



ValorNatural – Valorização de Recursos Naturais através da Extração de Ingredientes de Elevado Valor Acrescentado para Aplicações na Indústria Alimentar.

Entregável nº 4.1.3

Versão do Documento: 1

Data de Submissão: 31/07/2020

Responsável: UP (FEUP-LSRE)

Nome do Documento: Caracterização química de hidrolatos e processos de concentração.

Histórico de Revisão

| Revisão | Data | Parceiros Envolvidos | Descrição |
|----------------|-------------|-----------------------------|------------------|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

Lista de Autores

Profa. Dra. Madalena Dias

Dra. Isabel Martins

Dra. Vanessa Vieira

Me. Júlia Cristiê Kessler

Resumo

O presente entregável tem como objetivo a caracterização química de extratos obtidos por hidrodestilação da classe dos hidrolatos das plantas de alecrim, tomilho e orégãos. A caracterização foi realizada através das técnicas de cromatografia gasosa acoplada a um detetor de massas (GC-MS). Uma vez que, para as amostras de alecrim e tomilho foi também possível isolar o óleo essencial, esta caracterização foi alargada a estes dois produtos no sentido de comparar os resultados obtidos.

Índice

| | | |
|----------|----------------------------|----|
| 1 | Identificação | 5 |
| 2 | Informação | 6 |
| | Referências | 26 |

1 Identificação

| | |
|-----------------------------------|---|
| <i>Deliverable</i> | E 4.1.3 - Caracterização química de hidrolatos e processos de concentração. |
| Tipo de <i>deliverable</i> | Relatório |
| Nível de disseminação | Confidencial |
| PPS | 4. Aromas e modelos de aromas |

2 Informação

No âmbito das atividades da PPS4, pretende-se estudar três plantas pertencentes à família das Lamiaceae como fonte de aromas naturais. Assim, plantas no seu estado fresco e desidratado foram alvo de hidrodestilação: alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), orégãos (*Origanum vulgare* L.) e tomilho bela luz (*Thymus mastichina* L.). Os respetivos conteúdos de água removida durante o processo de secagem em estufa com circulação de ar (Venticell, MMM Medcenter, Alemanha) a 40 °C, durante 36 horas, são apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Conteúdo de água removida de plantas desidratadas.

| Amostra | Conteúdo de água removida (%) |
|----------------------------------|-------------------------------|
| <i>Rosmarinus officinalis</i> L. | 63,45 ± 0,61 |
| <i>Origanum vulgare</i> L. | 84,52 ± 0,48 |
| <i>Thymus mastichina</i> L. | 82,06 ± 1,14 |

O método de extração aplicado representando um método de referência para obter óleos essenciais, e consequentemente, hidrolatos ^[1]. As condições aplicadas estão apresentadas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Condições de extração por hidrodestilação das plantas aromáticas.

| | Plantas aromáticas |
|----------------------|--------------------|
| Tempo (min) | 180 |
| Temperatura (°C) | 100 |
| Sólido:líquido (w:v) | 1:10 |

Na presente data, foi possível fazer a extração de todas as amostras planeadas.

O hidrolato foi submetido a um processo de concentração por liofilização (55C, CoolSafe, Holanda), com o objetivo de preservar as características das plantas aromáticas. Conhecendo a massa sólida resultante do processo, determinou-se o rendimento pela Equação 1, em base seca (b.s.).

$$\text{Rendimento (\%)(b.s.)} = \frac{\text{massa média de sólidos}}{\text{massa de planta submetida à extração}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

A **Tabela 3** apresenta os valores de rendimento das frações de hidrolato liofilizado e óleo essencial para cada planta, fresca e desidratada.

Tabela 3. Rendimento das frações de hidrolato liofilizado e óleo essencial de plantas frescas e desidratadas, em base seca (b.s.).

| Amostra | Massa média sólidos (mg) | Rendimento (%) (b.s.) | Desvio padrão |
|---------|--------------------------|-----------------------|---------------|
| HP1 | 15,23 | 0,056 | 0,0010 |
| HP2 | 7,20 | 0,010 | 0,0010 |
| HP3 | 19,35 | 0,063 | 0,0003 |
| HP4 | 48,55 | 0,361 | 0,0061 |
| HP5 | 58,85 | 0,196 | 0,0016 |
| HP6 | 4,40 | 0,095 | 0,0014 |
| OP1 | 205,43 | 0,750 | 0,0040 |
| OP2 | 452,65 | 0,060 | 0,0290 |
| OP3 | 0,19 | 0,620 | 0,0080 |
| OP4 | 9,25 | 0,070 | 0,0041 |
| OP5 | 0,00 | 0,000 | 0,0000 |
| OP6 | 0,00 | 0,000 | 0,0000 |

H: hidrolato, O: óleo essencial, P1: alecrim fresco, P2: alecrim desidratado, P3: tomilho desidratado, P4: tomilho fresco, P5: orégãos frescos, P6: orégãos desidratado.

As frações de hidrolato liofilizado e óleo essencial foram diluídas em solvente (*n*-hexano) a $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e a caracterização química dos produtos obtidos foi realizada por cromatografia gasosa com detetor de massas acoplado (GC-MS TQ8040 NX Triple Quadrupole, Shimadzu, Japão). As condições cromatográficas otimizadas são apresentadas na **Tabela 4**.

Tabela 4. Condições cromatográficas otimizadas para a análise de voláteis em hidrolatos e óleos essenciais de plantas aromáticas usando o GCMS TQ8040 NX Triple Quadrupole.

| Taxa ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) | Temperatura final ($^{\circ}\text{C}$) | Tempo de espera (min) |
|---|--|-----------------------|
| - | 40 | 1 |
| 7 | 200 | 2 |
| 15 | 250 | 2 |
| 20 | 280 | 1 |

Tempo = 33,69 min

Temperatura da coluna = $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Temperatura de injeção = $280 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Volume de injeção = $1 \text{ }\mu\text{L}$

Temperatura de ionização = $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Temperatura de interface = $260 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Tempo de corte do solvente = $3,5 \text{ min}$

A técnica de destilação a vapor é um processo extrativo que dá origem a dois produtos: o hidrolato e o óleo essencial. O hidrolato é considerado, frequentemente, um subproduto do processo de extração e comumente é usado na perfumaria. Dada a solubilidade (ainda que baixa) dos fitoquímicos de interesse (maioritariamente terpenos - aromas), a sua composição foi alvo de investigação para a sua valorização.

A massa média sólida dos hidrolatos e seu rendimento, em base seca, demonstraram ordem de grandeza de 10^{-2} , o que na prática se traduz na dificuldade de medir com precisão as massas respetivas, atendendo ao rigor necessário para quantificação analítica. De facto, estas diferenças entre a sua forma hidratada e liofilizada obrigaram ao fracionamento da amostra e, conseqüentemente, aumentaram o erro de medição. Desta forma, a massa de resíduo seco que se obteve foi extremamente baixa em comparação ao produto líquido (exemplo: 356 g de hidrolato de alecrim fresco originaram 15,23 mg de resíduo seco) e, portanto, os resultados poderão não justificar os recursos tecnológicos despendidos para alcançar o produto final.

Apesar do estudo dos respetivos óleos essenciais não estar previsto no âmbito das atividades a desenvolver pela PPS4, os mesmos foram considerados como recurso comparativo aos hidrolatos.

No que diz respeito aos rendimentos de extração obtidos, as plantas frescas apresentaram um maior rendimento: $0,750 \pm 0,0040\%$ e $0,070 \pm 0,0041\%$ (b.s.), respetivos a alecrim e tomilho. Por outro lado, o método aplicado revelou ser insuficiente para a produção de óleo essencial (OE) de orégãos (quer frescos ou desidratados), pelo que o único produto obtido foi o seu hidrolato (HD).

Relativamente à caracterização química dos extratos obtidos (HD e OE), esta encontra-se sumariada na **Tabela 5**, onde são apresentadas as percentagens de cada molécula identificada. Os respetivos cromatogramas são apresentados nas **Figuras 1-10**.

Tabela 3. Composição química dos óleos essenciais e hidrolatos das plantas aromáticas.

| N | Identificação | T _R (min) | Pico base | OP1 | | HP1 | | OP2 | | HP2 | | OP3 | | HP3 | | OP4 | | HP4 | | HP5 | | HP6 | |
|----|-------------------------------|-------------------------|------------------|--------------|------|--------------|------|--------------|------|--------------|------|--------------|------|--------------|------|--------------|------|------|------|--------------|-------|--------------|-------|
| | | | | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± |
| 1 | Tricyclene | 5,913 | 93,41,121 | 0,06 | 0,00 | - | - | 0,36 | 0,02 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 | α -Thujene | 5,988 | 93,41,136,51 | 0,11 | 0,01 | - | - | 0,07 | 0,00 | - | - | 1,96 | 0,07 | - | - | 1,78 | 0,16 | - | - | - | - | - | - |
| 3 | α -Pinene | 6,140 | 93,41,53,121 | 42,84 | 0,25 | 25,69 | 0,03 | 33,47 | 0,22 | 29,49 | 3,85 | 1,13 | 0,03 | - | - | 0,56 | 0,00 | - | - | - | - | 31,41 | 21,37 |
| 4 | Camphene | 6,480 | 93,41,67,121,107 | 2,40 | 0,03 | 0,71 | 1,18 | 2,93 | 0,04 | 0,57 | 0,36 | tr | - | - | - | tr | - | - | - | - | - | - | - |
| 5 | Linalool oxide | 6,906 | 43,71,139 | 1,62 | 0,22 | 3,44 | 0,00 | 1,49 | 0,00 | 1,97 | 0,25 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 6 | Sabinene | 6,963 | 93,41,77,136 | - | - | - | - | - | - | - | - | tr | - | - | - | tr | - | - | - | - | - | - | - |
| 7 | β -Pinene | 7,067 | 93,41,69 | 1,95 | 0,15 | - | - | 0,73 | 0,02 | 0,20 | 0,07 | tr | - | - | - | tr | - | - | - | - | - | - | - |
| 8 | Amyl vinyl carbinol | 7,128 | 57,72,43 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,32 | 0,02 | - | - | tr | - | - | - | - | - | - | - |
| 9 | β -Myrcene | 7,313 | 41,93,69 | 2,80 | 0,01 | 0,92 | 0,94 | 4,38 | 0,79 | 0,33 | 0,11 | 2,73 | 0,15 | - | - | 1,76 | 0,05 | - | - | - | - | - | - |
| 10 | Amyl ethyl carbinol | 7,490 | 59,83,41 | - | - | - | - | - | - | - | - | tr | - | - | - | tr | - | - | - | - | - | - | - |
| 11 | α -Phellandrene | 7,681 | 93,136,41,65 | - | - | - | - | 0,20 | 0,00 | - | - | - | - | - | - | tr | - | - | - | - | - | - | - |
| 12 | (+)-4-Carene | 7,908 | 93,121,41,53 | 0,39 | 0,01 | - | - | 0,71 | 0,13 | 0,07 | 0,01 | 4,14 | 0,26 | 8,70 | 0,12 | 2,84 | 0,01 | - | - | - | - | - | - |
| 13 | <i>p</i> -Cymol | 8,067 | 119,91,134 | 0,72 | 0,04 | - | - | 1,03 | 0,03 | 0,19 | 0,03 | 17,59 | 1,06 | 34,19 | 0,89 | 10,32 | 0,26 | 0,17 | 0,03 | - | - | - | - |
| 14 | D-Limonene | 8,180 | 68,93,136,107,41 | 23,01 | 9,05 | 27,67 | 0,03 | 10,12 | 0,00 | 34,67 | 1,27 | 0,35 | 0,03 | - | - | 0,41 | 0,09 | - | - | - | - | 10,95 | 3,96 |
| 15 | Eucalyptol | 8,239 | 43,81,93,55,154 | 5,36 | 0,56 | 6,70 | 0,13 | 16,61 | 0,22 | 6,53 | 0,25 | 0,51 | 0,04 | - | - | 0,87 | 0,05 | - | - | - | - | 57,64 | 24,88 |
| 16 | Ocimene quintoxide | 8,506 | 139,43,55 | 0,45 | 0,20 | 1,39 | 0,02 | 0,19 | 0,01 | 0,79 | 0,06 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 17 | β - <i>cis</i> -Ocimene | 8,580 | 93,79,53 | - | - | - | - | - | - | - | - | tr | - | - | - | tr | - | - | - | 22,48 | 14,38 | - | - |
| 18 | γ -Terpinene | 8,809 | 93,136,143 | 0,95 | 0,08 | tr | - | 1,35 | 0,15 | 0,19 | 0,04 | 35,52 | 1,65 | 45,64 | 0,67 | 30,56 | 0,68 | 0,33 | 0,13 | 4,43 | 0,09 | - | - |

(Continuação)

| N | Identificação | T _R (min) | Pico base | OP1 | | HP1 | | OP2 | | HP2 | | OP3 | | HP3 | | OP4 | | HP4 | | HP5 | | HP6 | |
|----|----------------------|-------------------------|-----------------|--------------|------|--------------|------|------|------|--------------|------|------|------|-----|---|------|------|------|------|------|------|-----|---|
| | | | | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± |
| 19 | β-Terpineol | 9,062 | 43,71,93,121 | 0,82 | 0,06 | 1,54 | 0,03 | 0,68 | 0,05 | 0,81 | 0,13 | 0,16 | 0,02 | - | - | tr | - | - | - | - | - | - | - |
| 20 | Sabinene hydrate | 9,090 | 43,93,71 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | tr | - | - | - | - | - | - | - |
| 21 | Terpinolene | 9,414 | 93,59,43,91,121 | 1,18 | 0,05 | 0,74 | 0,87 | 1,04 | 0,04 | 0,81 | 0,13 | tr | - | - | - | tr | - | - | - | - | - | - | - |
| 22 | β-Linalool | 9,695 | 71,41,43,93,55 | 11,30 | 3,89 | 26,41 | 0,00 | 7,89 | 0,21 | 17,62 | 0,82 | 1,92 | 0,18 | - | - | 1,27 | 0,00 | - | - | - | - | - | - |
| 23 | cis-Verbenol | 10,707 | 109,91,41,55 | - | - | 0,26 | 0,47 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 24 | Camphor | 10,719 | 95,441,55,108 | 1,05 | 0,13 | 2,32 | 0,07 | 5,95 | 1,01 | 1,60 | 0,46 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 25 | Borneol | 11,263 | 95,41,55,93 | 0,13 | 0,04 | tr | - | 1,39 | 0,21 | 0,30 | 0,20 | tr | - | - | - | tr | - | - | - | - | - | - | |
| 26 | Pinocamphone | 11,340 | 55,83,41,95 | 0,19 | 0,06 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 27 | 4-Terpineol | 11,444 | 71,111,43,154 | tr | - | - | - | 0,84 | 0,08 | 0,11 | 0,02 | 0,72 | 0,07 | - | - | 1,41 | 0,10 | - | - | 7,63 | 0,42 | - | - |
| 28 | α-Terpineol | 11,743 | 59,93,121,43 | 0,64 | 0,19 | 1,14 | 0,12 | 1,49 | 0,01 | 0,95 | 0,07 | tr | - | - | - | tr | - | - | - | - | - | - | |
| 29 | trans-Dihydrocarvone | 11,900 | 67,95,82,41 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | tr | - | - | - | - | - | - | |
| 30 | Isobornyl formate | 11,912 | 95,93,41,121 | tr | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 31 | l-Verbenone | 11,993 | 107,91,135,150 | 0,31 | 0,06 | 0,36 | 0,60 | 3,58 | 0,29 | 0,81 | 0,14 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 32 | β-Citral | 12,691 | 41,69,84,109 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | tr | - | - | - | - | - | - | |
| 33 | Carvone | 12,735 | 82,54,39,108 | - | - | 0,15 | 0,66 | - | - | 0,10 | 0,03 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 34 | Nerol | 12,873 | 41,69,93 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | tr | - | - | - | - | - | - | |
| 35 | Não identificado | 13,168 | 43,99,71 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,33 | 0,01 | - | - | - | |
| 36 | α-Citral | 13,440 | 41,69,84 | - | - | - | - | - | - | - | - | tr | - | - | - | tr | - | - | - | - | - | - | |

(Continuação)

| N | Identificação | T _R (min) | Pico base | OP1 | | HP1 | | OP2 | | HP2 | | OP3 | | HP3 | | OP4 | | HP4 | | HP5 | | HP6 | |
|----|-------------------------|-------------------------|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|-------|-----|---|
| | | | | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± |
| 37 | Bornyl acetate | 13,574 | 95,43,93,136 | 1,38 | 0,07 | - | - | 3,31 | 0,55 | 0,91 | 0,44 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 38 | Thymol | 13,700 | 135,150,91,115 | - | - | - | - | - | - | - | - | 31,84 | 2,59 | 11,48 | 1,26 | 48,24 | 3,09 | 98,64 | 1,62 | - | - | - | - |
| 39 | Carvacrol | 13,857 | 135,150,91,107 | - | - | - | - | - | - | - | - | tr | - | - | - | tr | - | 0,53 | 0,07 | - | - | - | - |
| 40 | Elixene | 14,546 | 121,93,107 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | tr | - | - | - | - | - | - | - |
| 41 | Thymol acetate | 14,75 | 135,150,192 | - | - | - | - | - | - | - | - | tr | - | - | - | tr | - | - | - | - | - | - | - |
| 42 | Isoeugenol methyl ether | 15,760 | 178,163,107 | tr | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 43 | β-Caryophyllene | 16,220 | 93,133,41 | 0,21 | 0,02 | - | - | 0,15 | 0,04 | 0,53 | 0,00 | 0,72 | 0,06 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 44 | Copaene | 16,410 | 161,119,93 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 45 | Citronellyl propionate | 16,505 | 81,67,41,95,123 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 46 | β-Farnesene | 16,785 | 69,41,93,133 | - | - | - | - | - | - | - | - | tr | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 47 | α-Caryophyllene | 16,872 | 93,121,41,147 | - | - | - | - | - | - | - | - | tr | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 48 | Germacrene | 17,317 | 161,105,91,41 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 49 | Germacrene B | 17,595 | 161,93,107,41 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 50 | Caryophyllene oxide | 19,088 | 79,43,69,95 | 0,10 | 0,03 | - | - | - | - | 0,18 | 0,04 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 51 | γ-Eudesmol | 19,725 | 189,204,161,59 | - | - | - | - | - | - | - | - | tr | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 52 | Methyl jasmonate | 20,005 | 83,41,151,224 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 53 | Methyl dihydrojasmonate | 20,109 | 83,153,55 | - | - | 0,56 | 0,03 | 0,60 | 0,05 | 0,49 | 0,08 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 54 | α-Cadinol | 20,292 | 43,95,121,161 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | tr | - | - | - | 65,47 | 43,30 | - | - |

(Continuação)

| N | Identificação | T _R (min) | Pico base | OP1 | | HP1 | | OP2 | | HP2 | | OP3 | | HP3 | | OP4 | | HP4 | | HP5 | | HP6 | |
|-------------------------------|---------------------|-------------------------|-------------------|------------|---|------------|---|------------|---|------------|---|------------|---|------------|---|------------|---|---------------|---|------------|---|------------|---|
| | | | | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± | % | ± |
| 55 | Isopropyl myristate | 22,850 | 43,60,102,228,129 | - | - | - | - | - | - | - | - | tr | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 56 | Isopropyl palmitate | 26,102 | 43,60,102 | - | - | - | - | - | - | - | - | tr | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| TOTAL NÃO IDENTIFICADO | | | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0,33 | | 0 | | 0 | |
| TOTAL IDENTIFICADO | | | | 100 | | 100 | | 100 | | 100 | | 100 | | 100 | | 100 | | 99,67 | | 100 | | 100 | |
| TOTAL | | | | 100 | | 100 | | 100 | | 100 | | 100 | | 100 | | 100 | | 100,00 | | 100 | | 100 | |

T_R=tempo de retenção, OP1: óleo essencial da planta 1 (alecrim fresco), HP1: hidrolato da planta 1 (alecrim fresco), OP2: óleo essencial da planta 2 (alecrim desidratado), HP2: hidrolato da planta 2 (alecrim desidratado), OP3: óleo essencial da planta 3 (tomilho desidratado), HP3: hidrolato da planta 3 (tomilho desidratado), OP4: óleo essencial da planta 4 (tomilho fresco), HP4: hidrolato da planta 4 (tomilho fresco), HP5: hidrolato da planta 5 (orégãos frescos), HP6: hidrolato da planta 6 (orégãos desidratados), tr=traços.

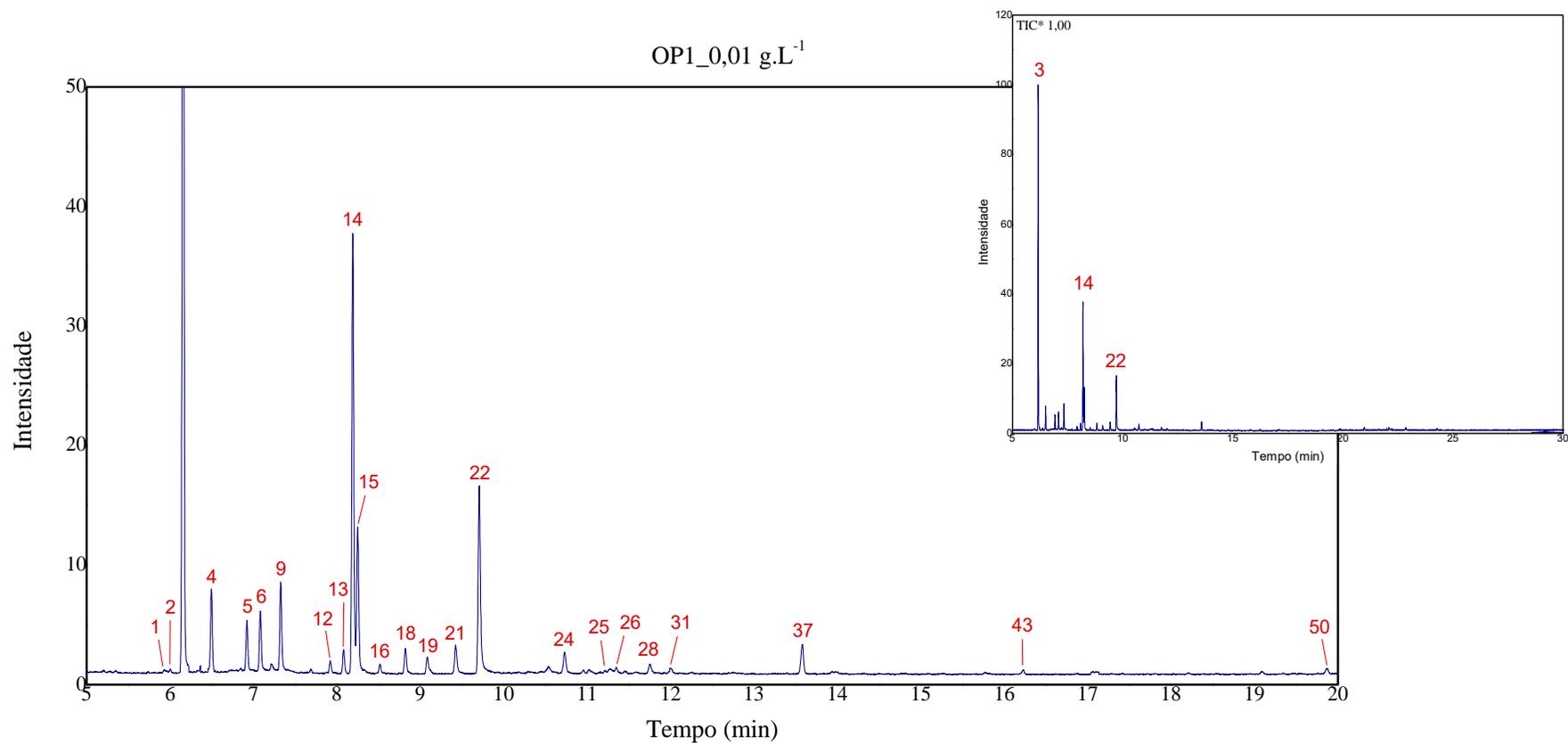


Figura 1. Cromatograma resultante da análise de óleo essencial de alecrim fresco (OP1).

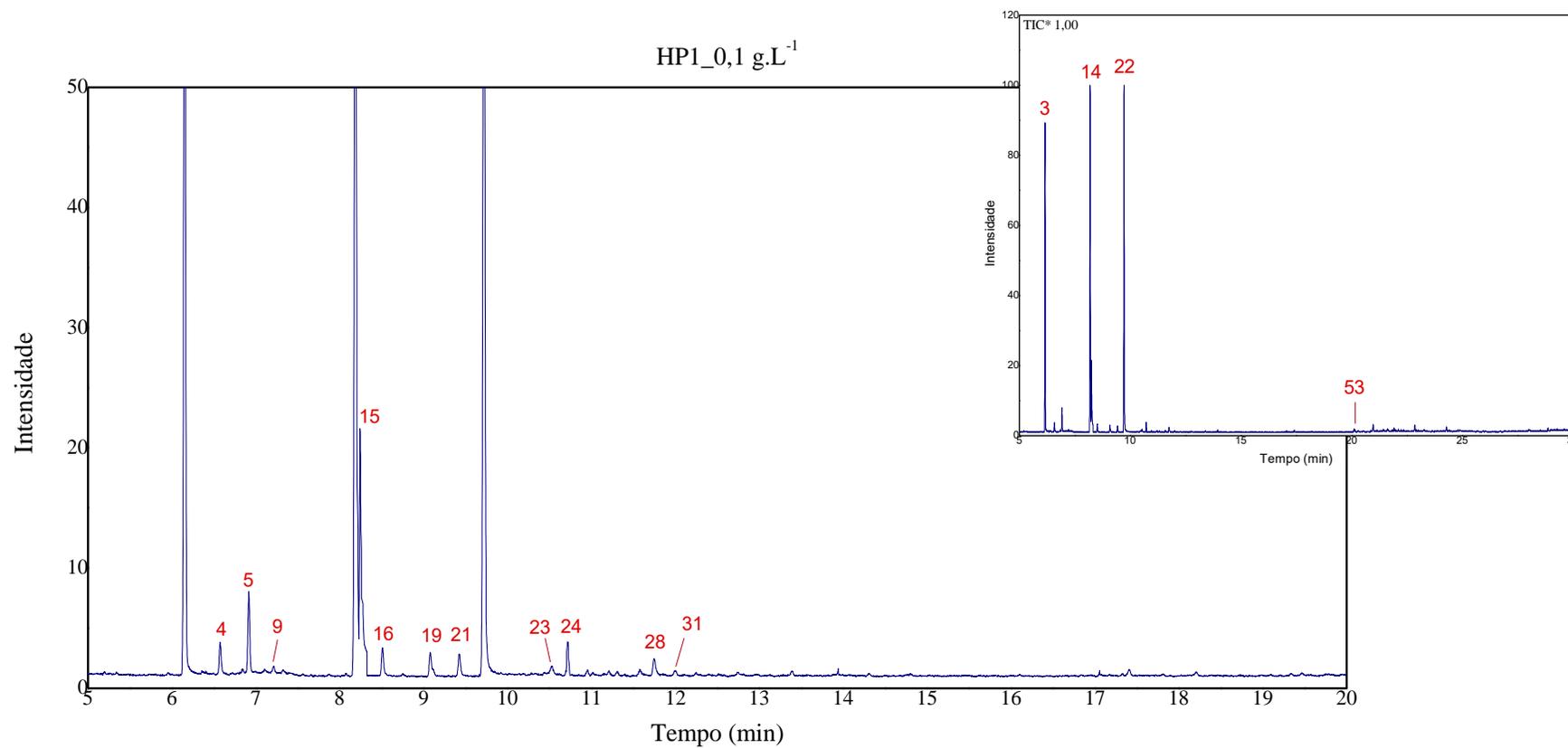


Figura 2. Cromatograma demonstrativo dos resultados obtidos do hidrolato de alecrim fresco (HP1).

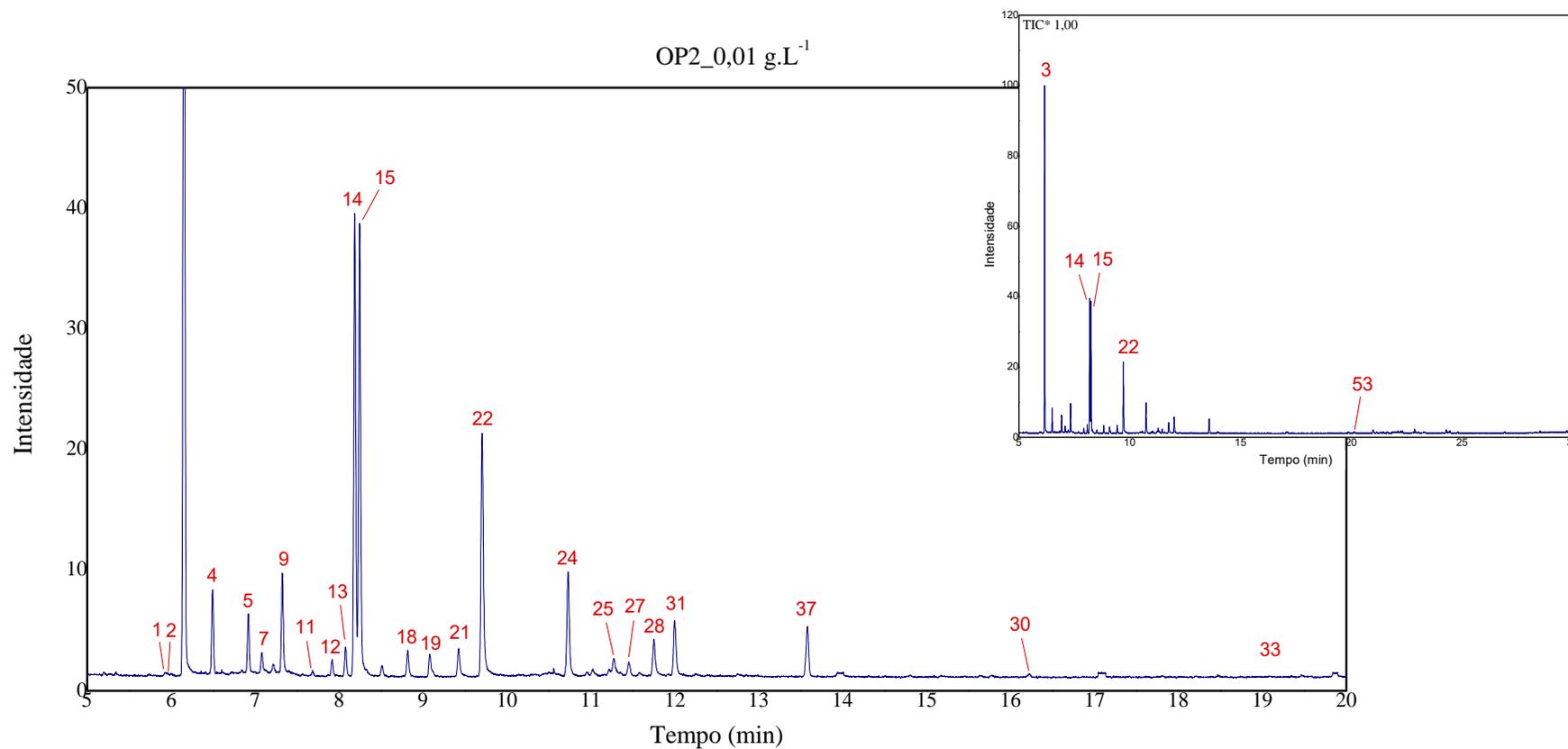


Figura 3. Cromatograma resultante da análise de óleo essencial de alecrim fresco (OP2).

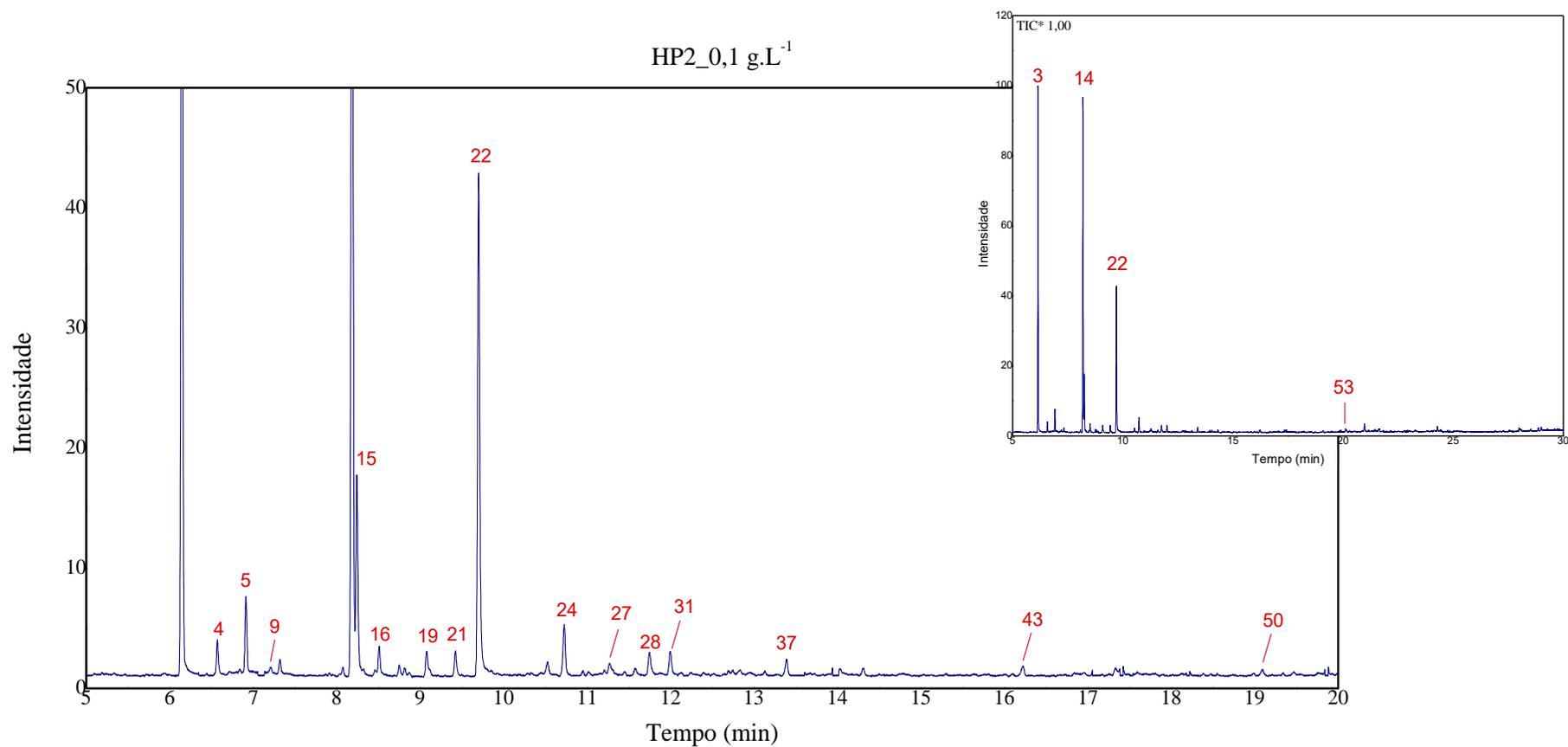


Figura 4. Cromatograma demonstrativo dos resultados obtidos do hidrolato de alecrim desidratado (HP2).

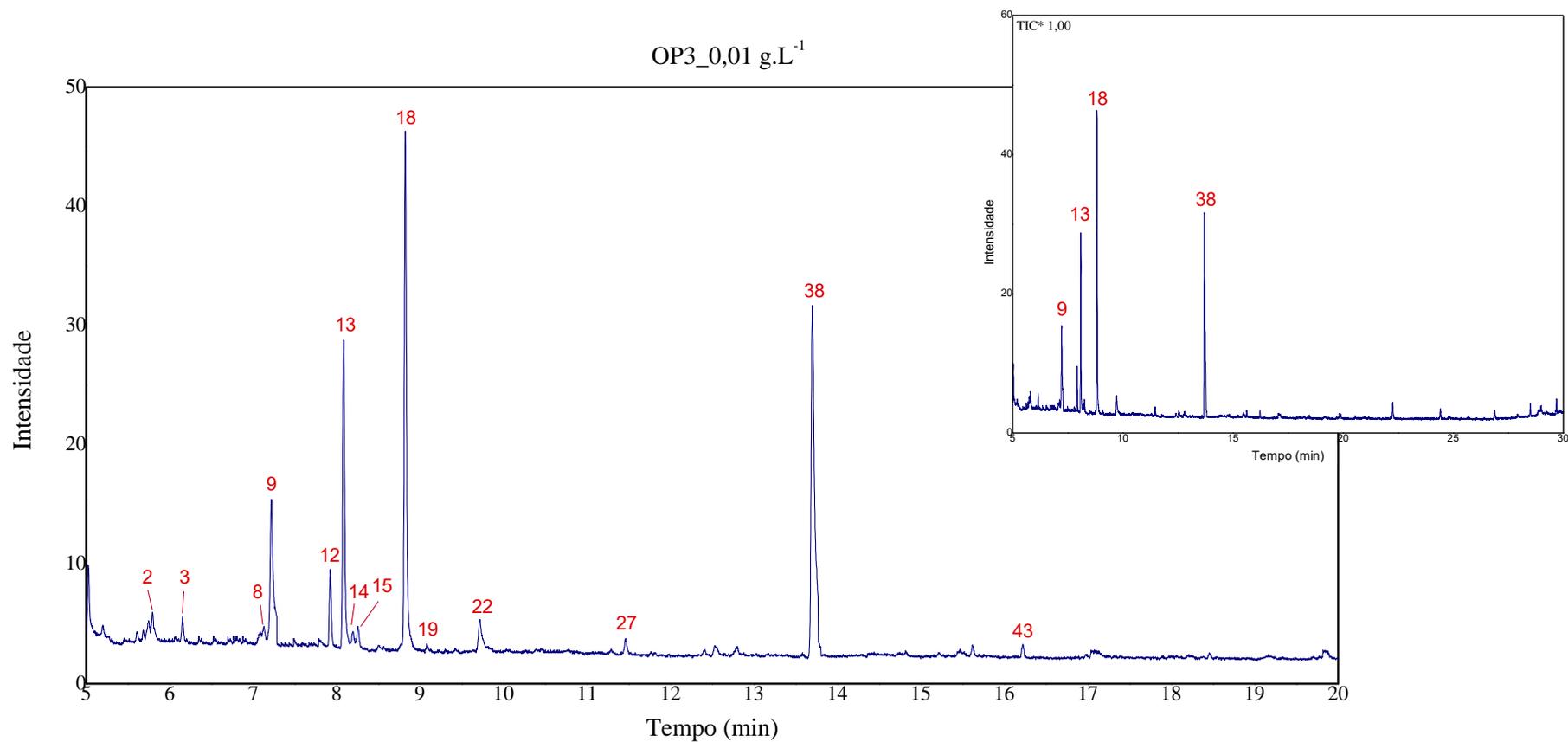


Figura 5. Cromatograma resultante da análise de óleo essencial de alecrim fresco (OP3).

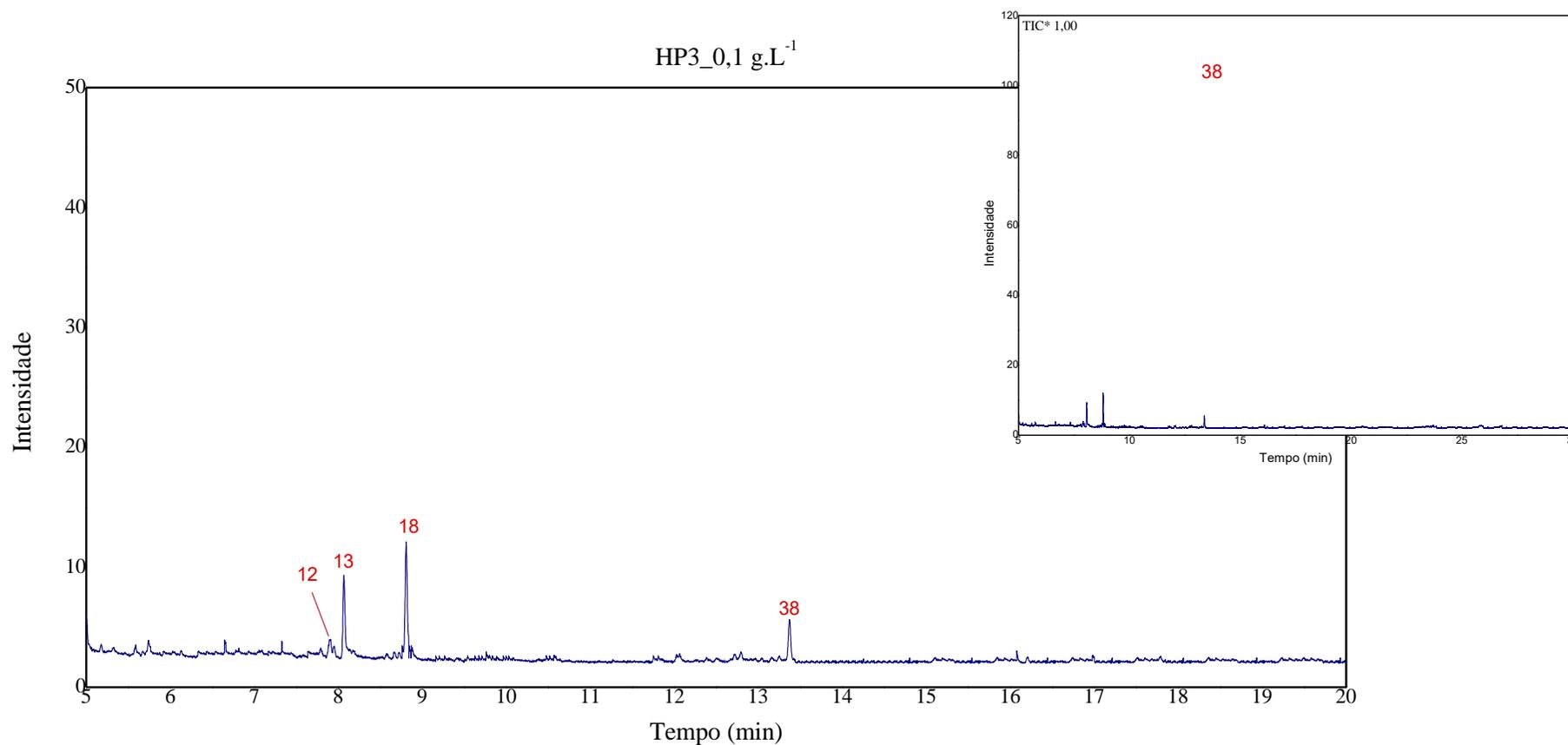


Figura 6. Cromatograma demonstrativo dos resultados obtidos do hidrolato de tomilho desidratado (HP3).

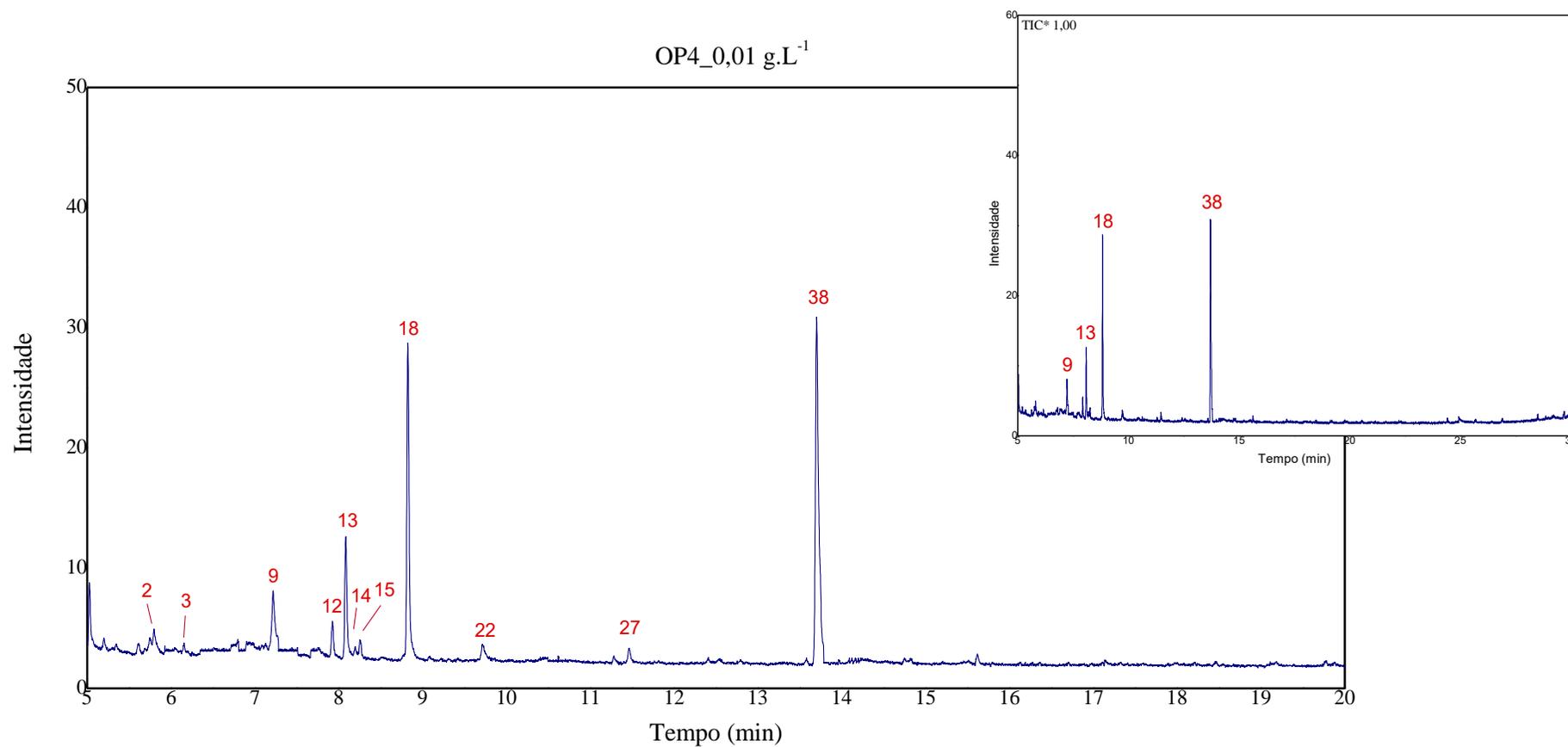


Figura 7. Cromatograma resultante da análise de óleo essencial de alecrim fresco (OP4).

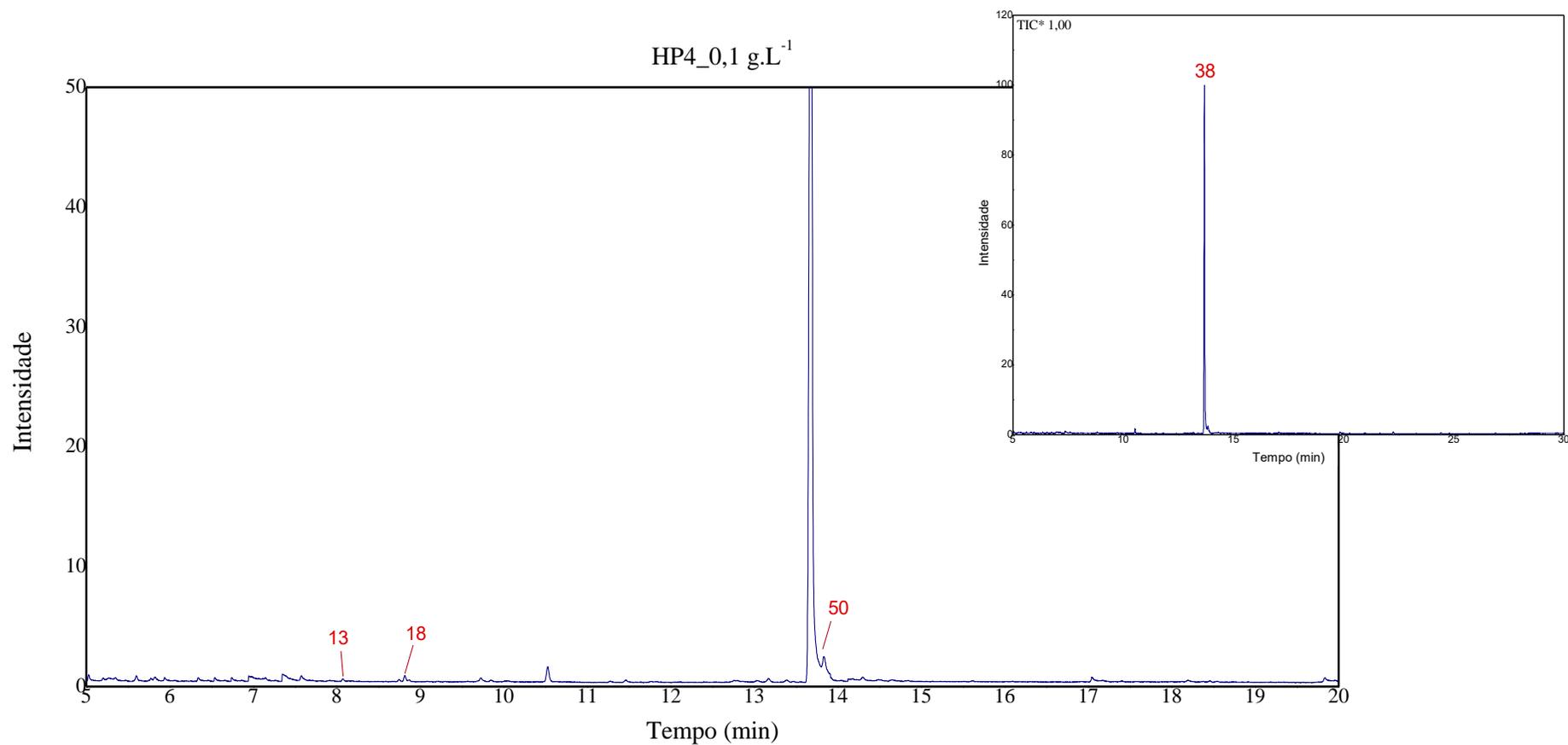


Figura 8. Cromatograma demonstrativo dos resultados obtidos do hidrolato de tomilho fresco (HP4).

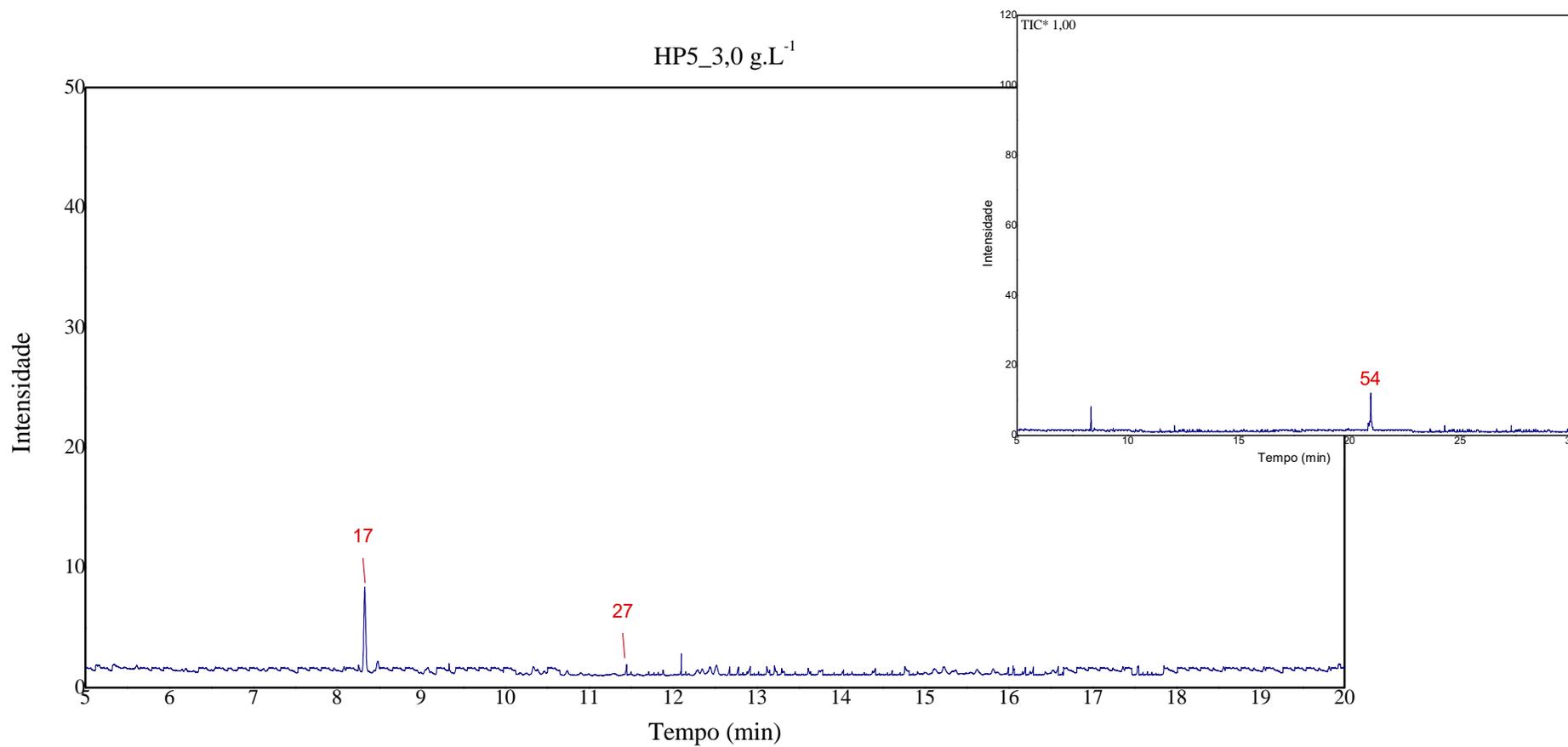


Figura 9. Cromatograma demonstrativo dos resultados obtidos do hidrolato de orégãos frescos (HP5).

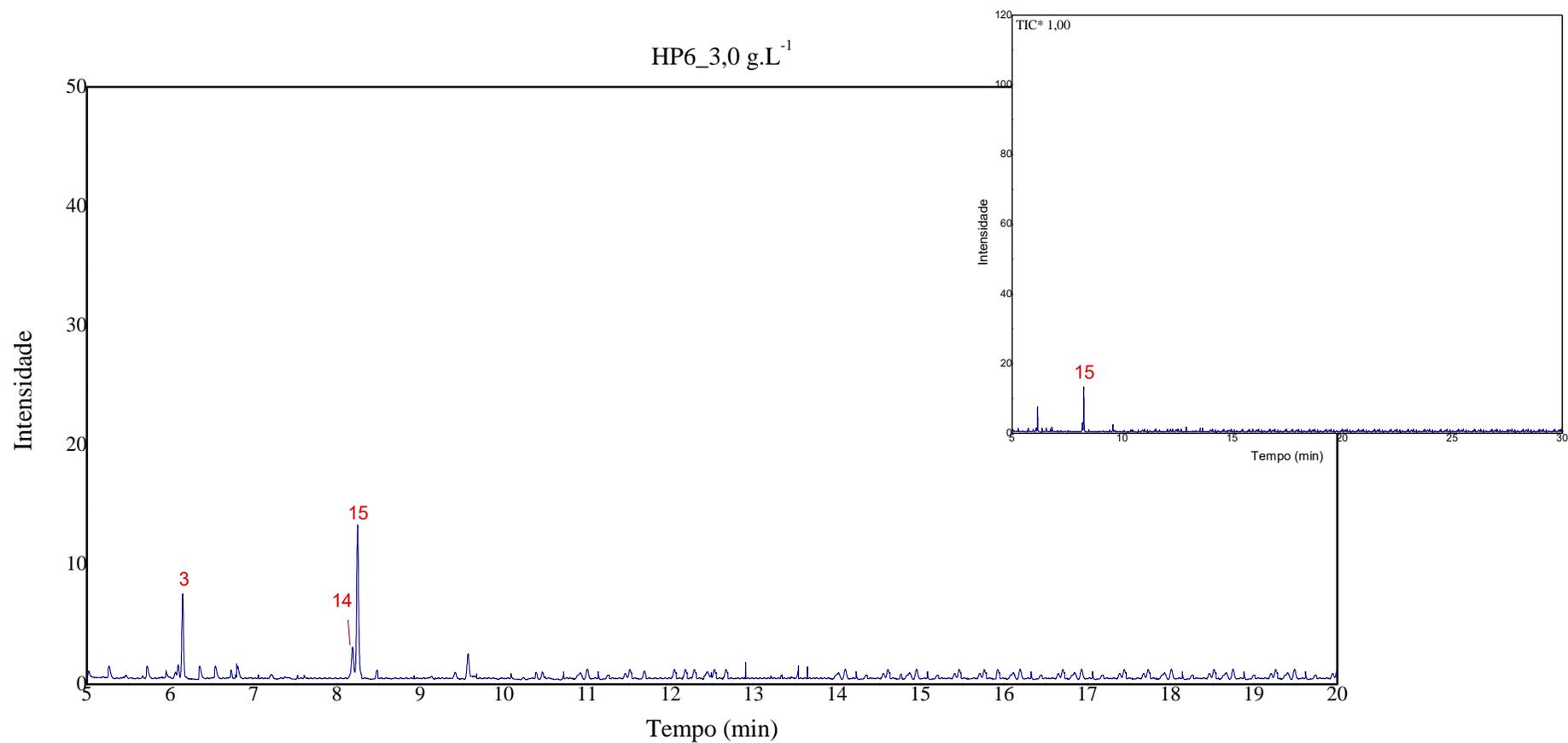


Figura 10. Cromatograma demonstrativo dos resultados obtidos do hidrolato de orégãos desidratados (HP6).

De um modo geral, foi possível identificar 56 moléculas nas amostras analisadas atendendo à sua massa molecular e padrão de fragmentação (comparação com a base de dados da NIST [2]).

No que diz respeito à composição da fração orgânica do HD de alecrim fresco (P1), este apresentou maior abundância em monoterpenos, em especial o α -pineno ($25,69 \pm 0,03\%$), D-limoneno ($27,67 \pm 0,03\%$) e β -linalol ($26,41 \pm 0,00\%$). Os mesmos constituintes foram identificados no óleo essencial em diferentes proporções de relevância e concentração relativa: α -pineno ($42,84 \pm 0,25\%$), D-limoneno ($23,01 \pm 9,05\%$) e β -linalol ($11,30 \pm 3,89\%$). Por outro lado, foram identificadas 25 moléculas, para o OE de alecrim desidratado (P2), destacando-se a abundância em α -pineno ($33,47 \pm 0,22\%$), eucaliptol ($16,61 \pm 0,22\%$) e D-limoneno ($10,12 \pm 0,00\%$). O mesmo se verificou no respetivo HD, que apresentou percentagens de $29,49 \pm 3,85\%$ para α -pineno, $34,671 \pm 1,27\%$ para D-limoneno e $17,62 \pm 0,82\%$ para β -linalol.

Os resultados apresentados vão de encontro com os dados da literatura, sendo o α -pineno, eucaliptol, β -linalol e canfeno as moléculas maioritárias presentes em amostras de alecrim desidratado submetidas a hidrodestilação, provenientes de regiões semi-áridas [3,4]. Por outro lado, plantas cultivadas em área tropical apresentaram maior composição em cânfora e eucaliptol [5,6]. Em menor percentagem são citados borneol, verbenona e bornil-acetato [7], compostos também identificados nas amostras analisadas.

Relativamente à composição dos extratos de tomilho desidratado (P3), verificou-se concordância nas moléculas que prevalecem em ambas as amostras (HD e OE). Verificando-se que o OE apresenta abundância em γ -terpineno ($35,52 \pm 1,65\%$), seguido de timol ($31,84 \pm 2,59\%$) e *p*-cimol ($17,59 \pm 1,06\%$). Já o respetivo hidrolato é constituído por $45,64 \pm 0,67\%$ de γ -terpineno, $34,19 \pm 0,89\%$ de *p*-cimol e $11,48 \pm 1,26\%$ de timol. Adicionalmente, os fitoquímicos maioritários que compõem o extrato (OE) de planta fresca repetem-se: timol ($48,24 \pm 3,09\%$), γ -terpineno ($30,56 \pm 0,68\%$) e *p*-cimol ($10,32 \pm 0,26\%$). Por fim, a fração de hidrolato liofilizada mostrou-se maioritariamente constituída por timol ($98,64 \pm 1,62\%$).

Os terpenos timol, *p*-cimol, e γ -terpineno têm vindo a ser reportados como os compostos maioritários da hidrodestilação de tomilho desidratado [8,9], seguidamente por eucaliptol, β -linalol e carvacrol [10,11]. Relativamente a estudos utilizando amostras de planta fresca, esses são escassos. Destaca-se a contribuição de Perestrelo et al. (2016), que realizaram a caracterização química do OE de amostras frescas provenientes do arquipélago da Madeira- Portugal, recorrendo à análise por *headspace*/SPME (*Solid*

Phase Micro Extraction) e, chegaram a uma gama de moléculas geralmente citadas como minoritárias: α -tujeno, cânfora, α -felandreno e β -mirceno, assim como D-limoneno e eucaliptol ^[12].

As extrações realizadas para os orégãos frescos e desidratados revelaram a ausência de óleo essencial. No que diz respeito à planta fresca, os hidrolatos apresentaram quantidades residuais de α -cadinol ($65,47 \pm 43,30\%$), β -*cis*-ocimene ($22,48 \pm 14,38\%$) e 4-terpineol ($7,63 \pm 0,42\%$). Para a amostra desidratada as moléculas identificadas variaram entre eucaliptol ($57,64 \pm 24,88\%$), α -pineno ($31,41 \pm 21,37\%$) e D-limoneno ($10,95 \pm 3,96\%$), e consequentemente, distinto da amostra fresca. A escassez de moléculas aromáticas e ausência de óleo essencial das plantas pode estar associada ao seu estado de desenvolvimento, em vista que a planta foi colhida ainda jovem e, por isso, precoce para a realização das extrações. Ainda assim, estudos realizados anteriormente (apresentados no entregável 4.1.2, tarefa 11.2, anexo 1) demonstraram que o material em estudo tende a apresentar baixos rendimentos e variabilidade dos fitoquímicos maioritários.

Considerando o levantamento bibliográfico ^[13] relativo ao perfil aromático de amostras de orégãos, existe discrepância entre as moléculas reportadas no presente entregável e as principais conclusões dos autores. Habitualmente, e em abundância, predominam o timol, ρ -cimeno, carvacrol, γ -terpineno na composição de voláteis de orégãos. No entanto, a presença de β -*cis*-ocimeno (tal como encontrado nas plantas analisadas), já foi verificado em amostras com origem na Lituânia ^[14].

De facto, os principais compostos voláteis identificados foram monoterpenóides e sesquiterpenóides, sendo também mencionados na literatura grupos carbonil, cetonas, ácidos, fenóis, éteres, aldeídos e álcoois como responsáveis pelos aromas de produtos naturais ^[12,15,16]. É verdade que, a composição fitoquímica e suas respectivas concentrações são dependentes das condições de cultivo, nomeadamente solo, irrigação e incidência solar ^[5,6], o que, isoladamente ou em conjunto, poderão estar na origem da divergência das conclusões apresentadas no presente entregável.

Por fim, pode-se concluir que, de um modo geral (alecrim e tomilho), a composição dos produtos analisados é muito semelhante entre a sua forma fresca e desidratada. No entanto, plantas frescas conduzem a maiores rendimentos de OE. No que diz respeito aos hidrolatos (principal objeto de estudo previsto para este entregável), de facto, apesar da sua composição relativa apresentar abundância em compostos aromáticos semelhantes aos do OE, o seu rendimento é extremamente baixo, em que os processos de concentração

(liofilização) são morosos e tecnologicamente complexos para transpor à realidade empresarial.

Os mesmos fitoquímicos majoritários em HD e OE foram mencionados em extrações por destilação a vapor para *Monarda citriodora*^[17], *Campomanesia viatoris*^[18] e *Syzygium aromaticum*^[19], tendo como fim a sua aplicação antimicrobiana. Por outro lado, hidrolatos de lavanda (*Lavandula angustifolia*) foram submetidos a uma análise descritiva da sua avaliação sensorial, usando o óleo essencial da planta como amostra de referência. Os ensaios demonstraram uma considerável variação da sua composição, apresentando características herbal, doce e floral. No entanto, um toque distinto de lavanda foi mencionado como característico e, portanto, indicado para o uso em produtos cosméticos ou alimentícios^[20]. Os estudos mencionaram apenas o rendimento do OE, não apresentando os valores para o hidrolato.

O potencial de aplicabilidade dos OE varia entre fragrâncias/perfumes ou até mesmo como agentes aromatizantes em alimentos e bebidas, não obstante o seu potencial de aplicação em produtos farmacêuticos^[15].

De modo a explorar o potencial dos óleos essenciais das plantas aromáticas selecionadas para estudo, será ainda necessário:

1. Quantificar os compostos majoritários encontrados nos extratos.
 - a. Retas de calibração (GC).
2. Análise de citotoxicidade de hidrolatos e óleos essenciais.
 - a. Alíquotas de hidrolatos na sua forma líquida e respetivos óleos essenciais, assim como extratos supercríticos (proveniente de plantas e frutos secos) foram enviados para análise de citotoxicidade ao Centro de Investigação da Montanha (CIMO), parceiro do projeto “Valor Natural”. Os resultados serão apresentados junto ao Entregável 4.1.4, destinado a caracterização organolética dos aromas produzidos por extração supercrítica, hidrolatos e óleos essenciais.
3. Estudar as propriedades organoléticas das amostras.
 - a. Aplicação de testes de sensibilidade. Estes estudos permitem avaliar a perceção, identificação e diferenciação qualitativa e/ou quantitativa proveniente de estímulos, pelos órgãos dos sentidos^[21]. Assim, será realizado o teste de Análise Descritiva Qualitativa (ADQ) para o reconhecimento e identificação da intensidade de odores e aplicado a um

painel de 20 avaliadores aleatórios, segundo as normativas divulgadas pela *International Standard Organization (ISO, 8586:2012(E))* [22]. Devido à complexidade dos testes e à atual situação social que vivemos, o prazo médio para o desenvolvimento é de três a quatro meses e o respetivo entregável corresponde à data de 30/09/2020.

Com base nos resultados acima mencionados, os hidrolatos não serão analisados sensorialmente, visto que, para além dos baixos rendimentos, o aroma proveniente apresentou-se extremamente desagradável.

Referências

- [1] COE, Council of Europe (2007). **European Directorate for the Quality of Medicines**, 6^a ed., Strasbourg: European Pharmacopoeia, 2007.
- [2] NIST (2018). **Mass Spectral Library of Standard Reference Data Series of National Institute of Standard and Technology**.
- [3] Jamshidi, R.; Afzali, Z.; Afzali, D. Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosmary in diferente origins in Iran and comparison with other countries. **American-Eurasian Journal of Agricultural and environmental Sciences**, v. 5, n. 1, p. 79-81, 2009.
- [4] Gachkar, L.; Yadegari, D.; Rezaei, M. B.; Taghizadeh, M.; Astaneh, S. A.; Rasooli, I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oil. **Food Chemistry**, v. 102, p. 898-904, 2007.
- [5] Carvalho Jr., R. N.; Moura, L. S.; Rosa, P. T. V.; Meireles, A. A. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 35, p. 197-204, 2005.
- [6] Conde-Hernández, L. A.; Espinosa-Victoria, J. R.; Trejo, A.; Guerrero-Beltrán, J. Á. CO₂-supercritical extraction, hydrodistillation and steam distillation of essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis*). **Journal of Food Engineering**, v. 200, p. 81-86, 2017.
- [7] Angioni, A.; Barra, A.; Cereti, E.; Barile, D.; Coisson, J. D.; Arlorio, M.; Dessi, S.; Coroneo, V.; Cabras, P. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3530-3535, 2004.

- [8] Grosso, C.; Figueiredo, A. C.; Burillo, J.; Mainar, A. M.; Urieta, J. S.; Barroso, J. G.; Coelho, J. A.; Palavra, A. M. F. Composition and antioxidante activity of *Thymus vulgaris* volatiles: comparision between supercritical fluid extraction and hydrodistillation. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 2211-2218, 2010.
- [9] Delgado, T.; Marinero, P.; Asensio-S.-Manzanera, C.; Asensio, C.; Herrero, B.; Pereira, J. A., Ramalhosa, Elsa. Antioxidant activity of twenty wild Spanish *Thymus mastichina* L. populations and its relation with their chemical composition. **LWT – Food Science and Technology**, v. 57, p. 412-418, 2014.
- [10] Costa, P.; Gonçalves, S.; Grosso, C.; Andrade, P. B.; Valentão, P.; Bernardo-Gil, M. G.; Romano, A. Chemical profiling and biological screening of *Thymus lotocephalus* extracts obtained by supercritical fluid extraction and hydrodistillation. **Industrial Crops and Products**, v. 36, p. 246-256, 2012.
- [11] Vidic, D.; Cavar, S.; Solic, M. E.; Maksimovic, M. Volatile constituents of two rare subspecies of *Thymus praecox*. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 7, p. 1123-1126, 2010.
- [12] Perestrelo, R.; Silva, C. L.; Rodrigues, F.; Caldeira, M.; Câmara, J. S. A powerful approach to explore the potential of medicinal plants as a natural source of odor and antioxidant compounds. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 132-144, 2016.
- [13] Teixeira, B.; Marques, A.; Ramos, C.; Serrano, C.; Matos, O.; Neng, N. R.; Nogueira, J. M. F.; Saraiva, J. A.; Nunes, M. L. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 2707-1714, 2013.
- [14] Mockute, D.; Bernotiene, G.; Judzentiene, A. The essential oil of *Origanum vulgare* L. spp. *vulgare* growing wild in Vilnius district (Lithuania). **Phytochemistry**, v. 57, p. 65-69, 2001.
- [15] Abada, M. B.; Hamdi, S. H.; Maseound, C.; Jroud, H.; Bousshah, E.; Jemâa, J. M. B. Variations in chemotypes patterns of Tunisian *Rosmarinus officinalis* essencial oils and applications for controlling the date moth *Ectomyelois ceratoniae* (Pyrilidae). **South African Journal of Botany**, v. 128, p. 18-27, 2020.
- [16] Breitmaier, E. (2006). **Terpenes: Flavors, fragrances, pharmaca, pheromones**, Alemanha: Wiley-VCH, 2006.
- [17] Vito, M. di; Bellardi, M. G.; Mondello, F.; Modesto, M.; Michelozzi, M.; Bugli, F.; Sanguinetti, M.; Sclocchi, M. C.; Sebastiani, M. L.; Biffi, S.; Barbanti, L.; Mattarelli, P.

Monarda citriodora hydrolate vs essential oil comparison in several anti-microbial applications. **Industrial Crops & Products**, v. 128, p. 206-212, 2019.

[18] Matos, I. L. de; Machado, S. M. F.; Souza, A. R. de; Costa, E. V.; Nepel, A.; Barison, A.; Alves, P. B. Constituents of essential oil and hydrolate of leaves of *Campomanesia vianorii* landrum. **Química Nova**, v. 38, n. 10, p. 1289-1292, 2015.

[19] Ferreira, F. M.; Delmonte, C. C.; Novato, T. L. P.; Monteiro, C. M. O.; Daemon, E.; Vilela, F. M. P.; Amaral, M. P. H. Acaricidal activity of essential oil of *Syzygium aromaticum*, hydrolate and eugenol formulated or free on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 32, p. 41-47, 2018.

[20] Prusinowska, R.; Smigielski, K.; Stobiecka, A.; Kunicka-Styczynska, A. Hydrolates from lavender (*Lavandula angustifolia*) – their chemical composition as well as aromatic, antimicrobial and antioxidant properties. **Natural Products Letters**, v. 30, n. 4, p. 386-393, 2016.

[21] Dutcosky, S. D. (2013). **Análise sensorial de alimentos**, 4ª ed., Curitiba: Champagnat, 2013, 531 p.

[22] ISO 8586:2012 (2012). Sensory analysis - **General guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors**, 1ª ed., Geneva: International standard, 2012, 28 p.