

Lucena Coelho Pereira

Caraterização química de folhas e atividade antioxidante de extratos de *Laurus* sp.

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Beatriz Oliveira
e pela Professora Doutora Lígia Ribeiro Salgueiro Silva Couto e apresentada na
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Janeiro de 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas e instituições que, direta ou indiretamente, tornaram possível a elaboração deste trabalho.

Quero agradecer particularmente à Prof. Doutora Beatriz Oliveira e à Prof. Doutora Lúcia Ribeiro Salgueiro Silva Couto pela sua orientação, disponibilidade, empenho e ajuda.

À Prof. Doutora Valentina Domingues pelos seus conhecimentos e disponibilidade.

Ao Eng. Virgílio, Maria e “Susy” pela ajuda que me disponibilizaram.

À Prof. Doutora Ana Vinha, Doutora Rita Alves e Mestre Anabela Costa pelo apoio e experiência transmitida.

Por fim, à minha família e amigos por estarem presentes.

A todos, o meu sincero muito obrigada!

Resumo

O louro é um condimento natural usado nas regiões de alimentação mediterrânica, onde se incluem Portugal continental e os arquipélagos dos Açores e da Madeira.

O interesse e procura de plantas aromáticas e medicinais por parte das indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica, em consequência da exigência cada vez maior dos consumidores, é um facto indiscutível. Tal comportamento deve-se às diversas propriedades farmacológicas dos compostos bioativos de origem vegetal, com diversos benefícios para a saúde e bem-estar, contribuindo assim, para a prevenção de doenças e uma melhor qualidade de vida.

O objetivo do estudo apresentado foi a determinação do valor nutricional, perfil dos compostos voláteis, composição em compostos bioativos e capacidade antioxidante de folhas e extratos de três espécies de louro: *Laurus nobilis* L., *Laurus azorica* (Seub.) Franco e *Laurus novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar.

A análise nutricional das folhas secas incluiu a avaliação da humidade, proteínas, gordura total, hidratos de carbono, fibra dietética total e cinzas, segundo métodos da AOAC e o perfil dos ácidos gordos por cromatografia gasosa acoplada a detetor de ionização de chama (GC-FID).

O perfil dos compostos voláteis das folhas frescas e secas foi determinado por microextração em fase sólida combinado com cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa (HS-SPME/GC-MS).

Foram quantificados os teores de compostos fenólicos totais, flavonoides e taninos e determinada a atividade antioxidante de extratos das referidas espécies por dois métodos (DPPH e FRAP).

Pelos compostos voláteis das três espécies foi possível verificar a existência de marcadores de espécie, e ainda diferenças quantitativas e qualitativas entre folhas frescas e secas.

A espécie *Laurus azorica* (Seub.) Franco forneceu os melhores resultados no que diz respeito a compostos fenólicos totais, flavonoides e taninos, bem como na atividade antioxidante.

Palavras-Chave: *Laurus nobilis* L., *Laurus azorica* (Seub.) Franco, *Laurus novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar, compostos bioativos, atividade antioxidante, compostos fenólicos, compostos voláteis.

Abstract

The laurel is a natural condiment used in Mediterranean cuisine regions, which include mainland Portugal and its Azores and Madeira archipelagos.

Thanks to consumers increasing demand, the food, cosmetics and pharmaceutical industries' growing interest and exploration of aromatic herbs is an undeniable fact. This is due to the multiple pharmacological properties of the bioactive components of plant origin which possess several health and well-being benefits thus contributing to prevent disease and improve quality of life.

The purpose of this study is to determine the nutritional value, the profile of volatile compounds, the bioactive compounds and the antioxidant properties of leaves and extracts of three species of laurel: *Laurus nobilis* L., *Laurus azorica* (Seub.) Franco e *Laurus novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar.

The nutritional analysis of dry leaves includes the evaluation of moisture, proteins, total fat, carbohydrates, total dietary fibre and ashes, according to the AOAC methods and the fatty acids profile through gas chromatography coupled to a flame ionization detector (GC-FID).

The volatile compounds profile of the fresh and dry leaves was determined by solid phase microextraction and gas chromatography coupled to mass spectrometry (HS-SPME/GC-MS). The levels of total phenolic compounds, flavonoids and tannins were quantified and the antioxidant activity of extracts from these species determined by two methods (DPPH e FRAP).

From the volatile compounds of the three species, it was possible to detect species markers, and also quantitative and qualitative differences between fresh and dried leaves.

The *Laurus azorica* (Seub.) Franco species provided the best results concerning total phenolic compounds, flavonoids and tannins as well as antioxidant activity.

Keywords: *Laurus nobilis* L., *Laurus azorica* (Seub.) Franco, *Laurus novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar, bioactive compounds, antioxidant activity, phenolic compounds, volatile compounds.

Índice Geral

Agradecimentos	3
Resumo	4
Abstract	5
Índice de Tabelas	8
Índice de Figuras	9
Lista de Abreviaturas	10
1. Introdução	12
2. Revisão Bibliográfica	15
2.1. Loureiro	15
2.1.1. <i>Laurus nobilis</i> L.	16
2.1.2. <i>Laurus azorica</i> (Seub.) Franco	17
2.1.3. <i>Laurus novocanariensis</i> Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar	18
2.2. Partes da planta utilizadas com fins terapêuticos	19
2.3. Metabolitos secundários	19
2.3.1. Antioxidantes	20
Compostos fenólicos	22
Flavonoides	23
Taninos	25
Terpenos	26
3. Atividades Biológicas do <i>Laurus</i> sp.	28
3.1. Atividade antioxidante e antimicrobiana	29
4. Objetivo	32
5. Materiais e Métodos	33
5.1. Recolha e tratamento das amostras	33
5.2. Reagentes e equipamentos	33
5.3. Análise nutricional	35
Determinação do teor de humidade	35
Determinação do teor de cinzas	35
Determinação do teor de proteína	36
Determinação do teor total de gordura	36
Determinação do teor total de fibra dietética	37

Determinação do teor de hidratos de carbono	38
Determinação do perfil de ácidos gordos	38
5.4. Análise dos compostos voláteis	39
5.5. Análise dos compostos fenólicos	40
Preparação dos extractos	40
Fenóis totais	41
Taninos.	41
Flavonoides	41
Atividade antioxidante	42
DPPH [•] (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo)	42
FRAP (poder antioxidante por redução do ião férrico)	42
6. Resultados e Discussão	43
6.1. Análise nutricional	43
6.2. Análise dos compostos voláteis	46
6.3. Análise dos compostos fenólicos	57
Compostos fenólicos totais	57
Flavonóides totais	58
Taninos.	59
Atividade antioxidante	60
7. Conclusões	64
8. Referências Bibliográficas	66

Índice Tabelas

Tabela 1. Atividades biológicas dos óleos essenciais e dos extratos das folhas de <i>L. nobilis</i> L., <i>L. azorica</i> (Seub.) Franco e <i>L. novocanariensis</i> Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar	29
Tabela 2. Percentagem de humidade das folhas de louro antes e após a secagem	43
Tabela 3. Composição nutricional das folhas secas do <i>Laurus</i> sp., em peso seco.	44
Tabela 4. Composição em ácidos gordos das folhas secas das espécies de louro em estudo	45
Tabela 5. Identificação dos compostos voláteis das folhas frescas e secas de <i>L. azorica</i> (Seub.) Franco.	48
Tabela 6. Identificação dos compostos voláteis das folhas frescas e secas de <i>L. nobilis</i> L.	50
Tabela 7. Identificação dos compostos voláteis das folhas frescas e secas de <i>L. novocanariensis</i> Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar .	53
Tabela 8. Teor total de compostos fenólicos de extratos obtidos com os diferentes solventes em estudo	58
Tabela 9. Teor de flavonoides de extratos obtidos com os diferentes solventes em estudo	59
Tabela 10. Teor de taninos de extratos obtidos com os diferentes solventes em estudo	59
Tabela 11. Atividade antioxidante de extratos de folhas de louro obtidos com os diferentes solventes em estudo e o método do radical DPPH	61
Tabela 12. Poder antioxidante, por redução do ião férrico (FRAP), de extratos de folhas de louro obtidos com os diferentes solventes em estudo	62

Índice de Figuras

Figura 1. Zona geográfica mais representativa da plantação do <i>Laurus nobilis</i> L.	15
Figura 2. Folhas de <i>Laurus nobilis</i> L.	16
Figura 3. Folhas de <i>Laurus azorica</i> (Seub.) Franco	17
Figura 4. Folhas de <i>Laurus novocanariensis</i> Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar	18
Figura 5. Estrutura dos ácidos hidroxibenzóicos	23
Figura 6. Estrutura dos ácidos hidroxicinâmicos	23
Figura 7. Estrutura geral dos flavonóides	24
Figura 8. Diferentes classes dos flavonóides	25
Figura 9. Taninos hidrolisáveis e alguns compostos derivados	26
Figura 10. Balança de determinação de humidade.	35
Figura 11. Mufla	35
Figura 12. Destilador automático	36
Figura 13. Montagem do dispositivo de Soxhlet	37
A- Extração da gordura; B- Recuperação do solvente	37
Figura 14. Sistema de filtração para determinação total da fibra dietética	37
Figura 15. Extratos das folhas de louro obtidos com diferentes solventes	40
Figura 16. Leitura, em leitor de microplacas, do ensaio dos fenóis totais.	41
Figura 17. Cromatograma do perfil de compostos voláteis das folhas frescas de <i>L. azorica</i> (Seub.) Franco.	49
Figura 18. Cromatograma do perfil de compostos voláteis das folhas secas de <i>L. azorica</i> (Seub.) Franco.	49
Figura 19. Cromatograma do perfil de compostos voláteis das folhas frescas de <i>L. nobilis</i> L.	51
Figura 20. Cromatograma do perfil de compostos voláteis das folhas secas de <i>L. nobilis</i> L.	51
Figura 21. Cromatograma do perfil de compostos voláteis das folhas frescas de <i>L. novocanariensis</i> Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar	54
Figura 22. Cromatograma do perfil de compostos voláteis das folhas secas de <i>L. novocanariensis</i> Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar	54

Lista de Abreviaturas

ADN (ácido desoxirribonucleico)

AHB (ácidos hidroxibenzóicos)

AHC (ácidos hidroxicinâmicos)

AlCl₃ (cloreto de alumínio)

AOAC (Association of Official Analytical Chemists)

BHA (hidroxianisol butilado)

BHT (hidroxitolueno butilado)

CoA (coenzima A)

CO₂ (dióxido de carbono)

DP (desvio padrão)

DPPH[•] (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo)

EAG (equivalentes de ácido gálgico)

EC (equivalentes de catequina)

FAME (fatty acid methyl ester; ésteres metílicos dos ácidos gordos)

Fe (II) (complexo ferroso)

Fe (III) (complexo férrico)

FDT (fibra dietética total)

FRAP (poder antioxidante por redução do ião férrico)

GC-FID (cromatografia gasosa acoplada a detetor de ionização de chama)

GRAQ (Grupo de Reação e Análises Químicas)

HCIO (ácido hipocloroso)

HO[•] (radical hidroxilo)

H₂O₂ (peróxido de hidrogénio)

HS-SPME/GC-MS (microextração em fase sólida do espaço livre combinado com cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa)

MUFA (ácidos gordos monoinsaturados)

NaOH (hidróxido de sódio)

ND (não detetado)

NI (não identificado)

NO[•] (óxido nítrico)

O₂^{•-} (anião superóxido)

¹O₂ (oxigénio singlete)

PDMS/DVB (polidimetilsiloxano/divinilbenzeno)
PG (galhato de propilo)
PUFA (ácidos gordos polinsaturados)
RFC (reagente Folin-Ciocalteu)
RO[•] (radical alcoxilo)
ROO[•] (radical peroxilo)
ROS (espécies reativas de oxigénio)
RNS (espécies reativas de azoto)
SFA (ácidos gordos saturados)
TBHQ (*terc*-butil-hidroquinona)
TPTZ (tripiridiltriazina)
TR (tempo de retenção)
USDA (United States Department of Agriculture)
UV (ultravioleta)

I. Introdução

O homem, desde sempre, tem usufruído das plantas para a sua sobrevivência, com diversos propósitos, como medicamento, alimento, material para construção ou aquecimento (Proença da Cunha, Ribeiro e Roque, 2009a).

A flora Portuguesa tem sido reconhecida pela sua diversidade em espécies aromáticas com propriedades medicinais (Proença da Cunha, Ribeiro e Roque, 2009b). Na realidade, das cerca de 3800 espécies que compõem a cobertura vegetal do Continente e dos arquipélagos da Madeira e dos Açores, aproximadamente 500 espécies são aromáticas e/ou medicinais. Parte delas constituem uma alternativa para sistemas agrícolas sustentáveis ou para a rentabilização de terrenos marginais para a agricultura (Figueiredo, Barroso e Pedro, 2007).

As diferentes condições climáticas, certos microclimas devido aos relevos, latitude, exposição solar, natureza do solo e proximidade do mar, são fundamentais para uma flora diversificada com um número importante de plantas aromáticas endémicas em Portugal (Proença da Cunha, Ribeiro e Roque, 2009b). Os arquipélagos dos Açores e da Madeira e as Ilhas Selvagens são parte integrante da Macaronésia (do grego *makarios*-feliz e *nessos*-ilhas), proporcionando locais de excelência para o desenvolvimento de espécies endémicas. Não fazendo parte desta região, é possível observar em Portugal Continental certos endemismos particulares da Macaronésia (Fernández-Palacios *et al.*, 2011; Proença da Cunha, Ribeiro e Roque, 2009b).

As plantas aromáticas são mundialmente utilizadas para dar sabor aos alimentos e, secundariamente, para ajudar na sua conservação, devido às propriedades antioxidantes e antimicrobianas que lhes estão associadas. Essas propriedades são atribuídas à presença de metabolitos secundários, nomeadamente, compostos fenólicos, carotenoides e vitaminas C e E, entre outros (Daglia, 2012; Gülçin, 2012).

Os condimentos da família Lamiaceae, caso do alecrim, tomilho e orégãos, têm sido largamente estudados devido ao seu elevado poder antioxidante, resultante da diversidade e dos teores de compostos fenólicos que contêm. Este facto tem potenciado a sua utilização, como aditivos naturais, em produtos alimentares (Mariutti e Bragagnolo, 2007).

O loureiro, nativo da região mediterrânica, pertence à família das Lauraceae, que abrange cerca de 2500 espécies que crescem em zonas geográficas tropicais e subtropicais (Derwich, Benziane e Boukir, 2009). Esta é caracterizada por árvores de folhas aromáticas, flores pequenas e pouco vistosas, tendo como fruto uma drupa (Proença da Cunha, Ribeiro e

Roque, 2009b). Em Portugal Continental vegeta a espécie *Laurus nobilis* L. (Proença da Cunha, Ribeiro e Roque, 2009b; Sellami *et al.*, 2011). No arquipélago da Madeira está descrita e ocorre naturalmente a espécie *Laurus novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar. No arquipélago dos Açores existe e está descrita, uma outra espécie de loureiro, o *Laurus azorica* (Seub.) Franco (Ballabio e Goetz, 2010).

O loureiro desenvolve-se, preferencialmente, em climas temperados, sendo intolerante a temperaturas negativas e a geadas constantes. Embora surja em quase todo o território mediterrânico como espécie cultivada, é nos locais húmidos e sombrios que encontra as melhores condições para o seu crescimento (Proença da Cunha, Ribeiro e Roque, 2009b; Jemâa *et al.*, 2012). São árvores pouco exigentes, no que respeita ao tipo de solo, com preferência por solos leves e frescos, embora também seja possível encontrá-la em solos secos e pedregosos (Jemâa *et al.*, 2012). Estas espécies existem também na forma selvagem.

O loureiro está distribuído por toda a zona mediterrânica, e em Portugal Continental ocorre de Norte a Sul, essencialmente na zona mais litoral. Para além das suas propriedades condimentares, o louro apresenta igualmente propriedades medicinais (Simic, Kundaković e Kovačević, 2003; Marzouki *et al.*, 2009a; Ramos *et al.*, 2012). Está descrito que a infusão das suas folhas pode ajudar no combate à falta de apetite e/ou a espasmos gastrointestinais (Proença da Cunha, Ribeiro e Roque, 2009b; Neves *et al.*, 2009). Por outro lado, extratos das folhas podem ser usados em distúrbios hepáticos e para eliminar os cálculos renais (Sellami *et al.*, 2011).

De uma maneira geral, todas as plantas são capazes de sintetizar e acumular metabolitos secundários, compostos orgânicos de baixa massa molecular, com propriedades bastante diversas (Paranhos, 2010a). Estes compostos, não sendo necessários para o crescimento e desenvolvimento da planta, são produzidos em quantidades relativamente pequenas, em células especializadas. São fundamentais para garantir a proteção da planta contra os predadores, ajudam no processo de polinização para a reprodução da espécie e agem como moléculas sinalizadoras em condições de stresse (Hartmann, 2004; Hounsoume *et al.*, 2008; Paranhos, 2010a; Mazid, Khan e Mohammad, 2011). Os metabolitos secundários podem ser dotados de atividade farmacológica, sendo utilizados como matéria-prima em diferentes indústrias, tais como a farmacêutica e a alimentar (Paranhos, 2010a; Daglia, 2012).

A presença de compostos bioativos tem, atualmente, um elevado interesse económico para a indústria em geral, e em especial para a indústria alimentar. Além disso, há uma grande preferência dos consumidores por compostos naturais, em detrimento dos compostos sintéticos, nomeadamente, os antioxidantes (Pokorny, 2007; Marmesat *et al.*, 2010; Gülçin,

2012). No entanto, a produção de metabolitos secundários pelas plantas só ocorre em determinadas condições, que interferem direta ou indiretamente no metabolismo da planta (Paranhos, 2010a; Jemâa *et al.*, 2012). É o caso dos fatores genéticos, as condições edafoclimáticas, os diversos tipos de stresses a que as plantas são sujeitas e até a forma como são colhidas e conservadas (Jalal *et al.*, 2009; Paranhos, 2010a; Sellami *et al.*, 2011).

O processo de conservação, caso da secagem, permite minimizar a perda de metabolitos secundários. Com a remoção da água, ocorre a concentração dos metabolitos secundários, facilitando assim a sua identificação, extração e quantificação (Papageorgiou, Mallouchos e Komatis, 2008; Proença da Cunha e Roque, 2010b; Sellami *et al.*, 2011; Pirbalouti *et al.*, 2013).

O trabalho que se apresenta teve como objetivo caracterizar e comparar diferentes espécies de *Laurus* sp. em estado selvagem, endémicas do território nacional. Usaram-se as folhas das espécies de *L. nobilis* L., *L. azorica* (Seub.) Franco e *L. novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar, provenientes respetivamente de Portugal Continental, Açores e Madeira. O estudo incluiu a determinação do valor nutricional e do perfil dos compostos voláteis das folhas e a quantificação de compostos bioativos de extratos das folhas bem como a sua atividade antioxidante.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Loureiro

O loureiro é uma espécie de folha persistente da família das Lauraceae. Trata-se de uma espécie que integra os ecossistemas ripícolas, em associação com o amieiro, o freixo e o salgueiro. É uma árvore característica da região mediterrânica, largamente utilizada como planta ornamental e/ou medicinal. As suas folhas têm uso culinário, sendo um dos condimentos mais utilizados na culinária dos países ocidentais (Proença da Cunha, Ribeiro e Roque, 2009b). Ocorre predominantemente no litoral Oeste do continente português (Figura 1), devido à natureza dos solos húmidos, locais sombrios e ausência de geadas prolongadas (<http://www.florestar.net/loureiro/loureiro.html>).

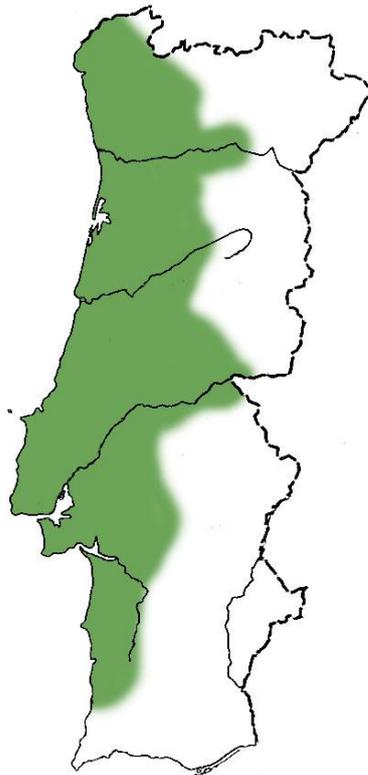


Figura 1. Zona geográfica mais representativa da plantação do *Laurus nobilis* L. (Retirado do site <http://www.florestar.net/loureiro/loureiro.html>).

O loureiro é uma árvore que pode ultrapassar os 10 metros de altura, com uma longevidade superior a 100 anos (Proença da Cunha, Ribeiro e Roque, 2009b). É uma espécie com grande potencial ornamental e paisagístico, sendo frequentemente utilizada em arranjos paisagísticos nos países da região mediterrânica.

2.1.1. *Laurus nobilis* L.

O loureiro continental (*L. nobilis* L.) é conhecido por loureiro-vulgar, loureiro comum, loureiro-dos-Poetas, louro e sempre verde (Proença da Cunha, Ribeiro e Roque, 2009b).

O loureiro continental é uma espécie distinta das espécies encontradas nos arquipélagos, *L. azorica* (Seub.) Franco (Açores) e *L. novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar (Madeira). A sua distinção das outras espécies é possível sobretudo pela presença de nervuras secundárias muito retas, salientes e que atingem a margem das folhas, bem como pelo indumento das folhas e pecíolos castanho-acobreado (<http://www.florestar.net/loureiro/loureiro.html>) (Figura 2).



Figura 2. Folhas de *Laurus nobilis* L.

As folhas e os óleos essenciais são utilizados devido às propriedades benéficas que lhe são atribuídas, tais como tratamento de dores musculares, em formulações dermatológicas para o tratamento de micoses e da psoríase, e na indústria alimentar como produto aromatizante de alimentos pré-preparados e na preparação de molhos (Proença da Cunha, Ribeiro e Roque, 2009b). Para além do *L. nobilis* L. muitas outras espécies pertencentes a esta família apresentam interesse económico. São o caso da canforeira (*Cinnamomum camphora* (L.) H. Sieb.) que é utilizada para a obtenção da essência de cânfora e o abacateiro (*Persea americana* Miller) para a obtenção de óleos essenciais das folhas e cascas (Proença da Cunha, Ribeiro e Roque, 2009b).

2.1.2. *Laurus azorica* (Seub.) Franco

A espécie *L. azorica* (Seub.) Franco (Figura 3), habitualmente designada por loureiro, louro da terra, louro ou louro de cheiro, pode ser considerada uma espécie nativa e pioneira da floresta Laurisilva das ilhas açorianas, sendo considerada uma importante espécie desta floresta (Rosa *et al.*, 2010; Elias e Dias, 2009; Ballabio e Goetz, 2010).



Figura 3. Folhas de *Laurus azorica* (Seub.) Franco.

Até há pouco tempo, o *L. azorica* (Seub.) Franco foi considerado uma espécie endémica dos arquipélagos dos Açores e da Madeira. No entanto, alguns dados taxonómicos provaram a existência de diferenças entre o *L. azorica* (Seub.) Franco e o *L. novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar (Ferrari *et al.*, 2005; Ballabio e Goetz, 2010).

Tal como no *L. nobilis* L., a espécie *L. azorica* (Seub.) Franco tem sido utilizada para diferentes fins, nomeadamente, culinários e medicinais (Medeiros *et al.*, 2000; Pedro *et al.*, 2001). Muitos estudos referem que os frutos e os óleos essenciais são utilizados, na medicina tradicional, como antisséptico em manipulações para a pele. O óleo essencial é utilizado externamente para tratar dores reumáticas, cicatrizante em furúnculos, no tratamento da apoplexia e problemas respiratórios. Os óleos extraídos das folhas apresentam atividade hepatoprotetora e inseticida (Pedro *et al.*, 2001; Rosa *et al.*, 2010).

2.1.3. *Laurus novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar

O *L. novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar é o nome pelo qual é conhecido cientificamente o loureiro endêmico do arquipélago da Madeira e das Canárias (Ballabio e Goetz, 2010). São árvores que podem ter até 20 metros de altura, perenifólia, de copa bastante densa. As folhas têm formas variadas, lanceoladas, ovadas, oblongas ou elípticas, com 5 a 17 centímetros de comprimento, aromáticas, glabras na página superior e geralmente tomentosas na página inferior, quando jovens (Figura 4).



Figura 4. Folhas de *Laurus novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar.

As folhas desta espécie têm sido utilizadas na gastronomia dos Madeirenses e os seus ramos são utilizados como espetos na tradicional espetada da Madeira (Proença da Cunha, Ribeiro e Roque, 2009b). As bagas do loureiro são utilizadas para a produção do "azeite de louro", usado na medicina popular no tratamento de infeções na pele, antireumático, constipações, doenças respiratórias e gripe (Luna-Herrera *et al.*, 2007; Ballabio e Goetz, 2010). São muitas as plantas regionais, endémicas ou não, que têm sido utilizadas, ao longo dos tempos, sob diversas formas, para o tratamento de algumas disfunções. O *L. novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar, desde a folha à baga é uma das espécies que tem uma maior aplicação na medicina popular. Segundo Tinoco, Ramos e Candeias (2009), o extrato da folha de *L. novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar tem um efeito contra o aumento dos níveis de etanol na corrente sanguínea de ratos winstar. Um estudo realizado por Luna-Herrera *et al.* (2007) atribuiu propriedades antibacterianas a esta espécie.

2.2. Partes da planta utilizadas com fins terapêuticos

Toda a planta é utilizada para a elaboração de produtos usados em medicina popular. As folhas são, sem dúvida, as partes mais utilizadas, embora as flores, os frutos, a casca, o caule, as raízes, as sementes e os rizomas sejam também matrizes vegetais com possível ação terapêutica. O motivo pelo qual as folhas são as partes mais utilizadas prende-se com a sua disponibilidade, opulência e facilidade de aquisição (Rivera e Obón, 1995; Neves *et al.*, 2009; Karousou e Deirmentzoglou, 2011). As folhas são também um meio de diferenciação e reconhecimento das plantas (Neves *et al.*, 2009). Devido ao facto de se encontrarem mais expostas a fatores adversos (predadores, condições climáticas e pragas), as folhas produzem elevadas quantidades de metabolitos secundários que, embora não sejam necessários para o desenvolvimento e crescimento da planta, são indispensáveis para a sua proteção (Karousou e Deirmentzoglou, 2011).

2.3. Metabolitos secundários

Todos os seres vivos têm a sua atividade metabólica, sendo o metabolismo o conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células e, no caso concreto das células vegetais, o metabolismo é dividido em primário e secundário (Seigler, 1998; Crozier, Jaganath e Clifford, 2006a).

Entende-se por metabolismo primário o conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial na planta, tais como o crescimento, o desenvolvimento, a respiração, a fotossíntese e a síntese de proteínas. Os compostos envolvidos exibem uma distribuição universal nas plantas, entre os quais se podem citar os aminoácidos, os lípidos, os ácidos nucleicos, os hidratos de carbono, a clorofila e os ácidos orgânicos (Hounsou et al., 2008; Ghasemzadeh e Jaafar, 2011).

O metabolismo secundário promove a síntese de compostos que exercem propriedades importantes, quer na planta quer nos predadores que as consomem. Por essa razão, têm sido alvo de muitos estudos (Shaaya *et al.*, 1997; Mazid, Khan e Mohammad, 2011; Daglia, 2012). Estes metabolitos são sintetizados a partir dos produtos do metabolismo primário, por distintas vias metabólicas, que diferem na forma como são reguladas (Russell e Duthie, 2011; Bartwal *et al.*, 2013).

Os metabolitos secundários, devido à complexidade da sua natureza química, podem formar três grupos primordiais: compostos fenólicos, terpenos e compostos azotados tais como os

alcalóides (Bartwal *et al.*, 2013).

Apesar das plantas não possuírem um sistema imunológico como os animais, elas desenvolveram uma série de mecanismos de proteção que lhes permite tornarem-se mais resistentes a doenças e pragas.

A resistência pode ser aumentada através de mudanças anatômicas (por exemplo: células epidérmicas mais espessas com mais teor de cutina e maior grau de linhificação) e mudanças nas propriedades fisiológicas e bioquímicas (por exemplo: maior produção de substâncias repelentes ou inibidoras). A resistência pode ainda ser potenciada pela alteração nas respostas da planta ao ataque de parasitas através do aumento da formação de barreiras mecânicas (linhificação) e/ou da síntese de fitoalexinas (Yamada, 2004; Grobkinsky, Graaff e Roitsch, 2012).

O conhecimento das principais vias de produção dos metabolitos secundários é importante para melhorar o conhecimento dos fatores que podem interferir na quantidade destes compostos, tais como as condições edafoclimáticas, práticas agrícolas e, obviamente a diferença entre espécies (Yamada, 2004).

2.3.1. Antioxidantes

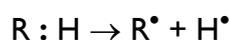
Entende-se por antioxidante toda e qualquer substância capaz de impedir ou reduzir o processo oxidativo dos substratos oxidáveis (Gülçin, 2012). Em relação aos alimentos, pode-se definir um antioxidante como “uma substância que em pequenas quantidades é capaz de prevenir ou retardar a oxidação de materiais facilmente oxidáveis” (Becker, Nissen e Skibsted, 2004; Gülçin, 2012).

Os diferentes compostos antioxidantes podem possuir atividade enzimática ou não. Exemplos de antioxidantes enzimáticos são a superóxido dismutase, a catalase, a glutathione peroxidase e a glutathione reductase. Os antioxidantes não enzimáticos incluem os antioxidantes sintéticos e os naturais (α -tocoferol, β -caroteno, ácido ascórbico e os compostos fenólicos, nomeadamente, flavonoides, ácidos fenólicos, entre outros) (Ndhlala, Moyo e Staden, 2010).

As propriedades antioxidantes, sendo muito importantes para a sobrevivência da planta, são, igualmente, essenciais para a estabilização dos alimentos (Brewer, 2011). Daí o interesse dos compostos antioxidantes na indústria alimentar, visando retardar a oxidação dos lípidos (provavelmente os compostos mais sensíveis à oxidação). A sua utilização promove a

qualidade e valor nutricional dos alimentos. Assim, para prevenir ou retardar a deterioração oxidativa nos produtos alimentares, recorre-se a aditivos, nomeadamente antioxidantes de origem natural ou sintética. Atualmente, o interesse recai sobre os antioxidantes de origem natural (Gülçin, 2012).

Para avaliar a importância da atividade antioxidante, é essencial conhecer o mecanismo de formação dos radicais livres e a subsequente degradação dos produtos alimentares. Um radical livre é qualquer espécie com existência independente que contém um ou mais eletrões desemparelhados. A presença destes eletrões torna as espécies altamente reativas. A formação desses radicais decorre da rutura de uma ligação covalente, em que cada eletrão partilhado fica no seu átomo (cisão homolítica) (Vinha, 2010).

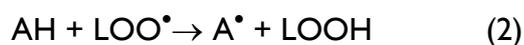


Os radicais livres podem reagir com outras moléculas, partilhando os seus eletrões desemparelhados, formando uma ligação covalente:



Um radical pode, no entanto, doar um eletrão desemparelhado a outra molécula, retirar um eletrão de outra molécula para formar um par de eletrões (radical ionizante) ou pode, ainda, combinar-se com espécies não radicalares. Em qualquer dos casos essa molécula torna-se um radical livre, prosseguindo a reação em cadeia (Kumar, 2011; Gülçin, 2012).

A mecânica de atuação dos antioxidantes é similar entre eles. Um antioxidante primário (flavonoides e ácidos fenólicos) tem capacidade de doar átomos de hidrogénio ou eletrões aos radicais livres (Bouayed e Bohn, 2010; Gülçin, 2012). Quando presentes em quantidades vestigiais podem retardar ou mesmo inibir o passo de iniciação, reagindo com um radical lipídico livre (Equação 1), ou inibir o passo de propagação, por reação com radicais peróxido (Equação 2) e radicais alcóxido (Equação 3) (Vinha, 2010).



O radical formado (A^\bullet) tem uma reatividade baixa e não reage com os lípidos. No entanto, estes radicais podem interferir com as cadeias de propagação, levando à formação de complexos peróxido-antioxidante (Equação 4) e alcóxido-antioxidante (Equação 5) (Vinha, 2010).



Na indústria alimentar, a adição de antioxidantes sintéticos, como o BHA (hidroxianisol butilado), BHT (hidroxitolueno butilado), TBHQ (*tert*-butil-hidroquinona) e o PG (galhato de propilo), tem sido prática frequente para a preservação de alimentos (Gülçin, 2010). No entanto, têm surgido trabalhos que questionam a sua inocuidade. Por tal facto, iniciaram-se estudos para avaliar o potencial de aplicação de antioxidantes naturais, provenientes de plantas, de forma a substituir os sintéticos, sem prejuízo da qualidade dos alimentos (Dimitrios, 2006; Christaki *et al.*, 2012).

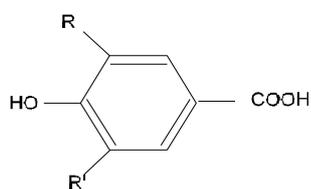
Compostos fenólicos

A determinação dos teores de compostos fenólicos totais é uma das etapas iniciais em qualquer investigação de funcionalidade fisiológica de plantas, para posterior estímulo ao consumo, visando a prevenção de doenças crónicas ou degenerativas (Vinha, 2010). Nos vegetais são numerosas as substâncias de carácter fenólico: ácidos fenólicos, flavonoides e taninos (Daglia, 2012).

Os compostos fenólicos possuem estruturas químicas heterogéneas e podem encontrar-se na forma livre ou conjugada. Também se podem ligar a outros compostos principalmente açúcares, como a glucose, galactose, xilose e ramnose, aumentando ainda mais a diversidade estrutural destes compostos (Crozier, Jaganath e Clifford, 2006a).

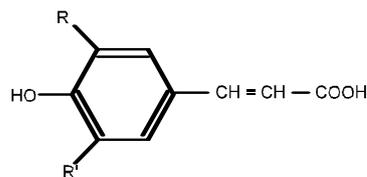
A denominação geral de ácidos fenólicos engloba os ácidos benzóicos com sete átomos de carbono ($C_6 - C_1$) e os ácidos cinâmicos com nove átomos de carbono ($C_6 - C_3$); estão normalmente hidroxilados, daí a designação ácidos hidroxibenzóicos (AHB) (Figura 5) e ácidos hidroxicinâmicos (AHC) também conhecidos por fenilpropanóides (Figura 6) (Proença da Cunha e Roque, 2010c; Gülçin, 2012).

Têm sido atribuídas diferentes atividades biológicas a estes compostos, destacando-se a atividade antitumoral e atividades antioxidante e antimicrobiana (Dai e Mumper, 2010; Albayrak *et al.*, 2012; Daglia, 2012; Inan, Özcan e Juhaimi, 2012).



R = R' = H; Ácido *p*-hidroxibenzoico;
 R = OH, R' = H; Ácido protocatéquico;
 R = OCH₃, R' = H; Ácido vanílico;
 R = R' = OH; Ácido gálgico;
 R = R' = OCH₃; Ácido siríngico.

Figura 5. Estrutura dos ácidos hidroxibenzoicos (Retirado de Vinha, 2010).



R = R' = H; Ácido *p*-cumárico;
 R = OH, R' = H; Ácido cafeico;
 R = OCH₃, R' = H; Ácido ferúlico;
 R = R' = OCH₃; Ácido sinápico.

Figura 6. Estrutura dos ácidos hidroxicinâmicos (Retirado de Vinha, 2010).

Flavonoides

Os flavonoides constituem uma ampla classe de substâncias de origem vegetal, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Têm uma série de propriedades fisiológicas e atuam em diversos sistemas biológicos (Crozier, Jaganath e Clifford, 2006a).

Na natureza, os flavonoides atuam como sinais químicos na floração e polinização das plantas, promovendo a fertilidade e a germinação do pólen, bem como a regulação do crescimento da planta e a atividade enzimática (Crozier, Jaganath e Clifford, 2006a; Buer, Imin e Djordjevic, 2010; Samanta, Das e Das, 2011; Agati *et al.*, 2012). São responsáveis pelas cores das plantas e dos frutos. Exercem ação protetora contra os raios ultravioleta (UV)

(Campos, 2010d; Garcia-Salas *et al.*, 2010; Agati *et al.*, 2012) e são considerados como agentes de defesa contra microrganismos patogênicos (Pietta, 2000; Bartwal *et al.*, 2013). Estes compostos são reconhecidos por terem uma elevada atividade antioxidante contra os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio (Campos, 2010d; Proestos *et al.*, 2013); ação estrogênica e antiproliferativa (promovem a diferenciação celular e a apoptose), razões pelas quais têm sido alvo da maior atenção por parte dos investigadores mundiais (Birt, Hendrich e Wang, 2001; Ren *et al.*, 2003; Meiyanto, Hermawan e Anindyajati, 2012; Xia *et al.*, 2013). Do ponto de vista químico, os flavonoides constituem substâncias com 15 átomos de carbono no seu esqueleto básico (Figura 7). Este grupo de compostos polifenólicos apresenta uma estrutura comum, caracterizada por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado que pode ou não ciclizar (anel C), formando um sistema C₆-C₃-C₆. Do ponto de vista biossintético, os flavonoides são formados pela união de duas subunidades, uma proveniente do ácido chiquímico e outra da via do ácido malónico. Atualmente, já foram identificadas mais de 4000 substâncias pertencentes a este grupo de compostos secundários (Crozier, Jaganath e Clifford, 2006a; Gülçin, 2012).

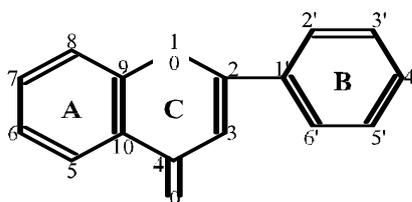


Figura 7. Estrutura geral dos flavonoides (Retirado de Vinha, 2010).

De acordo com o grau de oxidação do heterociclo oxigenado, os flavonoides agrupam-se em classes distintas (Figura 8) (Vinha, 2010).

Para além das suas propriedades biológicas, os flavonoides também são de grande interesse na alimentação, na indústria de cosméticos e na indústria farmacêutica, devido ao facto de poderem ser usados como substitutos de antioxidantes sintéticos (Christaki *et al.*, 2012; Gülçin, 2012).

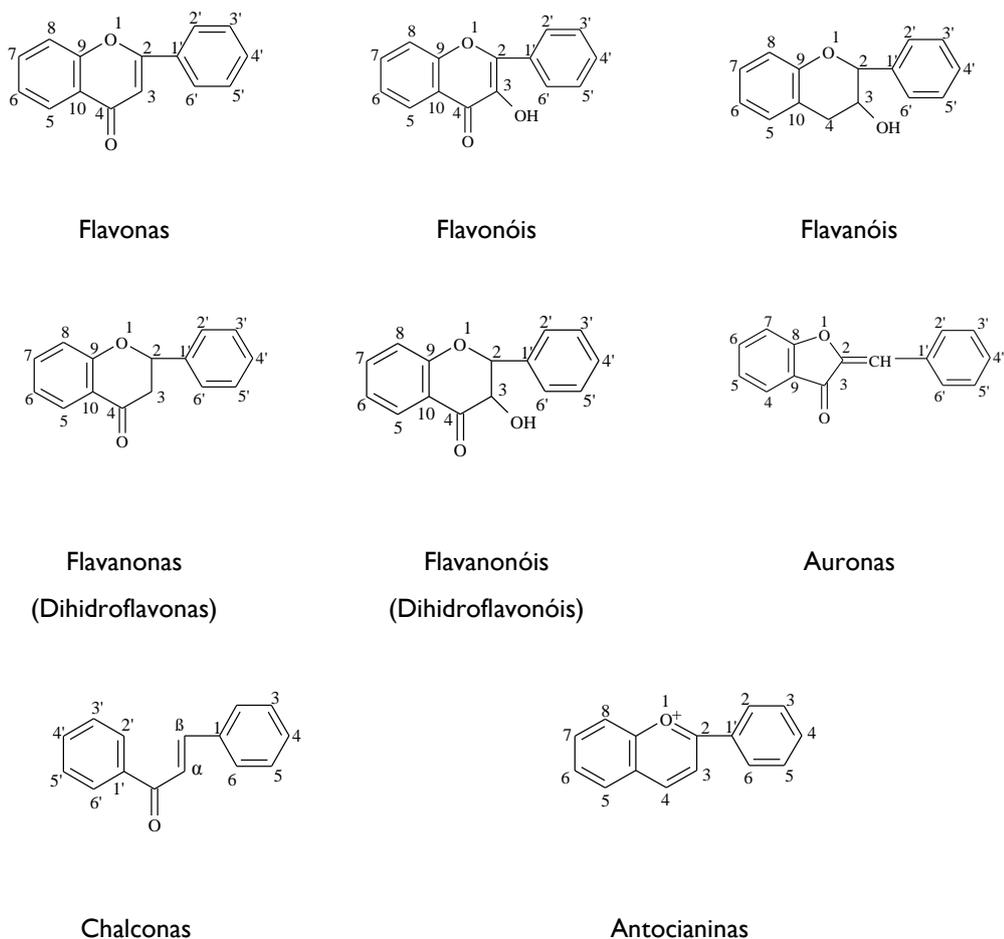


Figura 8. Diferentes classes dos flavonoides (Retirado de Vinha, 2010).

Taninos

Inicialmente o termo “tanino” aplicava-se a substâncias de origem vegetal, utilizadas pelas suas propriedades para curtir as peles, isto é, capazes de transformar a pele fresca dos animais em material imputrescível e com pouca permeabilidade (Proença da Cunha e Batista, 2010e).

Atualmente, e pelo conhecimento das suas estruturas químicas, podem-se definir como compostos fenólicos hidrossolúveis, com massas moleculares entre 500 e 3000 que, por hidrólise, originam fenóis e que são capazes de precipitar proteínas e alcaloides. Uma das características mais relevantes dos taninos é a sua adstringência, resultante de interações hidrofóbicas e das ligações de hidrogénio entre os grupos fenólicos destes com outras macromoléculas. A formação de complexos entre os taninos e as proteínas confere também a estes compostos um papel importante no controlo da contaminação por bactérias, fungos e/ou insetos (Proença da Cunha e Batista, 2010e).

No reino vegetal é possível encontrar três grupos de taninos estruturais e biogeneticamente diferentes (Figura 9): os taninos hidrolisáveis, os condensados ou proantocianidinas e os taninos complexos (Proença da Cunha e Batista, 2010e).

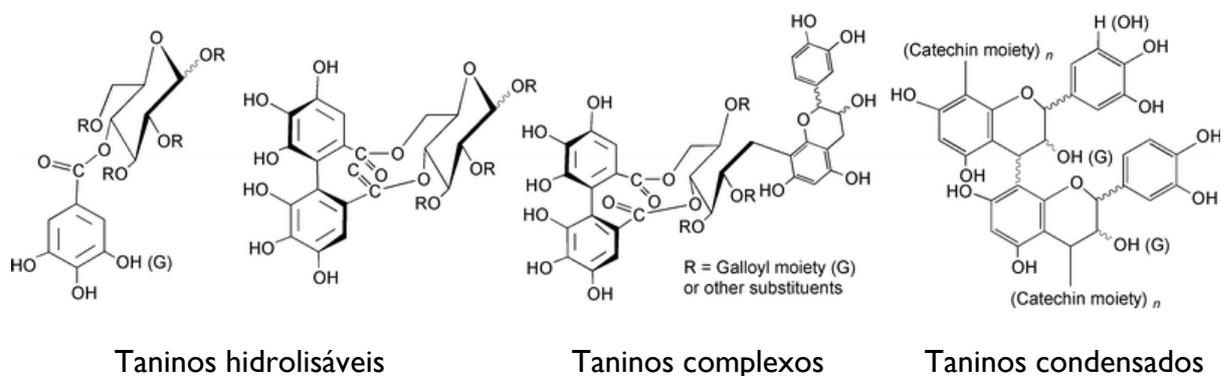


Figura 9. Taninos hidrolisáveis e alguns compostos derivados (Retirado de Khanbabaee e Ree, 2001).

O papel biológico da maioria dos taninos, nas plantas, resume-se à proteção contra herbívoros, insetos ou infeções (Proença da Cunha e Batista, 2010e; Bartwal *et al.*, 2013). Na medicina, os taninos são utilizados no tratamento de diarreias, distúrbios gastrointestinais, como anti-inflamatórios, antissépticos e hemostáticos (Khanbabaee e Ree, 2001; Okigbo, Anuagasi e Amadi; 2009; Proença da Cunha e Batista, 2010e; Vinha *et al.*, 2012).

Estudos recentes têm demonstrado que os taninos, tal como os fenóis e os flavonoides, atuam como captadores de radicais e como compostos antioxidantes, facto que tem merecido um grande interesse por parte da indústria farmacêutica e alimentar (Proença da Cunha e Batista, 2010e).

Terpenos

Os terpenos ou terpenóides constituem o maior grupo de metabolitos secundários de origem vegetal, sendo abundantes nos óleos essenciais produzidos pelas plantas aromáticas (Proença da Cunha, Cavaleiro e Salgueiro, 2010f). Os óleos essenciais são dotados de aroma e são misturas complexas de compostos aromáticos voláteis produzidos por algumas plantas. São responsáveis pelas características odoríferas, próprias das plantas aromáticas, possuindo uma diversidade de atividades biológicas, destacando-se a atividade antimicrobiana (Proença da Cunha, Cavaleiro e Salgueiro, 2010f).

De uma forma geral, os óleos essenciais são insolúveis em meio aquoso. São tóxicos e deletérios para muitos insetos e mamíferos herbívoros, assumindo uma função de defesa importante contra os predadores. Estes compostos também intervêm na regulação da evapotranspiração, atuam como polinizadores e participam no processo germinativo e no desenvolvimento das espécies vegetais (Proença da Cunha, Cavaleiro e Salgueiro, 2010f).

Quimicamente os terpenos são formados por sucessivas unidades de isopreno (C_5), podendo classificar-se em monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}) (Bartwal *et al.*, 2013). Nos óleos essenciais predominam os terpenos mais voláteis, nomeadamente, os monoterpenos e os sesquiterpenos (Proença da Cunha, Cavaleiro e Salgueiro, 2010f).

Muitas plantas aromáticas, tais como a menta, tomilho e eucalipto são conhecidas por produzirem compostos monoterpénicos com grande valor industrial como o mentol, o timol e o 1,8-cineol, respetivamente (Proença da Cunha, Cavaleiro e Salgueiro, 2010f).

Os terpenos têm um grande valor económico, como aditivos alimentares e aromatizantes, na indústria alimentar e de bebidas, sendo também usados na indústria farmacêutica, perfumaria e cosmética (Humphrey e Beale, 2006b; Proença da Cunha, Cavaleiro e Salgueiro, 2010f).

3. Atividades Biológicas do *Laurus* sp.

A expressão "plantas aromáticas, medicinais e condimentares" é utilizada, indistintamente, para designar um grupo de plantas que se distinguem por determinadas características. Contudo, existem plantas com características exclusivamente medicinais, apesar de haver outras espécies que integram os três grupos (aromáticas, medicinais e condimentares) (<http://www.quintinha.com/Quintinha/files/Plantas%20AMC.pdf>).

As plantas aromáticas caracterizam-se por produzirem óleos essenciais em quantidade significativa, que lhes conferem propriedades odoríferas, podendo ser isoladas por destilação e/ou expressão, no caso dos frutos do género *Citrus* (Proença da Cunha, Cavaleiro e Salgueiro, 2010f).

As plantas medicinais são as espécies vegetais que sintetizam, em pelo menos um órgão, metabolitos secundários, princípios ativos capazes de alterar as funções fisiológicas do organismo humano e/ou animal com propriedades farmacológicas reconhecidas. (<http://www.quintinha.com/Quintinha/files/Plantas%20AMC.pdf>).

As plantas condimentares podem ser descritas como as espécies vegetais normalmente ricas em óleos essenciais, constituindo um subproduto das plantas aromáticas e que, devido às suas características organolépticas e químicas são utilizadas na culinária. (<http://www.quintinha.com/Quintinha/files/Plantas%20AMC.pdf>).

O louro, além de ser um condimento muito usado na culinária, tem efeito antioxidante devido à sua composição rica em compostos fenólicos (Simic, Kundaković e Kovačević, 2003; Albayrak *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, o louro tem sido alvo de investigação, nomeadamente, na caracterização química e quantificação de metabolitos secundários relacionados com diversas atividades biológicas. Tem funções fisiológicas importantes, tais como antioxidante, antidiabético, antimicrobiano, analgésico, anti-inflamatório, antifúngico e antiviral, uma vez mais, devido aos elevados teor de compostos bioativos que contém (Emam *et al.*, 2010; Ouchikh *et al.*, 2011; Albayrak *et al.*, 2012).

A atividade antioxidante é a que desperta mais atenção por parte da comunidade científica devido aos benefícios na saúde pública, contribuindo para a prevenção de doenças crónicas, como o cancro, as doenças cardiovasculares e neurológicas, e as disfunções provocadas pelo stress oxidativo. Segundo vários estudos publicados recentemente, a riqueza de diferentes metabolitos secundários, potencia o reconhecido valor medicinal do louro (Ouchikh *et al.*, 2011; Inan, Özcan e Juhaimi, 2012; Ramos *et al.*, 2012).

Vários estudos provaram que os extratos das folhas de *L. nobilis* L. e os óleos essenciais apresentam atividades biológicas distintas (Tabela I).

Tabela I. Atividades biológicas dos óleos essenciais e dos extratos das folhas de *L. nobilis* L., *L. azorica* (Seub.) Franco e *L. novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar.

Espécies	Atividades biológicas
<i>L. nobilis</i> L.	Anticonvulsiva (Sayyah, Valizadeh e Kamalinejad, 2002).
	Analgésica e anti-inflamatória (Sayyah et al., 2003).
	Inibição da produção de óxido nítrico (De Marino et al., 2004).
	Inibição da acetilcolinesterase (Ferreira et al., 2006).
	Ação anti-inflamatória e antitumoral (Kaileh et al., 2007).
	Ação antifúngica e antibacteriana (Marzouki et al., 2009b).
	Inibição da proliferação celular (Kim et al., 2011).
	Ação inseticida (Jemâa et al., 2012).
	Ação antioxidante e antibacteriana (Ramos et al., 2012).
	Ação antitumoral e antioxidante (Saab et al., 2012).
<i>L. azorica</i> (Seub.) Franco	Ação anticoagulante (Medeiros et al., 2000).
	Ação inseticida (Rosa et al., 2010).
<i>L. novocanariensis</i> Rivas Mart ...	Atividade acaricida (Macchioni et al., 2006).
	Atividade antifúngica (Rodilla et al., 2008).
	Inibição da absorção do álcool no sangue (Tinoco, Ramos e Candeias, 2009).
	Atividade protetora na pele (Viciolle, Castilho e Rosado, 2012).

3.1. Atividade antioxidante e antimicrobiana

O estilo de vida atual impulsiona em alguns consumidores hábitos alimentares menos saudáveis, levando a um consumo reduzido em alimentos ricos em antioxidantes. A má alimentação associada ao stresse, poluição ambiental, sedentarismo e processos metabólicos que ocorrem continuamente no organismo, produzem radicais livres sob a forma de espécies reativas de oxigénio (ROS) e espécies reativas de azoto (RNS) (Emam et al., 2010; Gülçin, 2012).

As espécies radicais como o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxilo (HO^{\cdot}), o radical peróxilo (ROO^{\cdot}), o radical alcoxilo (RO^{\cdot}) e o óxido nítrico (NO^{\cdot}) são exemplos de espécies reativas de oxigénio, existindo outras espécies de ROS não radicais como o oxigénio singleto (1O_2), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HClO) (Gülçin, 2012).

A produção de ROS em concentrações moderadas no organismo humano acarreta benefícios para as células, visto estarem envolvidos em vários processos fisiológicos como a ativação do sistema imunitário contra agentes patogênicos, desintoxicação e transmissão de sinais químicos (Gülçin, 2012).

A produção excessiva de ROS provoca a oxidação nos lípidos, proteínas, hidratos de carbono e mutações no ADN, promovendo danos, impedindo a sua função normal e conduzindo ao aparecimento de doenças (Gülçin, 2012).

A oxidação lipídica causa a deterioração dos alimentos, com alterações sensoriais devidas especialmente, aos ácidos gordos polinsaturados oxidados, produzindo odores e sabores desagradáveis. Estes fatores diminuem a qualidade nutricional e organolética dos géneros alimentícios e dos alimentos processados, limitando assim o tempo de vida útil dos mesmos (Gülçin, 2012; Inan, Özcan e Juhaimi, 2012).

A eliminação de ROS pelo organismo é feita através de antioxidantes endógenos, evitando assim a oxidação que pode desencadear o aparecimento de doenças, resultando num equilíbrio entre a oxidação e os antioxidantes que a previnem. No entanto, a produção excessiva de ROS e a insuficiência de antioxidantes para a sua eliminação, provoca um desequilíbrio, o chamado stresse oxidativo (Bouayed e Bohn, 2010; Gülçin, 2012).

Embora o organismo possua mecanismos de defesas endógenas (antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos) capazes de repararem os danos causados ou eliminarem os radicais livres, estes potenciam a sua ação, atuando sinergicamente com defesas obtidas por via exógena, especialmente antioxidantes não enzimáticos (Bouayed e Bohn, 2010; Gülçin, 2012).

Diversos estudos realizados em louro têm demonstrado a sua atividade antioxidante, visto que contém na sua composição compostos bioativos, como os compostos fenólicos (Albayrak *et al.*, 2012) e derivados, nomeadamente, flavonoides (Emam *et al.*, 2010; Kaurinovic, Popovic e Vlaisavljevic, 2010), α -tocoferol (Ouchikh *et al.*, 2011) e compostos voláteis (Conforti *et al.*, 2006; Politeo, Jukić e Miloš, 2007; Ramos *et al.*, 2012; Saab *et al.*, 2012).

Os metabolitos secundários, como os compostos fenólicos e terpenos, apresentam atividade antimicrobiana devido à capacidade de poderem atuar em diferentes alvos bioquímicos dos microrganismos, suprimindo uma série de fatores (Simões, Bennett e Rosa, 2009; Proença da Cunha, Cavaleiro e Salgueiro, 2010f; Daglia, 2012).

Os compostos fenólicos podem inibir a síntese de ácidos nucleicos tanto de bactérias Gram (+) como Gram (-), interrupção da produção de energia, inibição da formação de biofilmes,

diminuição da aderência ao hospedeiro e a neutralização de toxinas bacterianas. Podem atuar sinergicamente com os antimicrobianos (Simões, Bennett e Rosa, 2009; Daglia, 2012). Os terpenos estão envolvidos na interrupção da membrana das bactérias, resultando na expansão da membrana, aumento da fluidez e permeabilidade da membrana, interferência nas proteínas incorporadas na membrana, inibição da respiração e alteração de processos de transporte de íons tanto em bactérias Gram (+) como Gram (-) (Simões, Bennett e Rosa, 2009; Proença da Cunha, Cavaleiro e Salgueiro, 2010f).

São vários os estudos efetuados em louro que comprovaram a sua atividade antimicrobiana devido aos metabolitos secundários presentes na sua composição. Um estudo realizado nas folhas de *L. nobilis* L. revelou que os óleos essenciais possuem forte atividade antibacteriana devido aos compostos voláteis, assim como os extratos etanólico e aquoso (Ramos, *et al.*, 2012). Outros estudos efetuados igualmente nas folhas de *L. nobilis* L. demonstraram que os óleos essenciais possuem atividade antibacteriana (Derwich, Benziane e Boukir, 2009; Ivanović *et al.*, 2010) e antimicrobiana (Marzouki *et al.*, 2009b).

Ozcan *et al.* (2009) estudaram e demonstraram que os óleos essenciais das folhas, o óleo de sementes e o extrato metanólico de óleo de sementes de *L. nobilis* L. possuem atividade antimicrobiana, resultado dos compostos fenólicos e voláteis presentes na sua composição, verificando-se também no extrato metanólico das folhas (Albayrak *et al.*, 2012).

Foram estudados extratos etanólicos de folhas, frutos, flores e casca do caule de *L. nobilis* L. e verificou-se que todas estas partes da planta têm atividade antimicrobiana, resultante da sua composição em determinados metabolitos secundários (Al-Hussaini e Mahasneh, 2011).

Para além dos estudos efetuados em *L. nobilis* L. foi igualmente concretizada uma investigação no *L. novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar onde foi comprovada a atividade antifúngica dos óleos essenciais das folhas (Rodilla, *et al.*, 2008).

4. Objetivo

Este trabalho teve como objetivo principal caracterizar as espécies endémicas *L. azorica* (Seub.) Franco e *L. novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar dos Açores e Madeira, respetivamente, e fazer a comparação com a espécie autóctone *L. nobilis* L. de Portugal Continental.

Para o seu cumprimento:

- Fez-se a caracterização nutricional das 3 espécies, usando as folhas secas.
- Avaliou-se ainda a composição em compostos voláteis de folhas frescas e secas.
- Para a avaliação do teor em compostos antioxidantes e da capacidade antioxidante usaram-se extratos de folhas secas das 3 espécies em estudo. Nesta fase do trabalho estudou-se o comportamento de diferentes solventes, visando obter o melhor compromisso entre teores extraídos de compostos bioativos e a sustentabilidade do processo.

5. Materiais e Métodos

O trabalho laboratorial decorreu nos Laboratórios do Departamento de Ciências Químicas da Faculdade de Farmácia do Porto e do GRAQ, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP).

5.1. Recolha e tratamento das amostras

A amostra era constituída por folhas de louro usadas como condimento. Usaram-se 3 espécies de *Laurus* de origens diferentes, conforme já referido. As determinações foram efetuadas em folhas frescas e secas.

As folhas de *L. nobilis* L. foram colhidas em Julho de 2012 em Freixieiro do Soutelo, Viana do Castelo.

As folhas de *L. novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar foram colhidas em Agosto de 2012 no Funchal, Ilha da Madeira.

As folhas de *L. azorica* (Seub.) Franco foram colhidas em Julho de 2012 na Ilha do Pico, Açores.

As folhas frescas foram sujeitas a um processo de secagem durante 3 semanas, a uma temperatura de 25 °C para se obterem as folhas designadas secas.

As folhas, frescas e secas, foram pulverizadas em moinho e, posteriormente, utilizadas na avaliação dos vários parâmetros propostos.

5.2. Reagentes e equipamentos

Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

Determinação do teor total de gordura:

Sulfato de sódio anidro (Merck, Darmstadt, Germany);

Éter de petróleo (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.).

Determinação do teor de proteína:

Sulfato potássio – Kjeldahl tablets (47,7% Na₂SO₄; 47,7% K₂SO₄; 2,8% TiO₂; 1,8% CuSO₄) (Merck, Darmstadt, Germany);

Ácido sulfúrico 96% (Absolve, Odivelas, Portugal);

Hidróxido de sódio 32%;

Ácido bórico a 4%.

Determinação do teor total de fibra dietética:

Etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Germany);

Acetona (Merck, Hohenbrum, Germany);

α -Amilase termoestável, protease e amilogucosidase (TDF-100A, SIGMA Aldrich, St. Louis, U.S.A.).

Determinação do perfil de ácidos gordos:

Metanol (VWR International, Leuven, Belgium);

Trifluoreto de boro (SIGMA Aldrich, St. Louis, U.S.A.);

Mistura de padrões de ácidos gordos (FAME 37, Supelco, Bellefonte, U.S.A.).

Extração dos compostos bioativos:

Etanol absoluto (Fisher Chemical, Loughborough, U.K.);

Água desionizada;

Ácido gálico (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.);

Reagente Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Germany);

Carbonato de sódio (Merck, Darmstadt, Germany);

Hidrato de catequina (SIGMA Aldrich, Inc., St. Louis, U.S.A.);

Nitrito de sódio (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.);

Cloreto de alumínio (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.);

Hidróxido de sódio (Merck, Darmstadt, Germany).

Determinação da atividade antioxidante:

DPPH[•] (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.);

TPTZ (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.);

Cloreto férrico (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.);

Sulfato ferroso (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.).

Equipamentos

Moinho (GM 200, RETSCH, Haan, Germany).

Balança eletrónica de determinação de humidade (Scaltec modelo SMO01, Scaltec Instruments, Heiligenstadt, Germany).

Mufla (Thermolyne 48000, F48010-26, Electrothermal Engineering Ltd, Essex, United Kingdom).

Dispositivo de extração em Soxhlet.

Digestor (K-424, BUCHI Labortechnik AG, Switzerland).

Destilador (KjelFlex K-360, BUCHI Labortechnik AG, Switzerland).

Digestor enzimático (GDE, VELP[®] Scientifica, Usmate, Italy).

Sistema de filtração (CSF-6, VELP[®] Scientifica, Usmate, Italy).

GC-FID (Shimadzu GC-2010, Shimadzu, Columbia, U.S.A.).

GC-MS (Thermo- Electron Corporation, Austin, U.S.A.).

Placa de agitação (VARIOMAG, TELEMODUL 40 CT, H+P Labortechnik, Germany).

Vortex (VWR INTERNATIONAL, Darmstadt, Germany).

Leitor de microplacas (BioTek Synergy HT, GENS5).

5.3. Análise nutricional

As análises descritas a seguir usaram as folhas secas, moídas, das 3 espécies de louro.

Determinação do teor de humidade



Para a determinação da humidade recorreu-se a uma balança adequada (Figura 10). Aproximadamente 1,5 g de amostra moída foi sujeita a um processo de secagem (± 100 °C) até atingir um peso constante. A análise foi efetuada em triplicado e os resultados expressos em percentagem (%).

Figura 10. Balança de determinação de humidade.

Determinação do teor de cinzas



As cinzas foram obtidas por incineração de 1 g de amostra a 500 °C, em mufla (Figura 11) de acordo com o método AOAC 950.153. A análise foi efetuada em triplicado e os resultados apresentados em percentagem (%).

Figura 11. Mufla.

Determinação do teor de proteína

O teor proteico foi determinado pelo método de Kjeldahl baseado no método AOAC 2001.11. Aproximadamente 0,5 g de amostra foram colocadas num tubo de Kjeldahl, juntamente com duas pastilhas de mistura catalisadora (3,5g sulfato de potássio e 0,4 g de sulfato de cobre por pastilha) e 20 mL de ácido sulfúrico a 96%. A digestão ácida foi efetuada em manta elétrica (cerca de 2 horas, até obtenção de líquido límpido e transparente de tonalidade azul-esverdeada) ligada a um sistema de aspiração de vapores (Digester K-424). Procedeu-se, de seguida, à alcalinização (Hidróxido de sódio 32%) e destilação do produto digerido (BUCHI Kjelfex K-360, Flawil, Switzerland) (Figura 12). Recolheu-se o destilado em ácido bórico a 4% durante 4 minutos, período depois do qual deixou de ocorrer reação



alcalina. Finalmente procedeu-se à titulação com ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 0,05 M) para a quantificação do azoto total presente na amostra.

A análise foi efetuada em triplicado e os resultados expressos em percentagem (%).

O fator de conversão de azoto total em proteína foi 6,25.

Figura 12. Destilador automático.

Determinação do teor total de gordura

O teor de gordura foi determinado pelo método do Soxhlet (método AOAC 991.36). Aproximadamente 5 g de amostra foram misturadas com sulfato de sódio anidro para garantir a remoção total de água, e areia para evitar a compactação da amostra, o que impediria a extração. A mistura foi transferida para cartuxos de celulose que foram colocados em ampolas de extração do dispositivo de Soxhlet. Para a extração da gordura utilizou-se éter de petróleo (8 horas para quantificação da gordura total) e recolheu-se a gordura extraída para balões previamente tarados. Posteriormente, procedeu-se à eliminação do solvente por evaporação (Figura 13) e a secagem do resíduo em estufa (100 °C) por períodos de meia hora até à obtenção de peso constante. A pesagem foi feita após arrefecimento em exsiccador. A análise foi efetuada em triplicado para cada amostra e os resultados apresentados em percentagem (%).

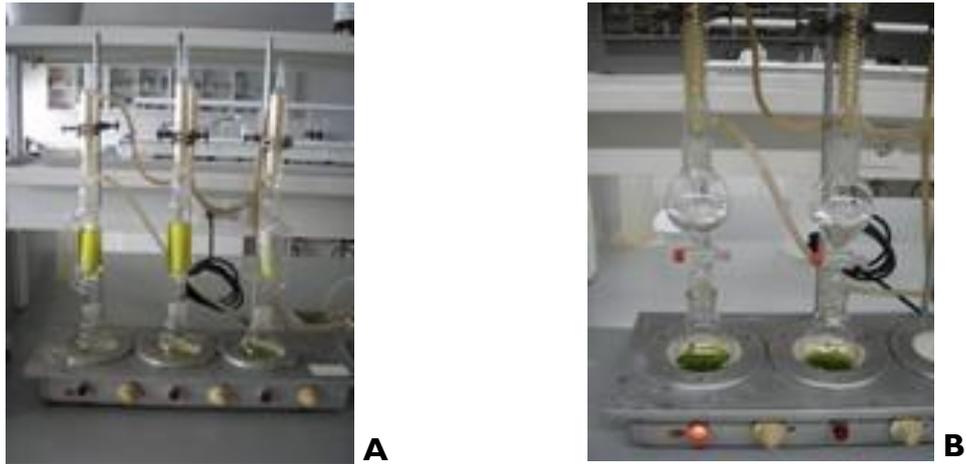


Figura 13. Montagem do dispositivo de Soxhlet.
A- Extração da gordura e **B-** Recuperação do solvente.

Determinação do teor total de fibra dietética

O teor de fibra dietética total (FDT) foi determinado por um método enzimático-gravimétrico (método AOAC 985.29), onde 4 alíquotas (1 g) de cada amostra foram digeridas e sujeitas a um processo de filtração (para remover a componente não fibrosa da amostra) (Figura 14). A amostra foi incubada com α -amilase termoestável, seguindo-se duas incubações com protease e com amiloglucosidase, de modo a simular o sistema digestivo, num banho termostatizado (GDE, VELP® Scientifica, Usmate, Italy). Procedeu-se à precipitação da FDT com etanol, sendo depois lavada com etanol e acetona. Em duas



alíquotas foi determinado o teor de proteína não digerida (método de Kjeldahl) e, nas outras duas alíquotas, o teor de cinzas (incineração a 525 °C). A FDT corresponde à massa em percentagem (%) do resíduo após a digestão e filtração, retirando o teor proteico e o teor de cinzas e corrigido também com o valor do branco (controlo).

Figura 14. Sistema de filtração para determinação da fibra dietética.

Determinação do teor de hidratos de carbono

O teor de hidratos de carbono foi obtido por diferença (método indireto), usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Hidratos de carbono} = 100 - (\% \text{ proteínas} + \% \text{ gordura} + \% \text{ humidade} + \% \text{ cinzas})$$

Os resultados foram apresentados em percentagem (%).

Determinação do perfil de ácidos gordos

O perfil em ácidos gordos foi determinado na gordura extraída, durante 4 horas, pelo método já descrito (método de Soxhlet).

A partir de uma determinada quantidade de gordura procedeu-se à hidrólise dos triglicerídios, usando calor e uma solução alcalina (NaOH), para obter os ácidos gordos livres. Estes, com aquecimento, sofreram metilação na presença de metanol (dador de metilos) e um catalisador (trifluoreto de boro). Após esta etapa obtiveram-se os ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME), entidades suficientemente voláteis para serem analisadas por cromatografia gasosa. Os FAME foram extraídos com *n*-hexano.

Os FAME foram analisados por cromatografia gasosa com deteção por ionização de chama (GC-FID). O cromatógrafo (Shimadzu GC-2010, Shimadzu, Columbia, U.S.A.) estava equipado com uma coluna capilar de sílica fundida CPSil 88 (Varian, Middelburg, The Netherlands; 50 m de comprimento × 0,25 mm de diâmetro interno, e 0,19 µm de espessura de filme). O gás de arraste utilizado foi o hélio (120 kPa), com o programa de temperaturas 120 °C, durante 5 minutos e aumento até 220 °C (3 °C/min.) onde se manteve por 10 minutos. As temperaturas do injetor e detetor foram 250 °C e 270 °C, respetivamente. A razão de “split” foi de 1:50 e o volume injetado foi de 1,0 µL. Fizeram-se 2 injeções por amostra. Os FAME foram identificados por comparação dos tempos de retenção com os de uma mistura de padrões (FAME 37 – mistura de 37 ésteres metílicos de ácidos gordos) e por adição de padrão às amostras. Os resultados foram expressos em relação ao total de ácidos gordos (% de área relativa). Os dados obtidos foram analisados com o software CP-Maitre (versão 2.30, shimadzu GC solution, Shimadzu, Columbia).

5.4. Análise dos compostos voláteis

Neste ensaio foram usadas folhas frescas e secas das 3 espécies de louro em estudo.

Cerca de 170 mg de amostra moída foram colocadas em vial de 10 mL, equipado com uma barra magnética e fechado com cápsulas de septo de Teflon (Tefloncoated).

Os compostos voláteis libertados para o espaço livre do vial foram adsorvidos por uma fibra de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB, Supelco, Inc., Bellefonte, PA) e analisados por Microextração em Fase Sólida combinada com Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (HS-SPME/GC-MS).

Antes de ser usada, a fibra de 65 μm foi condicionada a 250 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos no injetor do cromatógrafo. Posteriormente, a fibra foi exposta ao espaço livre do vial para adsorção dos compostos voláteis durante 45 minutos, a uma temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. De seguida, foi introduzida no injetor do cromatógrafo GC TRACE Ultra Polaris Q acoplado a um espectrómetro de massa, com armadilhas de iões (Thermo Fisher Scientific), com ionização por impacto de eletrões a 70 eV, controlados pelo software Xcalibur 1.3, para análise dos compostos voláteis desorvidos. O gás de arraste utilizado foi o hélio (Linde Sógas purity $\geq 99,999\%$) a 1 mL/min.

Os compostos voláteis foram separados em coluna capilar ZB-XLB Phenomenex[®] (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm). A temperatura do forno foi programada como se segue: temperatura inicial 40 $^{\circ}\text{C}$ (durante 1 minuto), um aumento de 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. até 220 $^{\circ}\text{C}$ (mantido durante 5 minutos), seguido de um aumento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. até 250 $^{\circ}\text{C}$ e mantida a esta temperatura durante 20 minutos e, finalmente, aumentada de novo a 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. até 285 $^{\circ}\text{C}$ e mantida a esta temperatura durante 5 minutos. A temperatura da fonte de iões foi de 250 $^{\circ}\text{C}$ e o multiplicador de eletrões controlado a 1900V. A proposta de identificação dos compostos voláteis foi feita por comparação dos espetros de massa com as bibliotecas NIST e Wiley 275. Apenas foram considerados os compostos para os quais se obtiveram resultados concordantes nas 2 bibliotecas.

Todos os testes foram realizados em triplicado.

A metodologia usada propõe apenas a presença de alguns compostos. Futuramente pretende-se fazer um estudo completo do óleo essencial usando duas colunas de distinta polaridade com a determinação dos índices de retenção.

5.5. Análise dos compostos fenólicos

Estes ensaios foram efetuados em extratos de folhas secas das diferentes espécies. No sentido de maximizar a extração com as condições mais sustentáveis possível, avaliou-se o comportamento de diferentes solventes (etanol, água e etanol/água).

Preparação dos extratos

Prepararam-se extratos a partir de 5 g de amostra moída em 50 mL de solvente, em triplicado, para as 3 amostras em estudo.

As condições extrativas avaliadas foram:

Solventes:

- 100% Água desionizada
- 50% Água desionizada e 50% etanol absoluto
- 100% Etanol absoluto

Tempo de extração: 60 minutos

Temperatura de extração: 40 °C

A extração foi efetuada em placa de aquecimento com agitação constante a 600 rpm. Os extratos foram depois filtrados e congelados a -25 °C até à análise dos compostos antioxidantes e avaliação da atividade antioxidante.

A figura 15 mostra os diferentes extratos obtidos (A-100% etanol; B-50% etanol e 50% água e C-100% água), sendo bem visível a diferente capacidade extrativa dos diferentes solventes.

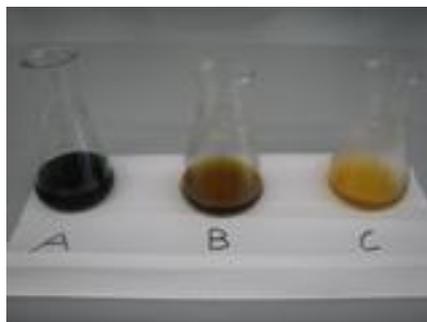


Figura 15. Extratos de folhas de louro obtidos com diferentes solventes.

Fenóis totais

Esta determinação inclui todos os fenóis, taninos e flavonoides das amostras em estudo.

A determinação do teor de fenóis totais dos extratos foi efetuada por um método espectrofotométrico, utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (RFC), segundo metodologia previamente descrita (Alves *et al.*, 2010). Para elaborar a curva de calibração usada na quantificação utilizou-se ácido gálgico como padrão.

Colocaram-se 500 μ L de extrato em tubo de ensaio e adicionaram-se 2,5 mL de RFC diluído em água desionizada (1:10). Adicionaram-se, a seguir, 2 mL de carbonato de sódio para alcalinizar a solução, e o tubo de ensaio foi colocado em banho-maria a 45 °C durante 15 minutos ao abrigo da luz. Deixou-se em repouso à temperatura ambiente durante 30 minutos, ao abrigo da luz, e as leituras foram efetuadas a 765 nm (Figura 16).



Figura 16. Leitura, em leitor de microplacas, do ensaio dos fenóis totais.

Taninos

Para a determinação dos taninos utilizou-se também o reagente RFC e a metodologia descrita por Tamilselvi *et al.* (2012) com ligeiras modificações. Foi utilizado como padrão ácido gálgico.

A 500 μ L de amostra foram adicionados 2,5 mL de RFC (1:10). Agitou-se vigorosamente e após 3 minutos adicionaram-se 2 mL de solução de carbonato de sódio e deixou-se repousar durante 2 horas ao abrigo da luz. As leituras foram efetuadas a 725 nm.

Flavonoides

O método de determinação dos flavonoides seguiu a metodologia previamente descrita por Barroso *et al.* (2011) com ligeiras modificações. A absorvência foi determinada a 510 nm e

corresponde ao máximo de absorção do complexo AlCl_3 -flavonoide formado. A catequina foi o padrão utilizada para construir a curva de calibração para a quantificação.

Num tubo de ensaio colocou-se 1 mL de extrato, 4 mL de água desionizada e 300 μL de nitrito de sódio a 5%. Após 5 minutos, adicionaram-se 300 μL de AlCl_3 a 10% e aguardou-se 1 minuto. Adicionaram-se 2 mL de solução de hidróxido de sódio 1 mol/L e 2,4 mL de água desionizada. Agitou-se em vortex e efetuaram-se as leituras a 510 nm.

Atividade antioxidante

Para a avaliação da atividade antioxidante consideraram-se 2 métodos, segundo as metodologias descritas por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e Benzie e Strain (1996):

- Determinação da capacidade de neutralização do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH[•]);
- Avaliação do poder antioxidante por redução do ião férrico (método FRAP).

DPPH[•] (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo)

Esta determinação utilizou o método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) com ligeiras modificações. O método consistiu em adicionar a 20 μL de extrato, 180 μL de solução etanólica de DPPH[•] ($6,0 \times 10^{-5}$ mol/L), agitar e efetuar as leituras a 515 nm, de 3 em 3 minutos, até a reação estabilizar. As determinações foram feitas durante 20 minutos.

FRAP (poder antioxidante por redução do ião férrico)

O método consiste na redução de complexo Fe(III)/ferricianeto [$\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] a Fe(II), forma ferrosa, pela presença do composto antioxidante na solução.

Determinou-se o poder antioxidante por redução do ião férrico, segundo a metodologia previamente descrita por Benzie e Strain (1996) com ligeiras modificações. Para a quantificação construiu-se uma curva de calibração de sulfato ferroso. Num tubo de ensaio, colocaram-se 90 μL de extrato, 270 μL de água desionizada e 2,7 mL de reagente FRAP (750 mL de tampão acetato 0,3 M, 75 mL de solução TPTZ 10 mM e 75 mL de cloreto férrico 20 mM). Homogeneizou-se e colocou-se em banho-maria a 37 °C. Após 30 minutos efetuaram-se as leituras a 595 nm.

6. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos são apresentados na forma de média \pm desvio padrão.

6.1. Análise nutricional

Os valores determinados na análise nutricional das amostras em estudo constam nas tabelas 2 e 3. A tabela 2 apresenta os valores de humidade determinados nas 3 espécies de folhas de louro (*L. azorica*, *L. nobilis* e *L. novocanariensis*), antes e após secagem. A composição nutricional das folhas secas apresenta-se na tabela 3.

Tabela 2. Percentagem de humidade das folhas de louro antes e após a secagem.

Espécie	% Humidade	% Humidade
	Antes secagem	Depois secagem
<i>L. azorica</i>	32,0 \pm 0,5	8,4 \pm 0,3
<i>L. nobilis</i>	52,4 \pm 0,8	8,6 \pm 0,3
<i>L. novocanariensis</i>	37,3 \pm 1,4	7,8 \pm 0,1

Em relação ao teor de humidade das folhas frescas das três amostras verificaram-se diferenças entre as espécies. *L. nobilis* foi a amostra com maior teor de humidade (52,4%), seguida de *L. novocanariensis* (37,3%) e *L. azorica* (32,0%). Tais diferenças podem ser explicadas pelas condições climáticas das regiões de origem. Como é sabido a zona de Viana do Castelo, Minho, é uma região de elevada humidade o que pode ajudar a justificar os teores determinados. No entanto, não serão de excluir diferenças relacionadas com a espécie, pois as outras amostras, sendo das ilhas, são de zonas também de elevados graus de humidade.

Após secagem das folhas das três amostras em avaliação, o *L. novocanariensis* foi a espécie que apresentou menor teor de humidade (7,8%), tendo as outras 2 amostras valores similares (8,4% *L. azorica* e 8,6% *L. nobilis*). Os valores baixos de humidade justificam a boa conservação das folhas secas de louro e a pouca susceptibilidade a contaminações microbiológicas.

Pelos valores obtidos, parece possível inferir que o processo de secagem foi eficiente, tendo os valores baixado 4 a 6 vezes. Confirma-se a influência da espécie, pois a perda de água foi diferente nas diferentes espécies.

Tabela 3. Composição nutricional das folhas secas do *Laurus* sp., em peso seco.

Espécie	% Proteínas	% Gorduras	% Hidratos de carbono	% Fibra	% Cinzas
<i>L. azorica</i>	11,1 ± 0,2	3,6 ± 0,1	69,5 ± 5,5	57,1 ± 2,3	3,3 ± 0,0
<i>L. nobilis</i>	16,1 ± 0,2	2,3 ± 0,1	68,6 ± 0,4	57,5 ± 1,3	4,0 ± 0,0
<i>L. novocanariensis</i>	17,9 ± 0,1	3,0 ± 0,0	67,5 ± 0,7	60,7 ± 2,0	3,3 ± 0,1

O teor proteico das amostras variou entre 11 e 18%.

As amostras das ilhas apresentam os valores extremos, tendo a amostra do continente um valor intermédio de 16%.

O teor de hidratos de carbono foi determinado por diferença. São os componentes mais abundantes, com valores entre 68 e 70%. Também neste caso a amostra do continente apresentou um valor intermédio, comparativamente com as amostras das ilhas. Neste grupo está incluída a fibra dietética, a qual constitui uma grande parte dos hidratos de carbono.

No que diz respeito ao teor total de fibra dietética, as amostras *L. azorica* e *L. nobilis* forneceram valores similares (57,1% e 57,5% respetivamente) e a da Madeira o maior teor neste componente (60,7%).

Durante o ensaio de determinação da fibra (fase de precipitação) a amostra *L. novocanariensis* mostrou um comportamento diferente das restantes, com a formação de uma substância gelatinosa que dificultou, mais tarde, o processo de filtração. Não foi possível saber o que aconteceu, mas seria interessante encontrar uma justificação para este comportamento característico. Talvez esse esclarecimento pudesse justificar o valor superior de fibra determinado.

O teor de cinzas fornece uma informação quantitativa dos minerais presentes na amostra. Considerando este parâmetro, as amostras das ilhas apresentaram valores semelhantes (3,3%) e a amostra do continente foi a mais rica em componentes minerais (4%).

Relativamente à gordura, as amostras das ilhas apresentaram os teores mais elevados (3,6 e 3,0 % respetivamente *L. azorica* e *L. novocanariensis*). A amostra *L. nobilis* apresentou os teores mais baixos neste nutriente (2,3%).

Os lípidos dos alimentos são constituídos maioritariamente por triglicéridos, que, por hidrólise, libertam os ácidos gordos ligados à molécula do glicerol. Os ácidos gordos são, então, os componentes maioritários da gordura. Podem classificar-se em ácidos gordos saturados (SFA), ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) e ácidos gordos polinsaturados (PUFA). A composição em ácidos gordos das amostras de louro em avaliação está expressa na tabela 4.

Tabela 4. Composição em ácidos gordos das folhas secas das espécies de louro em estudo.

Espécie	<i>L. azorica</i>	<i>L. nobilis</i>	<i>L. novocanariensis</i>
Ácidos gordos			
C14:0 (ác. mirístico)	6,61 ± 0,16	3,23 ± 0,49	4,59 ± 0,57
C16:0 (ác. palmítico)	23,36 ± 1,75	18,16 ± 2,05	15,78 ± 0,80
C18:0 (ác. esteárico)	2,52 ± 0,20	2,51 ± 0,03	2,59 ± 0,10
C18:1 cis-9 (ác. oleico)	8,21 ± 1,17	9,00 ± 0,34	10,17 ± 0,81
C18:2 n-6 (ác. linoleico)	19,72 ± 0,72	19,59 ± 1,31	14,01 ± 1,34
C18:3 n-6 (ác. γ-linolénico)	24,18 ± 0,87	30,32 ± 1,97	22,91 ± 2,40
C20:0 (ác. araquídico)	1,90 ± 0,34	1,53 ± 0,14	1,96 ± 0,21
C20:3 n-6 (ác. eicosatrienóico)	nd	1,25 ± 0,02	2,53 ± 0,33
C22:0 (ác. beénico)	3,00 ± 0,62	nd	1,15 ± 0,09
SFA	37,40 ± 0,84	25,42 ± 2,43	27,90 ± 0,83
MUFA	8,21 ± 0,80	9,00 ± 0,68	14,41 ± 1,24
PUFA	45,68 ± 0,41	51,16 ± 3,31	42,46 ± 3,52
Outros	8,72	10,49	17,17

Média ± Desvio Padrão, n = 2. nd: não detetado.

Analisando a tabela 4, verifica-se que foram identificados 9 ácidos gordos, de acordo com a mistura de padrões Supelco 37. Ficaram por identificar entre 9 e 17% do total dos picos detetados.

Os PUFA foram a classe de ácidos gordos mais abundante, variando entre 43% (*L. novocanariensis*) e 51% (*L. nobilis*). Foram detetados teores elevados dos ácidos linoleico (18:2 n-6) e γ -linolénico (18:3 n-6), constituindo os ácidos gordos da família n-6 a maioria dos PUFA.

Os SFA foram a segunda classe de ácidos gordos mais representativa (25-37%). A espécie *L. azorica* tem a maior percentagem determinada, sobretudo devido à sua riqueza em ácidos palmítico (C16:0) e mirístico (C14:0).

Por outro lado, os MUFA foram o grupo menos prevalente (8-14%), sendo mais abundantes na espécie *L. novocanariensis*.

Comparando os resultados da análise nutricional de folhas secas de *L. nobilis* com os valores da base de dados dos padrões de referência da mesma espécie, do Agricultural Research Service, USDA, verifica-se que os valores de humidade, proteína, cinza e fibra dietética total das amostras avaliadas, foram superiores. Contrariamente, no que diz respeito aos teores de gordura total (8,4 %) e hidratos de carbono (75,0 %), os valores disponibilizados pelo USDA são mais altos do que os determinados no nosso estudo (2,3 e 68,6 %, respetivamente).

Considerando os valores do perfil em ácidos gordos (g /100 g), verifica-se que os teores descritos no nosso estudo (SFA, 0,6 %; MUFA, 0,2 %; PUFA, 1,2 %) são inferiores aos do estudo do USDA (SFA, 2,3 %; MUFA, 1,6 %; PUFA, 2,3 %), devendo-se sobretudo à menor quantidade de gordura determinada experimentalmente (Tabela 3). No entanto, verifica-se que a tendência relativa a uma menor quantidade de MUFA na amostra é comum nos dois casos.

A variância genética, fatores como a produção, o clima e a conservação podem esclarecer as diferenças encontradas nos valores da composição nutricional do *L. nobilis* do nosso estudo. Não temos conhecimento de valores comparativos com as amostras das ilhas.

6.2. Análise dos compostos voláteis

As folhas de louro, devido ao seu perfume/odor agradável e característico, são usadas como condimento/tempero. Os compostos voláteis presentes nas suas folhas são responsáveis pelas características distintas, aroma picante específico e sabor peculiar (Sellami *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2012).

O perfil de compostos voláteis foi avaliado por microextração em fase sólida dos compostos presentes no espaço livre do vial (HS-SPME). Trata-se de um método simples, que requer pequena quantidade de amostra, rápido e de baixo custo e não usa solventes. É frequentemente usado na identificação de compostos voláteis em plantas aromáticas e medicinais (Gholivand, Piryaei e Abolghasemi, 2011).

Este método tornou-se uma alternativa atraente e vantajosa relativamente às técnicas comuns de extração. Pode realizar vários passos num só, tais como amostragem, extração, pré-concentração e introdução da amostra (Gholivand, Piryaei e Abolghasemi, 2011).

A proposta de identificação dos compostos voláteis foi efetuada em folhas frescas e secas das 3 espécies em estudo. As tabelas 5, 6 e 7 apresentam a composição em compostos voláteis das folhas frescas e secas. O perfil dos compostos voláteis evidencia diferenças quantitativas e qualitativas consideráveis entre as amostras.

Nas folhas frescas de *L. azorica* foi possível propor a presença de 20 compostos voláteis (Figura 17), sendo o 1,8-cineol (44,7%), α -felandreno (14,2%) e β -felandreno (7,6%) os mais abundantes.

Nas folhas secas de *L. azorica* foram identificados 24 compostos. Os compostos predominantes são o 2-careno (17,7%), o α -terpineol (17,3%) e o β -cariofileno (10,2%).

O perfil dos compostos voláteis das folhas frescas e secas de *L. azorica* tem grandes diferenças, com determinados compostos apenas presentes nas folhas frescas e outros nas secas, como é o caso do 1,8-cineol, o principal composto das folhas frescas, que está ausente nas folhas secas e o α -terpineol apenas presente nas folhas secas. Também, o α -felandreno e β -felandreno têm valores superiores nas folhas frescas, enquanto que o 2-careno apresenta valores superiores nas folhas secas.

Tabela 5. Identificação dos compostos voláteis das folhas frescas e secas de *L. azorica* (Seub.) Franco.

Folhas frescas			Folhas secas		
TR	Composto	Média ± DP	TR	Composto	Média ± DP
9.03	n.i.	2,09 ± 0,27			
10.06	α-Felandreno	14,16 ± 2,38	9.91	α-Felandreno	4,16 ± 1,30
11.68	β-Felandreno	7,56 ± 1,02	11.58	β-Felandreno	0,84 ± 0,83
12.24	cis-Ocimeno	0,70 ± 0,20			
12.86	α-Pineno	1,10 ± 0,12			
13.24	n.i.	1,35 ± 0,23	13.21	n.i.	1,49 ± 0,36
			13.68	α-Terpineol	17,32 ± 1,50
			13.73	Canfeno	4,82 ± 0,68
13.80	1,8-Cineol	44,71 ± 3,42			
14.71	α-Terpineno	2,36 ± 0,18	14.69	α-Terpineno	2,53 ± 0,40
16.13	n.i.	1,18 ± 0,12			
18.80	Isopinocanfona	1,45 ± 0,33			
18.87	4-Terpineol	1,35 ± 0,13	18.87	4-Terpineol	1,00 ± 0,37
19.38	Álcool β-Fenchílico	0,74 ± 0,02	19.40	Álcool β-Fenchílico	0,87 ± 0,25
			19.46	Mirtenal	1,28 ± 0,08
19.97	Verbenona	0,96 ± 0,09			
21.58	Acetato de bornilo	0,18 ± 0,01	21.61	Acetato de bornilo	3,93 ± 0,32
			22.10	Acetato de mirtenilo	1,73 ± 0,07
22.61	4-Careno	0,64 ± 0,04	22.63	4-Careno	1,11 ± 0,17
			23.30	n.i.	1,80 ± 0,11
23.59	2-Careno	5,45 ± 0,29	23.65	2-Careno	17,68 ± 1,06
24.16	α-Copaeno	0,69 ± 0,01	23.98	α-Copaeno	1,73 ± 0,10
			24.64	β-Elemeno	1,88 ± 0,19
25.37	β-Cariofileno	4,90 ± 0,24	25.40	β-Cariofileno	10,22 ± 0,43
26.58	n.i.	0,90 ± 0,06	26.42	n.i.	4,11 ± 0,25
			26.55	Acetato de cinamilo	5,27 ± 2,19
27.37	Valenceno	2,67 ± 0,15	26.61	Valenceno	3,00 ± 0,22
			27.38	β-Selineno	4,28 ± 0,64
			27.58	Gurjuneno	1,46 ± 0,14
27.95	δ-Cadineno	2,56 ± 0,04	27.96	δ-Cadineno	2,56 ± 0,21
28.04	Isoledeno	1,29 ± 0,06	28.04	Isoledeno	2,70 ± 0,21
28.53	α-Cubebeno	0,75 ± 0,01	28.54	α-Cubebeno	0,65 ± 0,11
29.78	Espatulenol	0,27 ± 0,02	29.80	Espatulenol	0,89 ± 0,27
			30.24	n.i.	0,50 ± 0,07
			30.86	Aromadendreno	0,18 ± 0,01

DP: Desvio Padrão, n=3; TR: Tempo de Retenção; n.i.: não identificado.

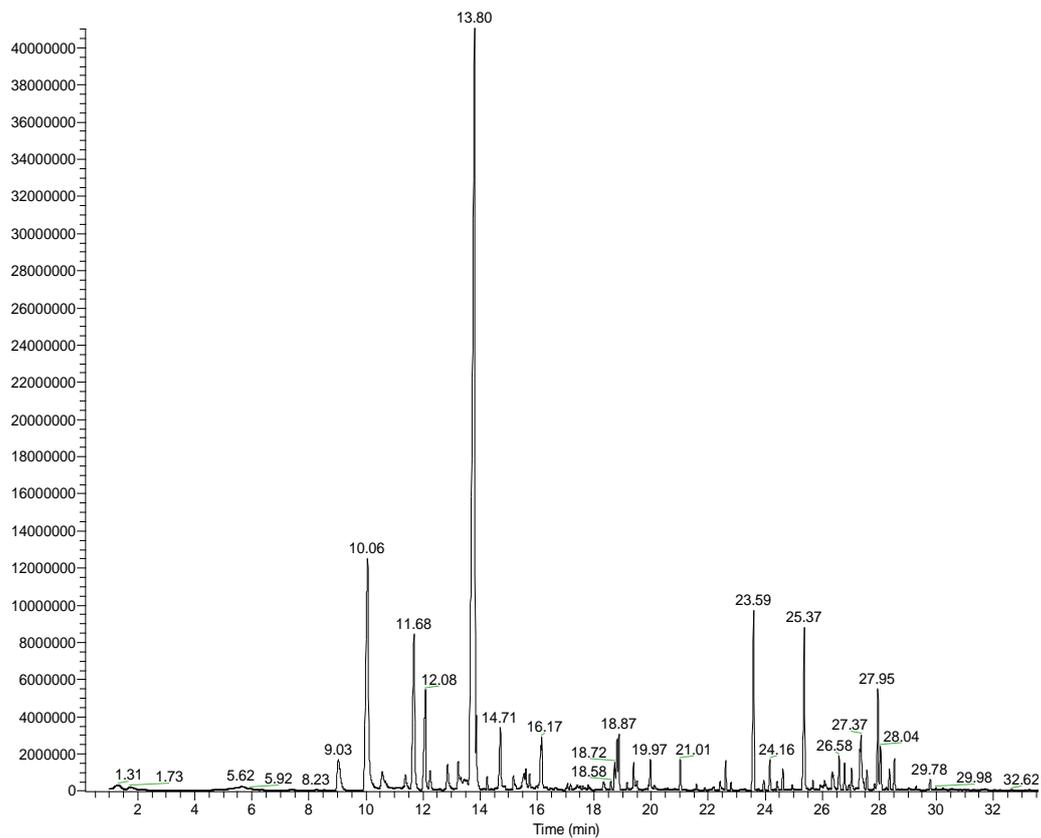


Figura 17. Cromatograma do perfil de compostos voláteis das folhas frescas de *L. azorica* (Seub.) Franco.

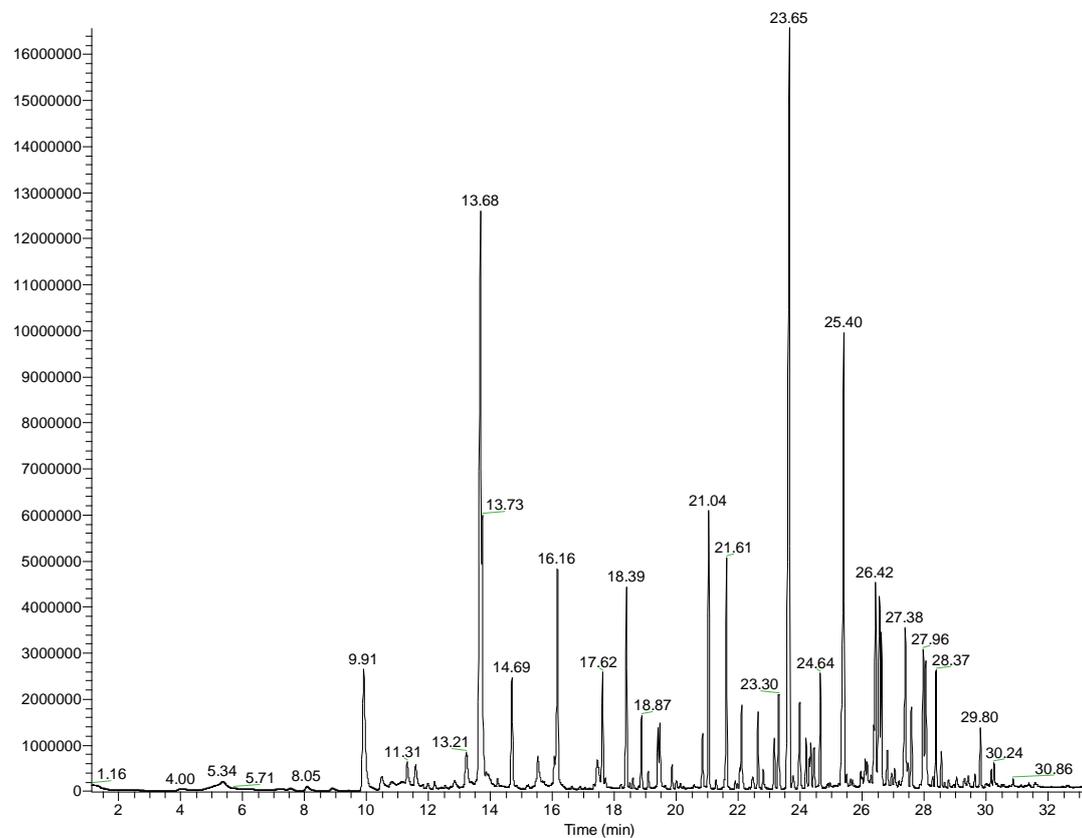


Figura 18. Cromatograma do perfil de compostos voláteis das folhas secas de *L. azorica* (Seub.) Franco.

Tabela 6. Identificação dos compostos voláteis das folhas frescas e secas de *L. nobilis* L.

Folhas frescas			Folhas secas		
TR	Composto	Média ± DP	TR	Composto	Média ± DP
9.91	α -Felandreno	1,43 ± 0,07	9.93	α -Felandreno	5,20 ± 0,39
			11.59	β -Felandreno	1,36 ± 0,12
12.21	<i>cis</i> -Ocimeno	0,74 ± 0,11	12.20	<i>cis</i> -Ocimeno	0,56 ± 0,10
12.81	α -Pinenos	0,51 ± 0,05			
13.20	n.i.	0,56 ± 0,07	13.20	n.i.	0,90 ± 0,02
			13.65	α -Terpineol	7,62 ± 0,38
			13.74	Canfeno	7,63 ± 0,50
13.89	1,8-Cineol	54,70 ± 1,76			
15.53	α -Terpineno	0,54 ± 0,05	14.68	α -Terpineno	1,90 ± 0,07
			16.16	n.i.	11,62 ± 1,12
16.23	n.i.	3,24 ± 0,51	16.20	n.i.	5,19 ± 1,19
16.30	n.i.	6,50 ± 0,69			
16.38	n.i.	9,34 ± 0,60			
18.90	4-Terpineol	2,00 ± 0,17	18.86	4-Terpineol	2,58 ± 0,05
19.44	Álcool β -Fenchílico	2,77 ± 0,44	19.38	Álcool β -Fenchílico	1,85 ± 0,09
20.58	Delta-3-careno	1,11 ± 0,06	20.55	Delta-3-careno	0,98 ± 0,09
22.63	4-Careno	0,50 ± 0,04	22.61	4-Careno	1,34 ± 0,02
23.65	2-Careno	8,15 ± 0,87	23.65	2-Careno	28,09 ± 0,10
23.96	α -Copaeno	0,29 ± 0,01	23.96	α -Copaeno	0,71 ± 0,06
24.01	Eugenol	0,61 ± 0,18	24.03	Eugenol	2,98 ± 0,06
24.64	β -Elemeno	0,88 ± 0,07	24.63	β -Elemeno	2,29 ± 0,07
24.96	α -Gurjuneno	0,22 ± 0,02	24.95	α -Gurjuneno	0,46 ± 0,02
25.36	Metileugenol	2,30 ± 0,73			
25.39	β -Cariofileno	1,98 ± 0,42	25.35	β -Cariofileno	10,11 ± 0,08
25.67	α -Guaieno	0,26 ± 0,01	25.67	α -Guaieno	0,74 ± 0,04
26.35	Humuleno	0,50 ± 0,04	26.35	n.i.	1,41 ± 0,12
27.56	Valenceno	0,24 ± 0,03	27.35	Valenceno	1,50 ± 0,03
			27.55	n.i.	0,82 ± 0,04
27.94	δ -Cadineno	0,32 ± 0,03	27.94	δ -Cadineno	0,76 ± 0,05
28.01	Germacreno-D	0,32 ± 0,06	28.01	Germacreno-D	1,15 ± 0,06
			29.78	n.i.	0,26 ± 0,01

DP: Desvio Padrão, n=3; TR: Tempo de Retenção; n.i.: não identificado.

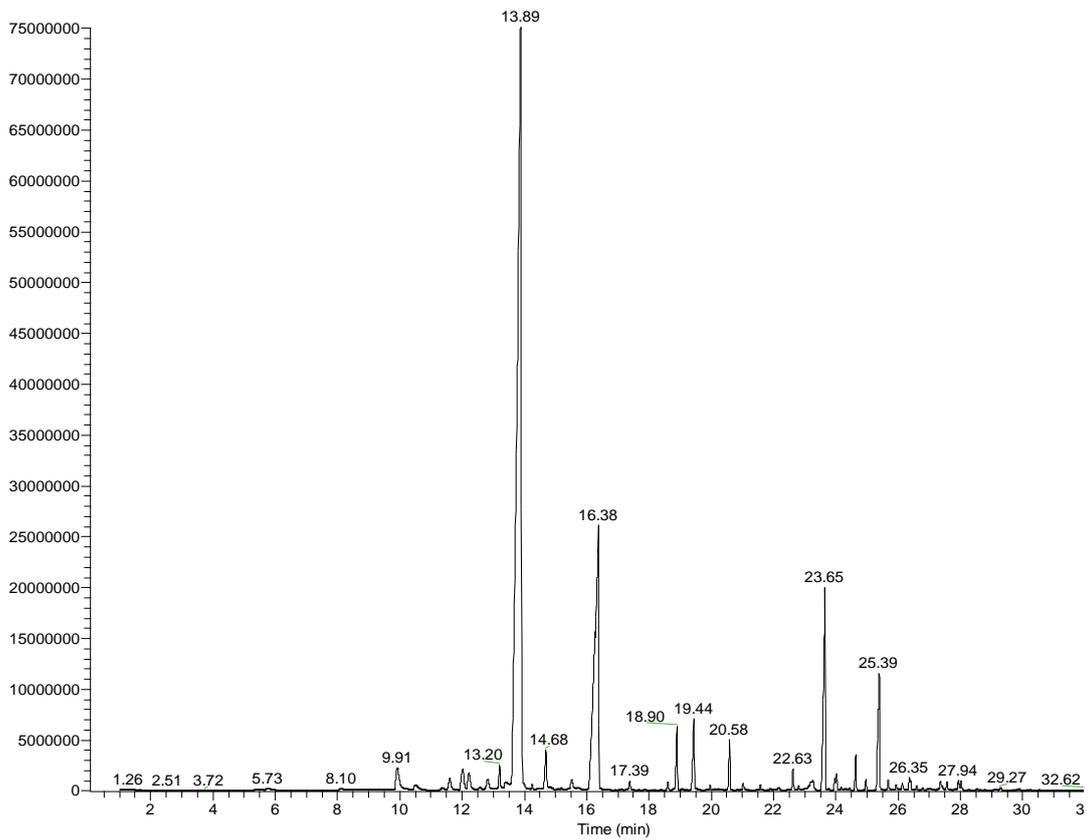


Figura 19. Cromatograma do perfil de compostos voláteis das folhas frescas de *L. nobilis* L.

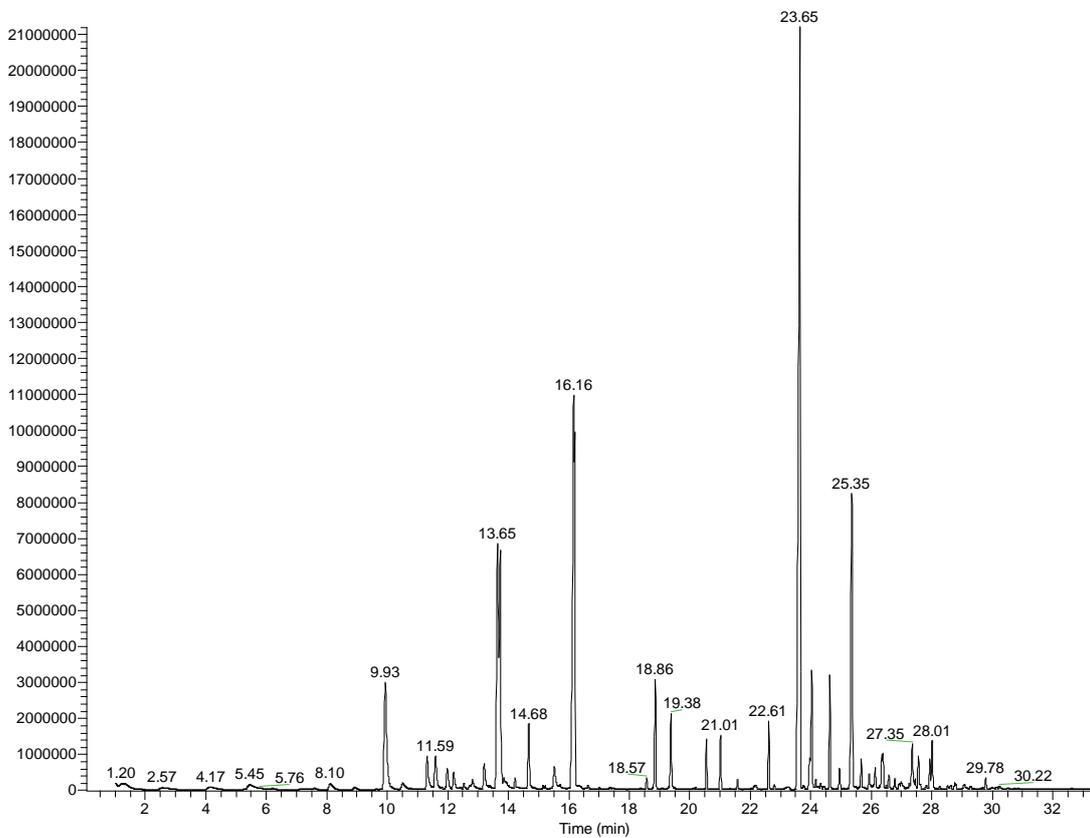


Figura 20. Cromatograma do perfil de compostos voláteis das folhas secas de *L. nobilis* L.

No *L. nobilis* propôs-se a identificação de 21 compostos voláteis nas folhas frescas (Figura 19) e de 20 nas folhas secas (Figura 20, Tabela 6). O principal composto das folhas frescas é o 1,8-cineol (54,7%), enquanto que o 2-careno (28,1%) é o composto maioritário nas folhas secas (Figura 20), seguido do β -cariofileno (10,1%). Assim, observam-se diferenças acentuadas no perfil de compostos aromáticos das folhas frescas e secas.

Nas folhas frescas de *L. novocanariensis* foram propostos 21 compostos (Figura 21, Tabela 7). Como nas espécies descritas anteriormente, o 1,8-cineol foi o composto presente em maior percentagem (29,1%) seguido de α -felandreno (20,5%), β -felandreno (9,3%) e miristicina (7,5%).

Nas folhas secas de *L. novocanariensis* foram identificados 25 compostos. A miristicina (31,7%) foi o composto com maior percentagem (Figura 22, Tabela 7), seguido pelo isoleideno (7,2%), valenceno (6,3%), α -felandreno (6,2%) e gurjuneno (5,3%).

O perfil das folhas frescas e secas da espécie *L. novocanariensis* revelou grandes diferenças, nomeadamente, o principal composto das folhas frescas (1,8-cineol) não foi detetado nas folhas secas, a miristicina atingiu valores muito mais elevados nas folhas secas, enquanto o α -felandreno atingiu valores superiores nas folhas frescas.

Tabela 7. Identificação dos compostos voláteis das folhas frescas e secas de *L. novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar.

Folhas frescas			Folhas secas		
TR	Composto	Média ± DP	TR	Composto	Média ± DP
9.97	α -Felandreno	20,46 ± 0,55	9.98	α -Felandreno	6,19 ± 0,25
11.62	β -Felandreno	9,31 ± 0,45	11.62	β -Felandreno	2,25 ± 0,19
12.81	α -Pinoeno	4,49 ± 0,40	12.84	α -Pinoeno	1,87 ± 0,33
			13.40	p-Cimeno	0,61 ± 0,13
			13.65	α -Terpineol	4,84 ± 1,05
13.72	1,8-Cineol	29,11 ± 0,97	13.72	Canfeno	2,37 ± 1,98
			14.69	α -Terpineno	0,98 ± 0,17
17.60	n.i.	1,13 ± 0,03	16.12	n.i.	2,06 ± 0,17
			17.59	n.i.	1,37 ± 0,03
18.33	Isopinocanfona	1,81 ± 0,01	18.35	n.i.	0,83 ± 0,02
18.84	n.i.	7,07 ± 0,14	18.84	4-Terpineol	0,79 ± 0,02
			19.43	Mirtenal	0,40 ± 0,00
19.96	Verbenona	0,54 ± 0,02			
			21.58	Acetato de bornilo	0,45 ± 0,01
22.60	4-Careno	0,21 ± 0,01	22.60	4-Careno	0,27 ± 0,01
23.56	2-Careno	1,17 ± 0,05	23.57	2-Careno	4,23 ± 0,12
23.94	α -Copaeno	0,67 ± 0,05	23.94	α -Copaeno	0,50 ± 0,01
24.18	n.i.	4,15 ± 0,29	24.16	n.i.	2,74 ± 0,06
24.42	β -Bourboneno	0,77 ± 0,06	24.41	β -Bourboneno	0,93 ± 0,02
24.61	β -Elemeno	0,29 ± 0,02	24.61	β -Elemeno	1,12 ± 0,03
25.21	Aristoleno	0,49 ± 0,07	25.21	Aristoleno	1,50 ± 0,11
25.33	β -Cariofileno	1,32 ± 0,03	25.33	Metileugenol	2,36 ± 0,08
25.97	Isoledeno	1,83 ± 0,09	25.98	Isoledeno	7,24 ± 0,12
26.78	n.i.	0,55 ± 0,03	26.78	n.i.	1,54 ± 0,04
26.92	Germacreno-D	0,54 ± 0,01			
			27.06	Cadina-3,9-dieno	2,41 ± 0,04
27.37	Valenceno	2,35 ± 0,13	27.38	Valenceno	6,30 ± 0,19
27.51	Gurjuneno	1,26 ± 0,01	27.52	Gurjuneno	5,30 ± 0,14
27.87	Miristicina	7,53 ± 0,31	27.92	Miristicina	31,66 ± 1,13
27.95	δ -Cadineno	1,73 ± 0,04	27.97	δ -Cadineno	2,20 ± 0,15
			28.06	n.i.	2,28 ± 0,05
28.53	α -Cubebeno	0,54 ± 0,03	28.54	α -Cubebeno	1,12 ± 0,01
29.04	cis-Asarona	0,69 ± 0,08	29.04	cis-Asarona	1,28 ± 0,02

DP: Desvio Padrão, n=3; TR: Tempo de Retenção; n.i.: não identificado.

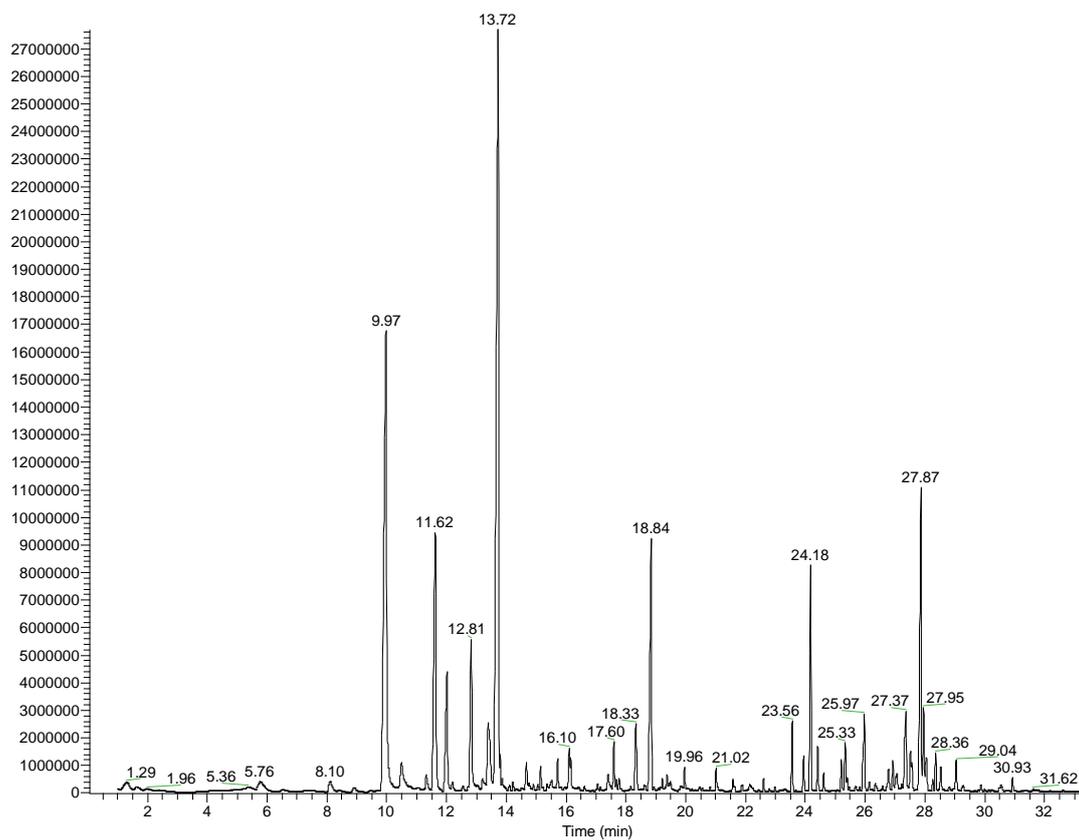


Figura 21. Cromatograma do perfil de compostos voláteis das folhas frescas de *L. novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar.

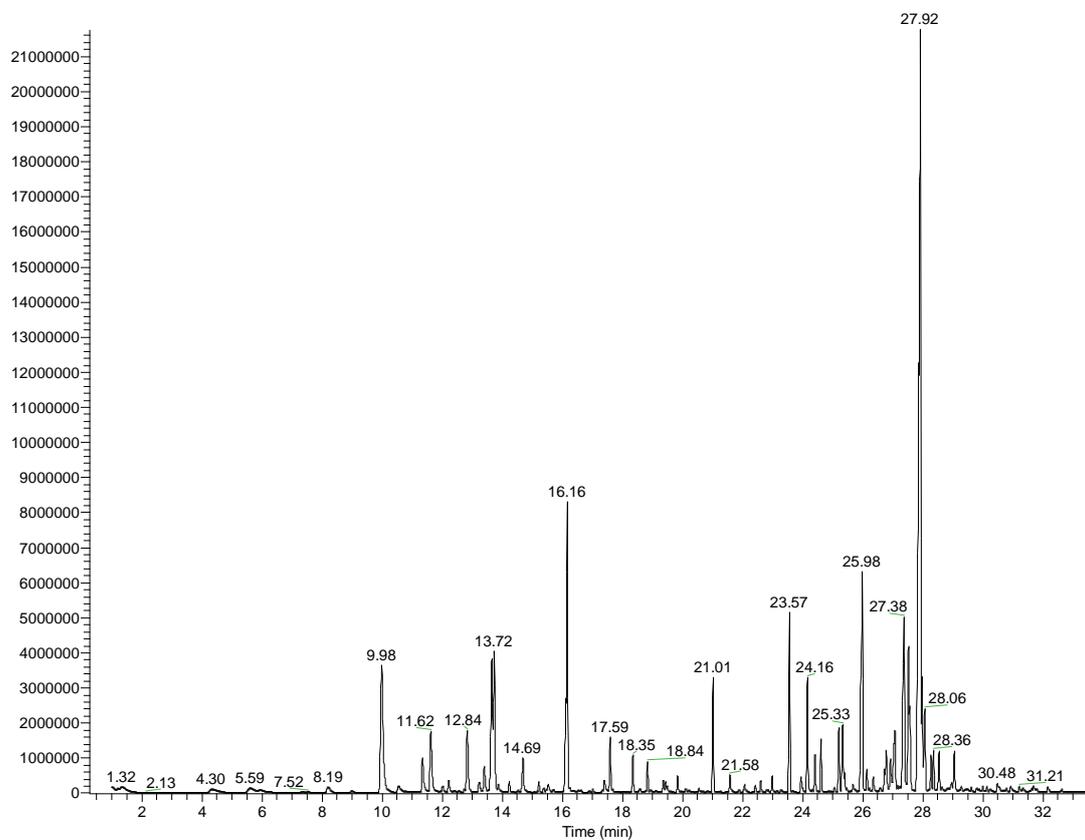


Figura 22. Cromatograma do perfil de compostos voláteis das folhas secas de *L. novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar.

Em resumo, as folhas frescas das três espécies apresentam como principal constituinte o 1,8-cineol. No entanto, há algumas diferenças que poderão ajudar a distinguir as folhas frescas das três espécies, nomeadamente, os teores elevados de α -felandreno em *L. novocanariensis* e *L. azorica* e muito menores em *L. nobilis*, sendo ainda possível distinguir o *L. azorica* do *L. novocanariensis* pelos maiores teores de 1,8-cineol na primeira espécie. No que respeita às folhas secas, o 1,8-cineol não foi detetado em qualquer das amostras, sendo possível distinguir o *L. novocanariensis* pelo elevado teor de miristicina, o *L. nobilis* pelo elevado teor de 2-careno e o *L. azorica* pelo elevado teor de α -terpineol.

Nas folhas secas o perfil de compostos voláteis pode resultar das modificações ocorridas com a secagem e condições de armazenamento.

Na pesquisa bibliográfica efetuada encontraram-se vários estudos nesta temática. Foram realizados estudos em folhas de *L. nobilis* por HS-SPME/GS-MS, não sendo conhecidos estudos efetuados com esta metodologia nas espécies das ilhas.

Num estudo realizado em Espanha em folhas frescas de *L. nobilis*, a adsorção do espaço livre foi realizada a 60 °C durante 30 minutos. O 1,8-cineol era o composto mais abundante, seguido de linalol, acetato de terpenilo e α -terpineol (Diaz-Maroto, Pérez-Coello e Cabezudo, 2002).

Igualmente em Espanha, foi efetuado outro estudo com extratos aquosos de folhas secas de *L. nobilis*, com 60 minutos de adsorção do espaço livre a temperatura ambiente (Pérez, Navarro e Lorenzo, 2007). O metileugenol foi o composto com maior percentagem, seguido de eucaliptol (1,8-cineol) e linalol.

Apesar da proximidade de Portugal com Espanha, observaram-se algumas diferenças na composição dos compostos voláteis que se pode dever à origem geográfica, fatores climáticos (calor e seca), grau de maturação e altura da colheita das folhas.

Na literatura estão disponíveis estudos realizados nos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação e analisados por GC e GC-MS nas folhas secas de *L. nobilis* (Sellami *et al.*, 2011; Jemâa *et al.*, 2012; Ramos *et al.*, 2012) e GC-MS/MS no *L. novocanariensis* (Rodilla *et al.*, 2008), e ainda por extração-destilação seguida de análise por GC e GC-MS nas folhas de *L. azorica* (Pedro *et al.*, 2001).

Os métodos utilizados e parte da planta utilizada foram distintos, verificando-se algumas diferenças nos resultados. O composto com maior percentagem em *L. azorica* e *L. novocanariensis* foi o α -pineno e em *L. nobilis* foi o 1,8-cineol (Pedro et al., 2001; Rodilla et al., 2008; Ramos et al., 2012). O composto α -pineno apenas foi identificado em *L. novocanariensis* em percentagens muito inferiores.

Um outro estudo realizado com os óleos essenciais das folhas secas de *L. nobilis* da Argélia, Marrocos e Tunísia descreve o perfil dos compostos voláteis com maior percentagem. O 1,8-cineol foi o composto com maior teor, que variou entre 34,6% na Argélia, 38,9% em Marrocos e 24,6% na Tunísia (Jemâa et al., 2012).

Sellami et al. (2011) determinaram os compostos voláteis dos óleos essenciais das folhas frescas e secas de *L. nobilis*, e o composto com maior percentagem foi o 1,8-cineol tanto nas folhas frescas (61,2%) como nas secas (56,3%).

A maior semelhança com o nosso estudo diz respeito ao *L. nobilis* que também apresenta elevado teor de 1,8-cineol nas folhas frescas.

As diferenças observadas entre os resultados do nosso estudo e dos autores aqui discutidos, podem dever-se ao diferente processo de obtenção dos compostos voláteis, bem como à origem diferente das plantas.

Os compostos voláteis exibem diversas atividades biológicas. É o caso do β -cariofileno, humuleno, espatulenol, β -bourboneno, 1,8-cineol, p-cimeno, α -felandreno e do α -pineno, com atividade antimicrobiana (Santoyo et al., 2006; Vagionas et al., 2007; Derwich, Benziane e Boukir, 2009; Elaissi et al., 2011); da *cis*-asarona com atividade antiparasitária (Nibret e Wink, 2010); do β -elemeno e do delta-3-careno com atividade antiproliferativa (Quassinti et al., 2013); do β -selineno com atividade inseticida (Santos et al., 2012) e dos compostos eugenol, metileugenol e miristicina com atividade antioxidante (Politeo, Jukić e Miloš, 2007; Firuzi et al., 2010).

Atendendo à composição das espécies de *Laurus* sp. em estudo, poder-se-á correlacionar alguns efeitos biológicos atribuídos a estas plantas com o seu perfil químico, uma vez que muitos destes compostos estão associados a essas ações biológicas.

Com a realização deste trabalho foi possível propor a presença de alguns compostos voláteis nas folhas das três espécies de louro em estudo. Pretende-se, no futuro, fazer uma identificação mais completa dos compostos voláteis, usando duas colunas de distinta polaridade e a determinação dos índices de retenção, de modo a fazer uma identificação inequívoca dos compostos voláteis.

6.3. Análise de composto fenólicos

Os compostos fenólicos e outros bioativos, presentes nas plantas, são conhecidos pelas suas inúmeras propriedades biológicas, destacando-se a atividade antioxidante.

Pela pesquisa bibliográfica verificou-se que há um maior número de estudos em óleos essenciais ou em extratos obtidos com diferentes solventes orgânicos, caso da acetona, do etanol, do metanol e do hexano (Chanda e Dave, 2009; Ouchikh *et al.*, 2011; Albayrak *et al.*, 2012).

Dada a toxicidade da maioria dos solventes usados, embora estes extratos permitissem obter a composição em bioativos não podiam ter aplicações alimentares ou para cosmética. Por outro lado, a valorização de qualquer produto deverá ter, também em conta a sustentabilidade do processo, quer económica quer ambiental.

Para dar resposta a estas permissas é que no trabalho efetuado se escolheram como solventes água e etanol, se usou uma temperatura baixa (40 °C) e um tempo de extração de 60 minutos. A escolha dos solventes com diferentes polaridades (100% água, 50% água/50% etanol e 100% etanol) visou avaliar a influência destes na composição dos extratos. Está descrito que os teores totais dos compostos fenólicos dependem da natureza da amostra, mas também da polaridade dos solventes extratores, dos tempos de extração e da temperatura (Costa *et al.*, 2012).

Compostos fenólicos totais

A tabela 8 apresenta os resultados de teor total de compostos fenólicos expressos em mg de equivalentes de ácido gálico/g.

Pela tabela verifica-se que o solvente extrator tem uma forte influência no teor do extrato em compostos fenólicos. É claro o poder superior da mistura etanol/água (50/50) para extrair estes compostos. Em todas as espécies obtêm-se os valores mais elevados com esta

mistura de solventes. A água, como solvente, tem pior comportamento com as espécies de louro das ilhas, sendo os extratos aquosos os mais pobres em compostos fenólicos. No entanto, este comportamento é diferente no *L. nobilis*. O que se verifica é que o extrato aquoso desta espécie tem um teor duplo do obtido com etanol 100% (31 e 15 mg EAG/g). Relativamente às espécies em estudo, e ainda quanto aos compostos fenólicos totais, verifica-se uma maior semelhança entre as espécies das ilhas (*L. azorica* e *L. novocanariensis*). Verifica-se igualmente que o extrato do louro dos Açores é em todos os casos mais rico do que o da Madeira.

O louro do continente (*L. nobilis*) forneceu, de uma forma geral, extratos etanólicos e hidroalcoólicos mais pobres do que as outras 2 amostras. No entanto, e como já referido, fornece os extratos quosos mais ricos nestes compostos bioativos.

Em termos de rentabilidade e sustentabilidade do processo, e apenas com os dados obtidos neste ensaio, parece que a escolha adequada seria a mistura hidroalcoólica (50:50).

Tabela 8. Teor total de compostos fenólicos de extratos obtidos com os diferentes solventes em estudo.

		Compostos Fenólicos totais (mg EAG/g)		
		100% Etanol	50% Etanol /50% Água	100% Água
40°C 60 min.	<i>L. azorica</i>	35,23 ± 0,92	62,40 ± 0,68	26,29 ± 1,18
	<i>L. nobilis</i>	14,37 ± 0,79	43,03 ± 0,35	31,09 ± 0,31
	<i>L. novocanariensis</i>	31,67 ± 1,38	53,41 ± 0,62	25,42 ± 1,20

Média ± Desvio Padrão, n = 3.

Flavonoides totais

A tabela 9 apresenta os resultados obtidos, nas condições previamente descritas, dos teores de flavonoides totais das 3 espécies de louro em avaliação. Os resultados apresentam-se em mg de equivalentes de catequina/g.

À semelhança do verificado para os fenóis totais, também o tipo de solvente afetou a composição dos extratos. Verifica-se, igualmente, que o melhor solvente para todas as amostras, em termos de quantidade extraída, é a mistura hidroalcoólica.

Verifica-se ainda uma similaridade de comportamentos e composição das amostras das ilhas, sendo o *L. azorica* a espécie que fornece extratos mais ricos em flavonoides.

Tabela 9. Teor de flavonoides de extratos obtidos com os diferentes solventes em estudo.

		Flavonoides totais (mg EC/g)		
		100% Etanol	50% Etanol /50% Água	100% Água
40°C 60 min.	<i>L. azorica</i>	25,59 ± 0,66	46,32 ± 0,87	16,62 ± 0,49
	<i>L. nobilis</i>	14,12 ± 0,93	30,15 ± 0,25	20,88 ± 0,88
	<i>L. novocanariensis</i>	25,44 ± 1,13	36,71 ± 1,88	16,32 ± 0,49

Média ± Desvio Padrão, n = 3.

Taninos

A tabela 10 apresenta os resultados obtidos para a determinação de taninos, expressos em mg de equivalentes de ácido gálico/g.

Tabela 10. Teor de taninos de extratos obtidos com os diferentes solventes em estudo.

		Taninos (mg EAG/g)		
		100% Etanol	50% Etanol /50% Água	100% Água
40°C 60 min.	<i>L. azorica</i>	34,45 ± 0,99	60,92 ± 1,54	24,76 ± 1,14
	<i>L. nobilis</i>	13,61 ± 0,90	42,25 ± 0,38	30,27 ± 0,38
	<i>L. novocanariensis</i>	29,83 ± 0,63	52,06 ± 0,72	24,51 ± 1,03

Média ± Desvio Padrão, n = 3.

A determinação dos taninos confirma mais uma vez a influência do solvente extrator na composição quantitativa dos extratos obtidos. Os extratos obtidos com a mistura hidrolcoólica eram os que apresentavam teores superiores destes compostos bioativos. Com os extratos aquosos verificou-se, mais uma vez, um comportamento diferente. O

extrato aquoso de *L. nobilis* tem um teor de taninos superior ao do extrato alcoólico. Tal situação não ocorre com as espécies provenientes das ilhas. O *L. azorica* é a espécie cujos extratos são mais ricos em taninos. O *L. nobilis* é a espécie mais pobre em taninos, excepto no caso dos extratos aquosos.

Pelos resultados obtidos com os compostos bioativos confirmam-se diferenças relacionadas com a espécie. Verifica-se maior similaridade de valores entre as espécies das ilhas, sendo a amostra do continente bastante diferente. Uma possível justificação para esta diferença serão as diferentes condições climáticas das regiões de origem das amostras, além das diferenças devidas à espécie.

Estão publicados alguns estudos realizados em folhas de *L. nobilis*. Não se conseguiram obter publicações referentes às amostras das ilhas.

De acordo com Ramos *et al.*, 2012, os extratos etanólicos obtidos de folhas secas de *L. nobilis* (3 dias à temperatura ambiente) eram mais ricos em compostos fenólicos (132 mg EAG/g) do que extratos aquosos obtidos a quente (água a ferver durante 3 horas) (62 mg EAG/g) ou a frio (3 dias à temperatura ambiente) (53 mg EAG/g).

Outro estudo realizado com folhas de *L. nobilis*, de Marrocos, mostrou que extratos aquosos obtidos a 50 °C, forneciam teores de compostos fenólicos totais da ordem de 60 mg EAG/g (Dudonné *et al.*, 2009).

Os autores dos trabalhos referidos obtiveram extratos mais ricos em compostos fenólicos totais do que os obtidos no trabalho que se descreve. As condições de extração, a origem geográfica e o clima são fatores que certamente ajudariam a explicar estas diferenças.

Atividade antioxidante

A atividade antioxidante tem sido alvo de estudos em diversas matrizes e utilizando vários métodos (Chanda e Dave, 2009; Albayrak *et al.*, 2012). No entanto, dada a complexidade dos compostos bioativos presentes, é aconselhado utilizar mais de um método para avaliar este parâmetro (Chanda e Dave, 2009).

Neste estudo foram utilizados dois métodos complementares, vulgarmente usados na determinação da atividade antioxidante, DPPH e FRAP. Estes métodos são populares devido

às suas elevadas sensibilidade, rapidez de execução, acessibilidade e baixo custo (Gülçin, 2012).

O DPPH é um radical de azoto estável e o método é baseado na redução do radical DPPH na presença de um antioxidante que pode doar um átomo de hidrogénio, originando uma cor púrpura escura (Chanda e Dave, 2009; Gülçin, 2012).

O método FRAP é baseado na capacidade de um antioxidante em reduzir o complexo Fe(III)/ferricianeto $[\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a Fe(II), forma ferrosa, originando uma cor azul intensa, por doação de eletrão a pH ácido baixo (pH = 3,6), para manter a solubilidade do ferro (Chanda e Dave, 2009; Gülçin, 2012).

As tabelas 11 e 12 apresentam os resultados da atividade antioxidante obtidos pelos métodos DPPH e FRAP, respetivamente, nas espécies de louro em estudo.

Tabela 11. Atividade antioxidante de extratos de folhas de louro obtidos com os diferentes solventes em estudo e o método do radical DPPH.

		DPPH' (% de inibição)		
		100% Etanol	50% Etanol /50% Água	100% Água
40°C 60 min.	<i>L. azorica</i>	84,18 ± 0,05	75,07 ± 0,09	54,11 ± 0,00
	<i>L. nobilis</i>	82,63 ± 0,00	76,11 ± 0,09	51,18 ± 1,51
	<i>L. novocanariensis</i>	83,10 ± 0,09	64,35 ± 1,27	23,65 ± 0,33

Média ± Desvio Padrão, n = 3.

Pelos resultados da tabela 11 verifica-se que a atividade antioxidante (método do DPPH) varia entre 24 e 84% de inibição. Tal variação significa estar-se perante extratos com composições muito diversas. Contrariamente ao verificado anteriormente (determinação dos teores de compostos bioativos), os extratos que responderam melhor ao ensaio foram os etanólicos (100% etanol). Os extratos aquosos apresentaram o pior comportamento e, inevitavelmente, a mistura hidroalcoólica teve um desempenho intermédio.

Relativamente às espécies de louro em estudo, verifica-se que os extratos etanólicos, os que apresentam as percentagens de inibição mais elevadas, diferem pouco entre si (entre 82% *L.*

nobilis e 84% *L. azorica*). Estes resultados são indicadores de uma elevada capacidade antioxidante dos extratos obtidos nas condições selecionadas neste estudo. Os extratos hidroalcoólicos (50% etanol/50% água) forneceram percentagens de inibição díspares, sendo o louro da Madeira a espécie com menor percentagem de inibição (64%). Os extratos hidroalcoólico e aquoso desta espécie, o *L. novocanarienses*, apresentaram o pior desempenho neste parâmetro.

Pode concluir-se que quanto à percentagem de inibição do radical DPPH as amostras fornecem extratos com características similares, especialmente quando se usa o etanol como solvente extrator.

Tabela 12. Poder antioxidante, por redução do ião férrico (FRAP), de extratos de folhas de louro obtidos com os diferentes solventes em estudo.

		FRAP (mmol Fe ²⁺ /g)		
		100% Etanol	50% Etanol /50% Água	100% Água
40°C 60 min.	<i>L. azorica</i>	0,69 ± 0,03	1,10 ± 0,01	0,62 ± 0,31
	<i>L. nobilis</i>	0,40 ± 0,04	0,87 ± 0,03	0,30 ± 0,00
	<i>L. novocanariensis</i>	0,63 ± 0,01	0,84 ± 0,01	0,34 ± 0,00

Média ± Desvio Padrão, n = 3.

Em relação ao poder antioxidante por redução do ião férrico, as amostras em estudo apresentaram um comportamento menos similar, relativamente ao apresentado no ensaio com o DPPH.

Os extratos hidroalcoólicos foram os que apresentaram valores superiores deste parâmetro (entre 0,84 e 1,10mmol Fe²⁺/g). Os extratos etanólicos apresentaram valores superiores aos aquosos, embora o extrato aquoso de *L. azorica* tivesse um valor semelhante ao etanólico.

Relativamente à espécie, verificou-se que os extratos do louro dos Açores apresentaram, em todas as situações, o valor mais elevado de FRAP. O *L. nobilis* foi a espécie com pior desempenho neste parâmetro.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam o que vem descrito na literatura. As mesmas amostras (extratos de folhas de louro de 3 espécies), obtidas nas mesmas condições, forneceram extratos com comportamentos diferentes no que se refere a atividade antioxidante. No caso do método do DPPH, o solvente 100% etanol forneceu os extratos com melhores resultados. No caso do método FRAP foi a mistura de solventes (50% etanol/50% água) que forneceu os extratos com melhor desempenho, à semelhança do que ocorreu nas determinações dos compostos fenólicos, flavonoides e taninos.

Confirma-se igualmente a inexistência de uma relação entre os dois métodos usados, justificando mais uma vez a necessidade de determinar esta característica por vários métodos. Tal informação também confirma uma composição diferente dos extratos, composição esta fortemente dependente dos reagentes usados e dos solventes em causa.

São desconhecidos estudos para a determinação da atividade antioxidante de extratos de folhas de *L. azorica* e *L. novocanariensis*. Pelo contrário, a espécie *L. nobilis* já foi alvo de estudos.

Dudonné *et al.*, 2009 efetuaram um estudo em folhas de *L. nobilis* de Marrocos. Avaliaram a percentagem de inibição do radical DPPH por extratos metanólicos, obtidos a 50 °C, os quais apresentaram uma percentagem de inibição de apenas 19%. Este valor, comparativamente com o descrito neste trabalho, é bastante inferior, mesmo usando uma temperatura ligeiramente superior (50 em vez de 40 °C).

No mesmo estudo, os autores avaliaram o poder antioxidante pelo método FRAP. Os valores obtidos (1,54 mmol Fe²⁺/g) foram muito superiores aos descritos neste trabalho.

Os resultados obtidos são promissores e permitem pensar em estudos mais aprofundados no sentido de que, no futuro, alguns dos extratos possam ter aplicações na indústria. Há vários exemplos de utilização de extratos naturais em diferentes produtos com diversos fins. No caso do louro, pode pensar-se na prevenção da oxidação de alimentos e/ou bebidas e em formulações cosméticas ou fitoterápicas. Esta aplicação seria uma forma de valorizar as espécies autóctones de louro com uma contribuição para a sustentabilidade social das referidas regiões.

7. Conclusões

As plantas aromáticas e medicinais são detentoras de diversas propriedades biológicas, sendo muito utilizadas na gastronomia como aromatizantes ou condimentos e ainda em medicina tradicional. A procura de compostos naturais de origem vegetal tem aumentado e cada vez mais as indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética tentam encontrar e aplicar os compostos/extratos nos produtos que formulam. Tal facto tem o apoio importante dos consumidores que preferem este tipo de produtos naturais.

O louro é, frequentemente, usado como condimento em Portugal e, de uma maneira geral, em toda a região mediterrânica.

O estudo apresentado visou comparar as três espécies autóctones dos Açores (*L. azorica* (Seub.) Franco), Madeira (*L. novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar) e do continente (*L. nobilis* L.) no que concerne à sua análise nutricional, composição em compostos voláteis, quantificação dos compostos fenólicos e sua atividade antioxidante. Embora sendo um estudo preliminar, permitiu verificar que existem diferenças entre as três espécies aos diferentes níveis avaliados.

Pela análise nutricional verificou-se que as folhas de louro são uma matriz rica em fibra. Os teores reduzidos de humidade justificam a utilização das folhas durante períodos alargados de tempo sem degradação aparente.

No perfil de compostos voláteis verificou-se a existência de marcadores de espécie, quer nas folhas frescas quer nas secas. No entanto, o 1,8-cineol foi um dos compostos maioritários observados nas três espécies. Verificou-se igualmente que a secagem das folhas conduz a alterações na sua composição química. Tais alterações podem ser influenciadas pelo tipo de secagem usado, sendo que neste estudo o processo de secagem foi semelhante para todas as amostras.

No estudo dos compostos bioativos (compostos fenólicos, flavonoides, taninos) e atividade antioxidante (DPPH e FRAP) observaram-se, igualmente, comportamentos diferentes entre as amostras, o que indicia uma diferente composição química dos extratos obtidos. O que ficou demonstrado é que os extratos de louro são ricos em compostos bioativos e exibiram uma elevada atividade antioxidante.

Nesta parte do trabalho, além de se avaliarem os diferentes compostos bioativos, estudou-se o comportamento das três espécies e a composição dos extratos obtidos com diferentes solventes extratores. Todo o estudo efetuado para a escolha das melhores condições de obtenção dos extratos teve sempre como objetivo principal a sustentabilidade do processo

para a valorização das folhas de louro. Além disso, os solventes usados tiveram em atenção a possibilidade de utilização na indústria alimentar e/ou cosmética dos extratos, pelo que teriam de ser seguros, inócuos e económicos.

Pelo referido, as folhas de louro têm elevado potencial de valorização. Deverão ser realizados estudos mais aprofundados para um melhor caracterização destas matérias-primas e um melhor conhecimento dos compostos presentes. Há ainda necessidade de avaliar outras características destas folhas que, por certo, serão promissoras.

8. Referências Bibliográficas

- AGATI, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, 196: 67-76.
- AL-Hussaini, R., Mahasneh, A. M. (2011). Antibacterial and Antifungal Activity of Ethanol Extract of Different Parts of Medicinal Plants in Jordan. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4 (1): 57-69.
- ALBAYRAK, S., Aksoy, A., Sagdic, O., Albayrak, S. (2012). Antioxidant and antimicrobial activities of different extracts of some medicinal herbs consumed as tea and spices in Turkey. *Journal of Food Biochemistry*, 36: 547-554.
- ALVES, R., Costa, A., Jerez, M., Casal, S., Sineiro, J., Núñez, M., Oliveira, B. (2010). Antiradical activity, phenolics profile, and hydroxymethylfurfural in espresso coffee: influence of technology factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 12221-12229.
- BALLABIO, R. e Goetz, P. (2010). Huile de graine/fruit de laurier *Laurus nobilis* L., *Laurus azorica* (Seub.) Franco, *Laurus novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar. *Phytothérapie*, 8: 141-144.
- BARROSO, M., Noronha, J., Delerue-Matos, C., Oliveira, B. (2011). Flavored waters: influence of ingredients on antioxidant capacity and terpenoid profile by HS-SPME/GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 5062-5072.
- BARTWAL, A., Mall, R., Lohani, P., Guru, S. K., Arora, S. (2013). Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32: 216-232.
- BECKER, E. M., Nissen, L. R., Skibsted, L. H. (2004). Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, 219 (6): 561-571.

- BENZIE, I. F. F., Strain, J. J. (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.
- BIRT, D. F., Hendrich, S., Wang, W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 90: 157-177.
- BOUAYED, J. e BOHN, T. (2010). Exogenous antioxidants – Double-edged swords in cellular redox state. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3 (4): 228-237.
- BRAND-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28: 25-30.
- BREWER, M. S. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potencial Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10: 221-247.
- BUER, C, S., Imin, N., Djordjevic, M. A. (2010). Flavonoids: New roles for old molecules. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52 (1): 98-111.
- CAMPOS, M. G. – **Flavonóides**. Em: Proença da Cunha, A. *Farmacognosia e Fitoquímica*. 3ª Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2010d. ISBN 978-972-31-1142-2, p. 237 - 289.
- CHANDA, S., Dave, R. (2009). *In vitro* models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *African Journal of Microbiology Research*, 3 (13): 981-996.
- CHRISTAKI, E., Bonos, E., Giannenas, I., Florou-Paneri, P. (2012). Aromatic plants as a source of bioactive compounds. *Agriculture*, 2 (3): 228-243.
- CONFORTI, F., Statti, G., Uzunov, D., Menichini, F. (2006). Comparative Chemical Composition and antioxidant Activities of Wild and Cultivated *Laurus nobilis* L. Leaves and *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* (Ucria) Coutinho Seeds. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29 (10): 2056-2064.

- COSTA, P., Gonçalves, S., Valentão, P., Andrade, P. B., Coelho, N., Romano, A. (2012). *Thymus lotocephalus* wild plants and *in vitro* cultures produce different profiles of phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chemistry*, 135: 1253-1260.
- CROZIER, A., Jagannath I. B., Clifford, M. N. – **Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview**. Em: Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2006a. ISBN 978-1-4051-2509-3, p. 1-24.
- DAGLIA, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23: 174-181.
- DAI, J., Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15: 7313-7352.
- DE MARINO, S., Borbone, N., Zollo, F., Ianaro, A., Di Meglio, P., Iorizzi, M. (2004). Megastigmane and Phenolic Components from *Laurus nobilis* L. Leaves and Their Inhibitory Effects on Nitric Oxide Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 7525-7531.
- DERWICH, E., Benziane, Z., Boukir, A. (2009). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Leaves Essential oil of *Laurus nobilis* from Morocco. *Australian Journal of Basic Applied Sciences*, 3 (4): 3818-3824.
- DIAZ-Maroto, M. C., Pérez-Coello, M. S., Cabezudo, M. D. (2002). Effect of Drying Method on the Volatiles in Bay Leaf (*Laurus nobilis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 4520-4524.
- DIMITRIOS, B. (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, 17: 505-512.
- DUDONNÉ, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., Mérillon, Jean-Michel. (2009). Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30

Plants Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 1768-1774.

ELAISSI, A., Salah, K. H., Mabrouk, S., Larbi, K. M., Chemli, R., Harzallah-Skhiri, F. (2011). Antibacterial activity and chemical composition of 20 *Eucalyptus* species essential oils. *Food Chemistry*, 129: 1427-1434.

ELIAS, R. B., Dias, E. (2009). Gap dynamics and regeneration strategies in *Juniperus-Laurus* forests of the Azores Islands. *Plant Ecology*, 200 (2): 179-189.

EMAM, A. M., Mohamed, M. A., Diab, Y. M., Megally, N. Y. (2010). Isolation and structure elucidation of antioxidant compounds from leaves of *Laurus nobilis* and *Emex spinosus*. *Drug Discovery & Therapeutics*, 4 (3): 202-207.

FERNÁNDEZ-Palacios, J. M., Nascimento, L., Otto, R., Delgado, J. D., García-del-Rey, E., Arévalo, J. R., Whittaker, R. J. (2011). A reconstruction of Palaeo-Macaronesia, with particular reference to the long-term biogeography of the Atlantic island laurel forests. *Journal of Biogeography*, 38 (2): 226-246.

FERRARI, B., Castilho, P., Tomi, F., Rodrigues, A. L., Costa, M. C., Casanova, J. (2005). Direct identification and quantitative determination of costunolide and dehydrocostunolide in the fixed oil of *Laurus novocanariensis* by ¹³C-NMR spectroscopy. *Phytochemical Analysis*, 16: 104-107.

FERREIRA, A., Proença, C., Serralheiro, M. L. M., Araújo, M. E. M. (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*, 108: 31-37.

FIGUEIREDO, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G. - **Plantas Aromáticas e Medicinais. Fatores que afetam a produção.** Em: Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G. Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático. 3ª Edição. Lisboa: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, 2007. ISBN 978-972-9348-16-7, p. 1-18.

- FIRUZI, O., Asadollahi, M., Gholami, M., Javidnia, K. (2010). Composition and biological activities of essential oils from four *Heracleum* species. *Food Chemistry*, 122: 117-122.
- florestar.net. Loureiro. [Acedido a 15 de Abril de 2013]. Disponível na Internet: <http://www.florestar.net/loureiro/loureiro.html>
- GARCIA-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-Compound-Extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, 15: 8813-8826.
- GHASEMZADEH, A., Jaafar, H. Z. E. (2011). Effect of CO₂ enrichment on synthesis of some primary and secondary metabolites in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *International Journal of Molecular Sciences*, 12: 1101-1114.
- GHOLIVAND, M. B., Piryaei, M., Abolghasemi, M. M. (2011). Anodized aluminum wire as a solid-phase microextraction fiber for rapid determination of volatile constituents in medicinal plants. *Analytica Chimica Acta*, 701: 1-5.
- GROBKINSKY, D. K., Graaff, E., Roitsch, T. (2012). Phytoalexin transgenics in crop protection-Fairy tale with a happy end? *Plant Science*, 195: 54-70.
- GÜLÇİN, İlhami. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86: 345-391.
- HARTMANN, T. (2004). Plant-derived secondary metabolites as defensive chemicals in herbivorous insects: a case study in chemical ecology. *Planta*, 219: 1-4.
- HOUNSOME, N., Hounsome, B., Tomos, D., Edwards-Jones, G. (2008). Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *Journal of Food Science*, 73 (4): 48-65.
- HUMPHREY, A. J., Beale, M. H. - **Terpenes**. Em: Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2006b. ISBN 978-1-4051-2509-3, p. 47-101.

- INAN, Ö., Özcan, M. M., Juhaimi, F. Y. A., (2012). Antioxidant effect of mint, laurel and myrtle leaves essential oils on pomegranate kernel, poppy, grape and linseed oils. *Journal of Cleaner Production*, 27: 151-154.
- INÊS F. – Plantas AMC (Aromáticas, Medicinais e Condimentares). [Acedido a 5 de Julho de 2013]. Disponível na Internet: <http://www.quintinha.com/Quintinha/files/Plantas%20AMC.pdf>
- IVANOVIĆ, J., Mišić, D., Ristić, M., Pešić, O., Žižović, I. (2010). Supercritical CO₂ extract and essential oil of bay (*Laurus nobilis* L.) – chemical composition and antibacterial activity. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 75 (3): 395-404.
- JALAL, K., Rahmat, M., Mohammad, F. T., Himan, N. (2009). Influence of drying methods, extraction time, and organ type on essential oil content of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Nature and Science*, 7 (11): 42-44.
- JEMÂA, J. M. B., Tersim, N., Toudert, K. T., Khouja, M. L. (2012). Insecticidal activities of essential oils from leaves of *Laurus nobilis* L. from Tunisia, Algeria and Marocco, and comparative chemical composition. *Journal of Stored Products Research*, 48: 97-104.
- KAILEH, M., Berghe, W. V., Boone, E., Essawi, T., Haegeman, G. (2007). Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 113: 510-516.
- KAROUSOU, R., Deirmentzoglou, S. (2011). The herbal market of Cyprus: Traditional links and cultural exchanges. *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 191-203.
- KAURINOVIC, B., Popovic, M., Vlaisavljevic, S. (2010). In Vitro and in Vivo Effects of *Laurus nobilis* L. Leaf Extracts. *Molecules*, 15: 3378-3390.
- KHANBABAEI, K., Teunis van Ree. (2001). Tannins: classification and definition. *Natural Product Reports*, 18: 641-649.

- KIM, T. J., Nam, Kung-Woo, Kim, B., Lee, Sung-Jin, Oh, Ki-Bong, Kim, K. H., Mar, W., Shin, J. (2011). Inhibitory effects of costunolide isolated from *Laurus nobilis* on IgE-induced degranulation of mast cell-like RBL-2H3 cells and the growth of Y16 pro-B cells. *Phytotherapy Research*, 25: 1392-1397.
- KUMAR, S. (2011). Free Radicals and Antioxidants: Human and Food System. *Pelagia Research Library*, 2 (1): 129-135.
- LUNA-Herrera, J., Costa, M. C., González, H. G., Rodrigues, A. I., Castilho, P. C. (2007). Synergistic antimycobacterial activities of sesquiterpene lactones from *Laurus* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 548-552.
- MACCHIONI, F., Perrucci, S., Cioni, P., Morelli, I., Castilho, P., Cecchi, F. (2006). Composition and acaricidal activity of *Laurus novocanariensis* and *Laurus nobilis* essential oils against *Psoroptes cuniculi*. *Journal of Essential Oil Research*, 18: 111-114.
- MARIUTTI, L. R. B., Bragagnolo, N. (2007). Revisão: Antioxidantes naturais da família Lamiaceae - Aplicação em produtos alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology*, 10 (2): 96-103.
- MARMESAT, S., Morales, A., Velasco, J., Dobarganes, M. C. (2010). Action and fate of natural and synthetic antioxidants during frying. *Grasas y Aceites*, 61 (4): 333-340.
- MARZOUKI, H., Elaissi, A., Khaldi, A., Bouzid, S., Falconieri, D., Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S. (2009a). Seasonal and geographical variation of *Laurus nobilis* L. essential oil from Tunisia. *The Open Natural Products Journal*, 2: 86-91.
- MARZOUKI, H., Khaldi, A., Chamli, R., Bouzid, S., Piras, A., Falconieri, D., Marongiu, B. (2009b). Biological activity evaluation of the oils from *Laurus nobilis* of Tunisia and Algeria extracted by supercritical carbon dioxide. *Natural Product Research*, 23 (3): 230-237.
- MAZID, M., Khan, T. A., Mohammad, F. (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*, 3 (2): 232-249.

- MEDEIROS, J. M. R., Macedo, M., Contancia, J. P., Nguyen, C., Cunningham, G., Miles, D. H. (2000). Antithrombin activity of medicinal plants of the Azores. *Journal of Ethnopharmacology*, 72: 157-165.
- MEIYANTO, E., Hermawan, A., Anindyajati. (2012). Natural products for cancer-targeted therapy: citrus flavonoids as potent chemopreventive agents. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13:427-436.
- NDHLALA, A. R., Moyo, M., Staden J. V. (2010). Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules? *Molecules*, 15: 6905-6930.
- NEVES, J. M., Matos, C., Moutinho, C., Queiroz, G., Gomes, L. R. (2009). Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 124: 270-283.
- NIBRET, E., Wink, M. (2010). Trypanocidal and antileukaemic effects of the essential oils of *Hagenia abyssinica*, *Leonotis ocymifolia*, *Moringa stenopetala*, and their main individual constituents. *Phytomedicine*, 17: 911-920.
- OKIGBO, R. N., Anuagasi, C. L., Amadi, J. E. (2009). Advances in selected medicinal and aromatic plants indigenous to Africa. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3 (2): 086-095.
- OUCHIKH, O., Chahed, T., Ksouri, R., Taarit, M. B., Faleh, H., Abdelly, C., Kchouk, M. E., Marzouk, B. (2011). The effects of extraction method on the measured tocopherol level and antioxidant activity of *L. nobilis* vegetative organs. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24: 103-110.
- OZCAN, B., Esen, M., Sangun, M. K., Coleri, A., Caliskan, M. (2010). Effective antibacterial and antioxidant properties of methanolic extract of *Laurus nobilis* seed oil. *Journal of environmental Biology*, 31 (5): 637-641.

- PAPAGEORGIU, 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 (14): 5743-5752.
- PARANHOS, A. - **Cultura de células e tecidos vegetais *in vitro*: uma fonte alternativa de metabolitos secundários.** Em: Proença da Cunha, A. *Farmacognosia e Fitoquímica*. 3ª Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2010a. ISBN 978-972-31-1142-2, p. 66-88.
- PEDRO, L. G., Santos, P. A. G., Silva, J. A., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Deans, S. G., Looman, A., Scheffer, J. J. C. (2001). Essential oils from Azorean *Laurus azorica*. *Phytochemistry*, 57: 245-250.
- PÉREZ, R. A., Navarro, T., Lorenzo, C. (2007). HS-SPME analysis of the volatile compounds from spices as a source of flavour in “Campo Real” table olive preparations. *Flavour and Fragrance Journal*, 22: 265-273.
- PIETTA, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63: 1035-1042.
- PIRBALOUTI, A. G., Oraie, M., Pouriamehr, M., Babadi, E. S. (2013). Effects of drying methods on qualitative and quantitative of the essential oil of Bakhtiari savory (*Satureja bachtiarica* Bunge.). *Industrial Crops and Products*, 46: 324-327.
- POKORNY, J. (2007). Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109 (6): 629-642.
- POLITEO, O., Jukić, M. e Miloš, M. (2007). Chemical Composition and Antioxidant Activity of Free Volatile Aglycones from Laurel (*Laurus nobilis* L.) Compared to Its Essential Oil. *Croatia Chemica Acta*, 80 (1): 121-126.
- PROENÇA da Cunha, A., Ribeiro, J. A., Roque, O. R. - **O emprego das plantas aromáticas desde as antigas civilizações até ao presente.** Em: Proença da Cunha, A., Ribeiro, J. A., Roque, O. R. *Plantas aromáticas em Portugal caracterização*

e utilizações. 2ª Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2009a. ISBN 978-972-31-1170-5, p. 19-32.

PROENÇA da Cunha, A., Ribeiro, J. A., Roque, O. R. - **Flora aromática em Portugal.**

Em: Proença da Cunha, A., Ribeiro, J. A., Roque, O. R. Plantas aromáticas em Portugal caracterização e utilizações. 2ª Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2009b. ISBN 978-972-31-1170-5, p. 55-57; 109; 164 e 165.

PROENÇA da Cunha, A., Roque, O. R. – **Produção de fármacos vegetais com vista à obtenção de medicamentos à base de plantas.** Em: Proença da Cunha, A.

Farmacognosia e Fitoquímica. 3ª Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2010b. ISBN 978-972-31-1142-2, p. 90-107.

PROENÇA da Cunha, A., Roque, O. R. – **Ácidos fenólicos, fenóis e seus derivados.** Em:

Proença da Cunha, A. Farmacognosia e Fitoquímica. 3ª Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2010c. ISBN 978-972-31-1142-2, p. 217-224.

PROENÇA da Cunha, A., Batista, M. T. – **Taninos.** Em: Proença da Cunha, A.

Farmacognosia e Fitoquímica. 3ª Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2010e. ISBN 978-972-31-1142-2, p. 291-316.

PROENÇA da Cunha, A., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. – **Fármacos aromáticos (Plantas aromáticas e óleos essenciais).** Em: Proença da Cunha, A. Farmacognosia e

Fitoquímica. 3ª Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2010f. ISBN 978-972-31-1142-2, p. 339-401.

PROESTOS, C., Lytoudi, K., Mavromelanidou, O. K., Zoumpoulakis, P., Sinanoglou, V. J.

(2013). Antioxidant Capacity of Selected Plant Extracts and Their Essential Oils. *Antioxidants*, 2: 11-22.

QUASSINTI, L., Bramucci, M., Lupidi, G., Barboni, L., Ricciutelli, M., Sagratini, G., Papa, F.,

Caprioli, G., Petrelli, D., Vitali, L. A., Vittori, S., Maggi, F. (2013). *In vitro* biological activity of essential oils and isolated furanosesquiterpenes from the neglected vegetable *Smyrniolum olusatrum* L. (Apiaceae). *Food Chemistry*, 138: 808-813.

- 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): 518-529.
- REN, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., Zhang, L. (2003). Flavonoids: Promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*, 23 (4): 519-534.
- RIVERA, D., Obón, C. (1995). The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo Islands, a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 46: 73-93.
- RODILLA, J. M., Tinoco, M. T., Morais, J. C., Gimenez, C., Cabrera, R., Martín-Benito, D., Castilho, L., Gonzalez-Coloma, A. (2008). *Laurus novocanariensis* essential oil: Seasonal variation and valorization. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36: 167-176.
- ROSA, J. S., Mascarenhas, C., Oliveira, L., Teixeira, T., Barreto, M. C., Medeiros, J. (2010). Biological activity of essential oils from seven Azorean plants against *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Applied Entomology*, 134: 346-354.
- RUSSELL, W., Duthie, G. (2011). Influences of food constituents on gut health. Plant secondary metabolites and gut health: the case for phenolic acids. *Proceedings of the Nutrition Society*, 70: 389-396.
- SAAB, A. M., Tundis, R., Loizzo, M. R., Lampronti, I., Borgatti, M., Gambari, R., Menichini, F., Esseily, F. (2012). Antioxidant and antiproliferative activity of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) leaves and seeds essential oils against K562 human chronic myelogenous leukemia cells. *Natural Product Research*, 26 (18): 1741-1745.
- SAMANTA, A., Das, G., Das, S. K. (2011). Roles of flavonoids in plants. *International Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 6 (1): 12-35.
- SANTOS, G. K. N., Dutra, K. A., Barros, R. A., Câmara, C. A. G., Lira, D. D., Gusmão, N. B., Navarro, D. M. A. F. (2012). Essential oils from *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae):

Chemical composition, oviposition deterrence, larvicidal and antibacterial activity. *Industrial Crops and Products*, 40: 254-260.

SANTOYO, S., Lloría, R., Jaime, L., Ibañez, E., Señoráns, F. J., Reglero, G. (2006). Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from *Laurus nobilis* L. chemical and functional characterization. *European Food Research and Technology*, 222: 565-571.

SAYYAH, M., Valizadeh, J., Kamalinejad, M. (2002). Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* against pentylenetetrazole-and maximal electroshock-induced seizures. *Phytomedicine*, 9: 212-216.

SAYYAH, M., Saroukhani, G., Peirovi, A., Kamalinejad, M. (2003). Analgesic and anti-inflammatory activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* Linn. *Phytotherapy Research*, 17: 733-736.

SEIGLER, D. S. – **Introduction**. Em: Seigler, D. S. *Plant Secondary Metabolism*. Massachusetts: Kluwer Academic, 1998. ISBN 0-412-01981-7, p. 1-12. [Acedido a 15 de Maio de 2013]. Disponível na Internet: http://www.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=hmYbjbGUEgC&oi=fnd&pg=PP9&dq=plant+secondary+metabolism&ots=oNpYCqLj_z&sig=ZOAsTG7JSglODafPdPChwSEFv7I&redir_esc=y#v=onepage&q=plant%20secondary%20metabolism&f=false

SELLAMI, I. H., Wannes, W. A., Bettaieb, I., Berrima, S., Chahed, T., Marzouk, B., Limam, F. (2011). Qualitative and quantitative changes in the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves as affected by different drying methods. *Food Chemistry*, 126: 691-697.

SHAAYA, E., Kostjukovski, M., Eilberg, J., Sukprakarn, C. (1997). Plant oils as fumigants and contact insecticides for the control of stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*, 33: 7-15.

SHANTA, N. C., Ackman, R. G. (1990). Nervonic acid versus tricosanoic acid as internal standards in quantitative gas chromatography analysis of fish oil longer-chain n-3 polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Journal of Chromatography*, 533: 1-10.

- SIMIĆ, M., Kundaković, T. K., Kovačević, N. (2003). Preliminary assay on the antioxidative activity of *Laurus nobilis* extracts. *Fitoterapia*, 74: 613-616.
- SIMÕES, M., Bennett, R. N., Rosa, E. A. S. (2009). Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural Product Reports*, 26: 746-757.
- TAMILSELVI, N., Krishnamoorthy, P., Dhamotharan, R., Arumugam, P., Sagadevan, E. (2012). Analysis of total phenols, total tannins and screening of phytocomponents in *Indigofera aspalathoides* (Shivanar Vembu) Vahl EX DC. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4 (6): 3259-3262.
- TINOCO, M. T., Ramos, P., Candeias, M. F. (2009). Effects of a hexane extract from *Laurus novocanariensis* leaves on the ethanol metabolism of Wistar rats. *Fitoterapia*, 80 (2):130-133.
- USDA (United States Department of Agriculture), Agricultural Research Service. National Nutrient Database for Standard Reference, Release 26. [Acedido a 19 de Outubro de 2013]. Disponível na Internet: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/229?fg=&man=&facet=&count=&max=25&sort=&qlookup=&offset=225&format=Full&new=&measureby=>
- VAGIONAS, K., Graikou, K., Ngassapa, O., Runyoro, D., Chinou, I. (2007). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of three *Satureja* species growing in Tanzania. *Food Chemistry*, 103: 319-324.
- VICIOLE, E., Castilho, P., Rosado, C. (2012). In vitro and in vivo assessment of the effect of *Laurus novocanariensis* oil and essential oil in human skin. *International Journal of Cosmetic Science*, 34: 546-550.
- VINHA, A. F. (2010). Aspectos Fisiológicos, Bioquímicos e Microbiológicos de diferentes cultivares de tomates portugueses (*Lycopersicon esculentum* L.). Tese de

Doutoramento Europeu, apresentado na Faculdade de Ciências da Universidade de Vigo, Espanha.

- VINHA, A. F., Soares, M. O., Castro, A., Santos, A., Oliveira, M. B. P. P., Machado, M. (2012). Phytochemical characterization and radical scavenging activity of aqueous extracts of medicinal plants from Portugal. *European Journal of Medicinal Plants*, 2 (4): 335-347.
- XIA, G., Matsidik, R., Ablise, M., Lei, S., Abudula, A. (2013). Anti-cancer activity of flavonoids from Xinjiang *Glycyrrhiza inflata* Licorice on proliferation, cytotoxicity and apoptosis in cervical carcinoma cells. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7 (5): 173-178.
- YAMADA, T. (2004). Resistência de plantas às pragas e doenças: pode ser afetada pelo manejo da cultura? *Potafos Tecnologia para Agricultura*, 108: 1-7.