

Biovalorização do Óleo Essencial e Subprodutos obtidos por Hidrodestilação de Ramada de *Cryptomeria japonica* coletada em duas estações anuais

Dissertação de Mestrado

Tânia Maria da Silva Rodrigues

Mestrado em
Ciências Biomédicas



Ponta Delgada
2023

Biovalorização do Óleo Essencial e Subprodutos obtidos por Hidrodestilação de Ramada de *Cryptomeria japonica* coletada em duas estações anuais

Dissertação de Mestrado

Tânia Maria da Silva Rodrigues

Orientadores

Professora Doutora Elisabete Maria de Castro Lima

Investigadora Ana Patrícia Rego Lima

Professor Doutor José Silvino Santos da Rosa

Dissertação de Mestrado submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre Ciências Biomédicas

Agradecimentos

A realização deste trabalho de tese, e posterior obtenção do Grau de Mestre, não teria sido possível sem o tremendo auxílio e constante apoio que recebi ao longo desta jornada académica, devendo expressar a minha gratidão a todos os que estiveram envolvidos e que ofereceram a sua disponibilidade para que este objetivo pessoal se concretizasse.

À minha orientadora, Professora Doutora Elisabete Maria de Castro Lima, confiro o mais solene agradecimento pela oportunidade que me foi dada com a efetuação deste trabalho, expressando também como a transmissão do seu vasto conhecimento, em conjunto com o seu inabalável sentido de confiança que em mim depositou, me foram essenciais para enfrentar os meus momentos de desânimo e terminar esta tese com orgulho.

À minha orientadora, Doutora Ana Patrícia Rego Lima, deixo o meu sentimento de profunda gratidão por sempre ter acompanhado de perto todo o meu percurso laboratorial, assim como pelo seu inspirador espírito de dedicação e esforço, auxiliando na pronta resolução de qualquer problema que me surgisse pelo caminho, por mais difícil que fosse, e na correção de todos os meus erros.

Ao meu orientador, Professor Doutor José Silvino Santos da Rosa, agradeço-lhe devidamente por todo o material que me disponibilizou para a pesquisa e desenvolvimento desta minha tese, tal como a sua prontidão para esclarecer qualquer dúvida que me ocorresse e pelas ideias e sugestões oferecidas, as quais não formulara através do meu próprio crédito intelectual.

Ao Professor Doutor José António Bettencourt Baptista, pela sua contribuição na caracterização química das minhas amostras, guiando-me pelos devidos conhecimentos teóricos e procedimentos laboratoriais necessários à concretização desta secção do meu trabalho, a qual sempre senti como sendo o meu mais difícil desafio a compreender e resolver.

Ao Professor Catedrático Nelson José de Oliveira Simões, e à Doutora Rita Isabel Pereira Cordeiro, por todo a sua disponibilização no empréstimo de material e equipamento sem os quais não seria possível avançar o meu trabalho.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Filipe Arruda e Alexandre Janeiro, agradeço-vos pela vossa inabalável boa-disposição e sentido de humor, os quais me permitiram descontraír nos meus momentos de maior pressão, e repor as minhas energias gastas.

Por fim, mas não de menor importância, agradeço a todos aqueles que, fora do contexto universitário, sempre estiveram ao meu lado quando mais necessitava e me encorajaram a não me dar por vencida, permanecendo sempre compreensivos comigo e otimistas em relação ao futuro, apesar dos meus percalços, e deixo a minha infinita gratidão à minha família, particularmente aos meus pais, ao meu irmão, e aos meus avós, assim como ao meu mais próximo círculo de amigos, Sabrina Pacheco, Daniela Benevides, André Mateus e Henrique Arruda.

A todos os que me auxiliaram, de qualquer maneira, na realização deste trabalho científico, e que foram o meu porto de abrigo nos meus piores momentos, agradeço-vos novamente, com todo o meu carinho.

Resumo

No presente trabalho de Tese de Mestrado, baseado no conceito de aproveitamento integral de resíduos de biomassa de *Cryptomeria japonica* e consequente valorização económica, investigou-se, pela primeira vez, a influência da sazonalidade sobre o rendimento, composição química e bioatividade do óleo essencial (OE), hidrolato (Hdl), resíduo vegetal (ResVGT) e águas residuais (AGRes) provenientes do processo de hidrodestilação da ramada da referida planta, colhida no outono de 2022 e primavera de 2023 na ilha de São Miguel (Açores). Quanto ao rendimento das amostras em estudo, verificou-se que não variou significativamente com a sazonalidade, mas as AGRes e os ResVGT apresentaram rendimentos superiores (> 9%) aos voláteis ($\leq 1,3\%$). Em relação à composição química dos OEs, a análise por GC/MS revelou a predominância ($\geq 4\%$) de quatro grupos de compostos terpénicos, com quantidades variáveis: hidrocarbonetos monoterpénicos ($39\%_{\text{OUTONO}}$ e $22\%_{\text{PRIMAVERA}}$), sesquiterpenos oxigenados ($28\%_{\text{OUTONO}}$ e $41\%_{\text{PRIMAVERA}}$), hidrocarbonetos diterpénicos ($24\%_{\text{OUTONO}}$ e $27\%_{\text{PRIMAVERA}}$) e monoterpénos oxigenados ($5\%_{\text{OUTONO}}$ e $4\%_{\text{PRIMAVERA}}$). Relativamente ao perfil químico dos Hdls, a análise cromatográfica mostrou a presença de dois componentes terpénicos maioritários, o terpineno-4-ol e o elemol, com o seguinte teor: $26\%_{\text{OUTONO}}$ e $18\%_{\text{PRIMAVERA}}$, e $17\%_{\text{OUTONO}}$ e $28\%_{\text{PRIMAVERA}}$, respetivamente. Em relação às amostras ResVGT e AGRes, os seus extratos foram caracterizados quanto ao Teor de Polifenóis Totais (TPT) e ao Teor de Flavonoides Totais (TFT). Observou-se que o TPT é significativamente mais elevado nas AGRes do que nos ResVGT (74_{OUTONO} - $76_{\text{PRIMAVERA}}$ e 31_{OUTONO} - $27_{\text{PRIMAVERA}}$ mg equivalente de ácido gálico/g extrato, respetivamente) e que, pelo contrário, os ResVGT apresentam maior TFT do que as AGRes (24_{OUTONO} - $25_{\text{PRIMAVERA}}$ e 2_{OUTONO} - $8_{\text{PRIMAVERA}}$ mg equivalente de quercetina/g extrato, respetivamente). Ainda sobre os TPT e TFT, constatou-se que apenas o TFT dos extratos das AGRes é significativamente afetado pela estação anual, conforme pode ser observado nos valores acima apresentados. Quanto às atividades biológicas das amostras em estudo, registaram-se os seguintes resultados: (1) apenas os OEs e ResVGT demonstraram atividade contra bactérias Gram-positivas, com níveis fracos (halos de inibição de 7 - 10 mm no ensaio disco-difusão, sem diferenças significativas entre estações) e variáveis (valores MIC: 5 - 20 mg/mL OE_{OUTONO} e 5 - >20 mg/mL OE_{PRIMAVERA}), não apresentando atividade antifúngica; (2) nenhuma das amostras demonstrou atividade anti-acetilcolinesterásica e (3) as AGRes demonstraram maior potencial sequestrador de radical livre (DPPH) (IC₅₀: 86 µg/mL_{OUTONO} e 65 µg/mL_{PRIMAVERA}) e poder redutor (265_{OUTONO} e 402_{PRIMAVERA} µmol equivalente de Trolox/g extrato), com valores significativamente superiores nas amostras de primavera, enquanto os ResVGT foram as únicas amostras que apresentaram poder quelante, sem diferenças significativas entre estações (15%_{OUTONO} e 17%_{PRIMAVERA}, a 11 µg/mL). Deste modo, conclui-se que a variabilidade química observada nas diferentes amostras estudadas, bem como o efeito da sazonalidade no seu perfil químico quantitativo, têm certamente influência nas suas propriedades bioativas, tornando estas amostras em produtos de potencial interesse para distintos propósitos, como por exemplo aplicações medicinais. De facto, as AGRes e ResVGT possuem um interessante potencial terapêutico devido à sua ação antioxidante, associada à sua composição rica em polifenóis e/ou flavonoides, e quanto aos OEs, apesar de não mostrarem as atividades biológicas mais significativas, podem, se fracionados, representar fontes importantes de frações/compostos com potencial antimicrobiano e anti-acetilcolinesterásico. Assim, este trabalho representa um contributo para o conhecimento atual sobre *C. japonica* açoriana, e constitui também uma base sólida para estudos futuros relacionados. É ainda de salientar que, para além da promoção do potencial desta espécie, através da valorização de produtos vegetais frequentemente desaproveitados, o presente trabalho pode também auxiliar na fomentação e

cumprimento de medidas governamentais que visam a aplicação de técnicas de exploração de recursos naturais mais ambientalmente sustentáveis, incentivando ao desenvolvimento da economia circular regional.

Palavras-chave: *Cryptomeria japonica*; Região Autónoma dos Açores; sazonalidade; hidrodestilação; óleos essenciais; valorização de subprodutos; rendimento; composição química; atividades biológicas.

Abstract

Based on the concept of integral exploitation of *Cryptomeria japonica* biomass residues and consequent economic valorization, it was investigated in this Master Thesis work, for the first time, the seasonality's influence on the yield, chemical composition and bioactivity of essential oil (EO), hydrolate (Hdl), solid vegetal residue (VGTRes) and wastewater (WW) obtained from the process of hydrodistillation of the species foliage, harvested in autumn 2022 and spring 2023 in São Miguel (Azores) island. Regarding the studied samples' yield, it did not vary significantly between seasons, although the WW and VGTRes showed superior yields (> 9%) to those of the volatiles ($\leq 1,3\%$). Concerning the EOs' chemical composition, the GC/MS analysis revealed the dominance ($\geq 4\%$) of four groups of terpene compounds, with variable quantities: monoterpene hydrocarbons (39%_{AUTUMN} and 22%_{SPRING}), oxygenated sesquiterpenes (28%_{AUTUMN} and 41%_{SPRING}), diterpene hydrocarbons (24%_{AUTUMN} and 27%_{SPRING}) and oxygenated monoterpenes (5%_{AUTUMN} and 4%_{SPRING}). In respect to the Hdls' chemical profile, the chromatographic analysis showed the presence of two major terpene components, terpinen-4-ol and elemol, with the following content: 26%_{AUTUMN} and 18%_{SPRING}, and 17%_{AUTUMN} and 28%_{SPRING}, respectively. Regarding VGTRes and WW samples, their extracts were characterized in terms of their Total Polyphenolic Content (TPC) and Total Flavonoid Content (TFC). It was observed that TPC was significantly higher in WW than VGTRes (74_{AUTUMN} - 76_{SPRING} and 31_{AUTUMN} - 27_{SPRING} mg equivalent of gallic acid/g extract, respectively), and, on the other hand, the VGTRes exhibited higher TFC than WW (24_{AUTUMN} - 25_{SPRING} and 2_{AUTUMN} - 8_{SPRING} mg equivalent of quercetin/g extract, respectively). Also, it was noted that only the WW TFC is significantly affected by season, as it can be observed by the values referred above. Concerning these samples' biological activities, the following results were registered: (1) only the EOs and VGTRes demonstrated activity against Gram-positive bacteria, although weak (inhibition zone with 7 - 10 mm, without significant differences between seasons) or variable (MIC values: 5 - 20 mg/mL EO_{AUTUMN} and 5 - >20 mg/mL EO_{SPRING}), having shown no antifungal activity; (2) none of the studied samples showed antiacetylcholinesterase activity and (3) the WW demonstrated the highest free radical (DPPH) scavenging potential (IC₅₀: 86 $\mu\text{g/mL}$ _{AUTUMN} and 65 $\mu\text{g/mL}$ _{SPRING}) and reducing power (265_{AUTUMN} and 402_{SPRING} μmol equivalent of Trolox/g extract), with significantly better values in the spring samples, while the VGTRes was the only sample that showed chelating power, with no significant differences between seasons (15%_{AUTUMN} and 17%_{SPRING}, at 11 $\mu\text{g/mL}$). In this sense, it was concluded that the observed chemical variability found in the different studied samples, along with the seasonality's effect on their quantitative chemical profile, had a certain influence on their bioactive properties, turning these samples into products of potential interest for distinctive purposes, as, for example, medicinal applications. In fact, WW and VGTRes possess an interesting therapeutic potential due to their antioxidant action, associated with their rich polyphenolic and/or flavonoid composition, while EOs, despite not showing the best biological activities, they can, if fractionated, represent important sources of fractions/compounds with antimicrobial and antiacetylcholinesterase potential. Thus, this work represents a contribute to the current knowledge on Azorean *C. japonica* and constitutes a solid foundation for related future studies. It is worth noting that, besides promoting this species' potential, through the valorization of frequently unutilized biomass vegetal products, the present work may also aid in the promotion and fulfillment of governmental measures that focus on the application of more environmentally sustainable techniques for natural resources exploration, propelling the development of a regional circular economy.

Keywords: *Cryptomeria japonica*; Azores Autonomous Region; seasonality; hydrodistillation; essential oils; by-product valorization; yield; chemical composition; biological activities.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract	vi
Lista de abreviaturas, siglas, acrónimos e símbolos químicos	x
Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas.....	xvi
1. Introdução	1
1.1 Enquadramento	1
1.2 Objetivos gerais e específicos	3
1.3 Contributo científico.....	4
1.4 Estrutura da tese	4
2. Revisão bibliográfica	5
2.1 A importância das plantas	5
2.2 Metabolitos Secundários de Plantas (MSP): o caso particular dos Óleos Essenciais (OEs)..	9
2.3 A Hidrodestilação (HD) como processo de extração de OEs e o valor considerável de subprodutos originados	14
2.4 A vegetação açoriana: a importância de <i>Cryptomeria japonica</i> D. Don (Thunb. ex L.f.) e valorização de resíduos gerados pela sua exploração	19
3. Metodologia	26
3.1 Obtenção de material vegetal, amostras e padrões químicos	26
3.1.1 Material vegetal	26
3.1.2 Padrões químicos	26
3.1.3 Obtenção das amostras por hidrodestilação (HD)	27
3.2 Caracterização do perfil químico dos OEs por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS).....	29
3.3 Caracterização do perfil químico dos Hdls	29
3.3.1 Extração dos voláteis dos hidrolatos	29
3.3.2 Análise dos voláteis dos Hdls por cromatografia gasosa (GC)	29
3.4 Determinação do Teor de Polifenóis Totais (TPT) dos EAGRes e EResVGT	30
3.5 Determinação do Teor de Flavonoides Totais (TFT) dos EAGRes e EResVGT	31
3.6 Avaliação das distintas atividades biológicas dos OEs, Hdls, EAGRes e EResVGT	33
3.6.1 Avaliação de atividade antimicrobiana.....	33
3.6.1.1 Ensaio de disco-difusão em meio agarizado.....	34
3.6.1.2 Ensaio de determinação do valor MIC.....	36

3.6.2 Avaliação de atividade anti-acetilcolinesterase	37
3.6.3 Avaliação de atividade antioxidante.....	38
3.6.3.1 Atividade de remoção de radicais DPPH.....	38
3.6.3.2 Poder antioxidante de redução de íões férricos.....	40
3.6.3.3 Atividade quelante de íão ferroso.....	41
3.7 Análise estatística.....	43
4. Resultados e Discussão.....	44
4.1 Rendimento das amostras	44
4.2 Caracterização do perfil químico dos OEs e Hdls	46
4.2.1 Perfil químico dos OEs	46
4.2.2 Perfil químico dos Hdls	48
4.3 Determinação dos valores de TPT dos EAGRes e EResVGT	49
4.4 Determinação dos valores do TFT dos EAGRes e EResVGT	51
4.5 Avaliação das atividades biológicas de OEs, Hdls, EAGRes e EResVGT	53
4.5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	53
4.5.2 Avaliação de atividade anti-acetilcolinesterase	59
4.5.3 Avaliação de atividade antioxidante.....	61
4.5.3.1 Atividade de remoção de radicais DPPH.....	61
4.5.3.2 Poder antioxidante de redução de íões férricos.....	63
4.5.3.3 Atividade quelante de íão ferroso.....	65
Conclusões e trabalho futuro	68
Referências Bibliográficas	70