

# Caracterização do perfil fenólico do extrato aquoso e hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* L.

## Chemical characterization of the *Rosmarinus officinalis* L. aqueous and hydroethanolic extracts in terms of phenolic compounds

Andreia Ribeiro<sup>1,2</sup>, Cristina Caleja<sup>1,2</sup>, Lillian Barros<sup>1</sup>, Celestino Santos-Buelga<sup>3</sup>, Maria Filomena Barreiro<sup>2</sup> e Isabel C.F.R. Ferreira<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigação de Montanha (CIMO), ESA, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 1172, 5301-855 Bragança, Portugal

<sup>2</sup>Laboratório de Processos de Separação e Reação (LSRE), Laboratório Associado LSRE/LCM, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Santa Apolónia Ap. 1134, 5301-857 Bragança, Portugal

<sup>3</sup>GIP-USAL, Faculdade de Farmácia, Universidade de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Espanha

(\*E-mail: iferreira@ipb.pt)

<http://dx.doi.org/10.19084/RCA16232>

Recebido/received: 2016.12.22

Recebido em versão revista/received in revised form: 2017.03.17

Aceite/accepted: 2017.03.17

### RESUMO

Desde a antiguidade, as plantas têm suscitado grande interesse pelos benefícios que trazem para a saúde humana. Em particular, algumas espécies de plantas, para além das suas características aromáticas, constituem uma fonte natural de diversos compostos bioativos nomeadamente compostos fenólicos, que têm sido associados a propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, entre outras. Neste trabalho, estudaram-se amostras de *Rosmarinus officinalis* L. fornecidas pelo Cantinho das Aromáticas Lda. (Vila Nova de Gaia). Prepararam-se duas tipologias de extratos, aquoso e hidroetanólico, que foram subseqüentemente caracterizados por HPLC-DAD-ESI/MS. Relativamente ao extrato hidroetanólico, o extrato aquoso apresentou um teor de compostos fenólicos total superior, assim como concentrações dos compostos individuais superiores. O ácido rosmarínico foi o composto mais abundante em ambos os extratos.

**Palavras-chave:** *Rosmarinus officinalis* L., compostos fenólicos, cromatografia, espetrometria de massa.

### ABSTRACT

Since the primitive societies, plants have received great attention due to the benefits they bring to human health. In particular, some plant species, in addition to their aromatic characteristics, provide natural sources of several bioactive molecules including phenolic compounds, which have been associated with antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial properties, among others. In this work, *Rosmarinus officinalis* L. samples provided by Cantinho das Aromáticas Lda. (Vila Nova de Gaia) were studied. Aqueous and hydroethanolic extracts were prepared and chemically characterized by HPLC-DAD-ESI/MS. The aqueous extract showed a higher content in total phenolic compounds as also in each of the individual compounds, in comparison to the hydroethanolic extract. Rosmarinic acid was the most abundant compound present in both extracts.

**Keywords:** *Rosmarinus officinalis* L., phenolic compounds, chromatography, mass spectrometry.

### INTRODUÇÃO

*Rosmarinus officinalis* L., vulgarmente conhecido por alecrim, é nativo das regiões mediterrânicas. Trata-se de uma das plantas mais conhecidas desde a antiguidade devido às suas propriedades medicinais, condimentares e aromatizantes (Bellumori *et al.*, 2015). São atribuídas várias bioatividades aos

extratos de alecrim de entre as quais se destacam as propriedades antioxidantes (Vicente *et al.*, 2013), antimicrobianas (Laham e Fadel, 2013), anti-inflamatórias (Arranz *et al.*, 2013), antidiabéticas (Bakiral *et al.*, 2008) e hepatoprotetoras (Al-Attar e Shawush, 2015). Estes atributos medicinais têm sido relacionados com o seu elevado teor em compostos fenólicos, principalmente derivados de

ácido cafeico, tais como o ácido rosmarínico, que é um dos principais componentes encontrados nesta planta (Couto *et al.*, 2011). O principal objetivo deste trabalho foi identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes em preparados vulgarmente usados como no caso de infusões.

## MATERIAL E MÉTODOS

A amostra de *Rosmarinus officinalis* L. foi gentilmente cedida pelo Cantinho das Aromáticas (Vila Nova de Gaia, Portugal), no estado seco. O seu armazenamento foi realizado num local seco e ao abrigo da luz.

Na preparação do extrato aquoso (infusão), a amostra (2 g) foi adicionada a 100 mL de água destilada em ebulição, deixada repousar durante 7 min e, posteriormente, filtrada com papel Whatman No. 4. Na preparação do extrato hidroetanólico, a amostra (2 g) foi macerada com 30 mL de uma mistura etanol:água (80:20 v/v), durante uma hora. O processo foi repetido nas mesmas condições à mesma amostra. Posteriormente os dois extratos obtidos foram combinados e o etanol evaporado. Ambas as amostras foram congeladas e liofilizadas para posterior utilização.

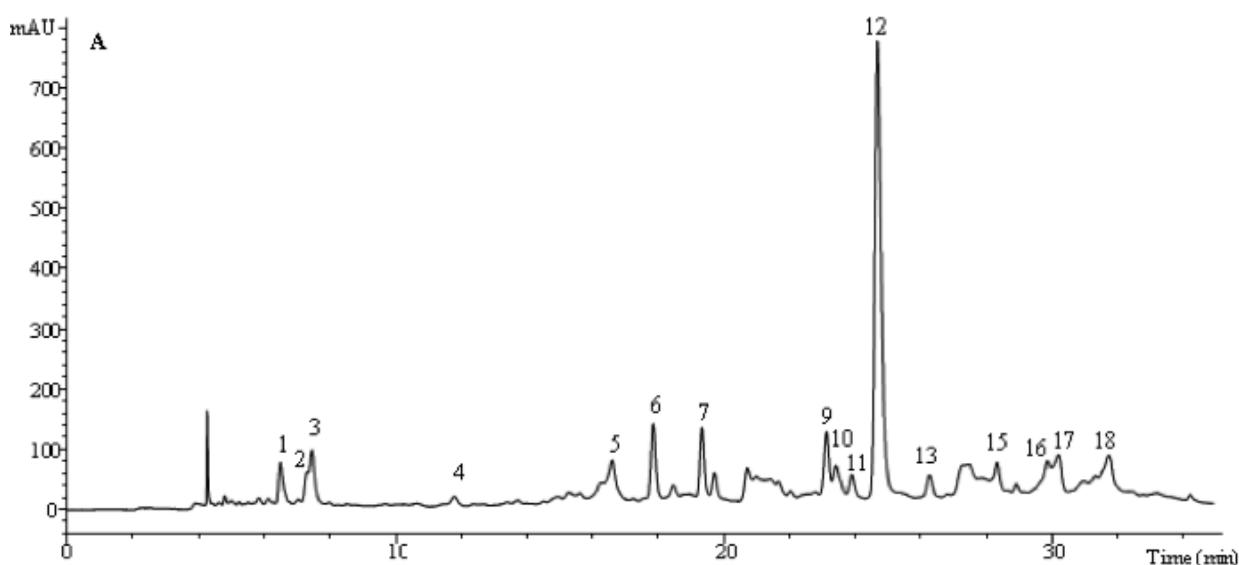
A análise dos compostos fenólicos foi efetuada por

cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa acoplada com deteção por díodos e espectrometria de massa (HPLC-DAD-ESI/MS). A separação cromatográfica foi efetuada numa coluna S3 ODS-2 C18 Spherisorb Waters, utilizando como fase móvel uma mistura água/acetonitrilo com 0,1% de ácido fórmico, em modo gradiente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra o perfil de compostos fenólicos do extrato aquoso de alecrim registado a 280 nm. No Quadro 1 são apresentadas as possíveis identificações dos compostos fenólicos presentes no extrato aquoso e hidroetanólico bem como a respetiva quantificação. Pela observação da tabela é possível verificar que existem diferenças nas quantidades assim como na composição fenólica das duas preparações, sobretudo no extrato hidroetanólico onde se verificou a ausência de alguns compostos, nomeadamente, isómero do ácido litospérmico A, ácido salvianólico B, isómero do ácido litospérmico A e derivados do ácido cafeico (tetrâmeros).

Foi registada a presença de compostos fenólicos com grupos cafeoil, mais especificamente 16 dos 18 compostos detetados, numa concentração total de  $154,52 \pm 2$  mg/g no extrato aquoso



**Figura 1** - Cromatograma individual do extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis* obtido a 280 nm.

**Quadro 1** - Identificação e quantificação de compostos fenólicos nos extratos aquoso e hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis*

Pico	Possível identificação	Extrato aquoso	Extrato hidroetanólico	t-Student valor de p
1	Hexósido do ácido cafeico	3,1±0,1	1,81±0,03	<0,001
2	Hexósido do ácido cafeico	1,9±0,1	1,41±0,04	<0,001
3	Ácido-4-O-cafeoilquínico	6,31±0,04	5,0±0,1	<0,001
4	Ácido cafeico	1,1±0,1	0,7±0,1	<0,001
5	Ácido yunaneico D	9,3±0,1	1,85±0,02	<0,001
6	Ácido yunaneico F	10,14±0,05	2,2±0,3	<0,001
7	Hexósido do ácido rosmarínico	9,1±0,1	4,4±0,1	<0,001
8	Glucuronido de luteolina	3,6±0,1	0,65±0,02	<0,001
9	Derivado do ácido cafeico (tetrâmeros)	nq	nq	-
10	Ácido sagerínico	7,0±0,2	2,6±0,1	<0,001
11	Sagecoumarina	4,87±0,01	1,3±0,1	<0,001
12	Ácido rosmarínico	68,5±0,1	13,1±0,1	<0,001
13	Derivados de ácido cafeico	nq	nq	-
14	Glucuronido de luteolina	8,7±0,1	0,29±0,01	<0,001
15	Isómero do ácido litospérmico A	6,9±0,2	nd	-
16	Ácido salvianólico B	7,1±0,3	nd	-
17	Isómero do ácido litospérmico A	9,9±0,2	nd	-
18	Derivado do ácido cafeico (tetrâmeros)	9,3±0,4	nd	-

nq – não quantificado; nd – não detetado

e de 34,37±0,99 mg/g no extrato hidroetanólico. Os restantes compostos quantificados correspondem a flavonoides que foram identificados como derivados de flavonas e que apresentaram concentrações de 12,3±0,2 e 0,94±0,03 mg/g nos extratos aquoso e hidroetanólico, respetivamente. Relativamente ao extrato hidroetanólico, o extrato aquoso apresentou um teor de compostos fenólicos total superior, assim como concentrações dos compostos individuais superiores. O ácido rosmarínico foi o composto mais abundante em ambos os extratos, com concentrações de 68,5±0,1 e 13,1±0,1 mg/g para os extratos aquoso e hidroetanólico, respetivamente. A presença do ácido rosmarínico, bem como do ácido cafeico em amostras de alecrim já havia sido descrita anteriormente por outros autores (Ferrer-Gallego *et al.*, 2014; Vallverdú-Queralt *et al.*, 2014; Maringer *et al.*, 2015). No entanto, os extratos obtidos neste trabalho revelaram maiores concentrações de ácido rosmarínico e cafeico comparativamente às concentrações obtidas no trabalho desenvolvido por Vallverdú-Queralt *et al.* (2014) que representam, respetivamente, 156,90±3,20 e 12,58±0,44 µg/g.

## CONCLUSÃO

Com este estudo, destacou-se a presença de compostos bioativos no alecrim, sendo o de ácido rosmarínico o composto maioritário relevando maiores quantidades no extrato aquoso, obtido por um procedimento de infusão. Este extrato poderá ser utilizado como ingrediente natural no desenvolvimento de alimentos funcionais, desde de produtos de panificação como em produtos lácteos, com benefícios para a saúde do consumidor.

## AGRADECIMENTOS

FCT pelo financiamento ao CIMO (Projeto PEst-OE/AGR/UI0690/2014). FCT/MEC e FEDER – Programa PT2020 pelo financiamento ao LSRE (Project UID/EQU/50020/2013). QREN, ON2 e FEDER (Projeto NORTE-07-0124-FEDER-000014) e PRODER (Projeto n.º 46577 – PlantLact).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Attar, A. & Shawush, N. A. (2015) – Influence of olive and rosemary leaves extracts on chemically induced liver cirrhosis in male rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 22, n. 2, p. 157-163. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.005>
- Arranz, E.; Mes, J.; Wichers, H.J.; Jaime, L.; Mendiola, J.A.; Reglero, G. & Santoyo, S. (2013) – Anti-inflammatory activity of the basolateral fraction of Caco-2 cells exposed to a rosemary supercritical extract. *Journal of Functional Foods*, vol. 13, p. 384-390. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.015>
- Bakiral, T.; Bakirel, U.; Keles, O.U.; Ulgen, S.G. & Yardibi, H. (2008) – In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *Journal of Ethno-Pharmacology*, vol. 116, n. 1, p. 64-73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2007.10.039>
- Bellumori, M.; Michelozzi, M.; Innocenti, M.; Congiu, F.; Cencetti G. & Mulinacci, N. (2015) – An innovative approach to the recovery of phenolic compounds and volatile terpenes from the same fresh foliar sample of *Rosmarinus officinalis* L. *Talanta*, vol. 131, p. 81-87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.073>
- Couto, R.; Conceição, E.C.; Chaul, L.T.; Oliveira, M.S.; Alves, S.F.; Rezende, K.R.; Bara, M.T.F. & Paula, J.R. (2011) – Validated HPLC-PDA method for rosmarinic acid quantification in rosemary. *Latin American Journal of Pharmacy*, vol. 30, n. 10, p. 1951-1956.
- Ferrer-Gallego, P.; Ferrer-Gallego, R.; Roselló, R.; Peris, J.B.; Guillén, A.; Gómez, J. & Laguna, E. (2014) – A new subspecies of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) from the eastern sector of the Iberian Peninsula. *Phytotaxa*, vol. 172, n. 2, p. 61-70. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.172.2.1>
- Laham, S.A.A. & Fadel, F.M. (2013) – Antibacterial efficacy of variety plants against the resistant streptococcus which cause clinical mastitis cows. *Asian Journal of Pharmaceutical Research & Health Care*, vol. 5, n. 1, p. 32-41.
- Maringer, L.; Ibáñez, E.; Bucherger, W.; Klampfl, C.W. & Causon, T.J. (2015) – Using sheath-liquid reagents for capillary electrophoresis-mass spectrometry: Application to the analysis of phenolic plant extracts. *Electrophoresis*, vol. 36, n. 2, p. 348-354. <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201400429>
- Vallverdú-Queralt, A.; Regueiro, J.; Martínez-Huélamo, M.; Alvarenga, J.F.R.; Leal, L.N. & Lamuela-Raventós, R.M. (2014) – A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chemistry*, vol. 154, p. 299-307. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.106>
- Vicente, G.; Molina, S.; González-Vallinas, M.; García-Risco, M.R.; Fornari, T.; Reglero, G. & Molina, A. M. (2013) – Supercritical rosemary extracts, their antioxidant activity and effect on hepatic tumor progression. *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 79, p. 101-108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2012.07.006>