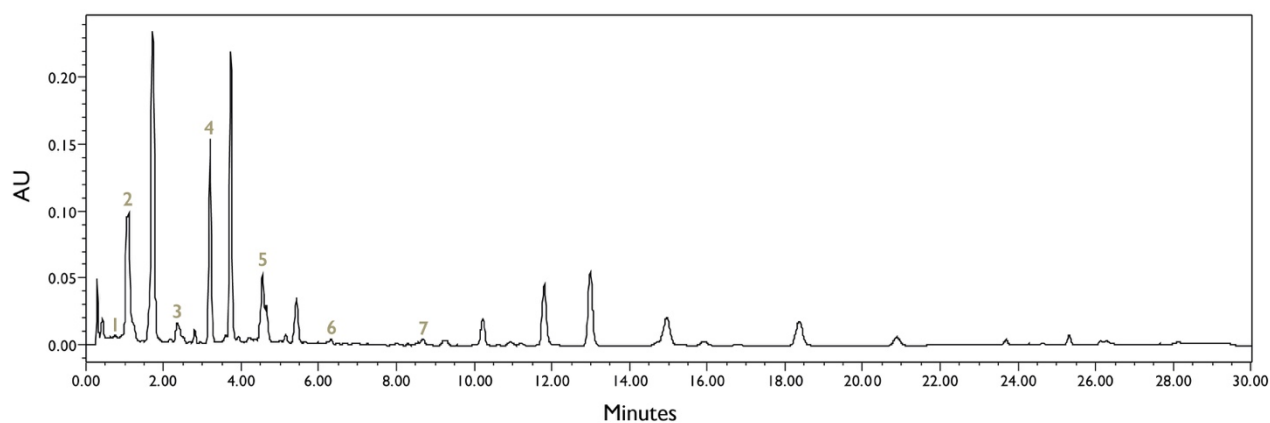
Ácido carnósico



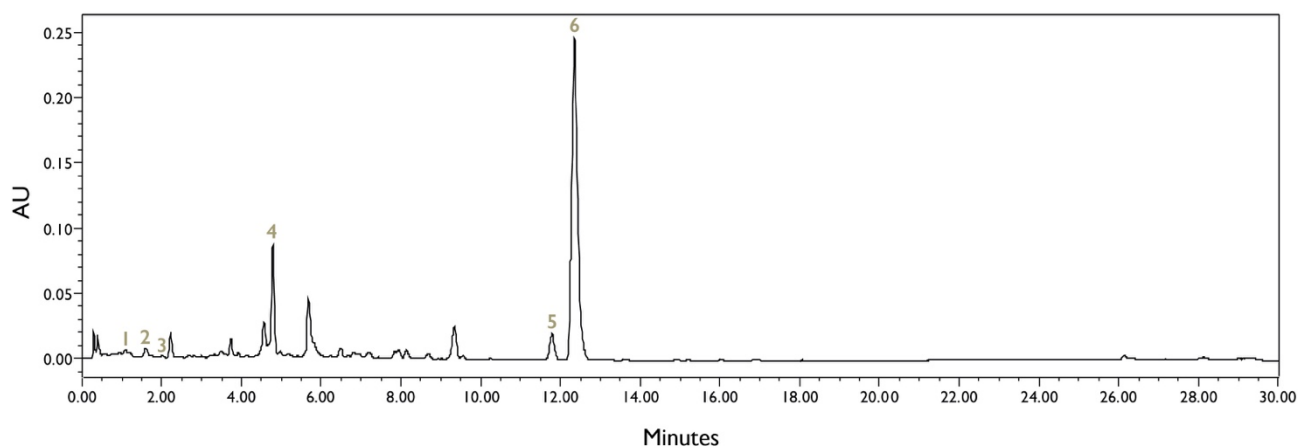
Anexo 2: Cromatogramas



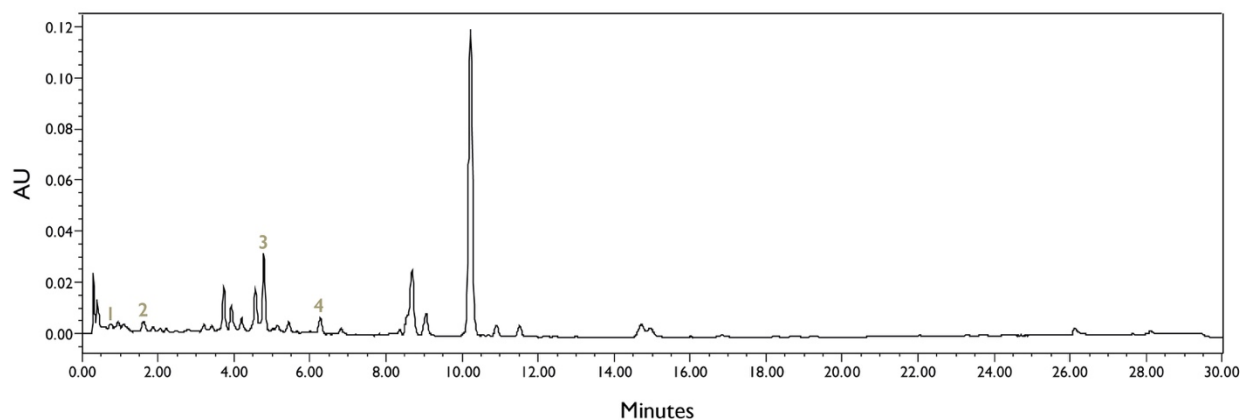
Cromatograma dos compostos fenólicos presentes no alecrim seco a $\lambda = 270\text{nm}$: (1) Ácido rosmarínico; (2) Carnosol; (3) Ácido carnósico.



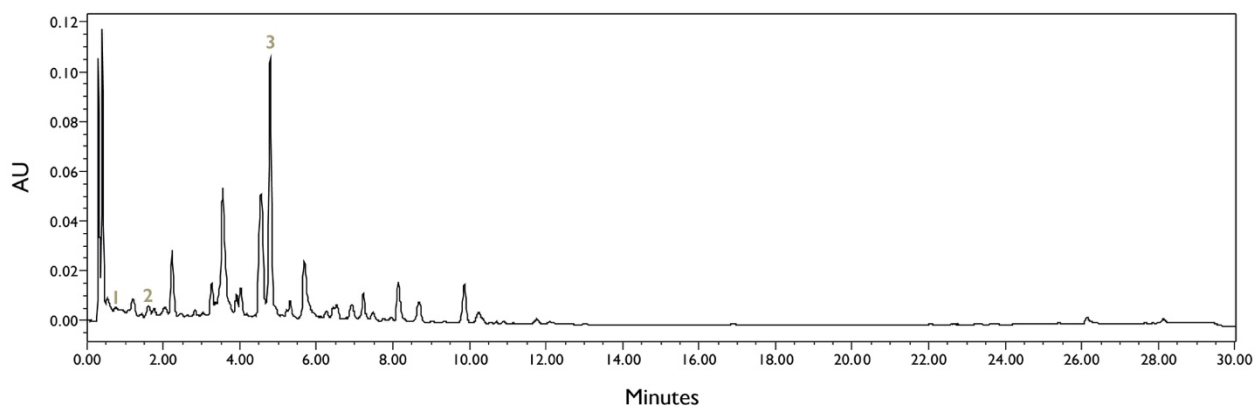
Cromatograma dos compostos fenólicos presentes no estragão seco a $\lambda = 270\text{nm}$: (1) Ácido protocatecuico; (2) Ácido clorogénico; (3) Ácido *p*-cumárico; (4) Ácido ferúlico; (5) Ácido rosmarínico; (6) Ácido *trans*-hidroxicinâmico; (7) Eugenol.



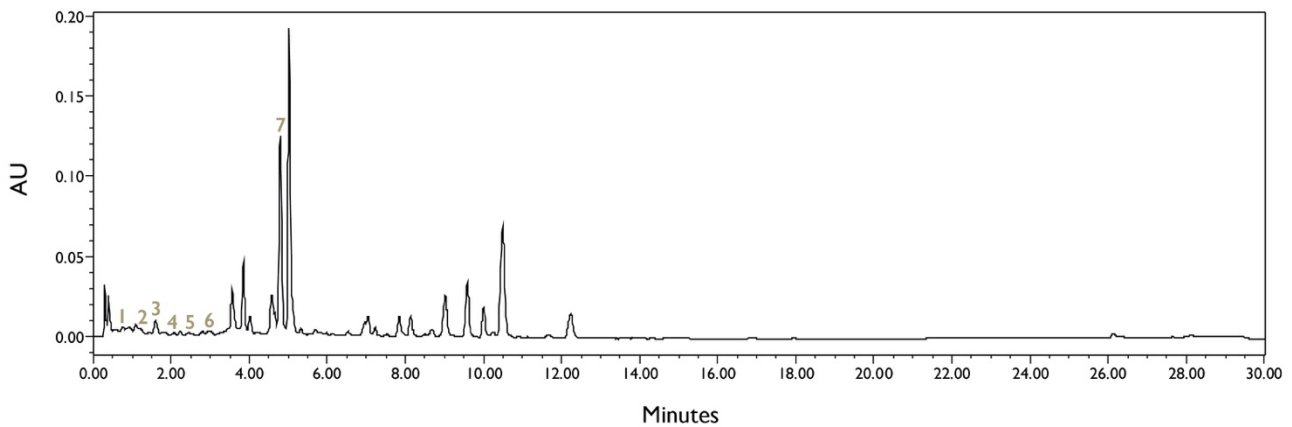
Cromatograma dos compostos fenólicos presentes no orégão seco a $\lambda = 270\text{nm}$: (1) Ácido clorogénico; (2) Ácido cafeico; (3) Epicatequina; (4) Ácido rosmarínico; (5) Carvacrol; (6) Timol.



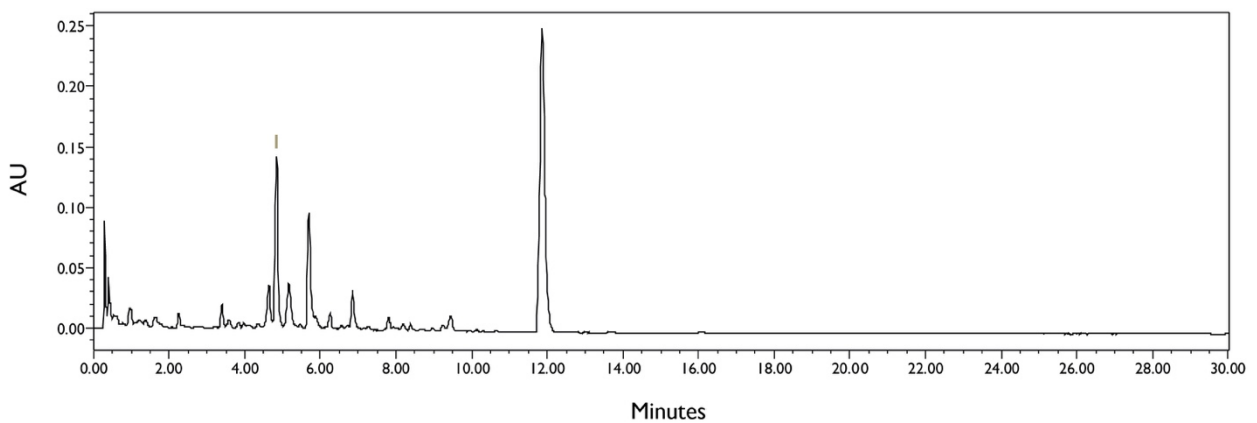
Cromatograma dos compostos fenólicos presentes no manjericão seco a $\lambda=270\text{nm}$: (1) Ácido protocatecuico; (2) Ácido cafeico; (3) Ácido rosmarínico; (4) Ácido *trans*-hidroxicinâmico.



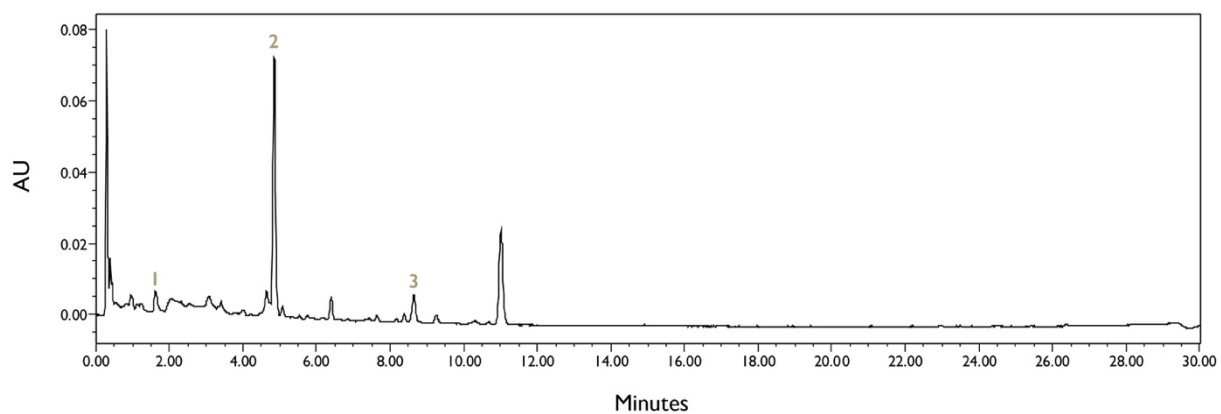
Cromatograma dos compostos fenólicos presentes na manjerona seca a $\lambda=270\text{nm}$: (1) Ácido protocatecuico; (2) Ácido cafeico; (3) Ácido rosmarínico.



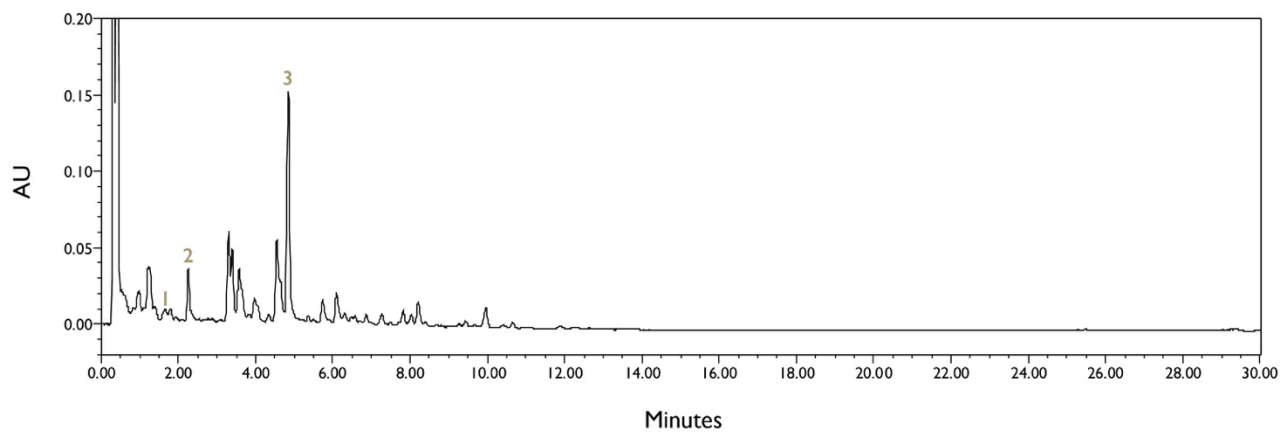
Cromatograma dos compostos fenólicos presentes na hortelã seca a $\lambda = 270\text{nm}$: (1) Ácido protocatecuico; (2) Ácido clorogénico; (3) Ácido cafeico; (4) Epicatequina; (5) Ácido *p*-cumárico; (6) Ácido ferúlico; (7) Ácido rosmarínico.



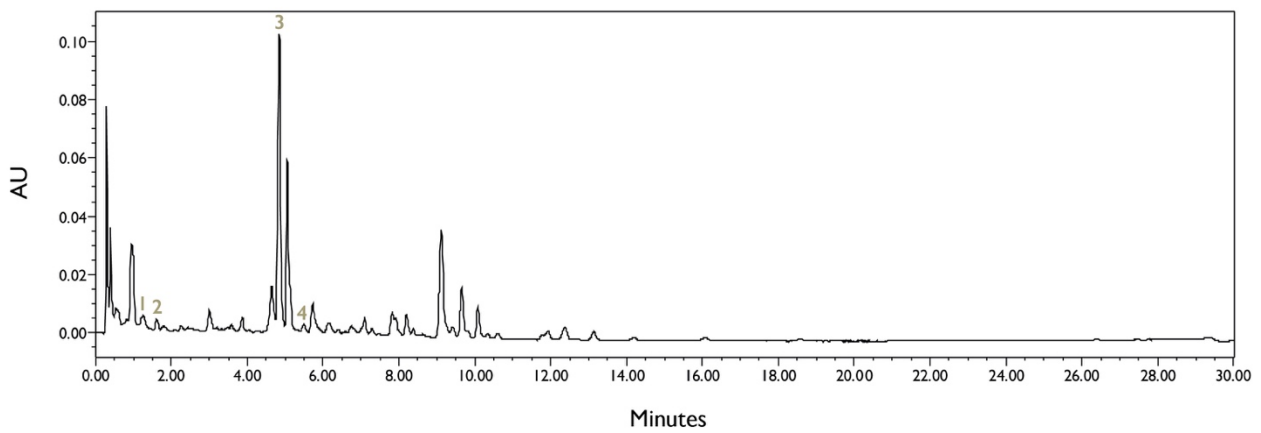
Cromatograma dos compostos fenólicos presentes no orégão fresco a $\lambda = 270\text{nm}$: (1) Ácido rosmarínico.



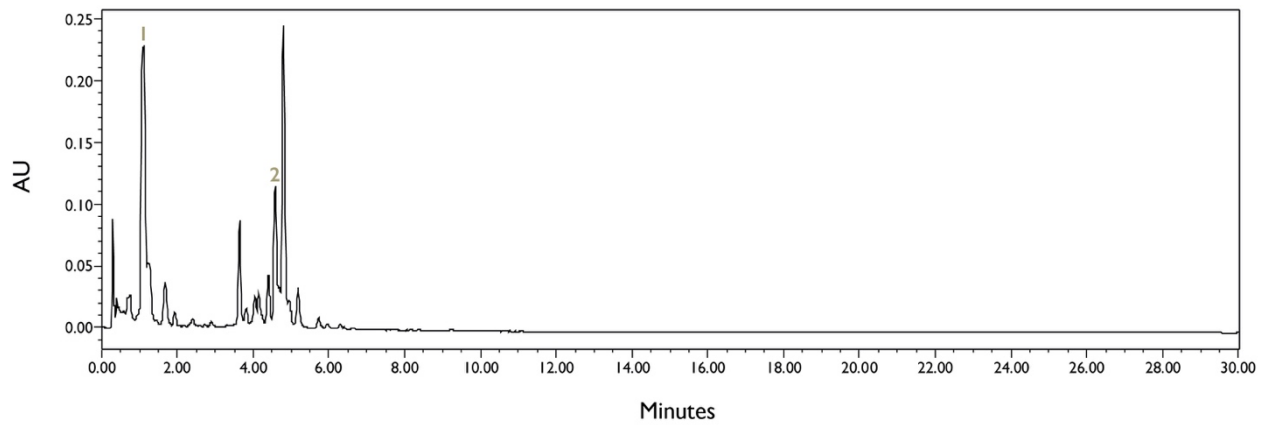
Cromatograma dos compostos fenólicos presentes no manjerição fresco a $\lambda = 270\text{nm}$: (1) Ácido cafeico; (2) Ácido rosmarínico; (3) Eugenol.



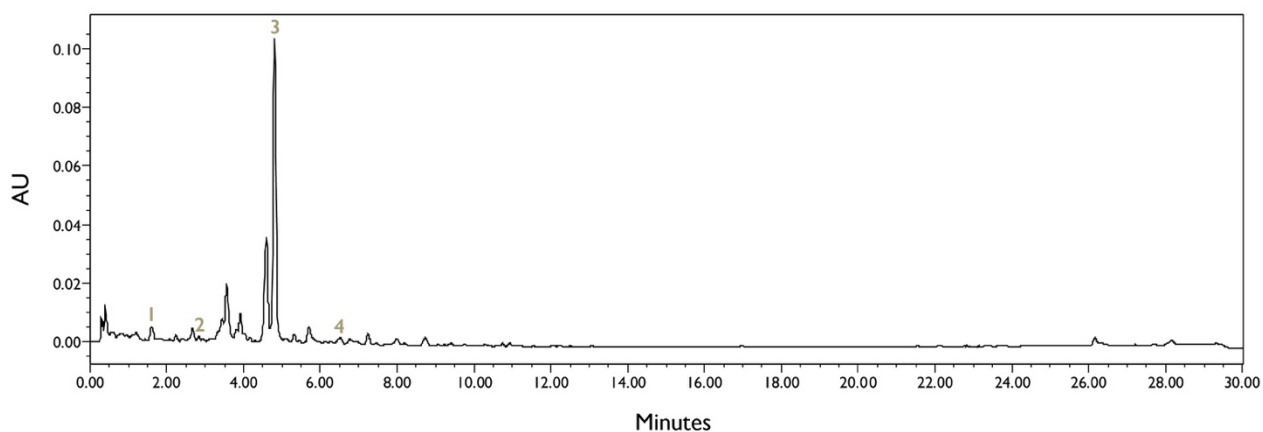
Cromatograma dos compostos fenólicos presentes na manjerona fresca a $\lambda = 270\text{nm}$: (1) Ácido cafeico; (2) Ácido *p*-cumárico; (3) Ácido rosmarínico.



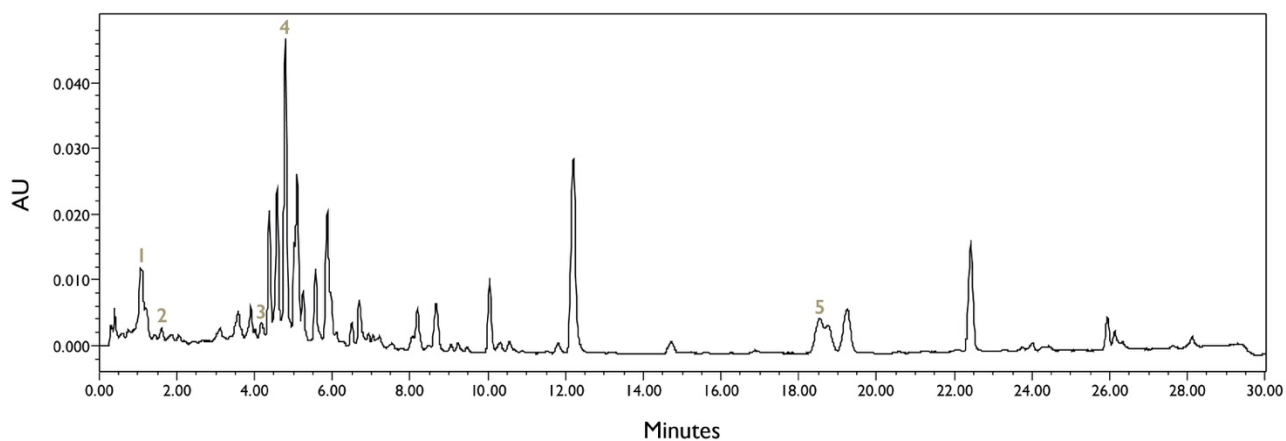
Cromatograma dos compostos fenólicos presentes no tomilho-limão orgânico a $\lambda=270\text{nm}$: (1) Ácido cafeico; (2) Ácido ferúlico; (3) Ácido rosmarínico; (4) Ácido *trans*-hidroxicinâmico.



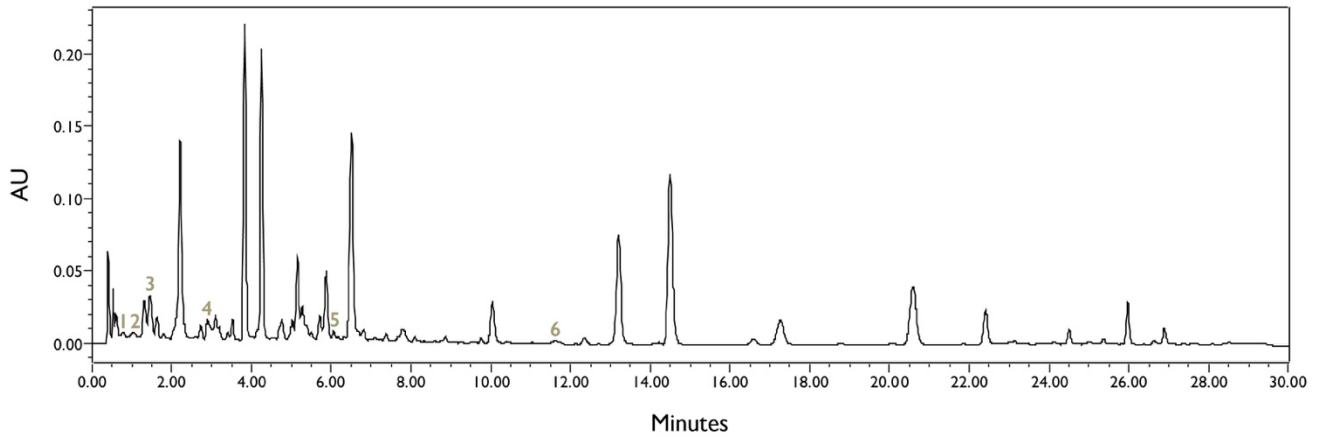
Cromatograma dos compostos fenólicos presentes na stevia fresca a $\lambda = 270\text{nm}$: (1) Ácido clorogénico; (2) Ácido rosmarínico.



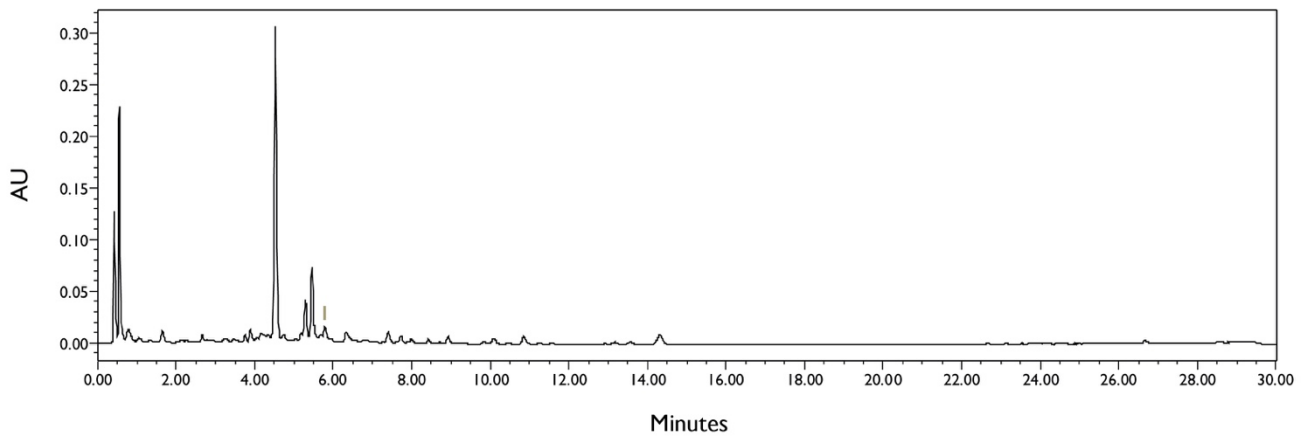
Cromatograma dos compostos fenólicos presentes na hortelã fresca a $\lambda = 270\text{nm}$: (1) Ácido clorogênico; (2) Ácido cafeico; (3) Ácido rosmarínico; (4) Resveratrol.



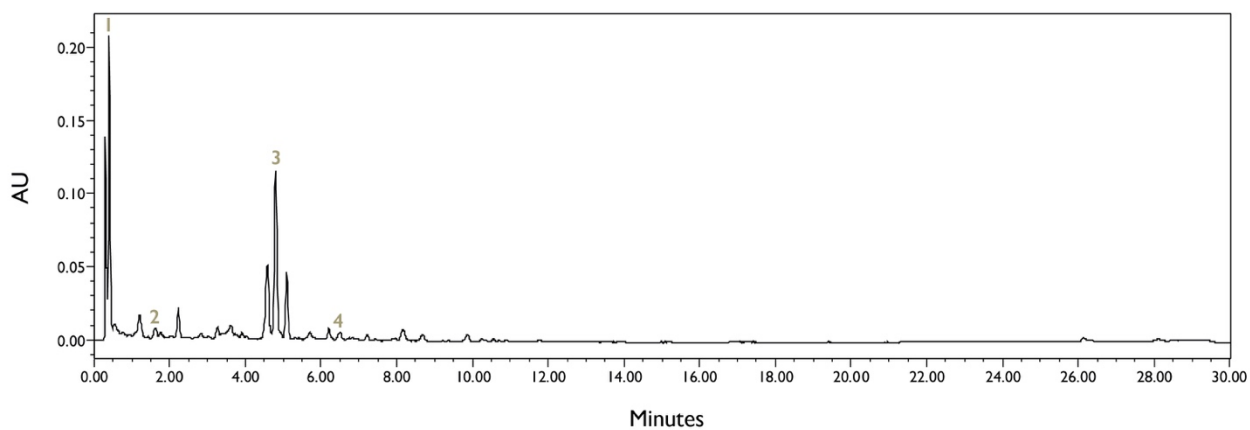
Cromatograma dos compostos fenólicos presentes no alecrim orgânico a $\lambda = 270\text{nm}$: (1) Ácido clorogênico; (2) Ácido cafeico; (3) Ácido 2-hidroxicinâmico; (4) Ácido rosmarínico; (5) Carnosol.



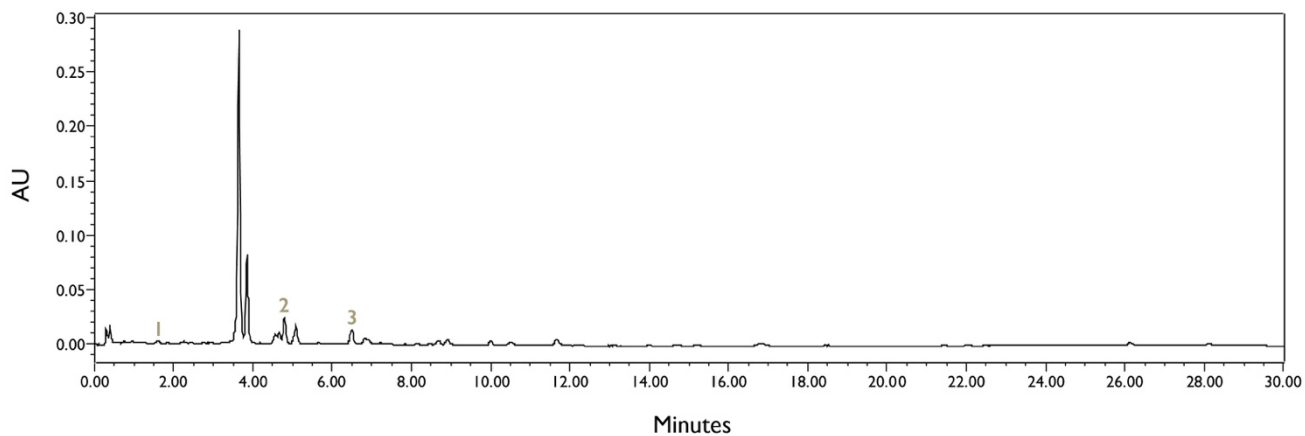
Cromatograma dos compostos fenólicos presentes no estragão orgânico a $\lambda = 270\text{nm}$: (1) Ácido protocatecuico; (2) Ácido clorogénico; (3) Ácido cafeico; (4) Ácido ferúlico; (5) Resveratrol; (6) Carvacrol.



Cromatograma dos compostos fenólicos presentes no orégão orgânico a $\lambda = 270\text{nm}$: (1) Resveratrol.



Cromatograma dos compostos fenólicos presentes na manjerona orgânica a $\lambda = 270\text{nm}$: (1) Ácido gálico; (2) Ácido cafeico; (3) Ácido rosmarínico; (4) Ácido *trans*-hidroxicinâmico.



Cromatograma dos compostos fenólicos presentes na hortelã-pimenta orgânica a $\lambda = 270\text{nm}$: (1) Ácido cafeico; (2) Ácido rosmarínico; (3) Ácido *trans*-hidroxicinâmico.

Anexo 3: Comunicação Internacional sob a forma de poster

S. Oliveira, H. Soares Costa, M.C. Castilho, F. Ramos, D. Carvalho Costa, T. G. Albuquerque, A.V. Machado, A. Sanches Silva. The potential of fresh versus dried aromatic herbs as source of antioxidant compounds. Pharma-Nutrition 2015. Linking the microbiome with nutrition and pharma. Filadelfia (EUA), Abril 2015.

The potential of fresh versus dried aromatic herbs as source of antioxidant compounds

S. Oliveira¹, H. Soares Costa², M.C. Castilho¹, F. Ramos*¹, D. Costa², T. Gonçalves Albuquerque³, A.V. Machado⁴, A. Sanches Silva²

¹University of Coimbra, Portugal, ²National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge, I.P., Portugal, ³University of Porto, Portugal, ⁴University of Minho, Portugal

Aromatic herbs have been used over the centuries, ubiquitously, with culinary or medicinal purposes. Nowadays they attract the interest of the scientific community due to their potential health benefits namely regarding oxidative processes in the body, such as age-related degenerative disorders and metabolic diseases, because herbs are considered a source of antioxidants. Seven plants, *Artemisia dracunculus* L. (tarragon), *Mentha piperita* L. (peppermint), *Ocimum basilicum* L. (basil), *Origanum majorana* L. (marjoram), *Origanum vulgare* L. (oregano), *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) and *Thymus vulgaris* (thyme), have been selected in order to compare their antioxidant activity (AA). Fresh and dried samples were acquired in local markets. Four methods were used to evaluate antioxidant activity: the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH[•]) scavenging assay, the β -carotene bleaching assay, the total flavonoids assay and the total phenolics assay. Analyses were performed in triplicate. The DPPH radical scavenging assay is a reliable method to determine the AA. The EC₅₀, i.e., the concentration of antioxidant required to inhibit 50% of the initial DPPH radical, was determined in order to better compare the AA of all samples under the same experimental conditions. The β -carotene bleaching assay is a spectrophotometric method that allows evaluating the ability of an extract to decrease the oxidative bleaching of β -carotene in a β -carotene/linoleic acid emulsion.

Total phenolic content of the aromatic herbs was determined spectrophotometrically applying the Folin-Ciocalteu method, which used gallic acid as standard while the total flavonoids content was also determined spectrophotometrically, using epicatechin as standard.

Although there is a great variability among the antioxidant capacity of the aforementioned plants, in general they are good sources of antioxidants and they can be used not only by the food, pharmaceutical and cosmetics industries but also by the food packaging industry.

Acknowledgements: This work was supported by the project PTDC/AGRTEC/3366/2012 with the acronym Rose4Pack (Biodegradable active packaging with rosemary extract - *Rosmarinus officinalis* L.) to improve food shelf-life and funded by the Foundation for Science and Technology (FCT) and COMPETE Program (FCOMP-01-0124-FEDER-028015). Denise Costa is grateful for the research grant under the project Rose4Pack. Tânia Albuquerque is grateful for research grant (BRJ/DAN-2012) funded by National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge, I.P.

Keywords: Aromatic herbs, Antioxidant activity

The potential of fresh versus dried aromatic herbs as source of antioxidant compounds

S. Oliveira^a, H. Soares Costa^{b,c}, M.C. Castilho^{a,d}, F. Ramos^{a,d}, D. Carvalho Costa^{b,e}, T. Gonçalves Albuquerque^{b,c}, A.V. Machado^f, A. Sanches Silva^{b,g}



^a Pharmacy Faculty, University of Coimbra, Coimbra, Portugal; ^b Department of Food and Nutrition, National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge, I.P., Lisbon, Portugal; ^c REQUIMTE/ Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, Portugal; ^d CNC – Center for Neuroscience and Cell Biology, Pharmacy Faculty, University of Coimbra, Coimbra, Portugal; ^e ICETA – Instituto de Ciências, Tecnologias e Agroambiente da Universidade do Porto, Porto, Portugal; ^f IPC – Institute for Polymers and Composites/3N, Department of Polymer Engineering, University of Minho, Guimarães, Portugal; ^g Centro de Estudos de Ciência Animal (CECA), Universidade do Porto, Porto, Portugal.



INTRODUCTION

Aromatic herbs have been used over the centuries, ubiquitously, with culinary or medicinal purposes. Nowadays they attract the interest of the scientific community due to their potential health benefits namely regarding oxidative processes in the body, such as age-related degenerative disorders and metabolic diseases, because herbs are considered a source of antioxidants. The use of antioxidants in lipids and lipid-containing foods is one method to minimize rancidity, retard the formation of toxic oxidation products,

maintain nutritional quality and increase the shelf life of food products [1]. Antioxidants such as flavonoids, tannins, coumarins, lignans and terpenoids are found in various plant products (such as fruits, leaves, seeds, and oils). For this reason, there is a growing interest in separating these plant antioxidants and using them as natural antioxidants [1]. The aim of this study was to evaluate the potential of seven aromatic plants as a source of antioxidant compounds. Fresh and dried samples were acquired in local markets (Fig. 1).

Four methods were used to evaluate the antioxidant potential of the selected aromatic plants: the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH•) scavenging assay, the β -carotene bleaching assay, the total phenolics assay and the total flavonoids assay. Analyses were performed in triplicate.



Figure 1. Some of the aromatic plants selected for the study.

MATERIALS AND METHODS

Aromatic Herbs (Fig. 2)

Common name	Scientific name
Tarragon	<i>Artemisia dracunculus</i> L.
Peppermint	<i>Mentha piperita</i> L.
Basil	<i>Ocimum basilicum</i> L.
Marjoram	<i>Origanum majorana</i> L.
Oregano	<i>Origanum vulgare</i> L.
Rosemary	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.
Thyme	<i>Thymus vulgaris</i> L.



Figure 2. Some of the aromatic plants selected for the study, analysed in triplicate.

Preparation of the plant extracts (Fig. 3)

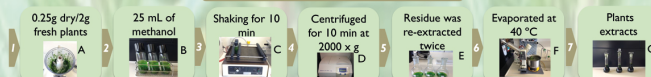


Figure 3. Procedure to prepare the extracts of dried and fresh aromatic plants (A-G).

Methods

• The **DPPH radical scavenging assay** (Fig. 4) is a reliable method to determine the antioxidant activity (AA) [2]. EC_{50} , i.e., the concentration of antioxidant required to inhibit 50% of the initial DPPH radical [1] was determined for each extract.



Fig. 4. DPPH radical scavenging assay.

• The **β -carotene bleaching assay** (Fig. 5) is a spectrophotometric method that allows evaluating the ability of an extract to decrease the oxidative bleaching of β -carotene in a β -carotene/maleic acid emulsion [3].



Fig. 5. β -carotene bleaching assay. A: Emulsion; B and C: tubes previous and after the assay.

• The **total phenolics content** of the aromatic herbs was determined spectrophotometrically applying the Folin-Ciocalteu Method (Fig. 6), which used gallic acid as standard [4].

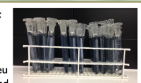


Fig. 6. Folin-Ciocalteu method.

• The **total flavonoids content** (Fig. 7) was determined spectrophotometrically, using epicatechin as standard [5].



Fig. 7. Total flavonoids assay.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the project PTDC/AGRTEC/3366/2012 with the acronym Rose4Pack (Biodegradable active packaging with rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) to improve food shelf-life) and funded by the Foundation for Science and Technology (FCT) and COMPETE Program (FCOMP-01-0124-FEDER-038015). Denise Costa is grateful for the research grant under the project Rose4Pack. Tânia Albuquerque is grateful for research grant (BRJ/DAN-2012) funded by National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge, I.P.



RESULTS AND DISCUSSION

The results of the DPPH• scavenging method (Figure 8) indicated that rosemary showed the lowest values of EC_{50} in both forms, dried (2.22 ± 0.08 mg/mL) and fresh (3.72 ± 0.22 mg/mL), obtaining the highest antioxidant activity among the studied aromatic plants. The highest values of EC_{50} were found for basil, among plants in the dry form, and for tarragon, among plants in the fresh form (19.48 ± 1.14 and 11.4 ± 0.38 mg/mL, respectively), corresponding to a lower antioxidant activity.

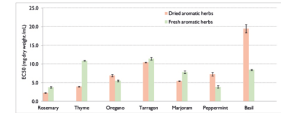


Figure 8. EC_{50} (mg/mL) of different aromatic herbs.

Regarding the β -carotene bleaching assay (Figure 9), thyme and rosemary presented the highest Antioxidant Activity Coefficient (AAC) among aromatic plants in the dry form, while basil showed the highest AAC value (43311 ± 2436.0), among the fresh samples. Basil presented the biggest difference between fresh and dried forms: the fresh form presented about 4 times higher antioxidant activity than the dried form, when considering the same initial amount of sample (per dry weight).

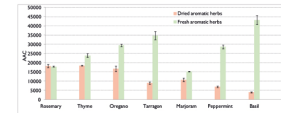


Figure 9. AAC of different aromatic herbs (fresh versus dried).

Concerning the phenolic compounds content (Figure 10), rosemary (in the dry form) and oregano (in the fresh form) showed the highest total phenolics content (21.21 ± 0.66 and 26.3 ± 0.57 mg of GAE/g dry weight, respectively). On the other hand, basil (in the dried form) and tarragon (in the fresh form) presented the lowest phenolic compounds content (4.96 ± 0.26 and 11.35 ± 0.85 mg of GAE/g dry weight, respectively).

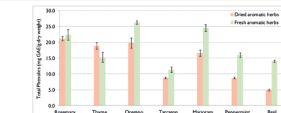


Figure 10. Total phenolics content (mg GAE/g dry weight) of both dry and fresh aromatic plants.

Rosemary (in the dried form, 24.1 ± 0.51 mg of ECE/g dry weight) and oregano (in the fresh form, 43.9 ± 1.95 mg of ECE/g dry weight), showed the highest total flavonoids content (Figure 11). The dry basil and the fresh tarragon showed the lowest total flavonoids content (0.37 ± 0.51 and 20.8 ± 0.08 mg of ECE/g dry weight, respectively).

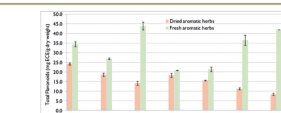


Figure 11. Total flavonoids content (mg ECE/g dry weight) of the selected aromatic plants.

CONCLUSIONS

There is great variability among the antioxidant potential of the studied aromatic plants, not only related with their form (fresh/dried), but also due to the influence of edaoflomatic, harvest or storing conditions. Although this variability, these matrices are, in general, good sources of antioxidants and they can be used not only by the food, pharmaceutical and cosmetics industries but also by the food packaging industry.

REFERENCES

[1] Roby, M.; Sarhan, M.; Salem, K.; Khalil, R. (2012). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.) and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43, 827–831.
 [2] Moore, A.; Cruz, J. M.; Franco, D.; Dominguez, J. M.; Sineiro, J.; Dominguez, H.; Nunez, M. J.; & Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 77, 145–171.
 [3] Miller, H.E. (1971). A simplified method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48, 91.
 [4] Ercan, N.; Ayarso, C.; & Ayarso, E. (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extracts, blackseed (*Nigella arvensis* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and resveratrol. *Food Chemistry*, 110(1), 76–82.
 [5] You, R. M.; Lee, C. H.; Lee, H.; Moon, S.; Lee, C. Y. (2008). Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry*, 106, 929–936.