João Paulo da Costa de Noronha

METABOLITOS SECUNDÁRIOS DO FRUTO DE *ARBUTUS UNEDO* L. (Medronho)

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Doutor em Química, especialidade em Química Orgânica pela Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia.

Lisboa
2001

Nº de arquivo
"copyright"

O problema da autonomia: a aprendizagem do vazio.

Arno Gruen

Agradecimentos

Agradeço ao Departamento de Química – FCT – UNL e ao Centro de Química Fina e Biotecnologia (CQFB) todos os apoios prestados durante a execução desta dissertação bem como o financiamento parcial do Projecto Praxis/2/2.1/QUI/305/94 (de Outubro de 1998 a Fevereiro de 1999).

Agradeço ao Prof. Doutor Higuinaldo Chaves das Neves, coordenador do grupo de cadeiras QOF, a proposta de iniciar este trabalho sob sua orientação institucional.

Agradeço à pessoa que sempre me acompanhou cientificamente (co-orientadora), a Doutora Elvira Gaspar, por desde o primeiro momento acreditar em mim e me orientar com um carinho e dedicação inexcedíveis.

Ao Prof. Doutor Nunes dos Santos agradeço a disponibilidade, ponderação, apoios institucional e pessoal prestados. Agradeço também ao Conselho Científico, na pessoa do seu Presidente, o apoio financeiro na impressão deste trabalho.

Agradeço à família Almeida, amigos que desinteressada e atempadamente colheram, seleccionaram e me enviaram da sua propriedade no lugar de Cepos, Arganil, os medronhos para este estudo, em particular ao João, à Rosário e à Carmo; pela sua enorme disponibilidade, empenho, capacidade de mobilização, carinho e cuidado na criteriosa selecção dos frutos.

Ao Departamento de Química – C.Q.F.B., na pessoa do seu ex-Presidente Prof. Doutor José Galhardas Moura, agradeço a disponibilização da sala gráfica departamental, sem a qual não teria sido possível a dactilografia deste trabalho.

Torno extensivos os meus agradecimentos a quantos me prestaram valiosa colaboração científica. Saliento:

- Ao Prof. Doutor José Barroso e Doutora Cristina Figueiredo (Departamento de Biologia Vegetal - Faculdade de Ciências - UL) agradeço a valiosa colaboração no estudo dos compostos terpenóides e compostos de baixa massa molecular e baixo ponto de ebulição e a cedência de padrões, bem como a amizade e incentivo.

- À Drª. Mª Rosário Caras-Altas (DQ-FCT-UNL) agradeço a colaboração na espectroscopia de RMN.

- À Drª. Lucília C. Vales (Faculdade de Farmácia - UL) agradeço a colaboração na execução das análises bromatológicas.

Um agradecimento especial aos colegas do Departamento de Química e amigos Jorge Parola, Eurico Cabrita, Madalena Dionísio, Mª João Melo, João Sotomayor, Helena Sousa, Alexandra Bernardo, André Saint-Maurice, companheiros diários de aventuras gastronómicas, pelo forte apoio e fonte de boa disposição durante estes anos.

Ao Hélder Bértolo, agradeço muito especialmente a sua grande amizade e ajuda na revisão deste manuscrito.

Aos meus amigos do Norte, bem como todos os outros mais recentes, agradeço a companhia, carinho, paciência e incentivo, os quais tornaram menos penosas as horas difíceis.

À minha família, em particular à minha tia Eulália, agradeço a presença constante, conselhos, cumplicidades e estímulos que me acompanharam ao longo destes anos.

Resumo

O medronheiro, *Arbutus unedo* L., é uma planta característica do matorral montanhoso e bosques do Mediterrâneo e da Europa meridional, existindo também em África e na Austrália. Em Portugal encontra-se especialmente nas regiões costeiras mais quentes, com uma maior incidência no Algarve.

O fruto - o medronho - possui a forma de baga, rugosa e avermelhada na maturação. Apesar de visualmente apelativo, aromático e doce, o fruto é "um pouco narcótico". A designação latina desta planta da família das Ericáceas, *Arbutus unedo*, em que *unedo* = *unum tantum edo* significa "eu como só um" é, provavelmente, indicativa do conhecimento ancestral dos sintomas de mal-estar associados à ingestão de uma maior quantidade de frutos.

A presente dissertação inclui o estudo de metabolitos secundários do medronho, o fruto da planta *Arbutus unedo* L.. O objectivo deste trabalho consiste em aprofundar o conhecimento da sua composição química e averiguar a existência de moléculas cuja actividade biológica possa ser associada ao efeito de mal-estar.

A dissertação apresenta na introdução a descrição do fruto, incluindo-se nesta os aspectos botânicos e as suas utilizações. Referem-se igualmente os fenómenos mais decisivos e influenciadores da química dos frutos em geral. Em seguida abordam-se, sumariamente, os metabolitos secundários mais associados à química dos frutos, incluindo-se uma breve revisão dos métodos de isolamento e identificação.

Utilizando a cromatografia gás-líquido de alta resolução (HRGC) e a sua associação à espectrometria de massa (GC-MS) e, executando posteriormente a comparação com amostras autênticas, foi possível identificar 70 compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição (voláteis), 30 ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia carbonada longa, 9 hidrocarbonetos, ácidos carboxílicos e cetonas de cadeia comprida, 14 compostos triterpénicos, incluindo triterpenos pentacíclicos e tetracíclicos e, ainda, 9 novos produtos naturais: duas séries de ésteres longos em C_{18}, C_{19}, $C_{20,}$ C_{22} e C_{12}, C_{14}, C_{17}, C_{18}, C_{20} dos ácidos octanóico e decanóico respectivamente.

Foram também isolados e identificados, com base nos dados cromatográficos, espectroscópicos e constantes físicas, 7 compostos triterpénicos, sendo o diol pentacíclico olean-12-en-3β,23-diol, um produto natural novo. Os restantes triterpenóides isolados foram a α-amirina, a β-amirina, o lupeol, o ácido ursólico, o ácido oleanólico e o β-sitosterol.

Com excepção do ácido ursólico e lupeol, todos os restantes compostos foram identificados pela primeira vez no medronho.

Foram ainda postuladas 35 estruturas.

Por ser um fruto edível, efectuou-se igualmente a sua análise bromatológica.

O último capítulo da tese descreve a actividade biológica mais significativa dos compostos identificados.

Abstract

Strawberry tree, *Arbutus unedo* L. is a typical shrub, which can be found in Mediterranean and South Europe matorral highlands and forests. It also exists in Africa and Australia. In Portugal, it can be found in coastal areas, especially in the Algarve. The plant belongs to the Ericaceae family.

The fruit is a pulpy, wrinkled, red berry in maturescence. Although the fruit is beautiful, aromatic and sweet it is not consumed in a large scale, being considered "a little bit narcotic".

The Latin name, *Arbutus unedo* (*unedo* means "I eat only one") seems to indicate an ancestral knowledge of the psychotropic side effects associated to the ingestion of fruits.

This dissertation presents the study of secondary metabolites of *Arbutus unedo* L. fruits. The main purpose of this work is to make a serious study of its chemical composition and to screen molecules with biological activity that would be associated with the known side effects.

The thesis has an introductory chapter, which deals with the description of the fruit including the botanical aspects and its main uses. The chemistry of the fruits during the most decisive stages of their development cycle is also included. At the end of this chapter a report on the secondary metabolites related to the chemistry of the fruits is presented, including a brief review of the isolation and identification methods.

For identification purposes high-resolution gas-liquid chromatography (HRGC) and its hyphenation with mass spectrometry (GC-MS) was used; further the comparison with authentic samples allowed the identification of 70 compounds of small molecular mass and low boiling point (volatiles), 30 long chain esters of carboxylic acids, 9 hydrocarbons, carboxylic acids and long chain ketones, 14 triterpenic compounds, including pentacyclic and tetracyclic triterpenes structures and also 9 new natural products: two series of long esters in C_{18}, C_{19}, C_{20}, C_{22} and C_{12}, C_{14}, C_{17}, C_{18}, C_{20} of the octanoic and decanoic acids, respectively.

Also 7 triterpenic compounds have been isolated and identified by examination of the chromatographic and spectroscopic data and comparison of physical constants. A new pentacyclic triterpenic diol, olean-12-en-3β,23-diol, has been identified. It is a new natural product. α-amyrin, β-amyrin, lupeol, β-sitosterol, ursolic acid and oleanolic acid were the other isolated triterpenoids.

With the exception of ursolic acid and lupeol, all the other compounds are described for the first time in the strawberry tree fruits.

This thesis also includes 35 postulated structures.

Being an edible fruit, its chemical food analysis was also performed.

Finally, the last chapter of the thesis describes the most significant biological activity of the identified structures.

Résumé

L'arbousier, *Arbutus unedo* L., est une plante caractéristique de la brousse montagneuse, des bois méditerranée et de l'Europe méridionale. Il se trouve aussi en Afrique et en Australie. Au Portugal on le trouve spécialement dans les régions côtières plus chaudes, en plus grand nombre en Algarve.

Le fruit – l'arbouse – a la forme de baie froissé et rouge pendant sa maturation. Malgré sa bonne apparence, son arôme, sa douceur, le fruit est "un peu narcotique". La désignation latine de cette plante, de la famille des Ericacées, *Arbutus unedo*, où *unedo* = unum *tantum edo* signifie "je n'en mange qu'un" est certainement l'indice de l'ancien savoir sur les symptômes de douleur physique associé, à l'ingestion d'une plus grande quantité du fruit.

Cette dissertation inclue l'étude des métabolismes secondaires de l'arbouse, le fruit de la plante *Arbutus unedo* L.. L'objectif de ce travail a été d'approfondir la connaissance de sa composition chimique et d'investiguer l'existence des molécules qui pourraient avoir une activité biologique associée à ces souffrances physiques.

La dissertation donne une introduction à la description du fruit, comportant dans cette description les aspects botaniques et leurs utilisations. On aborde aussi les phénomènes plus décisifs et influents dans la chimie des fruits en général. Les métabolismes secondaires sont aussi abordés de forme résumée, mais associés à la chimie des fruits, compris une brève révision des méthodes de l'isolement et de l'identification.

En utilisant la chromatographie en phase gazeuse de haute résolution (HRGC) et de couplage à la spectrométrie de masse (GC-MS) et, postérieurement exécutant la comparution avec les échantillon authentiques, il a été possible d'identifier 70 composés de basse moléculaire et le bas point d'ébullition (volatiles), 30 esters d'acides carboxyliques de longue chaîne carbonée, 9 hydrocarbures, des acides carboxyliques et des cétones de longe chaîne, 14 composés triterpéniques, compris des triterpènes pentacycliques et tétracycliques et encore 9 nouveaux produits naturels: deux séries d'esters longues en C_{18}, C_{19}, C_{20}, C_{22} et C_{12}, C_{14}, C_{17}, C_{18}, C_{20} des acides octanoïque et décanoïque respectivement. Il a été aussi

isolés et identifiés, ayant comme base les donnés chromatographiques, spectroscopiques et des constantes physiques, 7 composés triterpéniques, soient la diol pentacyclique, olean-12-en-3β,23-diol, un nouveau produit naturel. Les restants triterpénoïdes isolés ont été la α-amyrine, la β-amyrine, le lupéol, l'acide ursolique, l'acide oleanolique et le β-sitostérol. À l'exception de l'acide ursolique et lupeol, tous les autres composés ont été identifiés pour la première fois dans l'arbouse.

35 structures ont aussi été postulées.

Du fait d'être un fruit edible, son analyse bromatologique a également été faite.

Le dernier chapitre de la thèse décrit l'activité biologique plus significative des composés identifiés.

Simbologia e Abreviaturas

Por não existirem normas e/ou homogeneidade de critérios em relação à utilização, em português, de siglas e abreviaturas correntemente utilizadas em química (especialmente nas áreas da cromatografia e espectroscopia), utilizei no decorrer desta dissertação, a terminologia anglo-saxónica, a mais utilizada e reconhecida internacionalmente.

%	percentagem
$[M^+]$	ião molecular
^{13}C-NMR	"*^{13}C Nuclear Magnetic Resonance*", espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono-13
^{1}H-NMR	"*^{1}H Nuclear Magnetic Resonance*", espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão
2D-NMR	"*Bidimensional Nuclear Magnetic Resonance*", espectroscopia de ressonância magnética nuclear bidimensional
ac.	Acidificar
AIA	Ácido Indol-3-acético
alc.	Alcalinizar
APCI	"*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*", ionização química à pressão atmosférica
atm	atmosfera
c	*cis*
CAD	"*Collisional Activated Decomposition*", decomposição por colisão activada
CC	cromatografia em coluna
CD	"*Circular Dicroism*", dicroísmo circular
CI	"*Chemical Ionization*", ionização química
Co.	companhia
CPC	"*Centrifugal Partition Chromatography*", cromatografia de partilha centrífuga
CZE	"*Capillary Zone Electrophoresis*", electroforese capilar
δ	desvio químico expresso em ppm

d.i.	diâmetro interno
DB-1™	fase ligada de 100% dimetilpolisiloxano (J & W)
DB-17HT™	fase ligada de 50% fenil, 50% dimetilpolisiloxano (J & W)
DB-5™	fase ligada de 5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano (J & W)
DCCC	"*Drop Counter-Current Chromatography*", cromatografia de contra-corrente de gota
d_f	espessura de filme
DHT	"*Double Hidrogen Transfer*", transferência dupla de hidrogénio
EI	"*Electron Impact*", impacto electrónico
EIMS	"*Electron Impact Mass Spectrometry*", espectrometria de massa de impacto electrónico
ELSD	"*Evaporative Ligth Scatering Detector*", detector evaporativo de dispersão de luz
ESI	"*Electrospray Ionization*", ionização electrónica de spray
Et	grupo etilo
ext.	extracção
FC	"*Flash Chromatography*", cromatografia sob pressão
FID	"*Flame Ionization Detector*", detector de ionização de chama
fig.	figura
FTICRMS	"*Fourier Transform Ion Cyclotron Resolution Mass Spectrometry*", espectroscopia de massa de resolução de ião ciclotrão com transformada de Fourier
FTIR	"*Fourier Transform Infrared*", espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
GC ou GLC	"*Gas Chromatography*", cromatografia gás-líquido
GC-MS	"*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*", cromatografia gás-líquido associada à espectrometria de massa
HMDS	hexametildisilazano
HPLC	"*High Performance Liquid Chromatography*", cromatografia Líquida de Alta Resolução
HRGC	"*High Resolution Gas Chromatography*", cromatografia gás-líquido de alta resolução
i.e.	isto é
Ip	Índice de retenção
Inc.	"*Incorporation*", sociedade
IR	"*Infrared*", espectroscopia de infravermelho

IRMS	"*Isotope Ratio Mass Spectrometry*", espectrometria de massa de razão de isótopo (EMRI)
ITD	"*Ion Trap Detector*", detector de armadilha de iões
ITMS	"*Ion Trap Mass Spectrometry*", espectrometria de massa de armadilha de iões
IV	espectroscopia de infravermelho
J	constante de acoplamento expressa em Hertz
K	*Kelvin*
kg	Quilograma
kPa	Quilopascal
λ	comprimento de onda
l	litro
L	"*Lenght*", comprimento
m/z	relação massa/carga
max.	máximo
Me	grupo metilo
MIM	"*Multiple Ion Monitoring*", monitorização múltipla de iões
min	minuto
MM	massa molecular
MRM	"*Multiple Reaction Monitoring*", monitorização múltipla de reacções
mRNA	"*messenger Ribonucleic Acid*", ácido ribonucleico mensageiro
MS	"*Mass Spectra*", espectrometria/ espectro de massa
NMR	"*Nuclear Magnetic Resonance*", espectroscopia de ressonância magnética nuclear
NP	"*Normal Phase*", fase normal
NPD	"*Nitrogen-phosphorous Detector*", detector de azoto fósforo
ºC	graus centígrados
P	pressão
p.e.	por exemplo
PBS	"*Particle Beam Separator*", separador de feixe de partículas
PGR	"*Plant Growth Regulators*", reguladores (hormonas) de crescimento das plantas
Pi	Padrão interno
PME	pectinametil-esterase, enzima

ppm	partes por milhão
PS-255	fase ligada de 100% Polidimetilsiloxano
QMS	"*Quadropole Mass Spectrometry*", espectrometria de massa de quadropólo
RDA	reacção retro-*Diels-Alder*
RF	radiofrequência
RLCCC	"*Rotation - Locular Drop Counter - Current Chromatography*", cromatografia de contra-corrente de gota de rotação locular
RP	"*Reverse Phase*", fase reversa
SC	"*Side Chain*", cadeia lateral
SDE	"*Simultaneous Steam Destilation-Extraction*", extracção-destilação simultâneas
SFE	"*Supercritical Fluid Extraction*", extracção com fluídos supercríticos
SIM	"*Single Ion Monitoring*", monitorização de ião seleccionado
SPME	"*Solid Phase Microextraction*", micro extracção em fase sólida
SRM	"*Selected Reaction Monitoring*", monitorização de reacção seleccionada
tandem-MS	"*tandem Mass Spectrometry*", espectroscopia de massa associada
TIC	"*Total Ion Current*", corrente iónica total
TLC	"*Thin-Layer Chromatography*", cromatografia em camada delgada
™	"*trademark*", marca registada
TMCS	trimetilclorosilano
TMS	tetrametilsilano
tr	*trans*
trr	tempo de retenção relativo
u.m.a.	unidade de massa atómica
UV	espectroscopia de ultravioleta
V/V	volume/volume
vs.	versus
w/w	razão massa/massa

Índice

Agradecimentos ..... *i*
Resumo ..... *iii*
Abstract ..... *v*
Résumé ..... *vii*
Simbologia e abreviaturas ..... *ix*
Índice ..... *xiii*
Índice de figuras ..... *xvii*
Índice de tabelas e esquemas ..... *xxi*

1.0.0 INTRODUÇÃO 3
1.1.0 O Medronho 9
1.1.1 Descrição Botânica/Distribuição 9
1.1.2 Características e Utilização do Medronho/Medronheiro 11
1.2.0 Metabolitos Secundários - Fruto 15
1.2.1 Ácidos Carboxílicos 18
1.2.2 Glúcidos 20
1.2.3 Compostos Fenólicos 21
1.2.3.1 Arbutina 27
1.2.4 Terpenos 28
1.2.5 Triterpenóides 32
1.3.0 Isolamento e Identificação de Metabolitos Secundários 43
1.3.1 Ácidos Carboxílicos 44
1.3.2 Compostos Fenólicos Glicosados - Arbutina 46
1.3.3 Mono-, Sesqui- e Diterpenos 47
1.3.3.1 GC-MS, ITD versus Quadropólo 49
1.3.4 Triterpenóides 52

2.0.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO 57

2.1.0 Extracção Global 59
2.1.1 Composição em Ésteres de Ácidos Carboxílicos 60
2.1.2 Outros Compostos 69
2.2.0 Extracção Direccionada a Triterpenóides 76
2.2.1 Composição do Extracto Direccionado a Triterpenóides 76
2.2.1.1 Ésteres Longos de Ácidos Carboxílicos 78
2.2.1.2 Triterpenos Pentacíclicos e Esteróides 86
2.3.0 Compostos Básicos 113
2.4.0 Compostos Glicosados 115
2.5.0 Análise Bromatológica 117
2.5.1 Composição Química do Medronho 117
2.6.0 Compostos de Pequena Massa Molecular e Baixo Ponto de Ebulição..... 121
2.6.1 Composição em Compostos de Pequena Massa Molecular e Baixo Ponto de Ebulição 122

3.0.0 ACTIVIDADE BIOLÓGICA 161

4.0.0 CONCLUSÕES 169

5.0.0 PARTE EXPERIMENTAL 179

5.1.0 Aparelhagem e Condições Experimentais 181
5.1.1 Análise Bromatológica 187
5.2.0 Sínteses 189
5.2.1 Ésteres Longos de Ácidos Carboxílicos 189
5.2.2 Outras Sínteses 192
5.2.3 Derivatizações 192
5.3.0 Material 193
5.4.0 Extracções e Fraccionamento 195
5.4.1 Extracção Global 195

5.4.2 Extracção Direccionada a Triterpenóides ……..……..……....….. 197

5.4.3 Extracção Direccionada a Compostos Glicosados ……....….…….. 199

5.4.4 Extracção Direccionada a Compostos Básicos ……...……...…… 200

5.4.5 Extracção de Compostos de Pequena Massa Molecular e Baixo Ponto de Ebulição ….....…….....… 201

6.0.0 BIBLIOGRAFIA 205

APÊNDICES 225

Índice de Figuras

Figura **1.0.0**	Direcções predominantes do transporte no floema.	**4**
Figura **1.1.0**	Flores e frutos do medronheiro. Mostra-se a ocorrência em simultâneo da floração e maturação do fruto na planta.	**10**
Figura **1.2.0**	Origem biossintética dos principais grupos de metabolitos secundários (esquema adaptado).	**17**
Figura **1.2.1**	Estrutura de uma cucurbitina (Cucurbitacina E) e de um limonóide (Azadiractina).	**18**
Figura **1.2.2**	Estrutura do 2-fenilcromano (Flavano).	**22**
Figura **1.2.3**	Classificação geral dos Flavonóides.	**23**
Figura **1.2.4**	Estruturas dos ácidos quínico, xiquímico e clorogénico.	**25**
Figura **1.2.5**	Estrutura típica de uma antocianidina, a "Cianidina".	**25**
Figura **1.2.6**	Estrutura da hesperidina (hesperitina-7-*O*-rutinósido).	**26**
Figura **1.2.7**	Estrutura de derivados fenólicos característicos das plantas da família das *Ericáceas*.	**27**
Figura **1.2.8**	Exemplos de algumas estruturas monoterpénicas.	**29**
Figura **1.2.9**	Exemplos de estruturas sequiterpénicas.	**30**
Figura **1.2.10**	Exemplos de alguns diterpenos e estruturas derivadas.	**31**
Figura **1.2.11**	Sistemas de ciclização do esqualeno em organismos eucariotas.	**33**
Figura **1.2.12**	Biossíntese de Triterpenóides (esquema adaptado de *Muray et al.*). Da ciclização do 2,3-óxido de esqualeno a formação do catião tetracíclico C-20 damarenilo, é seguida de rearranjo, levando aos sistemas pentacíclicos α-, β-amirina e lupeol, via espécies catiónicas, ião bacharenilo, lupenilo e oleanilo.	**34**
Figura **1.2.13**	Nomenclatura e estruturas descritivas dos triterpenóides mais comuns.	**35**
Figura **1.2.14**	Estruturas dos triterpenóides pentacíclicos, mais vulgarmente encontrados nas plantas. Notar que se trata sempre do esteroisómero 3S.	**36**
Figura **1.2.15**	Biossíntese de fito-esteróides. Etapas fundamentais.	**38**
Figura **1.2.16**	Biossíntese de carotenóides. Etapas fundamentais.	**41**
Figura **1.2.17**	Exemplos de algumas estruturas tetraterpénicas.	**41**
Figura **1.3.0**	Esquema geral de funcionamento dos detectores de massa de quadropólo, QMS.	**49**
Figura **1.3.1**	Esquema geral de funcionamento dos detectores de massa de armadilha de iões, ITD incluindo (**a**) a formação de iões e (**b**) a filtração mássica. Os três anéis: superior, RF e inferior, fazem parte dos eléctrodos de captura iónica.	**49**
Figura **1.3.2**	Comparação dos espectros da 3-metil-4-heptanona obtidos com espectrómetros de massa de quadropólo *versus ion trap*; (**a**) Espectro de quadropólo da 3-metil-4-heptanona; (**b**) Espectro de *ion trap* da 3-metil-4-heptanona de um *"scan"* do topo do pico, (conc. elevada); (**c**) Espectro de *ion trap* da 3-metil-4-heptanona numa zona do pico não sobrecarregada.	**51**

Figura **2.1.1**	Cromatograma HRGC do extracto em natureza, da fracção neutra (F.VI) dos frutos de *Arbutus unedo*. Condições experimentais: forno: 50 ºC - 4,5º/min. - 300 ºC (25 min.), (ver Parte Experimental).	**60**
Figura **2.1.2**	**A**- Traçados de corrente iónica total (TIC) e MIM dos dois iões diagnóstico para ésteres dos ácidos carboxílicos **B**- (*m/z* **73/74**) e **C**- (*m/z* **55**) obtido por GC-MS(ITD) a partir do extracto em natureza, correspondente à fracção neutra (FVI) dos frutos de *Arbutus unedo*. Condições experimentais: Forno: 80º(4)-3,5º/min. - 175º-7º/min. – 300 ºC, (ver Parte Experimental).	**61**
Figura **2.1.3**	Esquema geral de fragmentação de ésteres de ácidos carboxílicos saturados lineares.	**66**
Figura **2.1.4**	Espectros de massa GC-MS dos compostos **A**- Cinamato de Metilo (**3**), **B**- Linolenato de Metilo (**19**), **C**- Octadecanoato de Metilo (**23**), **D-** Octadecenoato de Etilo (**25**), **E**- Octadecanoato de Etilo (**26**), **F**- Nonadecanoato de Metilo (**27**), **G**- Eicosanoato de Metilo (**31**) e **H-** Docosanoato de Metilo (**35**) da figura 2.1.2. Identificação de acordo com a tabela 2.1.0.	**68**
Figura **2.1.5**	Traçado de corrente iónica total (TIC) obtido por GC-MS(ITD) a partir do sub-extracto **C** dos frutos de *Arbutus unedo*. Forno: 120º - 7º/min. - 300 ºC (25 min.), (ver Parte Experimental). Identidade dos picos de acordo com a tabela 2.1.2.	**71**
Figura **2.1.6**	Traçado de corrente iónica total (TIC) e MIM (*m/z* 73) obtido por GC-MS(ITD) a partir do sub-extracto **D** trimetilsililado dos frutos de *Arbutus unedo*. Forno: 120º - 7º/min. – 300 ºC (25 min.), (ver Parte Experimental). Identidade dos picos de acordo com a tabela 2.1.3.	**73**
Figura **2.1.7**	Espectros de massa GC-MS e esquema geral de fragmentação do 2-trimetilsililoxi-hexadecanoato de etilo (***m***) da figura 2.1.6.	**75**
Figura **2.2.1**	Esquema geral de fragmentação do 5α-Colestano.	**78**
Figura **2.2.2**	Traçado HPLC-PBMS da fracção **2*A*** (extracto neutro) dos medronhos. Condições experimentais: fluxo isocrático de 0,7 ml/min.; coluna Lichrosorb RP-18 (250 x 4 mm) (d_f = 5μm); em condições isocráticas com Metanol: Água (0,1% ácido acético) (96 : 4). HPLC-PBMS, 10 scans/s (ver Parte Experimental).	**79**
Figura **2.2.3**	Espectros de massa HPLC-PBMS obtidos após desconvolução do **pico 2** (figura 2.2.2) da fracção **2A** (extracto neutro): Decanoato de tetradecilo (topo) e Octanoato de hexadecilo (baixo). Identificação de acordo com a tabela 2.2.3.	**80**
Figura **2.2.4**	Esquema de fragmentação proposto para os ésteres longos dos ácidos octanóico e decanóico.	**81**
Figura **2.2.5**	HPLC-PBMS: TIC e MIM (iões *m/z* **173** e *m/z* **145**) da sub-fracção **2A**. Picos: **1**- Decanoato de dodecilo/Octanoato de tetradecilo; **2**- Decanoato de tetradecilo/Octanoato de hexadecilo; **3**- Decanoato de hexadecilo/Octanoato de octadecilo; **4**- Decanoato de heptadecilo/Octanoato de nonadecilo; **5**- Decanoato de octadecilo/Octanoato de eicosanilo; **6**- Decanoato de eicosanilo/Octanoato de docosanilo. Condições experimentais: fluxo isocrático de 0,7 ml/min.; coluna Lichrosorb RP-18 (250 x 4 mm) (d_f = 5μm); em condições isocráticas com Metanol: Água (0,1% ácido acético) (96:4). HPLC-PBMS, 10 scans/s (ver Parte Experimental).Identificação de acordo com a tabela 2.2.2.	**81**
Figura **2.2.6**	Cromatograma de HRGC da fracção **2*A*** (extracto neutro) dos medronhos. Condições experimentais: Coluna: DB-5 (L = 30 m, d_f = 1 μm, d.i. = 32 mm), Forno: 175º - 1º/min. - 240 ºC, (ver Parte Experimental, 3.1.0). Picos: **1**- Decanoato de dodecilo, **2**- Octanoato de tetradecilo, **3**- Decanoato de tetradecilo, **4**- Octanoato de hexadecilo, **5**- Decanoato de hexadecilo, **6**- Octanoato de octadecilo, **7**- Decanoato de heptadecilo, **8**- Octanoato de nonadecilo, **9**- Decanoato de octadecilo, **10**- Octanoato de eicosanilo, **11**- Decanoato de eicosanilo, **12**- Octanoato de docosanilo. Identificação de acordo com as tabelas 2.2.2 e 2.2.3.	**84**

Figura **2.2.7**	TIC obtido por HRGC-MS da fracção **2*B*** (ver Parte Experimental) do extracto neutro dos medronhos. Picos: **1**- Colestanona; **2**- Colesterol; **3**- Estigmastenona; **4**- Estigmasterol; **5**- Lupeona; **6**- α-Amirona. Forno: 120º - 4 – 290 ºC. Condições experimentais como o descrito na Parte Experimental.	**87**
Figura **2.2.8**	Esquema geral de fragmentação de Triterpenos Tetracíclicos.	**87**
Figura **2.2.9**	Esquema geral de fragmentação de Triterpenos Pentacíclicos das séries Lupano e Oleanano/Ursano.	**89**
Figura **2.2.10**	TIC obtido por HRGC-MS da fracção **2CA** (ver parte experimental) do extracto neutro dos medronhos. Picos: **1**- β-Amirina; **2**- Mistura de α-Amirina, Lupeol e um terceiro componente desconhecido. Condições experimentais descritas na Parte Experimental.	**91**
Figura **2.2.11**	Cromatograma obtido por HRGC da fracção **2CA** trimetilsililada (ver parte experimental) do extracto neutro dos medronhos. Picos: **1**- β-Amirina; **2**- α-Amirina; **3**- Lupeol; **4**- Olean-12-en-3β,23-diol. Condições experimentais descritas na Parte Experimental.	**91**
Figura **2.2.12**	Cromatograma obtido por HPLC-ELSD da fracção **2CA** (ver Parte Experimental) do extracto neutro dos medronhos. Picos: **1**- β-Amirina; **2**- α-Amirina; **3**- Olean-12-en-3β,23-diol; **4**- Lupeol.	**93**
Figura **2.2.13**	Cromatograma obtido por HPLC-PBMS da fracção **2CA** (ver parte experimental) do extracto neutro dos medronhos. Picos: **1**- β-Amirina; **2**- α-Amirina; **3**- Olean-12-en-3β,23-diol; **4**- Lupeol.	**93**
Figura **2.2.14**	Cromatogramas de massa para os iões diagnóstico mais significativos para a α-Amirina (*m/z* **426**, **189**), Lupeol (*m/z* **426**, **218**), e Olean-12-en-3β,23-diol (*m/z* **203**).	**94**
Figura **2.2.15**	Espectro de massa obtido por HPLC-PBMS do **pico 3** na figura 2.2.13. O composto foi tentativamente identificado como sendo o Olean-12-en-3β,23-diol, um novo composto natural.	**97**
Figura **2.2.16**	Esquema de fragmentação proposto para o Olean-12-en-3β,23-diol, (**pico 3**).	**98**
Figura **2.2.17**	Desvios químicos ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR (δ) do olean-12-en-3β,23-diol (**pico 3**) e diois derivados do lupano e do oleanano.	**100**
Figura **2.2.18**	Traçado HPLC-PBMS da fracção **2D** (extracto neutro) dos medronhos. Pico **1**- Amirenonol, Pico **2**- Aldeído ursólico, Pico **3**- Uvaol; Condições experimentais: fluxo isocrático de 0,7 ml/min.; coluna *Lichrosorb* RP18 (250 x 4 mm) (d_f = 5μm); em condições isocráticas com Metanol: Água (0,1% ácido acético) (96:4). HPLC-PBMS, 10 scans/s (ver Parte Experimental).	**103**
Figura **2.2.19**	Esquema de fragmentação proposto para o α-Amirenonol.	**104**
Figura **2.2.20**	Cromatograma da fracção **3** do extracto neutro dos medronhos obtido por HPLC-PBMS (ver Parte Experimental).	**105**
Figura **2.2.21**	Espectro de ^{13}C-NMR da fracção **3** do extracto neutro dos medronhos (ver Parte Experimental). Mistura dos ácidos ursólico e oleanólico.	**106**
Figura **2.4.0**	Cromatograma de RP-HPLC-RI da fracção correspondente a compostos fenólicos das folhas de *Arbutus unedo*. Picos: **1**- Arbutina, **2**- Resorcinol (Pi), **3**- Metilarbutina, **4**- hidroquinona, **5**- metil-hidroquinona. (ver Parte Experimental).	**116**
Figura **2.5.0**	Medronhos em diferentes estados de maturação (dimensões médias) (foto da esquerda); Corte transversal de um fruto, pormenor (foto da direita).	**118**

Figura **2.6.1**	Cromatograma do extracto em natureza, correspondente aos compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição dos frutos de *Arbutus unedo* (para o ano de **1997**). Forno: 45º - 3º/min. - 175º - 15º/min. – 300 ºC (10 min.); (**A**)-Coluna DB-17HT (d_f = 0,15 μm, L = 30 m, d.i. = 0,25 mm); (**B**)-Coluna DB-1 (d_f = 0,25 μm, L = 30 m, d.i. = 0,25 mm) (ver Parte Experimental). Compostos dominantes: **a**- 2-Furfural, **b**- Limoneno, **c**- Terpinoleno, **d**- α-Terpineol, **e**- β-Damascona, **f**- β-Cariofileno.	**122**
Figura **2.6.2**	Traçado de corrente iónica total (TIC) obtido por GC-MS(ITD) do extracto em natureza, correspondente aos compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição dos frutos de *Arbutus unedo* (para o ano de **1997**). Forno: 45º - 3º/min. - 175º - 15º/min. – 300 ºC (10 min.); Coluna DB-1 (d_f = 0,25 μm, L = 30 m, d.i. = 0,25 mm); (ver Parte Experimental). Compostos dominantes: **a**- 2-Furfural, **b**- Limoneno, **c**- Terpinoleno, **d**- α-Terpineol, **e**- β-Damascona, **f**- β-Cariofileno.	**123**
Figura **2.6.3**	Traçado de corrente iónica total (TIC) obtido por GC-MS(ITD) do extracto em natureza, correspondente aos compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição dos frutos de *Arbutus unedo* (para o ano de **1998**). Forno: 45º - 3º/min. - 175º - 15º/min. – 300 ºC (10 min.); Coluna DB-1 (d_f = 0,25 μm, L = 30 m, d.i. = 0,25 mm); (ver Parte Experimental). Compostos dominantes: **a**- 2-Furfural, **b**- Limoneno, **c**- Terpinoleno, **d**- α-Terpineol, **e**- β-Damascona, **f**- β-Cariofileno.	**123**
Figura **2.6.2.1**	Figura expandida do traçado de corrente iónica total (TIC) (figura 2.6.2) obtido por GC-MS(ITD) do extracto em natureza, correspondente aos compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição dos frutos de *Arbutus unedo* (para o ano de **1997**). Identidade dos picos de acordo com a tabela 2.6.0.	**125**
Figura **2.6.3.1**	Figura expandida do traçado de corrente iónica total (TIC) (figura 2.6.3) obtido por GC-MS(ITD) do extracto em natureza, correspondente aos compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição dos frutos de *Arbutus unedo* (para o ano de **1998**). Identidade dos picos de acordo com a tabela 2.6.1.	**127**
Figura **5.4.0**	Extractores contínuos de *Clevenger* (**A**) e de *Likens-Nickerson* (**B**).	**201**

Índice de Tabelas e Esquemas

Tabela **1.1.0**	Características gerais da maturação dos frutos carnosos.	**7**
Tabela **1.2.0**	Conteúdo em ácidos orgânicos na laranja (fruto não climatérico) e tomate (fruto climatérico).	**19**
Tabela **1.2.1**	Conteúdo em açúcares redutores, sacarose, matéria seca e principais ácidos orgânicos em diferentes frutos.	**20**
Esquema **1.2.0**	Vias biossintéticas dos triterpenóides encontrados nas plantas.	**32**
Tabela **1.2.2**	Nomenclatura e estruturas utilizadas para os esteróides.	**39**
Esquema **2.1.0**	Sequência do fraccionamento por solventes utilizado para os medronhos a partir do extracto bruto (metanol:água, 1:1).	**59**
Tabela. **2.1.0**	Composição do medronho em Ésteres de Ácidos Carboxílicos, (Fracção Neutra, FVI). Compostos identificados por GC-MS(ITD). Identidade dos picos assinalados na figura 2.1.2.	**62 /65**
Esquema **2.1.1**	Sub-fraccionamento da fracção neutra (Fracção VI) utilizando o método de *Wheeler* modificado.	**70**
Tabela **2.1.1**	Composição das fracções obtidas por sub-fraccionamento da fracção neutra.	**71**
Tabela. **2.1.2**	Compostos minoritários (sub-fracção **C**) identificados na fracção neutra (fracção VI) do fruto de *Arbutus unedo*. Identidade dos picos assinalados na figura 2.1.5.	**72**
Tabela **2.1.3**	Ácidos carboxílicos identificados na sub-fracção **D**. Componentes identificados por GC-MS(ITD) na forma de éteres trimetilsilílicos. Identidade dos picos assinalados na figura 2.1.6.	**74**
Tabela **2.2.2**	Composição em ésteres longos de ácidos carboxílicos do medronho. Identidade dos picos assinalados nas figuras 2.2.5 e 2.2.6.	**82 /83**
Tabela **2.2.3**	Composição percentual (áreas % normalizadas) em ésteres longos de ácidos carboxílicos da fracção **2A** (extracto neutro) dos frutos de *Arbutus unedo*.	**85**
Tabela **2.2.4**	Desvios químicos (δ) de ^{13}C-NMR dos compostos α-Amirina, β-Amirina e Lupeol. Solvente: $CDCl_3$.	**95**
Tabela **2.2.5**	Desvios químicos (δ) de ^{13}C-NMR e ^{1}H-NMR do olean-12-en-3β,23-diol (**pico 3**). Solvente: $CDCl_3$.	**99**
Tabela **2.2.6**	Desvios químicos (δ) de ^{13}C-NMR do β-Sitosterol. Solvente: $CDCl_3$.	**102**
Tabela **2.2.7**	Desvios químicos (δ) de ^{13}C-NMR dos Ácidos ursólico e oleanólico. Solvente: $CDCl_3$.	**107**
Tabela **2.2.8**	Composição em triterpenóides do fruto de *Arbutus unedo*.	**109**
Tabela **2.2.9**	Estruturas dos triterpenos pentacíclicos encontrados no medronho.	**110**
Tabela **2.2.10**	Estruturas dos triterpenos tetracíclicos encontrados no medronho.	**111**
Tabela **2.5.0**	Dimensões médias dos frutos maduros de *Arbutus unedo*.	**117**
Tabela **2.5.1**	Análise do fruto maduro: composição em g ou mg por 100 g de polpa.	**119**
Tabela **2.5.2**	Análise da matéria seca contida nos frutos.	**119**

Tabela **2.5.3**	Cor, actividade da *PME*, ácidos orgânicos, vitaminas, e compostos fenólicos no medronho maduro (valores referidos à matéria seca).	**119**
Tabela **2.5.4**	Análise bromatológica do medronho maduro: composição em g ou mg por 100 g de parte edível. Condições ver Parte Experimental.	**120**
Tabela **2.6.0**	Compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição, identificados por HRGC-MS(ITD) num extracto específico (ano de **1997**) dos frutos de *Arbutus unedo*. Picos assinalados na figura 2.6.2.1.	**129/132**
Tabela **2.6.1**	Compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição identificados por HRGC-MS(ITD) num extracto específico (ano de **1998**) dos frutos de *Arbutus unedo*. Picos assinalados na figura 2.6.3.1.	**133/135**
Tabela **2.6.2**	Compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição identificados nos frutos de *Arbutus unedo* L; Numeração dos compostos identificados nos dois extractos analisados (**1997** e **1998**) e respectivos, tempos de retenção, Índices de retenção calculados (Ip^{DB-1}) e desvio percentual (Δ%) obtido relativamente aos Ip da literatura.	**136/138**
Tabela **2.6.3**	Espectros de massa (ITD) e principais fragmentações, dos seis compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição dominantes identificados nos dois extractos analisados (**1997** e **1998**) dos frutos de *Arbutus unedo* L.	**139/140**
Tabela **2.6.4**	Espectros de massa (ITD) e principais fragmentações, de compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição identificados nos dois extractos analisados (**1997** e **1998**); os compostos escolhidos incluem-se em subclasses distintas.	**141/146**
Tabela **2.6.5**	Composição qualitativa e quantitativa média (referente a áreas normalizadas percentuais, n=3), dos dois extractos voláteis de medronho analisados (anos de **1997** e **1998)** (Lista por ordem de eluição).	**147**
Tabela **2.6.6**	Tabela resumo dos compostos voláteis identificados em cada um dos dois extractos (**1997** e **1998**) de medronhos. Listagem por ordem alfabética.	**151/153**
Tabela **2.6.7**	Tabela resumo dos compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição, identificados nos medronhos, nos dois extractos (**1997** e **1998**), comuns a outros frutos.	**154**
Tabela **2.6.8**	Compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição identificados por GC-MS(ITD) no fruto de *Arbutus unedo*. Listagem dos compostos por ordem alfabética.	**155/160**
Tabela **3.0.0**	Compostos com actividades biológicas relevantes, encontrados no fruto de *Arbutus unedo* L.	**167/168**
Esquema **5.4.0**	Esquema de sub-fraccionamento por solventes utilizado nos medronhos a partir do extracto bruto (metanol: água, 1:1).	**196**

"*Ora o fazia parar para apanhar as mais altas flores dos medronheiros, que atirava ao chão; ora queria espreitar os ninhos*"
Eça de Queirós, in "*Últimas Páginas*"

1.0.0 INTRODUÇÃO

Os frutos são adaptações das plantas visando a sua auto-protecção e propagação, efectuadas pela atracção que exercem em pássaros, insectos e outros animais, os quais promovem a disseminação das sementes.[1] As células do mesocarpo[i] acumulam grandes quantidades de reservas efectuando-se, ao mesmo tempo, um conjunto de reacções que transformam o amido, os taninos e os ácidos carboxílicos dos frutos verdes em açúcares (glúcidos), álcoois, ésteres e óleos essenciais, entre outros. Simultaneamente, a expensas dos cloroplastos, formam-se plastídios coloridos mais ou menos abundantes, dos quais dependem a intensidade e cor dos frutos, que como já foi referido, ajudam a promover a atracção de animais disseminantes, incluindo o homem.[2]

O crescimento dos frutos (carnosos) envolve várias fases: uma 1ª fase compreende a floração, o desenvolvimento do ovário, e a polinização; a 2ª fase, de divisão celular, tem lugar depois da antesis[ii] e nela ocorre o desenvolvimento e expansão do fruto, com a disponibilização de carbono e de água; e finalmente a 3ª fase, inclui o início da maturação.[3]

A fase da elongação ou expansão celular (2ª fase), provavelmente, a mais estudada, devido a ser a que afecta directamente a produção e a qualidade final do fruto, é muito importante em quase todos os frutos carnosos principalmente nos que possuem um grande conteúdo de água, como é o caso do medronho. A maioria dos frutos experimentam um grande incremento no seu volume celular quando se expandem.[4] Durante esta fase, o fruto actua como um consumidor (sorvedouro) e acumulador de carbono, água e sais minerais e outros elementos, sofrendo alterações importantes na sua composição química e física.

À medida que o fruto se desenvolve e se expande, deve importar carbono e água e, inevitavelmente, perderá uma parte de ambos pela respiração e transpiração. Além disso, certos minerais, sobretudo o cálcio e o potássio, são igualmente importantes para o desenvolvimento, podendo o seu transporte dentro da planta afectar a respectiva assimilação

[i] Porção de um fruto monospérmico que se destaca do conjunto
[ii] Tempo que decorre entre o desabrochar e o emurchecimento de uma flor.

por parte dos frutos. O fruto desenvolve um sistema vascular, mais ou menos extenso, à medida que cresce, o qual o mantém em contacto com o resto da planta. O grau de desenvolvimento dos seus vasos (xilema[iii] e floema[iv]) pode ser também influenciado pelas condições de crescimento e pela espécie. O carbono, geralmente na forma de açúcar (sacarose) e, em menor medida, na forma de ácidos orgânicos, chega ao fruto através do floema, embora possa também ser assimilado directamente mediante a fotossíntese do fruto.[5,6] O floema transporta para o fruto estes compostos em solução e, portanto, também a água e os minerais dissolvidos. O xilema, também realiza um aporte complementar destes elementos. Demonstrou-se que o transporte de produtos via floema está principalmente determinado pelos processos metabólicos que ocorrem dentro do fruto,[3] enquanto que o fluxo xilemático depende dos gradientes de potencial hídrico entre a planta e o fruto. Estes gradientes podem estar condicionados pelo potencial hídrico do fruto (isto é, pela acumulação de solutos ou pela perda de água) e pelo estado hídrico e distribuição do fluxo de água na planta. Deste modo, a disponibilidade de carbono, água e minerais do fruto dependerá do equilíbrio entre a contribuição relativa das suas fontes e a perda de água e carbono do fruto.

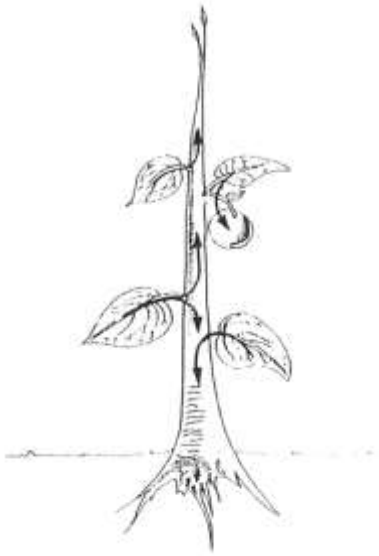


Figura **1.0.0** Direcções predominantes do transporte no floema.

Durante o desenvolvimento, as elevadas taxas de respiração do fruto reflectem um crescimento intenso e uma grande actividade metabólica. A importação e o processamento do carbono podem necessitar de uma grande quantidade de energia, que em combinação com a elongação celular, têm um grande custo respiratório para o fruto.

Em muitos frutos, o carbono transforma-se, a partir da sacarose, noutros compostos de armazenamento que, por sua vez, se reconvertem ou modificam durante a

[iii] Conjunto dos vasos traqueanos, sistema vascular das plantas.
[iv] Conjunto dos feixes crivosos, sistema vascular das plantas.

maturação. Alguns frutos acumulam quantidades significativas de amido durante as primeiras etapas do desenvolvimento, (como ocorre no tomate[7] e na maçã[8]), enquanto que muitos outros armazenam unicamente açúcares simples, (como no caso do pêssego[9] ou da uva[3]), ou possuem um grande conteúdo em ácidos orgânicos.[10] As razões da existência destas diferenças são até ao momento desconhecidas. A formação do amido pode ter um papel importante na osmorregulação,[7,8,11] prevenindo a acumulação de solutos osmoticamente activos. Os frutos acumulam e concentram os solutos que lhes chegam via floema, e normalmente são incapazes de voltar a exportá-los para as outras partes da planta. A capacidade para eliminar solutos mediante a formação de polímeros osmoticamente inactivos poderia prevenir uma pressão excessiva de turgência do fruto.

Nos frutos, os ácidos orgânicos podem acumular-se como sais do potássio assimilado, ou podem actuar como intermediários da fotossíntese nos sistemas de fixação na ausência de luz.[6] Pensa-se também que estes possam estar implicados no processo de maturação, actuando como agentes quelantes do cálcio, ou favorecendo a degradação da parede celular.

O crescimento potencial de um fruto está claramente determinado por factores genéticos, uma vez que a componente varietal possui grande influência sobre a velocidade de crescimento, o tamanho e a forma final do fruto. Alguns frutos completam a fase de expansão mais rapidamente que outros e amadurecem 20-30 dias depois da antesis (ex. morangos, melão, pepino), enquanto que outros (ex. citrinos, maçã, banana) tardam bastante mais (200-400 dias). A duração da fase de expansão não depende do tamanho final do fruto.[5] A maioria dos frutos carnosos possuem um peso seco percentual similar (geralmente entre 5 e 20% do peso do fruto fresco). As curvas de crescimento dos frutos, com raras excepções, descrevem curvas sigmóides. No entanto são de esperar alterações no crescimento, por influências ambientais do meio como a temperatura, a irradiação, e o estado hídrico.[3] Quase todos os frutos de determinado género e, de uma mesma espécie, se podem associar dentro de um amplo intervalo de formas e tamanhos.

A maturação é a fase final de crescimento e desenvolvimento do fruto, existindo várias hipóteses sobre o início desta fase de desenvolvimento dos frutos. De entre as mais correntes podemos citar, por exemplo:

1 - O fruto alcança o seu tamanho potencial máximo.

2 - Reduz-se a velocidade de crescimento ou algum factor associado.

3 - Diminui a concentração de um inibidor hipotético da maturação.

4 - Esgota-se um hipotético promotor interno de crescimento, quiçá quando as sementes alcançam a maturidade.

5 - Trata-se de um processo programado geneticamente.

De todas estas hipóteses a última parece ser a mais credível. O início da maturação parece ser um processo programado geneticamente, embora as condições particulares de cada fruto modulem este fenómeno.[3]

Como já foi referido, o objectivo evolutivo do fruto faz com que este tenha como finalidade dispersar as sementes atraindo pássaros, insectos e animais. A combinação das características de cor, aroma, textura e gosto contribuem para ela, tornando-o atractivo a espécies distintas, incluindo o homem. A pressão evolutiva e ecológica terá possivelmente seleccionado diferentes compostos capazes de atrair estes agentes dispersadores. As alterações que ocorrem durante a maturação estão associadas, em geral, com a acumulação destes compostos.

O processo de maturação dos frutos leva a importantes reajustes no metabolismo celular. A estrita regulação genética da planta, promove uma série de processos coordenados que levam às alterações metabólicas, dando lugar ao desaparecimento de determinadas proteínas e à síntese de outras, à degradação de glúcidos de reserva, à redução do conteúdo de ácidos orgânicos e polifenóis, mudanças na pigmentação, à síntese de misturas complexas de substâncias voláteis características e por último ao "amolecimento" da sua textura.

A maturação de muitos frutos caracteriza-se pelo incremento da respiração e pela autocatálise da produção de etileno (fito-hormona), embora outras espécies amadureçam sem mostrar nenhuma destas características. São as distintas fito-hormonas (reguladores de crescimento, PGR (*plant growth regulators*), ex. AIA - ácido indolacético, GAs – giberelinas e etileno, entre outros), que promovem o início e a velocidade da maturação dos frutos. Dependendo do seu comportamento no início da maturação, os frutos, dividem-se em duas categorias: climatéricos e não climatéricos, segundo mostrem ou não um incremento na produção de etileno[v] e na taxa respiratória. O etileno é a única fito-hormona claramente

[v] Fito-hormona que coordena e regula numerosos processos de crescimento e senescência das plantas.

implicada na iniciação e continuação da maturação. Enquanto que o etileno e o ácido abscísico aceleram a maturação, as auxinas, citoquininas e giberelinas, retardam-na.

Tabela **1.0.0** Características gerais da maturação dos frutos carnosos.[12]

Aspecto. A maturação pode coincidir com alteração de cor da pele ou nas camadas parenquimáticas. As antocianinas ou os carotenóides (ou ambos) comparecem nas clorofilas e pode existir uma reutilização dos produtos degradados. A persistência dos frutos na árvore pode ocasionar um reverdecimento dos mesmos.

Textura. A maturação do fruto pode estar associada a um amolecimento dos tecidos, que provavelmente está sob controlo genético. As alterações da firmeza do fruto incluem o adelgaçamento da parede celular, a dissolução da lâmina média, a perda de turgescência e a degradação de produtos de reserva, originando constituintes semi-líquidos.

Sabor. Produção de uma mistura complexa de compostos voláteis que interagem com a produção de outros constituintes maioritários, especialmente glúcidos, ácidos orgânicos e compostos fenólicos. O aroma é característico de cada espécie e variedade. O armazenamento incorrecto e o sobre-amadurecimento dos frutos podem induzir a formação de componentes com sabores desagradáveis.

Fisiologia. O início da maturação dos frutos "climatéricos" está associado a um incremento da produção de etileno e na respiração. Os frutos "não climatéricos", pelo contrário, não são sensíveis ao etileno nem incrementam a respiração. Os frutos de outras espécies têm um comportamento intermédio.

Expressão genética. Uma série de alterações controladas que originam alterações no mRNA, actividades enzimáticas específicas e sínteses proteicas. Estas modificações na expressão genética determinam as alterações nos diversos aspectos da maturação do fruto.

Senescência. Uma série de alterações programadas que seguem a maturação do fruto e originam alterações degradativas nos tecidos que rodeiam as sementes que podem finalizar na abscisão do fruto. Determinadas organizações celulares podem persistir depois destes processos.

Os frutos de famílias muito divergentes têm várias características comuns, as quais se manifestam claramente conforme avança o desenvolvimento dos tecidos que rodeiam ou suportam as sementes. Em muitos casos as sementes influenciam o resto do fruto promovendo a produção de fito-hormonas. Durante a maturação, em diferentes espécies, produz-se a confluência de várias características, como aspecto, aroma, textura e composição que induzem o consumo do fruto e que coincidem com o estado de viabilidade máxima das sementes. As alterações de cor são uma característica comum, mas não universal, da maturação.

Na tabela 1.0.0 apresenta-se o resumo das características gerais da maturação dos frutos carnosos.

Na fase final da maturação, produz-se uma série de alterações, geralmente coordenadas, que conduzem à senescência e abscisão do fruto. Conforme avança a

senescência do fruto, determinadas estruturas permanecem intactas e fisiologicamente activas até à desintegração celular. Se os frutos maduros não são consumidos, forma-se uma capa de abscisão mediante mecanismos diferentes, dependendo da espécie, e os frutos caem ao solo, promovendo-se a distribuição do material genético em diferentes nichos ecológicos.

1.1.0 O Medronho

O medronho é o fruto de *Arbutus unedo* L., um arbusto ou pequena árvore espontânea, da família das *Ericáceas*. Sendo um dos elementos vegetais mais típicos do matorral mediterrâneo, a planta, conhecida por medronheiro, encontra-se em Portugal em quase todo o País, nos matos, bosques e pinhais, especialmente nas regiões costeiras mais quentes, com uma maior incidência no Algarve. O fruto, o medronho, possui a forma de baga, rugosa e avermelhada na maturação.

A etimologia da palavra "*Arbutus*" parece derivar do substantivo "arbustus"; esta designação muito simples foi já utilizada por autores romanos, como o poeta Virgílio. No entanto, outros apontam a origem celta da denominação, uma vez que "arbois" designa fruto granuloso.[13] Os medronhos, são comestíveis, de sabor agradável, doce e aromático, possuindo contudo o inconveniente de serem um pouco indigestos. De acordo parecem estar os autores quanto à designação latina de *unedo* = *unum tantum edo* - "eu como só um", uma alusão às propriedades psicotrópicas do fruto, do qual não se deverá comer mais de um.

1.1.1 Descrição Botânica / Distribuição

O medronheiro é um arbusto de folhagem persistente, de cor verde, com fortes ramificações que se dá bem em solos ácidos e, que em boas condições de vegetação, pode eventualmente atingir o porte de árvore de 5 a 6 m de altura.

É uma planta que de acordo com o sistema de classificação de *Cronquist* [14] pertencente à Divisão - *Magnoliophyta*, Classe - *Magnoliopsida* (Dicotiledóneas), Subclasse IV - *Dilleniidae*, Ordem 10 - *Ericales*, Família 6 - *Ericaceae*, sub-família - *Arbutoidea*, género - *Arbutus* e espécie *Arbutus unedo* L.. Pertence, tal como a murtinheira e o mirtilo, à família das urzes (*Ericáceas*). As *Ericáceas* são uma das famílias das dicotiledóneas constituídas maioritariamente

por arbustos de folhas simples.[15,16] Esta família é representada em Portugal pelos géneros *Arbutus* L., *Calluna* Salisb., *Daboecia* D. Don, *Erica* L., *Rhododendron* L. e *Vaccinium* L..

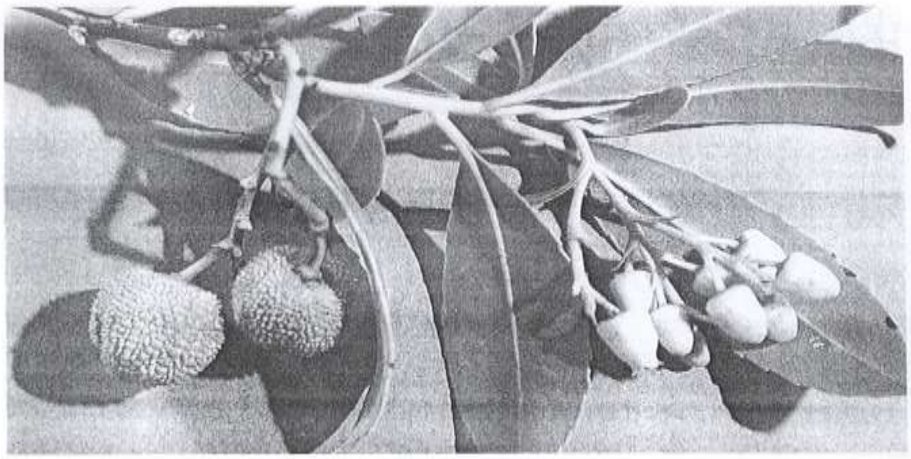


Figura **1.1.0** Flores e frutos do medronheiro. Mostra-se a ocorrência em simultâneo da floração e maturação do fruto na planta.

As folhas, alternas, persistentes, brilhantes, opostas, com haste e aspecto resistente, são de forma elíptica até forma oval invertida, quase sempre com uma pequena ponta saliente, nitidamente com nervuras, com cerca de 8 - 12 cm de comprimento (com a haste mede até 15 cm) e com 6 cm de largura. A parte superior da folha é verde escura até verde azeitona, com brilho fraco, sendo a parte inferior verde clara. A orla da folha, com base em forma de cunha é frequentemente lisa, em direcção à extremidade podendo ser mais ou menos dentada. O medronheiro floresce no final do Outono, com pequenos botões em forma de cálice ou de sino, brancos, cor de marfim ou cor-de-rosa escuro, com cerca de 6 - 8 mm, que se juntam em forma de cachos pendentes (até 40 botões), figura 1.1.0.

Apesar de se assinalarem 28 espécies do género *Arbutus,* apenas uma delas, o *Arbutus unedo* L., é maioritariamente encontrada na região mediterrânica (figurando no brasão de armas de Madrid). A distribuição geográfica do medronheiro tem uma maior incidência nos Países da Costa do Mediterrâneo, com excepção da Líbia e Egipto, estendendo-se até à Costa Atlântica da Europa do Sul, na Ásia Menor e também no Cáucaso.[17] Similarmente a muitas espécies de plantas sul europeias, também o medronheiro avançou para o norte até à Irlanda e Inglaterra. Posteriormente o medronheiro bravo

(*Arbutus andrachne* L.) e o seu cruzamento com o *Arbutus unedo* = *A. andrachnoides* Link também se espalharam pelos territórios já referidos, em especial Inglaterra e Irlanda.[18]

A época de maturação do medronho é também o Outono (Setembro - Novembro). Os frutos passam gradualmente de uma cor esverdeada a alaranjada que se torna vermelha nos frutos maduros. A época de colheita vai de Setembro a Novembro/Dezembro.

O fruto é uma pequena baga, de forma esférica-oblonga, achatada na cavidade peduncular estando as dimensões médias referidas na tabela 2.5.0; o perfil equatorial e longitudinal é simétrico; a cavidade peduncular é fechada; a casca mediamente espessa, com numerosíssimos relevos crestiformes (com cerca de 1 mm). A polpa, de cor amarela, uniformemente distribuída do exterior ao interior, tenra, de sabor doce na maturidade, com ligeiro retrogusto acídulo, apresenta numerosas sementes no interior.[13]

1.1.2 Características e Utilização do Medronho / Medronheiro

Os medronhos são frutos que possuem muita matéria seca, muito "açúcar", pouco teor em ácidos, algum ferro sendo, também, ricos em vitaminas (especialmente vitamina C) e carotenóides.[19] O seu sabor baseia-se principalmente no balanço entre o teor em açúcares e ácidos orgânicos,[20] sendo a razão açúcares/ácidos de 23,1:1.[21]

Num estudo de 1997[23], procedeu-se à pesquisa da presença de metanol (e outros álcoois pequenos) no medronho, não tendo sido detectada a sua presença nas amostras estudadas. Este resultado está de acordo com o referido por outros autores[22] que indicam que os álcoois pequenos (metanol, etanol) raramente ocorrem livres nos alimentos que não tenham fermentado ou sido sujeitos a contaminação microbiana. A presença de álcool metílico em bebidas destiladas preparadas de produtos fermentados é tida como derivada da pectina presente no fruto que foi fermentado.[22] Leitão A. E. B. *et al.*[23] verificaram que a actividade da pectinametil-esterase (PME) em medronhos aumenta paralelamente ao amadurecimento do fruto e que o metanol tem origem na desmetilação das substâncias pécticas existentes no fruto por acção daquela enzima.

Os medronhos quando comidos crus são de digestão difícil devido à forte quantidade de celulose (gosto um pouco farinhento, também designado por fibroso) no seu parênquima lenhosos.[22] Por possuírem estas características e serem, levemente ácidos e ligeiramente aromáticos, os frutos são predominantemente transformados em marmeladas, geleias, frutas cristalizadas, bebidas alcoólicas (aguardente e licor) e cidra. Na Sardenha é costume produzir-se uma apreciada bebida fermentada: o "*Vino di Corbezzoli*" ("*Vin d'Arbouse*" na Córsega) de 9 - 10 graus alcoólicos, de sabor semelhante à cidra. Da destilação deste vinho é possível obter-se uma aguardente muito agradável (*Medronheira*) e com teor alcoólico entre 25-30º dotada de propriedades digestivas e antidiarreicas.[25] Nos estudos efectuados por Versini *et al.*[26] com os derivados fermentados (aguardente de medronho) a desvantagem alimentar apontada à aguardente de medronho baseia-se na sua elevada acidez e no teor de acetato de etilo. No entanto e ainda como base o referido trabalho, convém destacar que nas aguardentes estudadas o teor de etanol é de 44-57 %Vol. (valores típicos para a técnica de destilação utilizada) e, o de metanol de 0,90 ± 0.078 g % ml p.A. com um máximo a 1,01 g % ml p.A.; valores bem abaixo do limite superior de 1,5 g % ml p.A. permitido pelas normas da Comunidade Europeia. O conteúdo em alcoóis superiores de após fermentação (193,1 ± 45 mg % ml p.A.) é cerca de metade do teor apresentado por outros destilados de frutos.

Das flores de medronheiro obtém-se um mel, muito aromático, embora com gosto amargoso devido à presença de arbutina.[13]

As folhas e a casca do medronheiro são utilizadas na curtimenta dos couros. A madeira, pesada, homogénea e dura, fornece uma lenha - antigamente utilizada para aquecer os fornos - sendo também adequada para a produção de carvão vegetal. Em tempos idos terá sido utilizada na Grécia no fabrico de teares.[18]

A importância comercial do medronheiro na fitoterapia, baseia-se na reputação de propriedades adstringentes, anti-sépticas renais, diuréticas e anti-inflamatórias atribuídas a extractos de diferentes partes da planta, especialmente a extractos químicos das folhas;[27] a adstringência dos frutos é devida à presença de taninos; a acção diurética atribuída à planta advém, principalmente, das folhas secas (do mesmo ano). Os extractos, preparados sob a forma de infusão ou de decocção,[28] são ricos em taninos. As folhas contêm também um glucósido (arbutina) que é um bom desinfectante do tracto urogenital.[13,29] As cascas são

utilizadas terapeuticamente uma vez que os seus extractos mostram actividade anti-espasmódica sobre o trânsito intestinal e biliar.[27] As raízes usam-se como tónico, descongestionante do tubo digestivo e também como desinfectante das vias urinárias. A partir das flores prepara-se um sudorífero.[24,30]

Em termos industriais, a industria químico-florestal obtém substâncias colantes e de impermeabilização, extraídas das folhas, do tronco e da casca. Da casca extrai-se igualmente um corante cinzento usado na indústria de tinturaria.[13] Contudo, os medronhos são fundamentalmente utilizados na produção de álcool (indústria do etanol), sendo o álcool de medronho também empregue na preparação de licores e perfumes delicados.[24]

Refira-se ainda o grande interesse ornamental do medronheiro, devido à beleza das folhas escuras, e à particular ocorrência em simultâneo da floração e maturação do fruto (figura 1.1.0).

O *Arbutus unedo* presta-se muito bem à reflorestação e consolidação de dunas costeiras. Tem sido ainda utilizado em estudos, participando como bio-indicador das etapas evolutivas dos solos.[31] Tratando-se de uma espécie espontânea de grande valor paisagístico, geológico e ecológico, deve a sua utilização ser regulamentada (conservação e defesa do património florístico e paisagístico).[13] Em Portugal, para além do seu grande interesse nestes domínios convém, ainda referir que a cultura do medronheiro tem já longa tradição no contexto sócio-cultural de várias regiões do país, em particular na região do Algarve. Constitui muitas vezes uma fonte de rendimento complementar, principalmente através do fabrico da aguardente do seu fruto, cuja melhoria de processamento tem vindo, ultimamente, a ser estudada e incentivada.[23, 25]

1.2.0 Metabolitos Secundários - Fruto

As plantas em geral e, os frutos em particular, biossintetizam uma gama diversificada de compostos que denunciam as suas origens evolutivas. A existência de compostos específicos de determinadas famílias, reflexo de processos endógenos (ex. factores genéticos) leva a que alguns destes possam ser usados em classificação quimiotaxonómica. Contudo, as diferenças morfológicas do fruto em relação ao resto da planta poderão permitir, em alguns casos, a existência de diferenciação química entre eles.

De um modo geral, as plantas no seu metabolismo primário utilizam vias metabólicas nas quais sintetizam e utilizam compostos orgânicos: glúcidos (açúcares), aminoácidos, ácidos carboxílicos comuns, nucleótidos e polímeros derivados (polissacáridos, proteínas, lípidos, DNA, RNA, etc.) essenciais para a sua sobrevivência, designados metabolitos primários.

Podem contudo seguir outras vias metabólicas que levam à formação de compostos peculiares. Estas vias constituem o metabolismo secundário, e os seus produtos denominam-se metabolitos secundários.[32] A biossíntese destes compostos pode estar associada a estados específicos do seu desenvolvimento, e a períodos de stress causados por deficiência de nutrientes ou ataque por microrganismos.

O metabolismo secundário é característico da especialização celular, pelo que os metabolitos secundários, em contraste com os primários, não possuem uma importância directa para a célula produtora. Contudo, muitos metabolitos secundários estão implicados em relações ecológicas, ou seja, na relação da planta produtora com os outros organismos do seu ambiente natural. Exemplos disso são os pigmentos das flores que atraem insectos polinizadores e os compostos que inibem o crescimento de outros organismos (substâncias alelopáticas) ou protegem a planta produtora de infecções (fito-alexinas) ou dos predadores (dissuasores nutritivos, "*antifeeding*"). Outros componentes secundários têm importância fisiológica (por ex., os esteróides constituintes das bio-membranas ou o polímero estrutural

lenhina (lignina)), ou servem como sinais que integram a diferenciação celular e o metabolismo de diferentes partes do organismo vegetal multicelular; estes compostos bem como as fito-hormonas derivadas do indol, as giberelinas, o ácido abscísico e as citoquininas que possuem uma cadeia lateral isopentenilo, entre outros, são considerados fisiologicamente fundamentais. Também para o homem, o metabolismo secundário vegetal é hoje uma fonte importante de substâncias, incluindo princípios activos de medicamentos e de outros produtos químicos igualmente valiosos (por ex., essências, corantes, insecticidas e aditivos alimentares).

Devido ao facto dos metabolitos secundários derivarem biossinteticamente dos primários e de o precursor metabólico ser também utilizado para a biossíntese de certos compostos primários (ácidos carboxílicos, proteínas, etc.), os dois tipos de metabolismo estão interconectados numa extensão que por vezes torna difícil o estabelecimento de uma clara divisão entre ambos.

O metabolismo primário, proporciona a formação de um número de pequenas moléculas, entre as quais cabe destacar o ácido xiquímico, o acetato e os aminoácidos, os quais constituem os materiais de partida para as vias mais importantes do metabolismo secundário das plantas (figura 1.2.0).[32]

O ácido xiquímico, pela via metabólica que tem o seu nome, dá origem a muitos compostos aromáticos, entre eles, aminoácidos aromáticos, ácidos cinâmicos e certos polifenóis. Os policétidos provêm da via acetato-malonato, e dos terpenos ou isoprenóides, da via acetato-mevalonato.

Os aminoácidos são precursores dos alcalóides e de antibióticos, nos quais se incluem as penicilinas e as cefalosporinas. De igual modo variações das vias metabólicas primárias podem conduzir à formação de metabolitos secundários. A via das pentoses-fosfato que origina os metabolitos primários glucose e frutose, é por vezes a fonte de glúcidos raros encontrados nos glucósidos cardiotónicos, enquanto que variações nas vias sintéticas dos aminoácidos proteicos são a origem dos aminoácidos não essenciais.

Uma das características mais apreciadas nos frutos comestíveis é o seu sabor. O sabor distingue-se em áreas específicas do paladar que permitem discriminar o doce, a acidez, a salinidade e o amargo. Como já foi anteriormente referido, na maioria dos frutos a interacção

entre açúcares (redutores e não redutores) e os ácidos orgânicos (carboxílicos) determinam as características finais do seu sabor. A salinidade deve-se à acumulação de sais inorgânicos.

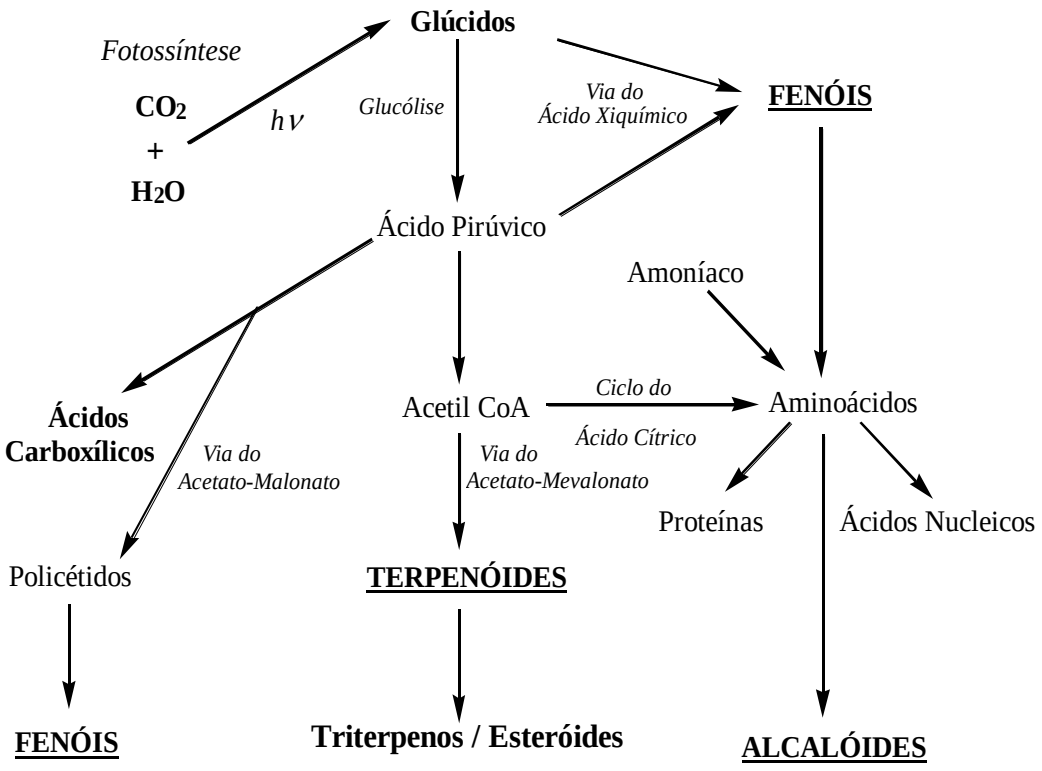


Figura **1.2.0** Origem biossintética dos principais grupos de metabolitos secundários (esquema adaptado).[32]

O amargo dos frutos imaturos parece estar associado à adstringência dos compostos fenólicos neles existentes e/ou à presença de alcalóides glicosilados, limonóides (nos citrinos) e cucurbitinas (nas *Cucurbitáceas*) (figura 1.2.1).

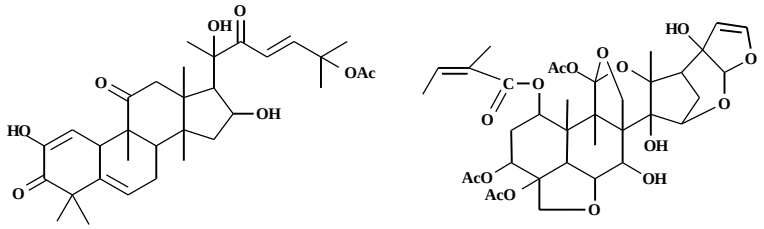


Figura **1.2.1** Estrutura de uma cucurbitina (Cucurbitacina E) e de um limonóide (Azadiractina).[32]

Os compostos voláteis, detectados pelo olfacto e, a textura do fruto, completam as características do sabor.

1.2.1 Ácidos Carboxílicos

Biossinteticamente os ácidos carboxílicos (gordos) provêm da acetil-CoA e sendo esta derivada do acetato, são também os ácidos carboxílicos considerados como metabolitos provenientes desta via biossintética.[1,33-36] A grande maioria dos ácidos carboxílicos naturais são ácidos alcanóicos lineares com número par de átomos de carbono, estando em minoria os que contêm ligações duplas ou triplas, grupos hidroxilo ou epóxido ou anéis carbocíclicos.[35]

Na natureza, entre os ácidos carboxílicos mais abundantes contam-se os ácidos caprílico (8:0), cáprico (10:0), láurico (12:0), mirístico (14:0), palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1; 9*c*), elaídico (18:1; 9*tr*), linoleico (18:2; 9*c*, 12*c*), linolénico (18:3; 9*c*, 12*c*, 15*c*) e araquidónico (20:4; 5*c*, 8*c*, 11*c*, 14*c*)[36] que podem ocorrer livres, em glicéridos (mono-, bi- ou tri-) ou seja, ésteres do glicerol ou em fosfolípidos; os mais comuns de todos, são os de 16 e 18 átomos de carbono (o palmítico, o esteárico e o oleico).[37] A ubiquidade, agora referida, de alguns dos ácidos carboxílicos juntamente com o papel importante que desempenham, colocam-nos na classe dos metabolitos primários; somente os menos usuais podem ser considerados metabolitos secundários.[34]

A introdução de duplas ligações nos ácidos carboxílicos, tornam mais fluidas as membranas formadas por estes ácidos (a fluidez membranar depende para além das

proteínas presentes, da relação fosfolípidos/esteróis e do grau de insaturação dos ácidos carboxílicos).

Tabela **1.2.0** Conteúdo em ácidos orgânicos na laranja (fruto não climatérico) e tomate (fruto climatérico).

	Laranja[38] (mg/100 ml sumo)	**Tomate**[39] (mg/100 g peso fresco)
Acético	-	20
Fórmico	-	10
Láctico	-	20
trans-Aconítico	-	25
Cítrico	1800	200
Fumárico	-	30
Málico	100	150
Malónico	2,4	75
Oxaloacético	-	20
Oxálico	-	50
Succínico	16	20
Tartárico	-	75
Galacturónico	-	25
Adípico	8,5	-
Isocítrico	7	-

De uma maneira geral, os níveis de ácidos orgânicos descem, durante a maturação do fruto, com algumas excepções, como na banana. A tabela 1.2.0, enumera os ácidos orgânicos mais importantes em frutos climatéricos e não climatéricos.

A "acidez titulável" (proporção de acidez não combinada com catiões, ácidos livres) é um parâmetro bastante objectivo da percepção sensorial detectada pelos consumidores. Por ex. na banana madura, a acidez titulável e o conteúdo total de ácido málico são muito similares, já que este ácido é quase o único constituinte e se encontra maioritariamente na forma livre.

Nos frutos maduros do tomate, o metabolismo do ácido cítrico decresce durante a maturação, enquanto que o ácido málico se oxida a CO_2 ou se converte em ácido cítrico ou glutâmico.[40]

No medronho os ácidos predominantes são os ácidos málico e cítrico.[41]

1.2.2 Glúcidos

O amolecimento dos frutos é um dos últimos processos do desenvolvimento, que ocorre uma vez finalizadas as trocas na composição.[41] O consumo de frutos imaturos produz uma impressão de insipidez, não só porque não se produziu a acumulação necessária de açúcares solúveis e compostos aromáticos, mas também porque se dificulta a ruptura e libertação dos componentes vacuolares durante a mastigação. Também quando se consomem maçãs extremamente maduras, onde as células se separam facilmente sem se romperem, não se percebem os componentes vacuolares. No tomate, a maior proporção de açúcares redutores encontra-se nas paredes internas e externas, apesar da acidez se concentrar no conteúdo locular[vi] do fruto.[42]

Tabela **1.2.1** Conteúdo em açúcares redutores, sacarose, matéria seca e principais ácidos orgânicos em diferentes frutos.

	Composto (g/100 g de fruto fresco)				
Fruto	**Glucose**	**Frutose**	**Sacarose**	**Matéria seca**	**Ácidos predominantes**
Cereja	4.7	7.2	0	18.5	Málico e Cítrico
Morango	2.6	2.3	1.3	11.1	Cítrico e Málico
Maçã	1.7	6.1	3.6	15.7	Málico, Cítrico e Quínico
Pêssego	1.5	0.9	6.7	13.8	Málico e Cítrico
Melão	2.2	1.7	8.8	10.1	Cítrico e Málico
Pêra	2.4	7.0	1.0	16.8	Málico e Cítrico
Ananás	2.3	1.4	7.9	15.7	Cítrico e Málico
Banana	5.8	3.8	6.6	29.3	Málico e Cítrico
Toranja	1.7	1.8	2.5	9.3	Cítrico e Málico
Tomate	1.6	1.2	0	6.6	Cítrico e Málico
Uva	8.2	7.3	0	20.0	Málico e Tartárico
Medronho[40]	6.4	8.7	0	31.5	Málico e Cítrico[41]

Adaptado de *Whiting,* em *Hulme, A.C.*;[41] *Hardenburg et al.*;[43] *Widdowson e McCance*, em *Wills et al.*.[44]

Como se indica na tabela 1.2.1, a identidade e a concentração dos açúcares variam nos diferentes frutos. Dentro de cada espécie, o seu conteúdo depende da variedade, do estado de nutrição, da quantidade de frutos e do estado de desenvolvimento, pelo que os

[vi] Compartimentos dos frutos, separados por septos (ver figura ***f*** da ilustração da página 57).

valores da tabela são só aproximados. Para peso igual, a frutose considera-se mais doce que a sacarose e esta mais que a glucose. Se bem que o fruto possua certa capacidade fotossintética durante o seu desenvolvimento, a maioria das reservas de glúcidos provêm da planta.

Como já foi referido (na secção 1.0.0), a maioria dos frutos acumulam amido durante o seu desenvolvimento, no entanto este origina açúcares mais simples antes ou durante a maturação por acção de enzimas como a α-amilase, β-amilase e a amidofosforilase, todas elas identificadas em frutos distintos. Por exemplo, nas bananas maduras somente se mantém 1-2% de amido existindo uma relação directa entre o conteúdo em açúcares do tomate maduro e do nível de amido acumulado durante e seu desenvolvimento.[45]

A acumulação de açúcares simples originados pela hidrólise de polímeros de reserva de cadeia longa e outros produtos fotossintéticos, principalmente na forma de sacarose, dirigem-se para o fruto desde as folhas durante a última fase da maturação, o período de colheita. A acumulação de açúcares nos frutos carentes de amido como o morango e a uva finaliza-se nos dias da colheita dos mesmos, enquanto que noutros casos se completa a degradação do amido.

1.2.3 Compostos Fenólicos

A utilização de substâncias fenólicas remonta a tempos muito antigos, quando algumas delas se aplicaram pela primeira vez em processos industriais, por ex. os taninos na curtidura das peles, na elaboração de tinta e no refinado de vinhos. Estas práticas industriais, naquela época, eram inteiramente empíricas, já que se desconhecia a verdadeira natureza dos compostos utilizados, e consequentemente o fundamento das suas propriedades. Os compostos fenólicos constituem um dos grupos de produtos naturais mais importantes e amplamente distribuídos no reino vegetal. Muitos deles são muito significativos fisiológica e ecologicamente para as plantas que os produzem.

A biossíntese das estruturas fenólicas efectua-se por duas vias metabólicas essenciais, a do ácido xiquímico e a dos policétidos (denominadas em cada caso com o nome do composto mais representativo da via). A primeira das vias, maioritária nas plantas

superiores, parte da eritrose-4-fosfato e do ácido fosfoenolpirúvico e conduz via ácido xiquímico à formação dos aminoácidos aromáticos e dos derivados fenilpropanóides. A via dos policétidos, minoritária nas plantas superiores mas maioritária nos microrganismos, por condensação de unidades de acetato forma cadeias policétidas que, posteriormente por ciclização, dão origem a uma diversidade de compostos aromáticos.

Os compostos fenólicos estão largamente distribuídos como componentes minoritários dos extractos epicuticulares das folhas de muitas espécies.[46] Entre as várias classes de compostos existe o domínio dos flavonóides (na forma livre, metilada, esterificada e glicosilada).[47]

Os flavonóides constituem um dos grupos mais característicos e extensos dos compostos secundários das plantas superiores, sendo muitos deles facilmente reconhecíveis como pigmentos das flores e dos frutos na maioria das angiospérmicas. Estes compostos proporcionam às plantas cores que atraem os insectos para efectuar a polinização cruzada, e também dissuasores nutritivos de defesa frente aos animais fitófagos. Ainda em relação à cor, pode indicar-se que as antocianinas são pigmentos vermelhos ou azuis, as catequinas e pro-antocianidinas incolores mas fluorescentes no UV, alguns flavonóis são amarelos, enquanto que outros como a quercetina e as flavonas são brancas. Existe uma relação entre a cor das flores e o insecto polinizador.

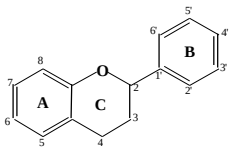


Figura **1.2.2** Estrutura do 2-fenilcromano (Flavano)

A estrutura química dos flavonóides baseia-se no anel flavano (2-fenilcromano) substituído (figura 1.2.2). O anel A é quase sempre de floroglucinol (derivado trihidroxilado) e só em alguns casos de resorcinol (derivado dihidroxilado), enquanto que o anel B pode apresentar diversas modificações. Ambos os anéis estão unidos por uma cadeia de três átomos de carbono que se fecham formando o ciclo do pirano (anel C). As diferenças entre os distintos grupos de flavonóides apresentam na estrutura básica (grau de hidroxilação,

metilação e/ou substituição isopentilo), no grau de polimerização (monómero, dímero e oligómero) e no tipo de conjugação (glucósidos, ésteres malónicos, ésteres sulfato).

A classificação geral dos flavonóides encontra-se esquematizada na figura 1.2.3.

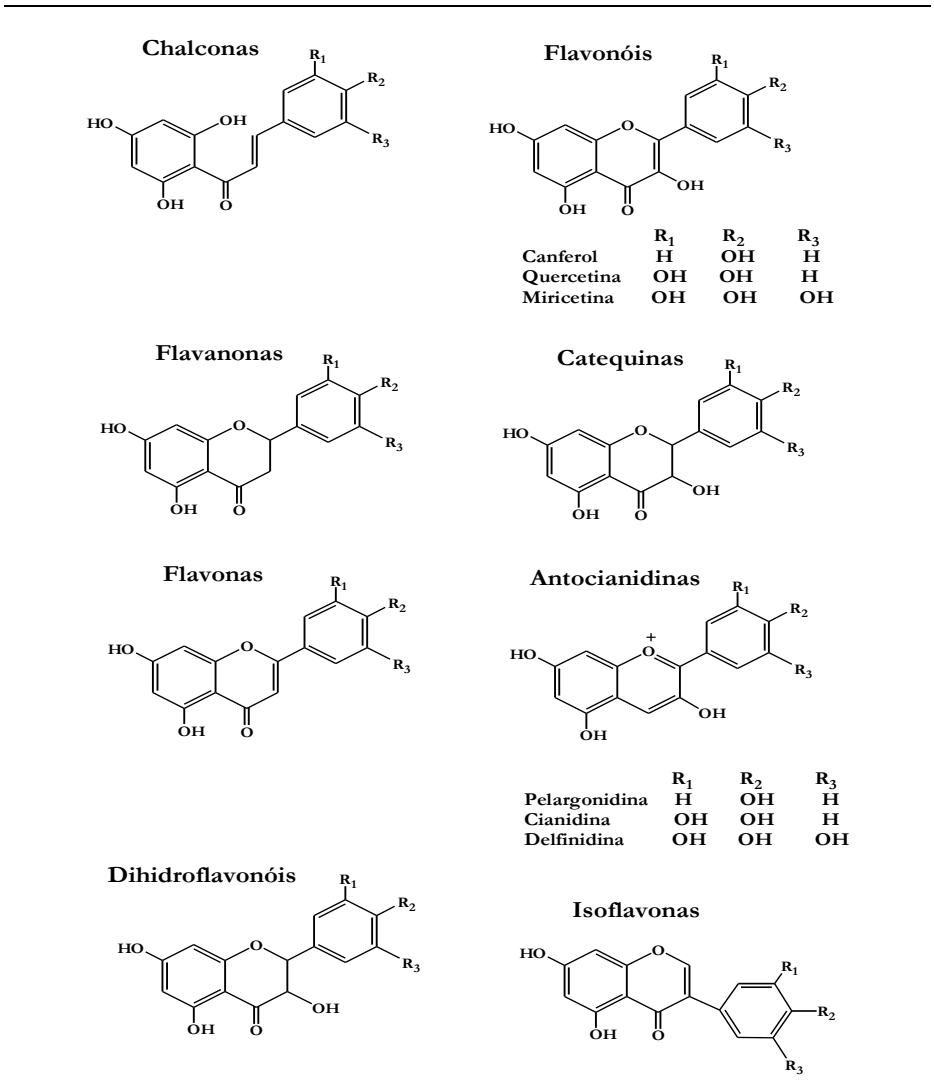


Figura **1.2.3** Classificação geral dos Flavonóides.

Os flavonóides, apesar de serem substâncias próprias do metabolismo secundário, desempenham funções importantes para a própria planta produtora e também para o meio que a rodeia.

Em geral, os flavonóides, pela sua condição de polifenóis, podem actuar como antioxidantes e inactivar o centro activo de numerosas enzimas (por ex., fenolases e

pectinametil-esterase) levando a alterações metabólicas. Por outro lado, de modo idêntico a outros grupos fenólicos, os flavonóides podem também exercer efeitos antagónicos sobre o crescimento; por ex., o canferol (fig. 1.2.3) e seus derivados (anel B mono- hidroxilado) estimulam a enzima AIA oxídase, ou seja, são cofactores enzimáticos que ocasionam a destruição do AIA (Ácido Indol-3-acético),[vii] com um decréscimo concomitante na proporção de crescimento. No entanto, a quercetina (fig. 1.2.3) que possui na sua estrutura o núcleo do catecol (anel B *2',3'*-dihidroxilado), facilmente oxidável, protege o AIA da sua degradação.

Alguns autores[3] são de opinião que a acção fundamental dos flavonóides não é o controlo relativo do metabolismo primário, mas sim que as suas funções são essencialmente ecológicas.

Os compostos fenólicos também participam no sabor do fruto: os ácidos fenólicos proporcionam acidez, os flavanos a adstringência, as flavonas e flavanonas o amargo, especialmente nos citrinos. Estando amplamente distribuídos, as suas funções estão igualmente relacionadas com a protecção da planta face a lesões, com os processos de oxidação, e são também indicadores do grau de maturação do fruto. As quantidades destes compostos variam desde 1,4 mg/10 g de peso fresco (maracujá) até 1,4 g/100 g de peso fresco nos frutos adstringentes de cacau.[41]

A concentração de compostos fenólicos decresce durante a maturação, devido ao incremento percentual em água, embora frequentemente a quantidade absoluta por fruto possa aumentar. Dentro da mesma espécie a concentração pode variar significativamente dependendo da variedade e das condições ambientais da planta. Nos frutos os principais grupos de compostos fenólicos são os seguintes:

Derivados do ácido cinâmico. São compostos importantes e estão amplamente distribuídos. Fazem parte de fenóis mais complexos e associados aos ácidos quínico e xiquímico formam, por ex. o ácido clorogénico (fig. 1.2.4), que se encontra nos frutos de arando e maçã em concentrações relativamente elevadas.

Flavanos. Possuem uma estrutura química baseada no flavano-3,4-diol e os mais comuns são a catequina e a epicatequina (ver figura 1.2.3). Estão amplamente distribuídos e

[vii] O AIA (ácido indol-3-acético) é uma auxina endógena, participando nas plantas como hormona de crescimento vegetal.

localizam-se em altas concentrações nas camadas externas dos frutos, decrescendo o seu conteúdo com a maturação.

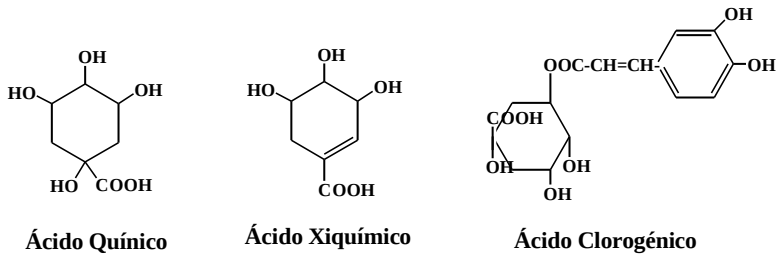


Figura **1.2.4** Estruturas dos ácidos quínico, xiquímico e clorogénico.

Antocianidinas e antocianos. Este diversificado grupo de pigmentos deriva das aglíconas dos três tipos de antocianidinas representadas pela pelargonidina, a cianidina, e a delfinidina (ver figura 1.2.3). Diferentes açúcares podem unir-se em distintas posições (principalmente na posição 3) com antocianidinas produzindo uma ampla variedade de pigmentos (antocianos), tanto nas flores como nos frutos. Quando se une uma molécula de galactose forma-se o composto cianidina-3-galactósido (fig. 1.2.5), que é o pigmento principal das maçãs, amoras, cerejas e ameixas.

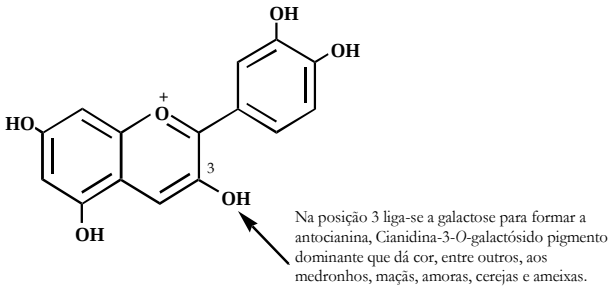


Figura **1.2.5** Estrutura típica de uma antocianidina, a "Cianidina".

Os antocianos encontram-se principalmente nas camadas epidérmicas dos frutos com caroço. Os frutos maduros do *Arbutus unedo* são vermelhos, sendo esta cor conferida pelas antocianinas: delfinidina-3-*O*-galactósido, cianidina-3-*O*-galactoglucósido (composto dominante) e a cianidina-3-*O*-galactósido.[48,49]

Flavanóis e flavanol glicósido. A estrutura típica destes compostos baseia-se nos flavanóis canferol, quercetina, ou miricetina (ver figura 1.2.3) que se condensam na posição 3 com açúcares tipo, glucose, ramnose ou rutinose para formar glicósidos ligeiramente coloridos ou sem cor.

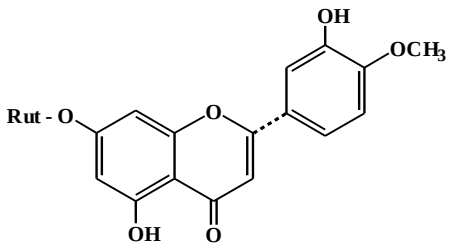


Figura **1.2.6** Estrutura da hesperidina (hesperitina-7-*O*-rutinósido).

As flavonas e flavanonas são compostos relacionados, entre os quais a hesperidina (fig. 1.2.6) é o mais conhecido por ser responsável pelo sabor amargo da casca da laranja.

Como tem sido aqui referido, os frutos, contêm uma ampla diversidade de compostos fenólicos, muitos dos quais presentes em altas concentrações. Estes compostos restringem o seu consumo até à fase da maturação, formando parte dos pigmentos e contribuindo para o seu sabor. Durante a maturação dos frutos aumenta a condensação dos compostos fenólicos, diminuindo a adstringência e o amargo. Os fenóis também participam na resistência a enfermidades, já que a sua concentração aumenta depois da infecção e as moléculas oxidadas são potentes inibidores das enzimas pectolíticas relacionadas com a invasão de agentes patogénicos.[50,51]

A maioria dos frutos muda de cor durante a sua maturação. A maturação pode conduzir à destruição da clorofila que revela a presença de outros pigmentos como β-carotenos e carotenos oxigenados ou xantofilas, como ocorre na pele da banana. Na maioria dos frutos, a conversão de cloroplastos em cromoplastos vem acompanhada da síntese de uma ou várias classes de pigmentos, normalmente antocianinas ou carotenóides. Embora os processos ocorram simultaneamente, não existem provas da conexão metabólica entre os mesmos.

Pode-se ainda referir que os flavonóides estão também implicados nas interacções planta-fungo, em duas situações distintas: como agentes tóxicos constituintes das superfícies

das folhas ou como fungitoxinas induzidas (fito-alexinas), que são formadas pela planta no lugar da infecção fúngica.

1.2.3.1 Arbutina

Ainda dentro do grupo dos compostos fenólicos convém destacar a arbutina (ou arbutósido). Este é um heterósido hidroquinónino que possui a particularidade de ser o derivado fenólico dominante das folhas das plantas da família das *Ericáceas*, onde se insere a espécie *Arbutus unedo*, servindo com efeito para a caracterização taxonómica das plantas desta família.[52]

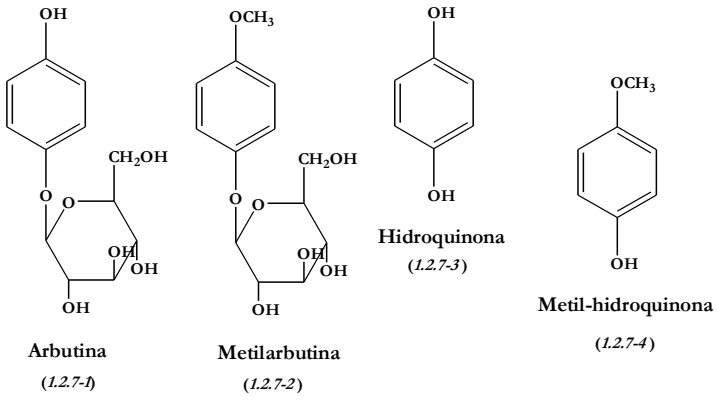


Figura **1.2.7** Estrutura de derivados fenólicos característicos das plantas da família das *Ericáceas*.

A arbutina (hidroquinona β-D-monoglucopiranósido) (*1.2.7-1*, figura 1.2.7), é um β-glucósido fenólico, hidrolisável em hidroquinona e glucose, variando o seu conteúdo em função da espécie de *Ericácea* em causa. Normalmente, associados à arbutina, existem outros compostos fenólicos, a metilarbutina (*1.2.7-2*) (o éter metílico da arbutina), a hidroquinona (*1.2.7-3*) e o seu derivado metil-hidroquinona (*1.2.7-4,* figura 1.2.7).[53,54]

A arbutina, para além do seu interesse sistemático e ecológico possui ainda um particular interesse farmacológico,[55,56] sendo os seus extractos descritos como desinfectantes urinários.[57,58] As propriedades anti-sépticas parecem ser devidas à hidroquinona libertada no organismo após hidrólise da arbutina.[29]

1.2.4 Terpenos

A grande diversidade de compostos de natureza terpénica, e de substâncias com eles relacionados, encontrados nas plantas, é um bom exemplo da capacidade de síntese das plantas. Têm sido descritos milhares de estruturas terpénicas nas plantas superiores, no entanto as plantas inferiores, os animais e os organismos procariotas também sintetizam terpenos.

Os compostos que formam parte deste numeroso grupo de produtos naturais podem realizar actividades biológicas distintas, como as de atrair e repelir insectos; actividades hormonais, inibidoras de crescimento e actividade como fito-alexinas.

Os terpenóides ou isoprenóides são sintetizados via acetato a partir do isopentenilpirofosfato (IPP), que se pode considerar o "isopreno activo", hipotético, de *Ruzicka*.[3] Os terpenos são assim designados por provirem biossinteticamente da condensação de sucessivas unidades isoprénicas[34] e classificam-se segundo o número de unidades isopreno de que se compõem como: Monoterpenos (C_{10}), Sesquiterpenos (C_{15}), Diterpenos (C_{20}), Triterpenos (C_{30}), Tetraterpenos (C_{40}), Politerpenos ($C_{>40}$).

Embora sejam conhecidos alguns terpenos acíclicos, a maioria são cíclicos, possuindo estruturas carbonadas diversificadas. Um grande número de terpenóides apresentam funções oxigenadas (alcoóis, epóxidos, aldeídos, cetonas, ácidos e lactonas) e alguns podem possuir na sua estrutura hetero-átomos (halogéneos, enxofre e azoto). Além disso, existem terpenos formando parte de ésteres, glicósidos, alcalóides e compostos aromáticos.

O geranilpirofosfato (C_{10}) é o precursor directo de todos os monoterpenos. De uma maneira geral estes compostos, são voláteis e componentes importantes dos óleos essenciais, acumulando-se em estruturas especializadas das plantas.[60]

Os monoterpenos podem apresentar estruturas acíclicas ou cíclicas e, na sua maioria, apresentam funções oxigenadas (álcool, aldeído, cetona, etc.). Os plastos possuem sistemas enzimáticos (ciclases), capazes de originar monoterpenos cíclicos.

Na figura 1.2.8 representam-se algumas estruturas de compostos monoterpénicos. Os monoterpenos são compostos característicos das plantas superiores, sendo muito abundantes nas plantas das famílias *Labiatae, Pinaceae* e *Umbelliferae,* que os acumulam.

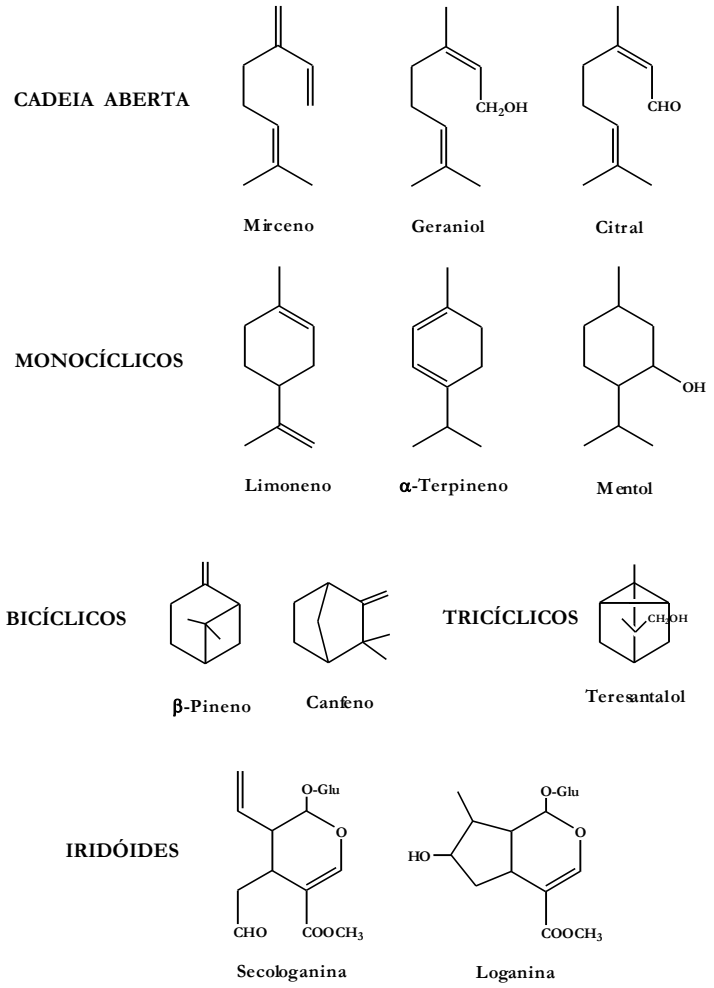


Figura **1.2.8** Exemplos de algumas estruturas monoterpénicas.

O significado biológico das essências está associado aos compostos que possuem aroma (vulgo aromáticos), embora existam monoterpenos lineares que possam ter funções energéticas: actuar na planta como reserva de estruturas carbonadas, durante o dia, para serem degradados a acetil-CoA durante a noite.

De modo igual aos monoterpenos, os sesquiterpenos podem ser compostos cíclicos ou acíclicos, saturados ou insaturados, e podendo ter incluídos diversos grupos

funcionais. Na figura 1.2.9 representam-se algumas estruturas de compostos sesquiterpénicos.

A biossíntese de compostos cíclicos compreende uma série de transformações que originam um amplo número de estruturas (cerca de duzentas), número muito superior ao de mono-, di- e triterpenos, devido à grande variedade de formas de ciclização que estes compostos podem experimentar.

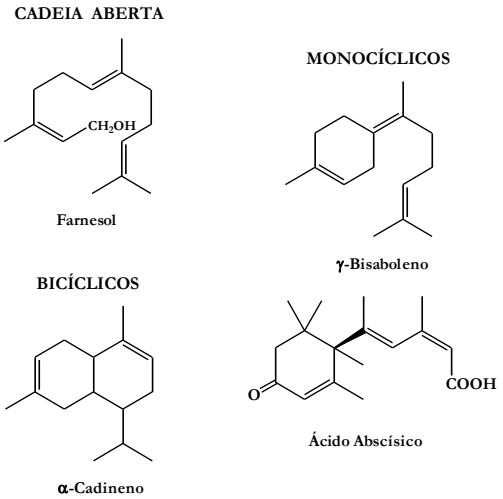


Figura **1.2.9** Exemplos de estruturas sesquiterpénicas.

Existem numerosos sesquiterpenos cíclicos que possuem actividade fito-alexínica, sendo a sua síntese desencadeada por elicitores fúngicos, que aumentam a actividade da sesquiterpeno ciclase, e pelo contrário, inibem a da esqualeno síntase (responsável da biossíntese de triterpenos).[61] Estes compostos também fazem parte das denominadas "essências".

No que respeita aos diterpenos, são compostos lineares ou cíclicos, que na maioria dos casos, possuem 3 ou 4 ciclos, substituídos com diversos grupos funcionais; podendo alguns conter azoto formando os alcalóides diterpénicos, por exemplo a atisina (*1.2.10-2*, fig. 1.2.10).

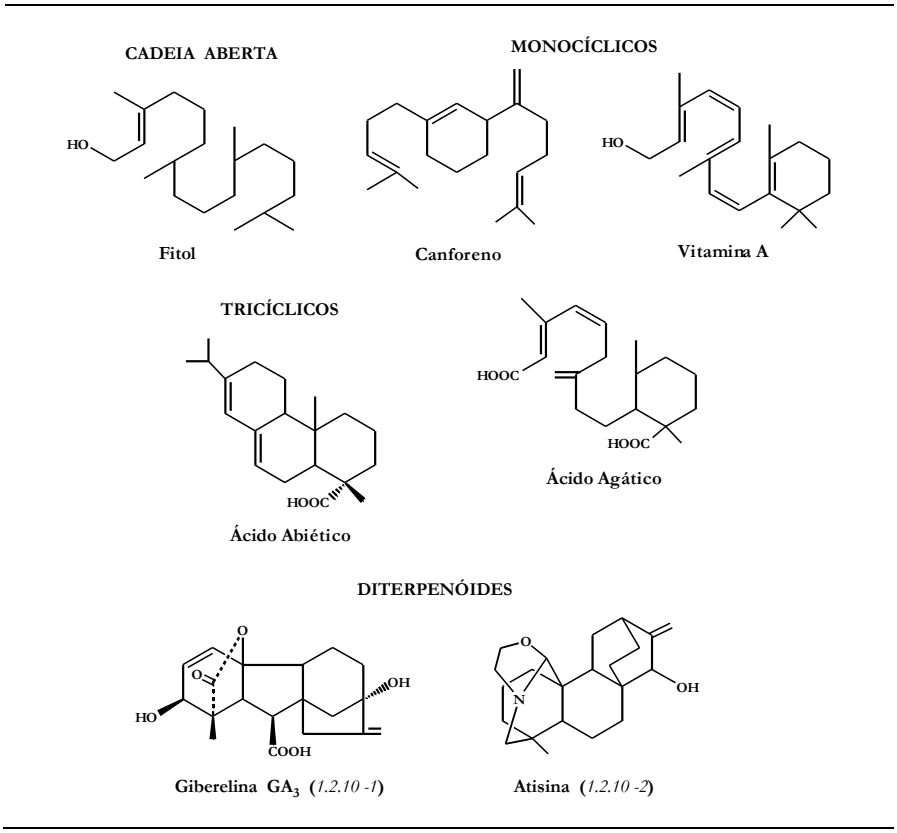


Figura **1.2.10** Exemplos de alguns diterpenos e estruturas derivadas.

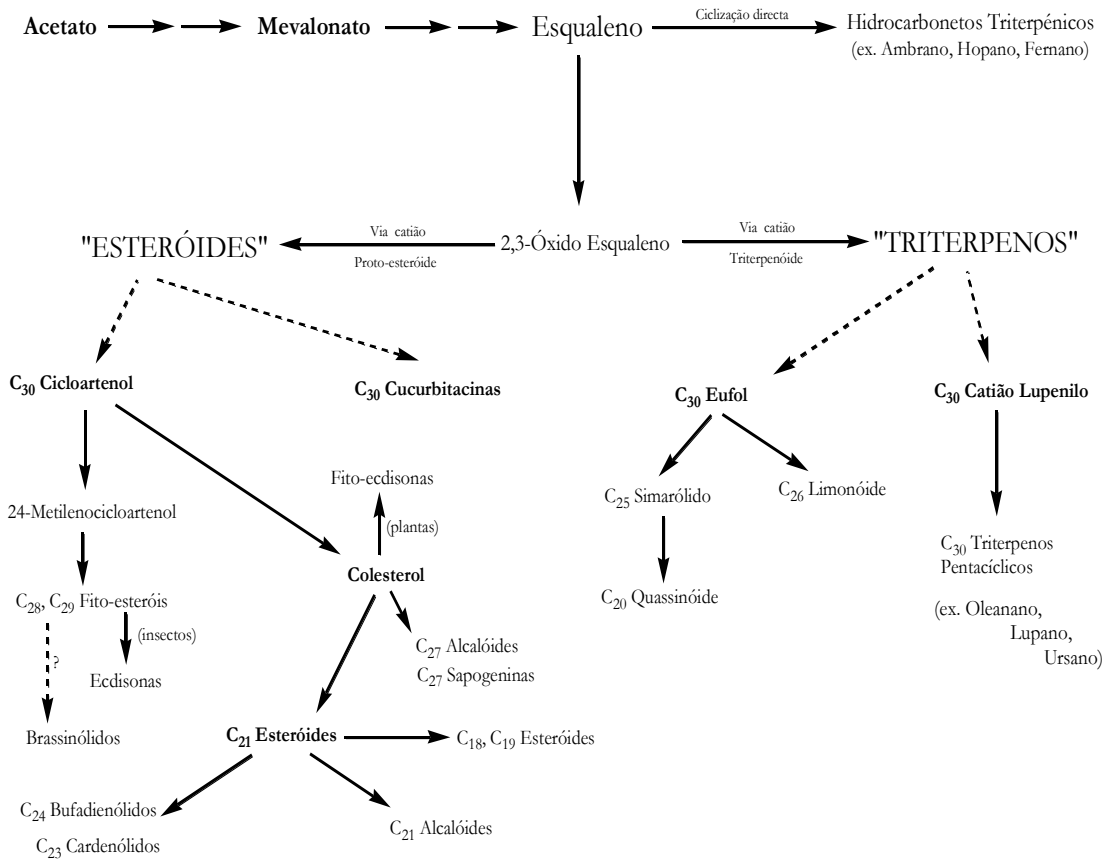
Os compostos voláteis completam os componentes do sabor dos frutos. A análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, GC-MS, dos compostos voláteis dos frutos revelou, até agora, a existência de mais de 400 substâncias: ácidos, alcoóis, aldeídos, cetonas, éteres, ésteres, acetais, hidrocarbonetos, fenóis, lactonas, compostos de enxofre, aminas, e moléculas heterocíclicas diferentes.[62] A concentração total destes compostos varia entre os distintos frutos, desde os 338 ppm nas bananas até 1 ppm nos arandos americanos.

Embora alguns compostos recordem especificamente um fruto, a sensação gustativa é produzida por uma mistura de substâncias.[44]

As revisões de *Hulme*[41] e *Seymour*[62] contêm a composição em voláteis identificados em numerosos frutos. Estes trabalhos proporcionam uma revisão incompleta, devendo estes compostos ser associados aos outros componentes do sabor para oferecer um ponto de vista mais real dos atributos gustativos dos distintos cultivares.[63]

1.2.5 Triterpenóides

Os triterpenóides (esteróides incluídos) incluem-se na classe dos isoprenóides. Em geral, são compostos policíclicos e estão amplamente distribuídos no reino vegetal. São compostos derivados do esqualeno (*1.2.11-1*) (esquema 1.2.0 e figura 1.2.11), desempenhando nas plantas importantes funções fisiológicas.



Esquema **1.2.0** Vias biossintéticas dos triterpenóides encontrados nas plantas.[64]

O diversificado universo de compostos leva a que os Triterpenóides possam ser classificados de variados modos. Usualmente são divididos em dois grupos principais: Tetracíclicos e Pentacíclicos.

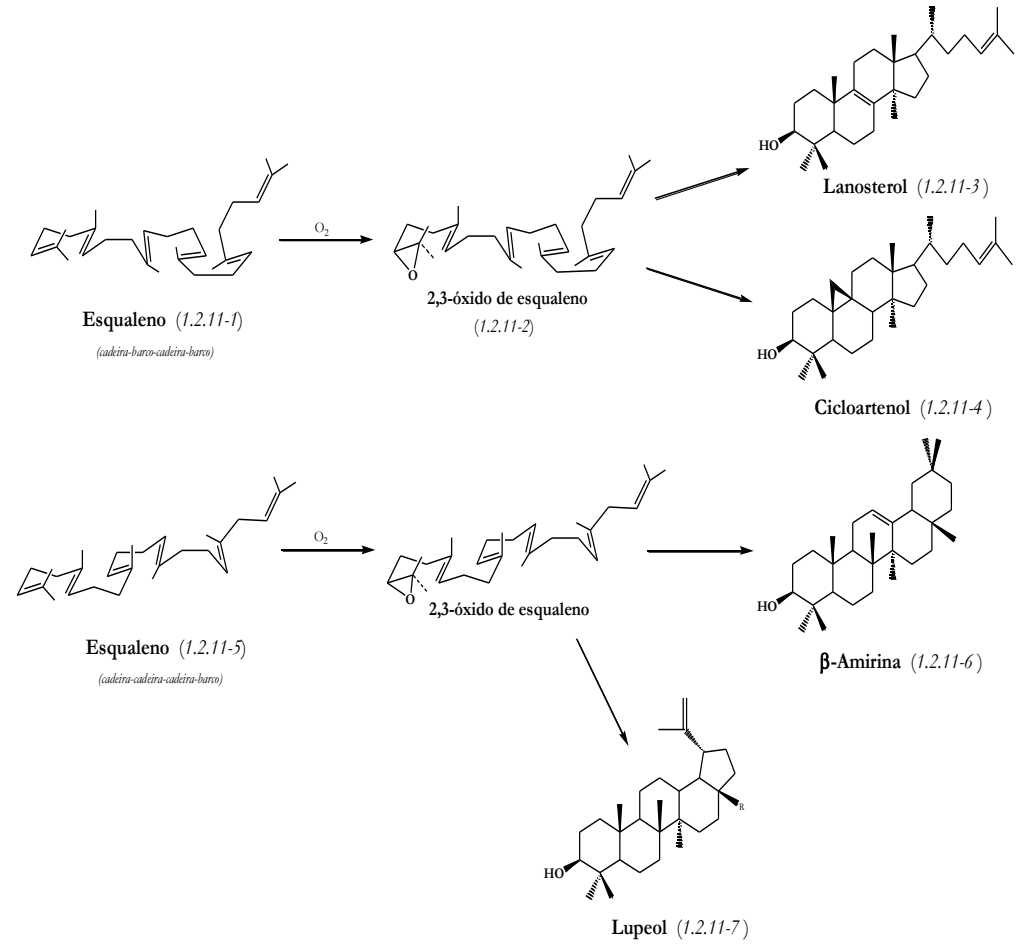


Figura **1.2.11** Sistemas de ciclização do esqualeno em organismos eucariotas.[32]

Os esteróides derivam do esqualeno. Partindo da configuração *cadeira-barco-cadeira-barco*, por acção de uma epoxídase, forma-se o 2,3-óxido de esqualeno (*1.2.11-2*) (figura 1.2.11). Deste composto derivam o lanosterol (*1.2.11-3*) e o cicloartenol (*1.2.11-4*). A partir do cicloartenol produzem-se os diversos esteróides vegetais ou fito-esteróides e a partir do lanosterol, o colesterol e as hormonas esteroídicas.

A partir da conformação *cadeira-cadeira-cadeira-barco* do esqualeno (*1.2.11-5*) e por acção de outras esqualeno ciclases, formam-se os triterpenos pentacíclicos do tipo oleanano/ursano (β-amirina, *1.2.11-6*) e lupano (lupeol, *1.2.11-7*), entre outros (figura 1.2.12).

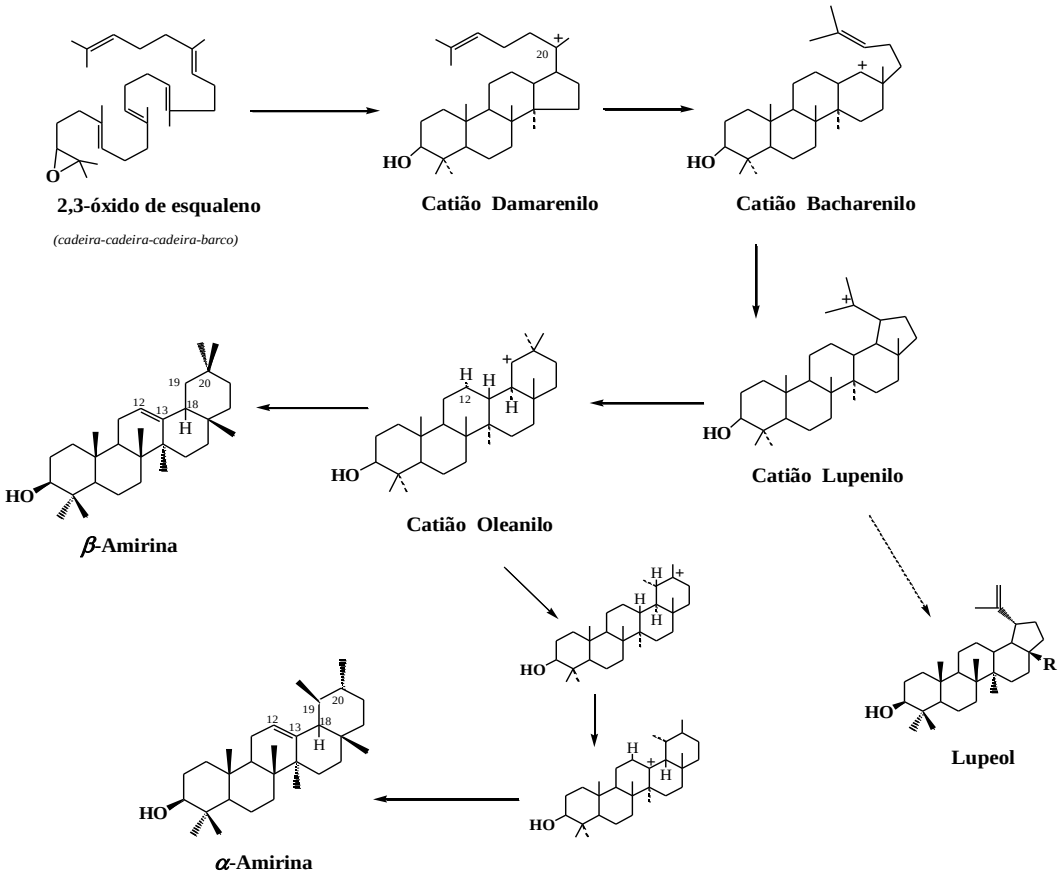


Figura **1.2.12** Biossíntese de Triterpenóides (esquema adaptado de *Muray et al.*[65]). Da ciclização do 2,3-óxido de esqualeno a formação do catião tetracíclico C-20 damarenilo, é seguida de rearranjo, levando aos sistemas pentacíclicos α- ou β-amirina e lupeol, via espécies catiónicas, ião bacharenilo, lupenilo e oleanilo.[66]

A nomenclatura aceite para os triterpenóides mais comuns está esquematizada na figura 1.2.13. A enorme diversidade estrutural desta família de compostos leva a que as propriedades químicas dos triterpenóides variem numa gama que vai desde os apolares (ex. hidrocarbonetos triterpénicos) aos muito polares (ex. as saponinas solúveis em água); os triterpenos pentacíclicos mais comuns, apresentam a função hidroxilo na posição C-3 (ver figura 1.2.14) com esteroisomeria S;[34] quando esta função se encontra glicosilada, estes incluem-se no grupo das saponinas (ex. glicirrizina (*1.2.13-2*), saponina triterpenóide).

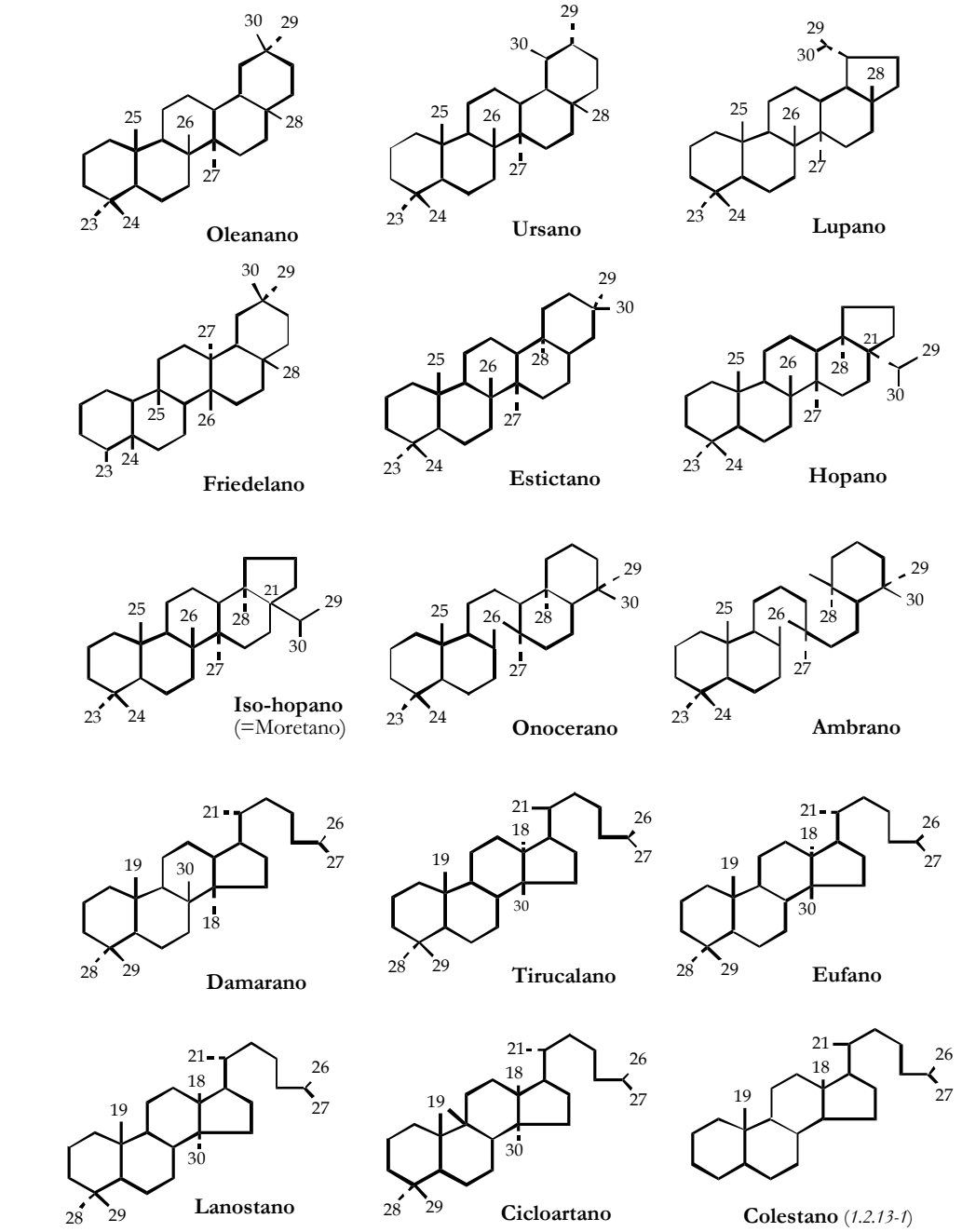
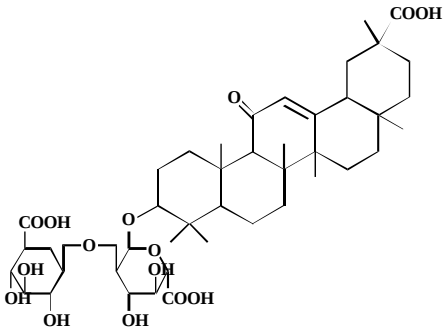


Figura **1.2.13** Nomenclatura e estruturas descritivas dos triterpenóides mais comuns.[67]



Glicirrizina (*1.2.13-2*)

Quantitativamente os compostos pentacíclicos são os triterpenóides mais importantes, estando largamente distribuídos nas plantas florescíveis.[64] Ocorrem de igual modo em líquenes e fetos, sendo nestes formados via ciclização directa do esqualeno. Até 1975 pouco se sabia sobre o seu significado para a planta, e os locais onde são sintetizados ou até mesmo sobre o envolvimento dos triterpenóides no metabolismo.[68]

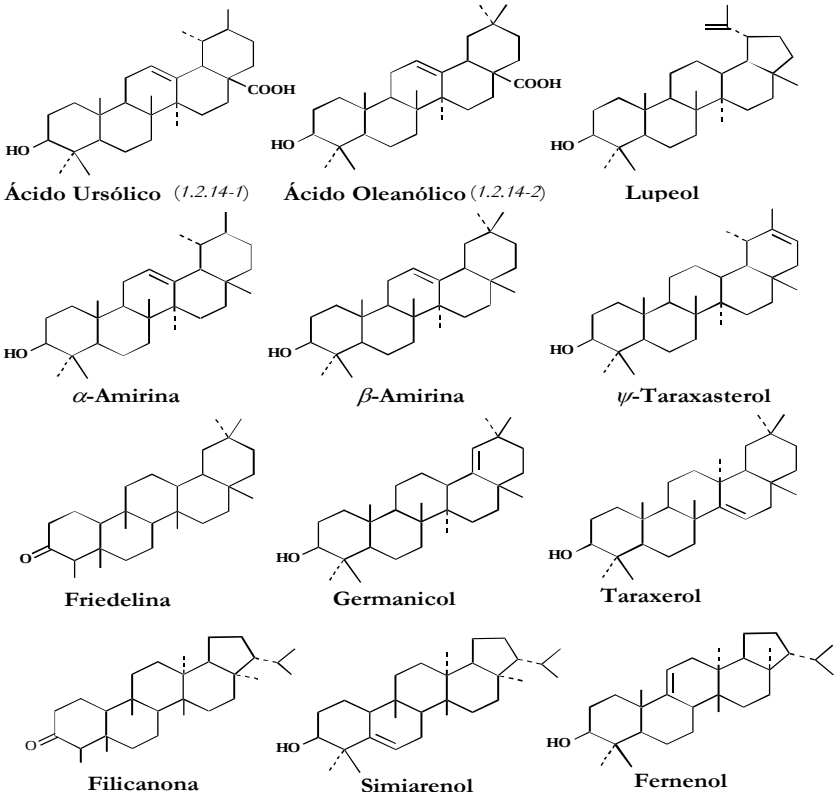
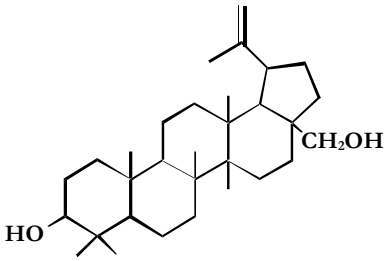


Figura **1.2.14** Estruturas dos triterpenóides pentacíclicos mais vulgarmente encontrados nas plantas.[68] Notar que se trata sempre do estereoisómero 3S.

Os triterpenos pentacíclicos ocorrem por vezes, em grandes quantidades, em células especializadas de armazenamento, como nos sistemas produtores de latéx, ou são secretados para o exterior da célula ou da planta como compostos maioritários nas resinas e ceras. Estas incluem entre outros, ácidos triterpenóicos, triterpenóis e triterpenonas (figura 1.2.14).[67] Por ex. as ceras epicuticulares da maçã, uva e arando, contêm mais de 40% (podendo chegar a 70%) de triterpenos pentacíclicos, em que os compostos dominantes são os ácidos triterpénicos, ácido ursólico (*1.2.14-1*) e ácido oleanólico (*1.2.14-2*) (figura 1.2.14).

A periderme (camada de cortiça) pode também conter grandes quantidades de triterpenos pentacíclicos (ex. a cor branca da bétula é devida à presença dominante do diol triterpénico betulina (*1.2.14-3*)).



Betulina (*1.2.14-3*)

Muitos são os trabalhos que sugerem que quanto mais oxigenados são os triterpenos mais importantes se tornam em termos evolutivos e, no que respeita à sua actividade biológica.[64]

O grupo mais intensamente estudado dos triterpenos é o dos esteróides (triterpenos tetracíclicos), compostos caracterizados por possuírem o sistema carbonado tetracíclico do esterano (figura 1.2.15), normalmente substituído, com um grupo hidroxilo no carbono 3. Os esteróides, no seu conjunto, não são considerados verdadeiros triterpenos, uma vez que o seu esqueleto carbonado possui normalmente C_{27}-C_{29} átomos; no entanto, são habitualmente tratados juntamente com os triterpenos por derivarem do mesmo precursor, o esqualeno (*1.2.11-1*; figura 1.2.11).[34]

Os fito-esteróides sintetizam-se a partir do cicloartenol mediante uma série de transformações que incluem: abertura do ciclopropano das posições 9-10, desmetilação das posições 4 e 7, e modificações na cadeia C_{17}. Os esteróides, uma vez formados, podem unir-

se a açúcares, ácidos carboxílicos e açúcares acilados, para formar, respectivamente, esteril glicósidos, esteril ésteres e esteril glicósidos acilados.

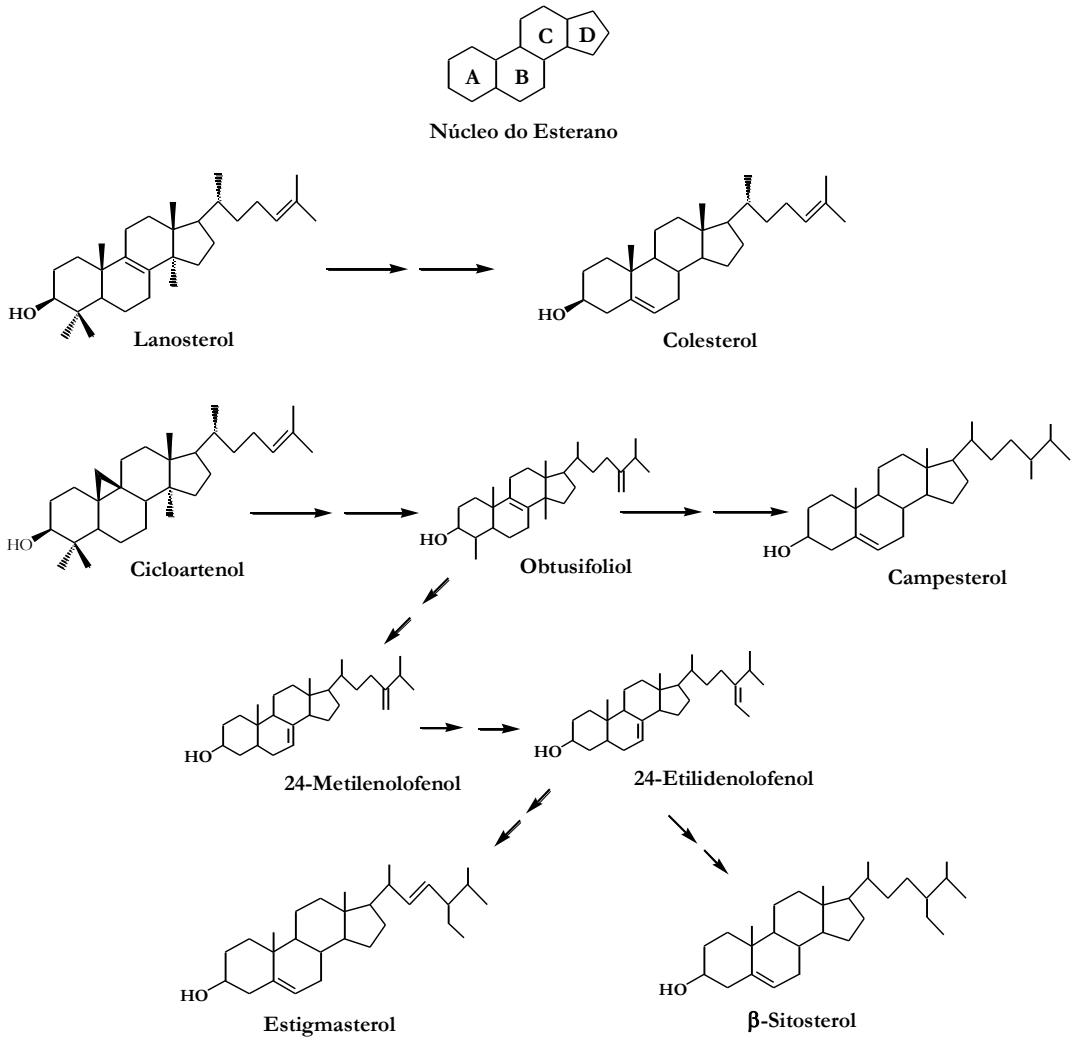


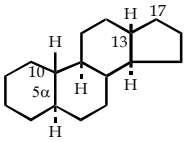
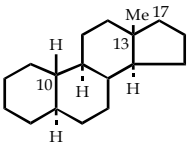
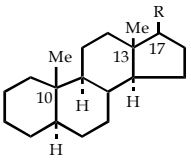
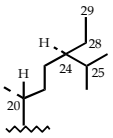
Figura **1.2.15** Biossíntese de fito-esteróides. Etapas fundamentais.[32,66]

As membranas vegetais, embora possam possuir o esteróide, colesterol, são muito mais ricas em sitosterol, 24-metilcolesterol (campesterol) e estigmasterol, todos pertencentes à subclasse dos 4-desmetilesteróis,[69,70] variando a proporção destes compostos com o tipo de membrana e a função biológica que realizam.

Na tabela 1.2.2 encontra-se a nomenclatura geralmente aceite para os esteróides (notar que, de acordo com a figura 1.2.13, os esteróides são considerados derivados do

colestano (*1.2.13-1*)). Estes podem diferir uns dos outros por variação no núcleo (diferenças no sistema de anéis) e na cadeia lateral.

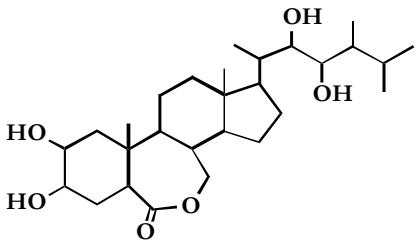
Tabela **1.2.2** Nomenclatura e estruturas utilizadas para os esteróides.

Núcleo	Cadeia lateral	Nome
	---	5α-Gonano
	---	5α-Esterano
	R = H R = Etilo 	5α-Andostrano 5α-Pregnano 5α-Colestano 5α-Ergostano 5α-Estigmastano

As variações no núcleo incluem a estereoquímica em C-5 (5α ou 5β), o número e localização das ligações duplas; a presença de grupos metilo em C-4, C-14 e C-19; a contracção do anel A a pentaciclo (A-*nor*); e a presença de um grupo ciclopropilo na posição C-9β,19. As diferenças na cadeia lateral podem incluir o número e posição das ligações duplas; cadeia curta (C-26 e/ou C-27-nor) ou comprida (C-26 e/ou C-27-metilo); com ou sem ramificações que incluem uma a três unidades carbonadas (C_1-C_3) normalmente em C-22, C-23, C-24 e/ou C-25; e a estereoquímica na cadeia lateral, particularmente em C-22 e C-24. Os esteróis são muitas vezes agrupados em três subclasses: os 4,4-dimetilesteróis, os 4α-metilesteróis e os 4,4-desmetilesteróis. Todas as considerações efectuadas se aplicam também aos triterpenóides.

Durante décadas pensou-se que os omnipresentes esteróides (sitosterol, estigmasterol, e campesterol (figura 1.2.15)) teriam nas plantas actividade hormonal, pois ao serem adicionados a um vegetal causavam alterações no seu crescimento. Actualmente

acredita-se que estes compostos exercem uma acção indirecta, ao actuar como precursores biossintéticos de outros compostos com verdadeira acção hormonal. Os primeiros registos da acção dos esteróides como reguladores do crescimento vegetal devem-se a experiências realizadas na década dos anos 70 onde se verificou que extractos de pólen de *Brassica napus* L. produziam um forte efeito activador do crescimento dos tecidos vegetais.



Brassinolido (*1.2.15-2*)

A partir destes extractos isolou-se um composto activo no estado cristalino, o brassinólido (*1.2.15-2*), que é um esteróide de anel-B-*seco* sendo provavelmente derivado do 24-metilenocolesterol ou campesterol.[71] Desde a descoberta deste composto até ao momento, encontraram-se nas plantas numerosas estruturas similares que possuem o mesmo efeito promotor de crescimento.

Até à descoberta das hormonas esteroídicas vegetais, os Fito-esteróis eram os únicos triterpenóides com funções conhecidas no metabolismo da planta (actividade hormonal). Actualmente acredita-se que os fito-esteróides desempenham nas membranas vegetais as mesmas funções que o colesterol nos animais (actua na fluidez, controlo da permeabilidade e confere estabilidade às membranas).[72]

Os tetraterpenos são compostos de 40 átomos de carbono, formados pela união de 8 unidades isoprénicas. Em geral, apresentam uma série de duplas conjugadas, e um ou dois anéis (figura 1.2.16).

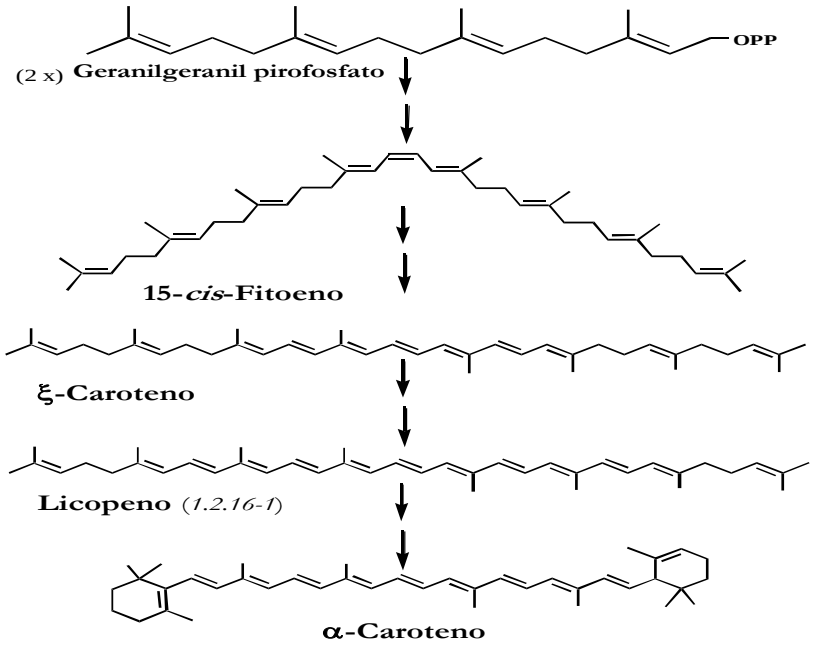


Figura **1.2.16** Biossíntese de carotenóides. Etapas fundamentais.[73]

Os tetraterpenos que carecem de oxigénio nas suas moléculas constituem o grupo dos carotenos (α- e β-, *1.2.17-1* e *1.2.17-2*, respectivamente), e os que possuem oxigénio pertencem ao grupo das xantofilas, de entre as quais se destacam a luteína (*1.2.17-3*), a violaxantina (*1.2.17-5*) e a neoxantina (*1.2.17-4*), pela sua ampla distribuição (figura 1.2.17).

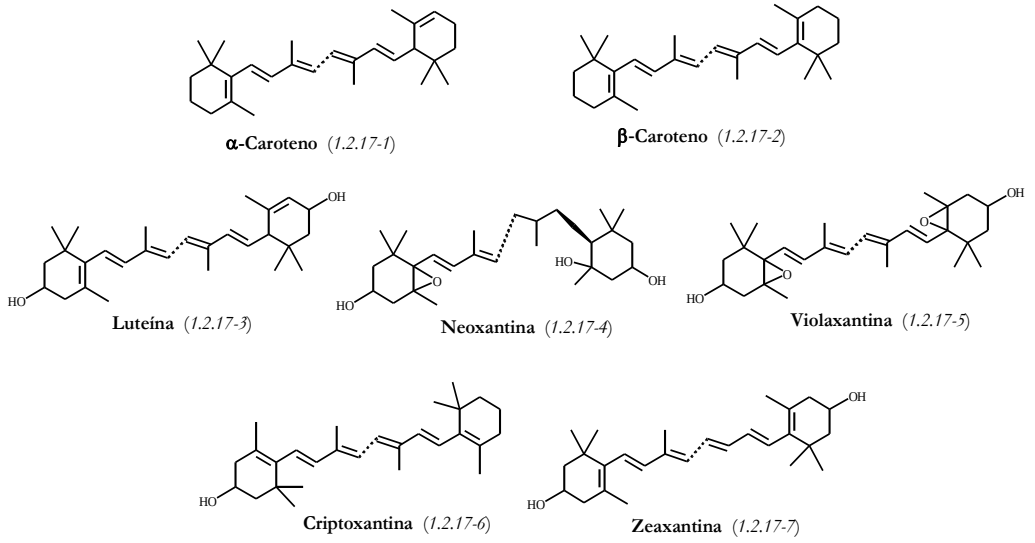


Figura **1.2.17** Exemplos de algumas estruturas tetraterpénicas.

Os carotenóides dividem-se em 4 grupos gerais: hidrocarbonetos (carotenos), derivados cetónicos ou hidroxílicos (xantofilas), carotenóides ácidos e éteres de xantofilas. Os carotenos e as xantofilas existem nas folhas de todas as plantas, e também nas flores e frutos; localizam-se nos plastos, e participam activamente na fotossíntese. As principais funções fisiológicas dos carotenos consistem em actuar como pigmentos acessórios da fotossíntese, além de exercer uma função fotoprotectora, protegendo da oxidação as clorofilas.

Com a alteração de cor durante a maturação dos frutos produz-se o desmantelamento do aparato fotossintético localizado no cloroplasto, embora este processo não seja um requisito essencial para a síntese de pigmentos. A via de síntese dos carotenóides do tomate, tem sido estudada em detalhe devido à importância comercial dos frutos corados. Quando os carotenóides se acumulam, o fruto toma inicialmente uma cor laranja e, posteriormente, vermelha pela deposição de licopeno (*1.2.16-1*, figura 1.2.16). Além disso, acumulam-se outros carotenóides, tal como os precursores incolores fitoeno e fitoflueno. Os carotenóides também estão presentes nos frutos antes da maturação, como se observa no tomate e na banana. A sua síntese continua durante a maturação no fruto do tomate, mas não na banana. A temperaturas superiores a 30 ºC dá-se a inibição da síntese de licopeno nas variedades susceptíveis, mas não a acumulação de β-caroteno, originando uma coloração amarela.

O miolo dos frutos do medronheiro (*Arbutus unedo*) é colorido de amarelo pelos carotenos: Licopeno, β-Caroteno, α-Caroteno; e as xantófilas: Violaxantina, Zeaxantina, Luteína e Criptoxantina (ver figura 1.2.17).[74-76]

1.3.0 Isolamento e Identificação de Metabolitos Secundários

Na última década o estudo de produtos naturais biologicamente activos tem mudado substancialmente. As alterações compreendem a selecção dos materiais de partida, as técnicas de isolamento, as técnicas de elucidação estrutural, a avaliação biológica e a biossíntese.

A extracção, isolamento, e identificação de pequenas quantidades de produtos naturais provenientes de matrizes complexas é hoje o maior objectivo no estudo dos produtos naturais. As técnicas cromatográficas utilizadas incluem a cromatografia de contra-corrente de gota (DCCC), a cromatografia de contra-corrente de rotação locular (RLCCC), a cromatografia de partilha centrífuga (CPC), a cromatografia sob pressão (flash)(FC), as técnicas de fase reversa (RP), como a cromatografia em camada delgada (TLC) ou a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), cromatografia gás-líquido (GC), e a electroforese capilar (CZE).[77,78]

As técnicas de elucidação estrutural de produtos naturais têm-se alterado pouco nos últimos anos, continuando a ser utilizadas a espectroscopia de infravermelho (IR), espectroscopia de ultra-violeta (UV), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR), espectrometria de massa (MS) e a espectroscopia de dicroísmo circular (CD).

A ionização de electrospray (ESI) introduzida em 1984 por Fenn & Yamashita,[79] revolucionou de muitas formas a acoplagem "on-line" HPLC-MS.[80] Igualmente a utilização da espectrometria de massa de ciclotrão de resolução iónica com transformada de Fourier (FTICRMS) e o tandem-MS em sistemas de quadropólos triplos ou sistemas de armadilha de iões (ITD), resultaram num aumento exponencial da informação nos últimos 20 anos.[80-82]

A determinação da configuração absoluta em produtos naturais biologicamente importantes continua a ser um desafio difícil. Apesar dos resultados obtidos com as separações quirais em GC e HPLC, a espectroscopia de dicroísmo circular (CD) tem-se revelado uma técnica muito útil na atribuição da configuração absoluta de novos metabolitos. Contudo são necessários dados experimentais de estruturas semelhantes ou

que as estruturas se ajustem às regras empíricas do dicroísmo circular.[83,84] A utilização complementar das técnicas HPLC-NMR/HPLC-MS/HPLC-CD permitiu recentemente a elucidação estrutural completa, incluindo a configuração absoluta de novos metabolitos (alcalóides) em extractos de plantas.[85]

A diversidade de metabolitos secundários existentes nos frutos torna, por vezes necessária a utilização de técnicas de isolamento direccionado e identificação selectiva de família(s) química(s).

1.3.1 Ácidos Carboxílicos

Entre os métodos mais clássicos de isolamento, separação e identificação de ácidos carboxílicos nas plantas (frutos incluídos), encontram-se a extracção, destilação (normalmente destilação por arrastamento de vapor, destilação fraccionada a pressão reduzida e destilação molecular), a cristalização (dos ácidos em natureza ou derivatizados na forma de sais), a distribuição de contra-corrente e os métodos cromatográficos: cromatografia de partilha em coluna, cromatografia de partilha em papel, em fase normal (NP) ou fase-reversa (RP) e cromatografia em camada delgada.[37,78] A cromatografia gás-líquido, devido sobretudo à sua elevada resolução, é hoje em dia o método cromatográfico mais utilizado e sem dúvida o método mais efectivo para análise qualitativa e quantitativa de misturas de ácidos carboxílicos, dando inclusive alguma informação acerca da estrutura de ácidos desconhecidos.[37,86,87] Os ácidos carboxílicos são normalmente separados na forma de ésteres metílicos (etílicos ou silílicos), embora para os ácidos mais voláteis (C_3-C_9) sejam preferidos derivados de cadeia mais comprida como os ésteres butílicos, decílicos ou outros.[37,78,86] A identificação dos compostos de uma mistura desconhecida é efectuada através da comparação dos tempos de retenção, tr, dos picos obtidos com os de padrões, de preferência em pelo menos dois tipos de colunas com polaridade diferente e isto porque, em alguns casos, existe a possibilidade de co-eluição de compostos num tipo de coluna não acontecendo o mesmo quando a polaridade é alterada.

Nos últimos anos tem havido um grande incremento na utilização do HPLC na separação de ácidos carboxílicos, principalmente os que possuem grupos funcionais diferentes de insaturações (tipo hidroxilo, alcóxido, carbonilo, entre outros).[88] No entanto, salvo algumas excepções, a cromatografia gás líquido de alta resolução (HRGC) tem-se mostrado mais eficiente devido à sua capacidade de detectar quantidades inferiores (análise vestigial por exemplo) e também devido à sua muito maior resolução.[86,87,89] Nos métodos de determinação de estrutura mais clássicos incluem-se a espectroscopia de ultra-violeta[37,78] - normalmente muito útil na determinação de insaturações conjugadas, a espectroscopia de infravermelho[37] - de particular importância no reconhecimento de grupos funcionais não usuais nos ácidos e também na detecção de ligações duplas *trans (E)*, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear[37,78,90] - especialmente útil na determinação de novas estruturas e, a espectrometria de massa.

A cromatografia gás-líquido associada à espectrometria de massa (GC-MS), é hoje o método mais utilizado na separação e identificação dos constituintes de misturas de ácidos carboxílicos principalmente na forma de ésteres metílicos.[86,87] Os espectros de massa de impacto electrónico (EI) dos ésteres metílicos dos ácidos carboxílicos encontram-se estudados exaustivamente.[91,92] Da sua interpretação é possível saber o comprimento da cadeia carbonada, o número de insaturações presentes, determinar a posição de ramificação de grupos metilo ou funções oxigenadas. Infelizmente, devido à ocorrência de migração das ligações duplas anterior à fragmentação, não é possível, só por GC-MS, determinar a sua posição nos ácidos, sem ter que recorrer à utilização de padrões. No entanto, a utilização de um método mais sofisticado - a decomposição por colisão activada (CAD) de iões negativos $(M-H)^-$ foi descrita como um método capaz de localizar as ligações duplas em ácidos mono-insaturados.[93,94] O método só é contudo aplicável em laboratórios que disponham de espectrómetros de massa "*tandem*" de analisador triplo (MS/MS).

1.3.2 Compostos Fenólicos Glicosilados - Arbutina

Vários são os trabalhos que abordam o isolamento e a identificação deste composto glicosilado. Isolada pela 1ª vez em 1852 por *Kawalier,*[95] a arbutina, foi em seguida colocada em evidência por diversos autores do mesmo modo que a metilarbutina, hidroquinona e metil-hidroquinona e diversos taninos, que de uma maneira geral vêm associados em termos extractivos.[52-55] Os teores em arbutina (arbutósido) variam em função da espécie de Ericácea em estudo e reconhece-se que o seu conteúdo é particularmente elevado nas folhas da Uva-ursina (*Arctostaphylos uva ursi* L.).

As técnicas de análise qualitativa descritas para estes compostos, polares com comportamento ácido fraco (pKa~10 para a arbutina), vão desde a cromatografia em coluna (CC) de adsorção (sílica gel) ou técnicas de fase reversa (em RP-18), cromatografia em camada fina,[96] o RP-HPLC,[97-99] à electroforese capilar.[52] Na cromatografia em camada fina, TLC, de uma maneira geral usa-se a sílica gel como adsorvente, em sistemas como Acetato de etilo: Metanol: Água (100:17:13), utilizando reveladores específicos: Ácido fosfomolíbdico (origina manchas azuis-cinza); Ácido sulfanílico-Nitrito de sódio (4,5%) seguida de pulverização com KOH 2M (origina manchas vermelhas); reagente de *Millons* (solução de mercúrio em ácido nítrico fumante) (origina manchas amarelas); ou ainda recorrendo ao reagente *Berlin blue* ($FeCl_3$-Hexacianoferrato de potássio).[100]

Os processos quantitativos mais vulgarmente utilizados são, entre outros, a quantificação por HPLC, por electroforese capilar, polarimetria ou a colorimetria [52, 53,97-99, 101-104] A sua quantificação por RP-HPLC-RI, eluente Metanol:Água (1:9), em coluna RP-18, utiliza o resorcinol como padrão interno visto este fenol não ocorrer naturalmente nas folhas e possuir características químicas semelhantes ao analito fenólico.[97-99]

1.3.3 Mono-, Sesqui- e Diterpenos

A análise de mono- sesqui- e diterpenos reveste-se de características específicas, que reflectem a reduzida concentração destes compostos nas plantas (caso particular dos frutos) podendo ir dos picogramas até aos miligramas por quilo,[105,106] bem com a enorme diversidade de características químicas dos componentes. A escolha do método extractivo a utilizar para estes compostos de pequena massa molecular (e baixo ponto de ebulição), tem que ser ponderada. Existem métodos extractivos variados, promovendo cada um alterações qualitativas e quantitativas da composição final do extracto, sem incluir os factores endógenos como a diversidade de composição entre espécies (factores genéticos),[106-122] diferentes graus de maturação, ou outros factores externos ambientais e/ou climatéricos, composição do solo, etc. Com o objectivo de serem obtidos extractos que reflictam de um modo mais rigoroso ("fiel") o teor da matriz original, foram desenvolvidos variados sistemas extractivos como a extracção líquido-líquido,[106,108,113,120-152] sólido-líquido,[122,141,142,147,149,153-162] a destilação a pressão reduzida,[149,157,160,163-171] a hidrodestilação extracção (SDE)[172] (a pressão normal[173,174] e a pressão reduzida[175-180]), a extracção de "*headspace*",[166,173,181-184] e mais recentemente, a extracção com fluídos supercríticos, (SFE)[185-187] e a microextracção em fase sólida, (SPME).[188-190]

Nos extractores contínuos SDE o vapor de água é extraído pelo vapor do solvente extractor também em condensação, levando a elevadas taxas de recuperação.[190] Este extractor foi desenvolvido por *Likens-Nickerson*[191,192] (sofrendo posteriores alterações[193,194]). De uma maneira geral este processo extractivo decorre à pressão normal mas é possível a utilização a pressão reduzida (minimizando a formação de artefactos proveniente dos compostos mais termolábeis). Pese embora o facto da destilação por arrastamento de vapor ser um método extractivo criticado por alguns autores,[173] levando a uma distorção, mais ou menos acentuada, do perfil da composição de compostos extraídos, visto serem extraídos apenas os compostos que destilam simultaneamente com a água, continua no entanto, a ser o método de extracção mais divulgado na análise destes compostos de pequena massa molecular.[115,143,166,194-212]

No que respeita às técnicas de *Head-space* e *Purge & Trap*, as críticas apontam para o facto destas técnicas permitirem apenas a recuperação dos metabolitos mais voláteis.[213] Quanto à extracção SFE, esta permite o isolamento de compostos semi-voláteis, mas durante o passo de despressurização pode ocorrer discriminação na recuperação dos compostos polares e algumas perdas de metabolitos voláteis.[213]

A cromatografia gás-líquido de alta resolução (HRGC) e a sua associação à espectrometria de massa são as técnicas mais utilizadas na análise de mono-, sesqui- e diterpenos em misturas complexas.[214,215] A análise de matrizes naturais complexas em quantidades pequenas (na ordem dos 10^{-9} a 10^{-12} g por quilo de amostra original) é normalmente efectuada utilizando sistemas cromatográficos que permitem que a amostra após a injecção seja repartida por duas colunas de diferente polaridade possibilitando uma melhor discriminação dos seus componentes, permitindo a "localização" de co-eluições.[210] No caso de amostras "ricas em componente volátil" é muitas vezes utilizada a cromatografia líquida em coluna (CC) como método de sub-fraccionamento da mistura anterior à sua análise.[141,163] O extracto é sub-fraccionado segundo a polaridade dos componentes[141,154,162,212] (fase normal ou fase reversa), ou segundo a massa molecular dos compostos recorrendo-se para tal à cromatografia de exclusão molecular.[159] Deste modo são obtidas sub-fracções do extracto inicial, de menor complexidade, facilitando a posterior separação cromatográfica e, reduzindo a probabilidade de co-eluições indesejáveis durante a cromatografia gasosa. No entanto, os métodos de sub-fraccionamento têm algumas desvantagens nomeadamente perda de amostra durante o procedimento, produção de artefactos ou ainda a introdução de impurezas. Além disso o fraccionamento nem sempre é previsível.[218]

1.3.3.1 GM - MS
ITD *versus* Quadropólo

Como já foi anteriormente referido a espectrometria de massa, especialmente a sua associação à cromatografia gasosa (GC-MS), tem um desempenho preponderante na identificação da componente volátil das plantas (flores/frutos).

São dois os detectores mais utilizados em GC-MS: o de quadropólo (QMS) e o de armadilha de iões (ITD). O detector de massa "*Ion Trap*", ITD, muito popular, em termos conceptuais possui (consideráveis) diferenças em relação ao espectrómetro de massa de quadropólo (QMS), as quais se reflectem nos espectros obtidos.

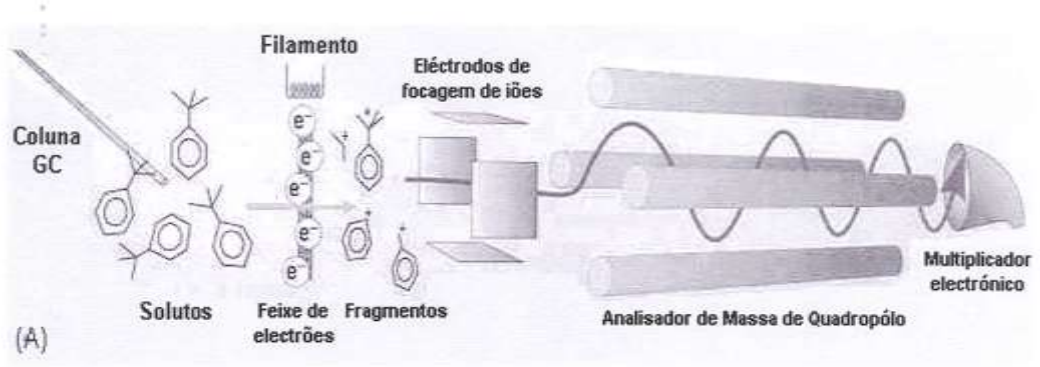


Figura **1.3.0** Esquema geral de funcionamento dos detectores de massa de quadropólo, QMS.[217]

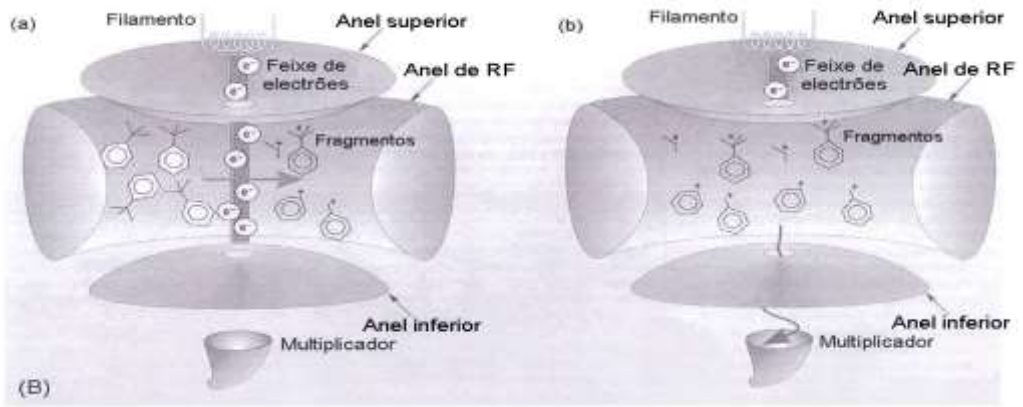


Figura **1.3.1** Esquema geral de funcionamento dos detectores de massa de armadilha de iões, ITD incluindo (**a**) a formação de iões e (**b**) a filtração mássica. Os três anéis: superior, RF e inferior, fazem parte dos eléctrodos de captura iónica.[217]

Nas figuras 1.3.0 e 1.3.1 descrevem-se os esquemas gerais de funcionamento dos detectores de massa de quadropólo, QMS (fig. 1.3.0) e de armadilha de iões, ITD (fig. 1.3.1) (neste último, inclui-se o esquema da formação de iões (**a**) e, da filtração mássica (**b**)).

O ITD possui um varrimento (*scanning*) numa gama de massas de 10 a 650 u.m.a. com uma velocidade de varrimento que vai dos 0,125 aos 2,0 segundos/scan por gama de massas seleccionada. O termo espectrometria de massa ITD difere da espectroscopia de massa de quadropólo uma vez que, neste, os iões são guardados (*trapped*) no sistema de eléctrodos de captura iónica e ejectados selectivamente enquanto que num quadropólo este produz os iões estáveis selectivamente.

A armadilha de iões (IT) ao usar ionização pulsada faz com que os iões sejam criados, armazenados e libertados numa ordem crescente de massas. Em contraste o QMS possui ionização contínua. O facto do IT funcionar numa gama de vácuo inferior (10^{-2} a 10^{-3} torr, hélio em contraste com os 10^{-5} a 10^{-6} torr do quadropólo) o que implica a manutenção dos iões na armadilha (*trap*), associado ao facto da libertação de iões de determinada massa molecular ser efectuada por um aumento faseado da voltagem de radiofrequência, RF (fazendo com que os iões instáveis saiam da armadilha), faz com que este detector utilize uma superior quantidade de amostra (~50%, enquanto que o quadropólo apenas usa 0,1-0,2% dos iões para análise) resultando numa sensibilidade superior deste detector podendo atingir os 5 pg.

Em contraste, no "*ion trap*" (ITMS) e com base num *"scan"* sobrecarregado (figura 1.3.2**b**) obtém-se como picos minoritários os iões *m/z* 85, 100, 111 e 129 (M+1), devido a auto-ionização química (*space charging*). No entanto, da análise do espectro correspondente a um *"scan"* da frente do pico (figura 1.3.2**c**), verifica-se a presença do ião molecular (*m/z* 128) mas o *m/z* 71 é notavelmente reduzido, quando comparado com o do espectro anterior. Neste caso, nenhum dos *"scans"* é semelhante ao do espectro obtido em quadropólo.

Além disso, ocorre uma troca abrupta no espectro mostrando um ião *m/z* 128 pequeno (**c**), com o ião "*space charging*" (ião *m/z* 129). A sobrecarga dos picos pode ser facilmente evitada; no entanto, em relação aos componentes minoritários das amostras (por vezes em concentrações ao nível vestigial) tal não pode ser feito.

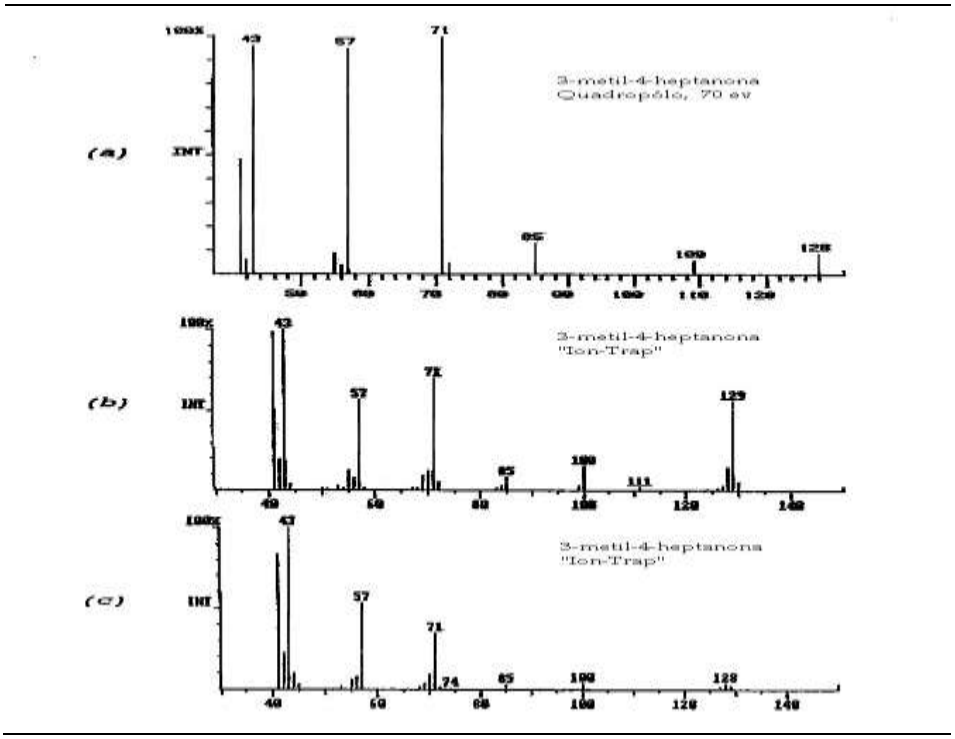


Figura **1.3.2** Comparação dos espectros da 3-metil-4-heptanona obtidos com espectrómetros de massa de quadropólo *versus ion trap*; (**a**) Espectro de quadropólo da 3-metil-4-heptanona; (**b**) Espectro de *ion trap* da 3-metil-4-heptanona de um *"scan"* do topo do pico, (conc. elevada); (**c**) Espectro de *ion trap* da 3-metil-4-heptanona numa zona do pico não sobrecarregada.

Uma outra técnica *on-line* para a determinação estrutural de compostos de pequena massa molecular consiste na cromatografia gasosa acoplada ao infravermelho com transformada de Fourier, HRGC-FTIR ("*Fourier Transform Infrared*"). Esta técnica tem como vantagem a detecção não destrutiva levando à elucidação estrutural de isómeros, de posição e geométricos, em misturas complexas. No entanto na sua utilização surgem por vezes problemas devido à baixa sensibilidade e gama dinâmica quando comparada com a HRGC-MS.[219]

1.3.4 Triterpenóides

As técnicas de extracção e isolamento de triterpenóides não têm na literatura um método universal, uma vez que a técnica extractiva adoptada é normalmente determinada pelo material a extrair e condicionada pelas informações já existentes acerca da natureza dos triterpenóides presentes (livres, glicosados e/ou esterificados). No entanto, nos processos extractivos os solventes mais utilizados são misturas clorofórmio-metanol e a acetona, estando também descritos o clorofórmio, o diclorometano, o éter de petróleo e o etanol. Normalmente uma pequena percentagem de água (2-7%) é adicionada se o material estiver seco, pois a sua presença aumenta o rendimento da extracção de triterpenóides.[220] Após a extracção, procede-se habitualmente à separação dos triterpenóides em subclasses. Também aqui os métodos são diversos, estando descritos o fraccionamento com solventes, a separação utilizando diversas técnicas cromatográficas como CC de adsorção (sílica gel e/ou alumina) de fase reversa ou de argentação ou, sendo a quantidade de extracto pequena, por TLC e, por HPLC.[221-224]

Na separação individual de triterpenóides utilizam-se a CC de adsorção (sílica gel ou alumina) ou de fase reversa (*Sephadex LH20*), TLC de adsorção, de fase reversa ou de argentação e HPLC, sendo actualmente o HPLC a técnica mais comum por possuir menores perdas, gerar menos artefactos e permitir maior resolução, vantagens estas relativamente à TLC e à CC; a GC, nesta fase, é principalmente utilizada como técnica analítica para acompanhamento do grau de pureza dos produtos isolados.[224,225,228,229]

Na elucidação estrutural dos triterpenóides, é fundamental a utilização de técnicas espectroscópicas como NMR, MS, UV, IR, e por vezes o raios-X para a identificação inequívoca.[227]

A espectroscopia de NMR contribui para a identificação do esqueleto carbonado tetra- ou pentacíclico e a localização tanto dos grupos funcionais como das ligações duplas existentes que, poderão estar dentro do núcleo (ou na cadeia lateral, no caso dos esteróides) sendo em ambos os casos importante a determinação das suas posições e estereoquímica. A natureza e orientação dos grupos substituintes no esqueleto tetra- ou pentacíclico

determinam, de um modo aproximadamente aditivo; os valores das frequências de ressonância dos grupos metilo angulares C-18 e C-19, no espectro de ^{1}H-NMR.[228] *Zucher,*[229,230] *Arnold et al.*[231] e *Cohen* e *Rock*[232] tabelaram os deslocamentos químicos dos metilos angulares para mais de trezentos triterpenos tetracíclicos (esteróides) de estrutura conhecida e, calcularam os incrementos dos deslocamentos para um vasto leque de substituintes em diferentes posições do núcleo; *Lehn et al.*[233] efectuaram o estudo por ^{1}H-NMR dos grupos metilo de triterpenos pentacíclicos da série lupano. Comparando os deslocamentos químicos dos grupos metilo angulares de um composto desconhecido com os valores calculados a partir da tabela de *Zucher*, pode estabelecer-se um princípio de correlação química. Em trabalhos publicados podem encontrar-se dados relativos a esteróides dos grupos do ergostano e colestano compilados por *Harmmer* e *Stevenson*[234] e, do grupo do lanostano por *Hemmert et al.*[235] e *Cohen et al.,*[236] verificando-se a consistência do princípio da adictividade dos incrementos dos desvios químicos para compostos de diferentes cadeias laterais. A influência da cadeia lateral nos deslocamentos químicos dos grupos metilo angulares, faz-se sentir sobretudo em C-18 e C-32 (caso exista), especialmente no caso de cadeias com sistema de electrões π deslocalizados.[236]

A dificuldade na identificação dos grupos metilo nos triterpenos tetra- e pentacíclicos, devido à sobreposição das suas ressonâncias no espectro de ^{1}H-NMR, pode ser superada pela utilização de reagentes paramagnéticos de deslocamento, como o $Eu(dpm)_3$ ou o $Eu(fod)_3$.[237,238] O reagente de desvio Lantanídeo $Eu(dpm)_3$ tem sido usado para caracterizar os metilos de triterpenóides.[239-242] Como resultado da análise espectral de ^{1}H-NMR de derivados Urseno na presença de $Eu(dpm)_3$ mostrou que os desvios de pseudocontacto de triterpenos bifuncionais pode ser calculado como o somatório dos correspondentes desvios dos respectivos compostos monofuncionais.[243] Numa experiência, com o uso de $Eu(fod)_3$ permitiu total registo dos 8 sinais metílicos de urs-12-enos e a avaliação do efeito de substituintes em C-3, C-11 e C-17 nos sinais metílicos.[244] Num trabalho de Romeo *et al.*[245] registam-se os resultados dos espectros $Eu(fod)_3$ de 12 triterpenóides relacionados com o urs-12-eno. As frequências de ressonância e multiplicidade dos protões geminais aos grupos hidroxilo e acetato do núcleo esterólico foram utilizadas por *L. Smith*[246] na elucidação estrutural de hidroxi-esteróides. A forma do multipleto correspondente à ressonância do protão metino C<u>H</u>-OH, fornece uma

indicação da posição e configuração do grupo hidroxilo no núcleo.[247] A relação existente entre a configuração e arranjo espacial dos grupos substituintes no núcleo esteróide e, as constantes de acoplamento *J* dos protões vicinais H-C-C-H' e geminais H-C-H, foi analisada por *Bhacca* e *Williams*.[248] Uma revisão da identificação de esteróis por ^{1}H-NMR foi efectuada por *Farines* e *Soulier*.[249]

Os espectros de ^{13}C-NMR são, por vezes, mais úteis do que os de ^{1}H-NMR na análise estrutural de moléculas, devido à grande sensibilidade dos desvios químicos de ^{13}C face a mudanças estruturais e também porque cada átomo de carbono na molécula pode, normalmente, ser examinado individualmente.[250-253] Vários são os trabalhos de revisão sobre os estudos de ^{13}C-NMR nesta vasta classe de compostos, podendo destacar-se, os dados relativos aos desvios químicos de ^{13}C-NMR de mais de duzentos compostos da série ursano/oleanano (e seus derivados) compilados por *S. Kang*[254] *Mahato et al.*[255] fazem uma compilação sistemática dos desvios de ^{13}C de cerca de quatro centenas de triterpenóides pentacíclicos. Quanto aos triterpenos tetracíclicos, os desvios químicos de grande número destes compostos foram compilados e revistos por *Blunt* e *Stothers*[256] e *Smith Kang*.[254] Contudo, apenas *Akihisa*[257] fez um registo sistemático dos desvios de ^{13}C de esteróis, tendo compilado e revisto em particular os dados de ^{13}C de 4,4-desmetilesteróis e 4,4-dimetilesteróis.

O desenvolvimento de técnicas de NMR bidimensionais (2D-NMR) tem permitido o desenvolvimento de métodos de atribuição muito úteis na área da química dos produtos naturais incluindo os triterpenóides.[227,258] Vários são os trabalhos nesta àrea[256,259-261] podendo-se destacar os trabalhos de *Reynolds et al.*[260] onde se efectua a atribuição total de espectros de ^{13}C e ^{1}H-NMR de triterpenóides e outro de *Croasmun* e *Carlson*[262] que publicaram um extenso trabalho sobre a análise estrutural de esteróides por técnicas de NMR bidimensionais.

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD)[83,84,263,264] e a análise de difracção de raios X[265,266] são também duas importantes ferramentas a ter em conta na elucidação estrutural individual dos triterpenóides.

As espectroscopias de absorção de UV e IV são métodos excelentes para a confirmação da presença e localização relativa de grupos funcionais. A análise de

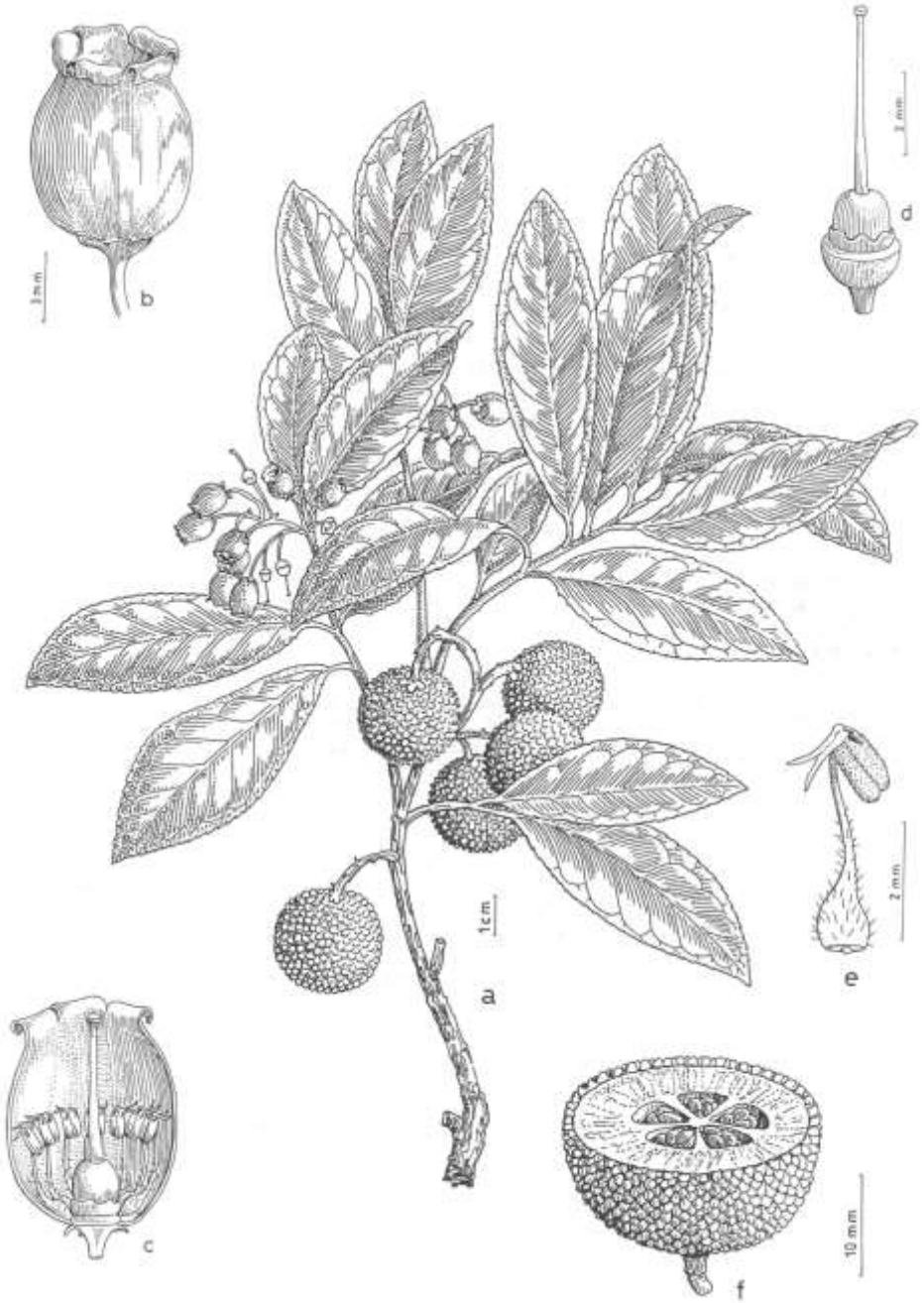
triterpenóides por espectroscopia de absorção tem sido extensivamente publicada. A destacar são os trabalhos de *Bellamy,*[267] *Silverstein et al.,*[268] *Acuña- Johnson* e *Oehlschlager.*[269]

A espectrometria de massa (MS) tem sido crucial para a elucidação estrutural de triterpenóides. Com o objectivo de localizar grupos funcionais e ligações duplas no núcleo tetra- ou pentacíclico, recorre-se habitualmente à espectrometria de massa (MS) ou às técnicas acopladas GC-MS e/ou HPLC-MS. Nestas últimas poder-se-ão utilizar técnicas específicas, como a monitorização de ião único (SIM) ou a monitorização múltipla de iões (MIM), para aumentar a sensibilidade do espectrómetro de massa, útil na análise de pequenas quantidades.[270] A interpretação da clivagem observada nos espectros de massa tem sido objecto de inúmeros estudos. *Djerassi et al.*[271] registaram os padrões de fragmentação de triterpenóides pentacíclicos pertencendo às séries oleanano, ursano e lupano (bem como oleanenos, ursenos e lupenos rearranjados, com as duplas ligações em várias posições). Este trabalho foi determinante para o correcto estabelecimento do padrão de fragmentação retro-*Diels Alder* (RDA) de oleanenos e ursenos C-12 insaturados. Em trabalhos de *Ogunkoya*[272] e *Shiojima*[273] registaram-se os espectros de massa de mais de uma centena de triterpenóides pentacíclicos saturados e insaturados de variadas séries, sendo racionalizada a geração de vários fragmentos característicos a partir dos esqueletos carbonados com duplas ligações no(s) sistema(s) policíclico(s). Entre os triterpenóides mais estudados encontram-se os esteróis, por serem habitualmente os mais abundantes. Em relação a estes e, salientando apenas alguns trabalhos, *Zaretskii*[274] e *González et al.*[275] estudaram as fragmentações observadas variando a natureza e posição dos grupos substituintes no núcleo e na cadeia lateral, *Galli* e *Maroni*[276] verificaram o efeito da posição das ligações duplas na cadeia lateral sobre a fragmentação observada, estudo também efectuado por *Wyllie* e *Djerassi*[277] e por *Djerassi*[278] e ainda dois trabalhos de revisão recentes cobrem a influência das modificações estruturais na clivagem observada por espectrometria de massa.[270,279] Um artigo pioneiro e muito importante é o de *Brooks et al.*[280] que estudaram a espectrometria de massa dos derivados trimetilsililo de 28 esteróis.

A combinação do HPLC com a MS tornou-se uma técnica praticável, após largos anos de pesquisa dedicada às interfaces. A primeira interface "aplicável" surgiu em 1973 num trabalho de *Baldwin* e *McLafferty.*[282] A evolução da acoplagem entre o HPLC e a MS não tem sido linear uma vez que as condições normais de operação de um espectrómetro de

massa (alto vácuo, temperaturas elevadas, operação em fase gasosa e velocidades de fluxo reduzidas) são opostas às condições utilizadas em HPLC, nomeadamente a operação em fase líquida, pressões elevadas, velocidades de fluxo elevadas e, temperaturas relativamente baixas.[283] São várias as interfaces existentes possuindo cada uma características e gama de aplicações próprias na análise de metabolitos secundários de plantas.[80,284] De entre as interfaces comercialmente existentes destacam-se: o "*termospray*" (TSP),[80,285] o "*electrospray ionisation*" (ESI),[79,80] o bombardeamento rápido de átomos de fluxo contínuo (CF-FAB) ("*continuous flow fast atom bombardment*"),[80,286] a ionização química à pressão atmosférica (APCI) ("*atmospheric pressure chemical ionisation*")[80,287] e ainda o separador de feixe de partículas (PBS).[80,288,289] Com excepção do separador de feixe de partículas (PBS), todas elas produzem, principalmente, informação acerca da massa molecular. O LC-TSP-MS permite de um modo satisfatório a ionização de constituintes moderadamente polares como polifenóis ou terpenóides (gama de massas 200-800 u.m.a.). Para moléculas polares maiores como as saponinas (MM>800 u.m.a.), a CF-FAB ou o ESI são os métodos de escolha.[80,284] A fragmentação não é previsível, sendo no entanto explicável *a posteriori*. A quantidade mínima detectável em HPLC-MS é dependente da interface e do tipo de compostos. Limites de detecção normais estão na gama 5-100 ng.[290] A técnica tem sido aplicada nos casos em que apresenta vantagens relativamente ao GC-MS. No entanto, casos há em que a cromatografia em fase gasosa requer derivatização extensiva, podendo ser incompleta ou resultar em produtos múltiplos. Num recente trabalho,[292] vinte triterpenóides são analisados por RP-HPLC-MS usando a ionização química à pressão atmosférica (APCI). Também o detector APCI-(MS-MS) tem sido utilizado como detector (muito sensível), neste tipo de compostos, por aplicação da monitorização de ião seleccionado (SIM) e/ou de reacção múltipla (MRM) ("*Multiple-Reaction Monitoring*"), tirando o máximo rendimento da enorme selectividade deste sistema *tandem*.[287,293-295]

2.0.0 RESULTADOS e DISCUSSÃO

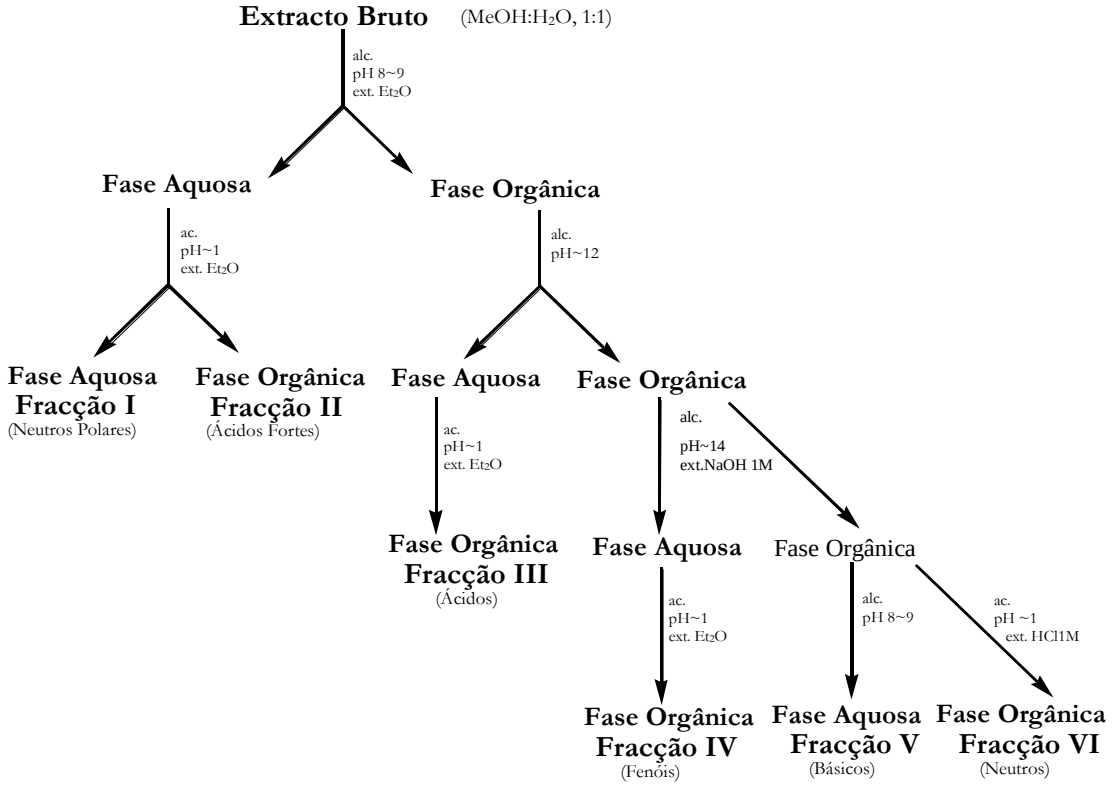


viii

[viii] Legenda da ilustração da página anterior - *Arbutus unedo*: **a** - ramo florido e frutificado; **b** - flor; **c** - secção longitudinal de uma flor; **d** - gineceu; **e** - estame; **f** - secção transversal de um fruto maduro. in "*Flora Iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*", Vol. IV, *Cruciferae-Monotropaceae*, (Eds.) Castroviejo, S., Aedo, C., Campo, C.G., Laínz, M., Montserrat, P., Morales, R., Garmendia, F.M., Feliner, G.N., Rico, E., Talavera and S. E Villar, L., Real Jardin Botánico, C.S.I.C., Madrid, **1993**, 515. (ref[a] 296).

2.1.0 Extracção Global

O extracto metanol: água (1:1) dos frutos de *Arbutus unedo* foi fraccionado segundo o esquema sistemático padronizado[297] de extracção por solventes (esquema 2.1.0).



Esquema **2.1.0** Sequência do fraccionamento por solventes utilizado para os medronhos a partir do extracto bruto (metanol : água, 1:1).

A análise preliminar das seis sub-fracções obtidas (**I**, **II**, **III**, **IV**, **V** e **VI**) efectuou-se por cromatografia em camada delgada (TLC) com a utilização de reveladores específicos de acordo com a funcionalidade esperada para cada fracção

(esquema 2.1.0), de modo a estimar a sua complexidade. Iniciou-se o conhecimento da composição química das diversas fracções pela fracção neutra (fracção **VI**).

2.1.1 Composição em Ésteres de Ácidos Carboxílicos

O estudo da fracção neutra (fracção VI) decorreu em duas fases. Do seu estudo preliminar, utilizando a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, GC-MS, concluiu-se que esta fracção era predominantemente constituída por ésteres metílicos e etílicos de ácidos carboxílicos de cadeia carbonada longa e por triterpenóides (figuras 2.1.1 e 2.1.2).

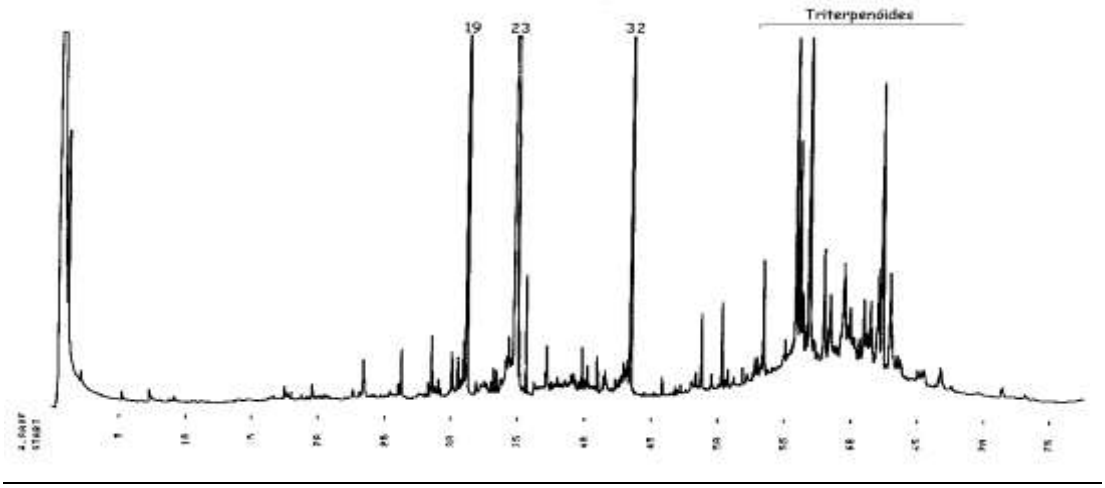


Figura **2.1.1** Cromatograma HRGC do extracto em natureza, da fracção neutra (fracção VI) dos frutos de *Arbutus unedo*. Condições experimentais: forno: 50º - 4,5º/min. - 300 ºC (25 min.), (ver Parte Experimental).

Para o estudo da sua composição em ésteres de ácidos gordos, recorreu-se à cromatografia gás-líquido de alta resolução (HRGC), bem como à sua associação à espectrometria de massa (HRGC-MS). As figuras 2.1.1 e 2.1.2 mostram os cromatogramas obtidos (GC e TIC respectivamente), para o extracto em natureza.

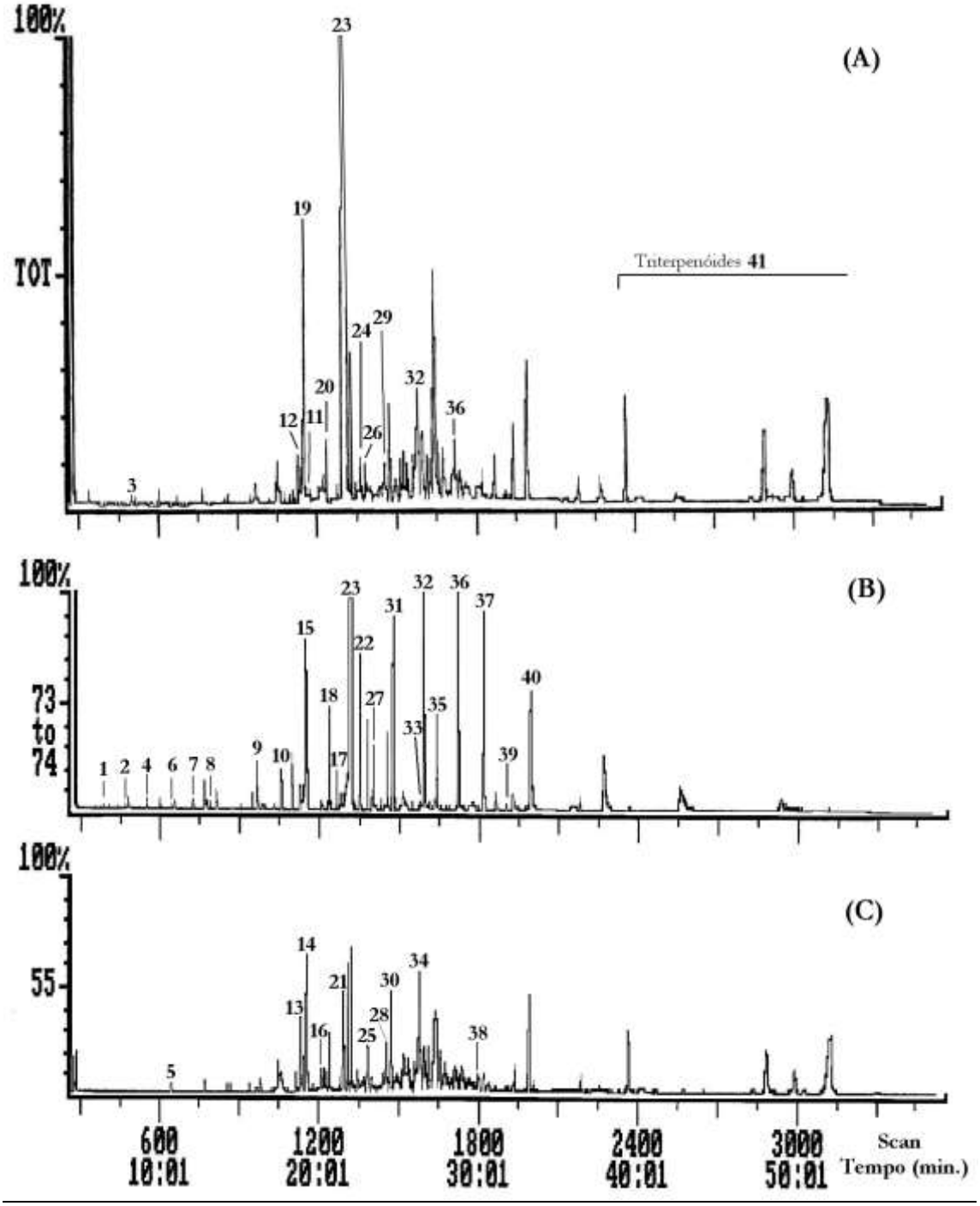


Figura **2.1.2 A** - Traçados de corrente iónica total (TIC) e MIM dos dois iões diagnóstico para ésteres metílicos dos ácidos carboxílicos **B** - (*m/z* **73/74**), e **C** - (*m/z* **55**), obtido por GC-MS(ITD) a partir do extracto em natureza, correspondente à fracção neutra (FVI) dos frutos de *Arbutus unedo*. Forno: 80 ºC (4) - 3,5 ºC/min - 175º- 7º/min. – 300 ºC, (ver Parte Experimental).

Os compostos foram identificados pela análise dos seus espectros de massa e, quando possível, confirmada a sua identidade por comparação com padrões – co-eluição em GC e comparação dos espectros de massa obtidos nas mesmas condições.

Foi tido em conta o que foi referido na introdução (páginas 44 e 45) - da interpretação do espectro de massa de um éster é possível saber o comprimento da cadeia carbonada, o número de insaturações presentes e, determinar a posição de ramificação de grupos alquilo ou funções oxigenadas. No entanto e, tal como foi mencionado na introdução, devido à ocorrência de migração anterior à fragmentação a posição das ligações duplas só foi possível pela utilização de padrões e execução de co-eluições.

A tabela 2.1.0 descreve a identidade dos picos. Nela estão assinalados os compostos para os quais não foi possível obter padrão.

Tabela. **2.1.0** Composição do medronho em Ésteres de Ácidos Carboxílicos, (Fracção Neutra, FVI). Compostos identificados por GC-MS(ITD). Identidade dos picos assinalados na figura 2.1.2.

Pico Nº	Compostos Identificados		*m/z* (int. rel. %)
1	**Heptanoato de Metilo** (C7:0) *Enantato de Metilo*		**144**(M^+)(12), 129(8), 115(2), 101(10), 87(41), 74(100), 59(11), 55(32), 43(61), 41(56)
2	**Octanoato de Metilo** (C8:0) *Caprilato de Metilo*		**158**(M^+)(13), 143(10), 129(6), 127(21), 115(2), 101(11), 87(40), 74(100), 59(38), 57(29), 55(32), 43(34), 41(47)
3	**Cinamato de Metilo**		**162**(M^+)(41), 161(33), 131(100), 117(3), 103(88), 102(28), 91(9), 77(61), 63(11), 51(48), 44(33)
4	**Nonanoato de Metilo** (C9:0) *Pelargonato de Metilo*		**172**(M^+)(22), 157(2), 143(11), 141(16), 115(3), 101(12), 87(39), 74(100), 59(14), 57(8), 55(32), 43(50), 41(45)
5	**Decenoato de Metilo** (C10:1)	a)	**184**(M^+)(6), 152(2), 130(3), 123(7), 110(11), 101(9), 97(12), 87(46), 83(35), 74(83), 69(53), 67(26), 55(100), 43(80), 41(77)
6	**Decanoato de Metilo** (C10:0) *Caproato de Metilo*		**186**(M^+)(8), 155(13), 143(18), 129(6), 115(2), 101(10), 87(39), 74(100), 57(43), 55(32), 43(58), 41(54)
7	**Undecanoato de Metilo** (C11:0)		**200**(M^+)(11), 169(4), 157(12), 143(14), 129(6), 115(4), 101(11), 87(54), 75(28), 74(100), 59(16), 57(14), 55(46), 43(71), 41(73)
8	**Dodecanoato de Metilo** (C12:0) *Laurato de Metilo*		**214**(M^+)(8), 185(2), 171(15), 157(9), 143(14), 129(9), 115(8), 101(9), 97(1), 87(56), 74(100), 69(16), 57(18), 55(39), 43(63), 41(72)
9	**Tetradecanoato de Metilo** (C14:0) *Miristato de Metilo*		**242**(M^+)(9), 213(3), 199(17), 185(5), 157(9), 143(23), 129(8), 115(4), 111(4), 101(11), 87(64), 83(13), 75(17), 74(100), 69(16), 55(46), 43(58), 41(66)
10	**Pentadecanoato de Metilo** (C15:0)		**256**(M^+)(8), 227(3), 213(9), 199(2), 185(4), 157(10), 143(18), 129(8), 115(2), 111(4), 101(12), 87(61), 74(100), 57(17), 55(38), 43(60), 41(68)

Tabela. **2.1.0** Composição do medronho em Ésteres de Ácidos Carboxílicos, (Fracção Neutra, FVI). Compostos identificados por GC-MS(ITD). Identidade dos picos assinalados na figura 2.1.2. (Continuação).

Pico Nº	Compostos Identificados		*m/z* (int. rel. %)
11	**Decanoato de hexilo** *Caproato de Hexilo*		**256**(M^+)(7), 213(3), 199(2), 185(3), 173(61), 155(8), 140(11), 129(4), 115(4), 112(5), 111(9), 97(16), 87(8), 85(9), 83(26), 71(25), 70(31), 69(26), 57(88), 55(56), 43(100), 41(41)
12	**Tetradecanoato de Etilo** (C14:0) *Miristato de Etilo*		**256**(M^+)(10), 227(2), 213(18), 199(8), 171(4), 157(21), 143(5), 123(3), 115(6), 110(4), 101(77), 88(100), 73(38), 69(25), 57(21), 55(56), 43(57), 41(45)
13	**Hexadecatrienoato de Metilo** (C16:3)	a)	**264**(M^+)(5), 235(2), 221(1), 167(2), 151(6), 138(2), 127(6), 125(4), 111(5), 97(11), 95(10), 87(44), 83(40), 79(38), 74(85), 69(31), 67(49), 57(34), 55(100), 43(66), 41(82)
14	**Pentadecatrienoato de Etilo** (C15:3)	a)	**264**(M^+)(4), 235(1.5), 221(1), 212(1), 177(3), 171(1.5), 128(4), 123(7), 121(5), 111(6), 101(51), 88(69), 83(45), 81(39), 69(58), 67(49), 57(33), 55(100), 43(61), 41(76)
15	**Hexadecanoato de Metilo** (C16:0) *Palmitato de Metilo*		**270**(M^+)(9), 241(4), 227(15), 213(3), 199(7), 185(7), 171(9), 157(6), 143(28), 129(6), 115(2), 101(11), 87(47), 75(19), 74(100), 69(20), 57(18), 55(44), 43(68), 41(73)
16	**Hexadecenoato de Metilo** (C16:1)	a)	**268**(M^+)(5), 236(4), 214(2), 194(3), 180(5), 166(3), 164(5), 147(4), 143(6), 123(9), 110(11), 109(4), 97(12), 95(6), 87(51), 83(35), 81(15), 75(21), 74(73), 69(54), 67(65), 57(28), 55(100), 43(64), 41(49)
17	**Hexadecanoato de Etilo** (C16:0) *Palmitato de Etilo*		**284**(M^+)(18), 255(3), 241(17), 227(4), 213(9), 199(8), 185(10), 171(7), 157(23), 143(12), 129(8), 115(11), 101(69), 89(15), 88(100), 83(18), 73(41), 71(8), 70(26), 69(26), 57(25), 55(56), 43(60), 41(91)
18	**Heptadecanoato de Metilo** (C17:0) *Margaroato de Metilo*		**284**(M^+)(12), 255(4), 241(11), 199(13), 185(14), 171(6), 157(8), 143(23), 129(12), 115(4), 101(11), 87(68), 74(100), 55(57), 43(92), 41(89)
19	**Octadecatrienoato de Metilo** (C18:3) *Linolenato de Metilo* (*n* = 9,12,15)		**292**(M^+)(8), 263(5), 249(4), 236(9), 223(5), 191(8), 178(4), 164(9), 163(7), 151(2), 149(10), 137(10), 135(13), 123(8), 121(12), 109(21), 95(52), 81(81), 79(100), 67(96), 55(67), 43(47), 41(99)
20	**Octadecadienoato de Metilo** (C18:2) *Linoleato de Metilo* (*n* = 9,12)		**294**(M^+)(6), 263(8), 262(9), 245(4), 220(3), 191(3), 178(10), 164(11), 149(15), 135(22), 121(16), 109(31), 95(69), 81(100), 69(8), 67(65), 55(21), 43(18), 41(40)
21	**Octadecenoato de Metilo** (C18:1) *Oleato de Metilo*		**296**(M^+)(10), 264(14), 242(4), 222(6), 199(8), 180(13), 166(4), 152(8), 143(12), 123(10), 110(13), 97(12), 87(56), 83(32), 74(93), 69(63), 57(28), 55(100), 43(80), 41(78)
22	**Heptadecanoato de Etilo** (C17:0) *Margaroato de Etilo*		**298**(M^+)(18), 269(6), 255(10), 241(7), 227(3), 213(8), 199(9), 185(10), 171(9), 157(25), 143(12), 129(9), 115(13), 101(63), 89(12), 88(100), 83(17), 73(41), 57(26), 55(44), 43(52), 41(82)
23	**Octadecanoato de Metilo** (C18:0) *Estearato de Metilo*		**298**(M^+)(12), 269(6), 255(19), 241(6), 227(3), 213(9), 199(13), 185(8), 171(6), 157(6), 143(31), 129(11), 115(5), 101(14), 87(73), 74(100), 57(24), 55(52), 43(94), 41(85)
24	**Nonadecadienoato de Metilo** (C19:2)	a)	**308**(M^+)(5), 279(1), 262(7), 245(2), 243(1), 220(2), 191(3), 178(8), 164(11), 150(13), 149(14), 137(10), 135(20), 123(14), 121(15), 109(31), 107(12), 95(58), 81(100), 67(64), 55(20), 53(11), 43(18), 41(41)

Tabela. **2.1.0** Composição do medronho em Ésteres de Ácidos Carboxílicos, (Fracção Neutra, FVI). Compostos identificados por GC-MS(ITD). Identidade dos picos assinalados na figura 2.1.2. (Continuação).

Pico Nº	Compostos Identificados		*m/z* (int. rel. %)
25	**Octadecenoato de Etilo** (C18:1) *Oleato de Etilo*		**310**(M^+)(6), 284(5), 265(7), 264(11), 245(5), 222(6), 180(13), 166(11), 155(15), 137(13), 135(20), 123(12), 111(16), 101(53), 95(35), 88(86), 83(65), 69(42), 67(29), 57(36), 55(100), 43(32), 41(41)
26	**Octadecanoato de Etilo** (C18:0) *Estearato de Etilo*		**312**(M^+)(10), 283(7), 269(13), 255(5), 241(6), 227(5), 213(8), 199(8), 185(10), 171(6), 157(22), 143(13), 129(10), 115(14), 101(59), 89(15), 88(100), 73(38), 57(26), 55(56), 43(53), 41(82)
27	**Nonadecanoato de Metilo** (C19:0)		**312**(M^+)(8), 281(3), 269(12), 255(5), 241(5), 213(3), 199(12), 185(13), 171(5), 157(8), 143(22), 129(13), 115(6), 101(17), 87(68), 75(20), 74(100), 69(19), 57(27), 55(56), 43(63), 41(61)
28	**Eicosatrienoato de Metilo** (C20:3)	a)	**320**(M^+)(5), 291(2), 277(1), 222(3), 177(3), 171(1), 163(2), 150(9), 141(2), 123(7), 121(5), 115(1), 107(4), 97(13), 95(11), 93(2), 87(54), 83(16), 81(45), 80(38), 75(24), 74(85), 67(49), 69(31), 59(13), 55(100), 43(73), 41(89)
29	**Eicosadienoato de Metilo** (C20:2)	a)	**322**(M^+)(3), 293(3), 277(4), 276(5), 259(2), 205(1), 191(2), 178(5), 164(7), 163(6), 150(6), 149(7), 135(8), 123(11), 121(13), 110(12), 109(24), 107(13), 95(51), 81(100), 67(94), 55(38), 53(11), 43(18), 41(66)
30	**Eicosenoato de Metilo** (C20:1)	a)	**324**(M^+)(3), 295(4), 267(3), 221(2), 205(1), 197(2), 181(3), 171(1), 143(2), 141(3), 137(4), 123(8), 110(10), 101(9), 97(23), 87(33), 84(48), 83(34), 81(52), 75(21), 74(67), 69(61), 67(82), 57(63), 55(100), 43(80), 41(78)
31	**Eicosanoato de Metilo** (C20:0) *Araquidato de Metilo*		**326**(M^+)(17), 283(13), 255(3), 227(12), 213(2), 199(8), 171(5), 157(6), 143(24), 129(11), 101(12), 87(71), 74(100), 69(30), 57(34), 55(6), 43(96), 41(98)
32	**Eicosanoato de Etilo** (C20:0) *Araquidato de Etilo*		**340**(M^+)(7), 311(2), 297(10), 283(3), 255(4), 227(6), 213(2), 199(7), 185(10), 171(5), 157(6), 143(13), 129(5), 101(65), 88(100), 73(38), 57(23), 55(62), 43(76), 41(88)
33	**Heneicosanoato de Metilo** (C21:0)		**340**(M^+)(5), 283(3), 255(3), 227(10), 213(2), 199(8), 185(9), 171(6), 157(4), 143(15), 129(6), 101(11), 87(66), 83(17), 74(100), 69(30), 57(33), 55(54), 43(84), 41(86)
34	**Docosenoato de Metilo** (C22:1)	a)	**352**(M^+)(3), 321(3), 320(8), 309(1), 278(2), 263(2), 250(2), 236(1), 208(1), 180(2), 166(3), 152(2), 143(3), 141(4), 123(6), 121(4), 115(5), 97(13), 87(53), 83(58), 81(45), 80(38), 74(56), 69(30), 67(78), 57(33), 55(100), 43(73), 41(84)
35	**Docosanoato de Metilo** (C22:0) *Behenato de Metilo*		**354**(M^+)(28), 325(7), 311(11), 279(18), 255(9), 241(5), 227(7), 213(11), 199(14), 171(4), 168(8), 157(5), 150(20), 143(13), 129(14), 115(23), 101(29), 87(49), 75(13), 74(100), 55(6)
36	**Docosanoato de Etilo** (C22:0) *Behenato de Etilo*		**368**(M^+)(4), 339(2), 325(8), 311(1), 297(3), 283(2), 255(3), 227(4), 213(2), 199(3), 185(5), 171(3), 157(4), 143(12), 129(4), 115(5), 101(56), 88(100), 73(34), 69(29), 57(33), 55(61), 43(73), 41(86)
37	**Tetracosanoato de Metilo** (C24:0) *Lignocerato de Metilo*		**382**(M^+)(21), 339(9), 325(2), 283(4), 241(3), 227(6), 199(10), 185(3), 143(31), 129(11), 115(5), 101(16), 87(72), 75(38), 74(100), 69(33), 57(34), 55(62), 43(85), 41(94)

Tabela. **2.1.0** Composição do medronho em Ésteres de Ácidos Carboxílicos, (Fracção Neutra, FVI). Compostos identificados por GC-MS(ITD). Identidade dos picos assinalados na figura 2.1.2. (Continuação).

Pico Nº	Compostos Identificados		*m/z* (int. rel. %)
38	**Pentacosatrienoato de Metilo** (C25:3)	a)	**390**(M^+)(4), 361(2), 347(1), 334(2), 293(2), 265(1), 247(1), 165(2), 151(5), 150(4), 141(3), 125(2), 123(7), 107(4), 97(12), 95(10), 87(53), 85(26), 83(45), 74(86), 71(15), 69(31), 67(49), 57(33), 55(100), 43(73), 41(84)
39	**Pentacosanoato de Metilo** (C25:0)		**396**(M^+)(1), 367(3), 353(3), 339(1), 325(1), 283(2), 255(3), 227(5), 213(3), 199(4), 185(6), 171(3), 157(5), 143(4), 129(5), 115(6), 101(11), 87(46), 75(25), 74(100), 69(30), 57(33), 55(38), 43(46), 41(59)
40	**Hexacosanoato de Metilo** (C26:0) *Ceroato de Metilo*		**410**(M^+)(0.5), 381(1), 367(3), 339(1), 283(3), 255(2), 227(3), 213(2), 199(3), 185(5), 171(3), 157(2), 143(9), 129(3), 115(4), 101(11), 87(66), 75(25), 74(100), 57(34), 55(54), 43(84), 41(86)
41	***Triterpenóides***		...

a) compostos cuja identidade não pode ser confirmada com amostra autêntica.

O esquema da figura 2.1.3 representa as fragmentações mais comuns para os ésteres de ácidos carboxílicos saturados lineares. Os seus espectros de impacto electrónico (EIMS) são dominados pelas perdas das cadeias carbonadas R e/ou R_1, sendo preferencial a perda de R_1 (éster), sendo também a perda do álcool $[R_1OH]^+$, um fragmento importante, esquema (**a**) da figura 2.1.3. Os ésteres metílicos com mais de 3 átomos de carbono na sua cadeia carbonada R, possuem espectros cuja característica principal consiste na presença do ião *m/z* 74 (fragmento (***e***), figura 2.1.3) como pico base: trata-se da clivagem por rearranjo de *McLafferty*[92] (McL) (compostos 1, 2, 4, 6-10, 15, 18, 23 (fig. 2.1.4**C**), 27 (fig. 2.1.4**F**), 31 (fig. 2.1.4**G**), 33, 35 (fig. 2.1.4**H**), 37, 39 e 40 da tabela 2.1.0).

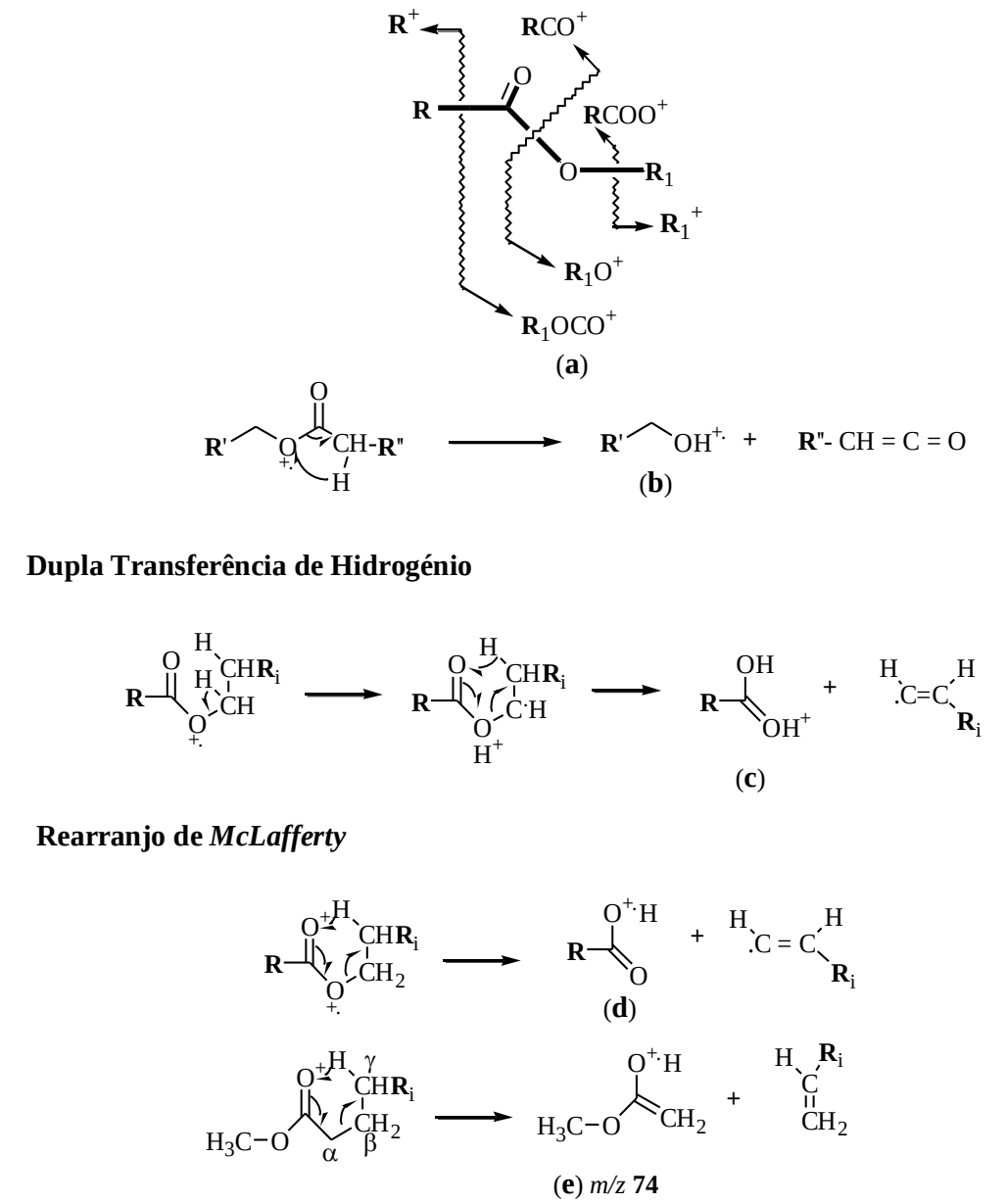


Figura **2.1.3** Esquema geral de fragmentação de ésteres de ácidos carboxílicos saturados lineares.[92]

Nos ésteres etílicos também ocorre o mesmo tipo de rearranjo correspondendo o fragmento ao ião $[CH_2{=}C(OH)OCH_2CH_3]^+$ a *m/z* 88 (compostos 12, 14, 17, 22, 26 (fig. 2.1.4**E**), 32 e 36 da tabela 2.1.0).[92]

Os ésteres metílicos insaturados (compostos 5, 13, 16, 19 (fig. 2.1.4**B**), 20, 21, 29, 30, 34 e 38 da tabela 2.1.0), ao contrário dos saturados, não possuem nos seus espectros de massa um ião fragmento diagnóstico tão característico. No entanto, o ião *m/z* 55 (fragmento $[C_nH_{2n-1}]^+$, n = 4) é normalmente usado como primeira aproximação. Este ião, associado à presença de iões fragmento típicos de cadeias lineares insaturadas $[CH_3(CH_2)_n(CH{=}CH)_y]^+$ e ao seu ião molecular $[M]^{+\cdot}$, são utilizados na sua identificação.[92,298,299]

O composto 11 foi identificado pelo seu padrão de fragmentação em MS. Possuia como ião de massa mais elevada *m/z* 256 (7) e um ião intenso a *m/z* 173 (61) (fragmento (**c**), figura 2.1.3) proveniente do rearranjo de transferência dupla de hidrogénio (DHT) e característico de ésteres derivados do ácido decanóico. Identificou-se este composto como sendo o decanoato de hexilo. A sua identidade foi confirmada com padrão sintetizado.

O composto 3 foi igualmente identificado pelo seu padrão de fragmentação em MS. O ião base *m/z* 131 juntamente com o ião *m/z* 77, indicaram a presença de um composto aromático derivado do ácido cinâmico. Os iões *m/z* 103 $[M\text{-}COOCH_3]^+$ e *m/z* 131 $[M\text{-}OCH_3]^+$ indicaram tratar-se do cinamato de metilo (figura 2.1.4**A**). A utilização de padrão confirmou a sua identificação. Refira-se que se trata de um composto comum nos frutos.[300]

Na figura 2.1.4 apresenta-se espectros de massa de alguns dos compostos identificados na fracção e descritos na tabela 2.1.0.

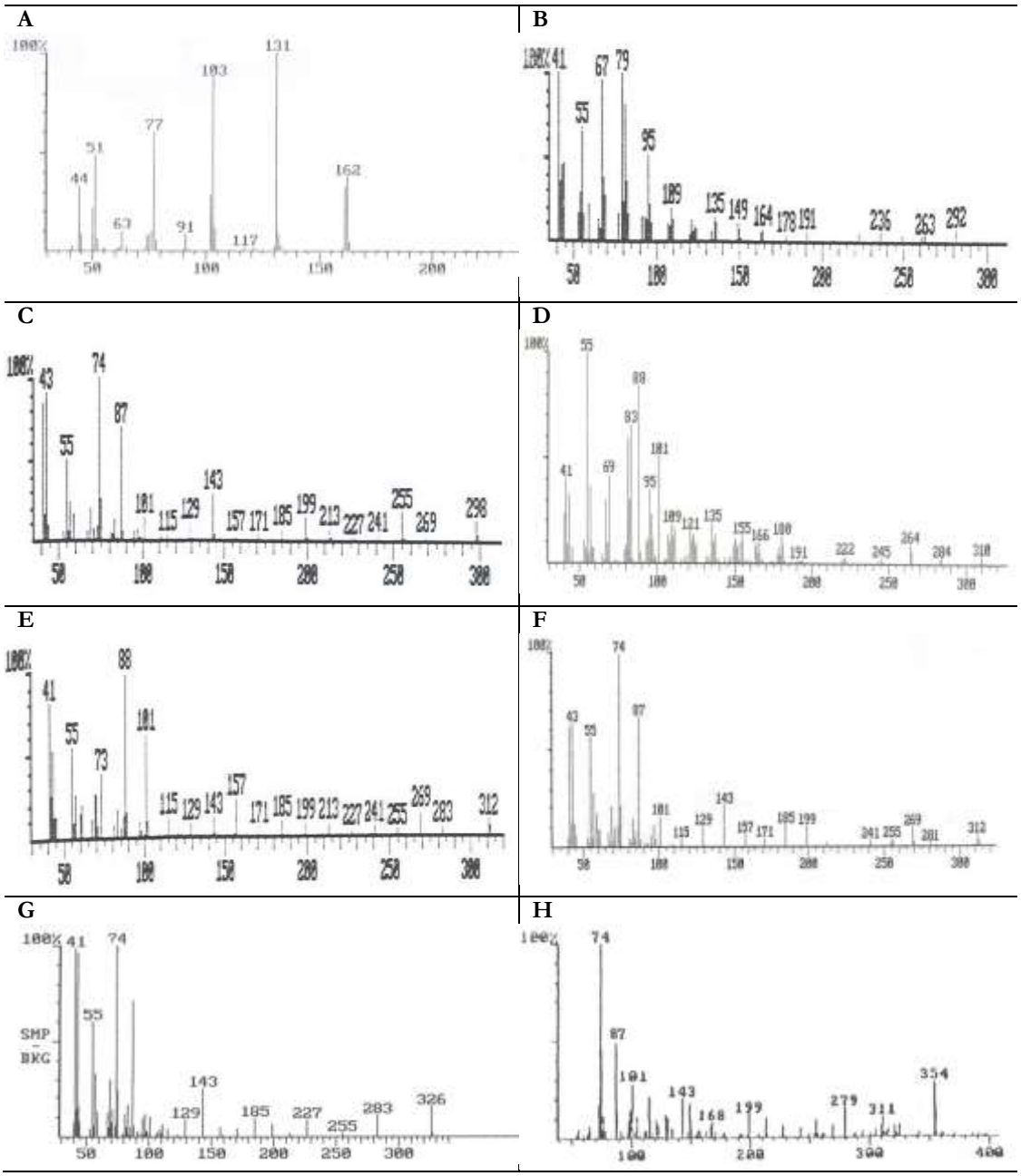


Figura **2.1.4** Espectros de massa GC-MS dos compostos: **A**– Cinamato de Metilo (**3**), **B**– Linolenato de Metilo (**19**), **C**– Octadecanoato de Metilo (**23**), **D**– Octadecenoato de Etilo (**25**), **E**– Octadecanoato de Etilo (**26**), **F**– Nonadecanoato de Metilo (**27**), **G**– Eicosanoato de Metilo (**31**) e **H**– Docosanoato de Metilo (**35**) da figura 2.1.2. Identificação de acordo com a tabela 2.1.0.

Os resultados obtidos estão de acordo com os estudos já descritos da composição de outros frutos.[300-304]

Tal como já foi mencionado, a parte final dos cromatogramas, mostrou ser constituída por triterpenóides. Estes compostos foram analisados mais detalhadamente em separado (sub-capítulo 2.2.0).

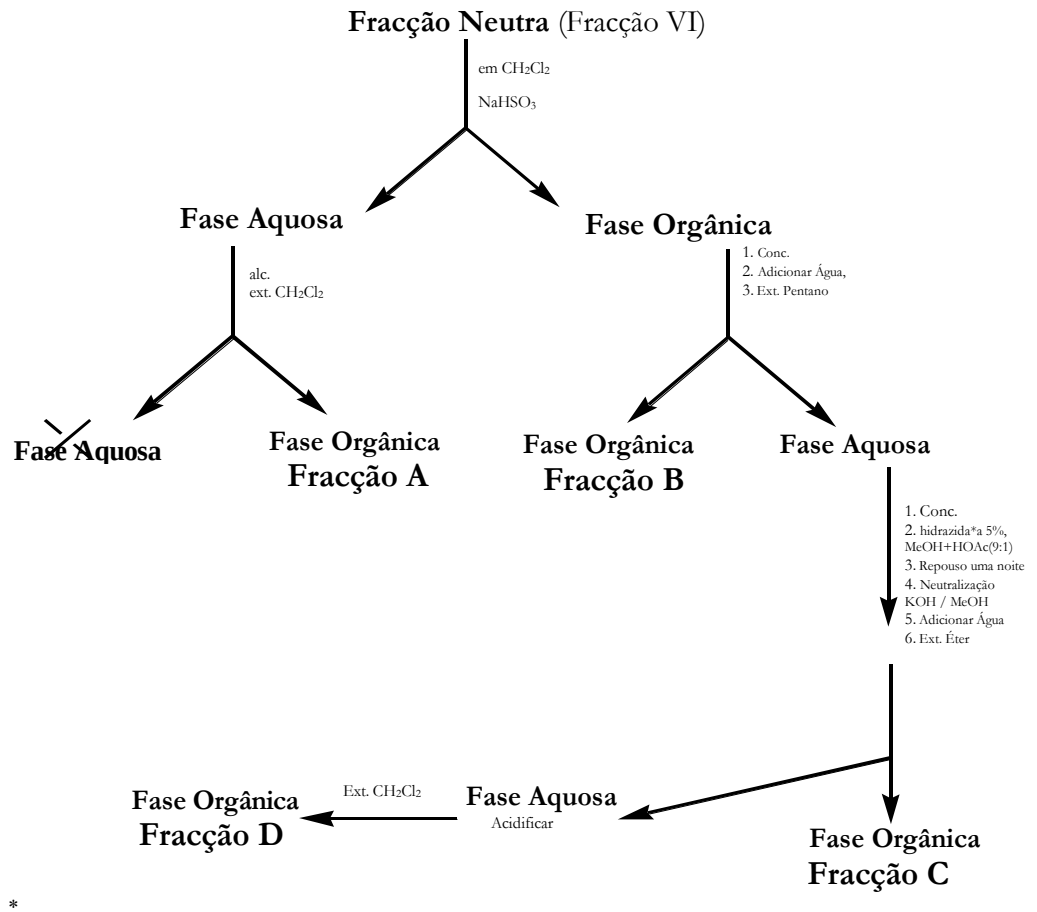
2.1.2 Outros Compostos

A fracção anterior, como foi referido, mostrou-se dominada por ésteres metílicos e etílicos de cadeia carbonada longa, saturados e insaturados, e por triterpenóides. Tratava-se contudo de uma fracção complexa.

Recorreu-se então ao seu sub-fraccionamento, utilizando-se um esquema modificado de extracção líquido-líquido baseado no método de *Wheeler*.[218,305]

De acordo com este esquema extractivo (Esquema 2.1.1) obtiveram-se quatro sub-fracções: **A**, **B**, **C** e **D**. Os resultados obtidos encontram-se sumariamente referidos da tabela 2.1.1.

Pretendia-se com este esquema de fraccionamento, simplificar o estudo da fracção pela obtenção de sub-fracções de menor complexidade e, alguma informação química. Utilizou-se primeiramente o bissulfito de sódio para extracção de aldeídos. O extracto (fracção **A**), possuía intenso aroma a benzaldeído. Contudo no dia seguinte verificou-se alteração do aroma e a análise por GC/GC-MS não permitiu a identificação de nenhum aldeído, tendo sido identificado após metilação, o ácido correspondente, ácido benzóico.



Esquema **2.1.1** Sub-fraccionamento da fracção neutra (fracção VI) utilizando o método de *Wheeler* [305] modificado.

As fracções **C** e **D** foram obtidas após reacção com a hidrazida, com o objectivo de separar as cetonas dos restantes compostos. Este resultado não foi obtido, tendo sido as cetonas identificadas na fracção **C** e não na fracção **D**, conforme era esperado. Contudo e surpreendentemente obtiveram-se duas fracções enriquecidas em compostos saturados (fracção **C**) e insaturados (fracção **D**).

[*] Cloreto de (Carboximetil)trimetilamónio hidrazida, ($H_2NNHCOCH_2N(CH_3)_3Cl$)

Tabela **2.1.1** Composição das fracções obtidas por sub-fraccionamento da fracção neutra.

Fracção	Composição dominante
A	... (*)
B	Terpenos(**) (predomínio de Diterpenos)
C	Ésteres metílicos saturados (1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18, 23, 27, 31, 33, 35 e 39),
	Hidrocarbonetos (***a, b***), Cetonas (***c, d***)
	Triterpenos Pentacíclicos, β-Sitosterol
D	Ésteres metílicos insaturados (13, 16, 19, 20, 21, 29 e 30), Ácidos carboxílicos, Triterpenos Pentacíclicos

(*) - Vestígios de aldeídos, que se degradaram antes da análise.

(**) - Estes compostos foram analisados mais detalhadamente em separado (sub-capítulo 2.5.0).

Para além do grande domínio dos ésteres, referidos anteriormente, revelou-se a existência de outros compostos, referidos nas tabelas 2.1.2 e 2.1.3.

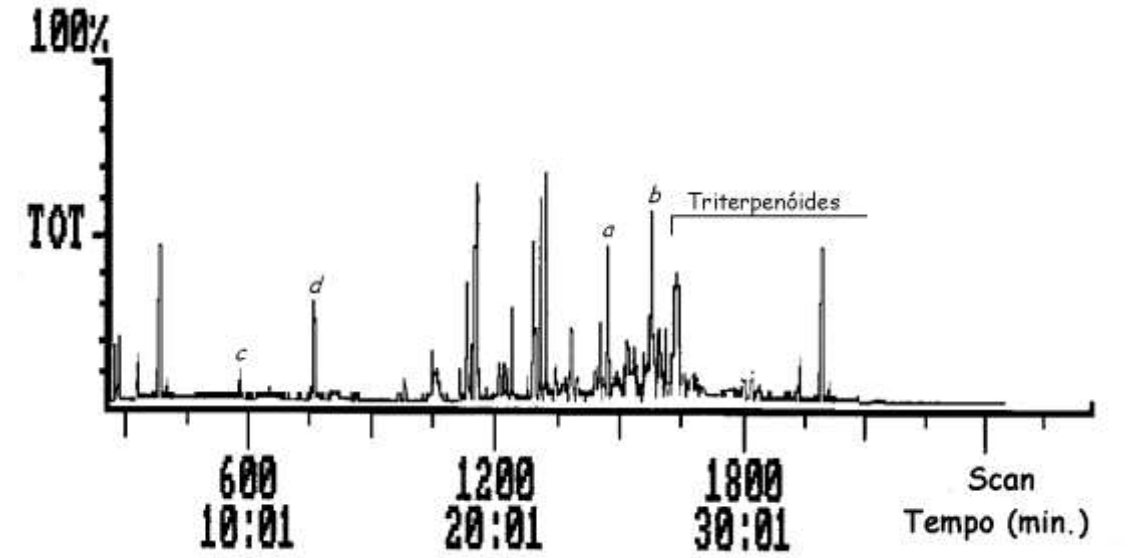


Figura **2.1.5** Traçado de corrente iónica total (TIC) obtido por GC-MS(ITD) a partir do sub-extracto **C** dos frutos de *Arbutus unedo*. Forno: 120 ºC - 7º/min. - 300 ºC (25 min.), (ver Parte Experimental). Identidade dos picos de acordo com a tabela 2.1.2.

Tabela. **2.1.2** Compostos minoritários (sub-fracção **C**) identificados na fracção neutra (fracção VI) do fruto de *Arbutus unedo*. Identidade dos picos assinalados na figura 2.1.5.

Pico	Compostos Identificados		***m/z*** (int. rel. %)
a	**Triacontano** ($C_{30}H_{62}$)		**422**(M^+)(0.3), 365(0.5), 351(2), 337(0.5), 323(1), 309(1), 295(1.5), 281(2), 267(0.5), 253(1), 239(2), 225(1), 211(1.5), 197(2), 183(1.5), 169(2), 155(3), 141(3), 127(4), 113(7), 111(5), 99(13), 97(10), 85(51), 83(20), 71(78), 69(18), 57(100), 55(30)
b	**Dotriacontano** ($C_{32}H_{66}$)		**450**(M^+)(2), 407(0.4), 393(0.3), 379(1), 365(0.5), 351(2), 337(1), 323(2), 309(1), 295(1.5), 281(3), 267(0.5), 253(2), 239(2), 225(1), 211(1), 197(2), 183(1.5), 169(2), 155(3), 141(3.5), 127(4), 113(7), 99(14), 97(11), 85(50), 83(19), 71(75), 69(18), 57(100), 55(31)
c	**2-Heneicosanona** ($C_{21}H_{42}O$)	a)	**310**(M^+)(6), 295(2.5), 281(1.5), 267(1), 252(1), 239(1), 224(1.4), 210(1), 199(1.2), 181(1.5), 167(2), 155(4), 153(2), 139(3), 123(11), 111(6), 109(7), 97(11), 95(14), 87(12), 85(51), 83(70), 71(51), 69(26), 67(21), 59(93), 58(100), 55(59)
d	**2-Pentacosanona** ($C_{25}H_{50}O$)	a)	**366**(M^+)(44), 351(11), 323(3), 309(3), 280(6), 251(4), 237(4), 223(3), 207(7), 193(5), 181(3), 167(5), 151(7), 149(13), 139(5), 137(6), 125(14), 123(15), 111(22), 109(20), 97(41), 95(29), 87(21), 85(69), 83(87), 71(80), 69(56), 67(36), 59(94), 58(100), 55(60)

a) Composto cuja identidade não foi confirmada com amostra autêntica.

A sub-fracção **C** para além dos ésteres metílicos saturados já anteriormente identificados, incluía na sua composição hidrocarbonetos (compostos ***a*** e ***b***) e cetonas (compostos ***c*** e ***d*** da figura 2.1.5) (ver Apêndice-3). A fragmentação mais característica para as metilcetonas corresponde aos iões *m/z* 43 $[COCH_3]^+$ (normalmente pico base) e *m/z* 58 $[CH_2{=}C(OH)CH_3]^+$ (segundo ião mais intenso) (compostos ***c*** e ***d*** da tabela 2.1.2), proveniente da clivagem por rearranjo de *McLafferty*.[92] Contudo, os espectros foram adquiridos a partir de *m/z* 45 pelo que o ião *m/z* 58 se tornou o pico base.

A sub-fracção **D** incluía também na sua composição compostos polares (ácidos carboxílicos) livres. Devido à forma não-gaussiana ("*fronting*") dos picos aquando da sua análise em natureza, utilizou-se a derivatização (trimetilsililação) para a sua melhor separação e identificação.

Na figura 2.1.6 mostra-se o cromatograma de GC-MS(ITD) do extracto derivatizado por trimetilsililação (TMSi); assinalam-se os éteres trimetilsilílicos dos ácidos carboxílicos, sendo a identidade dos picos concordante com a tabela 2.1.3.

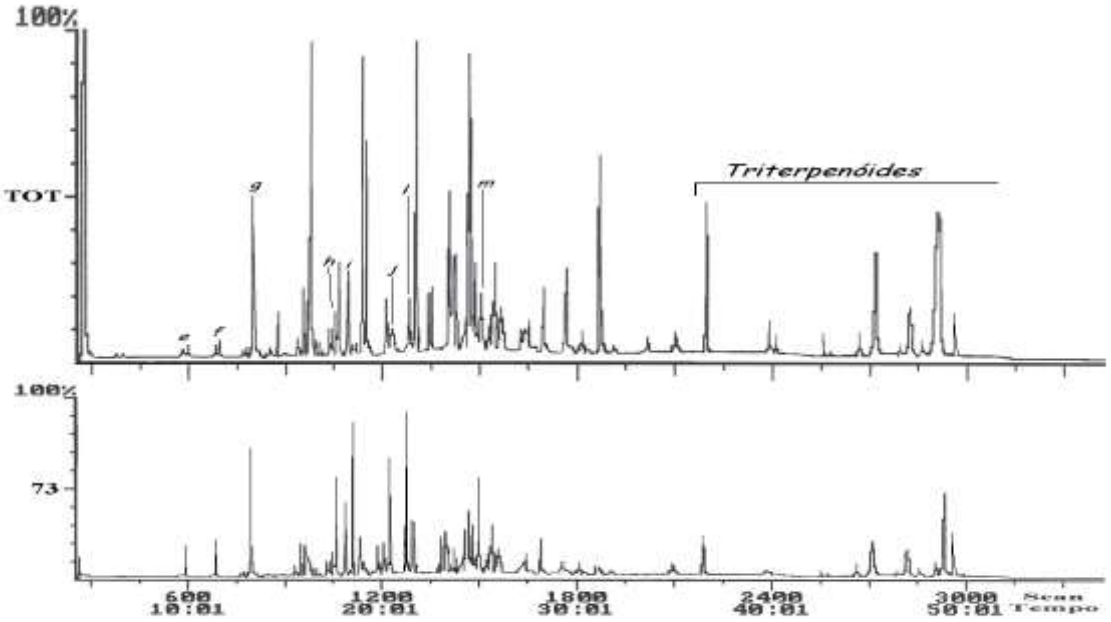


Figura **2.1.6** Traçado de corrente iónica total (TIC) e MIM (*m/z* **73**) obtido por GC-MS(ITD) a partir do sub-extracto **D** trimetilsililado. Forno: 120º - 7º/min. – 300 ºC (25 min.), (ver Parte Experimental). Identidade dos picos de acordo com a tabela 2.1.3.

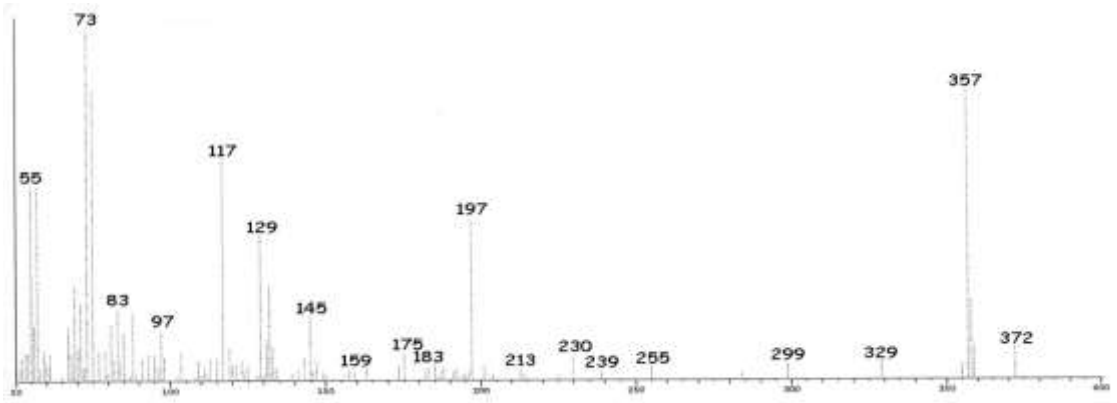
Os picos foram identificados pela análise dos seus espectros de massa (assinale-se todos possuírem ião molecular, $M^{+\cdot}$) e por comparação dos seus tempos de retenção com os de padrões (com excepção dos compostos ***c***, ***d*** e ***m***).

Tabela. **2.1.3** Ácidos carboxílicos identificados na sub-fracção **D**. Componentes identificados por GC-MS na forma de éteres trimetilsilílicos. Identidade dos picos assinalados na figura 2.1.6.

Pico	Compostos Identificados	*m/z* (int. rel. %)
e	**Ácido Octanóico** (C8:0) *Ácido Caprílico*	**216**(M^+)(1), 202(4), 201(27), 187(1), 173(1.5), 157(2), 145(5), 132(12), 131(9), 129(10), 117(34), 109(1), 105(2), 75(94), 73(100), 69(3), 67(4), 61(9), 57(5), 55(15)
f	**Ácido Decanóico** (C10:0) *Ácido Cáprico*	**244**(M^+)(1), 230(5), 229(28), 217(1), 201(3), 185(2), 171(1), 159(2), 145(9), 132(19), 131(8), 129(12), 117(52), 105(2), 95(3), 81(4), 75(75), 73(100), 69(7), 67(2), 61(7), 55(15)
g	**Ácido Dodecanóico** (C12:0) *Ácido Laurico*	**272**(M^+)(4), 258(10), 257(52), 229(1.8), 213(2), 201(2), 185(1), 145(16), 132(39), 131(8), 129(25), 117(52), 104(13), 97(2), 95(2), 83(3), 71(82), 73(100), 69(7), 67(3), 61(7), 57(10), 55(24)
h	**Ácido Pentadecanóico** (C15:0)	**314**(M^+)(2), 300(19), 299(72), 283(2), 285(1), 269(3), 201(5), 185(3), 171(1), 159(3), 157(2), 145(25), 132(36), 131(8), 129(27), 117(70), 97(4), 95(4), 83(5), 81(4), 75(71), 73(100), 69(14), 67(5), 61(4), 57(13), 55(24)
i	**Ácido Hexadecanóico** (C16:0) *Ácido Palmítico*	**328**(M^+)(6), 314(19), 313(72), 285(3), 269(4), 201(6), 187(3), 159(3), 145(29), 132(40), 129(31), 117(74), 97(5), 95(5), 83(5), 75(71), 73(100), 69(14), 67(5), 61(4), 57(13), 55(24)
j	**Ácido Octadecenóico** (C18:1) *Ácido Oleico*	**354**(M^+)(7), 340(16), 339(63), 264(8), 212(9), 201(3), 199(6), 185(7), 180(6), 171(3), 147(9), 145(30), 132(21), 129(46), 123(7), 117(66), 109(9), 97(13), 95(15), 83(15), 81(21), 75(87), 73(100), 69(23), 67(21), 57(11), 55(44)
l	**Ácido Octadecanóico** (C18:0) *Ácido Esteárico*	**356**(M^+)(5), 341(19), 201(4), 145(33), 132(64), 129(31), 117(79), 97(5), 83(6), 75(74), 73(100), 69(12), 57(19), 55(31)
m	**2-Hidroxihexadecanoato de Etilo** a)	**328**(M^+)(6), 314(19), 313(72), 285(3), 269(4), 201(6), 187(3), 159(3), 145(29), 132(40), 129(31), 117(74), 97(5), 95(5), 83(5), 75(71), 73(100), 69(14), 67(5), 61(4), 57(13), 55(24)

a) Composto cuja identidade não foi confirmada com amostra autêntica.

No que respeita ao hidroxi-éster (composto ***m*** da tabela 2.1.3) o seu espectro de massa apresentou os seguintes iões: *m/z* 372 [M^+], *m/z* 357 [M-15], *m/z* 197 [M-175] [M-($CH_3CH_2OCOCHOSi(CH_3)_3$]$^+$, *m/z* 117 [$CH_3CH_2OCOCH(OH)CH_2$]$^+$ e *m/z* 73(100). O ião *m/z* 197 juntamente com o incremento da massa molecular do composto aquando da trimetilsililação, permitiram o diagnóstico e localização do grupo hidroxilo, tendo sido o composto tentativamente identificado como sendo o 2-hidroxihexanoato de etilo (figura 2.1.7).[92, 298]



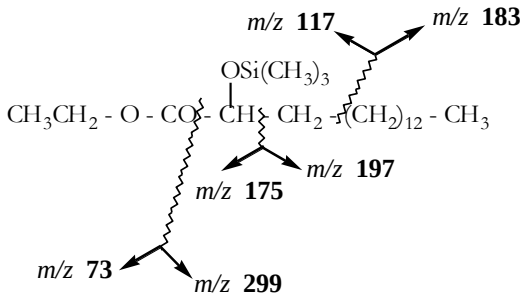


Figura **2.1.7** Espectro de massa GC-MS e esquema geral de fragmentação do 2-trimetilsililoxi-hexadecanoato de etilo (***m***) da figura 2.1.6.

2.2.0 Extracção Direccionada a Triterpenóides

Como se referiu em 2.1.0, a fracção neutra (fracção VI), é fundamentalmente constituída por ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia carbonada longa e por triterpenóides. Para a identificação individual dos triterpenóides e devido ao interesse biológico associado a esta classe de compostos, efectuou-se uma extracção dirigida para obtenção de maior quantidade de triterpenóides.

A espectrometria de massa constituiu uma ferramenta essencial na elucidação estrutural dos triterpenóides uma vez que a presença de ligações duplas e outros grupos funcionais influenciam marcadamente a fragmentação.[271,272]

Com a fracção triterpenóide, utilizou-se o LC-MS sendo a interface o separador de feixe de partículas (PBS). O maior inconveniente da técnica consistiu no fluxo máximo permitido (1 ml/min.).[80,289,290] O ajuste da operacionalidade da interface (PBS) efectuou-se recorrendo ao detector evaporativo de dispersão de luz ELSD.[306-315] A analogia dos princípios operacionais deste detector torna-o muito útil no ajuste das condições operacionais da interface "*particle-beam*". Este detector, tido como universal, tem uma resposta mássica, sendo insensível a alterações do fluxo e de composição do eluente.[315,316]

2.2.1 Composição do Extracto Direccionado a Triterpenóides

A extracção especialmente dirigida a triterpenóides envolveu a extracção dos frutos liofilizados com acetona : H_2O (7 : 3).[221] O material solúvel em éter dietílico foi

cromatografado em coluna de sílica-gel de onde resultaram três fracções, assim compostas pela ordem de eluição:

Fracção	Composição dominante
1	Ésteres metílicos e etílicos de ácidos carboxílicos, Hidrocarbonetos e Colestano
2 (*dominante*)	Ésteres longos de ácidos carboxílicos, Triterpenóides (tetracíclicos e pentacíclicos)
3	Triterpenos pentacíclicos (mono-hidroxi ácidos)

Fracção 1: Esta fracção eluida com éter, era constituída fundamentalmente por ésteres metílicos e etílicos de ácidos carboxílicos de cadeia longa (sendo o estearato de metilo (C18:0) o éster dominante da fracção), para além de hidrocarbonetos. Os constituintes dominantes desta fracção foram já descritos em 2.1.1 (tabela 2.1.0). No entanto, nesta fracção, surgiu também um hidrocarboneto esteroídico. O seu espectro de massa de HRGC-MS mostrou um perfil de fragmentação compatível com o dos esteróides,[92,274] possuindo como ião de massa mais elevada *m/z* 372 (37), identificado como ião molecular $[M^+]$ e como pico base *m/z* 217, atribuído ao fragmento $[M\text{-}SC\text{-}42]^+$ por perda de $CH_2{=}CHCH_2\text{-}SC$, em que SC corresponde à cadeia lateral (figura 2.2.1); *m/z* 232 (12) surge por quebra no anel D, *m/z* 149 (49) por ruptura no anel C e *m/z* 357 (73), correspondente ao fragmento $[M\text{-}CH_3]^+$ (perda de um grupo metilo).[317]

A comparação com o tr obtido em GC, bem como com o espectro de massa de uma amostra natural autêntica obtido em idênticas condições experimentais, permitiu confirmar a estrutura: o composto foi identificado como 5α-Colestano (*2.2.4-1*) (ver Apêndice-1).

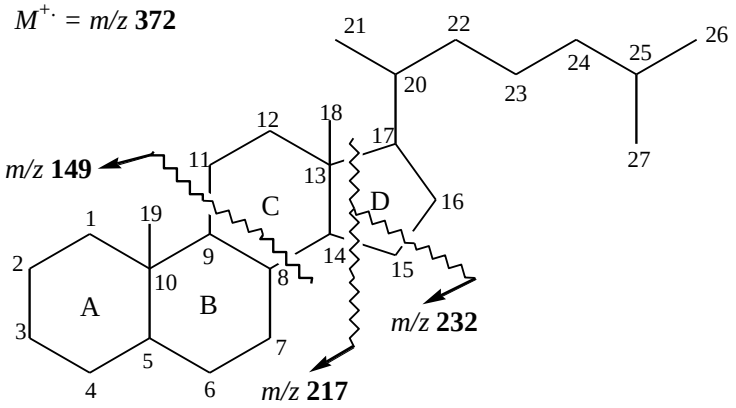


Figura **2.2.1** Esquema geral de fragmentação do 5α-Colestano.

Fracção 2: Esta fracção mostrou ser a fracção dominante e a mais complexa. Foi então refraccionada em coluna de sílica-gel, daí resultando quatro novas sub-fracções **A, B, C** e **D**, assim compostas pela ordem de eluição:

2A	Ésteres longos de ácidos carboxílicos
2B	Cetotriterpenóides e mono-hidroxitriterpenóides
2C	Mono-hidroxitriterpenóides e di-hidroxitriterpenóide
2D	Hidroxi-cetotriterpenóides e di-hidroxitriterpenóides

2.2.1.1 Ésteres Longos de Ácidos Carboxílicos

Fracção 2A: a análise por HPLC-PBMS desta sub-fracção mostrou ser a mesma constituída por ésteres longos de ácidos carboxílicos. Tratando-se de compostos lipídicos e, tendo em consideração a ordem de grandeza das suas massas moleculares,

foi tida como normal a sua presença num extracto direccionado a triterpenóides, também estes lípidos.

O cromatograma da figura 2.2.2 mostra o traçado de corrente iónica total (TIC) em HPLC-PBMS da sub-fracção **2A**. Da análise dos espectros de massa dos seis picos observados, verificou-se que estes constituíam duas séries homólogas de ésteres.

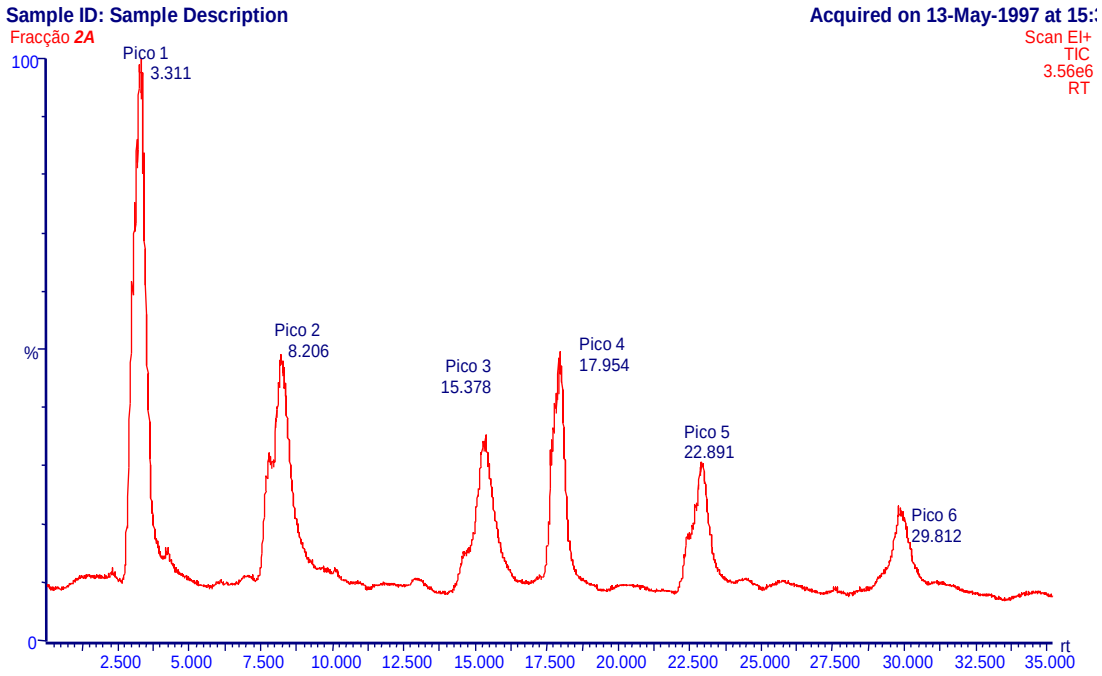


Figura **2.2.2** Traçado HPLC-PBMS da fracção **2A** (extracto neutro) dos medronhos. Condições experimentais: fluxo isocrático de 0,7 ml/min.; coluna *Lichrosorb* RP-18 (250 x 4 mm) (d_f = 5 μm); em condições isocráticas com Metanol: Água (0,1% ácido acético) (96:4). HPLC-PBMS, 10 scans/s (ver Parte Experimental).

Constatou-se que cada pico correspondia a uma mistura de dois compostos - dois ésteres longos de ácidos carboxílicos em C_8 e C_{10}. A figura 2.2.3 mostra os espectros desconvolucionados dos compostos do pico 2. Ambos os espectros de massa mostram como pico base o ião $[RCOOH_2]^+$. Este ião, como já foi anteriormente referido (fragmento (**c**), figura 2.1.3) é proveniente do rearranjo de transferência dupla de hidrogénio (DHT), intensificando-se com o aumento da cadeia alquílica do álcool e

originando fragmentos mais intensos do que os provenientes do rearranjo de *McLafferty*.[92]

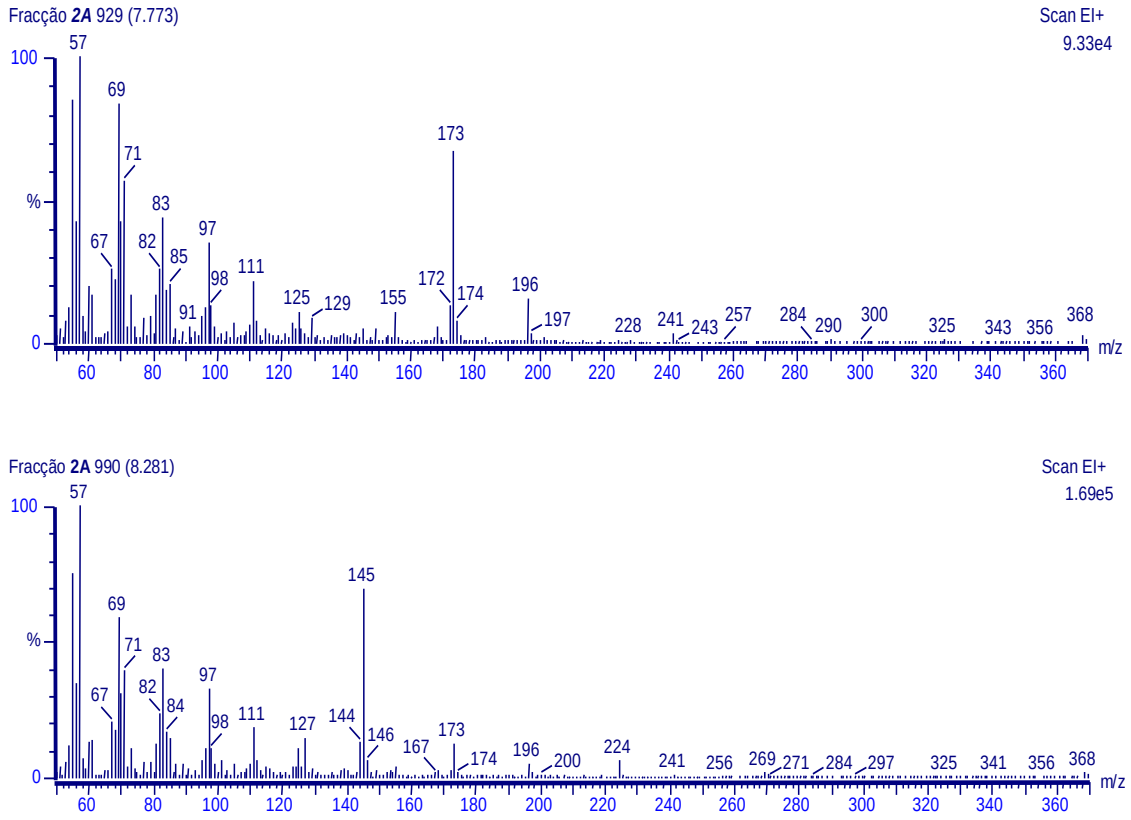


Figura **2.2.3** Espectros de massa HPLC-PBMS obtidos após desconvolução do **pico 2** (figura 2.2.2) da fracção ***2A*** (extracto neutro): Decanoato de tetradecilo (topo) e Octanoato de hexadecilo (baixo). Identificação de acordo com a tabela 2.2.3.

Este comportamento espectroscópico levou a que nos espectros os iões diagnóstico fossem: *m/z* 145, nos ésteres derivados do ácido octanóico e *m/z* 173, nos ésteres derivados do ácido decanóico, conforme exemplificado nas figuras 2.2.3 e 2.2.4.

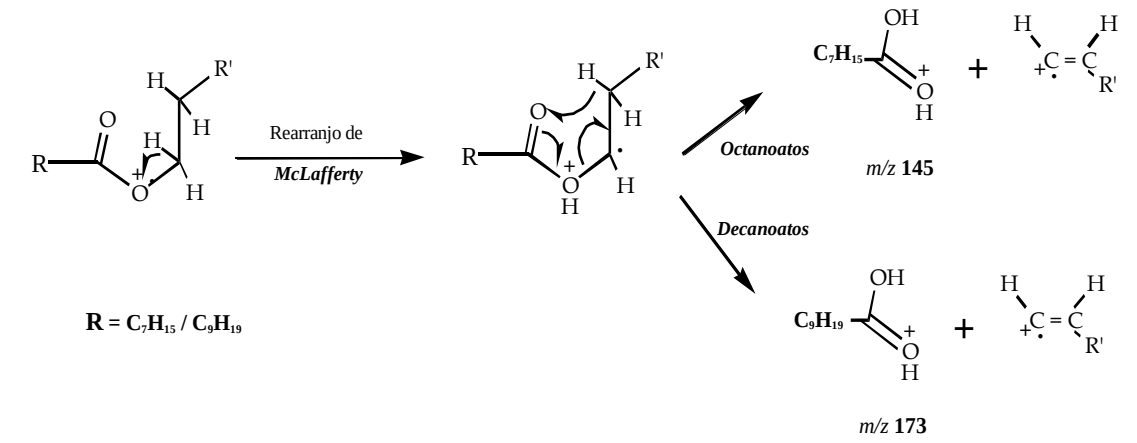


Figura **2.2.4** Esquema de fragmentação proposto para os ésteres longos dos ácidos octanóico e decanóico.

Como já foi mencionado, os seis picos correspondem a 6 pares de isómeros, não tendo sido possível a sua adequada resolução por HPLC-PBMS (figura 2.2.5.), devido às limitações desta técnica.

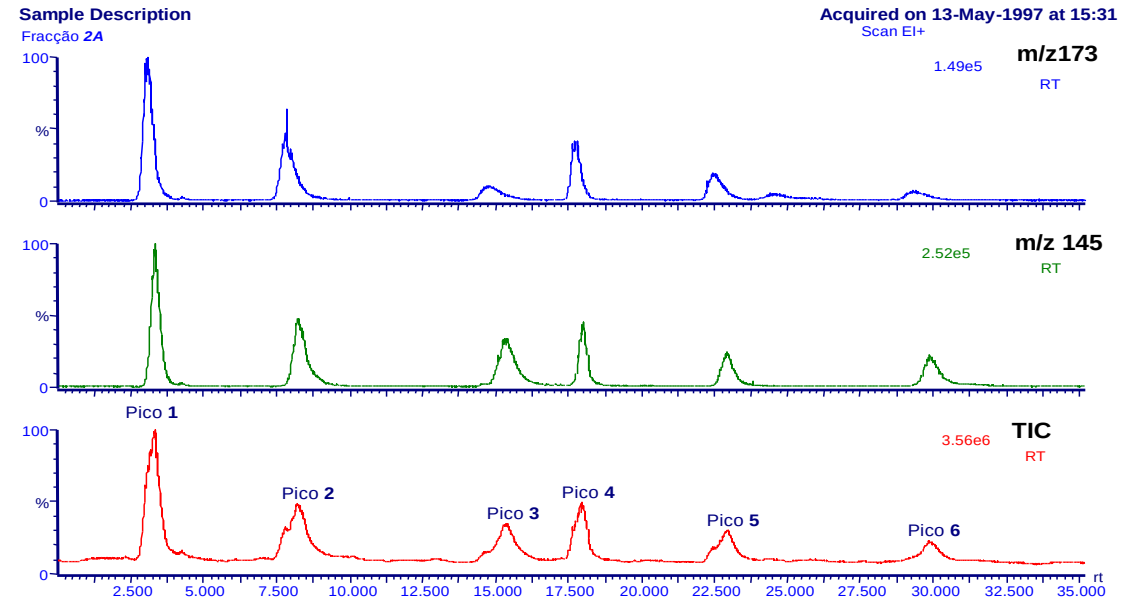


Figura **2.2.5** HPLC-PBMS: TIC e MIM (iões *m/z* **173** e *m/z* **145**) da sub-fracção **2A**. Picos: **1**- Decanoato de dodecilo/Octanoato de tetradecilo; **2**- Decanoato de tetradecilo/Octanoato de hexadecilo; **3**- Decanoato de hexadecilo/Octanoato de octadecilo; **4**- Decanoato de heptadecilo/Octanoato de nonadecilo; **5**- Decanoato de octadecilo/Octanoato de eicosanilo; **6**- Decanoato de eicosanilo/Octanoato de docosanilo. Condições experimentais: fluxo isocrático de 0,7 ml/min.; coluna *Lichrosorb* RP-18 (250 x 4 mm) (d_f = 5 μm); em condições isocráticas com Metanol: Água (0,1% ácido acético) (96:4). HPLC-PBMS, 10 scans/s (ver Parte Experimental). Identificação de acordo com a tabela 2.2.2.

Tabela **2.2.2** Composição em ésteres longos de ácidos carboxílicos do medronho. Identidade dos picos assinalados nas figuras 2.2.5 e 2.2.6.

Pico Nº	Compostos	***m/z*** (int. rel. %) (HPLC-MS)
1	**Decanoato de dodecilo** Caproato de laurilo (*2.2.2-1*)	**340**(M^+)(1.8), 297(0.4), 213(4), 196(2), 185, **173**(64), 169, 168(26), 155(12), 145(14), 140(8), 129(9), 125(10), 111(22), 97(32), 87(6), 83(45), 73(16), 71(58), 69(77), 61(25), 57(100), 55(79)
2	**Decanoato de tetradecilo** Caproato de miristilo (*2.2.2-3*)	**368**(M^+)(2.3), 269(0.5), 241(3), 219(1), 213(0.5), 207(0.8), 201(2), 196(16), 189(1), **173**(72), 168(7), 163(1.4), 161(1), 155(12), 149(4), 146(1), 145(4), 144(1), 143(3), 139(3), 129(9), 127(3) 125(11), 111(21), 97(36), 87(6), 83(44), 73(16), 71(61), 69(86), 61(17), 57(100), 55(88)
3	**Decanoato de hexadecilo** Caproato de cetilo (*2.2.2-5*)	**396**(M^+)(1.3), 355(0.2), 324(0.3), 284(1.2), 269(1), 241(3), 225(1), 218(3), 213(0.6), 207(2), 201(1), 196(3), 189(2), **173**(45), 168(5), 163(1), 161(1), 155(6), 146(2), 145(15), 144(3), 143(2), 139(4), 129(6), 127(5) 125(10), 111(20), 97(33), 87(4), 83(39), 73(14), 71(47), 69(91), 61(13), 57(100), 55(86)
4	**Decanoato de heptadecilo** Caproato de margarilo (*2.2.2-7*)	**410**(M^+)(0.3), 381(0.4), 340(1.1), 324(0.3), 297(0.3), 283, 269(0.3), 255, 239, 219(1.1), 213(3), 207(0.8), 201(1), 196(0.6), 189(1), **173**(55), 168(20), 163(0.4), 161(1), 155(10), 146(1.4), 145(8), 144(3), 143(3), 139(4), 129(8), 127(3) 125(10), 111(21), 97(29), 87(6), 83(42), 73(16), 71(55), 69(79), 61(21), 57(100), 55(86)
5	**Decanoato de octadecilo** Caproato de estearilo (*2.2.2-9*)	**424**(M^+)(0.4), 369(2), 342(0.4), 297, 285(0.5), 269(0.2), 253, 241(3), 218(1.2), 213(0.5), 207(1), 201(1.4), 196(13), 189(2), **173**(52), 168(6), 163(1), 161(2), 155(10), 146(1), 145(8), 144(2), 143(3), 139(4), 129(9), 127(3) 125(10), 111(23), 97(35), 87(6), 83(46), 73(14), 71(57), 69(89), 61(15), 57(100), 55(88)
6	**Decanoato de eicosanilo** Caproato de araquidilo (*2.2.2-11*)	**452**(M^+)(0.4), 425(0.5), 419(1.5), 414(0.8), 408(0.7), 397(1), 367(2), 358(1.4), 355(0.9), 346(0.6), 337(0.6), 325, 310(0.7), 297, 281, 273(1), 269(1.2), 237(0.7), 225(1.3), 224(2.3), 218(3), 213(1), 207(3), 201(0.8), 196(3), 189(3), **173**(38), 168(2), 167(2), 163(2), 161(3), 155(6), 153(3), 149(9), 146(2), 145(6), 144(2), 143(4), 139(4), 129(7), 127(2) 125(9), 111(15), 97(34), 87(4), 83(39), 73(15), 71(55), 69(97), 60(44), 57(99), 55(100)

Tabela **2.2.2** Composição em ésteres longos de ácidos carboxílicos do medronho. Identidade dos picos assinalados nas figuras 2.2.5 e 2.2.6. (continuação).

Pico Nº	Compostos	*m/z* (int. rel. %) (HPLC-MS)
1	**Octanoato de tetradecilo** Caprilato de miristilo (*2.2.2-2*)	**340**(M^+)(1.2), 297(0.2), 241(2), 213(0.7), 197, 196(11), 173(9), 168(8), 155(2), 146(5), **145**(63), 144(11), 139(3), 129(3), 127(15) 125(9), 111(22), 97(32), 87(6), 83(45), 73(16), 71(58), 69(77), 61(25), 57(100), 55(79)
2	**Octanoato de hexadecilo** Caprilato de cetilo (*2.2.2-4*)	**368**(M^+)(1.3), 269(2), 241(0.5), 225, 219(0.3), 213(0.4), 207(0.8), 201(0.3), 196(4), 189(0.6), 173(7), 168(2), 163(0.5), 161(0.7), 155(2), 149(3), 146(5), **145**(54), 144(10), 143(1), 139(3), 129(3), 127(13) 125(10), 111(16), 97(27), 87(4), 83(40), 73(10), 71(35), 69(59), 61(11), 57(100), 55(74)
3	**Octanoato de octadecilo** Caprilato de estearilo (*2.2.2-6*)	**396**(M^+)(1.6), 353(0,3), 297(2), 269, 253, 252(3), 225(0.4), 224(2), 218(0.6), 213(0.2), 207(0.7), 201(0.6), 196(0.7), 189(1), 173(5), 168(2), 163(0.7), 161(1), 155(2), 146(6), **145**(68), 144(14), 143(1), 139(4), 129(2), 127(12) 125(10), 111(20), 97(30), 87(4), 83(39), 73(10), 71(36), 69(59), 61(10), 57(100), 55(73)
4	**Octanoato de nonadecilo** Caprilato de nonadecilo (*2.2.2-8*)	**410**(M^+)(0.23), 341(0.7), 311, 283, 267, 241(1.4), 219(0.4), 213(0.5), 207(0.5), 201(0.33), 196(9), 189(0.6), 173(7), 168(5), 163(0.5), 161(0.7), 155(2), 146(1.4), **145**(47), 144(8), 143(1), 139(2), 129(3), 127(12) 125(8), 111(15), 97(26), 87(4), 83(36), 73(10), 71(33), 69(53), 61(13), 57(100), 55(72)
5	**Octanoato de eicosanilo** Caprilato de araquidilo (*2.2.2-10*)	**424**(M^+)(<1), 369(0.8), 325, 297, 281, 269(2), 241(0.3), 218(0.6), 213(0.6), 207(1), 196(4), 189(1), 173(8), 168(2), 161(1), 155(2), 146(4), **145**(49), 144(10), 143(2), 139(3), 129(3), 127(12) 125(9), 111(18), 97(29), 87(4), 83(39), 73(9), 71(35), 69(56), 61(11), 57(100), 55(70)
6	**Octanoato de docosanilo** Caprilato de behenilo (*2.2.2-12*)	**452**(M^+)(0.2), 421(0.3), 397(1.5), 353(0.7), 345(0.2), 325, 323(0.3), 309, 297(2), 285(0.3), 269(0.4), 253(0.8), 252(3), 237(0.7), 231(0.3), 225(0.4), 224(2), 218(0.5), 207(2), 201(0.6), 196(1), 189(1), 173(5), 168(2), 167(2), 163(1), 155(1), 153(2), 149(5), 146(6), **145**(63), 144(13), 143(1), 139(4), 129(3), 127(11) 125(9), 111(17), 97(34), 87(5), 83(39), 71(32), 69(68), 60(18), 57(100), 55(80)

A análise da fracção **2A** por cromatografia gás-líquido de alta resolução (coluna capilar), permitiu a separação individual dos compostos (figura 2.2.6). Os espectros de massa (EI) obtidos por GC-MS foram idênticos aos espectros de HPLC-PBMS.

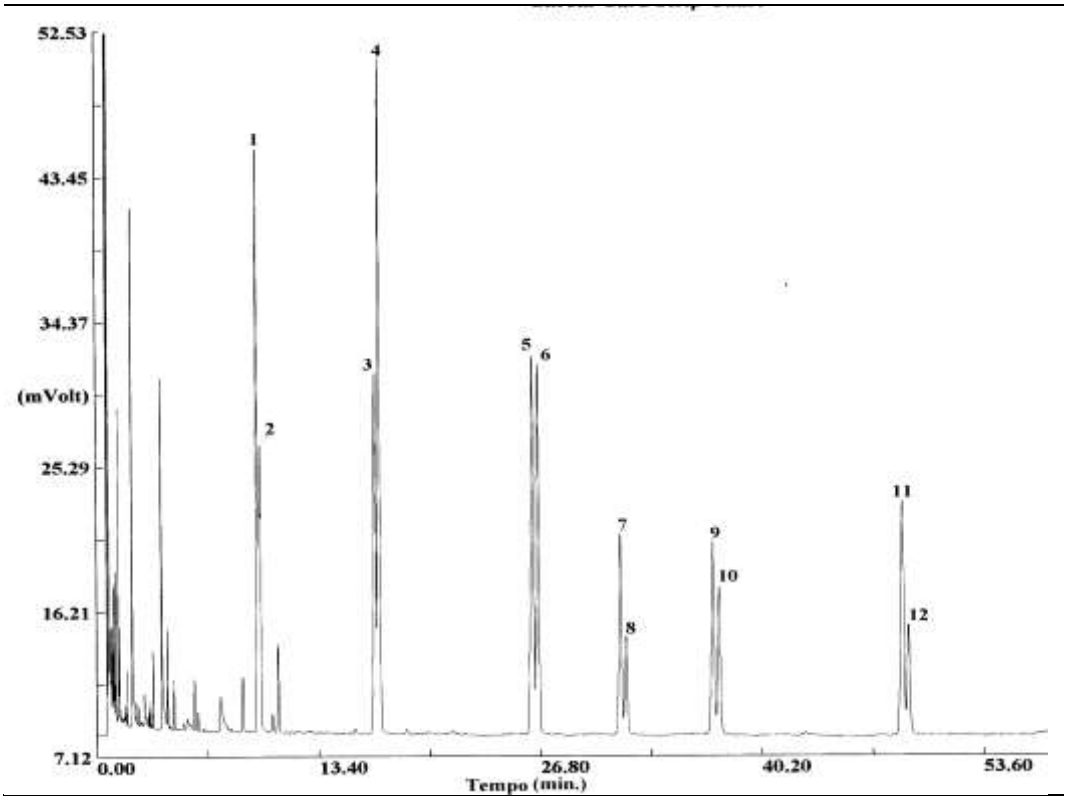


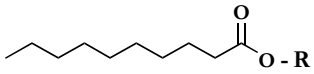
Figura **2.2.6** Cromatograma de HRGC da fracção **2A** (extracto neutro) dos medronhos. Condições experimentais Coluna: DB-5 (L = 30 m, d_f = 1 μm, d.i. = 32 μm), Forno: 175º-1º/min. - 240 ºC (10 min.) (ver Parte Experimental, 3.1.0). Picos: **1**- Decanoato de dodecilo, **2**- Octanoato de tetradecilo, **3**- Decanoato de tetradecilo, **4**- Octanoato de hexadecilo, **5**- Decanoato de hexadecilo, **6**- Octanoato de octadecilo, **7**- Decanoato de heptadecilo, **8**- Octanoato de nonadecilo, **9**- Decanoato de octadecilo, **10**- Octanoato de eicosanilo, **11**- Decanoato de eicosanilo, **12**- Octanoato de docosanilo. Identificação de acordo com as tabelas 2.2.2 e 2.2.3.

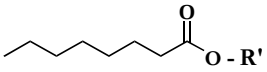
A tabela 2.2.3, mostra a composição percentual (áreas percentuais normalizadas) dos éteres de cadeia longa presentes na fracção **2A**.

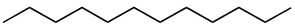
Tabela **2.2.3** Composição percentual (áreas % normalizadas) em ésteres longos de ácidos carboxílicos da fracção ***2A*** (extracto neutro) dos frutos de *Arbutus unedo*.

Pico	tr (min.)	%	Composto
1	9,70	12,58	Decanoato de dodecilo
2	9,81	4,63	Octanoato de tetradecilo
3	16,82	8,89	Decanoato de tetradecilo
4	17,10	17,67	Octanoato de hexadecilo
5	26,32	7,39	Decanoato de hexadecilo
6	26,68	11,90	Octanoato de octadecilo
7	31,64	7,81	Decanoato de heptadecilo
8	31,98	2,94	Octanoato de nonadecilo
9	37,24	7,53	Decanoato de octadecilo
10	37,61	4,91	Octanoato de eicosanilo
11	48,71	10,07	Decanoato de eicosanilo
12	49,06	3,66	Octanoato de docosanilo

As estruturas destes compostos foram confirmadas por comparação com amostras autênticas obtidas por síntese (ver Capítulo 3.2.0, Parte Experimental e Apêndice-3).

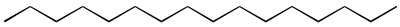




R = 

Decanoato de dodecilo (*2.2.2-1*)

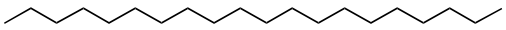
Decanoato de tetradecilo (*2.2.2-3*)



Decanoato de hexadecilo (*2.2.2-5*)

Decanoato de heptadecilo (*2.2.2-7*)

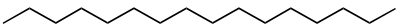
Decanoato de octadecilo (*2.2.2-9*)



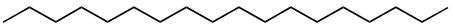
Decanoato de eicosanilo (*2.2.2-11*)

R'=

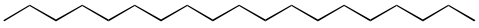
Octanoato de tetradecilo (*2.2.2-2*)



Octanoato de hexadecilo (*2.2.2-4*)

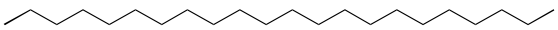


Octanoato de octadecilo (*2.2.2-6*)



Octanoato de Nonadecilo (*2.2.2-8*)

Octanoato de eicosanilo (*2.2.2-10*)



Octanoato de docosanilo (*2.2.2-12*)

No melhor do conhecimento, esta é a primeira descrição destes ésteres como produtos naturais de origem vegetal, havendo duas citações, do octanoato de tetradecilo, do octanoato de hexadecilo e, do decanoato de hexadecilo, como produtos de origem animal.[318]

2.2.1.2 Triterpenos Pentacíclicos e Esteróides

Fracção 2*B*: A análise por TLC desta sub-fracção mostrou reacção positiva ao teste de *Liebermann-Burchard*[319-321] denunciando a presença de 3-cetotriterpenóides.

Da análise por HRGC e HRGC-MS (figura 2.2.7) desta sub-fracção (***2B***) verificou-se ser uma mistura de triterpenos pentacíclicos: Lupeona (18,4%) (*2.2.3-1*), α-Amirona (11%) (*2.2.3-2*) e esteróides: 5α-Colestan-3-ona (14,3%) (*2.2.4-2*), Colesterol (5,7%) (*2.2.4-3*), Estigmasterol (31%) (*2.2.4-4*) e Estigmasta-4-en-3-ona (19,6%) (*2.2.4-5*).

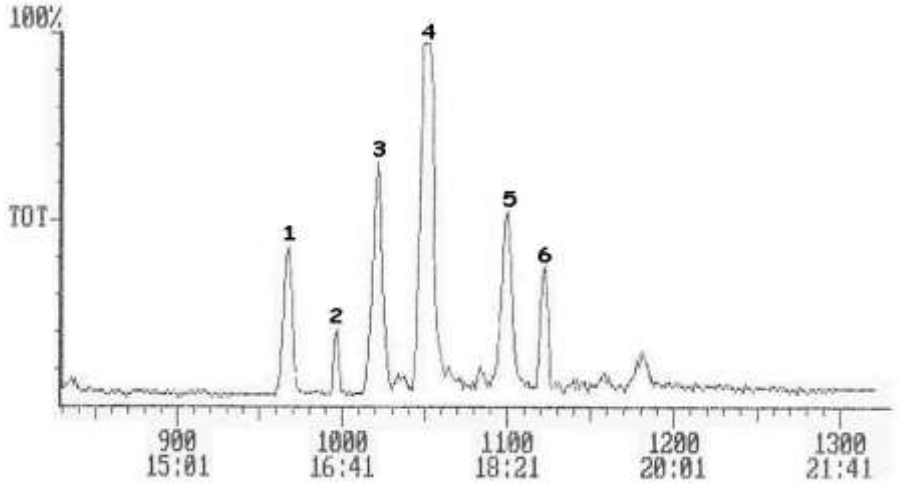


Figura **2.2.7** TIC obtido por HRGC-MS da fracção **2*B*** (ver Parte Experimental) do extracto neutro dos medronhos. Picos: **1**- Colestanona; **2**- Colesterol; **3**- Estigmastenona; **4**- Estigmasterol; **5**- Lupeona; **6**- α-Amirona. Forno: 120º - 4º/min. -290 ºC (ver Parte Experimental).

Por se tratar de uma sub-fracção de pequena dimensão (~7 mg) e, serem os seus constituintes maioritários compostos muito conhecidos e comuns nos extractos de origem vegetal, não foi efectuado o isolamento individual dos seus componentes. As suas estruturas foram deduzidas por interpretação dos seus espectros de massa e comparação com os espectros mencionados na literatura;[271,322-330] com excepção da α-amirona, as restantes estruturas foram confirmadas por comparação com padrões.

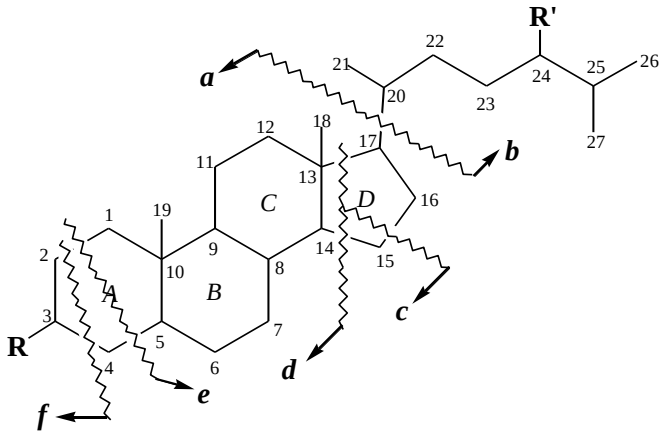


Figura **2.2.8** Esquema geral de fragmentação de Triterpenos Tetracíclicos.

O espectro de massa do **pico 1** da figura 2.2.7 (*2.2.4-2*), mostrou um padrão de fragmentação de triterpeno tetracíclico, com ião molecular $[M^+]$ a *m/z* 386 (38) e *m/z* 273 (5), correspondente à perda da cadeia lateral $[M\text{-}SC]^+$ (fragmento ***a*** com R'=H, figura 2.2.8). O pico base a *m/z* 231 (pico originado pela perda da cadeia lateral, SC e anel D, fragmento ***d***.) juntamente com *m/z* 246 (12) (fragmento ***c***) e *m/z* 316 (8) originário da fragmentação no anel A (ruptura das ligações 1-10 e 4-5), foram indicativos da presença de uma colestanona. O composto (*2.2.4-2*) foi identificado como sendo a Colestan-3-ona.[321,331](ver Apêndice-1). Como foi já referido, a sua identidade foi confirmada com padrão.

A análise por HRGC-MS do **pico 2** (*2.2.4-3*), mostrou igualmente como ião de massa mais elevada $[M^+]$ *m/z* 386 (56); o espectro continha também o ião $[M\text{-}15]^+$ a *m/z* 371 (23); o ião $[M\text{-}18]^+$ a *m/z* 368 (31), perda de uma molécula de água; ião *m/z* 273 (14), $[M\text{-}SC]^+$, correspondente ao fragmento ***a*** (com R'=H); observaram-se também o ião *m/z* 301 (26), $[M\text{-}85]^+$ (M-18-67), o ião *m/z* 255 (33), $[M\text{-}18\text{-}SC]^+$, o ião *m/z* 213 (38), $[M\text{-}SC+42+18]^+$ (fragmento ***d*** –18) e o ião *m/z* 275 (23) $[M\text{-}111]^+$ habitualmente presente nos espectros de triterpenos tetracíclicos com insaturação Δ^5. Deste modo identificou-se este composto como sendo o Colest-5-en-3β-ol (Colesterol, *2.2.4-3*) (ver Apêndice-1). Esta identificação foi também confirmada com padrão.

O composto correspondente ao **pico 3** (*2.2.4-5*), mostrou ião molecular $[M^+]$ a *m/z* 412 (18); o ião *m/z* 397 (8) $[M\text{-}15]^+$; o ião *m/z* 370 (5) $[M\text{-}42]^+$ (M-fragmento ***f***; R=O e R'=CH_2CH_3); *m/z* 288 (41) $[M\text{-}124]^+$. Mostrou ainda o ião a *m/z* 229 (30) $[M\text{-}SC\text{-anel D}]^+$ (fragmento ***d***); o pico base a *m/z* 124 é característico da presença da funcionalidade Δ^4,3-ona (fissão das ligações alílicas 6-7 e 9-10, anel B).[278,299,331,332]

Este composto mostrou ser a cetona α,β-insaturada, Estigmasta-4-en-3-ona (*2.2.4-5*) (ver Apêndice-1). A identificação foi igualmente confirmada com padrão.

O espectro de massa do **pico 4** (*2.2.4-4*), apresentava também *m/z* 412 (13) como ião de massa mais elevada e foi tido como ião molecular $[M^+]$; o ião $[M\text{-}15]^+$ a *m/z* 397 (8); o ião *m/z* 394 (23), proveniente da perda de uma molécula de água $[M\text{-}18]^+$ e o intenso ião *m/z* 255 (63) $[M\text{-}SC\text{-}18]^+$ confirmaram a existência de grupo hidroxilo; o pico *m/z* 271 (22)

denunciou o núcleo esterólico Δ^5-3-ol e insaturação na cadeia lateral;[328] o ião *m/z* 273 (12), corresponde à perda da SC, $[M-SC]^+$, fragmento ***a*** (R'=CH_2CH_3; figura 2.2.8); O espectro mostrava também o ião $[M-43]^+$ a *m/z* 369 (10), por quebra na cadeia lateral em C_{24}-C_{25} e o ião *m/z* 300 (18), por quebra na cadeia lateral em C_{20}-C_{22} com transferência de 1H indicando a existência de um triterpeno tetracíclico derivado do estigmastano com insaturações $\Delta^{5,22}$.[333] Deste modo foi possível identificar este composto como sendo o Estigmasta-5,22-dien-3β-ol (Estigmasterol, *2.2.4-4*) [325,333,334](ver Apêndice-1). A identificação foi também confirmada com padrão.

Para além destes quatro compostos, esta fracção compreendia ainda dois triterpenos pentacíclicos.

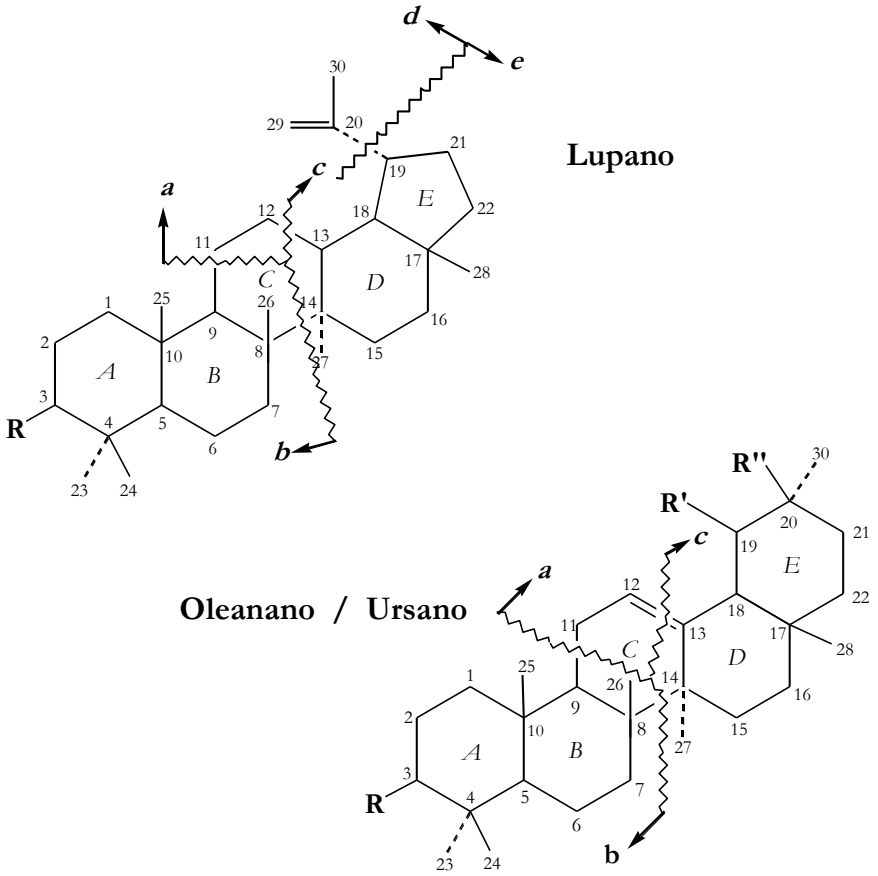


Figura **2.2.9** Esquema geral de fragmentação de Triterpenos Pentacíclicos das séries Lupano e Oleanano/Ursano.[271]

O espectro de massa do **pico 5** (*2.2.3-1*), mostrou um padrão de fragmentação de triterpeno pentacíclico com esqueleto carbonado derivado do lupano (esquema da fig. 2.2.9 (R=O)): ião de massa mais elevada, *m/z* 424 (30), foi identificado como ião molecular [M^+]; o ião *m/z* 409 (11), tido como [M-15]$^+$; o ião *m/z* 381 (10), [M-43]$^+$, corresponde ao fragmento ***e***; o ião *m/z* 218 (48), fragmento ***a***, é proveniente da fragmentação RDA (retro-*Diels-Alder*), do anel C do lupeno;[271] o pico base *m/z* 205 corresponde ao fragmento ***b*** +2H e o ião *m/z* 189 (37) corresponde ao ião ***c***. A comparação com uma amostra autêntica, permitiu confirmar a estrutura: o composto foi identificado como sendo a Lup-20(29)-en-3-ona (Lupeona, *2.2.3-1*) (ver Apêndice-1).[322,333]

O último composto eluído nesta fracção *2.2.3-2* (**pico 6**), revelou como padrão de fragmentação: ião molecular [M^+] a *m/z* 424 (30), pico base a *m/z* 218 (fragmento ***a***, proveniente da ruptura RDA) denunciando provável insaturação no anel C (Δ^{12}) da cadeia pentacíclica, e iões a *m/z* 406 (10) [M-18]$^+$ e *m/z* 391 (12) [M-15-18]$^+$ e, ainda os iões a *m/z* 191 (21) (fragmentos ***c***), e a *m/z* 206 (15) (fragmentos ***b***) (R'=CH_3, R''=H).

Tendo em conta a via biossintética, postulou-se para este composto a estrutura Urs-12-en-3-ona (α-Amirona, *2.2.3-2*).[271](ver Apêndice-1).

Apesar de se tratar de compostos muito comuns em plantas, esta é a primeira citação da existência de lupeona, colestan-3-ona, colesterol, estigmasterol e estigmasta-4-en-3-ona no medronho.

Fracção 2C: a análise desta sub-fracção por HRGC-MS mostrou ser constituída pelos compostos muito comuns, β-Amirina (9,5%) (*2.2.3-4*), α-Amirina (43%) (*2.2.3-3*) (composto dominante), Lupeol (36%) (*2.2.3-5*) e β-Sitosterol (8%) (*2.2.4-6*) e, por um di-hidroxitriterpenóide (3,6%) (*2.2.3-8*).

A fracção foi dividida em duas sub-fracções, **2CA** (92%) e **2CB** (8%), por cromatografia em coluna (adsorvente alumina neutra desactivada). A cromatografia gás-líquido de alta resolução acoplada à espectrometria de massa (HRGC-MS) da fracção **2CA**

em natureza mostrou a presença de isómeros triterpenóides (figura 2.2.10), mas não permitiu a separação de todos os componentes.

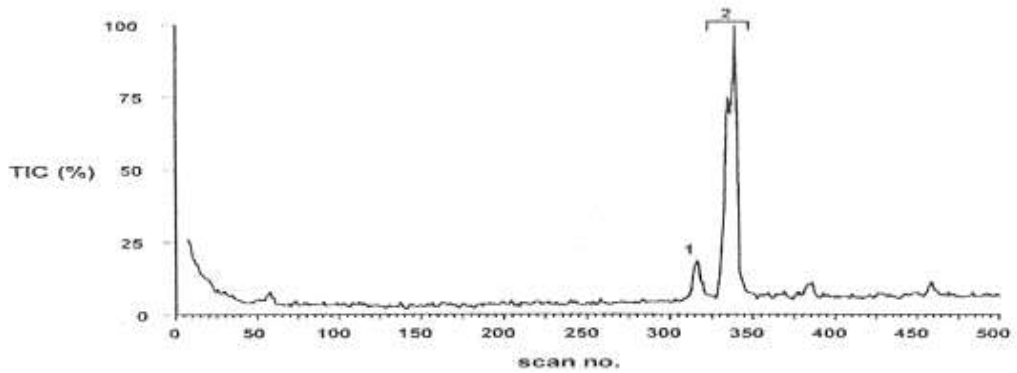


Figura **2.2.10** TIC obtido por HRGC-MS da fracção **2*CA*** (ver Parte Experimental) do extracto neutro dos medronhos. Picos: **1**- β-Amirina; **2** - Mistura de α-Amirina, Lupeol e um terceiro componente desconhecido. Condições experimentais descritas na Parte Experimental.

A separação ocorreu após recurso à trimetilsililação (figura 2.2.11). Contudo a ausência de iões moleculares e a complexidade do espectro do derivado trimetilsililado do composto **3** dificultaram a interpretação. Os espectros de massa dos derivados TMS foram ambíguos e a correlação com os espectros da fracção não derivatizada, não foi possível de uma forma inequívoca.

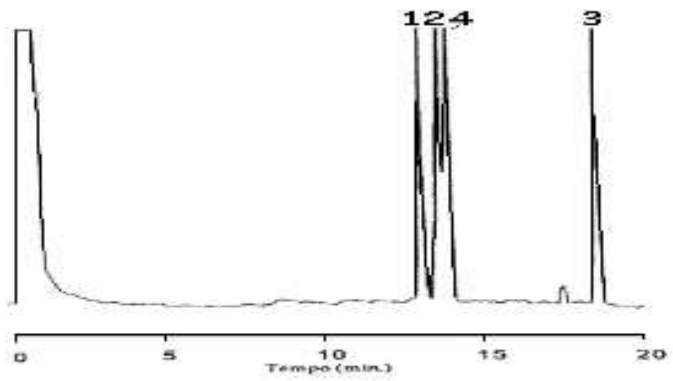


Figura **2.2.11** Cromatograma obtido por HRGC da fracção **2*CA*** trimetilsililada (ver Parte Experimental) do extracto neutro dos medronhos. Picos: **1**- β-Amirina; **2**- α-Amirina; **3**- Olean-12-en-3β,23-diol; **4**- Lupeol. Condições experimentais descritas na parte experimental.

O espectro de ^{13}C-NMR mostrou que a fracção **2*CA*** era uma mistura de triterpenóides pentacíclicos, dominados por α- e β-amirina e por lupeol.[255,336]

O **pico 1** foi então identificado como β-Amirina (Olean-12-en-3β-ol). O seu espectro de massa GC-MS apresentou o padrão de fragmentação descrito na literatura[337] (figura 2.2.9, com R=OH, R'=H e R"=CH_3).[271] Observaram-se o ião molecular [M^+] a *m/z* 426 (9), o ião [M-15]$^+$ a *m/z* 411 (3), o ião [M-18]$^+$ a *m/z* 408 (19), por perda de uma molécula de água e o ião [M-15-18]$^+$ a *m/z* 393 (1); o pico base, *m/z* 218 (100), o qual é um ião importante nas α- e β-amirinas correspondendo ao fragmento ***a*** (insaturação em C_{12}-C_{13}); o espectro mostrava também o ião fragmento ***b*** a *m/z* 207 (41); ião [***a*** -15]$^+$ correspondente ao ião [M-$C_{14}H_{24}O$-CH_3]$^+$ a *m/z* 203 (29), por quebra em C_{15}-C_{16}; o ião *m/z* 189 (12) corresponde aos fragmentos [***a*** -29]$^+$ e [***b*** -18]$^+$.

Como atrás foi referido, a trimetilsililação da mistura permitiu uma melhor separação da mesma revelando a existência de um pico ocultado sob a região não resolvida na figura 2.2.10, com um tempo de retenção muito aumentado relativamente à amostra em natureza (**pico 3** na figura 2.2.11).

Esta modificação cromatográfica do derivado TMS do **pico 3**, associada aos iões fragmento do seu espectro de massa, sugeriu a presença de oleanano/ursano ou lupano dihidroxilado. Como foi referido anteriormente, a complexidade espectral e a ausência de ião molecular não permitiu conclusões.

Foi então tentada e conseguida uma boa separação por HPLC dos componentes da fracção **2CA** com Metanol: Água (96:4 (0,1% ácido acético)), usando o detector de "*light-scattering*" (ELSD) (figura 2.2.12).

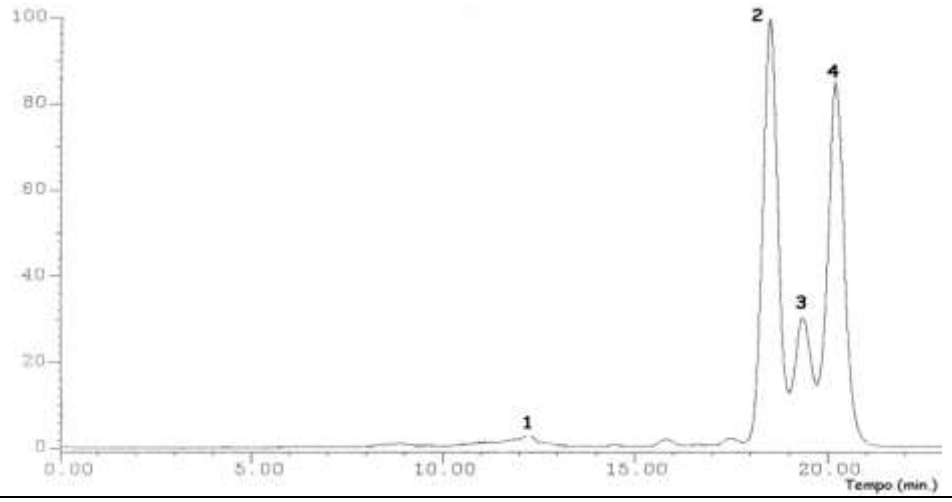


Figura **2.2.12** Cromatograma obtido por HPLC-ELSD da fracção **2*CA*** (ver Parte Experimental) do extracto neutro dos medronhos. Picos: **1**- β-Amirina; **2**- α-Amirina; **3**- Olean-12-en-3β,23-diol; **4**- Lupeol.

Efectuou-se posteriormente a análise da fracção por HPLC-PBMS (figura 2.2.13).

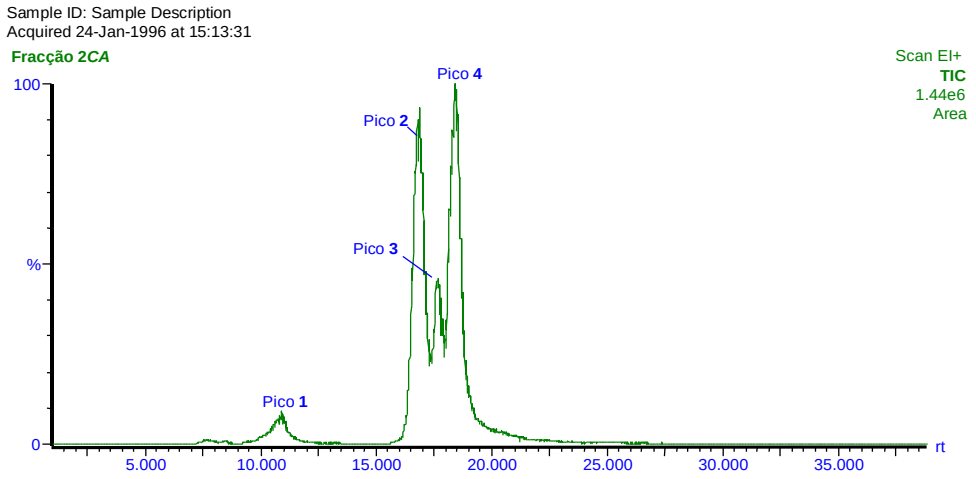


Figura **2.2.13** Cromatograma obtido por HPLC-PBMS da fracção **2*CA*** (ver Parte Experimental) do extracto neutro dos medronhos. Picos: **1**- β-Amirina; **2**- α-Amirina; **3**- Olean-12-en-3β,23-diol; **4**- Lupeol.

Todos os espectros de massa apresentaram ião molecular e padrões de fragmentação racionalizáveis, comparáveis aos espectros de impacto electrónico descritos na literatura (figura 2.2.14).[271,341]

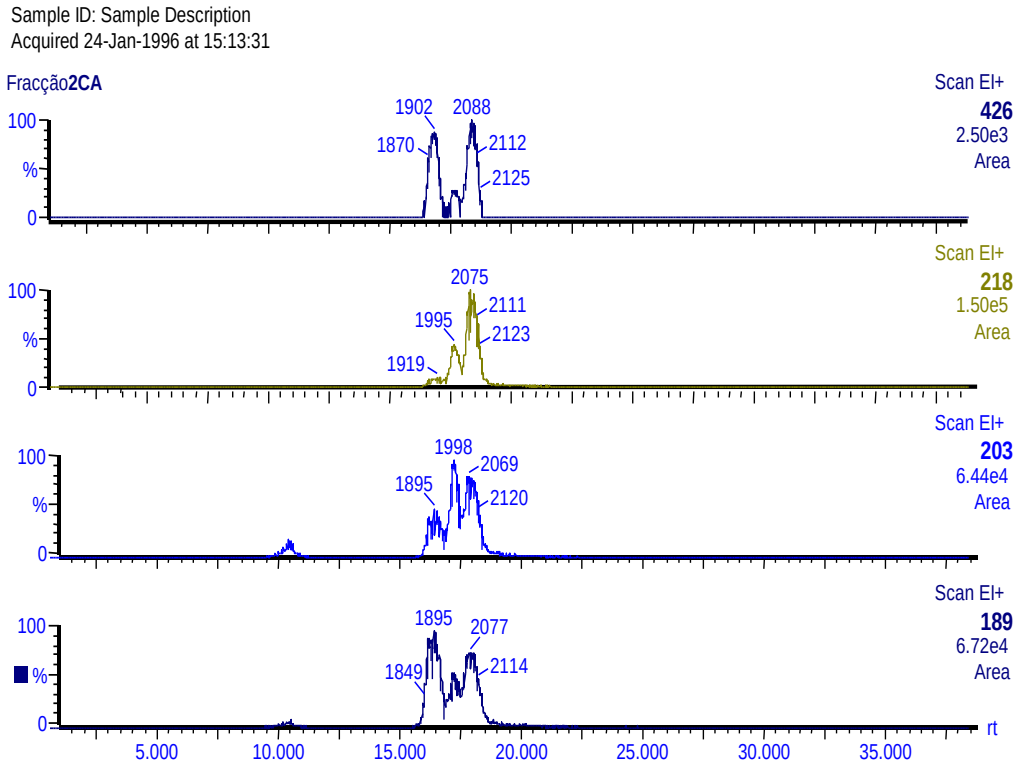


Figura **2.2.14** Cromatogramas de massa para os iões diagnóstico mais significativos para a α-amirina (m/z **426**, **189**), lupeol (m/z **426**, **218**), e olean-12-en-3β,23-diol (m/z **203**).

O espectro de HPLC-MS do componente **pico 2** apresentou como $[M^+]$ o ião *m/z* 426 (19); mostrou também o ião *m/z* 411 (4) $[M-15]^+$, o ião *m/z* 408 (15) $[M-18]^+$, o ião *m/z* 393 (2) $[M-15-18]^+$ e, como pico base a *m/z* 218 (100) interpretado como sendo correspondente ao fragmento ***a***, proveniente da reacção RDA, nos esqueletos carbonados oleanano/ursano com insaturação em C_{12}-C_{13} sem substituição nos anéis D e E (esquema da figura 2.1.9, R=OH, R'=CH_3 e R"=H); o espectro mostrou também o ião *m/z* 207 (4), fragmento ***b***, o ião *m/z* 203 (24), $[\boldsymbol{a}\ -15]^+$, quebra em C_{15}-C_{16} e o ião *m/z* 189 (29) que corresponde a $[\boldsymbol{a}\ -29]^+$ e $[\boldsymbol{b}\ -18]^+$. O composto depois de isolado e recristalizado em acetona: metanol (1:2), apresentou um valor de rotação específica de $[\alpha]_D$ +82.5º ($CHCl_3$) (lit.[342]: +83.5º ($CHCl_3$)) e um ponto de fusão de 184-187 ºC (lit.[342]: 186 ºC), tendo sido identificado como sendo a α-amirina (urs-12-en-3β-ol, *2.2.3-3*).[271,273] (ver Apêndice-1). O seu espectro de ^{13}C-NMR está descrito na tabela 2.2.4.

Tabela **2.2.4** Desvios químicos (δ) de ^{13}C-NMR dos compostos α-Amirina, β-Amirina e Lupeol. Solvente: $CDCl_3$

	α-Amirina	lit.[255]	**β-Amirina**	lit.[255]	**Lupeol**	lit.[255]
C-1	38.82	38.9	38.74	38.7	38.71	38.7
C-2	27.28	27.3	27.33	27.3	27.42	27.4
C-3	78.90	78.9	78.93	78.9	78.92	78.9
C-4	38.71	38.8	38.83	38.8	38.84	38.8
C-5	55.26	55.3	55.28	55.3	55.30	55.3
C-6	18.33	18.4	18.38	18.4	18.31	18.3
C-7	33.12	33.1	32.68	32.8	34.28	34.2
C-8	39.91	40.1	38.83	38.8	40.83	40.8
C-9	47.90	47.8	47.90	47.7	50.44	50.4
C-10	36.91	36.9	36.88	37.0	37.16	37.1
C-11	23.32	23.3	23.63	23.6	20.92	20.9
C-12	124.31	124.3	121.78	121.8	25.14	25.1
C-13	139.52	139.3	145.19	145.1	38.05	38.0
C-14	42.24	42.2	41.82	41.8	42.82	42.8
C-15	26.54	26.7	26.15	26.2	27.42	27.4
C-16	28.01	28.2	27.08	27.0	35.58	35.5
C-17	33.83	33.8	32.68	32.5	42.98	43.0
C-18	59.02	58.9	47.32	47.4	48.30	48.2
C-19	39.53	39.6	46.86	46.9	47.97	47.9
C-20	39.60	39.6	31.12	31.1	150.92	150.9
C-21	31.32	31.3	34.83	34.8	29.84	29.8
C-22	41.63	41.6	38.01	37.2	39.99	40.0
C-23	28.04	28.2	28.32	28.2	27.98	28.0
C-24	15.81	15.6	15.64	15.5	15.35	15.4
C-25	15.81	15.6	15.64	15.6	16.10	16.1
C-26	16.92	16.9	17.04	16.9	15.97	15.9
C-27	23.34	23.3	26.15	26.0	14.54	14.5
C-28	28.71	28.7	28.32	28.4	17.99	18.0
C-29	17.42	17.4	33.28	33.3	109.31	109.3
C-30	21.33	21.4	23.63	23.7	19.30	19.3

O espectro do isómero correspondente ao **pico 4** apresentou também $[M^+]$ a *m/z* 426 (15), mostrando como iões principais *m/z* 411 (6), $[M-CH_3]^+$, *m/z* 207 (56), *m/z* 189 (44), $[207-H_2O]^+$ e como pico base *m/z* 95; o ião 365 (4), $[M-43-18]^+$ (perda de água e grupo isopropenilo terminal) e os intensos iões a *m/z* 189 e 207 são característicos do espectro do lupeol resultantes da fragmentação RDA no anel C (de acordo com o esquema

da figura 2.1.9 esqueleto carbonado tipo lupano, com R = OH).[341] Este composto depois de isolado e recristalizado ($CHCl_3$/MeOH) apresentou como bandas mais significativas no IV: 3370 e 1032 cm^{-1} (hidroxilo), 3080, 1645 e 883 cm^{-1} (metileno terminal) e 1383 cm^{-1} (dimetilo geminal). O seu espectro de UV apresentou uma banda com fraca absorção com um λ_{max} = 206 nm (ε=2500) correspondente à dupla exocíclica. No seu espectro de ^{1}H-NMR identificaram-se 6 grupos metilo terciários entre δ 0.88 e 1.15 (3H cada, s), três protões alílicos na forma de singleto alargado a δ 1.68 (3H, *s*, C=C-Me), e dois vinílicos a δ 4.57 e 4.67 (1H cada, br s, -C=CH_2); Estes são sinais característicos dos derivados lup-20(29)-eno.[260] Também o protão C-3 axial surgiu no ^{1}H-NMR como duplo dubleto a δ 3.18 com constantes de acoplamento de 11.0 Hz e 5.8 Hz, confirmando a orientação equatorial do hidroxilo em C-3. O espectro de ^{13}C-NMR esteve de acordo com a existência de um grupo isopropenilo, em particular a ressonância característica do átomos de carbono vinílicos (C-20, δ 150,9 e C-29, δ 109,3).[251,255,338] O composto apresentou um valor de rotação específica $[\alpha]_D$ +27º ($CHCl_3$) (lit.[342]: +26.4º ($CHCl_3$)) e um ponto de fusão de 211-214 ºC (lit.[342]: 215 ºC). O composto foi identificado como Lupeol (lup-20(29)-en-3β-ol, *2.2.3-5*) (ver Apêndice-1).

A tabela 2.2.4 descreve igualmente o espectro de ^{13}C-NMR deste composto. Verifica-se que relativamente às amirinas, as principais diferenças incidem nos valores dos carbonos C-12 (~97 a 99 ppm), C-13 (~101 a 107 ppm), C-20 (~111 a 120 ppm) e C-29 (~76 a 92 ppm).

Saliente-se que o ^{13}C-NMR é tido na literatura[251,338] como um método importante na distinção dos isómeros α- e β-amirinas. As principais diferenças entre α- e β-amirina incidem nos valores C-12 (~3 ppm) e C-13 (~6 ppm), C-18 (~12 ppm), C-19 (~7 ppm), C-20 (~8.5 ppm) e C-29 (~16 ppm), valores observados em $CDCl_3$.

A β-amirina (pico 1) depois de isolada e recristalizada (etanol absoluto/hexano) apresentou como rotação específica $[\alpha]_D$ +88.0º ($CHCl_3$) (lit.[342]: +88.4º ($CHCl_3$)) e um ponto de fusão de 195-197 ºC (lit.[342]: 197-198 ºC) (ver Apêndice-1). Na tabela 2.2.4 está igualmente descrito o espectro de ^{13}C-NMR da β-amirina.

Saliente-se que os triterpenóides com estruturas derivadas dos olean-12-eno e urs-12-eno estão largamente distribuídos no reino vegetal, sendo frequentemente isolados como misturas isoméricas.[259]

A figura 2.2.15 mostra o espectro HPLC-PBMS obtido para o **pico 3**. Este apresenta um padrão de fragmentação compatível com uma estrutura derivada de oleanano/ursano.[271,344]

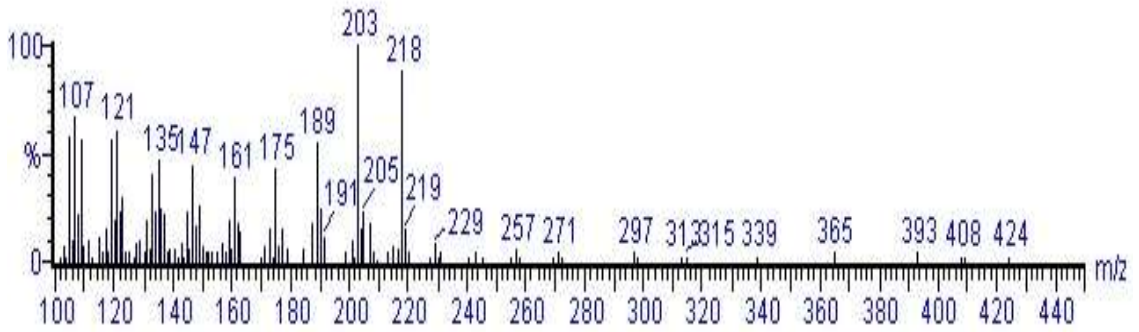


Figura **2.2.15** Espectro de massa HPLC-PBMS do **pico 3** da figura 2.2.13. O composto foi identificado como sendo olean-12-en-3β,23-diol, um novo composto natural.

No espectro o ião *m/z* 424 (1), foi tido como $[M-18]^+$, *m/z* 409 (2), $[M-15-18]^+$, os fragmentos *m/z* 229 (7), 218 (88), 203 (100), e 189 (29), provenientes dos anéis D/E e, *m/z* 223 (1), devido ao fragmento $[C_{14}H_{23}O_2]^+$ e *m/z* 205 (22), $[223-H_2O]^+$ (provenientes dos anéis A/B) (figura 2.2.16). O padrão de fragmentação restringiu a localização dos dois grupos hidroxilo aos anéis A/B. Também o espectro de massa de HRGC-MS do derivado trimetilsililado deste composto mostrou fragmentos intensos a *m/z* 483 deduzido como sendo $[M-TMS-31]^+$ (perda do fragmento $-CH_2OTMS$) e *m/z* 265 atribuído a $[223+TMS-31]^+$.

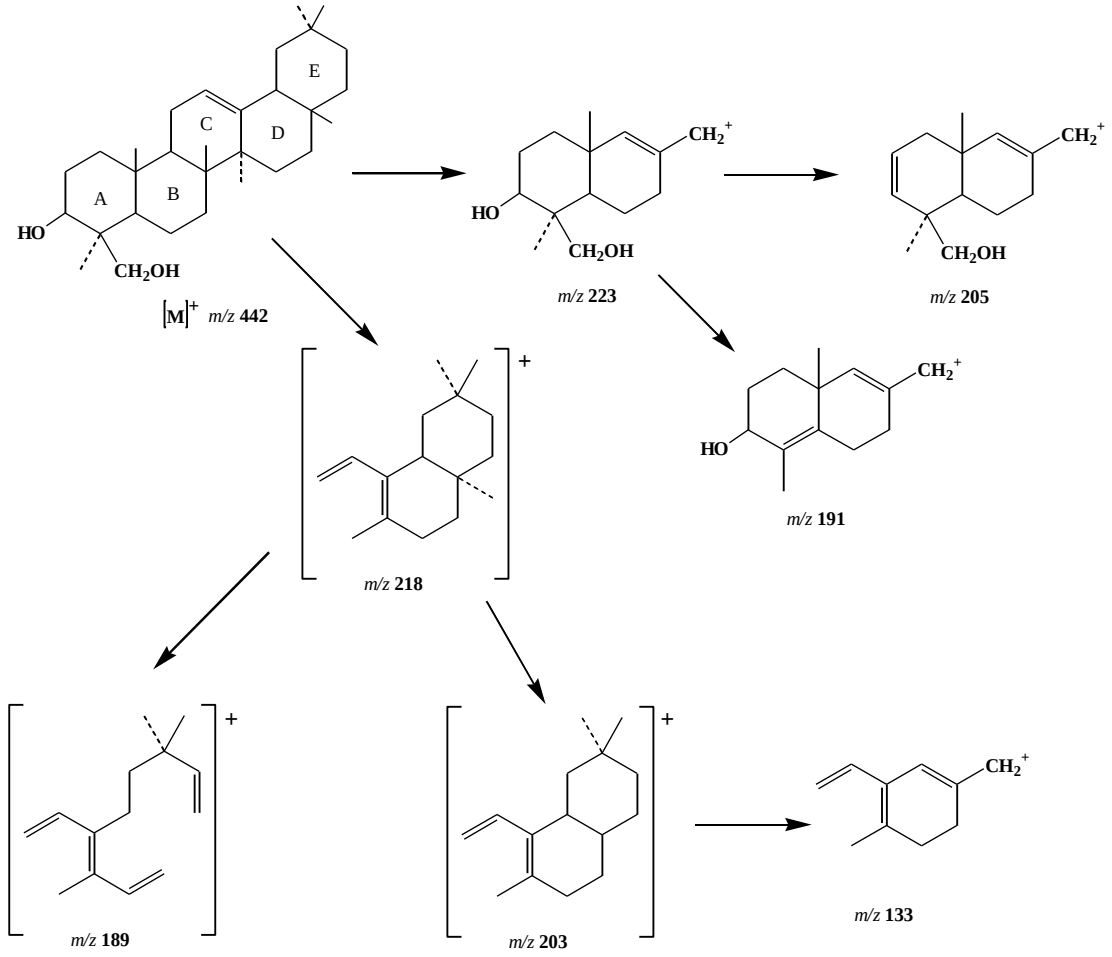


Figura **2.2.16** Esquema de fragmentação proposto para o Olean-12-en-3β,23-diol (**pico 3**).[271-273,345-347]

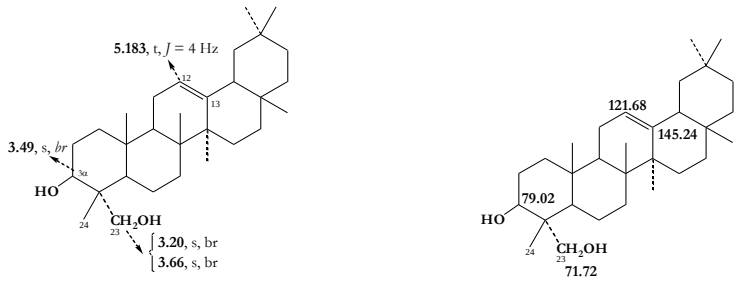
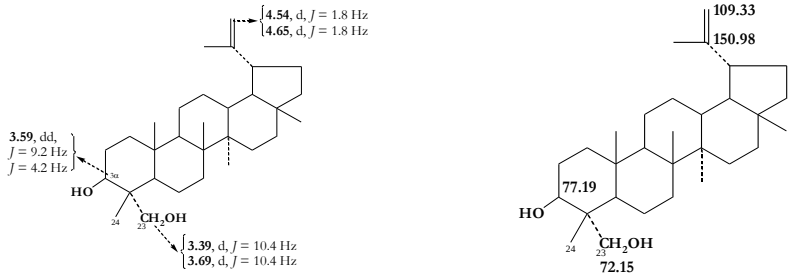
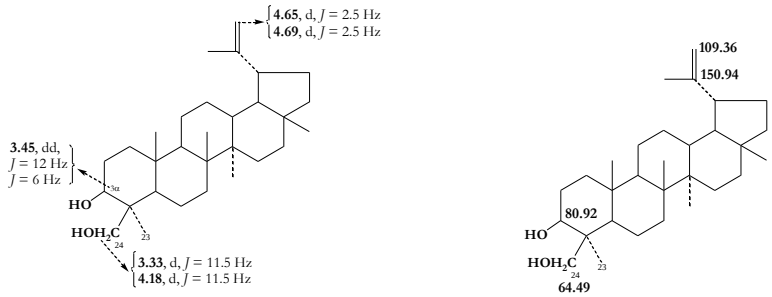
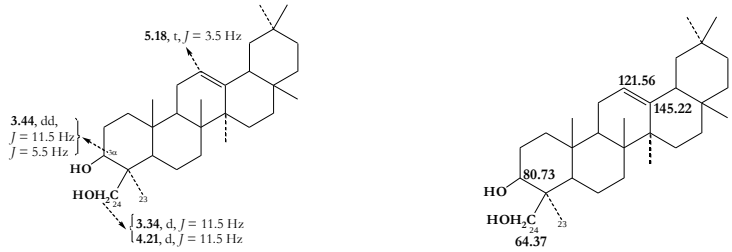
Da comparação dos dados de ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR registados (tabela 2.2.5) com os valores de compostos análogos[345,348,349] (figura 2.2.17) surgiu a indicação da presença de um derivado diol do olean-12-eno com um grupo hidroximetilo no anel A (em C-23 ou C-24); saliente-se a presença de protão metínico a δ 3.49 (s, largo), indicativo de grupo hidroxilo em C-3 (posição equatorial) e sinais a δ 3.20 (s, largo) e δ 3.66 (s, largo) de protões metilénicos adjacentes a grupos hidroxilo (-CH_2OH) confirmados pela presença no espectro de ^{13}C-NMR dos sinais a δ 79.02 e δ 71.72 respectivamente. A figura 2.2.17

mostra a correlação existente entre os desvios químicos de ^{1}H-NMR do composto correspondente ao **pico 3** de diois derivados do lupeol e β-amirina descritos na literatura.[345,349]

Tabela **2.2.5** Desvios químicos (δ) de ^{13}C-NMR e ^{1}H-NMR do olean-12-en-3β,23-diol (**pico 3**). Solvente: $CDCl_3$

	^{13}C-NMR		**^{1}H-NMR**
C-1	38.73	H-3	3.49, s, br
C-2	27.44		
C-3	79.02	H-12	5.183, t, J = 4 Hz
C-4	42.84		
C-5	55.32	H-23	3.197, s, br
C-6	18.33		
C-7	32.80	H-23'	3.656, s, br
C-8	38.73		
C-9	48.32	H-24	1.236 (3H, s)
C-10	37.18		
C-11	23.60	H-25	0.868 (3H, s)
C-12	121.68		
C-13	145.24	H-26	0.943 (3H, s)
C-14	41.84		
C-15	26.21	H-27	1.134 (3H, s)
C-16	27.44		
C-17	32.52	H-28	0.828 (3H, s)
C-18	47.99		
C-19	47.99	H-29	0.868 (3H, s)
C-20	29.86		
C-21	34.80	H-30	0.868 (3H, s)
C-22	37.18		
C-23	71.72		
C-24	23.60		
C-25	15.36		
C-26	16.11		
C-27	25.17		
C-28	28.00		
C-29	34.80		
C-30	23.72		

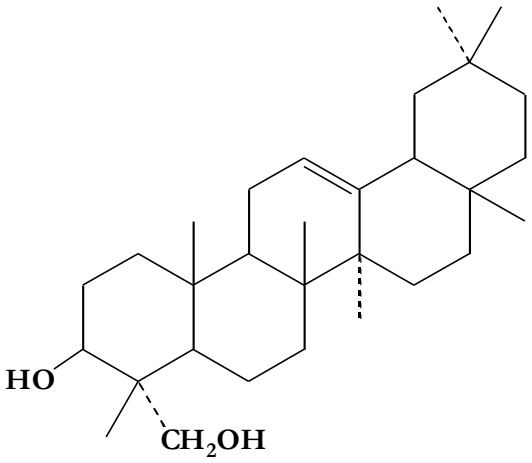
Figura **2.2.17** - Desvios químicos ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR (δ) do olean-12-en-3β,23-diol (**pico 3**) e diois derivados do lupano e do oleanano.

Estrutura e respectivos δ de ^{1}H e ^{13}C-NMR	Ref[a]
	
Lup-20(29)-en-3β,23-diol	349
	
Lup-20(29)-en-3β,24-diol	345
	
Olean-12-en-3β,24-diol	345
	

O espectro de IV do composto apresentou como bandas mais significativas 3600-3100 (3411)cm^{-1} (OH), 2918, 2850, 1636 (C=C), 1259 (C-O) e 800 cm^{-1}. O composto apresentou um ponto de fusão de 247-251 ºC.

Com base nos dados espectroscópicos o composto relativo ao **pico 3** foi identificado como sendo o olean-12-en-3β,23-diol (ver Apêndice-1).

Este composto é um produto natural novo.



Olean-12-en-3β,23-diol (*2.2.3-8*)

A sub-fracção **2CB**, correspondente a 8% da fracção **2*C***, mostrou ser um composto puro: o seu espectro de massa apresentou ião molecular [M^+] a *m/z* 414 (32); ião $[M-15]^+$ a *m/z* 399 (10) e ião $[M-18]^+$ a *m/z* 396 (21) (de acordo com o esquema da figura 2.2.8, com R = OH e R' = CH_2CH_3). Mostrou também o característico ião $[M-SC]^+$ a *m/z* 273 (19), correspondente ao fragmento ***a***; o ião $[M-85]^+$ a *m/z* 329 (21), e o ião $[M-111]^+$ a *m/z* 309 (15). O seu espectro de FTIR apresentou bandas indicativas da presença de OH e de insaturação: 3550-3250 cm^{-1} 1632, 1465, 1367. O seu espectro de ^{1}H-NMR apresentou 6 singletos relativos a grupos metilo entre δ 0.68 e 1.01, surgindo um multipleto de protão olefínico a δ 5.35 (1H, *m*, H-6); para além de um sinal alargado a δ 3.52, atribuível ao protão metínico α em C-3 (ver Apêndice-1). O seu espectro de ^{13}C-NMR está descrito na tabela 2.2.6.

Tabela **2.2.6** Desvios químicos (δ) de ^{13}C-NMR do β-Sitosterol. Solvente: $CDCl_3$

	β-Sitosterol	lit.[350]		**β-Sitosterol**	lit.[350]
C-1	37.11	37.2	C-16	27.92	28.2
C-2	31.50	31.6	C-17	55.96	56.0
C-3	71.73	71.8	C-18	11.65	11.9
C-4	42.17	42.3	C-19	19.20	19.4
C-5	140.85	140.7	C-20	35.99	36.1
C-6	121.75	121.7	C-21	18.84	18.8
C-7	31.75	31.9	C-22	33.79	33.9
C-8	31.75	31.9	C-23	25.92	26.0
C-9	50.02	50.1	C-24	45.71	45.8
C-10	36.35	36.5	C-25	30.05	29.1
C-11	20.01	21.1	C-26	19.62	19.8
C-12	39.64	39.8	C-27	18.58	19.0
C-13	42.17	42.3	C-28	22.89	23.0
C-14	56.67	56.8	C-29	11.65	12.0
C-15	24.12	24.3			

O composto apresentou um valor de rotação específica de $[\alpha]_D$ -34.5º ($CHCl_3$) (lit.[343]: -37º (c = 2, $CHCl_3$)) e um ponto de fusão de 135-138 ºC(lit.[343]: 140 ºC). O composto foi identificado como sendo o ubíquo β-Sitosterol (Estigmat-5-en-3β-ol, *2.2.4-6*) (ver Apêndice-1).[330,332,333,350]

<u>Fracção 2D</u>: da análise desta sub-fracção concluiu-se ser uma mistura de três triterpenos pentacíclicos (figura 2.2.18) tentativamente identificados como sendo um hidroxiceto-triterpenóide (α-Amirenonol, 33%) (*2.2.3-7*)); um aldeído hidroxi-terpenóide (Aldeído ursólico, 12,5%) (*2.2.3-6*)) e um di-hidroxiterpenóide (Uvaol, 54,5%) (*2.2.3-9*)).

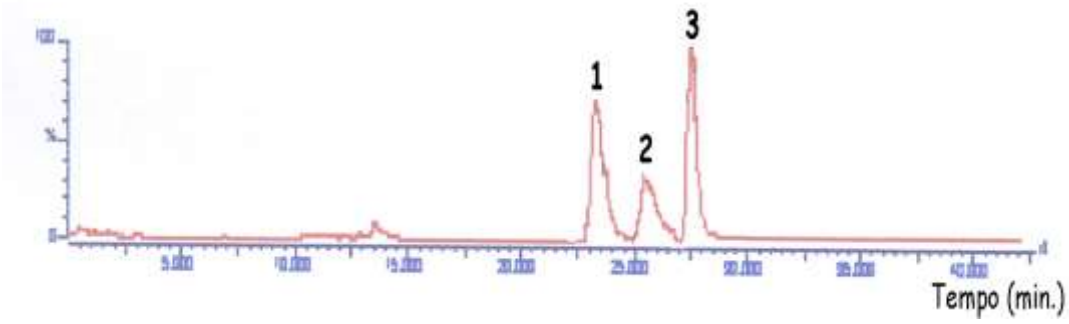


Figura **2.2.18** Traçado HPLC-PBMS da fracção **2D** (extracto neutro) dos medronhos. Pico **1**- α-Amirenonol, Pico **2**- Aldeído ursólico, Pico **3**- Uvaol; Condições experimentais: fluxo isocrático de 0,7 ml/min.; coluna *Lichrosorb* RP18 (250 x 4 mm) (d_f = 5 μm); em condições isocráticas com Metanol: Água (0,1% ácido acético) (96:4). HPLC-PBMS, 10 scans/s (ver Parte Experimental).

A análise do espectro de massa, do primeiro composto (*2.2.3-8*) (**pico 1**), mostrou como ião de massa mais elevada *m/z* 440 (16), identificado como ião molecular $[M^+]$; ião $[M-15]^+$ a *m/z* 425 (6); ião $[M-18]^+$ a *m/z* 422 (10) e, como pico base *m/z* 273 (100) interpretado como sendo proveniente da fragmentação RDA no anel C, com presença de grupo oxo em C-11 (fragmento **a**, figura 2.2.9 e esquema da figura 2.1.19); o espectro mostrou também *m/z* 232 (84) e $[M-28]^+$ a *m/z* 413 (8). Este último ião *m/z* 413, juntamente com a presença do ião m/z 135 (82), corroboraram a presença de carbonilo em C-11. O espectro de massa foi racionalizado de acordo com o esquema de fragmentação representado na figura 2.2.19.

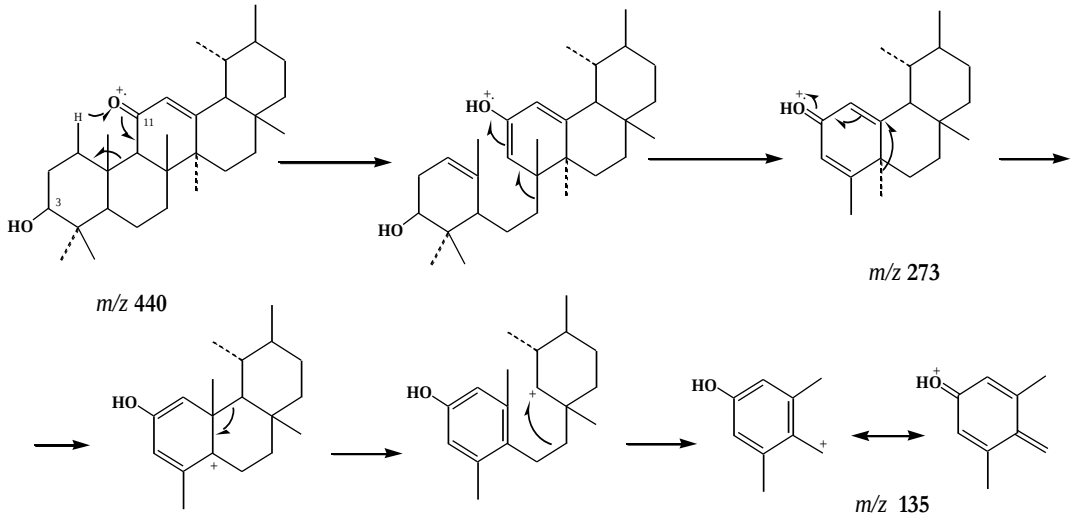


Figura **2.2.19** Esquema de fragmentação proposto para o α-Amirenonol.[323,351.]

O composto foi tentativamente identificado como 3β-hidroxi-urs-12-en-11-ona (α-Amirenonol, *2.2.3-7*)[323,351] (ver Apêndice-1).

O componente minoritário (**pico 2**), desta fracção apresentou um espectro de MS com o seguinte padrão de fragmentação: [M^+] a *m/z* 440 (13), [M^+ -15] a *m/z* 425 (6); [M^+ -18] a *m/z* 422 (10), perda de uma molécula de água e *m/z* 407 (7), [M^+-15-18]. Apresentou também o ião *m/z* 232 (18), que foi interpretado como sendo devido à clivagem do anel C via fragmentação RDA (fragmento ***a***, figura 2.2.9) com possível presença de um grupo CHO ou no anel D ou no anel E, e o ião *m/z* 411 (8), $[M-29]^+$ normalmente indicador de perda de grupo aldeído CHO, racionalizado como estando em C-28. Os fragmentos *m/z* 218 (100), fragmento ***c*** (insaturação em C_{12}-C_{13} (figura 2.2.9)), *m/z* 203 (56), ião $[\boldsymbol{c}\text{-}15]^+$, e *m/z* 189 (36), $[\boldsymbol{b}\text{-}18]^+$, são reflexo da presença de esqueleto carbonado derivado do oleanano/ursano.[271] O composto foi tentativamente identificado como sendo o 3β-hidroxi-urs-12-en-28-al (aldeído ursólico, *2.2.3-6*) (ver Apêndice-1).

Por último o componente dominante da fracção **2D** (**pico 3**), apresentou também um padrão de fragmentação característico de esqueleto carbonado derivado do oleanano/ursano; ião molecular [M^+] a *m/z* 442 (11); ião $[M-15]^+$ a *m/z* 427 (9); ião $[M-18]^+$

a *m/z* 424 (3); ião $[M-CH_2OH]^+$ a *m/z* 411 (15); ião $[M-15-18]^+$ a *m/z* 409 (4); pico base a *m/z* 218 (100) (fragmento ***c***); ião $[\boldsymbol{c}-15]^+$ a *m/z* 203 (53), *m/z* 189 (28) e o ião *m/z* 234 (31) (fragmento ***a***) devido à clivagem do anel C via fragmentação RDA, com presença de um grupo CH_2OH ou no anel D ou no anel E. O ião molecular *m/z* 442 e o fragmento *m/z* 406 (11) $[M-18-18]^+$ suportaram a presença de um diol triterpénico, urs-12-en-3β,28-diol (Uvaol, *2.2.3-9*)[272](ver Apêndice-1). Esta identificação foi confirmada com padrão.

Refira-se que o uvaol é um composto comum em plantas da família das Ericáceas, à qual o medronheiro pertence. É um dos compostos mais característicos do género *Arctostaphylos*, em especial da uva-ursina (*A. uva-ursi*).[342]

Devido ao facto de esta sub-fracção ser de reduzidas dimensões (~5 mg) não se efectuou o isolamento dos seus componentes.

Esta é a primeira citação destes compostos como constituintes do medronho.

Fracção 3: O cromatograma de HPLC-MS desta fracção mostrou apenas um pico, figura 2.2.20.

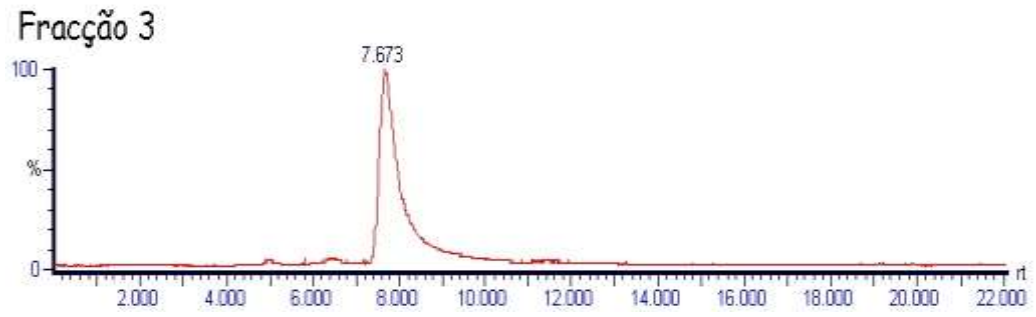


Figura **2.2.20** Cromatograma da fracção **3** do extracto neutro dos medronhos obtido por HPLC-PBMS (ver Parte Experimental).

No entanto, a sua análise por ^{13}C-NMR mostrou ser uma mistura de 2 isómeros (figura 2.2.21); Esta conclusão deveu-se ao facto do espectro desta mistura apresentar 2 pares de sinais na zona 120-160 ppm atribuíveis segundo a literatura[254,255] aos carbonos olefínicos C-12 e C-13 de estruturas derivadas da α- e β-amirinas, juntamente com dois

sinais na zona δ e também dois valores distintos na zona dos ~δ 180 (176 e 181 ppm), atribuíveis a função carboxilo.

O recurso à TLC preparativa permitiu a separação destes dois isómeros (sílica gel (tolueno: acetona: ácido acético (100:3:0,07)). Obtiveram-se dois componentes. Rf = 0,65 e Rf = 0,42, sendo o de maior Rf o composto dominante.

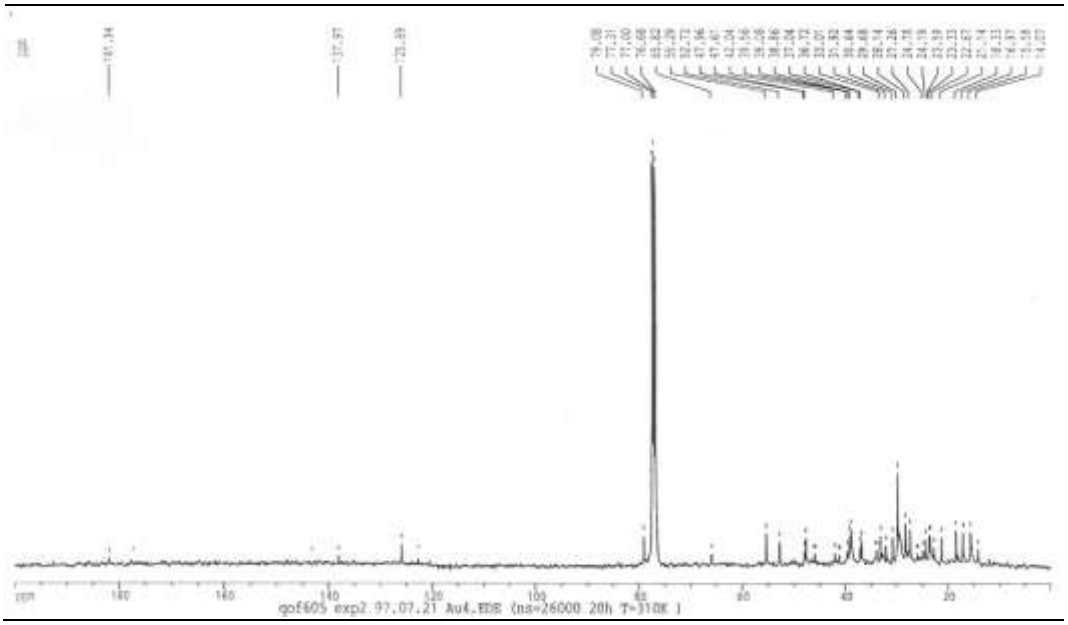


Figura **2.2.21** Espectro de ^{13}C-NMR da fracção **3** do extracto neutro dos medronhos (ver Parte Experimental). Mistura dos ácidos ursólico e oleanólico.

Os espectros de massa destes dois compostos mostraram-se bastante similares. Ambos apresentaram padrão de fragmentação (previsível) de derivados da série ursano/oleanano. O espectro do primeiro componente (*2.2.3-10*) mostrou ião molecular [M$^+$] a *m/z* 456 (4); o ião *m/z* 248 correspondente ao pico base, foi interpretado como sendo devido à clivagem do anel C via fragmentação RDA (fragmento ***a***, figura 2.2.9) e indicou a possível presença de um grupo COOH no anel D ou no anel E; ião [M-18]$^+$ a *m/z* 436 (1); ião [M-15-18]$^+$ a *m/z* 423 (1); o ião [M-COOH-18]$^+$ a *m/z* 392 (3) e o intenso ião [***a***-45]$^+$ a *m/z* 203 (69), sustentaram a perda de COOH como provável localização em C-28.[322] O composto apresentou como bandas de IV mais significativas 3434 cm^{-1} (OH), 1693 cm^{-1} (C=O) e 1645 cm^{-1} (C=C).

Tabela **2.2.7** Desvios químicos (δ) de ^{13}C-NMR dos Ácidos ursólico e oleanólico. Solvente: $CDCl_3$

	Ácido Ursólico	lit.[248]	**Ácido Oleanólico**	lit.[249]
C-1	38.86	38.7	38.52	38.5
C-2	23.59	23.5	27.29	27.4
C-3	79.08	79.0	79.07	78.7
C-4	39.56	39.6	38.67	38.7
C-5	52.72	52.7	55.31	55.2
C-6	18.33	18.3	18.34	18.3
C-7	33.01	33.0	32.65	32.6
C-8	39.08	39.1	39.33	39.3
C-9	47.62	47.6	47.63	47.6
C-10	36.72	36.7	37.05	37.0
C-11	23.59	23.7	23.82	23.8
C-12	127.08	127.0	122.82	122.7
C-13	138.42	138.4	145.05	143.4
C-14	42.04	42.0	42.07	41.6
C-15	29.68	29.4	27.67	27.7
C-16	23.33	23.3	23.33	23.4
C-17	47.96	47.9	46.63	46.6
C-18	55.29	55.3	41.27	41.3
C-19	30.64	30.6	45.82	45.8
C-20	30.46	30.4	30.65	30.6
C-21	27.26	27.3	33.82	33.8
C-22	37.04	37.0	32.35	32.3
C-23	23.33	23.4	28.08	28.1
C-24	16.97	17.0	15.57	15.6
C-25	16.97	17.0	15.33	15.3
C-26	15.58	15.5	16.97	16.8
C-27	24.19	24.2	26.08	26.0
C-28	176.08	176.0	181.07	181.0
C-29	21.14	21.1	32.65	33.1
C-30	22.67	23.4	23.82	23.6

Entretanto no seu espectro de ^{13}C-NMR, a presença dos sinais a δ 127.0 e 138.4, C-12 e C-13 respectivamente, juntamente com o sinal δ 176.0 (C-28) indicaram estarmos na presença de um derivado ursano (derivado da α-amirina).[254,338,353] O seu espectro de ^{1}H-NMR apresentou 5 grupos metilo terciários entre δ 0.78 e 1.07 (3H cada, s), e 2 grupos metilo secundários δ 0.86 e 0.94 (3H cada, dupletos, J = 7.0 Hz, H-19 e H-20), surgindo a multiplicidade do protão olefínico na forma de tripleto a δ 5.24 (J = 3.5 Hz, H-12). Além

disso o protão metínico axial em C-3 surge no ^{1}H-NMR como duplo dupleto a δ 3.20 com constantes de acoplamento próximas (8.5 Hz e 7.0 Hz), confirmando a orientação equatorial do hidroxilo em C-3 (biossinteticamente a única possível). O composto apresentou um valor de rotação específica $[\alpha]_D$ +65º (EtOH) (lit.[342] +67.5º) e um ponto de fusão de 283-287 ºC (lit.[342] 291 ºC). O composto, componente dominante desta fracção (22 mg, 62,8% da fracção), foi identificado como sendo o ácido ursólico (ácido 3β-hidroxi-urs-12-en-28-oico, *2.2.3-10).*[354] O outro isómero componente da mistura é o ácido oleanólico (ácido 3β-hidroxi-olean-12-en-28-oico, *2.2.3-11*) (13 mg, 37,1%). O seu espectro de ^{13}C-NMR (juntamente com o do ácido ursólico) encontra-se descrito na tabela 2.2.7. O seu espectro de ^{1}H-NMR (Apêndice-1) apresenta 7 grupos metilo terciários entre δ 0.74 e 1.15 (3H cada, s), surgindo o protão olefínco H-12 na forma de tripleto a δ 5.21 (J = 3.3 Hz). O protão H-3 axial surge a δ 3.24 (dd, J = 9.0 Hz e 7.0 Hz). O composto apresentou um valor de rotação específica $[\alpha]_D$ +82.3º ($CHCl_3$) e um ponto de fusão de 305-308 ºC (lit.[342] $[\alpha]_D$ +79.5º e p.f. 306-307 ºC).

Os dados obtidos estão de acordo com os dados mencionados na literatura[251,254,255, 342, 346, 355-359] para estes dois compostos. Estas identificações foram confirmadas com amostras autênticas.

Refira-se que estes dois ácidos representam os componentes dominantes do extracto direccionado a triterpenóides.

Saliente-se aqui o facto de a maioria dos triterpenóides por nós identificados no medronho serem compostos vulgarmente encontrados nas plantas superiores (ver figura 1.2.14), possuindo uma via biossintética bem conhecida.[34]

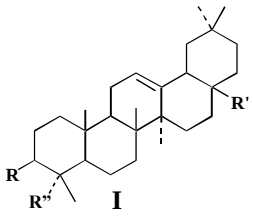
O ácido ursólico e o lupeol foram anteriormente descritos como constituinte das folhas e bagas de plantas da família das Ericáceas[342] dos géneros *Arctostaphylos uva-ursi, Vaccinium macrocarpon, Rhododendron hynenanthus,* tendo sido igualmente descritos na planta de *Arbutus unedo.*[360]

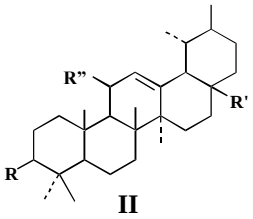
A composição do medronho em triterpenóides está descrita na tabela 2.2.8. Nas tabelas 2.2.9 e 2.2.10, encontram-se representadas as suas estruturas.

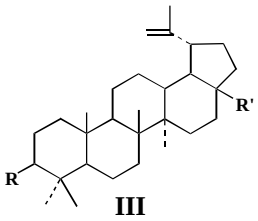
Tabela **2.2.8** Composição em triterpenóides do fruto de *Arbutus unedo*.

Compostos Identificados	*m/z* (int. rel. %)
Triterpenos Pentacíclicos	
Lupeona	**424**(M^+), 409, 381, 368, 313, 245, 233, 218, 207, 205(100), 203, 191, 189, 175, 161, 147, 135, 121, 109, 95, 83, 69, 55
α-Amirenona	**424**(M^+), 406, 391, 382, 355, 339, 313, 295, 255, 219, 218(100), 206, 203, 191, 189, 175, 161, 147, 135, 121, 119, 109, 95, 81, 69, 55
α-Amirina	**426**(M^+), 411, 408, 393, 385, 339, 313, 297, 286, 272, 257, 231, 219, 218(100), 207, 205, 203, 190, 189, 175, 161, 147, 135, 122, 109, 95, 93, 81, 69, 67, 55
β-Amirina	**426**(M^+), 411, 408, 393, 385, 355, 315, 313, 287, 273, 272, 257, 229, 220, 219, 218(100), 205, 203, 189, 175, 161, 147, 135, 121, 119, 109, 95, 93, 81, 69, 67, 57, 55
Lupeol	**426**(M^+), 411, 409, 408, 393, 365, 343, 317, 315, 297, 271, 257, 246, 229, 219, 218, 207(56), 205, 189, 175, 161, 149, 147, 135, 123, 121, 109, 107, 95(100), 93, 91, 81, 69, 67, 57, 55
Aldeído ursólico	**440**(M^+), 441, 425, 422, 411, 407, 394, 369, 353, 342, 329, 326, 311, 302, 273, 255, 243, 233, 232, 219, 218(100), 207, 203, 109, 189, 175, 163, 147, 135, 133, 121, 119, 107, 105, 95, 93, 91, 83, 81, 69, 55
α-Amirenonol	**440**(M^+), 425, 422, 413, 408, 407, 395, 353, 340, 313, 301, 299, 287, 274, 273(100), 271, 248, 235, 233, 232, 217, 203, 189, 175, 161, 149, 135, 133, 121, 119, 107, 105, 95, 93, 91, 83, 81, 69, 55
Olean-12-en-3β,23-diol	**442**(M^+), 424, 409, 408, 393, 365, 339, 315, 313, 297, 271, 257, 243, 229, 223, 219, 218(88), 205, 203(100), 191, 189, 175, 161, 147, 135, 121, 119, 109, 107, 105
Uvaol	**442**(M^+), 441, 438, 427, 426, 424, 411, 409, 408, 406, 390, 379, 339, 327, 297, 287, 274, 273, 271, 234, 218(100), 207, 203, 189, 175, 161, 149, 147, 135, 121, 119, 107, 105, 95, 81, 79, 69, 67, 55
Ácido Ursólico	**456**(M^+), 438, 423, 410, 392, 377, 351, 327, 301, 271, 257, 250, 249, 248(100), 235, 233, 220, 219, 215, 207, 204, 203, 199, 189, 175, 163, 147, 135, 133, 121, 119, 107, 105, 95, 93, 81, 69, 55
Ácido Oleanólico	**456**(M^+), 438, 423, 410, 392, 377, 351, 327, 301, 300, 271, 257, 249, 248(100), 235, 220, 219, 207, 204, 203, 199, 189, 175, 173, 163, 147, 135, 133, 121, 119, 107, 105, 95, 93, 81, 69, 55
Triterpenos Tetracíclicos	
5α-Colestano	**372**(M^+), 373, 358, 357, 287, 262, 232, 219, 218, 217(100), 203, 189, 175, 163, 150, 149, 148, 135, 123, 122, 121, 109, 108, 107, 95, 93, 83, 81, 79, 69, 67, 57, 55
Colestan-3-ona	**386**(M^+), 371, 353, 316, 273, 246, 230, 231(100), 217, 207, 189, 175, 163, 149, 135, 123, 109, 95, 83, 69, 67, 55
Colesterol	**386**(M^+), 387, 371, 368, 353, 329, 326, 301, 275, 273, 255, 247, 231, 214, 213, 199, 189, 173, 161, 147, 145, 133, 119, 105, 95, 91, 81(100), 69, 67, 57, 55
Estigmasterol	**412**(M^+), 397, 394, 379, 369, 351, 327, 314, 300, 299, 273, 272, 271, 255, 253, 241, 231, 229, 213, 199, 173, 159, 145, 133, 124, 107, 95, 83, 69, 55(100)
Estigmast-4-en-3-ona	**412**(M^+), 397, 370, 327, 289, 288, 271, 229, 211, 207, 177, 173, 161, 147, 135, 124(100), 107, 95, 83, 69, 57, 55
β-Sitosterol	**414**(M^+), 415, 399, 396, 381, 329, 309, 303, 285, 275, 273, 255, 231, 229, 213, 199, 163, 161, 159, 145, 107(100), 105, 95, 93, 91, 81, 69,

Tabela **2.2.9** Estruturas dos triterpenos pentacíclicos identificados no medronho.

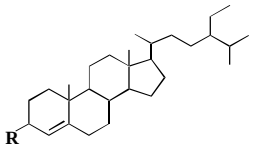




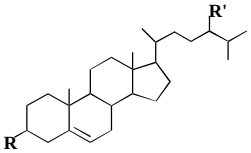


Composto	Triterpenos Pentacíclicos		Estrutura Tipo	*R*	*R'*	*R"*	M+
2.2.3 -	Nome comum	Nome sistemático					
1	**Lupeona**	Lup-20(29)-en-3-ona	**III**	O	CH_3	-	**424**
2	**α-Amirona**	Urs-12-en-3-ona	**II**	O	CH_3	H	**424**
3	**α-Amirina**	Urs-12-en-3β-ol	**II**	β-OH, H	CH_3	H	**426**
4	**β-Amirina**	Olean-12-en-3β-ol	**I**	β-OH, H	CH_3	CH_3	**426**
5	**Lupeol**	Lup-20(29)-en-3β-ol	**III**	β-OH, H	CH_3	-	**426**
6	**Aldeído ursólico** (Ursenal)	3β-Hidroxi-urs-12-en-28-al	**II**	β-OH, H	28-CHO	H	**440**
7	**α-Amirenonol**	3β-Hidroxi-urs-12-en-11-ona	**II**	β-OH, H	CH_3	O	**440**
8	**Oleanenodiol**	Olean-12-en-3β,23-diol	**I**	β-OH, H	CH_3	23-CH_2OH	**442**
9	**Uvaol**	Urs-12-en-3β,28-diol	**II**	β-OH, H	28-CH_2OH	H	**442**
10	**Ácido Ursólico**	Ácido 3β-Hidroxi-urs-12-en--28-óico	**II**	β-OH, H	28-COOH	H	**456**
11	**Ácido Oleanólico**	Ácido 3β-Hidroxi-olean-12-en--28-óico	**I**	β-OH, H	28-COOH	CH_3	**456**

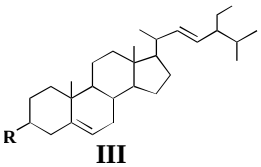
Tabela **2.2.10** Estruturas dos triterpenos tetracíclicos identificados no medronho.



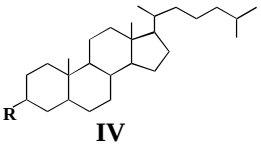
I



II



III



IV

Composto	Triterpenos Tetracíclicos		Estrutura Tipo	*R*	*R'*	M^+
2.2.4-	Nome comum	Nome sistemático				
1	**Colestano**	5α-colestano	**IV**	H	-	**372**
2	**Colestanona**	5α-colestan-3-ona	**IV**	O	-	**386**
3	**Colesterol**	Colest-5-en-3β-ol	**II**	β-OH, H	H	**386**
4	**Estigmasterol**	Estigmasta-5,22-dien-3β-ol	**III**	β-OH, H	-	**412**
5	**Estigmastenona** (β-Sitostenona)	Estigmast-4-en-3-ona	**I**	O	-	**412**
6	**β-Sitosterol**	Estigmast-5-en-3β-ol	**II**	β-OH, H	CH_2CH_3	**414**

2.3.0 Compostos Básicos

Como foi referido em 2.1.0, o extracto global (metanol: água (1:1)) dos medronhos, foi fraccionado de acordo um esquema de extracção por solventes usualmente utilizado (esquema 2.1.0). Foram obtidas seis fracções. A fracção V (F.V), segundo o referido esquema, corresponderia a compostos com carácter básico, no entanto não foi obtido qualquer vestígio orgânico detectável nesta fracção.

Foi também efectuada uma extracção especialmente dirigida a compostos básicos (ver parte experimental), tendo sido obtido um resultado semelhante (nulo) ao obtido na extracção global.

A existirem compostos básicos (por ex. alcalóides) estarão presentes em quantidades muito pequenas, não detectadas pelos métodos cromatográficos empregues. Refira-se que se utilizou sempre a sensibilidade máxima dos instrumentos. Neste caso particular, foi também utilizada a detecção específica com recurso ao detector azoto-fósforo, NPD, no extracto em natureza e derivatizado por trimetilsililação, na análise por HRGC.

2.4.0 Compostos Glicosados

As diferenças morfológicas do fruto em relação ao resto da planta como já anteriormente foi referido, poderão permitir, em alguns casos, a existência de diferenciação química entre estes.

As *Ericáceas* em geral e, o *Arbutus unedo* em particular, são quimiotaxonomicamente caracterizados, entre outros, por um fenol glicosado, a arbutina (estando nesta espécie normalmente associadas às metilarbutina, hidroquinona e metil-hidroquinona) variando a concentração em função da espécie.[53]

Objectivou-se o seu isolamento e identificação nos frutos de *Arbutus unedo,* uma vez que este composto glicosado, para além do seu interesse sistemático e ecológico, possui ainda uma particular actividade farmacológica.[55,56]

A partir da fracção I (F.I) (proveniente da extracção global (2.1.0) dos frutos), fracção correspondente a compostos muito polares, efectuou-se uma extracção direccionada a compostos glicosados. Desta extracção (ver parte experimental) não foi obtido qualquer resíduo detectável. De modo a confirmar o resultado obtido, extraíram-se pelo mesmo método, folhas de *Arbutus unedo* provenientes das mesmas plantas de onde foram recolhidos os frutos. A fracção foi controlada por TLC (RP-18, acetato de etilo/água (7:3)), sendo utilizados reveladores específicos de acordo com a natureza desta fracção: *Berlin Blue* e *Millons.*[100,319] Na fracção obtida das folhas, foram isolados e identificados os 4 compostos associados a esta família de plantas: arbutina, metilarbutina, hidroquinona e metil-hidroquinona. A sua identificação (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR e IV, ver Apêndice-3) foi confirmada por comparação com padrões. A figura 2.4.0 mostra o cromatograma de HPLC-RI da referida fracção. A quantificação destes compostos foi efectuada por HPLC-RI (coluna de L = 250 mm, d.i. = 4 mm empacotada com *Lichrosorb* RP-18 Select B®, d_f = 5 μm (E. Merck, Darmstadt, Alemanha), eluente acetato de etilo/HCOOH/ H_2O (88: 6: 6s)) utilizando-se o resorcinol (1,3-benzenodiol) como padrão

interno. Para o efeito usaram-se as médias das áreas percentuais relativas ao padrão interno adicionado ao extracto. Os resultados obtidos foram convertidos em valores percentuais (*w*/*w*) relativamente às folhas de medronheiro secas.

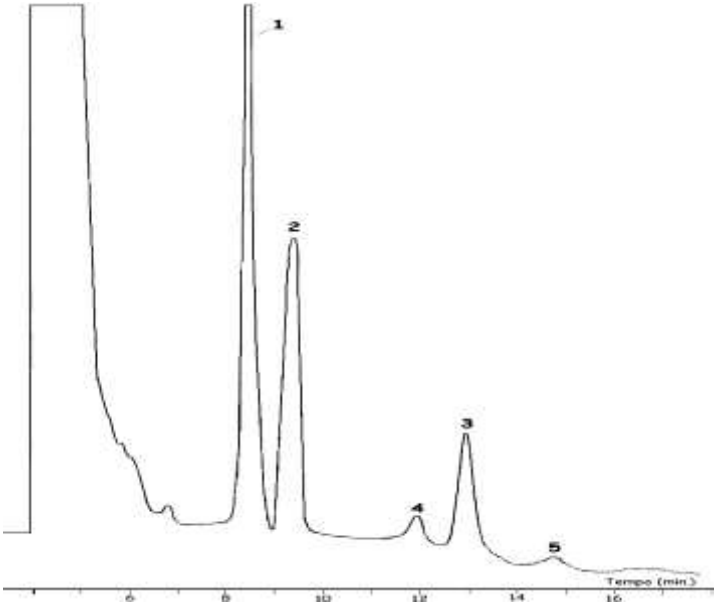


Figura **2.4.0** Cromatograma de RP-HPLC-RI da fracção correspondente a compostos fenólicos das folhas de *Arbutus unedo*.
Picos: **1**- Arbutina, **2**- Resorcinol (Pi), **3**- Metilarbutina, **4**- Hidroquinona, **5**- Metil-hidroquinona. (ver Parte Experimental).

Os resultados obtidos (*n* = 3) foram: arbutina (hidroquinona β-D-monoglucopiranósido) 6%, metilarbutina 2,6%, e hidroquinona e metil-hidroquinona, inferiores a 0,5% (0,38 e 0.07%, respectivamente) (Apêndice-3). Estes valores estão de acordo com os descritos na literatura.[52-54]

Estes resultados confirmaram a existência destes compostos na planta, mas não no fruto. Também neste caso, a existirem no fruto estarão em quantidades residuais, não detectáveis pelos métodos utilizados.

2.5.0 Análise Bromatológica

Os medronhos, quando atingem a plena maturação são, como já foi referido, de uma bela cor vermelha viva, sendo no seu desenvolvimento, verdes e depois amarelos. Na tabela 2.5.0 referem-se as dimensões médias dos medronhos estudados. A polpa, de cor amarela, uniformemente distribuída do exterior ao interior, tenra, de sabor doce (na maturidade), com retrogusto acídulo, continha numerosas sementes no interior (ver foto da esquerda da figura 2.5.0).

Tabela **2.5.0** Dimensões médias dos frutos maduros de *Arbutus unedo*.

altura (cm)	1,7 - 2,6
largura (cm)	1,8 - 2,5
espessura (cm)	1,8 - 2,5
peso médio (g)	5,5 - 8,3

2.5.1 Composição Química do Medronho

O exterior do medronho é coberto de "cicatrizes" vermelhas que contêm antocianinas. Segundo a literatura,[48] a sua composição em antocianinas distribui-se do seguinte modo: delfinidina-3-*O*-galactósido (10%), cianidina-3-*O*-galactoglucósido (67%) e a cianidina-3-*O*-galactósido (23%), valores típicos da família *Ericáceas*.

Também segundo a literatura,[74] o miolo do fruto é colorido de amarelo por carotenóides nomeadamente: licopeno, β-caroteno, α-caroteno; e as xantófilas: violaxantina, zeaxantina, luteína e criptoxantina.

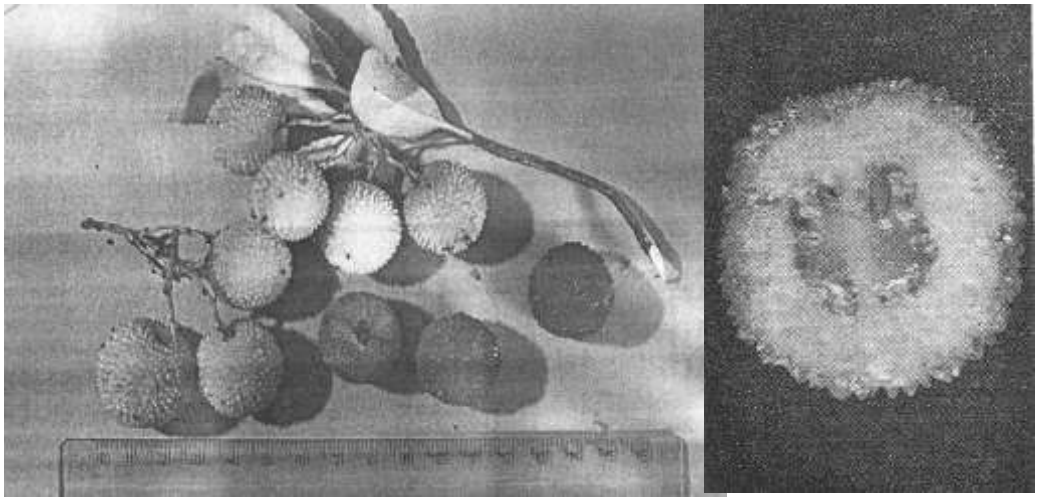


Figura **2.5.0** Medronhos em diferentes estados de maturação (dimensões médias) (foto da esquerda);[13] Corte transversal de um fruto, pormenor (foto da direita).[361]

Quanto ao uso alimentar e, como já foi referido anteriormente (secção 1.1.0), os frutos, apesar de serem agradáveis, doces, saborosos e aromáticos, são um pouco indigestos (devido à quantidade de celulose) e provocam uma indefinida sensação de mal-estar (*unedo* - eu como só um); Como consequência, em Portugal, os frutos são utilizados predominantemente no fabrico de aguardente.

Da observação das análises bromatológicas descritas na literatura (tabelas 2.5.1-2.5.3) surge a indicação de que os medronhos possuem quantidades apreciáveis de açúcar total e pectinas, um reduzido teor em ácidos, sendo uma fonte de vitaminas e carotenóides; são especialmente ricos em ácido ascórbico (vitamina C).[362] Em relação a este último aspecto e reportando-nos a um estudo comparativo do teor em vitamina C em relação a outros frutos[13] verifica-se que o medronho é um fruto rico nesta vitamina: 8,2 mg (25 g de polpa) para o medronho, 4 mg para peras e pêssegos, 5 mg para maçãs e ameixas, e 7 mg para as ginjas (determinação pelo método da 2,4-Dinitrofenil-hidrazina). O teor de vitaminas, ferro e outros constituintes minerais atribui ao medronho um elevado valor nutritivo e fisiológico.[363] Em termos energéticos 100 g de polpa equivalem a 55-80 calorias.[364,365]

Tabela **2.5.1** Análise do fruto maduro: composição em g ou mg por 100 g de polpa.[13]

Humidade	80,2
Matéria Seca	19,8
Açúcar total (método *Febling*)	11,2
Proteína (método *Folin*)	0,76
Acidez titulável (expressa em ácido málico) mg	281
pH	3,7

Tabela **2.5.2** Análise da matéria seca contida nos frutos.[13]

Matéria Seca (%)	% sobre a matéria seca				
	Proteína bruta	Lípidos bruta	Matéria não azotada	Fibra Bruta	Cinzas
28,7	2,6	3,4	73,6	18,4	2,0

Tabela **2.5.3** Cor, actividade da *PME*, ácidos orgânicos, vitaminas, e compostos fenólicos no medronho maduro (valores referidos à matéria seca).[23]

Cor	L*	59,82
	a*	18,75
	b*	38,11
Actividade *PME* [ix] (U/ml) (**)		0,13
Ácidos Orgânicos (mg/100 g)	L-Málico	265,7
	Fumárico	0,7
Vitaminas (mg/100 g)	Niacina	9,1
	Ácido Ascórbico	346,3
	β-Caroteno	70,9
Compostos Fenólicos	Fenóis totais	1,46
(g catequina/100 g)	Taninos	0,17

Colorimetria: A cor do homogeneizado fresco foi analisada para valores de L, a e b usando a escala de "lightness", vermelha e verde num *Minolta CR-200 Croma Meter*; padrão branco com as características: L* = 23,18; a* = 5,30; b* = 15,86);
(**)-Uma **unidade de actividade** é definida como a quantidade de enzima que liberta da pectina 1 mmol de grupos carboxílicos/min. a 30 ºC e pH 7,5. A actividade da PME obtida por titulação de acordo com Versteeg *et al.*.[366]

[ix] Enzima pectinametil-esterase, PME, envolvida na desmetilação das substâncias pécticas (Blinder *et al.*)[368], cuja actividade aumenta ao longo do amadurecimento dos frutos.

O medronho não consta da Tabela de Composição dos Alimentos Portugueses[369] No entanto e, de acordo com a sistematização estabelecida na referida tabela (ainda em vigor), baseando-nos no agrupamento por afinidades e características de composição e no significado dos constituintes que apresentam maior interesse pela quantidade em que se encontram nos produtos e pela importância nutricional de que se revestem, os medronhos enquadram-se no grupo V (Produtos hortícolas, frutos).

Este grupo é predominantemente constituído por alimentos pobres em proteínas e de valor energético baixo ou médio. Na generalidade são bons fornecedores de ácido ascórbico, de elementos minerais e de celulose.[22,369]

Para a execução da análise bromatológica utilizou-se a totalidade dos frutos frescos. Na tabela 2.5.4, assinala-se a composição (teores percentuais) dos medronhos estudados. Os resultados obtidos estão de acordo com os valores da literatura, já citados.[13]

Tabela **2.5.4** Análise bromatológica do medronho maduro: composição em g por 100 g de parte edível. Condições ver Parte Experimental.

Parte edível	100%
Água	74,6
Matéria seca	25,4
Matéria Gorda	0,5
Glúcidos Totais	16,7
Frutose	10,7
Glucose	5,1
Sacarose	-
Proteína	1,2
Celulose	3,2
Cinzas	0,8
pH do fruto	3,9
Valor energético (calorías)	76,1

Por questões várias, não nos foi possível a determinação dos teores em vitaminas e constituintes minerais, os quais viriam completar a análise bromatológica efectuada.

2.6.0 Compostos de Pequena Massa Molecular e Baixo Ponto de Ebulição

Pelo facto de a nossa amostra ser um fruto, efectuámos também um processo extractivo direccionado a compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição e, eventualmente perdidos na extracção global. Estes, compostos voláteis, completam os componentes do sabor dos frutos e estão normalmente associados a uma enorme variedade estrutural: ácidos, alcoóis, aldeídos, cetonas, éteres, ésteres, acetais, hidrocarbonetos, fenóis, lactonas, compostos de enxofre, aminas e, moléculas heterocíclicas.

A análise química do medronho ficaria, a nosso ver, incompleta se não se tivesse também em conta esta fracção.

Efectuaram-se então análises dos componentes voláteis em dois anos consecutivos (1997 e 1998); o processo extractivo utilizado foi a hidrodestilação - extracção simultânea (SDE) e o extractor o aparelho modificado de *Likens-Nickerson* (ver Parte Experimental).[133,190-192,204]

Para a identificação utilizou-se HRGC com duas colunas em simultâneo de polaridade diferente, DB-1™ (fase ligada de 100% dimetilpolisiloxano (J & W)) e DB-17HT™ (fase ligada de 50% fenil, 50% dimetilpolisiloxano (J & W)) e HRGC-MS(ITD). Tal procedimento visou a detecção de co-eluições. Na determinação da composição dos extractos foi efectuada co-injecção com compostos padrão e/ou co-injecção com "extractos padrão"[x] (*Thymus caespititius*, *Citrus sp., Eugenia cariophylla*, Óleo de *Rosa damascena*) tendo sido efectuada a comparação dos índices de retenção (Ip, ver Parte Experimental) dos componentes com os dos padrões e/ou os Ip descritos na literatura. Foi também efectuada a comparação dos espectros de massa de ITD dos componentes do extracto com os dos padrões obtidos nas mesmas condições experimentais e/ou os espectros de ITD descritos na literatura.

[x] Designámos "extracto padrão" os extractos cuja composição se conhece (está descrita na literatura), sendo os espectros de massa (ITD) dos seus componentes igualmente bem conhecidos.[372,373]

2.6.1 Composição em Compostos de Pequena massa Molecular e Baixo Ponto de Ebulição

A figura 2.6.1 ilustra os cromatogramas obtidos em simultâneo, para o extracto correspondente ao ano de 1997 com duas colunas de polaridade diferente DB-1™ e DB-17HT™ (índices de polaridade 5 e 24 respectivamente)*

As figuras 2.6.2 e 2.6.3 mostram os traçados de corrente iónica total (TIC) obtidos por GC-MS(ITD) do extracto em natureza, para os anos de 1997 e 1998, respectivamente.

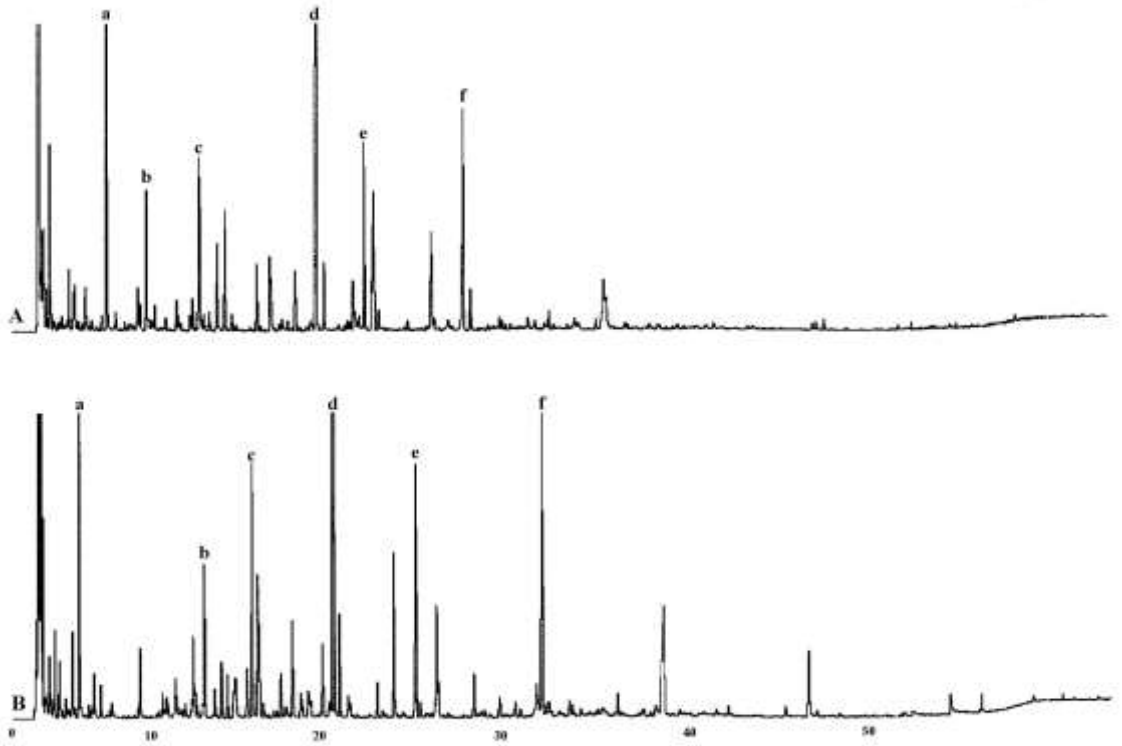


Figura **2.6.1** Cromatograma do extracto em natureza, correspondente aos compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição dos frutos de *Arbutus unedo* (para o ano de **1997**). Forno: 45º - 3º/min. - 175º - 15º/min. - 300 ºC (10 min.); (**A**) - Coluna DB-17HT (d_f = 0,15 μm, L = 30 m, d.i. = 0,25 mm); (**B**) - Coluna DB-1 (d_f = 0,25 μm, L = 30 m, d.i. = 0,25 mm, ver Parte Experimental). Compostos dominantes: **a** – 2-Furfural, **b** – Limoneno, **c** – Terpinoleno, **d** – α-Terpineol, **e** – β-Damascona, **f** – β-Cariofileno.

* Nota: A escala de polaridade varia de 1 – 60.

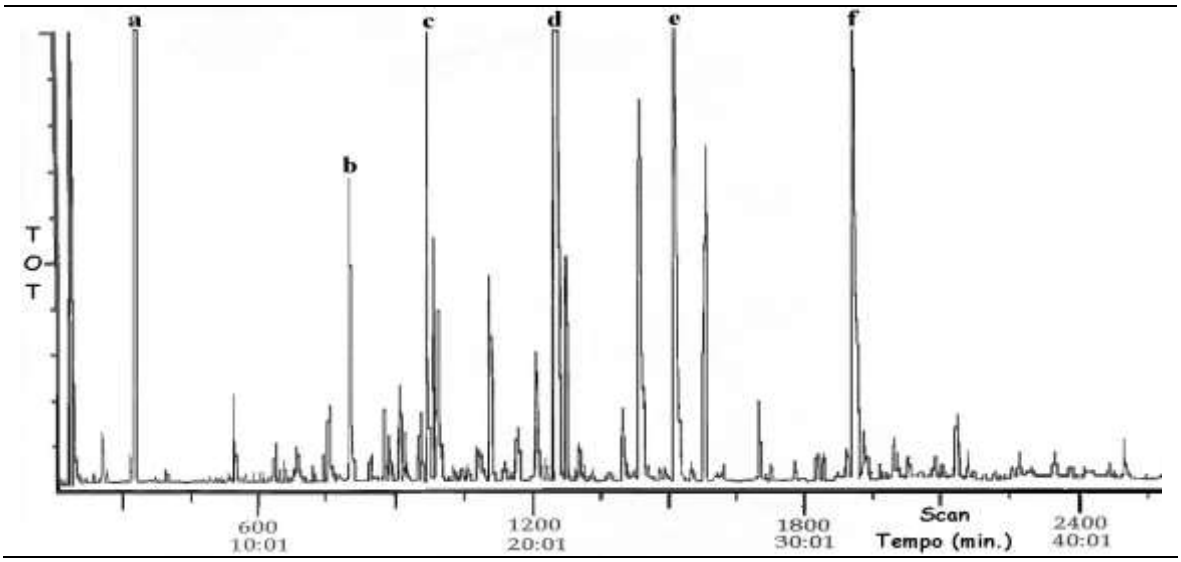


Figura **2.6.2** Traçado de corrente iónica total (TIC) obtido por GC-MS(ITD) do extracto em natureza, correspondente aos compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição dos frutos de *Arbutus unedo* (para o ano de **1997**). Forno: 45º - 3º/min. - 175º - 15º/min .- 300 ºC(10 min.); Coluna DB-1 (d_f = 0,25 μm, L = 30 m, d.i. = 0,25 mm; ver Parte Experimental). Compostos dominantes: **a** – 2-Furfural, **b** – Limoneno, **c** – Terpinoleno, **d** – α-Terpineol, **e** – β-Damascona, **f** – β-Cariofileno.

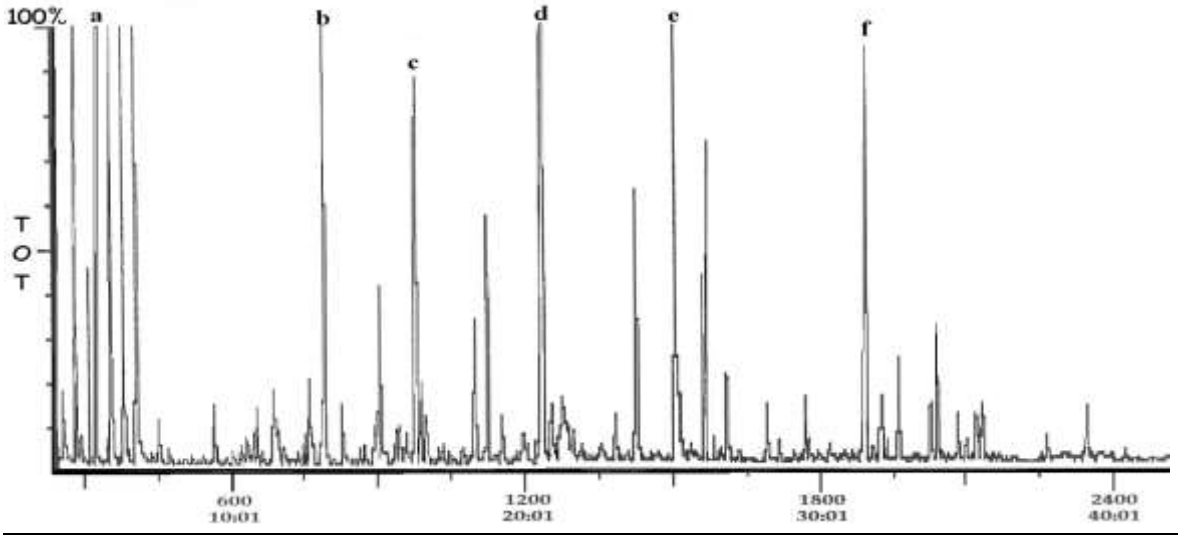


Figura **2.6.3** Traçado de corrente iónica total (TIC) obtido por GC-MS(ITD) do extracto em natureza, correspondente aos compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição dos frutos de *Arbutus unedo* (para o ano de **1998**). Forno: 45º-3º/min. - 175º-15º /min. - 300 ºC (10 min.); Coluna DB-1 (d_f = 0,25 μm, L = 30 m, d.i. = 0,25 mm; ver Parte Experimental). Compostos dominantes: **a** – 2-Furfural, **b** – Limoneno, **c** – Terpinoleno, **d** – α-Terpineol, **e** – β-Damascona, **f** – β-Cariofileno.

Dos resultados obtidos com as duas colunas verificou-se que para os dois extractos em estudo a separação cromatográfica com a coluna DB-1 (a coluna de menor polaridade) foi a mais eficaz, tendo apenas sido detectadas 2 co-eluições no extracto

correspondente ao ano de 1997 (picos 27 e 34, figura 2.6.2.1) e uma co-eluição (pico 41, figura, 2.6.3.1) no extracto de 1998. O número de co-eluições detectadas aumentou com o incremento da polaridade das colunas utilizadas.

Como já foi referido na página 121, na identificação dos componentes dos extractos foram utilizados os índices de retenção experimentais Ip dos componentes dos extractos e efectuada a comparação com os Ip de amostras autênticas ou comparação com os Ip dos componentes de "extracto padrão". Foi igualmente efectuada a correlação com os Ip descritos na literatura.[215,374-381] Os resultados obtidos, estão apresentados na tabela 2.6.2 e advêm da separação com a coluna DB-1, a coluna que se mostrou mais eficaz na separação dos componentes das matrizes estudadas.

O perfil de fragmentação dos espectros de massa dos componentes, obtidos em ITD e, a comparação com os espectros de massa dos padrões obtidos nas mesmas condições experimentais e/ou a comparação, com espectros de MS-ITD da literatura,[215] foi outro dos critérios utilizados na identificação dos componentes voláteis. Notar que os espectros de massa de ITD poderão, em alguns casos, ser completamente diferentes dos espectros descritos nas bibliotecas ("*libraries*") mais correntes que utilizam o quadropólo (ver 1.3.1.1). No Apêndice-2A estão ilustrados os ajustes obtidos, bem como a comparação com os espectros de quadropólo para os 6 componentes dominantes das 2 matrizes estudadas.

Foram também executadas co-injecções com padrões para confirmar as identificações efectuadas.

Relativamente aos componentes para os quais não foi possível obter padrão (cerca de 21% do total dos compostos identificados nesta fracção), a identificação foi efectuada por correlação dos seus Ip com os Ip descritos na literatura,[215] comparação dos seus espectros de massa com os espectros de ITD descritos na literatura[215] e, correlação com os espectros de quadropólo contidos nas bibliotecas *Wiley* e *NBS*.

As figuras 2.6.2.1 (pág. 125) e 2.6.3.1 (pág. 127) são traçados expandidos correspondentes às figuras 2.6.2 e 2.6.3 e nelas estão assinalados os componentes identificados em cada um dos extractos. A identidade dos picos está referida nas tabelas 2.6.0 e 2.6.1. Nestas tabelas estão igualmente descritos os espectros de massa de ITD dos compostos.

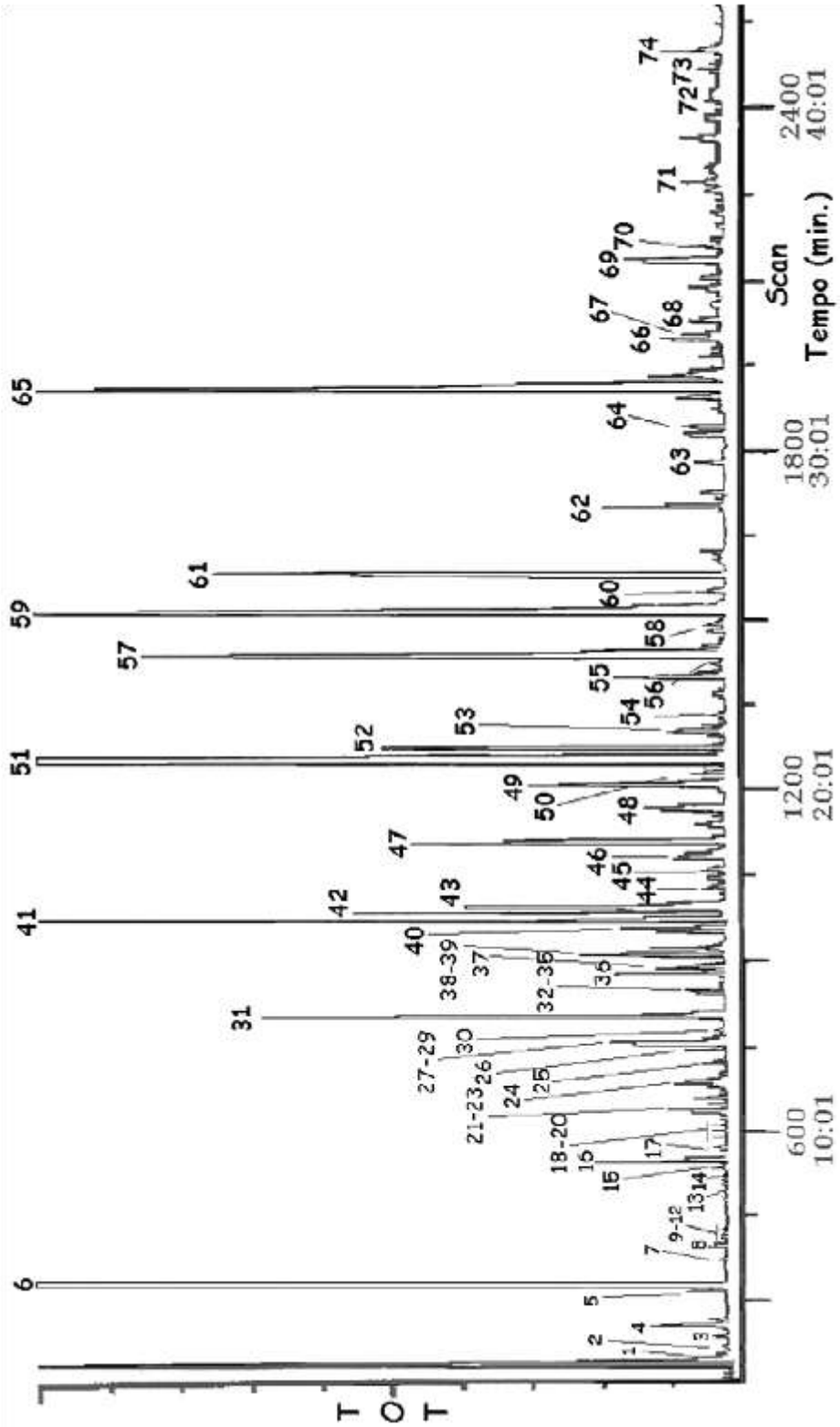


Figura **2.6.2.1** Figura expandida do traçado de corrente iónica total (TIC) (figura 2.6.2) obtido por GC-MS(ITD) a partir do extracto em natureza, correspondente aos compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição dos frutos de *Arbutus unedo* (para o ano de **1997**). Identidade dos picos de acordo com a tabela 2.6.0.

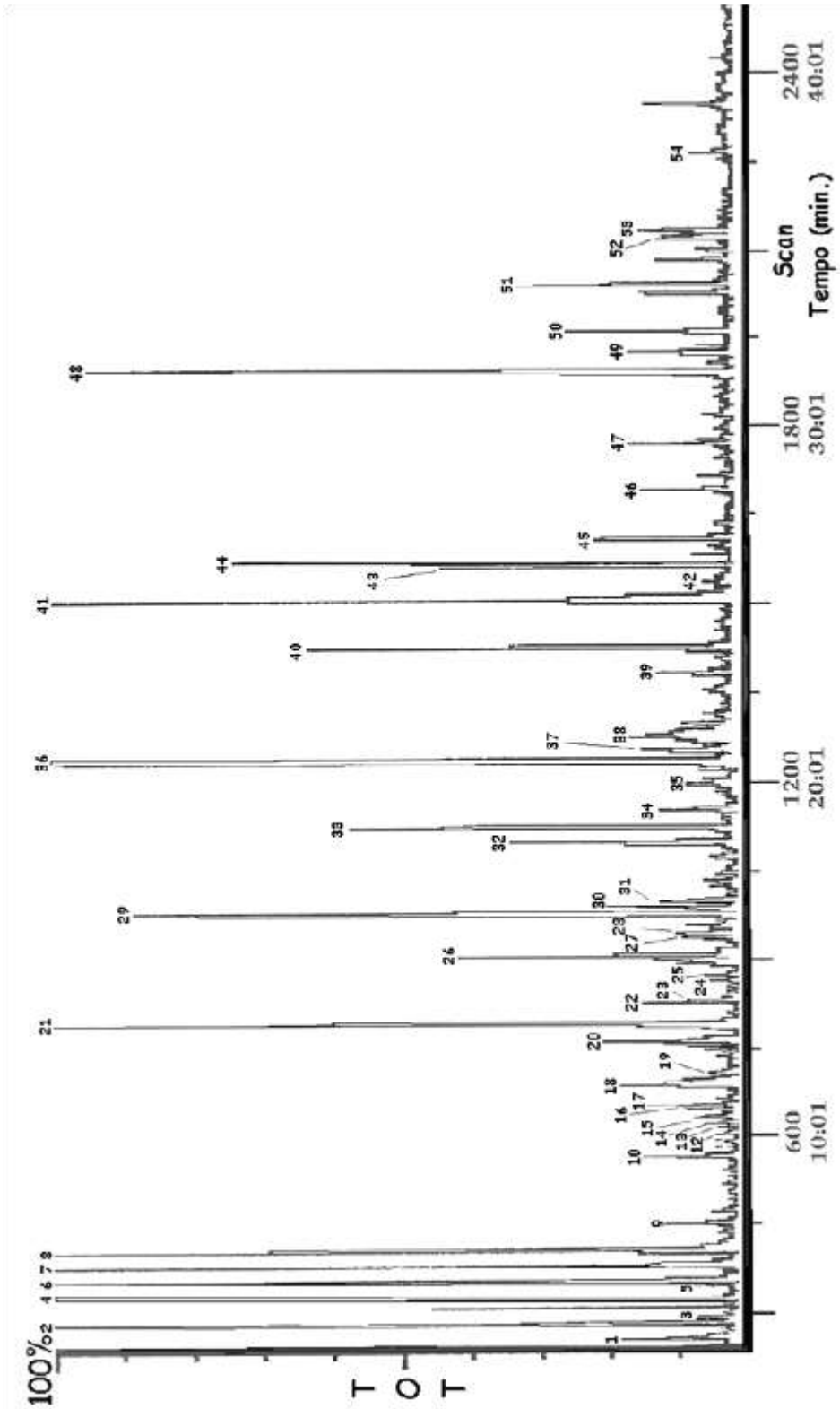


Figura **2.6.3.1** Figura expandida do traçado de corrente iónica total (TIC) (figura 2.6.3) obtido por GC-MS(ITD) do extracto em natureza, correspondente aos compostos de pequena massa e baixo ponto de ebulição molecular dos frutos de *Arbutus unedo* (para o ano de **1998**). Identidade dos picos de acordo com a tabela 2.6.1.

Tabela **2.6.0** Compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição, identificados por HRGC-MS(ITD) num extracto específico (ano de **1997**) dos frutos de *Arbutus unedo*. Picos assinalados na figura 2.6.2.1.

Pico Nº	Composto	Scan	*m/z* (int.rel.%)
1	***n-Butanol***	184	56(44), 41(77), 43(70), 42(24), 55(16)
2	***n-Heptano***	209	41(100), 43(91), 45(5), 53(3), 57(28), 70(26), 71(32)
3	***Álcool isoamílico***	235	41(86), 42(54), 43(45), 53(12), 55(83), 57(28), 67(3), 70(M-18)(22), 71(4)
4	***5-Hexen-2-ona,***	244	43(92), 55(100), 41(28), 83(88), **98**(M^+)(23)
5	***n-Octano***	305	41(89), 43(100), 57(33), 70(12), 71(14), 84(11), 85(M-29)(29)
6	***2-Furfuraldeído***	323	42(6), 50(3), 67(6)(M-29), 95(100), **96**(M^+)(43)
7	*trans-**2-Octeno***	365	41(100),42(34), 43(65), 44(29), 55(92), 56(13), 59(9), 69(39), 70(7), 83(32), 97(3), **112**(M^+)
8	*trans-**3-Hexen-1-ol***	386	41(100), 42(31), 43(43), 44(21), 55(78), 57(11), 67(77), 69(12), 81(6), 82(M-18)(23)
9	***5-Metileno-2-norborneno***	395	43(7), 44(34), 45(2), 50(39), 51(48), 63(3), 65(11), 66(49), 73(3), 77(40), 78(45), 79(13), 91(100), 105(23), **106**(M^+)(19)
10	***n-Hexanol***	428	41(97), 42(45), 43(61), 55(60), 56(100), 69(33), 73(2), 85(1)
11	***n-Heptanal***	447	41(100), 42(45), 43(70), 44(86), 55(50), 57(35), 70(40), 81(22), 85(8) (M-29), 96
12	*trans-**Salveno***	453	41(73), 55(29), 59(25), 67(100), 82(25), 85(5), 95(9), 109(9), **124**(M^+)(5)
13	***2-Acetilfurano***	490	42(34), 43(32), 53(50), 67(42), 81(<1), 95(100), **110**(M^+)(34)
14	*p-**Metilanisol***	524	44(95), 50(21), 51(37), 55(72), 63(13), 69(61), 77(68), 79(80), 91(7), 97(7), 107(55), 121(35), **122**(M^+)(100)
15	***Tricicleno***	529	41(36), 43(17), 51(21), 53(35), 55(12), 65(11), 67(25), 77(53), 79(47), 91(77), 93(100), 105(10), 121(8), **136**(M^+)(4)
16	***Benzaldeído***	537	44(13), 50(29), 51(36), 63(3), 74(8), 77(47), 78(2), 92(3), 105(34), **106**(M^+)(23)
17	***5-Metilfurfural***	559	43(73), 50(44), 51(45), 53(100), 69(<1), 73(6), 81(68), 95(2), 109(89), **110**(M^+)(66), 111(3)
18	***n-Heptanol***	582	41(33), 42(15), 43(39), 55(100), 70(50), 83(8), 98(M-18)(1)
19	***Álcool Yomogi***	601	41(61), 43(100), 55(31), 59(8), 67(40), 69(32), 71(45), 79(20), 81(33), 93(18), 95(5), 109(10), 111(2), 121(23), 136(M-18)(4), 139(28)(M-15)
20	***Furfurilmetil metilsulfureto***	612	53(38), 65(15), 69(1), 81(100), 95(2), 91(2), **128**(M^+)(3)
21	***Mesitileno***	616	41(25), 43(65), 45(4), 50(13), 51(6), 63(8), 77(25), 79(34), 91(13), 103(20), 105(100), **120**(M^+)(19)
22	*p-**Ment-3-eno***	620	41(50), 55(37), 67(78), 79(13), 81(100), 82(34), 95(13), 96(16), 109(10), 123(<1), **138**(M^+)(10)
23	***n-Octanal***	625	41(100), 43(64), 55(38), 56(47), 57(35), 67(31), 68(19), 69(25), 72(3), 81(14), 82(15), 84(13), 85(3), 95(7), 110(1), 129(M+1)
24	*m-**Menta-1(7),8-dieno***	678	41(68), 44(20), 50(21), 51(26), 53(43), 65(18), 67(11), 77(34), 79(49), 91(34), 93(48), 105(20), 110(1), 121(35), **136**(M^+)(6)
25	***Silvestreno***	729	41(50), 42(10), 44(29), 53(18), 55(55), 65(18), 67(100), 68(35), 77(22), 79(10), 81(16), 91(50), 92(16), 93(42), 105(4), 107(<1), **136**(M^+)(8)

Tabela **2.6.0** Compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição, identificados por HRGC-MS(ITD) num extracto específico (ano de **1997**) dos frutos de *Arbutus unedo*. Picos assinalados na figura 2.6.2.1. (continuação).

Pico Nº	Composto	Scan	*m/z* (int.rel.%)
26	***1,4-Cineole***	749	41(70), 43(100), 53(10), 55(43), 58(8), 67(30), 69(21), 71(32), 81(14), 83(12), 93(7), 95(3), 107(8), 110(4), 111(35), 125(14), 139(1), **154**(M^+)(5)
27	***α-Terpineno, (5:6) Fenilacetaldeído***	762	41(7), 43(2), 51(11), 53(1), 55(<1), 65(32), 74(2), 77(7), 79(5), 91(100)(M-29), 92(36), 93(16), 103(1), 105(3), **120**(M^+)(9), 121(10), **136**(M^+)(5)
28	*orto*-***Cimeno***	781	41(17), 50(13), 51(15), 63(16), 65(32), 77(13), 79(5), 91(100), 103(3), 104(1), 105(2), 115(6), 117(18), 119(74), 120(14), **134**(M^+)(20)
29	*p*-***Menta-1-eno***	787	41(72), 43(54), 51(17), 53(33), 55(37), 67(100), 68(13), 79(79), 81(56), 95(46), 109(24), 119(15), 123(2), **138**(M^+)(3)
30	***1,8-Cineole***	794	41(48), 43(100), 51(9), 53(17), 55(25), 58(6), 59(8), 67(26), 68(11), 69(23), 71(21), 79(24), 81(33), 93(55), 95(12), 108(20), 111(17), 121(5), 139(13), **154**(M^+)(7)
31	***Limoneno***	807	41(35), 50(10), 51(17), 53(31), 67(100), 68(58), 77(23), 79(41), 91(27), 92(19), 93(55), 105(7), 107(16), 108(3), 121(11), **136**(M^+)(10)
32	*cis*-***β-Ocimeno***	833	41(34), 43(17), 51(24), 53(37), 63(5), 65(10), 77(66), 79(78), 91(100), 92(27), 93(83), 105(32), 107(24), 121(15), **136**(M^+)(2)
33	*n*-***Octanol***	859	41(100), 42(28), 43(13), 54(4), 55(58), 56(10), 69(30), 70(34), 82(13), 83(24), 84(6), 97(M-18-15)(5), 105(M-15).
34	***Dihidrotagetona + Bergamal***	868	41(100), 42(33), 43(35), 53(24), 55(61), 57(31), 67(34), 69(33), 70(30), 81(27), 82(40), 83(20), 85(42), 91(<1), 93(3), 95(18), 97(2), 100(5), 105(11), 123(2), 139(M-15)(5), **140**(M^+)
35	*trans*-***β-Ocimeno***	876	41(80), 43(30), 44(33), 53(30), 55(21), 65(15), 67(34), 77(79), 79(85), 80(52), 91(57), 93(100), 105(36), 107(25), 119(5), 121(18), **136**(M^+)(2)
36	***2,3-Benzofurano***	882	50(18), 51(11), 62(31), 63(63), 89(100), 90(68), **118**(M^+)(93), 119(9)
37	***γ-Terpineno***	895	41(37), 43(24), 50(11), 51(20), 52(3), 53(13), 63(10), 65(16), 66(1), 67(4), 77(50), 78(11), 79(37), 80(11), 91(89), 92(31), 93(100), 94(10), 105(16), 106(1), 107(12), 121(24), **136**(M^+)(28), 137(1)
38	***p-Menta-3,8-dieno***	913	41(40), 43(100), 51(14), 53(16), 55(11), 65(12), 67(15), 77(30), 79(95), 80(6), 91(25), 92(5), 93(50), **136**(M^+)(5)
39	***Óxido cis-linalool***	955	41(52), 42(11), 43(100), 53(16), 55(43), 59(85), 67(35), 68(19), 69(13), 71(11), 77(12), 79(32), 81(15), 83(11), 93(41), 94(34), 97(7), 109(5), 111(12), 137(7), 153, 164
40	***Óxido trans-linalool***	967	41(54), 42(11), 43(95), 51(12), 52(2), 53(17), 55(51), 57(11), 59(100), 65(14), 67(38), 68(22), 71(12), 77(11), 79(21), 81(14), 83(14), 91(25), 93(34), 94(36), 95(8), 111(13), 115(17), 117(25), 125(2), 131(5), 132(8), 137(4), 153(1)
41	***Terpinoleno***	978	41(44), 42(5), 43(18), 50(12), 51(24), 52(8), 53(23), 55(10), 63(9), 65(17), 67(17), 77(41), 79(52), 91(73), 93(100), 105(30), 107(18), 119(5), 121(64), 135(3), **136**(M^+)(53), 137(7)
42	***Nonanaldeído***	998	41(100), 42(19), 43(45), 44(35), 55(36), 56(34), 57(55), 67(25), 68(16), 69(21), 70(24), 81(19), 82(15), 83(7), 95(11), 96(10), 97(1), 98(5), 99(1), 113(M-29)

Tabela **2.6.0** Compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição, identificados por HRGC-MS(ITD) num extracto específico (ano de **1997**) dos frutos de *Arbutus unedo*. Picos assinalados na figura 2.6.2.1. (continuação).

Pico Nº	Composto	Scan	*m/z* (int.rel.%)
43	***Linalool***	1007	41(79), 42(8), 43(100), 53(16), 55(52), 56(7), 67(22), 69(24), 71(52), 79(12), 80(19), 81(14), 83(8), 91(11), 92(9), 93(37), 105(5), 107(4), 109(2), 121(9), 136(M-18)(1)
44	***Mircenol***	1032	41(64), 42(11), 43(86), 51(10), 52(8), 53(21), 55(20), 59(100), 67(41), 68(33), 69(18), 71(12), 79(59), 80(28), 81(43), 93(35), 95(10), 107(9), 108(5), 121(19)(M-18-15), 136(3)(M-18)
45	***4-Ceto-isoforona***	1059	41(46), 42(15), 51(16), 53(23), 67(22), 68(100), 69(30), 80(9), 81(33), 83(4), 95(20), 96(46), 109(11), 111(4), 119(8), 137(4), **152**(M^+)(9)
46	*p-**Menta-1,3,8-trieno***	1065	41(21), 50(15), 51(18), 63(18), 65(26), 77(7), 79(11), 91(100), 92(26), 103(4), 105(8), 119(21), **134**(M^+)(19)
47	*cis-**β-Terpineol***	1113	41(43), 43(100), 53(18), 55(23), 58(16), 67(29), 69(24), 71(43), 79(24), 80(3), 81(16), 83(9), 92(15), 93(40), 94(25), 107(20), 108(10), 121(16), 136(M-18)(10)
48	*trans-**β-Terpineol***	1179	41(40), 43(100), 51(15), 53(18), 55(23), 67(29), 69(26), 71(43), 77(16), 79(27), 81(12), 93(38), 107(27), 108(20), 121(20), 136(M-18)(21)
49	***Terpin-4-ol***	1215	41(80), 43(100), 51(12), 53(24), 55(42), 65(10), 67(35), 69(25), 71(97), 77(19), 79(12), 81(17), 91(26), 93(62), 110(8), 111(35), 125(2), 136(15), **154**(M^+)(6)
50	*m-**Cimen-8-ol***	1231	43(100), 50(4), 51(5), 63(5), 65(8), 77(3), 91(11), 105(2), 115(3), 117(3), 119(2), 132(M-18), 135(M-15)(26)
51	***α-Terpineol***	1258	41(42), 43(85), 51(12), 53(22), 55(16), 59(100), 65(10), 67(40), 68(8), 71(10), 77(15), 79(22), 81(74), 91(16), 92(15), 93(53), 105(7), 107(9), 108(6), 121(43), 136(M-18)(41), **154**(M^+)(2)
52	***Dihidrocarveol***	1274	41(56), 43(100), 51(15), 53(23), 55(27), 57(8), 67(32), 69(10), 79(40), 81(24), 91(25), 93(79), 95(7), 105(16), 107(24), 108(11), 121(92), **136**(M^+)(39)
53	*trans-**Dihidrocarvona***	1285	41(65), 42(22), 51(19), 53(28), 55(30), 67(100), 81(70), 82(4), 95(49), 109(65), 123(48), 137(44), **152**(M^+)(41)
54	***Acetato de mirtenilo***	1315	43(75), 51(24), 53(47), 55(56), 65(19), 67(53), 77(38), 79(56), 81(38), 91(44), 93(18), 95(19), 109(33), 119(32), **134**(M^+)(11)
55	***α-Terpinen-7-al***	1390	41(12), 43(6), 50(24), 51(37), 52(11), 53(18), 63(15), 65(22), 77(100), 79(75), 91(45), 93(22), 105(12), 107(21), 108(45), 121(42)(M-29), **150**(M^+)(22)
56	***Acetato de cis-verbenilo***	1419	41(100), 43(81), 50(23), 51(48), 53(48), 55(38), 65(39), 67(37), 77(54), 79(60), 81(34), 91(71), 93(33), 105(14), 107(10), 109(70), 119(94), **134**(M^+)(56)
57	*n-**Decanol,** (Álcool Cáprico)*	1443	41(100), 42(20), 43(48), 55(55), 56(18), 57(29), 67(19), 69(26), 83(26), 97(9), 111(M-18-29)(4), 121(1)
58	***δ-Elemeno***	1479	41(64), 43(44), 51(34), 53(25), 65(32), 67(64), 77(46), 79(40), 91(47), 93(51), 105(8), 107(17), 121(36), 136(5), 147(12), 161(8), **204**(M^+)(2)
59	*cis-**β-Damascona***	1518	41(100), 42(25), 43(69), 51(23), 53(24), 55(33), 65(37), 67(28), 69(56), 79(29), 81(41), 91(27), 93(33), 105(23), 107(39), 109(20), 119(17), 121(15), 123(23), 135(18), 136(11), 149(16), 159(6), 163(8), 177(72), **192**(M^+)(49), 193(7)

Tabela **2.6.0** Compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição, identificados por HRGC-MS(ITD) num extracto específico (ano de **1997**) dos frutos de *Arbutus unedo*. Picos assinalados na figura 2.6.2.1. (continuação).

Pico Nº	Composto	Scan	***m/z*** (int.rel.%)
60	*cis*-***Anetole***	1547	41(23), 43(100), 51(6), 53(8), 55(9), 65(7), 67(10), 77(7), 79(8), 81(15), 91(8), 93(4), 105(8), 107(8), 115(<1), 119(7), 125(17), 133(10), **148**(M^+)(30)
61	***β-Bourboneno***	1580	41(59), 51(12), 53(19), 55(24), 65(18), 67(30), 77(10), 79(16), 80(3), 81(100), 91(4), 93(2), 95(15), 105(1), 119(2), 123(4), 161(M-43)(4)
62	1,2-dihidro-1,1,6-trimetilnaftaleno	1695	77(8), 115(22), 128(10), 141(26), 142(63), 157(100), **172**(M^+)(30)
63	*trans*-***β-Damascenona***	1786	41(60), 42(4), 51(13), 53(10), 65(11), 69(100), 70(4), 77(17), 79(16), 91(23), 93(9), 103(7), 105(29), 121(43), 133(5), 147(3), 175(5), **190**(M^+)(4), 191(1)
64	***β-Elemeno***	1849	41(82), 51(21), 53(54), 55(31), 65(22), 67(100), 68(36), 77(29), 79(57), 81(51), 91(42), 93(65), 95(20), 105(34), 107(38), 119(22), 121(18), 133(21), 147(24), 161(14), 189(M-15)(9)
65	***β-Cariofileno***	1915	41(100), 43(8) 53(28), 55(23), 65(16), 67(34), 69(33), 77(27), 79(45), 81(19), 91(52), 93(38), 105(37), 107(19), 119(19), 120(16), 133(33), 147(10), 148(8), 161(12), 175(1), 189(<1), **204**(M^+)(1)
66	***α-Santaleno***	1990	41(52), 43(17), 51(14), 53(29), 55(15), 67(43), 77(27), 79(34), 91(37), 93(100), 94(14), 105(10), 107(19), 119(10), 121(22), 133(3), 161(4), **204**(M^+)(2)
67	***Ciclamenaldeído***	2015	41(12), 43(100), 50(5), 51(7), 63(5), 65(8), 77(11), 79(7), 91(16), 105(30), 115(10), 117(6), 131(10), 133(23), 147(11), 157(8), 175(23), **190**(M^+)(4)
68	***γ-Himachaleno***	2075	41(100), 43(12), 51(22), 53(34), 55(32), 65(28), 67(48), 77(40), 79(45), 81(48), 91(77), 93(44), 95(30), 105(71), 107(39), 119(40), 121(10), 133(84), 135(4), 147(47), 161(28), 189(30), **204**(M^+)(11)
69	*trans,trans*-***α-Farneseno***	2145	41(100), 43(13), 51(12), 53(21), 55(31), 65(10), 67(15), 69(33), 77(25), 79(35), 91(37), 93(54), 105(20), 107(29), 119(21), 123(18), 133(3), 147(<1), 161(M-43)(1), 189(M-15)(1)
70	***β-Bisaboleno***	2168	41(100), 43(65), 51(15), 53(26), 55(32), 65(18), 67(42), 69(33), 77(20), 79(30), 81(28), 91(26), 93(49), 105(17), 107(23), 119(11), 121(15), 133(11), 135(14), 150(5), 161(1), 189(M-15)(1), **204**(M^+)(1)
71	***Álcool cariofilénico***	2303	41(100), 43(39), 44(16), 55(61), 59(15), 67(37), 69(30), 77(16), 79(23), 81(33), 83(17), 91(15), 93(21), 95(27), 105(12), 107(14), 109(12), 111(79), 119(9), 121(18), 123(25), 135(7), 150(5), 161(18), 179(3), 189(2), 204(1), 207(1)
72	***Guaiol***	2414	41(65), 43(58), 44(30), 51(6), 53(24), 55(37), 59(100), 65(29), 67(28), 77(16), 79(42), 81(48), 91(65), 93(43), 95(25), 105(59), 107(42), 119(43), 121(6), 131(10), 133(59), 135(16), 147(39), 149(5), 161(81), 189(57), 204(M-18)(29)
73	***Selin-11-en-4-α-ol***	2463	41(55), 43(100), 53(25), 55(22), 65(13), 67(50), 71(27), 79(30), 81(46), 91(14), 93(21), 95(27), 105(18), 107(17), 109(20), 121(14), 123(13), 133(15), 135(21), 137(6), 147(11), 161(16), 189(15), 204(M-18)(15)
74	*trans*-***Isoelemicina***	2499	41(17), 43(12), 44(24), 65(28), 69(40), 77(32), 79(31), 91(33), 103(21), 105(26), 107(19), 118(12), 119(8), 121(8), 124(6), 133(30), 135(20), 137(41), 150(18), 165(49), 177(6), 193(59), **208**(M^+)(100), 209(6)

Nota: Os seis componentes sombreados, são os compostos dominantes da fracção.

Tabela **2.6.1** Compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição, identificados por HRGC-MS(ITD) num extracto específico (ano de **1998**) dos frutos de *Arbutus unedo*. Picos assinalados na figura 2.6.3.1.

Pico Nº	Composto	Scan	*m/z* (int.rel.%)
1	***Álcool isoamílico***	242	41(79), 42(81), 43(35), 55(100), 70(M-18)(17), 71(2)
2	***n-Hexanal***	282	41(100), 43(63), 44(64), 56(50), 57(40), 67(17), 71(6)(M-29), 72(14), 82(8)(M-18), 83(6)
3	*n*-***Octano***	291	41(89), 43(100), 57(33), 70(12), 71(14), 84(11), 85(29)
4	***2-Furfuraldeído***	318	42(6), 50(3), 67(6)(M-29), 95(100), **96**(M^+)(43)
5	*cis*-***2-Octeno***	345	41(100), 42(51), 53(16), 55(76), 56(17), 57(29), 67(6), 68(8), 69(47), 70(16), 83(34), 97(7), **112**(M^+)(<1)
6	*trans*-***2-Octeno***	357	41(100),42(34), 43(65), 44(29), 55(92), 56(13), 59(9), 69(39), 70(7), 83(32), 97(3), **112**(M^+)
7	*trans*-***3-Hexen-1-ol***	378	41(100), 42(31), 43(43), 44(21), 55(78), 57(11), 67(77), 69(12), 81(6), 82(M-18)(23)
8	***n-Hexanol***	412	41(97), 42(45), 43(61), 55(60), 56(100), 69(33), 73(2), 85(1)
9	***n-Heptanal***	449	41(100), 42(45), 43(70), 44(86), 55(50), 57(35), 70(40), 81(22), 85(M-29)(8), 96, 97, **114**(M^+)(2), 115(2)
10	***Benzaldeído***	561	44(13), 50(29), 51(36), 63(3), 74(8), 77(47), 78(2), 92(3), 105(34), **106**(M^+)(23)
13	***n-Heptanol***	615	41(100), 42(39), 43(51), 55(87), 69(27), 70(49), 83(8)
14	***Octen-3-ol***	628	41(44), 42(14), 43(78), 54(2), 55(27), 56(8), 57(100), 58(11), 68(7), 69(8), 71(10), 72(11), 81(7), 85(5), 95(<1), 99(2)
15	***Furfurilmetil metilsulfureto***	636	53(38), 65(15), 69(1), 81(100)
16	***1,2,4-Trimetilbenzeno***	650	41(14), 50(9), 51(21), 52(3), 63(10), 65(7), 77(21), 78(8), 79(35), 91(17), 103(14), 104(4), 105(100), 119(7), **120**(M^+)(34), 121(2)
17	*p*-***Ment-1-eno***	658	41(22), 42(7), 51(14), 53(11), 55(13), 65(37), 66(16), 67(100), 68(5), 77(13), 79(16), 81(16), 91(11), 93(3), 95(29), 96(6), 109(2), 119(15), 123(2), **139**(M^+)(3)
18	***Fenilacetaldeído***	691	41(10), 43(1), 50(10), 51(11), 61(3), 62(6), 63(13), 64(4), 65(37), 74(6), 89(6), 90(1) 91(100), 92(36), 93(6), 119(15), **120**(M^+)(6), 121(3)
19	*orto*-***Cimeno***	709	41(17), 50(13), 51(15), 63(16), 65(32), 77(13), 79(5), 91(100)(M-29), 103(3), 104(1), 105(2), 115(6), 117(18), 119(74), 120(14), **134**(M^+)(20)
20	***1,8-Cineole***	765	41(48), 43(100), 51(9), 53(17), 55(25), 58(6), 59(8), 67(26), 68(11), 69(23), 71(21), 79(24), 81(33), 93(55), 95(12), 108(20), 111(17), 121(5), 139(13), **154**(M^+)(7)
21	***Limoneno***	789	41(35), 50(10), 51(17), 53(31), 67(100), 68(58), 77(23), 79(41), 91(27), 92(19), 93(55), 105(7), 107(16), 108(3), 121(11), **136**(M^+)(10)
22	*n*-***Octanol***	835	41(100), 42(28), 43(13), 54(4), 55(58), 56(10), 69(30), 70(34), 82(13), 83(24), 84(6), 97(M-18-15)(5), 105(M-15)(1)
23	***Acetofenona***	841	42(51), 43(32), 50(17), 51(44), 69(32), 77(61), 83(24), 105(46), **120**(M^+)(5)

Tabela **2.6.1** Compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição, identificados por HRGC-MS(ITD) num extracto específico (ano de **1998**) dos frutos de *Arbutus unedo*. Picos assinalados na figura 2.6.3.1. (continuação).

Pico Nº	Composto	Scan	*m/z* (int.rel.%)
24	***2,3-Benzofurano***	865	**118**(M^+)(77), 89(100), 90(62), 63(65), 62(35), 119(51)
25	***γ-Terpineno***	851	41(37), 43(24), 50(11), 51(20), 52(3), 53(13), 63(10), 65(16), 66(1), 67(4), 77(50), 78(11), 79(37), 80(11), 91(89), 92(31), 93(100), 94(10), 105(16), 106(1), 107(12), 121(24), **136**(M^+)(28), 137(1)
26	*para*-***Cimeno***	908	41(46), 53(4), 65(17), 77(24), 78(4), 91(52), 103(6), 104(4), 105(9), 117(6), 119(100), 120(7), **134**(M^+)(20)
27	***Óxido de cis-Linalool***	936	41(52), 43(100), 53(16), 55(43), 59(85), 67(35), 68(19), 69(13), 71(11), 77(12), 79(32), 81(15), 83(11), 93(41), 94(34), 97(7), 109(5), 111(12), 137(7), 153, 164
28	***Óxido de trans-Linalool***	948	41(54), 42(11), 43(95), 51(12), 52(2), 53(17), 55(51), 57(11), 59(100), 65(14), 67(38), 68(22), 71(12), 77(11), 79(21), 81(14), 83(14), 91(25), 93(34), 94(36), 95(8), 111(13), 115(17), 117(25), 125(2), 131(5), 132(8), 137(4), 153(1)
29	***Terpinoleno***	972	41(44), 42(5), 43(18), 50(12), 51(24), 52(8), 53(23), 55(10), 63(9), 65(17), 67(17), 77(41), 79(52), 91(73), 93(100), 105(30), 107(18), 119(5), 121(64), 135(3), **136**(M^+)(53), 137
30	***Nonanaldeído***	980	41(100), 42(19), 43(45), 44(35), 55(36), 56(34), 57(55), 67(25), 68(16), 69(21), 70(24), 81(19), 82(15), 83(7), 95(11), 96(10), 97(1), 98(5), 99(1)(M-29), 113(M-29)
31	***Linalool***	995	41(79), 42(8), 43(100), 53(16), 55(52), 56(7), 67(22), 69(24), 71(52), 79(12), 80(19), 81(14), 83(8), 91(11), 92(9), 93(37), 105(5), 107(4), 109(2), 121(9), 136(M-18)(1)
32	***Naftaleno***	1097	43(4), 50(14), 51(29), 63(9), 64(2), 74(3), 75(3), 76(5), 87(2), 100(2), 101(5), 102(12), 126(9), 127(12), **128**(M^+)(100), 129(7)
33	***Terpin-4-ol***	1120	41(80), 43(100), 51(12), 53(24), 55(42), 65(10), 67(35), 69(25), 71(97), 77(19), 79(12), 81(17), 91(26), 93(62), 110(8), 111(35), 125(2), 136(15), **154**(M^+)(6)
34	*meta*-***Cimen-8-ol***	1155	43(100), 50(4), 51(5), 63(5), 65(8), 77(3), 91(11), 105(2), 115(3), 117(3), 119(2), 132(M-18), 135(M-15)(26)
35	***Salicilato de Metilo***	1197	41(3), 43(5), 50(9), 51(3), 52(3), 53(14), 62(5), 63(31), 64(24), 65(40), 73(5), 91(13), 92(100), 93(16), 94(3), 120(68), 121(17), **152**(M^+)(31)
36	***α-Terpineol***	1236	41(42), 43(85), 51(12), 53(22), 55(16), 59(100), 65(10), 67(40), 68(8), 71(10), 77(15), 79(22), 81(74), 91(16), 92(15), 93(53), 105(7), 107(9), 108(6), 121(43), **136**(M^+)(6)
37	***Dihidrocarveol***	1255	41(56), 43(100), 51(15), 55(27), 57(8), 67(32), 69(10), 79(40), 81(24), 91(25), 93(79), 95(7), 105(16), 107(24), 108(11), 121(92), **136**(M^+)(39)
38	***α-Terpinen-7-al***	1280	41(12), 43(6), 50(24), 51(37), 52(11), 53(18), 63(15), 65(22), 77(100), 79(75), 91(45), 93(22), 105(12), 107(21), 108(45), 121(42)(M-29), **150**(M^+)(22)
39	***Acetato de cis-verbenilo***	1386	41(100), 43(81), 50(23), 51(48), 53(48), 55(38), 65(39), 67(37), 77(54), 79(60), 81(34), 91(71), 93(33), 105(14), 107(10), 109(70), 119(94), **134**(M^+)(56)
40	*n*-***Decanol***	1428	41(100), 42(20), 43(48), 55(55), 56(18), 57(29), 67(19), 69(26), 83(26), 97(9), 111(M-18-29)(4), 121(1)

Tabela **2.6.1** Compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição, identificados por HRGC-MS(ITD) num extracto específico (ano de **1998**) dos frutos de *Arbutus unedo*. Picos assinalados na figura 2.6.3.1. (continuação).

Pico Nº	Composto	Scan	*m/z* (int.rel.%)
41	***δ-Elemeno + cis-β-Damascona***	1487	41(78), 42(31), 43(56), 51(19), 53(22), 55(35), 65(37), 67(56), 69(45), 77(41), 79(40), 81(17), 91(67), 92(12), 93(100), 94(22), 95(16), 105(20), 106(8), 107(28), 108(7), 109(13), 119(16), 121(49), 123(30), 135(20), 136(12), 149(15), 150(6), 163(11), 177(44), **192**(M^+)(26), 193(10)
42	***β-Bourboneno***	1537	41(59), 51(12), 53(19), 55(24), 65(18), 67(30), 77(10), 79(16), 80(3), 81(100), 91(4), 93(2), 95(15), 105(1), 119(2), 123(4), 161(M-43)(4)
43	***2-Undecanona***	1561	41(42), 43(100), 55(14), 58(67), 59(13), 71(11), 95(15), 110(4), **170**(M^+)(2)
44	***Acetato de trans-dihidro-α-terpenilo***	1569	41(26), 42(8), 43(100), 53(3), 55(8), 67(9), 68(5), 69(2), 79(4), 81(9), 95(5), 103(2), 105(6), 107(7), 109(9), 122(3), 123(15), 125(6), 133(6), 138(13), 148
45	***4,4,6-Trimetil-2-ciclohexen-1-ona***	1572	41(52), 55(28), 67(15), 81(13), 82(42), 95(19), 96(100), **138**(M^+)(59)
46	***1,2-dihidro-1,1,6-trimetil-naftaleno***	1612	77(8), 115(22), 128(10), 141(26), 142(63), 157(100), **172**(M^+)(30)
47	*trans-**β-Damascenona***	1689	41(60), 42(4), 51(13), 53(10), 65(11), 69(100), 70(4), 77(17), 79(16), 91(23), 93(9), 103(7), 105(29), 121(43), 133(5), 147(3), 175(5), **190**(M^+)(4), 191(1)
48	***β-Cariofileno***	1885	41(100), 53(28), 55(23), 65(16), 67(34), 69(33), 77(27), 79(45), 81(19), 91(52), 93(38), 105(37), 107(19), 119(19), 120(16), 133(33), 147(10), 148(8), 161(12), 175(1), 189(<1), **204**(M^+)(1)
49	***α-Santaleno***	1916	41(52), 43(17), 51(14), 53(29), 55(15), 67(43), 77(27), 79(34), 91(37), 93(100), 94(14), 105(10), 107(19), 119(10), 121(22), 133(3), 161(4), **204**(M^+)(2)
50	***γ-Himachaleno***	1958	41(100), 43(12), 51(22), 53(34), 55(32), 65(28), 67(48), 77(40), 79(45), 81(48), 91(77), 93(44), 95(30), 105(71), 107(39), 119(40), 121(10), 133(84), 135(4), 147(47), 161(28), 189(30), **204**(M^+)(11)
51	*trans-**β-Ionona***	2041	41(32), 42(12), 43(100), 51(11), 53(10), 55(16), 63(5), 65(139, 67(10), 69(89), 77(23), 79(22), 81(59, 91(30), 92(29), 93(18), 95(10), 105(11), 106(2), 107(13), 109(3), 119(8), 121(16), 122(4), 133(6), 135(9), 145(18), 147(2), 149(12), 161(10), 177(79), 178(10), **192**(M^+)(2)
53	*trans,trans-**α-Farneseno***	2138	41(100), 43(13), 51(12), 53(21), 55(31), 65(10), 67(15), 69(33), 77(25), 79(35), 91(37), 93(54), 105(20), 107(29), 119(21), 123(18), 133(3), 147(<1), 161(M-43)(1), 189(1)
54	***α-Bisabolol***	2261	41(100), 42(22), 43(78), 53(17), 55(42), 67(48), 69(55), 71(25), 77(11), 79(27), 81(28), 91(24), 93(47), 95(6), 107(28), 119(14), 121(4), 133(2), 161(2), 189(M-18-15), 204(M-18)(2)

Na tabela 2.6.2 (páginas 132 a 134) descrevem-se comparativamente os compostos voláteis identificados nos extractos estudados (anos de 1997 e 1998). Nela estão sumariados os tempos de retenção (tr) dos compostos, os seus índices de retenção experimentais e o desvio percentual obtido por comparação com os Ip da literatura (Δ%), estando também descrita a numeração atribuída aos compostos em cada um dos dois extractos estudados.

Tabela **2.6.2** Compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição identificados nos frutos de *Arbutus unedo* L; Numeração dos compostos identificados nos dois extractos analisados (**1997** e **1998**) e respectivos, tempos de retenção, Índices de retenção calculados (Ip^{DB-1}) e desvio percentual (Δ%) obtido relativamente aos Ip da literatura.[92,215,374-381]

Composto	**Nº 1997**	**tr 1997**	Nº 1998	**tr 1998**	**Ip^{DB-1}**	**Δ%**
***n*-Butanol**	**1**	2.47	-	-	**604**	-
***n*-Heptano**	**2**	3.31	-	-	**700**	0
Álcool isoamílico	**3**	3.65	**1**	3.40	**723**	1.1
5-Hexen-2-ona	**4**	4.57	-	-	**759**	-
Hexanal	-	-	**2**	4.20	**784**	2.0
***n*-Octano**	**5**	5.24	**3**	5.03	**800**	0
2-Furfuraldeído	**6**	5.32	**4**	5.11	**802**	0.1
***cis*-2-Octeno**	-	-	**5**	5.18	**807**	0.2
***trans*-2-Octeno**	**7**	5.93	**6**	5.62	**823**	0.5
(*E*)-3-Hexen-1-ol	**8**	6.27	**7**	6.08	**837**	1.6
5-Metileno-2-norborneno	**9**	6.42	-	-	**842**	3.5
***n*-Hexanol**	**10**	7.09	**8**	6.84	**865**	0.2
***n*-Heptanal**	**11**	7.41	**9**	7.20	**878**	1.3
***trans*-Salveno**	**12**	7.50	-	**-**	**879**	1.6
2-Acetilfurano	**13**	8.12	-	**-**	**902**	0.8
***para*-Metilanisole**	**14**	9.25	-	-	**935**	7.3
Tricicleno	**15**	9.30	-	**-**	**936**	1.0
Benzaldeído	**16**	9.45	**10**	9.22	**941**	2.0
5-Metilfurfural	**17**	9.84	**-**	-	**952**	1.0
***n*-Heptanol**	**18**	10.25	**13**	10.13	**964**	0.5
1,2,4-Trimetilbenzeno	-	-	**12**	10.05	**965**	4.7
1-Octen-3-ol	-	-	**14**	10.42	**971**	0.7
Yomogi álcool	**19**	11.07	-	-	**986**	1.2
Furfurilmetil metilsulfureto	**20**	11.29	**15**	11.04	**994**	0.2
Mesitileno	**21**	11.37	**16**	11.13	**996**	0.2
p-Ment-3-eno	**22**	11.42	**17**	11.16	**998**	1.2
***n*-Octanal**	**23**	11.52	-	-	**1004**	0.3
m-Menta-1(7),8-dieno	**24**	12.13	-	-	**1010**	1.1
Silvestreno	**25**	12.38	-	-	**1014**	1.2
1,4-Cineole	**26**	12.44	-	-	**1015**	0.1

Tabela **2.6.2** Compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição identificados nos frutos de *Arbutus unedo* L; Numeração dos compostos identificados nos dois extractos analisados (**1997** e **1998**) e respectivos, tempos de retenção, Índices de retenção calculados (Ip^{DB-1}) e desvio percentual (Δ%) obtido relativamente aos Ip da literatura. [92,215,374-381] (continuação).

Composto	**Nº 1997**	**tr 1997**	**Nº 1998**	**tr 1998**	**Ip^{DB-1}**	**Δ%**
Fenilacetaldeído	**27**	12.70	**18**	12.37	**1018**	0.6
α-Terpineno	**27'**	12.88	-	-	**1021**	2.0
***orto*-Cimeno**	**28**	13.04	**19**	12.77	**1025**	0.3
***p*-Ment-1-eno**	**29**	13.17	-	-	**1027**	0.5
1,8-Cineole	**30**	13.23	**20**	12.98	**1028**	0.5
Limoneno	**31**	13.38	**21**	13.15	**1030**	0.1
cis-β-Ocimeno	**32**	13.84	-	-	**1037**	0.3
***n*-Octanol**	**33**	14.26	**22**	13.65	**1045**	2.1
Dihidrotagetona	**34**	14.32	-	-	**1045**	0.8
Bergamal	**34**	14.34	-	-	**1045**	1.0
***trans*-β-Ocimeno**	**35**	14.39	-	-	**1046**	0.3
Acetofenona	-	-	**23**	13.95	**1049**	1.5
2,3-Benzofurano	**36**	14.49	**24**	14.24	**1048**	-
***para*-Cimeno**	-	-	**25**	14.05	**1050**	2.7
***γ*-Terpineno**	**37**	14.80	**26**	14.12	**1052**	1.0
p-Menta-3,8-dieno	**38**	15.11	-	-	**1058**	1.3
Óxido *cis*-Linalool	**39**	15.25	**27**	15.00	**1059**	1.4
Óxido *trans*-Linalool	**40**	16.09	**28**	15.44	**1072**	1.4
Terpinoleno	**41**	16.26	**29**	15.62	**1075**	1.1
Nonanal	**42**	16.60	**30**	16.36	**1081**	1.9
Linalool	**43**	16.78	**31**	16.54	**1083**	1.6
Mircenol	**44**	17.66	-	-	**1096**	1.9
4-Cetoisoforona	**45**	18.00	-	-	**1103**	2.5
***p*-Menta-1,3,8-trieno**	**46**	18.15	-	-	**1105**	0.5
***cis*-β-Terpineol**	**47**	18.91	-	-	**1123**	1.8
***trans*-β-Terpineol**	**48**	20.04	-	-	**1149**	1.2
Naftaleno	-	-	**32**	20.22	**1161**	1.5
Terpin-4-ol	**49**	20.88	**33**	20.62	**1170**	0.7
***meta*-Cimen-8-ol**	**50**	21.16	**34**	20.90	**1176**	0.3
Salicilato de metilo	-	-	**35**	21.20	**1183**	0.7

Tabela **2.6.2** Compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição identificados nos frutos de *Arbutus unedo* L; Numeração dos compostos identificados nos dois extractos analisados (**1997** e **1998**) e respectivos, tempos de retenção, Índices de retenção calculados (Ip^{DB-1}) e desvio percentual (Δ%) obtido relativamente aos Ip da literatura. [92,215,374-381] (continuação).

Composto	**Nº 1997**	**tr 1997**	Nº **1998**	**tr 1998**	**Ip^{DB-1}**	**Δ%**
α–Terpineol	**51**	21.74	**36**	21.50	**1190**	0.1
Dihidrocarveol	**52**	22.02	**37**	21.77	**1196**	0.3
***trans*-Dihidrocarvona**	**53**	22.16	-	-	**1199**	0.1
Acetato de Mirtenilo	**54**	22.45	-	-	**1215**	1.6
α-Terpinen-7-al	**55**	23.22	**38**	23.02	**1262**	1.6
Acetato de *cis*-verbenilo	**56**	23.46	**39**	23.31	**1277**	0.5
Decanol	**57**	23.84	**40**	23.45	**1294**	1.7
δ-Elemeno	**58**	24.96	**41**	24.48	**1316**	1.7
***cis*-β-Damascona**	**59**	25.62	**41'**	25.44	**1325**	1.3
***β*-Bourboneno**	**61**	26.68	**42**	25.72	**1329**	2.6
***cis*-Anetole**	**60**	26.13	-	-	**1332**	2.9
***2*-Undecanona**	-	-	**43**	25.83	**1334**	2.4
Acetato de *trans*-dihidro-α-Terpenilo	-	-	**44**	26.11	**1334**	1.4
4,4,6-Trimetil-2-ciclohexeno-1-ona	-	-	**45**	26.45	**1338**	-
1,2-Dihidro-1,1,6-trimetilnaftaleno	**62**	28.24	**46**	27.98	**1360**	-
***trans*-β-Damascenona**	**63**	29.43	**47**	29.18	**1376**	0.2
β-Elemeno	**64**	30.47	-	-	**1390**	0.1
β-Cariofileno	**65**	31.57	**48**	31.28	**1410**	0.5
α-Santaleno	**66**	32.81	**49**	31.52	**1415**	0.4
Ciclamenaldeído	**67**	33.56	**-**	-	**1458**	0.1
γ-Himachaleno	**68**	34.22	**50**	33.93	**1474**	0.1
β-(*E*)-Ionona	-	-	**51**	34.01	**1476**	0.6
***trans,trans*-α-Farneseno**	**69**	35.41	**53**	35.16	**1504**	0.2
***β*-Bisaboleno**	**70**	36.05	-	-	**1516**	0.4
Cariofileno álcool	**71**	38.30	-	-	**1558**	0.6
***α*-Bisabolol**	-	-	**54**	38.04	**1559**	1.3
Guaiol	**72**	40.26	-	-	**1597**	0.1
Selin-11-en-4–α-ol	**73**	41.08	-	-	**1629**	1.4
***trans*-Isoelemicina**	**74**	41.42	-	-	**1644**	0.3

Na tabela 2.6.3 mostram-se os espectros de ITD, a estrutura e as fragmentações principais (iões dominantes) dos seis compostos maioritários dos dois extractos estudados.

Tabela **2.6.3** Espectros de massa (ITD) e principais fragmentações, dos seis compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição dominantes identificados nos dois extractos analisados (**1997** e **1998**) dos frutos de *Arbutus unedo* L..

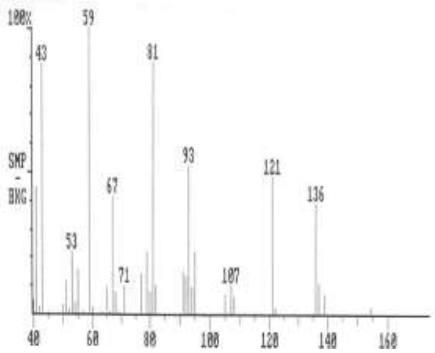
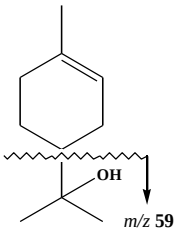
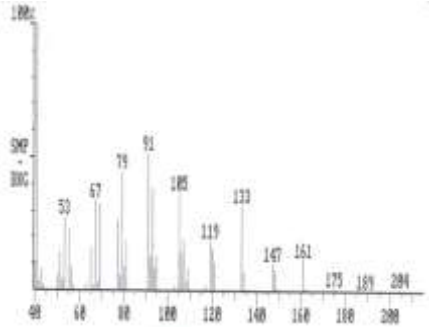
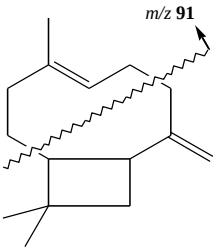
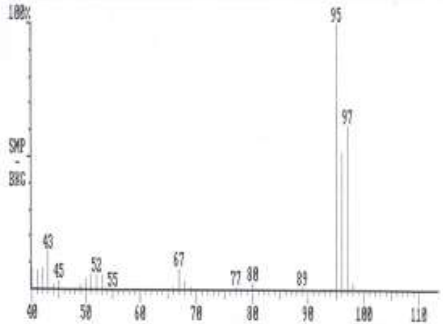
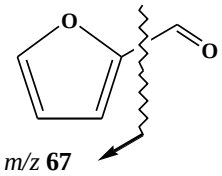
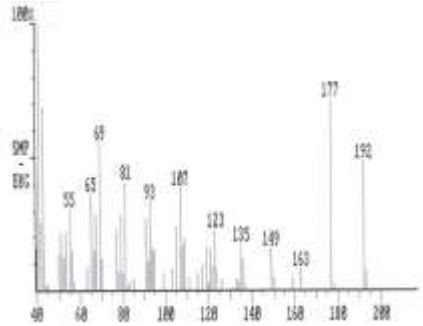
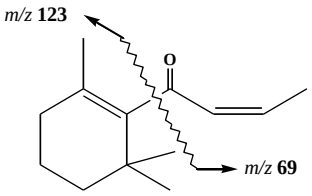
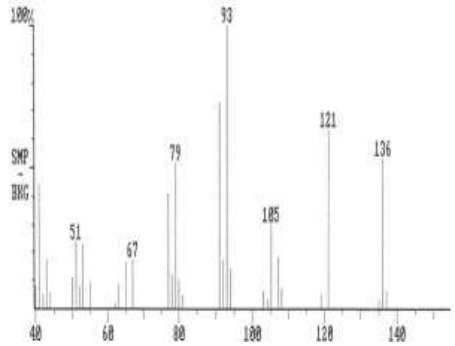
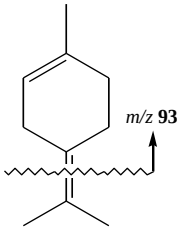
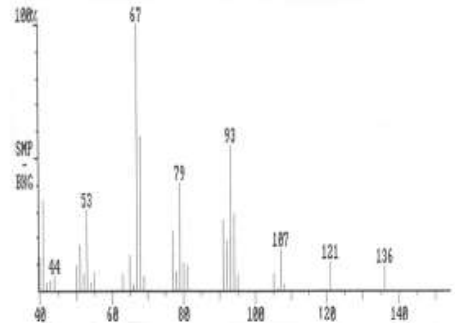
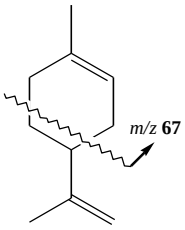
	**α-Terpineol** **154** (M^+), 139(M-15), 136(M-18)	
	**β-Cariofileno** **204** (M^+), 189 (M-15), 161 (M-43)	
	**2-Furfuraldeído** 97(M^++1) **96** (M^+), 95 (M-1), 67 (M-29)	

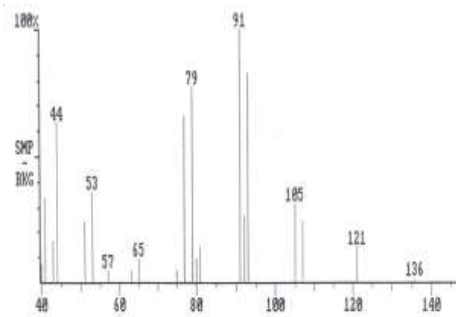
Tabela **2.6.3** Espectros de massa (ITD) e principais fragmentações, dos seis compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição dominantes identificados nos dois extractos analisados (**1997** e **1998**) dos frutos de *Arbutus unedo* L. (continuação).

	**β-Damascona** **192** (M^+), 177 (M-15), 163 (M-29), 93 (121-15-15)	
	**Terpinoleno** **136** (M^+), 121 (M-15), 105 (M-15-15), 93 (M-43)	
	**Limoneno** **136** (M^+), 121 (M-15), 93 (M-43)	

Na tabela 2.6.4 apresentam-se espectros de massa GC-MS(ITD) de alguns dos compostos identificados e suas fragmentações principais; os compostos escolhidos são representativos das diferentes subclasses químicas encontradas nos 2 extractos analisados.

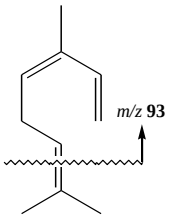
Tabela **2.6.4** Espectros de massa (ITD) e principais fragmentações, de compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição identificados nos dois extractos analisados (**1997** e **1998**); os compostos escolhidos incluem-se em subclasses distintas.

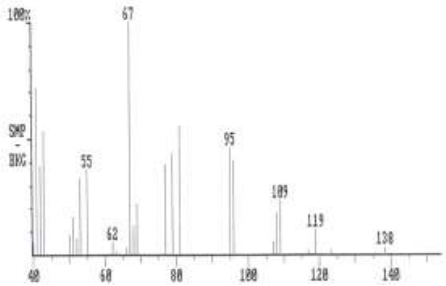
Hidrocarbonetos Monoterpénicos



cis-β-Ocimeno

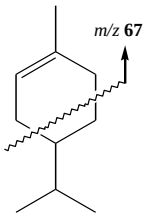
136 (M^+),
121 (M-15),
105 (M-15-15),
93 (M-43)

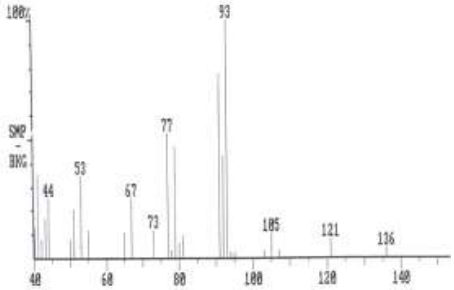




p-Ment-1-eno

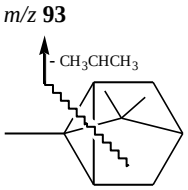
138 (M^+),
109(M-29),
95(M-43)

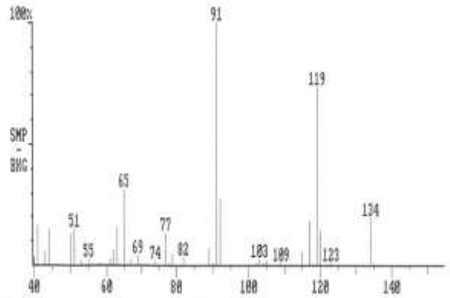




Tricicleno

136 (M^+),
121 (M-15),
93 (M-43)





orto-Cimeno

134 (M^+),
119 (M-15),
91 (M-43)

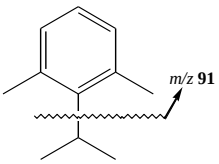
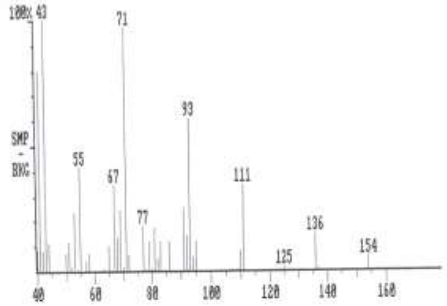


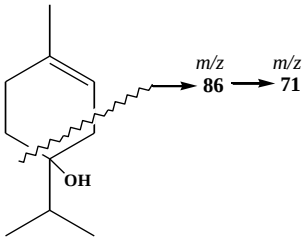
Tabela **2.6.4** Espectros de massa (ITD) e principais fragmentações, de compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição identificados nos dois extractos analisados (**1997** e **1998**); os compostos escolhidos incluem-se em subclasses distintas (continuação).

Monoterpenos Oxigenados

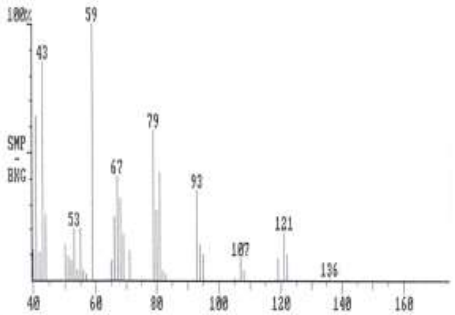
Terpinen-4-ol



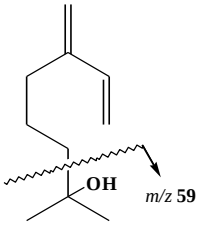
154(M^+),
136(M-18),
111(M-43),
93 (M-18-43)



Mircenol

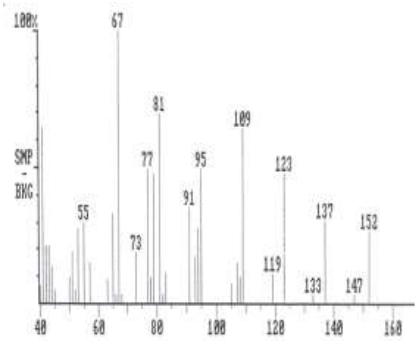


136 (M-18),
121 (M-18-15)

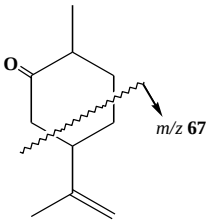


MM = **154**

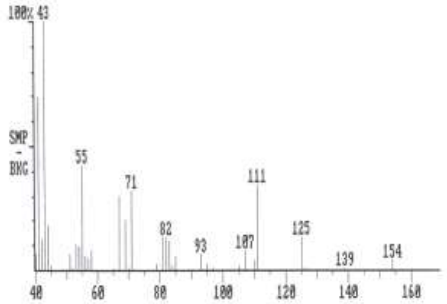
trans-Dihidrocarvona



152 (M^+),
137 (M-15),
109 (M-43)



1,4-Cineole



154 (M^+),
139 (M-15),
125 (M-29)

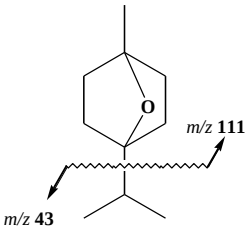
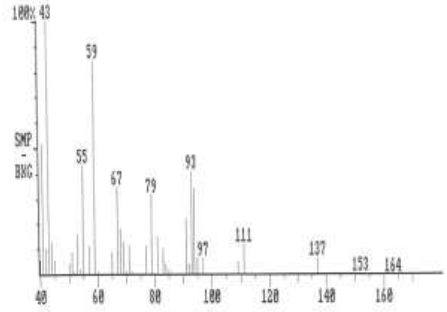
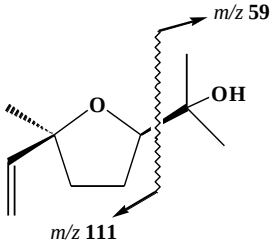


Tabela **2.6.4** Espectros de massa (ITD) e principais fragmentações, de compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição identificados nos dois extractos analisados (**1997** e **1998**); os compostos escolhidos incluem-se em subclasses distintas (continuação).

Óxido de *cis*-Linalool

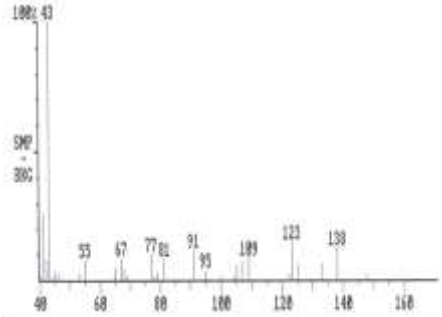


111 (M-59)
153 (M-18+1)

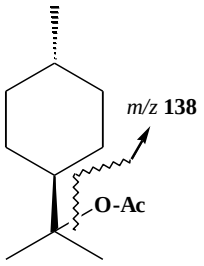


MM = **170**

Acetato de *trans*-dihidro-α-terpenilo



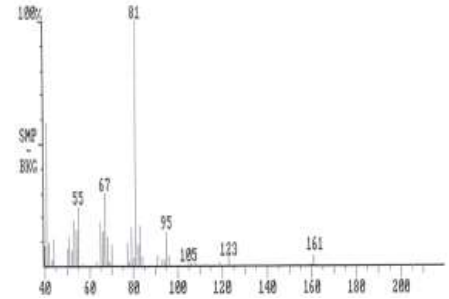
138(M-60 (CH_3COOH)),
123(M-60-15),



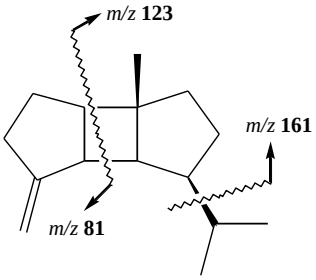
MM = **198**

Hidrocarbonetos Sesquiterpénicos

β-Bourboneno

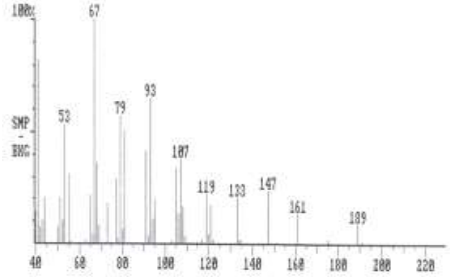


161 (M-43)

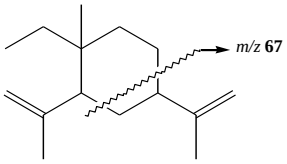


MM = **204**

β–Elemeno



189 (M-15),
161 (M-43)



MM = **204**

Tabela **2.6.4** Espectros de massa (ITD) e principais fragmentações, de compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição identificados nos dois extractos analisados (**1997** e **1998**); os compostos escolhidos incluem-se em subclasses distintas (continuação).

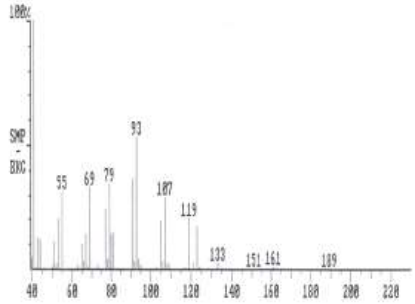
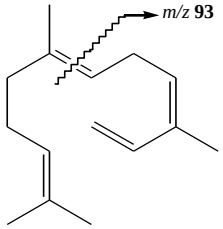
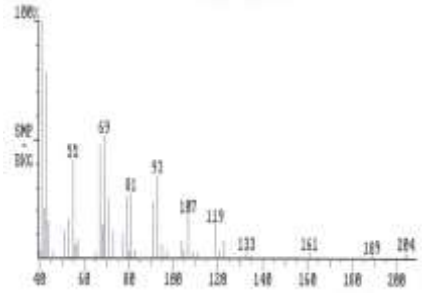
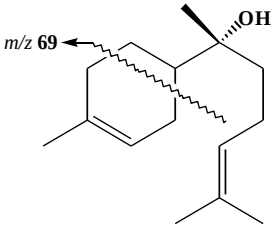
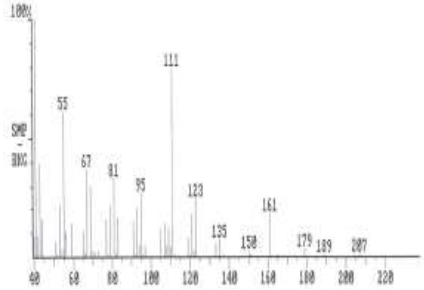
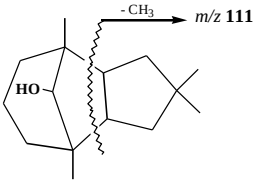
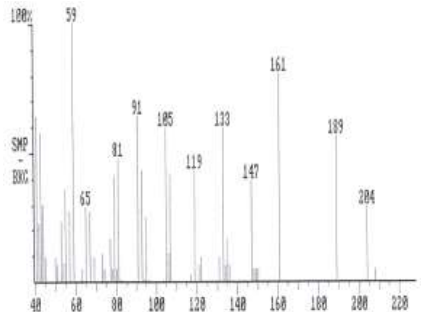
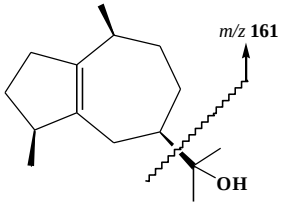
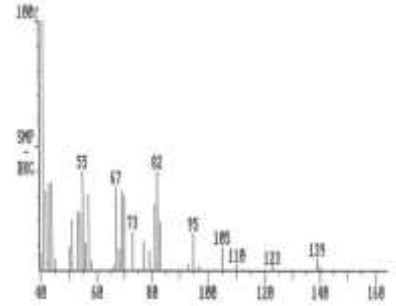
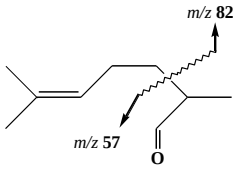
	***trans,trans*-β-Farneseno** 189 (M-15), 161 (M-43)	 MM = **204**
Sesquiterpenos Oxigenados		
	**α-Bisabolol** 204 (M-18), 189 (M-18-15) 161 (M-18-43)	 MM = **222**
	**Álcool Cariofilénico** 207 (M-15) 204 (M-18), 173 (M-43) 161 (M-18-43)	 MM = **222**
	**Guaiol** 207 (M-15) 204 (M-18), 189 (M-18-15) 161 (M-18-43)	 MM = **222**

Tabela **2.6.4** Espectros de massa (ITD) e principais fragmentações, de compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição identificados nos dois extractos analisados (**1997** e **1998**) (**1997** e **1998**); os compostos escolhidos incluem-se em subclasses distintas (continuação).

Outros

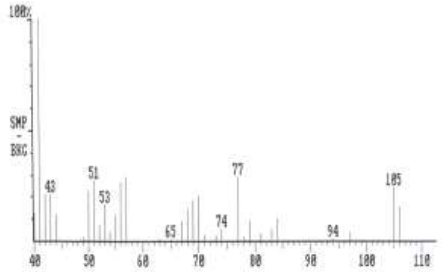
Bergamal

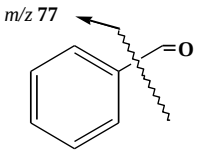




140 (M^+),
139 (M-1),
110 (M-15-15)

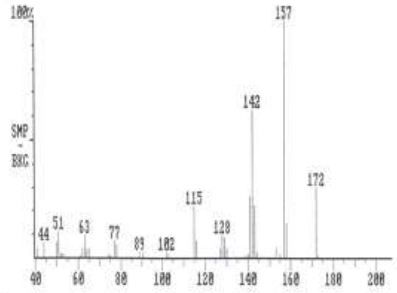
Benzaldeído

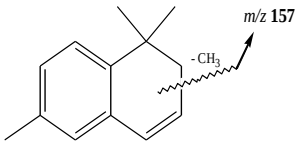




106 (M^+),
105 (M-1),
77 (M-29)

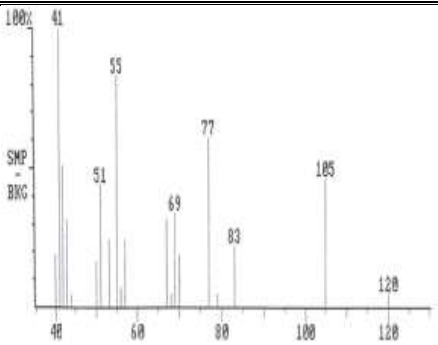
1,2-Dihidro-1,1,6-Trimetilnaftaleno

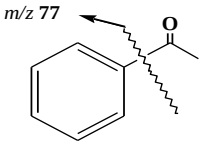




172 (M^+),
157 (M-15),
142 (M-15-15)

Acetofenona





120 (M^+),
105 (M-15),
77 (M-43)

Tabela **2.6.4** Espectros de massa (ITD) e principais fragmentações, de compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição identificados nos dois extractos analisados (**1997** e **1998**) (**1997** e **1998**); os compostos escolhidos incluem-se em subclasses distintas (continuação).

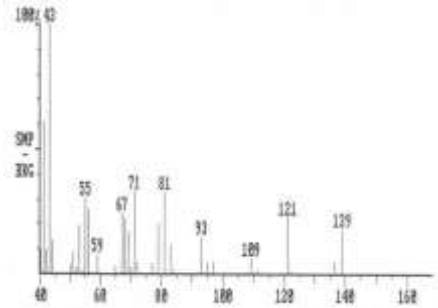
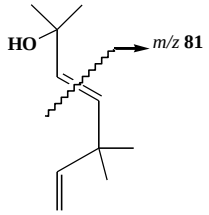
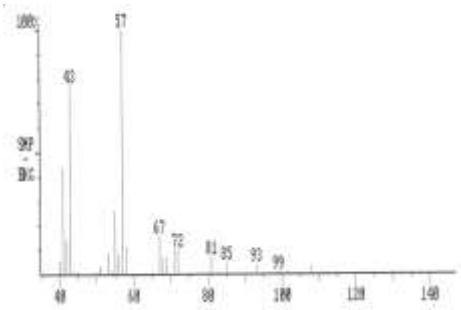
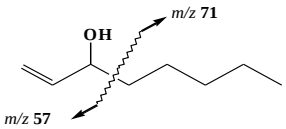
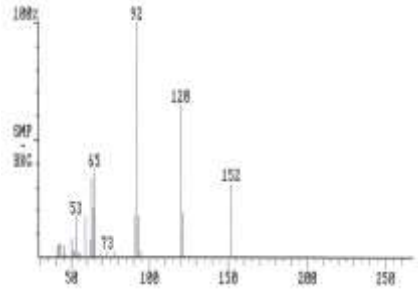
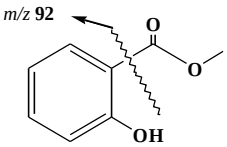
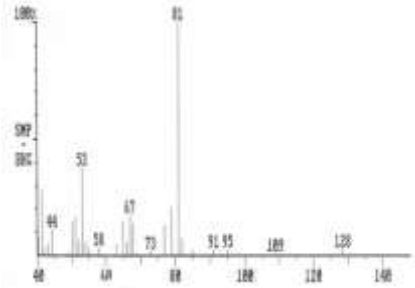
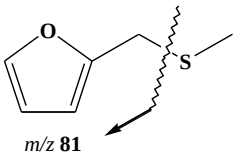
	**Álcool Yomogi**	139(M-15), 121 (M-18-15)	 M = **154**
	**Oct-1-en-3-ol**		 MM = **128**
	**Salicilato de Metilo**	**152** (M^+), 121 ($M-CH_3O$), 92 ($M-COOCH_3$)	
	**Furfurilmetil metilsulfureto**	**128** (M^+), 67 ($M-CH_2SCH_3$)	

Tabela **2.6.5** Composição qualitativa e quantitativa média (referente a áreas normalizadas percentuais, n=3), dos dois extractos voláteis de medronho analisados (anos de **1997** e **1998)** (Lista por ordem de eluição).

Composto	I	1997 % Área	1998 % Área	*Composto*	I	1997 % Área	1998 % Área
n-Butanol		1.06	-	*p*-Menta-3,8-dieno	a)	0,70	-
n-Heptano		0,39	-	*cis*-Linalool óxido		1,26	1,15
Álcool isoamílico		0.24	0,18	*trans*-Linalool óxido		0,92	0,56
5-Hexen-2-ona		0,71	-	**Terpinoleno**		3,70	3,92
n-Hexanal		-	1,03	Nonanal		1,62	1,65
n-Octano		1.69	2,01	Linalool		1,37	1,39
2-Furfuraldeído		11.65	12,51	Mircenol		0,05	-
cis-2-Octeno		-	0,27	4-Ceto-isoforona	a)	0,05	-
trans-2-Octeno		0,29	0,87	*p*-Menta-1,3,8-trieno	a)	0,05	-
(E)-3-Hexenol		0,59	0,62	*cis*-β-Terpineol		1,26	-
5-Metileno-2-norborneno		0,15	-	*trans*-β-Terpineol		0,23	-
n-Hexanol		0,66	0,84	Naftaleno		-	1,27
n-Heptanal		0,47	0,74	Terpinen-4-ol		0,78	1,85
trans-Salveno		0,10	-	*meta*-Cimen-8-ol	a)	0,17	0,21
2-Acetilfurano		0,12	-	Salicilato de metilo		-	1,26
p-Metilanisole		0,09	-	**α-Terpineol**		23,0	18,63
Tricicleno		0,16	-	Dihidrocarveol		1,01	0,92
Benzaldeído		1.27	1,08	*trans*-Dihidrocarvona		0,05	-
5-Metilfurfural		0,16	-	Acetato de Mirtenilo		0,04	-
n-Heptanol		0,14	0,18	α-Terpinen-7-al		0,38	0,38
1,2,4-Trimetilbenzeno		-	0,22	Acetato de *cis*-verbenilo		0,04	0,05
Oct-1-en-3-ol		-	0,50	Decanol		1,82	1,61
Yomogi álcool	a)	0,48	-	δ-Elemeno	a)	0,04	0,05
Furfurilmetil metilsulfureto		0,75	0,56	***cis*-β-Damascona**		8.42	5.36
Mesitileno		0,17	0,21	β-Bourboneno	a)	0,21	0,19
para-Menta-3-eno	a)	0,26	-	*cis*-Anetole		0,20	-
n-Octanal		0,74	-	2-Undecanona	a)	-	0,18
m-Menta-1(7),8-dieno		0,06	-	Acetato de *trans*-dihidro-α-Terpenilo	a)	-	0,88
Silvestreno	a)	0,60	-	4,4,6-Trimetil-2-ciclohexen-1-ona	a)	-	1,02
1,4-Cineole		0,84	-	1,2-Dihidro-1,1,6-trimetilnaftaleno	a)	1.36	1.84
Fenilacetaldeído		0,75	1.27	*trans*-β-Damascenona		0,40	0,39
α-Terpineno		0,63	-	β-Elemeno		0,40	-
orto-Cimeno		0,72	0,95	**β-Cariofileno**		11,93	11,68
p-Ment-1-eno		0,17	0,32	α-Santaleno		0,29	0.18
1,8-Cineole		0,78	0,78	Ciclamenaldeído	a)	0,24	-
Limoneno		2,98	1,87	γ-Himachaleno	a)	0,17	0,17
cis-β-Ocimeno	a)	0,09	-	β-(*E*)-Ionona		-	1,24
n-Octanol		0,91	1,03	*trans,trans*-α-Farneseno		0,39	0,37
Dihidrotagetona		0,05	-	β-Bisaboleno	a)	0,09	-
Bergamal		0,30	-	Cariofileno álcool		0,21	-
trans-β-Ocimeno		0,26	-	α-Bisabolol	a)	-	0,25
2,3-Benzofurano		1,62	1,12	Guaiol		0,15	-
Acetofenona		-	0,42	Selin-11-en-4α-ol	a)	0,21	-
para-Cimeno		-	0,84	*trans*-Isoelemicina		0,24	-
γ–Terpineno		1,25	1,17				

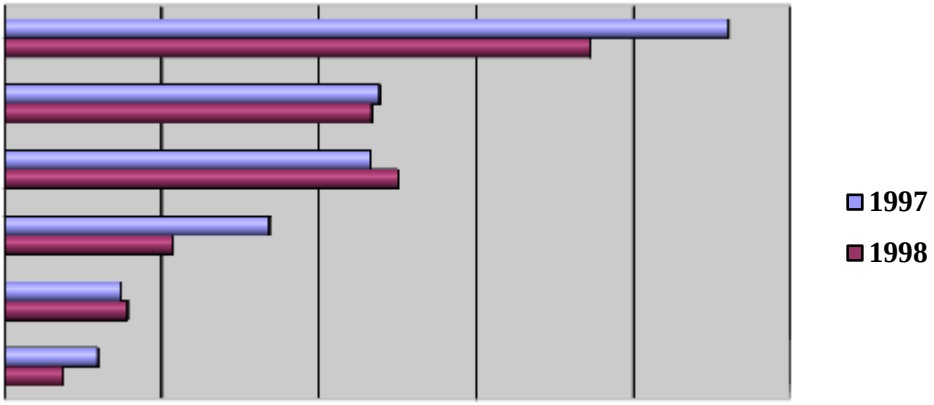
a) compostos cuja identidade não pode ser confirmada com amostra autêntica.

A tabela 2.6.5 descreve comparativamente as composições qualitativa e quantitativa média dos dois extractos voláteis analisados. Assinala também os compostos cuja identidade não pode ser confirmada com recurso a amostra autêntica. Estes representam 21% dos compostos identificados.

Foram identificados 89 compostos, que correspondem a 96,8% (áreas normalizadas) deste extracto, sendo a sua maioria, monoterpenos (51%), com predomínio dos compostos oxigenados (36%). No grupo dos monoterpenos salienta-se como constituintes maioritários o α-terpineol (18,6 - 23,0%), logo seguido do terpinoleno (3,7 - 3,9%) e o limoneno (1,9 - 3,0%). O 2-furfuraldeído (11,6 - 12,5%) e o β-cariofileno (11,7 - 11,9%) são os restantes constituintes dominantes. Estes perfazem cerca de 62% e 54% da composição dos extractos (ano 1997 e 1998, respectivamente).

	Ano 1997	**Ano 1998**
α-Terpineol	23,03	18,63
β-Cariofileno	11,93	11,68
2-Furfuraldeído	11,65	12,51
β-Damascona	8,43	5,36
Terpinoleno	3,69	3,92
Limoneno	2,98	1,87
	61,71%	**53,97%**

Representando graficamente a distribuição dos seis compostos dominantes nos dois extractos analisados (1997 e 1998) vem:



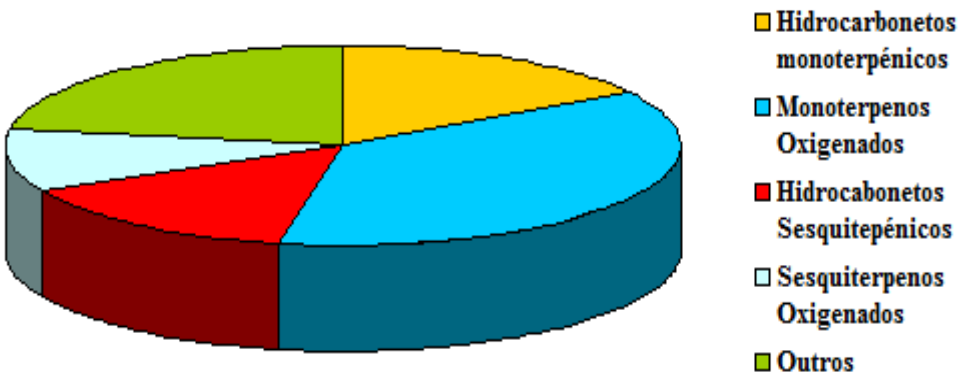
Dando particular destaque aos compostos terpénicos e efectuando o seu agrupamento temos:

Hidrocarbonetos monoterpénicos	15,47%
Monoterpenos oxigenados	35,81% (*)
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos	14,15%
Sesquiterpenos oxigenados	9,56%
Outros (**)[xi]	21,81%
% Identificação	96,80

Representando graficamente estes agrupamentos funcionais temos:

[xi](*) – Destes, 2,57% correspondem a monoterpenos oxigenados alicíclicos e 33,24% a monoterpenos oxigenados cíclicos.

(**) – Constituídos por 23,8% de aldeídos, 17,5% de cetonas, 11% de hidrocarbonetos alifáticos, 11% de hidrocarbonetos aromáticos, 9,5% de derivados acetilados, 11% de alcoóis, 9,5% de ésteres e 0,8% de derivados com enxofre.



Na extracção dos compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição há que ter sempre em conta a possibilidade de algumas substâncias voláteis poderem permanecer retidas na matriz sólida do fruto, dando origem a uma grande variabilidade dos resultados. No nosso caso, considerámos este factor desprezável uma vez que os dois extractos foram obtidos de frutos em estados de maturação semelhante. As diferenças podem assim atribuir-se apenas a questões exógenas à planta (alterações no crescimento (planta/fruto) por influências ambientais do meio como a temperatura, a irradiação, e o estado hídrico) ou à formação de voláteis secundários por acção enzimática. Quanto a este último aspecto, podemos referir que os frutos conservam a total actividade das suas enzimas, as quais podem promover alterações no teor final de compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição. Por ex. na homogeneização de frutos, as hidrolases cindem os ésteres e, quando associadas às lipo-oxigenases e hidroperoxidoliases, enriquecem o aroma final dos frutos com "novos" compostos voláteis. Para evitar tais influências, é usual a desintegração tecidular realizar-se na presença de inibidores enzimáticos ou, sempre que possível, mediante a rápida preparação da amostra.[382] No nosso caso, minimizaram-se as alterações enzimáticas dos frutos, efectuando-se as extracções, no próprio dia da colheita das amostras.

Verificou-se que os medronhos são "pobres" em compostos voláteis uma vez que o rendimento da extracção foi inferior a 0,05% do peso do fruto (ver Parte Experimental, página 182).

Verificou-se ainda que a maioria dos compostos (41) são comuns aos dois extractos estudados (1997 e 1998). No entanto, há a destacar o facto do extracto correspondente ao ano de 1997 ser quimicamente mais complexo (possui 33 compostos diferentes em relação ao do ano 1998) que o do ano de 1998 (possui 12 compostos diferentes em relação ao do ano 1997). Estes resultados estão sumariados na tabela 2.6.6.

Tabela **2.6.6** Tabela resumo dos compostos voláteis identificados em cada um dos dois extractos (**1997** e **1998**) de medronhos. Listagem por ordem alfabética.

Composto	***1997***	***1998***
Acetato de cis-verbenilo	***S***	***S***
Acetato de Mirtenilo	***S***	
Acetato de trans-dihidro-α-terpenilo		***S***
2-Acetilfurano	***S***	
Acetofenona		***S***
Álcool Isoamílico	***S***	***S***
Anetole	***S***	
Benzaldeído	***S***	***S***
2,3-Benzofurano	***S***	***S***
Bergamal	***S***	
β-Bisaboleno	***S***	
α-Bisabolol		***S***
β-Bourboneno	***S***	***S***
n-Butanol	***S***	
Cariofileno Álcool	***S***	
β-Cariofileno	***S***	***S***
4-Ceto-isoforona	***S***	
Ciclamenaldeído	***S***	
meta-Cimen-8-ol	***S***	***S***
orto-Cimeno	***S***	***S***
para-Cimeno		***S***
1,4-Cineole	***S***	
1,8-Cineole	***S***	***S***
Trans-β-Damascenona	***S***	***S***
cis-β-Damascona	***S***	***S***
n-Decanol	***S***	***S***
Dihidrocarveol	***S***	***S***
1,2-Dihidro-1,1,6-trimetilnaftaleno	***S***	***S***
trans-Dihidrocarvona	***S***	
Dihidrotagetona	***S***	
β-Elemeno	***S***	***S***
δ-Elemeno	***S***	***S***
trans,trans-α-Farneseno	***S***	***S***
Fenilacetaldeído	***S***	***S***
2-Furfuraldeído	***S***	***S***

Tabela **2.6.6** Tabela resumo dos compostos voláteis identificados em cada um dos dois extractos (**1997** e **1998**) de medronhos. Listagem por ordem alfabética. (continuação).

Composto	***1997***	***1998***
Furfurilmetil-metilsulfureto	***S***	***S***
Guaiol	***S***	
n-Heptanal	***S***	***S***
n-Heptano	***S***	
n-Heptanol	***S***	***S***
n-Hexanal		***S***
n-Hexanol	***S***	***S***
3-Hexen-1-ol	***S***	***S***
5-Hexen-2-ona	***S***	
γ-Himachaleno	***S***	***S***
β-trans-Ionona		***S***
trans-Isoelemicina	***S***	
Limoneno	***S***	***S***
Linalool	***S***	***S***
p-Menta-3,8-dieno	***S***	
p-Menta-1,3,8-trieno	***S***	
p-Ment-3-eno	***S***	
p-Ment-1-eno	***S***	***S***
m-Menta-1(7),8-dieno	***S***	
Mesitileno	***S***	***S***
p-Metilanisole	***S***	
5-Metileno-2-Norborneno	***S***	
5-Metilfurfural	***S***	
Mircenol	***S***	
Naftaleno		***S***
Nonanaldeído	***S***	***S***
trans-β-Ocimeno	***S***	
cis-β-Ocimeno	***S***	
n-Octanal	***S***	
n-Octano	***S***	***S***
n-Octanol	***S***	***S***
Octen-3-ol		***S***
trans-2-Octeno	***S***	***S***
cis-2-Octeno		***S***
Óxido de cis-linalool	***S***	***S***
Óxido de trans-linalool	***S***	***S***
Salicilato de metilo		***S***
trans-Salveno	***S***	
α-Santaleno	***S***	***S***
Selin-11-en-4α-ol	***S***	
Silvestreno	***S***	
Terpinen-4-ol	***S***	***S***
α-Terpinen-7-al	***S***	***S***
α-Terpineno	***S***	

Tabela **2.6.6** Tabela resumo dos compostos voláteis identificados em cada um dos dois extractos (**1997** e **1998**) de medronhos. Listagem por ordem alfabética. (continuação).

Composto	***1997***	***1998***
γ-Terpineno	***S***	***S***
cis-β-Terpineol	***S***	
trans-β-Terpineol	***S***	
α-Terpineol	***S***	***S***
Terpinoleno	***S***	***S***
Tricicleno	***S***	
1,2,4-Trimetilbenzeno		***S***
2-Undecanona		***S***
Yomogi Álcool	***S***	

De uma maneira geral os frutos comestíveis partilham os mesmos compostos voláteis dominantes; na tabela 2.6.7 listam-se os compostos identificados nos medronhos, comuns a outros frutos comestíveis: groselha, maçã, uva, morango, limão, lima e laranja.

Na tabela 2.6.8 estão descritos todos os componentes de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição (voláteis) identificados no medronho; esta tabela inclui também a sua nomenclatura IUPAC e fórmulas estruturais.

Tabela **2.6.7** Tabela resumo dos compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição, identificados nos medronhos, nos dois extractos (**1997** e **1998**), comuns a outros frutos.[130,138,382,383]

Composto	Groselha	Morango	Maçã	Uva	Limão	Lima	Laranja
Acetato de trans-dihidro-α-terpenilo							*S*
2-Acetilfurano		*S*					
Acetofenona		*S*	*S*				
Álcool Isoamílico	*S*	*S*					
Benzaldeído	*S*	*S*		*S*			
β-Bisaboleno					*S*	*S*	
n-Butanol	*S*	*S*					
β-Cariofileno	*S*			*S*	*S*	*S*	*S*
para-Cimeno	*S*			*S*	*S*	*S*	*S*
1,4-Cineole						*S*	
1,8-Cineole	*S*					*S*	
β-Damascenona			*S*	*S*			
n-Decanol						*S*	*S*
β-Elemeno				*S*		*S*	*S*
δ-Elemeno							*S*
trans,trans-α-Farneseno							*S*
Fenilacetaldeído				*S*			
2-Furfuraldeído	*S*	*S*	*S*			*S*	*S*
n-Heptanal		*S*			*S*		
n-Hexanal		*S*	*S*	*S*			*S*
n-Hexanol	*S*		*S*		*S*		*S*
trans-3-Hexen-1-ol	*S*			*S*	*S*	*S*	*S*
Limoneno	*S*			*S*		*S*	*S*
Linalool	*S*	*S*		*S*		*S*	*S*
p-Menta-3,8-dieno					*S*		*S*
Mesitileno				*S*			
Naftaleno		*S*					
Nonanaldeído						*S*	*S*
trans-β-Ocimeno	*S*						
cis-β-Ocimeno	*S*						
n-Octanal						*S*	*S*
n-Octanol						*S*	*S*
Octen-3-ol	*S*						
Óxido de cis-linalool				*S*			
Óxido de trans-linalool				*S*			
Salicilato de metilo	*S*						
Terpinen-4-ol	*S*						*S*
α-Terpineno	*S*						*S*
γ-Terpineno	*S*			*S*		*S*	*S*
trans-β-Terpineol						*S*	
α-Terpineol	*S*	*S*		*S*	*S*	*S*	*S*
Terpinoleno						*S*	*S*
2-Undecanona					*S*		

Tabela **2.6.8** Compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição e baixo ponto de ebulição identificados por GC-MS(ITD) no fruto de *Arbutus unedo*. Listagem dos compostos por ordem alfabética.

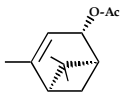
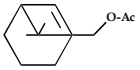
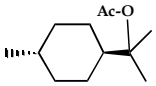
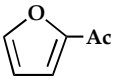
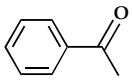
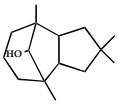
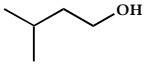
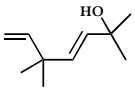
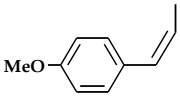
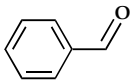
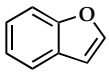
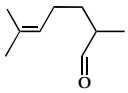
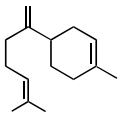
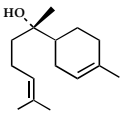
Composto	Fórmula Estrutural	MM
Acetato de *cis*-verbenilo [1R-(1α,2β,5α)]-4,6,6-trimetil-biciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol, acetato (1R,4R,5R)-2-Pinen-4-ol, acetato		**194**
Acetato de mirtenilo 6,6-dimetil-biciclo[3.1.1]-hepta-2-eno-2-metanol, acetato 2-Pinen-10-ol, acetato		**194**
Acetato de *trans*-dihidro-α-terpenilo α,α,4-trimetilciclohexano-1-metanol, acetato *cis-p*-Mentan-8-ol, acetato		**198**
2-Acetilfurano 1-(2-furanil)etanona, 2-furfurilmetilcetona		**110**
Acetofenona 1-Feniletanona, Fenilmetilcetona		**120**
Álcool cariofileno decahidro-2,2,4,8-tetrametil-4,8-metanoazuleno-9-ol		**222**
Álcool Isopentílico Álcool isoamílico, 3-metil-1-butanol		**88**
Álcool Yomogi *trans*-2,5,5-trimetil-3,6-heptadien-2-ol		**154**
(*Z*)-Anetole 1-Metoxi-4-(1-propenil)benzeno (*Z*)-*para*-Propenilanisole		**148**
Benzaldeído		**106**
2,3-Benzofurano		**118**
Bergamal 2,6-Dimetil-5-heptenal		**140**
β-Bisaboleno 1-Metil-4-(5-metil-1-metileno-4-hexenil)ciclohexeno (S)-6-Metil-2-(4-metil-3-ciclohexen-1-il)-1,5-heptadieno		**204**
α-Bisabolol (R,R)-(+-)-α,4-dimetil-α-(4-metil-3-pentil)-3-ciclohexeno-1-metanol		**222**

Tabela **2.6.8** Compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição e baixo ponto de ebulição identificados por GC-MS(ITD) no fruto de *Arbutus unedo*. Listagem dos compostos por ordem alfabética (continuação).

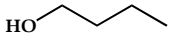
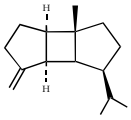
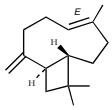
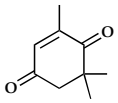
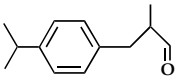
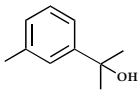
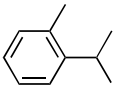
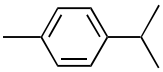
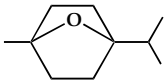
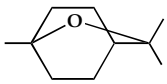
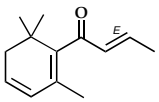
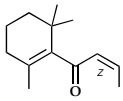
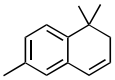
Composto	Fórmula Estrutural	MM
n-Butanol 1-butanol		**74**
β-Bourboneno [1S-(1α,3αα,3ββ,6αβ,6βα)]-decahidro-3a-metil-6-metileno-1-(1-metiletil)-ciclobuta[1,2:3,4]diciclopenteno		**204**
β-Cariofileno *trans*-(1R,9S)-4,11,11-trimetil-8-metilenobiciclo[7.2.0] undeca-4-eno, *trans*-Cariofileno		**204**
4-Ceto-isoforona 2,6,6-trimetil-2-ciclohexeno-1,4-diona		**152**
Ciclamenaldeído α-Metil-4-(1-metiletil)-benzenopropanal		**190**
***meta*-Cimen-8-ol** α,α,4-trimetilbenzenometanol		**150**
***orto*-Cimeno** 1-Metil-2-(4-metiletil)-benzeno		**134**
***para*-Cimeno** 1-Metil-4-(1-metiletil)-benzeno		**134**
1,4-Cineole 1-Metil-4-(1-metiletil)-7-oxabiciclo[2.2.1]heptano 1,4-epoxi-p-mentano		**154**
1,8-Cineole 1,3,3-Trimetil-2-oxabiciclo[2.2.2]octano; Eucaliptol 1,8-epoxi-p-mentano		**154**
***trans*-β-Damascenona** *trans*-1-(2,6,6-trimetil-1,3-ciclohexadienil)-2-butenona		**190**
***cis*-β-Damascona** *cis*-1-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexenil)-2-butenona		**192**
***n*-Decanol** 1-decanol, álcool cáprico		**158**
1,2-Dihidro-1,1,6-trimetilnaftaleno		**172**

Tabela **2.6.8** Compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição e baixo ponto de ebulição identificados por GC-MS(ITD) no fruto de *Arbutus unedo*. Listagem dos compostos por ordem alfabética (continuação).

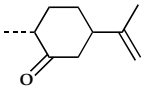
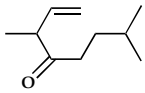
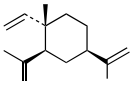
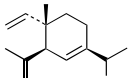
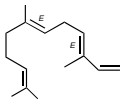
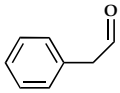
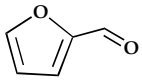
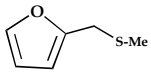
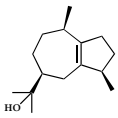
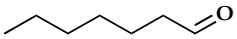
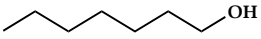
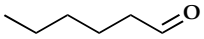
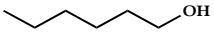
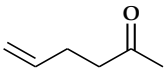
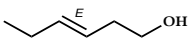
Composto	Fórmula Estrutural	MM
***trans*-Dihidrocarvona** *trans*-2-metil-5-(1-metiletenil)-ciclohexanona; *p*-Menta-8-en-2-ona		152
Dihidrotagetona 2,6-dimetil-7-octen-4-ona		154
β-Elemeno 1S-(1α,2β,4β)–1-etenil-1-metil-2,4-bis(1-metiletenil)-ciclohexano (1S,2R,4R)-2-diisopropenil-1-vinil-p-Ment-3-eno		204
δ-Elemeno (3R-*trans*)-4-etenil-4-metil-3-(1-metiletenil)-1-(1-metiletil)-ciclohexeno (1S,2R)-2-Isopropenil-1-vinil-p-Ment-3-eno		204
***trans,trans*-α-Farneseno** *trans,trans*-3,7,11-trimetil-1,3,6,10-dodecatetraeno *(E,E)*-α-Farneseno		204
Fenilacetaldeído 2-feniletanal		120
2-Furfuraldeído Furfural, 2-furancarboxaldeído		96
Furfurilmetil-metilsulfureto 2-[(metiltio)metil]-furano		128
Guaiol [3S]-1,2,3,4,5α,6,7,8-octahidro-α,α,3α,8α-tetrametil-5-azulenometanol		222
***n*-Heptanal** Heptanaldeído		114
***n*-Heptano**		100
***n*-Heptanol** 1-heptanol		116
***n*-Hexanal** Hexanaldeído, Aldeído capróico		100
***n*-Hexanol** 1-hexanol		102
5-Hexen-2-ona alilacetona		98
***trans*-3-Hexen-1-ol**		100

Tabela **2.6.8** Compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição e baixo ponto de ebulição identificados por GC-MS(ITD) no fruto de *Arbutus unedo*. Listagem dos compostos por ordem alfabética (continuação).

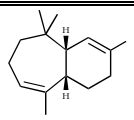
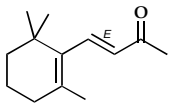
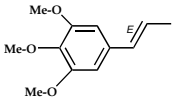
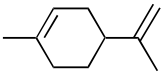
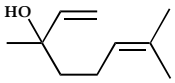
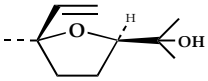
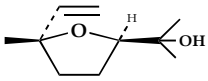
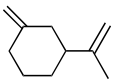
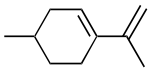
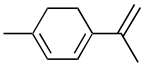
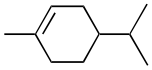
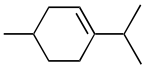
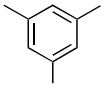
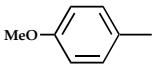
Composto	Fórmula Estrutural	MM
γ-Himachaleno (4aS-*cis*)-2,4a,5,6,7,9a-hexahidro-3,5,5,9-tetrametil-1H-benzociclohepteno		**204**
***trans*-β-Ionona** *trans*-4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-3-buten-2-ona		**192**
***trans*-Isoelemicina** *trans*-1,2,3-trimetoxi-5-propenilbenzeno		**208**
Limoneno 1-metil-4-(1-metiletenil)-ciclohexeno, *p*-menta-1,8-dieno		**136**
Linalool 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol		**154**
***cis*-Linalool óxido** *cis*-6-eteniltetrahidro-2,2,6-trimetil-2H-piran-3-ol		**170**
***trans*-Linalool óxido** *trans*-6-eteniltetrahidro-2,2,5-trimetil-2H-piran-3-ol		**170**
***m*-Menta-1(7),8-dieno** (*R*)-1-metileno-3-(1-metiletenil)-ciclohexano Pseudolimoneno		**136**
***p*-Menta-3,8-dieno** 4-metil-1-(1-metiletenil)-ciclohexeno		**136**
***p*-Menta-1,3,8-trieno** 1-metil-4-(1-metiletenil)-1,3-ciclohexadieno		**134**
***p*-Ment-1-eno** 1-metil-4-(1-metiletil)-ciclohexeno		**138**
***p*-Ment-3-eno** 4-metil-1-(1-metiletil)-ciclohexeno		**138**
Mesitileno 1,3,5-trimetilbenzeno		**120**
***para*-Metilanisole** 1-Metoxi-4-metilbenzeno *p*-Cresol metil éter		**122**
5-Metileno-2-norborneno 5-metileno-biciclo[2.2.1]hepta-2-eno		**106**

Tabela **2.6.8** Compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição e baixo ponto de ebulição identificados por GC-MS(ITD) no fruto de *Arbutus unedo*. Listagem dos compostos por ordem alfabética (continuação).

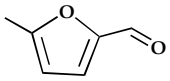
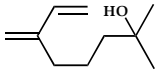
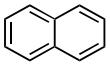
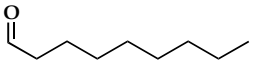
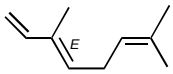
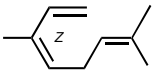
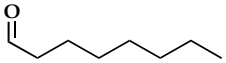
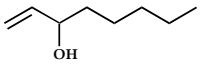
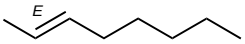
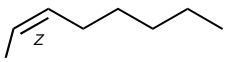
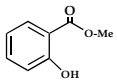
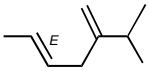
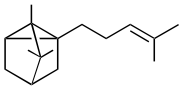
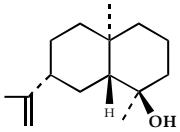
Composto	Fórmula Estrutural	MM
5-Metilfurfural 5-metil-2-furancarboxaldeído		110
Mircenol 2-metil-6-metileno-7-octeno-2-ol		154
Naftaleno		128
***n*-Nonanal** Nonanaldeído		142
***trans*-β-Ocimeno** *trans*-3,7-dimetil-1,3,6-octatrieno *(E)*-β-Ocimeno		136
***cis*-β-Ocimeno** *cis*-3,7-dimetil-1,3,6-octatrieno *(Z)*-β-Ocimeno		136
***n*-Octanal** Octanaldeído, Aldeído Caprílico		128
Octano *n*-octano		114
***n*-Octanol** 1-octanol, álcool caprílico		130
1-Octen-3-ol		128
***trans*-2-Octeno**		112
***cis*-2-Octeno**		112
Salicilato de metilo 2-hidroxibenzoato de metilo, óleo de *Wintergreen*		152
***trans*-Salveno** *trans*-6-metil-5-metileno-2-hepteno		124
α-Santaleno (-)-1,7-dimetil-7-(4-metil-3-pentenil)-triciclo[2.2.1.$0^{2,6}$]heptano		204
Selin-11-en-4α-ol [1R-(1α,4aβ,7β,8aα)]-decahidro-1,4a-dimetil-7-(1-metiletenil)-1-naftalenol		222

Tabela **2.6.8** Compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição e baixo ponto de ebulição identificados por GC-MS(ITD) no fruto de *Arbutus unedo*. Listagem dos compostos por ordem alfabética (continuação).

Composto	Fórmula Estrutural	MM
Silvestreno (*R*)-1-metil-5-(1-metiletenil)-ciclohexeno *m*-Menta-1(6)8-dieno		**136**
Terpinen-4-ol 4-metil-1-(1-metiletil)-3-ciclohexenol, *p*-Menta-1-en-4-ol	OH	**154**
α-Terpinen-7-al 4-(1-metiletil)-1,3-ciclohexadieno-1-carboxaldeído, *p*-Menta-1,3-dien-7-al	O	**150**
α-Terpineno 1-metil-4-(1-metiletil)-1,3-ciclohexadieno, *p*-Menta-1,3-dieno		**136**
γ-Terpineno 1-metil-4-(1-metiletil)-1,4-ciclohexadieno, *para*-Menta-1,4-dieno		**136**
***cis*-β-Terpineol** *cis*-1-metil-4-(1-metiletenil)-ciclohexanol, *p*-Menta-8-en-1-ol	HO	**154**
***trans*-β-Terpineol** *trans*-1-metil-4-(1-metiletenil)-ciclohexanol	HO	**154**
α-Terpineol α,α,4-trimetil-3-ciclohexeno-1-metanol, *p*-Menten-8-ol	HO	**154**
Terpinoleno 1-metil-4-(1-metiletilideno)ciclohexeno, *p*-Menta-1,4(8)-dieno		**136**
Tricicleno 1,7,7-trimetil-triciclo[2.2.1.$0^{2,6}$]heptano		**136**
1,2,4-Trimetilbenzeno pseudocumeno		**120**
2-Undecanona metilnonilcetona	O	**170**

Refira-se que, quanto nos foi possível pesquisar na literatura, este é o primeiro estudo sobre a componente volátil (em voláteis) do fruto de *Arbutus unedo*, existindo apenas um trabalho sobre a composição da aguardente de medronho.[26]

3.0.0 ACTIVIDADE BIOLÓGICA

Desde tempos imemoriais, as plantas têm desempenhado um papel terapêutico dominante no tratamento das doenças humanas.

O reino vegetal representa um extraordinário reservatório de novas moléculas. Estima-se que existam no mundo, entre 400 e 500 mil espécies de plantas, onde apenas uma pequena percentagem foi estudada fitoquimicamente, sendo substancialmente reduzida a fracção submetida a rastreio (*screening*) biológico ou farmacológico.[384] Uma vez que as plantas possuem centenas, ou mesmo milhares, de metabolitos, é frequente o interesse no reino vegetal como possível fonte de novas moléculas para introdução em programas de rastreio terapêutico. O rápido desaparecimento das florestas tropicais e outras áreas de vegetação importantes veio tornar essencial o acesso a métodos que levem ao rápido isolamento e identificação de produtos naturais bio-activos.

As medicinas tradicionais possuem um papel determinante no tratamento das populações e, hoje em dia, nos países subdesenvolvidos 85% dos regimes de tratamento baseiam-se na utilização terapêutica das plantas.[xii,385-387]

Na civilização "Ocidental", as plantas, surpreendentemente, desempenham igualmente um papel importante nos tratamentos de saúde. Recentemente sumarizaram-se aproximadamente 120 princípios activos de plantas,[388] possuindo uma elevada gama de actividades terapêuticas. Nestes incluem-se esteróides, glicósidos cardiotónicos (glicósidos da *Digitalis*), anticolinérgicos (alcalóides tipo tropano da beladona) analgésicos e antitússicos (alcalóides do ópio), anti-hipertensores (reserpina), colinérgicos (fisostigmina, pilocarpina), antimaláricos (alcalóides da *Chinchona*), anti-gota (colquicina), anestésicos (cocaína), relaxantes do músculo esquelético (tubocurarina), e agentes anti-cancerígenos.[389] Poucas são as drogas correntemente utilizadas no tratamento do cancro, que foram descobertas com base na racionalização do *design* estrutural. Na sua maioria os agentes anti-cancerígenos têm

[xii] Aproximadamente 79% da população mundial (4,5 biliões) utiliza as medicinas tradicionais em alguma extensão.[385]

sido descobertos a partir das plantas como resultado de empirismo, casualidade, ou programas de rastreio (*screening*)[389] em larga escala.

Convém ainda referir, apenas como indicativo da extensão da utilização destes fármacos, que se estima que as drogas de plantas representem cerca de 25% dos fármacos prescritos no mercado dos E.U.A..[xiii,387,391]

Como já referido anteriormente, a medicina popular atribui ao *Arbutus unedo* várias propriedades farmacológicas conferidas pelas folhas e raízes desta planta, não existindo qualquer referência relativamente aos seus frutos. De entre as diversas actividades fisiológicas conhecidas, destacam-se os efeitos diurético, anti-séptico urinário, adstringente, anti-inflamatório, depurativo, antidiarreico, actividade contra a blenorragia, efeitos cardiovasculares, anti-hipertensor e/ ou antidiabético.[393,394]

De acordo com os resultados obtidos, os metabolitos secundários que os frutos de *Arbutus unedo* contêm são predominantemente derivados de ácidos carboxílicos e triterpenóides. Será assim dado particular destaque às actividades biológicas associadas a estas famílias de compostos.

Os triterpenóides são dos metabolitos secundários mais omnipresentes na flora terrestre e marinha e, inclusive na fauna. A sua presença, mesmo em bactérias não-fotossintéticas, desenvolveu interesses quer evolutivos quer funcionais. Embora até há pouco tempo os usos medicinais desta classe de compostos tenham sido limitados, trabalhos recentes nesta área têm vindo a indicar um crescente potencial como droga. Além disso, e apesar da grande diversidade que se conhece existir entre os esqueletos carbonados dos triterpenos, continuam a emergir novas variantes.[258]

Investigações biológicas extensivas em triterpenóides revelam um largo espectro de actividades farmacológicas e fisiológicas como anti-inflamatórios,[387,394-396] antineoplásicos,[362,397-407] anti-úlcerosos,[387,408] antibacterianos[398,409,411] e antifúngicos,[387,398,412] espermicidas,[398] actividade no sistema nervoso central (SNC),[398] diuréticos,[398]

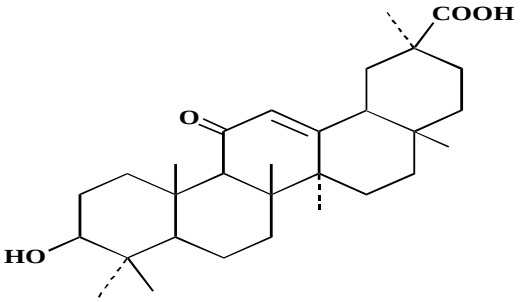
[xiii] Cerca de 15.5 biliões de dólares em 1990 onde mais de metade dos 25 produtos mais prescritos são produtos derivados de plantas.[392]

antidiabéticos,[396] transportadores de metabolitos,[398] moluscicidas,[387,413] ascaricidas[398] e insecticidas.[398,413,414] Descobriu-se também que alguns triterpenóides são agentes adoçantes.[387]

No entanto, poucos são os triterpenóides que já conquistaram o estatuto de droga com utilização clínica. Apesar das limitadas aplicações destes metabolitos secundários como agentes terapêuticos bem sucedidos, têm vindo a ser extensivamente exploradas nos últimos anos as actividades *in vitro* destes compostos. Alguns resultados interessantes são a seguir mencionados:

Actividade Anti-inflamatória. Dentro deste vasto leque de estruturas químicas dos triterpenóides encontram-se compostos com acção no metabolismo, actividade mineralocorticóide e actividade anti-inflamatória entre outras actividades.[388] Os triterpenóides das séries oleaneno e urseno são activos contra o edema induzido por *carrageenan* e na artrite induzida por formaldeído em animais de experiência (ratazanas).[414]

As raízes da *Glycyrrhiza glabra*, vulgarmente chamadas de alcaçuz têm sido usadas nas medicinas Ocidentais e Orientais como expectorante, antitússico e como agente adoçante, devido ao seu teor em triterpenóides (ácido glicirrético, composto dominante).



Ácido glicirrético

No sistema médico chinês o alcaçuz é usado no tratamento de inflamações da garganta.[415] Tem sido observada actividade anti-inflamatória em triterpenóides da série oleaneno aumentando com a polaridade dos compostos, sendo enaltecida pelo número de grupos hidroxilo presentes na molécula.[394,416] Num trabalho recente de Akihisa *et al.*[394] refere-se a actividade anti-inflamatória de vários álcoois triterpénicos nomeadamente a α-amirina, β-amirina, uvaol e o lupeol entre outros.[417] O ácido ursólico e o lupeol, diminuem

significativamente a incidência de úlcera gástrica em animais de experiência (ratazanas).[418] O ácido oleanólico é efectivo na prevenção experimental de doença hepática induzida por injecção de CCl_4 em animais de experiência (ratazanas). Os resultados sugerem que o ácido oleanólico possui acção hepatoprotectora muito potente no tratamento da doença hepática induzida pelo CCl_4.[419]

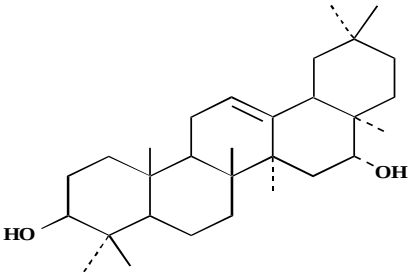
Actividades Antibacteriana e Antifúngica. O ácido oleanólico e o seu isómero, ácido ursólico[xiv] isolados do fruto *ziziphora*, uma droga oriental, verificou-se inibirem a formação do glucano *in vitro* a 100 μg/ml. Inibindo simultaneamente o crescimento de bactérias como *Streptococcus mutans* na boca.[420]

Actividade Antiplasmodial *(antimalárica)*. A malária, doença causada por parasitas do género *Plasmodium* é uma doença das regiões tropicais, responsável no mundo pela morte de milhões de pessoas.[421] Após o período de aparente controlo, o surgimento do parasita que permanece resistente à droga, a resistência dos vectores do insecto aos insecticidas e os movimentos migratórios das populações infectadas resultam num crescente número de novos casos de malária.[422,423] A descoberta da actividade antimicrobiana da artemisia, isolada de uma planta tradicional da medicina chinesa, usada como antimalárica, *Artemisia annua*, estimulou a pesquisa de novas drogas a partir de plantas.[424-426] O triterpeno pentacíclico, lupeol, foi identificado como sendo responsável, pelo menos em parte, pela actividade antiplasmodial observada *in vitro*. Este resultado está de acordo com o trabalho de Khalid *et al.*[428] publicado em 1986 que confirma a actividade antiplasmodial do lupeol após pesquisa com produtos naturais.[426]

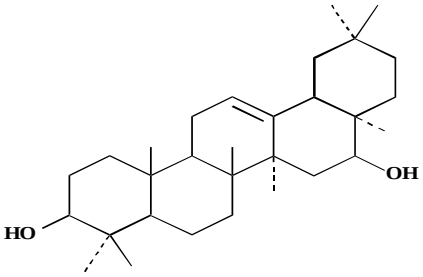
Actividade Antitumoral e Anti-cancerígena. A relação entre a estrutura química e a actividade anti-cancerígena de alguns triterpenóides pentacíclicos e tetracíclicos foi estudada, entre outros, por Ling *et al.*.[429] Os efeitos anti-cancerígenos foram testados contra células de cancro humanas das linhas *ME-180*, *u-87MG*, *SK-HEP-1*, *CALAU-1*,

[xiv] Num trabalho de revisão, *Jie Liu*[427] sumaria os estudos farmacológicos efectuados com estes dois ácidos triterpénicos.

CAMA-1, *SK-OV-3* e *HEC-1-A*.[xv] Dentro dos triterpenos pentacíclicos o Epimanidiol (3β,16α-dihidroxiolean-12-eno) (*3.0.0-1*) mostrou ser citotóxico a 100 μgml^{-1} contra as células cancerosas das linhas *ME-180, u-87MG, CALAU-1, CAMA-1, SK-OV-3* e *HEC-1-A*. A concentração necessária para produzir 50% da inibição contra o *HEC-1-A* era de aproximadamente 10 μgml^{-1}.



Epimanidiol (*3.0.0-1*)



Maniladiol (*3.0.0-2*)

O Maniladiol (*3.0.0-2*), o epímero 16β-, exibe citotoxicidade contra o *ME-180* e *CAMA-1*. Alguns triterpenos tipo α- e β-amirina e lupano, bem como o ácido ursólico, entre outros, são também frequentemente referidos como proeminentes agentes antitumorais contra as células cancerosas das linhas *A-549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498, HCT15*.[400,401,403,406]

Os resultados dos estudos *in vitro* permitem ajudar a perceber os mecanismos de acção. Devido à limitada solubilidade e acção não selectiva das elevadas concentrações de compostos lipofílicos a interpretação dos resultados deve ser criticamente reconsiderada de modo a avaliar as implicações práticas do provável uso *in vivo*. Em conclusão, existem resultados promissores que sugerem que os triterpenos pentacíclicos são uma classe de compostos com efeitos biológicos muito interessantes a serem estudados mais cuidadosamente.[387]

[xv] Linhas de células tumorais humanas: *ME-180* (cervical), *u-87MG* (glioblastoma), *SK-HEP-1* (adenocarcinoma hepático), *CALAU-1* (tiróide), *CAMA-1* (mama), *SK-OV-3* (ovário), *HEC-1-A* (útero), *A-549* (tipo II do epitélio alveolar (células não pequenas do pulmão)), *SK-MEL-2* (melanoma), *XF498* (sistema nervoso central, SNC) e *HCT15* (adenocarcinoma do cólon).

Quanto aos ácidos carboxílicos e seus derivados são muitos os trabalhos que se referem às actividades biológicas destes compostos. Dando particular destaque aos ácidos carboxílicos de cadeia carbonada curta a média ($\leq C_{10}$) podemos referir trabalhos onde se denuncia, entre outros, o envolvimento dos ácidos octanóico e decanóico na actividade anticonvulsiva, no tratamento da epilepsia,[195,430] no síndrome tipo *Reye*[431] e outras doenças metabólicas.[432]

Na tabela 3.0.0 são referidas as actividades biológicas mais interessantes descritas na literatura dos compostos isolados e/ou identificados no medronho.

Tabela **3.0.0** Compostos com actividades biológicas relevantes, encontrados no fruto de *Arbutus unedo* L.[xvi]

Composto	Actividade Biológica	Referências
α-Amirina	Anti-edémica (IC43 =40 mg/kg ipr rato), Anti-inflamatória (IC71 = 1000 ppm oral), Antitumoral, Citotóxica (50-400 ppm);	387, 394, 400, 408, 433
β-Amirina	Anti-edémica (IC27 = 40 mg/kg ipr rato);	387, 394, 400, 409, 417, 433
Lupeol	Anti-edémica, Anti-gripe, Anti-hiperlipidémica, Anti-inflamatória (1/3 Indometacina), Antimalárica (IC50 = 46,8 μg/ml), Anti-oxalato (25 mg/kg/dia), Antioxidante (25 mg/kg/dia), Antiperoxidante (25 mg/kg/dia), Antireumática, Antitumoral, Anti-uretrótica, Antiviral, Citotóxica (50-500 ppm), Inibidora da FTPase (IC50 = 65 μg/ml), Hipotensiva,	387, 394, 400, 409, 417, 433
Ácido Oleanólico	Abortifaciente, Anti-HIV (EC50 = 1,7 μg/ml, IC50 = 21,8 μg/ml), Anti-alérgica, Anti-aterosclerótica, Anticarcinogénica, Anti-edémica (IC36 = 40 mg/kg ipr rato), Antifertilidade, Antigengivite, Anti-hepatotóxica, Anti-hiperlipidémica, Anti-inflamatória (40 mg/kg ipr), Antioxidante, Antiperiodontítica (MIC = 625-1250 μg/ml), Antiplaca (MIC = 625-1250 μg/ml), Antisarcoma, Antiséptica (MIC = 625-1250 μg/ml), Antitumoral, Anti-úlcera (>carbenoxolona), Inibidora da Aromatáse, Bactericida (MIC = 625-1250 μg/ml), Preventiva do Cancro, Cardiotónica, Diurética, Hepatoprotectora, Hipolipidémica, Imunomoduladora, Fagocitótica, Sedativa, Uterotónica;	194, 195, 386, 387, 403, 424, 433
Ácido Ursólico	Analgésica, Anti-HIV (EC50 = 2,0 μg/ml, IC50 = 6,5 μg/ml, IC85 = 18 μg/ml), Anti-EBV, Anti-artrítica, Anticarcinogénica, Anticolestática (28-100 mg/kg oral), Antidiabética, Anti-edémica, Anti-hepatotóxica (5-20 mg/kg ipr), Anti-histamínica, Anti-hiperlipidémica, Anti-inflamatória (1/3 Indometacina, IC24 = 500 mg/kg), Antileishmânica (ED50 = 20 μM), Antileucémica, Antilinfomica, Antimutagénica, Anti-obesidade?, Anti-idade, Antioxidante, Antiproliferativa (IC50 = 15-20 μM), Anti-estafilocócica, Antitumoral (mama) (0,5% dieta, IC50 = 15-20 μM), (Cólon), (Pulmão), (Estômago) (IC50 = 15-20 μM), Anti-Promotora Cancro, Anti-úlcera, Antiviral, Inibidora-Aromatase, Depressora do SNC, Preventiva do Cancro, Colerética (5-20 mg/kg oral), Citotóxica (50 ppm, ED50 = 3.75 μg/ml), Diurética, Hepatoprotectora, Hipolipidémica, Inibidora da Lipogenáse (IC50 = 0,18 mM), Piscicida, "*Sparing*" do Potássio (3 mg/ratos), Inibidora da Protease (IC85 = 18 μg/ml), "*Sparing*" do Sódio (3 mg/ratos), Viricida (IC85 = 18 μg/ml);	193, 195, 386, 387, 400, 401, 402, 403, 405, 406, 413, 433, 434, 435, 436
Uvaol	Antitumoral (mama) (IC50 = 30->30 μM), Antitumoral (estômago) (IC50 = 30->30 μM), Citotóxica (100-200 ppm), Inibidora da Lipogenáse;	386, 387, 392, 433, 434

[xvi] IC50 (concentração inibitória de 50% das células), LC50 (concentração letal, 50%), EC50 (concentração efectiva, 50%), MIC (concentração mínima inibitória, crescimento das células); ipr - administração intraperitoneal.

Tabela **3.0.0** Compostos com actividades biológicas relevantes, encontrados no fruto de *Arbutus unedo* L. (continuação)

Composto	Actividade Biológica	Referências
β-Sitosterol	Androgénica, Anoréctica, Anti-adenomica, Anticancro (mama), Anti-edémica (IC54 = 320 mg/kg oral), Anti-estrogénica, Anti-insectos, Antifertilidade, Antigonadotrófica, Anti-hiperlipoproteinémica, Anti-inflamatória, Antileucémica, Antilinfomica, Antimutagénica (250 μg/ml), Anti-ofídica (2,3 mg musc.), Antiprogestacional, Antiprostaglandinas (30 mg/dia/12 semanas), Anti-prostatadenomica, Antiprostatítica (10-20 mg/3x/dia/oral homens), Antitumoral (Cervix) (Pulmão), Antiviral, Artemicida (LC50 = 110 ppm), Bactericida, Preventiva do Cancro, Candidicida, Estrogénica, Gonadotrófica, Hepatoprotectora, Hipo-colesterinémica (9-3330 g/homem/dia/oral), Hipoglicémica, Hipolipidémica, Espermicida, Ulcerogénica (500 mg/kg/ ipr ratos), Viricida;	433
Estigmasterol	Anti-hepatotóxica, Anti-inflamatória, Anti-ofídica (2,3 mg/ ipr musc.), Antiviral, Artemicida (LC50 = 110 ppm), Preventiva do Cancro, Estrogénica, Hipo-colesterinémica, Ovulativa, Sedativa, Viricida;	433
2-Furfural	Antiséptica, Aromatizante, Fungicida, Insecticida, Irritante,	433
α-Terpineol	Anti-alergénica, Anti-asmática, Antibacteriana, Anti-séptica, Antitússica, Colagoga, Expectorante, Insectífuga, Pesticida;	433
Terpinoleno	Insecticida, Desodorizante, Aromatizante, Fungicida, Pesticida;	433
β-Carofileno	Inibidora da Aldose-reductase, Anti-acne, Anti-asmática, Antibacteriana, Anticariogénica (MIC = 1600 μg/ml), Anti-edémica, Insecticida (500 ppm), Anti-inflamatória (IC50 = 100 μM), Antipasmódica, Anti-estreptocóccica, Antitumoral, Aromatizante, Insectífuga, Pesticida, Termitífuga;	433
Ácido Octanóico	Candidicida, Aromatizante, Fungicida, Pesticida;	195, 430-433
Ácido decanóico	Nematicida, Aromatizante, Pesticida;	195, 430-433
Ácido palmítico	Antifribrinolítica, Aromatizante, Hemolítica, Hiper-colesterolémica, lubrificante, Nematicida, Pesticida;	433

4.0.0 CONCLUSÕES

A presente dissertação tem por objectivo aprofundar o conhecimento da composição química do medronho, o fruto de *Arbutus unedo* L. e, averiguar a existência de moléculas cuja actividade biológica possa ser associada ao efeito de mal-estar sentido aquando da ingestão de uma maior quantidade de frutos.

Apesar de se tratar de um fruto edível, até ao início deste estudo apenas eram conhecidas as suas características tecnológicas,[24,361-364] a sua composição química alimentar[18,23,362-365,437] e os seus pigmentos (carotenóides).[19,48,74-76]

Procedeu-se ao estudo sistemático do fruto, possibilitando o conhecimento da sua composição química em metabolitos secundários. Para tal e, de acordo com o actual estado da arte,[444] foram utilizadas a cromatografia gás-líquido de alta resolução (HRGC), a sua associação à espectrometria de massa (GC-MS) e a comparação com amostras autênticas no estudo dos componentes de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição. Foram identificados 70 compostos e postuladas 19 estruturas de voláteis. Efectuou-se o estudo destes componentes por se encontrarem associados às características do sabor dos frutos. Um dos seis componentes dominantes, a β-damascona, um sesquiterpeno oxigenado, é uma estrutura pouco comum em pequenos frutos comestíveis.[300]

A cromatografia gás-líquido de alta resolução, a sua associação à espectrometria de massa e posteriormente a comparação com amostras autênticas foi também a metodologia utilizada na identificação de derivados de ácidos carboxílicos. Estas são actualmente as técnicas mais utilizadas na identificação deste tipo de compostos.[86,445] Foram identificadas dez estruturas químicas naturais novas: duas séries de ésteres longos de ácidos carboxílicos, os ésteres em C_{18}, C_{19}, C_{20} e C_{22} do ácido octanóico e os ésteres em C_{12}, C_{14}, C_{17}, C_{18} e C_{20} do ácido decanóico.

A mesma metodologia foi utilizada na identificação no medronho, de estruturas já conhecidas de hidrocarbonetos, cetonas de cadeia comprida e compostos triterpénicos.

Recorrendo a métodos de isolamento cromatográficos convencionais e também a técnicas mais modernas de detecção e isolamento por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), procedeu-se ao isolamento individual de 7 triterpenóides: α- e β-amirinas, lupeol, ácidos oleanólico e ursólico, β-sitosterol e também o diol triterpénico olean-12-en-3β,23-diol, um novo produto natural. A sua identificação foi efectuada com base nas evidências espectroscópicas e comparação de constantes físicas.

Tendo em conta os metabolitos secundários identificados, as hipóteses do efeito de mal-estar associados à ingestão do fruto poderão ser:

1 - a indigestibilidade do medronho.[24]

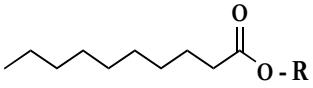
2 - o teor do fruto em triterpenóides (>1 g/Kg fruto fresco); associe-se as actividades biológicas conhecidas, especialmente as atribuídas aos ácidos ursólico e oleanólico.

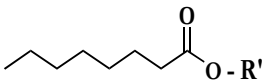
3 - embora vestigial, a presença de aldeídos, os quais poderão levar à formação de estruturas heterocíclicas (alcalóides).

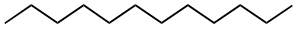
4 - a possível presença de acetato de etilo nos frutos consumidos (frutos geralmente muito maduros), composto conhecido pela sua actividade depressora do sistema nervoso central. Embora não tenha sido detectada a presença de acetato de etilo nos frutos estudados, ele forma-se aquando da sua fermentação, sendo um dos problemas da valorização da aguardente de medronho.[26]

Nas páginas seguintes estão representadas as principais estruturas químicas identificadas no medronho, o fruto de *Arbutus unedo*.

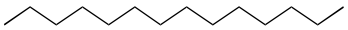
Ésteres longos de ácidos carboxílicos encontrados no fruto de *Arbutus unedo*.



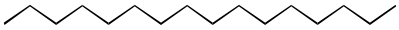


R = 

Decanoato de dodecilo (*2.2.2-1*)

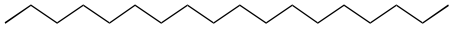


Decanoato de tetradecilo (*2.2.2-3*)

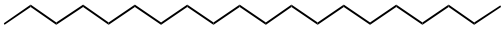


Decanoato de hexadecilo (*2.2.2-5*)

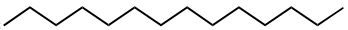
Decanoato de heptadecilo (*2.2.2-7*)



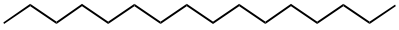
Decanoato de octadecilo (*2.2.2-9*)



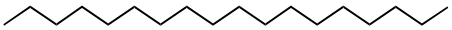
Decanoato de eicosanilo (*2.2.2-11*)

R'= 

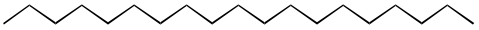
Octanoato de tetradecilo (*2.2.2-2*)



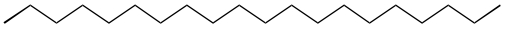
Octanoato de hexadecilo (*2.2.2-4*)



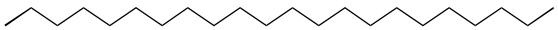
Octanoato de octadecilo (*2.2.2-6*)



Octanoato de Nonadecilo (*2.2.2-8*)

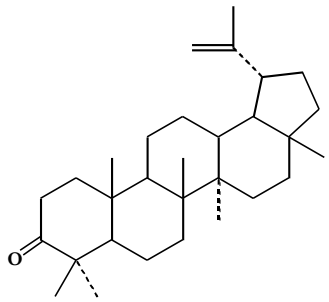


Octanoato de eicosanilo (*2.2.2-10*)

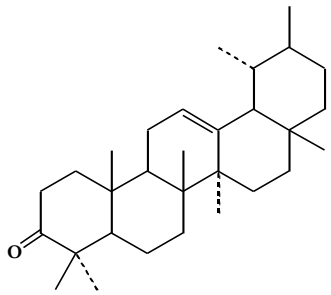


Octanoato de docosanilo (*2.2.2-12*)

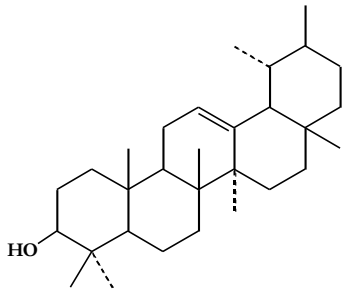
Triterpenos pentacíclicos encontrados no fruto de *Arbutus unedo*.



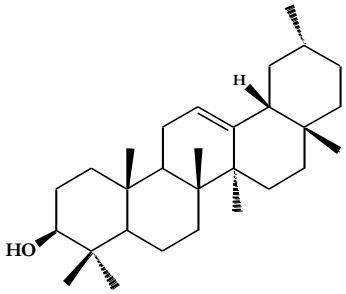
2.2.3-1 **- Lupeona**



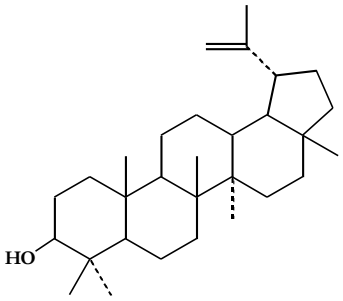
2.2.3-2 **- α-Amirona**



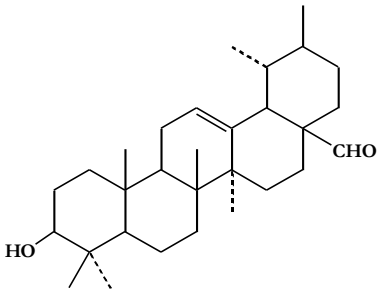
2.2.3-3 **- α-Amirina**



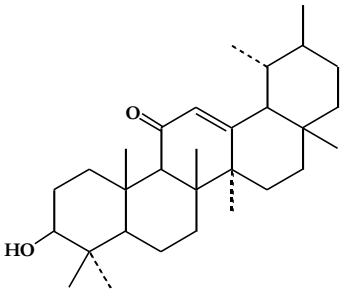
2.2.3-4 **- β-Amirina**



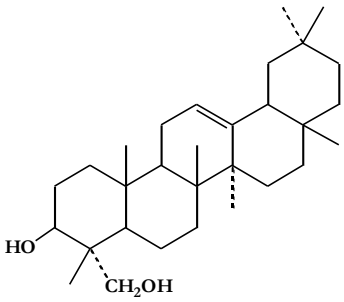
2.2.3-5 **- Lupeol**



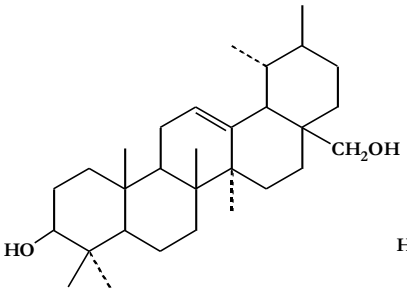
2.2.3-6 **- Aldeído ursólico**



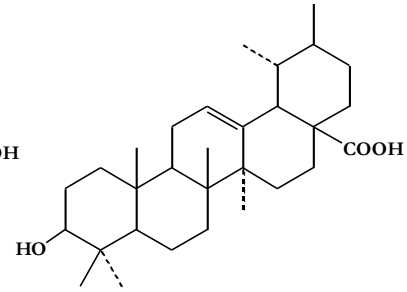
2.2.3-7 **- α-Amirenonol**



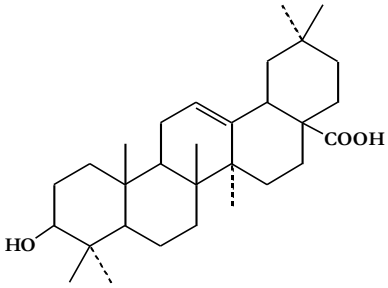
2.2.3-8 **- Olean-12-en-3β,23-diol**



2.2.3-9 **- Uvaol**

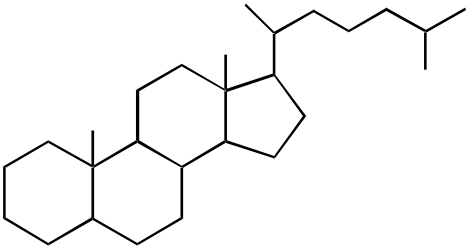


2.2.3-10 **- Ácido Ursólico**

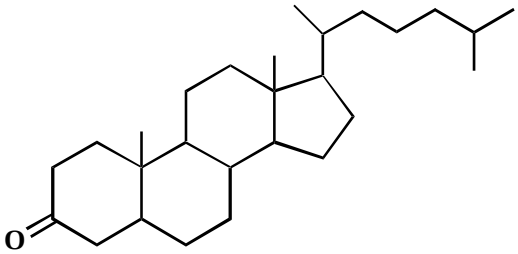


2.2.3-11 **- Ácido Oleanólico**

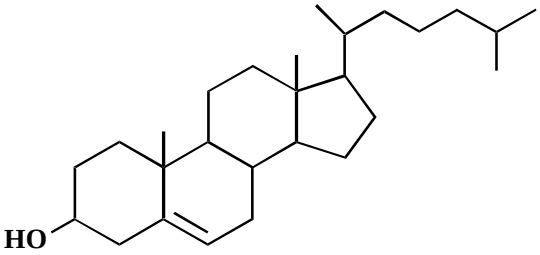
Triterpenos tetracíclicos encontrados no fruto de *Arbutus unedo*.



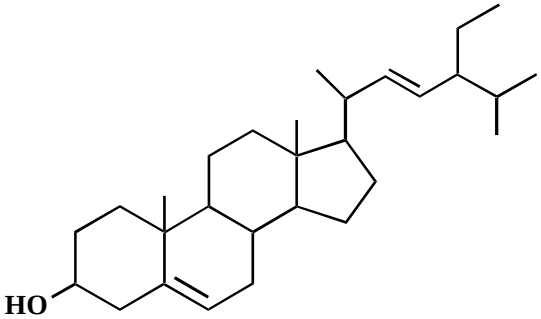
2.2.4-1 – **5α-Colestano**



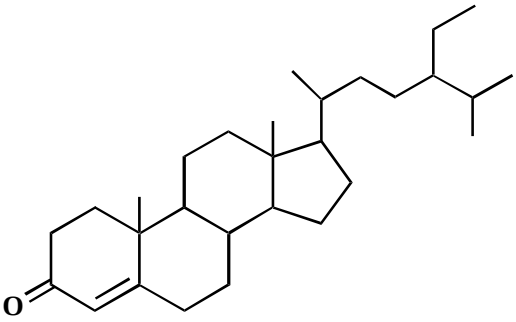
2.2.4-2 - **Colestanona**



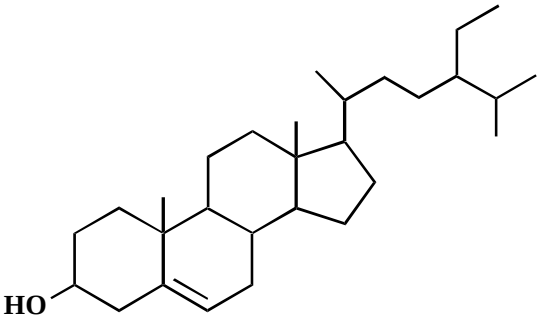
2.2.4-3 - **Colesterol**



2.2.4-4 - **Estigmasterol**

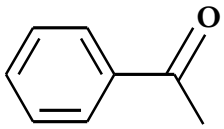


2.2.4-5 - **Estigmastenona**

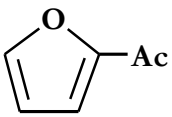


2.2.4-6 - **β-Sitosterol**

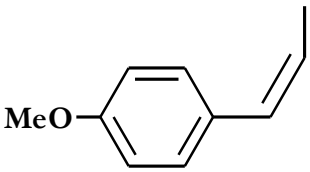
Estruturas dos compostos de pequena massa molecular identificados no fruto de *Arbutus unedo*.



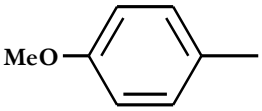
Acetofenona



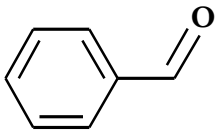
2-Acetilfurano



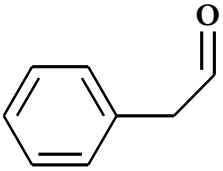
Anetole



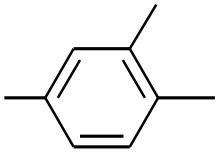
***para*-Metilanisole**



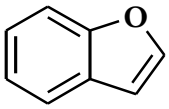
Benzaldeído



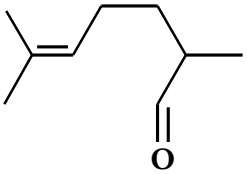
Fenilacetaldeído



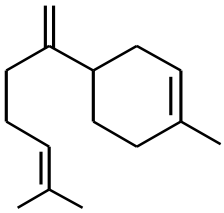
1,2,4-Trimetilbenzeno



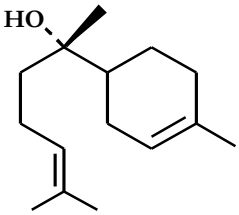
2,3-Benzofurano



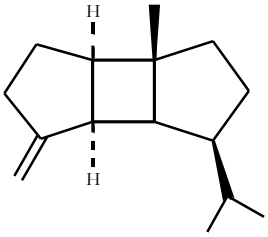
Bergamal



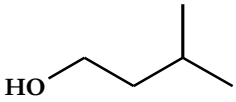
β-Bisaboleno



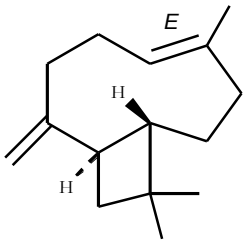
α-Bisabolol



β-Bourboneno

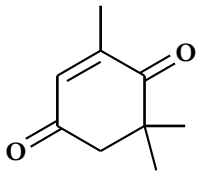


Álcool isoamílico

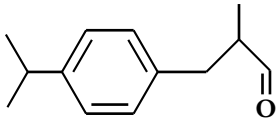


β-Cariofileno

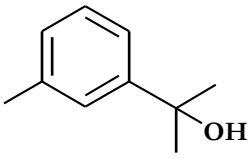
Estruturas dos compostos de pequena massa molecular identificados no fruto de *Arbutus unedo*. (continuação)



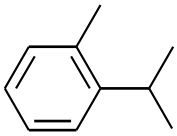
4-Ceto-isoforona



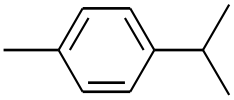
Cliclamenaldeído



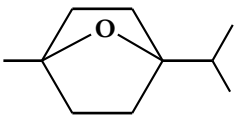
***meta*-Cimeno-8-ol**



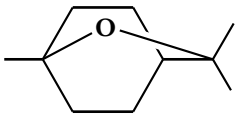
***orto*-Cimeno**



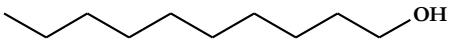
***para*-Cimeno**



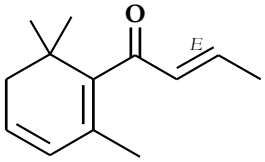
1,4-Cineole



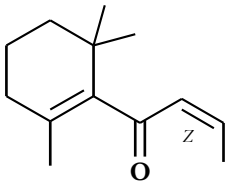
1,8-Cineole



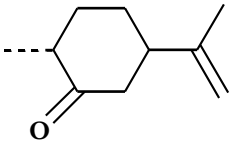
***n*-Decanol**



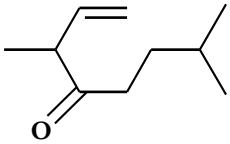
***trans*-*β*-Damascenona**



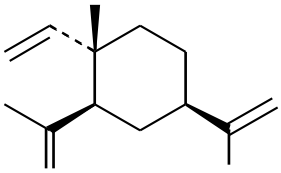
***cis*-*β*-Damascona**



***trans*-Dihidrocarvona**

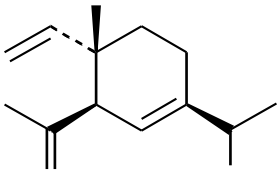


Dihidrotagetona

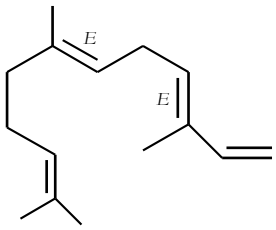


β-Elemeno

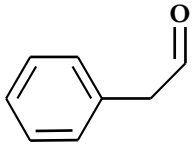
Estruturas dos compostos de pequena massa molecular identificados no fruto de *Arbutus unedo*. (continuação)



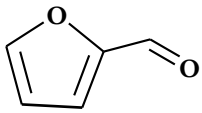
δ-Elemeno



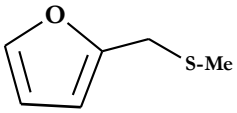
α-Farneseno



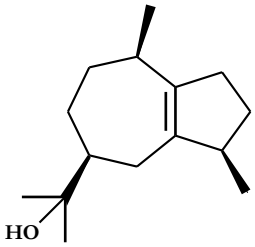
Fenilacetaldeído



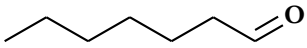
2-Furfuraldeído



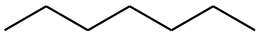
Furfurilmetil metilsulfureto



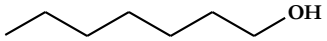
Guaiol



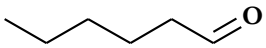
***n*-Heptanaldeído**



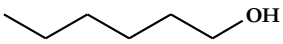
***n*-Heptano**



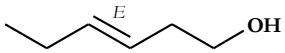
***n*-Heptanol**



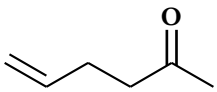
***n*-Hexanaldeído**



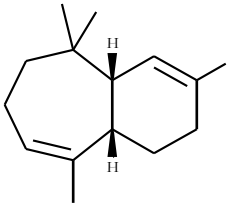
Hexanol



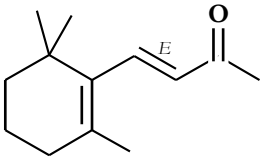
3-Hexenol



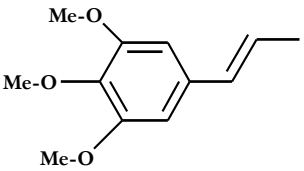
5-Hexen-2-ona



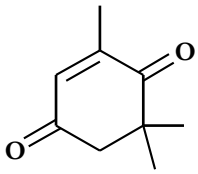
γ-Himachaleno



β-Ionona

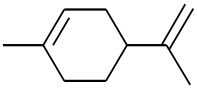


***trans*-Isoelemicina**

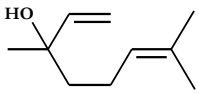


4-Cetoisoforona

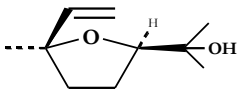
Estruturas dos compostos de pequena massa molecular identificados no fruto de *Arbutus unedo*. (continuação)



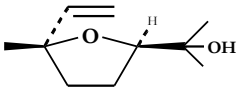
Limoneno



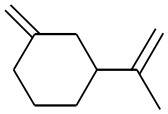
Linalool



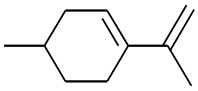
cis-Linalool óxido



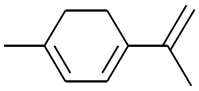
trans-Linalool óxido



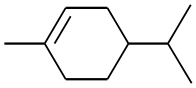
m-Menta-1(7),8-dieno



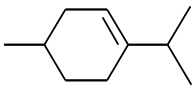
p-Menta-3,8-dieno



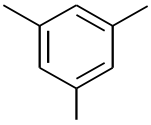
p-Menta-*1,3,8*-trieno



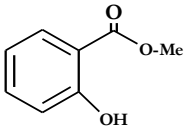
p-Ment-1-eno



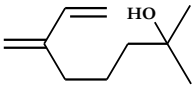
p-Ment-3-eno



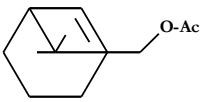
Mesitileno



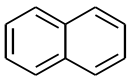
Salicilato de metilo



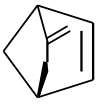
Mircenol



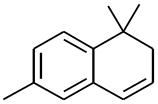
Acetato de mirtenilo



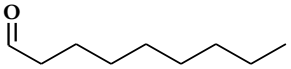
Naftaleno



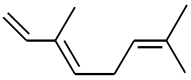
5-Metileno-2-norborneno



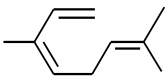
1,2-Dihidro-1,1,6-trimetilnaftaleno



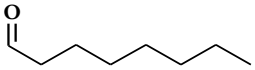
n-Nonanaldeído



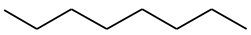
trans-*β*-Ocimeno



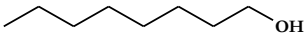
cis-*β*-Ocimeno



n-Octanaldeído

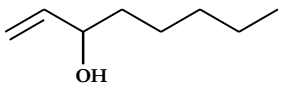


n-Octano

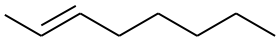


n-Octanol

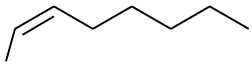
Estruturas dos compostos de pequena massa molecular identificados no fruto de *Arbutus unedo*. (continuação)



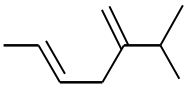
1-Octen-3-ol



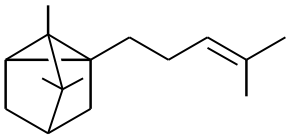
***trans*-2-Octeno**



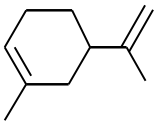
***cis*-2-Octeno**



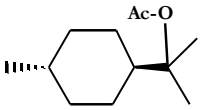
***trans*-Salveno**



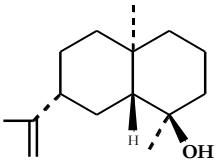
α-Santaleno



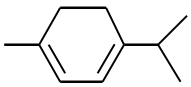
Silvestreno



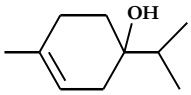
Acetato de *trans*-dihidro-α-terpenilo



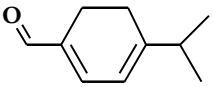
Selin-11-en-4α-ol



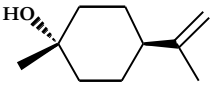
α-Terpineno



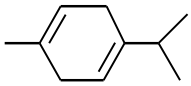
Terpinen-4-ol



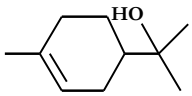
α-Terpinen-7-al



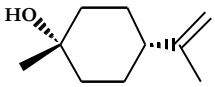
***trans*-β-Terpineol**



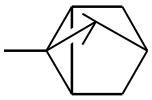
γ-Terpineno



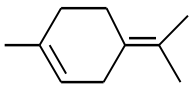
α-Terpineol



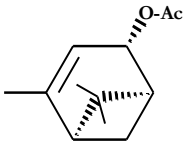
***cis*-β-Terpineol**



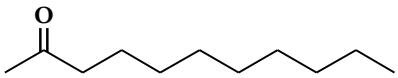
Tricicleno



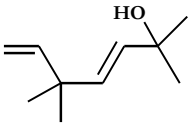
Terpinoleno



Acetato de *cis*-verbenilo



2-Undecanona



Álcool yomogi

5.0.0 PARTE EXPERIMENTAL

5.1.0 Aparelhagem e Condições Experimentais

Os pontos de fusão (m.p.) foram determinados num aparelho de placa aquecida Kofler (*Leica Galen III*) e não são corrigidos.

Os índices de refracção (η^T_D) foram determinados num refractómetro de Abbe (*Zazi*).

As determinações de rotação específica $[\alpha]^T_D$ foram determinadas em polarímetro de *Perkin Elmer, 241MC*.

Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos num aparelho FTIR *Nicolet 5 SCX*. Os espectros dos compostos apresentados em 2.2.0 foram registados em solução ($CHCl_3$), utilizando-se um detector DTGF (janela de KBr) e uma resolução de 16 cm^{-1}.

Os espectros de ultravioleta (UV) foram registados em etanol absoluto num espectrómetro *Perkin Elmer, Lambda 6*.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de protão (^{1}H-NMR) e de carbono-13 (^{13}C-NMR), foram efectuados em aparelho *Brucker ARX* 400 MHz. O tetrametilsilano (TMS) foi usado como padrão interno (referência zero) e como solventes: o deuterocloroformio ($CDCl_3$), a piridina deuterada (C_5D_5N), o metanol deuterado (CD_3OD), óxido de deutério (D_2O) e/ou a acetona deuterada (CD_3COCD_3). Os dados obtidos são indicados pela ordem: desvio químico (δ em ppm); intensidade relativa, através do número de protões (nH); multiplicidade s (singuleto), d (dubleto), t (tripleto), q (quarteto), m (multipleto); constante de acoplamento *J* em Hertz.

As determinações de HRGC-MS foram efectuadas em condições cromatográficas idênticas com instrumento *Shimadzu*, modelo QP -1000, nas seguintes condições: temperatura da fonte iónica 250 ºC, temperatura da interface directa 325 ºC, velocidade de *"scan"* 1.2 s/década de 50 m/z a 500 m/z. Coluna capilar de sílica, manufacturada, L = 25 m, d.i. = 0,32 mm revestida com PS-255 (fase ligada de 100% Polidimetilsiloxano), d_f = 1

μm. A temperatura do forno foi linearmente programada de 250 a 300 ºC a 2,5 ºC min^{-1}. Os espectros de impacto electrónico (EI) foram obtidos a 70 eV.

A cromatografia de gás-líquido foi executada em instrumento *Carlo Erba* da série Vega, modelo 5300 equipado com injector *split-splitless*, detector de ionização de chama, e coluna capilar de sílica, manufacturada, L = 25 m, d.i. = 0,32 mm, revestida com PS-255 (fase ligada de 100% Polidimetilsiloxano), d_f = 1,0 μm. A temperatura do forno foi linearmente programada de 250 a 300 ºC a 2,5 ºC min^{-1}. As temperaturas do injector e do detector de 300 ºC. Os gás de arraste o hidrogénio (Pi = 70 kPa). A integração dos picos executada com integrador *Shimadzu CR3A*.

Na análise dos compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição, as amostras provenientes da SDE foram sujeitas (0,2 μl) a análise por HRGC; as condições cromatográficas foram: a temperatura do forno foi linearmente programada de 45º a 3º/min até 175º seguida de aquecimento a 15 ºC min^{-1} até 300 ºC (10 min.); O injector aquecido a 250 ºC; razão de Split 1:20. No bloco de injecção a amostra repartiu-se por duas colunas A e B de polaridades diferentes; Coluna A: coluna capilar de sílica, L = 30 m, d.i. = 0,25 mm, d_f = 0,25 μm, revestida com DB-1™ (fase ligada de 100% dimetilpolisiloxano (J & W)); Coluna B: coluna capilar de sílica, L = 30 m, d.i. = 0,25 mm, d_f = 0,15 μm, revestida com DB-17HT™ (fase ligada de 50% fenil, 50% dimetilpolisiloxano (J & W)).

Na análise dos compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição, as determinações dos Índices de retenção (Ip) foram efectuados de acordo com a expressão:[438,439]

$$Ip = 100 \frac{tr'(i) - tr'(px)}{tr'(px+1) - tr'(px)} + 100x$$

sendo:

Ip – Índice de retenção do soluto i, a temperatura programada

tr'(i) – tempo de retenção corrigido (tr' = tr – tm) do composto i

tr'(px) – tempo de retenção corrigido do alcano linear cujo pico elui imediatamente antes do soluto i, e cujo número de átomos de carbono é x.

tr'(px+1) – tempo de retenção corrigido do alcano linear com x+1 átomos de carbono, cujo pico elui imediatamente após o soluto i.

tm – tempo morto.

Para estas determinações, foi utilizada a série padrão de *n*-alcanos C_5-C_{30} (*Aldrich*).

As determinações de HRGC-ITD foram efectuadas em condições cromatográficas idênticas com instrumento *Finnigan Mat* (U.K.), nas seguintes condições: temperatura da fonte iónica 250 ºC, temperatura da interface directa 250 ºC, velocidade de *"scan"* 1.2 s/década de 40 *m/z* a 450 *m/z*. Coluna capilar de sílica, L = 30 m, d.i. = 0,25 mm, d_f = 0,25 μm, revestida com DB-1™ (fase ligada de 100% dimetilpolisiloxano (J & W)). A temperatura do forno foi: 45 ºC, isotérmica de 1 min., a 1ª rampa de aquecimento de 1,3 ºC min^{-1} até 175 ºC, isotérmica de 2 min., a 2ª rampa de aquecimento de 15 ºC min^{-1} até 300 ºC, permanecendo nesta temperatura durante 15 min.. Gás de arraste o hélio (1 ml/min.). Os espectros de impacto electrónico (EI) foram obtidos a 70 eV.

O HPLC executado numa bomba *Varian 2510* equipada com coluna de L = 250 mm, d.i. = 4 mm, empacotada com Lichrosorb RP-18 Select B®, 5 μm (E. Merck, Darmstadt, Alemanha). A eluição foi efectuada com uma mistura Metanol: Água (0,1% ácido acético) (96:4), fluxo de 0,7 ml min^{-1}, com detector de *"light-scattering"* (LSD) em instrumento "*laser light-scattering detector*" Sedere® (Alfortville, França), modelo Sedex 55, operado com ganho 8, temperatura 62 ºC, e nebulização com ar a uma pressão de 250 kPa.

As análises de HPLC-PBMS foram executadas em condições cromatográficas idênticas: numa bomba *Varian 2510* equipada com coluna de L = 250 mm, d.i .= 4 mm, empacotada com Lichrosorb RP-18 Select B®, d_f = 5 μm (E. Merck, Darmstadt, Alemanha). A eluição foi efectuada com uma mistura Metanol: Água (0,1% ácido acético) (96:4), fluxo de 0,55 ml min^{-1}, com instrumento VG *Trio-1000* equipado com interface de "particle-beam" (PB) (a pressão de hélio para a nebulização foi de 50 kPa). Velocidade de *"scan"* 10 scans/s de 50 m/z a 500 m/z. Temperatura da fonte iónica 150 ºC, Temperatura da interface 150 ºC. Os espectros de impacto electrónico (EI) foram obtidos a 70 eV.

Na cromatografia em camada delgada (TLC) utilizaram-se placas de sílica Merck $60F_{254}$ de 0,25 mm e 0,5 mm de espessura. As placas foram reveladas utilizando luz UV (λ = 254 e 366 nm) (lâmpada *Camag*) e com "sprays" de H_2SO_4 em solução metanólica (reagente Nº241[319]) e:

- solução anidrido acético-ácido sulfúrico (reagente de *Liebermann-Buchard*) (reagente Nº1[319]).
- solução anisaldeído-ácido sulfúrico (reagente Nº11[319]).
- solução de verde bromocresol-azul de bromocresol- permanganato de potássio (reagente Nº26[319]).
- solução de glucose - anilina (reagente Nº127[319]).
- solução de Ninidrina (reagente Nº178[319]).
- solução de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (reagente Nº82[319]).
- solução de acetato de bismuto-iodeto de potássio (reagente de *Dragendorff*) (reagente Nº97[319]).
- solução metanólica a 0,4% de 2,6-dicloroquinona-4-cloroimida (reagente de *Gibbs*) (reagente Nº62[319]).
- solução de vanilina - ácido sulfúrico (reagente Nº262[319]).
- solução de cloreto de ferro (III)-hexacianoferrato de potássio (reagente de *Berlin blue*) (reagente Nº5[319]).
- solução de mercúrio em ácido nítrico fumante (reagente de *Millons*) (reagente Nº26[100]).

Todos os solventes utilizados (Merck, grau p.a. ou puro) foram pré-purificados de acordo com a literatura.[400]

A seguir listam-se os compostos padrão utilizados neste trabalho:

ÉSTERES METÍLICOS

Composto	Marca	Referência
Dodecanoato de Metilo (Laurato)	*Aldrich*	23459-1
Eicosanoato de Metilo (Araquidato)	*Aldrich*	2522-0
Linolenato de Metilo	*Aldrich*	23526-1
Pentacosanoato de Metilo	*Fluka*	76497
Cinamato de Metilo	*Aldrich*	17328-2

ÁCIDOS CARBOXÍLICOS

Composto	Marca	Referência
Ácido Decanóico	*Aldrich*	15376-1
Ácido Docosanóico (Behénico)	*Aldrich*	21694-1
Ácido Dodecanóico	*Aldrich*	15378-8
Ácido Eicosanóico (Araquídico)	*Aldrich*	E23-1
Ácido Heneicosanóico	*Aldrich*	21966-5
Ácido Heptadecanóico (Margárico)	*Aldrich*	H100-0
Ácido Heptanóico	*Aldrich*	25873-3
Ácido Hexacosanóico	*Aldrich*	28428-9
Ácido Hexadecanóico	*Aldrich*	P5-1
Ácido Nonanóico	*Aldrich*	N2990-2
Ácido Nonadecanóico	*Aldrich*	22283-6
Ácido Octadecanóico (Esteárico)	*Aldrich*	26804-6
Ácido Octadecenóico (Oleico)	*Aldrich*	26838-0
Ácido Octanóico	*Aldrich*	15375-3
Ácido Pentadecanóico	*Aldrich*	P360-0
Ácido Tetracosanóico (Lignocérico)	*Aldrich*	23468-0
Ácido Undecanóico	*Aldrich*	17147-6
Ácido Tetradecanóico (Mirístico)	*Aldrich*	15379-6

ÁLCOOIS

Composto	Marca	Referência
Docosanol (álcool behénico)	*Aldrich*	16910-2
Dodecanol	*Aldrich*	44381-6
Eicosanol (álcool araquídico)	*Aldrich*	23449-4
Heptadecanol	*Aldrich*	24169-5
Hexadecanol (álcool cetílico)	*Aldrich*	25874-1
Nonadecanol	*Aldrich*	28684-2
Octadecanol (álcool estearílico)	*Aldrich*	34620-9
Tetradecanol	*Aldrich*	18538-8

TRITERPENÓIDES

Composto	Marca	Referência
Ácido Oleanólico	*Aldrich*	30170-1
Ácido Ursólico	*Extrasynthese, France*	0037S
5α-Colestano	*Aldrich*	15032-0
Colestanona	*Aldrich*	C7440-7
Colesterol	*Aldrich*	36279-4
Estigmasterol	*Aldrich*	S440-9
Lupeona	*Extrasynthese, France*	0030
Lupeol	*Extrasynthese, France*	0047
Uvaol	*Extrasynthese, France*	0039S
α-Amirina	*Extrasynthese, France*	0015S
β-Amirina	*Extrasynthese, France*	0016S
β-Sitosterol	*Aldrich*	S340-2

COMPOSTOS DE PEQUENA MASSA MOLECULAR E BAIXO PONTO DE EBULIÇÃO

Composto	Marca	Referência
1,2,4-Trimetilbenzeno	*Aldrich*	T7,320-2
1,4-Cineole	*Aldrich-Flavors & Fragances*	W36580-7
1,8-Cineole	*Aldrich-Flavors & Fragances*	W24650-6
1-Octen-3-ol	*Aldrich-Flavors & Fragances*	W28051-8
2,3-Benzofurano	*Aldrich*	B800-2
2-Acetilfurano	*Aldrich-Flavors & Fragances*	W31631-8
2-Furfuraldeído	*Aldrich-Flavors & Fragances*	W31600-8
4-Terpineol	*Fluka Chemika*	86477
5-Hexen-2-ona	*Aldrich*	H1300-1
5-Metileno-2-norborneno	*Aldrich*	12984-4
5-Metilfurfural	*Aldrich-Flavors & Fragances*	W27020-2
Acetato de *cis*-Verbenilo	*Fluka Chemika*	94882
Acetato de Mirtenilo	*Fluka Chemika*	70158
Acetofenona	*Aldrich-Flavors & Fragances*	W20090-5
Álcool isoamílico	*Aldrich-Flavors & Fragances*	W20570-2
Anetole	*Aldrich*	11787-0
Benzaldeído	*Aldrich-Flavors & Fragances*	W21271-7
Bergamal	*Aldrich-Flavors & Fragances*	W23890-2
n-Butanol	*Aldrich*	27067-9
β-Cariofileno	*Fluka Chemika*	22075
cis-2-Octeno	*Aldrich*	S44259-3
n-Decanol	*Aldrich*	15058-4
Dihidrocarveol	*Aldrich-Flavors & Fragances*	W23790-6
Fenilacetaldeído	*Aldrich-Flavors & Fragances*	W28740-7
Furfurilmetil metilsulfureto	*Aldrich-Flavors & Fragances*	W31600-8
Guaiol	*Fluka Chemika*	50900
n-Heptanal	*Aldrich*	H212-0
n-Heptano	*Aldrich*	27051-2
n-Heptanol	*Aldrich*	H280-5
n-Hexanal	*Aldrich*	11560-6
n-Hexanol	*Aldrich*	47140-2
Limoneno	*Aldrich-Flavors & Fragances*	W26330-3
Linalool	*Aldrich-Flavors & Fragances*	W26350-8
Linalool óxido	*Aldrich*	S44373-5
Mesitileno	*Aldrich*	M720-0
m-Menta-1(7),8-dieno	*Aldrich*	33411-1
Mircenol	*Aldrich-Flavors & Fragances*	W34390-0
Naftaleno	*Aldrich*	18450-0
n-Nonanal	*Aldrich*	N3080-3
n-Octanal	*Aldrich*	O-560-8
n-Octano	*Aldrich*	29698-8
n-Octanol	*Aldrich*	29324-5
orto-Cimeno	*Aldrich*	25527-0
para-Cimeno	*Aldrich-Flavors & Fragances*	W23560-1
p-Ment-1-eno	*Fluka Chemika*	63655

COMPOSTOS DE PEQUENA MASSA MOLECULAR E BAIXO PONTO DE EBULIÇÃO (continuação)

Composto	Marca	Referência
para-Metilanisole	*Aldrich-Flavors & Fragances*	W26810-0
Salicilato de metilo	*Extrasynthese, France*	4738S
Terpinoleno	*Aldrich-Flavors & Fragances*	W30460-3
trans-2-Octeno	*Aldrich*	S41897-8
trans-3-Hexenol	*Extrasynthese, France*	3097S
trans-Dihidrocarvona	*Extrasynthese, France*	5100
trans-Isoelemicina	*Aldrich*	23128-2
trans-β-Ionona	*Aldrich-Flavors & Fragances*	W25950-0
Tricicleno	*Aldrich*	28105-0
α-Farneseno	*Aldrich*	34048-0
α-Terpineno	*Aldrich-Flavors & Fragances*	W35580-1
α-Terpineol	*Fluka Chemika*	86481
γ-Terpineno	*Aldrich-Flavors & Fragances*	W35590-9
n-Alcanos C_5-C_{30}	*Aldrich*	29850-6

OUTROS COMPOSTOS

Composto	Marca	Referência
Arbutina	*Aldrich*	S57928-9
Dotriacontano	*Aldrich*	D22310-2
Hidroquinona	*Aldrich*	24012-5
Metil-hidroquinona	*Aldrich*	24097-4
Resorcinol	*Aldrich*	39804-7
Triacontano	*Aldrich*	26384-2
D-(-)-Frutose	*Aldrich*	23970-4
D-(+)-Glucose	*Aldrich*	25307-3
Sacarose	*Aldrich*	24761-8

5.1.1 Análise Bromatológica

Métodos de Dosagem:

Água – Foi efectuada por secagem do fruto fresco, até peso constante, em estufa de vácuo a 80 ºC.[369]

Proteínas – Foi efectuado por amonização de 2 g de fruto, pelo método de *Kjeldahl*, utilizando a mistura catalizadora de *Arnold*. A destilação do amoníaco foi feita, numa parte alíquota, em aparelho *Kjeldahl* semi-automático. Para a conversão do azoto total em proteínas, empregou-se o factor 6,25. [369]

Matéria gorda – Foi efectuada por extracção no aparelho de *Soxhlet* (durante 18 horas) com éter de petróleo de 5 g de fruto, depois de seco, bem triturado e misturado com areia e sulfato de sódio. Como o fruto é rico em hidratos de carbono procedeu-se previamente à hidrólise com HCl, segundo a técnica habitual.

Glúcidos totais – Efectuada sob a forma de glucose, após hidrólise ácida. A 1 g de fruto finamente triturado e homogeneizado, procedeu-se à hidrólise com 4 ml de HCl a 8%, em banho de água fervente durante 5 minutos. Agita-se e adiciona-se 5 ml de água e aquece-se por mais 15 minutos. O doseamento foi feito em volume conveniente de hidrolisado, depois de defecado, pelo método clássico de *Walker* e *Munson*, com redução do licor de *Fehling* (acção redutora dos açúcares sobre uma solução cupro-alcalina) e pesagem do óxido cuproso obtido. [369]

Açúcares redutores – Foi efectuada a extracção segundo *Medlicott* e *Thompson.*[367] A análise foi efectuada por HPLC-UV em coluna Sugar-pak/μBondapak (temperatura do forno: 90 - 95 ºC), fase móvel de 20 mg/l de EDTA sal disódico cálcico em água Milli-Q, a um fluxo de 0,5 ml/min. Efectuaram-se os ensaios com o detector de Ultravioleta a λ = 214 e 254 nm. O doseamento foi efectuado por comparação com padrões a 10% (p/v) de Glucose e Frutose. A calibração foi efectuada mediante a injecção de quantidades conhecidas de solução padrão e o cálculo dos respectivos factores de resposta relativos (FRR = C (g/l do padrão) / Área do pico).

Sacarose – Foi determinada multiplicando por 0,95 a diferença entre os valores dos açúcares redutores determinados antes e depois da inversão (por hidrólise clorídrica), que foi efectuada pela técnica corrente. [369]

Cinzas – Foram determinadas por incineração na mufla, à temperatura de cerca de 500 ºC, da amostra exsicada que serviu para a determinação da água por secagem na estufa.[369]

pH – Determinado potenciometricamente a 20 ºC (pH-metro) com frutos finamente triturados e homogeneizados.

5.2.0 Sínteses

5.2.1 Ésteres Longos de Ácidos Carboxílicos

Octanoato de tetradecilo

A balão de 50 ml adicionou-se 30 ml de benzeno (previamente destilado), 1 ml (6.31×10^{-3} mole) de ácido caprílico, 0.12 g (6.31×10^{-4} mole) de ácido *p*-toluenosulfónico e 1.62 g (7.57×10^{-3} mole) de 1-tetradecanol (álcool mirístico). Colocou-se a mistura a refluxar em montagem *Dean-Stark* durante 120 minutos. Findo este tempo destilou-se cerca de 15 ml de benzeno. Após arrefecimento da mistura reaccional adicionou-se cerca de 50 ml de éter dietílico e 50 ml de solução de $NaHCO_3$ a 10%. Extraiu-se a fase aquosa com 2 x 50 ml de éter. Reuniram-se as fases orgânicas. A fase etérea foi extraída com solução aquosa de $NaHCO_3$ a 10%, lavada com água e seca sobre sulfato de sódio anidro, obtendo-se um óleo amarelado com p.e. 162 - 165 ºC. O controlo do produto da reacção foi efectuado por GC (ver Apêndice-3).

Procedeu-se de modo análogo ao efectuado anteriormente para os restantes ésteres derivados do ácido octanóico, apenas alterando-se o álcool a utilizar e respectiva concentração:

Octanoato de hexadecilo

Usou-se 1.82 g (7.57×10^{-3} mole) de 1-hexadecanol (álcool cetílico). Obtendo-se no final um óleo amarelado com p.e. 38 - 40 ºC (ver Apêndice-3).

Octanoato de octadecilo

Usou-se 2,03 g (7.57×10^{-3} mole) de 1-octadecanol (álcool estearílico). Obtendo-se no final um sólido branco com p.f. 47 - 49 ºC (ver Apêndice-3).

Octanoato de nonadecilo

Usou-se 2,15 g (7.57 x 10^{-3} mole) de 1-nonadecanol. Obtendo-se no final um sólido branco com p.f. 36 - 38 ºC (ver Apêndice-3).

Octanoato de eicosanilo

Usou-se 2.26 g (7.57 x 10^{-3} mole) de 1-eicosanol (álcool araquídico). Obtendo-se no final um sólido branco com p.f. 35 - 37 ºC (ver Apêndice-3).

Octanoato de docosanilo

Usou-se 2,47 g (7.57 x 10^{-3} mole) de 1-docosanol. Obtendo-se no final um sólido branco com p.f. 35 - 40 ºC (ver Apêndice-3).

Decanoato de dodecilo

A balão de 50 ml adicionou-se 30 ml de benzeno (previamente destilado), 1.10 g (6.38 x 10^{-3} mole) de ácido cáprico, 0.12 g (6.31 x 10^{-4} mole) de ácido *p*-toluenosulfónico e 1.41 g (7.56 x 10^{-3} mole) de 1-dodecanol. Colocou-se a mistura a refluxar em montagem *Dean-Stark* durante 120 minutos. Findo este tempo destilou-se cerca de 15 ml de benzeno. Após arrefecimento da mistura reaccional adicionou-se cerca de 50 ml de éter dietílico e 50 ml de solução de $NaHCO_3$ a 10%. Extraiu-se a fase aquosa com 2 x 50 ml de éter. Reuniram-se as fases orgânicas. A fase etérea foi extraída com solução aquosa de $NaHCO_3$ a 10%, lavada com água e seca sobre sulfato de sódio anidro, obtendo-se um óleo ligeiramente amarelado com p.e. 112 - 114 ºC. O controlo do produto da reacção foi efectuado por GC (ver Apêndice-3).

Procedeu-se de modo análogo ao efectuado anteriormente para os restantes ésteres derivados do ácido decanóico, apenas alterando-se o álcool a utilizar e respectiva concentração:

Decanoato de tetradecilo

Usou-se 1.62 g (7.56 x 10^{-3} mole) de 1-tetradecanol. Obtendo-se um óleo ligeiramente amarelado com p.e. 128 - 131 ºC (ver Apêndice-3).

Decanoato de hexadecilo

Usou-se 1.83 g (7.55 x 10^{-3} mole) de 1-hexadecanol. Obtendo-se um sólido branco com p.f. 28 - 29 ºC (ver Apêndice-3).

Decanoato de heptadecilo

Usou-se 1.94 g (7.56 x 10^{-3} mole) de 1-heptadecanol. Obtendo-se um sólido branco com p.f. 34 - 36 ºC (ver Apêndice-3).

Decanoato de octadecilo

Usou-se 2.04 g (7.56 x 10^{-3} mole) de 1-octadecanol. Obtendo-se um sólido branco com p.f. 32 - 35 ºC (ver Apêndice-3).

Decanoato de eicosanilo

Usou-se 2.26 g (7.56 x 10^{-3} mole) de 1-eicosanol. Obtendo-se um sólido branco com p.f. 36-40 ºC (ver Apêndice-3).

5.2.2 Outras Sínteses

Diazometano: O método utilizado foi o da N-metil-N-nitrosotolueno-*p*-sulfonamida.[441] Para tal dissolveu-se 2,14 g do composto em 30 ml de éter, arrefeceu-se a solução em gelo e adicionou-se 0.4 g de hidróxido de potássio em 10 ml de etanol a 96%. Tendo-se formado um precipitado, adicionou-se mais 10 ml de etanol para a sua dissolução. Destilou-se de seguida a solução etérea de diazometano entre 38 - 50 ºC, tendo-se obtido 25 ml de solução.

Diazoetano: O método utilizado foi o nitrosometilureia para a preparação do diazometano[441] utilizando-se propanamida, em vez da acetamida descrita, para a preparação da nitrosoetilureia.

O diazoetano foi preparado agitando-se a nitrosoetilureia a frio (2 g) com uma mistura de solução de KOH aquoso 2 M (2 ml) e éter dietílico puro (20 ml). Destilou-se de seguida a solução etérea de diazoetano a ~50 ºC.

5.2.3 Derivatizações

Metilação e Etilação: estas derivatizações ocorrem à temperatura ambiente. A cada amostra (~10 μg) transferida para *Vial* (*Pierce Chemical Co.*) (frasco de derivatização de fundo cónico) é adicionada uma quantidade mínima de metanol seco (~75 μl). De seguida adicionou-se (900 μl) de solução etérea de diazometano (para a metilação) ou diazoetano (no caso da etilação) até persistência de coloração amarela. A mistura foi mantida a 4º C durante a noite. Após concentração a ~200 ml, procedeu-se à análise por HRGC, e HRGC-MS.

Trimetilsililação[442]: Uma alíquota da amostra a derivatizar (~1 mg) foi transferida para "*screw-cap vial*" e o solvente evaporado sob ligeiro fluxo de azoto. O resíduo foi dissolvido em 100 μl de piridina seca, 500 μl HMDS, e 10 μl de TMCS. A solução foi aquecida a 50 ºC durante 1 hora. Após centrifugação, foi usado 0,2 μl de sobrenadante para cromatografia.

5.3.0 Material

Os medronhos (*Arbutus unedo* L.) foram colhidos no Lugar de Cepos, Arganil, em Novembro de 1994. À chegada foram separados de acordo com o grau de maturação, moídos e liofilizados. Nos ensaios visando os compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição (2.6.0) foram utilizados medronhos frescos provenientes do mesmo local e colhidos em Novembro de 1997 e Novembro de 1998. Em ambos os casos os extractos correspondentes foram obtidos no próprio dia de molde a salvaguardar inerentes alterações quer qualitativas quer quantitativas associadas aos processos de conservação. As folhas de *Arbutus unedo* utilizadas em 2.4.0 foram recolhidas no mesmo local.

5.4.0 Extracções e Fraccionamento

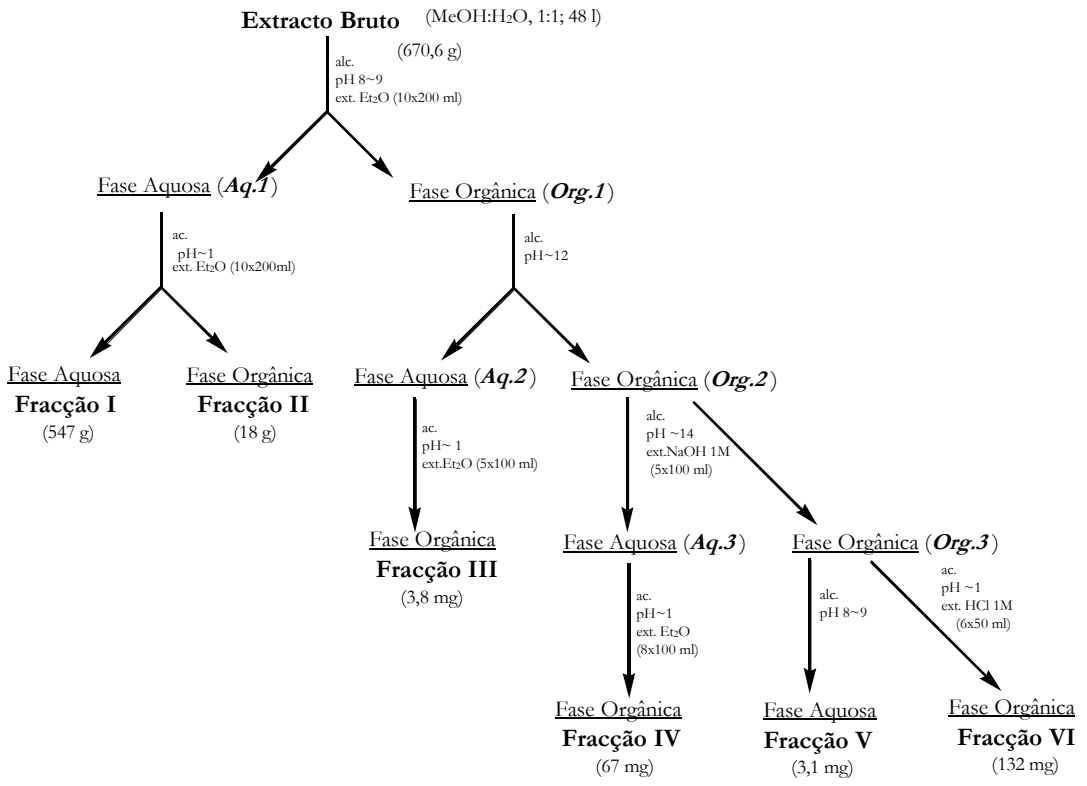
5.4.1 Extracção Global

Frutos maduros liofilizados (6 kg, equivalente a 15,8 kg de frutos frescos) de *Arbutus unedo*, finamente divididos foram colocados em metanol: água (1:1, 2 x 24 l), à temperatura ambiente, com agitação mecânica (agitador de vidro) e ao abrigo da luz durante 72 h (ver esquema 5.4.0). Após filtração, o solvente foi removido em evaporador rotativo a temperatura não superior a 50 ºC. Ao resíduo (670,6 g) dissolvido em água, foi adicionada solução aquosa de bicarbonato de potássio a 10% ($KHCO_3$) até pH 8, seguida de extracção com éter dietílico (10 x 200 ml). A fase aquosa (***Aq.1***) foi de seguida acidificada a pH~1 com uma solução de HCl 1 M e extraída com éter dietílico (10 x 200 ml). A fase aquosa desta segunda extracção foi denominada fracção I (**F.I**), sendo a fracção orgânica a fracção II (**F.II**). Após remoção dos solventes obtiveram-se 547 g e 18 g de fracção I e II, respectivamente.

A fase etérea proveniente da primeira extracção (***Org.1***) foi extraída com solução aquosa de K_2CO_3 a 10% (5 x 100 ml) (pH~12). Após separação da fase orgânica seguiu-se a extracção com solução aquosa de hidróxido de sódio 1 M (4 x 50 ml). A fase aquosa (***Aq.2***) foi acidificada a pH~1 com solução aquosa de HCl 1 M, extraída com éter (5 x 100 ml), lavada com água e seca sobre sulfato de sódio anidro, obtendo-se aproximadamente 4 mg de um extracto, denominado fracção III (**F.III**).

A fase orgânica separada (***Org.2***), foi extraída com NaOH 1 M (5 x 100 ml) (pH~14), tendo-se obtido duas novas fases aquosa (***Aq.3***) e orgânica (***Org.3***).

A fase aquosa (***Aq.3***) foi então acidificada a pH~1 com solução aquosa de HCl 1 M e, de seguida extraída com 8 x 100 ml de éter dietílico. Esta nova fase orgânica foi então lavada com água, e seca utilizando *molecular sieves* (4 Å). O solvente foi removido em evaporador rotativo, resultando 67 mg da fracção IV (**F.IV**).



Esquema **5.4.0** Esquema de sub-fraccionamento por solventes utilizado nos medronhos a partir do extracto bruto (metanol: água, 1:1).

A fase orgânica anterior (***Org.3***) foi novamente extraída com 6 x 50 ml de solução aquosa de HCl 1 M (pH~1). Desta última fase orgânica, após lavagem com água, secagem e remoção do solvente obteve-se um resíduo de 132 mg que denominámos fracção VI, (**F.VI**). A fracção aquosa foi alcalinizada, com solução de NaOH 1 M e, após secagem, obtiveram-se aproximadamente 3 mg de resíduo seco. Este sub-extracto foi denominado fracção V (**F.V**).

Todas as fracções foram controladas por TLC utilizando reveladores universal e específicos de acordo com a funcionalidade química prevista nas diferentes fracções obtidas. Os reveladores utilizados foram: ácido sulfúrico: metanol (1:1) (reagente nº241[319]), em todas as fracções; fracções II e III: reagente nº26,[319] verde de bromocresol + azul de bromocresol + permanganato de potássio, reagente nº127,[319] glucose + anilina, e ainda o reagente nº62,[319] solução metanólica de 2,6-dibromoquinonacloroimida; fracções I e V: reagente nº97,[319] reagente *Dragendorff*, reagente nº178,[319] ninidrina e reagente nº11,[319]; fracção

VI: reagente nº262,[319] vanilina + ácido sulfúrico, reagente nº82,[319] 2,4-dinitrofenil-hidrazina; fracção IV: reagente nº62.[319]

Do fraccionamento por solventes e, confirmados pelos resultados obtidos na revelação química utilizada em TLC, as seis fracções definiram-se do seguinte modo:

Fracção	Compostos	Compostos prováveis
I	Muito polares	Açúcares, aminoácidos, alcalóides, etc. (fracção não estudada)
II	Ácidos fortes	Ácidos carboxílicos
III	Ácidos	Ácidos (fracção vestigial)
IV	*	Fenóis
V	-	Básicos
VI	Neutros	Hidrocarbonetos, aldeídos, cetonas, alcoóis, diferentes tipos de ésteres, triterpenóides

* - Apenas nas folhas foram encontrados arbutina, metilarbutina, hidroquinona e metil-hidroquinona.

5.4.2 Extracção Direccionada a Triterpenóides

Os medronhos liofilizados (750 g, equivalente a 2 kg de frutos frescos), finamente divididos foram colocados em acetona-água (7:3, 12 l), ao abrigo da luz durante 48 h. Após filtração, o solvente foi removido em evaporador rotativo a temperatura não superior a 50 ºC. O resíduo dissolvido em quantidade mínima de água, foi extraído com éter dietílico (25 x 300 ml, 7,5 l). A fase etérea foi lavada com água, seca sobre sulfato de magnésio e, após remoção do solvente em evaporador rotativo, resultaram 15,39 g de resíduo seco. O resíduo foi separado utilizando-se para o efeito uma coluna de vidro (120 x 7 cm), com sílica-gel 70-230 mesh (1200 g),com *n*-hexano (4,8 l), hexano-tolueno (1:1; 4 l), éter dietílico (5 l), metanol (3,5 l) e água (5 l)). Foram recolhidas fracções de aproximadamente 5 ml e submetidas a cromatografia em camada delgada (TLC) para verificação de homogeneidade e

separação. As fracções idênticas foram reunidas, tendo a separação resultado em três diferentes sub-fracções (**1**, **2** e **3**).

A fracção **1** (1.26 g), verificou-se ser constituída fundamentalmente por ésteres metílicos e etílicos de ácidos carboxílicos de cadeia comprida, sendo o estearato de metilo o componente dominante desta fracção, contendo também na sua composição hidrocarbonetos, entre eles um hidrocarboneto esteroídico o 5α-colestano (*2.2.4-1*). A sua identificação foi confirmada com padrão (Apêndice-1).

A sub-fracção maioritária, fracção **2** (4,15 g), mostrou ter maior complexidade, tendo sido posteriormente submetida a separação em coluna de sílica-gel, utilizando-se hexano, éter dietílico e metanol como eluentes. Foram recolhidas novas sub-fracções de aproximadamente 5 ml e submetidas a TLC para verificação de homogeneidade e separação. As fracções idênticas, tal como anteriormente, foram reunidas e concentradas em evaporador rotativo a volume mínimo, originando quatro novas sub-fracções, **2A** (980 mg), **2B** (7,12 mg), **2C** (3,12 g) e **2D** (5,07 mg).

A análise por HPLC-MS da fracção **2A**, mostrou ser esta constituída por duas séries de seis ésteres longos de ácidos carboxílicos, os ésteres em C_{14}, C_{16}, C_{18}, C_{19}, C_{20} e C_{22} do ácido octanóico e os ésteres em C_{12}, C_{14}, C_{16}, C_{17}, C_{18} e C_{20} do ácido decanóico (compostos *2.2.2-1* a *2.2.2-12*). Os doze compostos foram confirmados por comparação com amostras autênticas obtidas por síntese (ver 5.2.1) (Apêndice-3).

A análise por HRGC-MS da sub-fracção **2B** mostrou ser esta fracção uma mistura de dois triterpenos pentacíclicos lupeona e α-amirona (*2.2.3-1* e *2.2.3-2*) e quatro esteróides estigmasterol, colesterol, estigmastenona e colestanona (*2.2.4-2* a *2.2.4-5*). Com excepção da α-amirona, as suas estruturas foram confirmadas por comparação com padrões (Apêndice-1).

Da análise por HRGC-MS da fracção **2C** (3,12 g), verificou-se ser esta constituída por hidroxitriterpenóides e um hidróxi-esteróide. Esta fracção foi posteriormente submetida a separação em coluna com 200 g de alumina neutra desactivada (3% *w/w* em água) (coluna de vidro 100 x 3,3 cm) utilizando-se hexano, éter dietílico e metanol como eluentes. Obtiveram-se duas sub-fracções: **2CA** (2,1 g) constituída pela mistura dos isómeros triterpénicos α-amirina, β-amirina e lupeol e ainda de o diol olean-12-en-3β,23-diol (compostos *2.2.3-3* a *2.2.3-5* e *2.2.3-8,* respectivamente). As suas identificações foram

confirmadas com padrões (Apêndice-1).; **2CB** (180 mg) mostrou ser constituída por β-Sitosterol puro (*2.2.4-6*). A sua identificação foi confirmada com padrão (Apêndice-1).

A análise por HPLC-MS da sub-fracção **2D** mostrou ser a sua composição uma mistura de três triterpenos pentacíclicos aldeído ursólico, α-amirenonol e uvaol (compostos *2.2.3-6, 2.2.3-7* e *2.2.3-9,* respectivamente) (Apêndice-1).

Da análise da fracção **3** (36 mg) por HPLC-PBMS, verificou-se conter dois ácidos triterpénicos pentacíclicos: o ácido ursólico (22 mg) e o ácido oleanólico (13 mg) (*2.2.3-10* e *2.2.3-11*). O recurso à TLC preparativa permitiu a separação destes dois isómeros (Sílica gel, eluente (Tolueno: acetona: ácido acético (100: 3: 0,7)). As suas identificações foram confirmadas com padrões (Apêndice-1).

É de salientar a elevada quantidade destes dois compostos no medronho.

5.4.3 Extracção Direccionada a Compostos Glicosados

A partir da fracção I (**F.I**) (proveniente da extracção global (2.1.0) dos frutos) fracção correspondente a compostos muito polares, efectuou-se uma extracção direccionada a compostos glicosados. Para o efeito uma parte desta fracção (40 g) foi retomada com água (500 ml). Seguiu-se a extracção com acetato de etilo (4 x 250 ml). As fases orgânicas foram reunidas, lavadas com água e secas sob $CaCl_2$ anidro. Desta extracção não foi obtido qualquer resíduo.

De modo a confirmar o resultado obtido, extraíram-se 500 g de folhas de medronheiro (provenientes das mesmas plantas onde foram recolhidos os frutos). Estas foram extraídas com metanol a 75% (500 ml) refluxando a mistura durante 30 minutos. O filtrado foi arrefecido e concentrado a 120 ml adicionando-se 400 ml de água. Seguiu-se a extracção com acetato de etilo (4 x 250 ml). As fases orgânicas foram reunidas, lavadas com água e secas sob $CaCl_2$ anidro. O resíduo foi dissolvido em MeOH. A fracção foi controlada por TLC (placas de sílica RP-18, eluente acetato de etilo: água (7:3)) e simultaneamente utilizado reveladores específicos de acordo a natureza das fracções esperadas. Os reveladores utilizados foram: ácido sulfúrico: metanol (1:1) (reagente nº241[319]); solução de cloreto de ferro (III) - hexacianoferrato de potássio (reagente *Berlin Blue*) (reagente Nº5,[100]) e

solução de mercúrio em ácido nítrico fumante (reagente de *Millons*) (reagente Nº26,[100]) (indicados para arbutina, metilarbutina, hidroquinona e metil-hidroquinona). Os compostos foram isolados e identificados por comparação com padrões. A quantificação destes compostos foi efectuada por HPLC-RI (coluna de L = 250 mm, d.i. = 4 mm empacotada com *Lichrosorb* RP-18 Select B®, d_f = 5 μm (E. Merck, Darmstadt, Alemanha), eluente acetato de etilo: HCOOH: água (88: 6: 6)) utilizando-se o resorcinol (1,3-benzenodiol) como padrão interno. Para o efeito usaram-se as áreas percentuais relativas. Os resultados obtidos (valores percentuais (*w*/*w*) relativamente à planta seca), para as folhas de medronheiro foram: arbutina 6%, metilarbutina 2,6%, hidroquinona 0,38% e metil-hidroquinona 0,07% (Apêndice-3).

5.4.4 Extracção Direccionada a Compostos Básicos

O extracto global (metanol:água, 1:1) dos medronhos, foi fraccionado de acordo com o esquema e extracção por solventes (ver 5.4.1). Foram obtidas seis fracções. A fracção V (F.V), segundo o referido esquema deveria corresponder aos compostos com carácter básico. No entanto não foi obtido qualquer vestígio orgânico nesta fracção (inferior a 3 mg). De modo a confirmar este resultado nulo, foi efectuada uma extracção especialmente dirigida a compostos básicos.

Para o efeito a 200 g de frutos liofilizados (equivalente a 550 g de medronhos frescos) adicionou-se 200 ml de solução de NH_4OH a 10%. Extraiu-se durante 15 minutos com 100 ml de metanol a 60 ºC. O filtrado foi arrefecido e concentrado a 1,5 ml.

O resíduo obtido foi analisado por TLC em placas de sílica-gel com indicador de fluorescência em diferentes sistemas de eluição (eluentes tolueno: acetato de etilo: dietilamina (70: 20: 10), acetato de etilo: metanol: água (100: 13,5: 10), benzeno: etanol (9:1), $CHCl_3$: acetona: dietilamina (5: 4: 1)), tendo sido reveladas sob UV 254 e 366 nm bem como utilizados reveladores específicos de acordo a natureza esperada da fracção obtida. Os reveladores utilizados foram: ácido sulfúrico: metanol (1:1) (reagente nº241[319]) e reagente de *Dragendorff* (reagente Nº97,[319]). Destas análises não se obtiveram quaisquer resultados positivos.

5.4.5 Extracção de Compostos de Pequena Massa Molecular e Baixo Ponto de Ebulição

Para as extracções contínuas dos compostos de pequena massa molecular e baixo ponto de ebulição foi utilizado o extractor modificado de *Likens-Nickerson*[133,192] (figura 5.4.0, **B**) com os frutos dos anos de 1997 e com os de 1998, usando-se em cada montagem 300 g de frutos maduros frescos. As amostras, colhidas no próprio dia, foram cobertas com água Milli-Q. Em cada montagem, ao balão conectado ao 2º braço, foi adicionado *n*-Pentano redestilado.

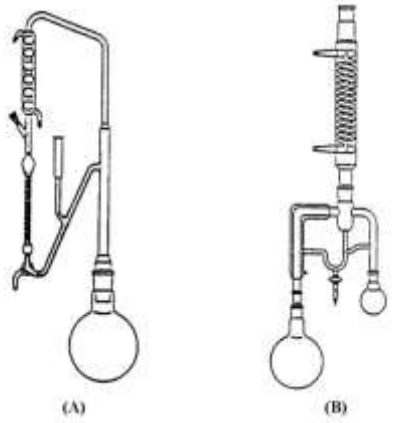


Figura **5.4.0** Extractores contínuos de *Clevenger* (**A**)[443] e de *Likens-Nickerson* (**B**).[192]

As extracções prolongaram-se por um período de 3 horas; o extracto foi seco (sulfato de sódio anidro), e o volume reduzido a cerca de 100 μl com concentrador evaporador de *Kuderna-Danish* com fluxo de N_2. Seguiu-se de imediato a análise dos extractos por GC e GC-MS.

Para aferição do rendimento do processo extractivo e, de acordo com a Farmacopeia Europeia (1997), utilizou-se o extractor contínuo de *Clevenger*[443] (figura 5.4.0, **A**), procedendo-se de modo análogo ao efectuado anteriormente mas utilizando-se neste caso 450 g de frutos. O rendimento obtido para os dois anos em análise (1997 e 1998) foi muito reduzido, < 0,05 % (*w*/*w*).

NOTA

Dos resultados apresentados nesta tese foram até aqui publicados:

Elvira M.S.M. Gaspar, H.J. Chaves das Neves, J.P. Noronha, *"Application of PB-HPLC-MS to the Identification of Unknown Components in Triterpenoid Fraction of Arbutus unedo Fruits*", in Sandra, P. (Editor): Proceedings of the 18th International Symposium on Capillary Chromatography, Riva del Garda, Italy, May 20-24, **1996**.

Elvira M.S.M. Gaspar, H.J. Chaves das Neves, J.P. Noronha, *"Application of PB-HPLC-MS to the Identification of Unknown Components in Triterpenoid Fraction of Arbutus unedo Fruits*", *J. High Resol. Chromatogr.,* **1997**, 20, 417.

Elvira M.S.M. Gaspar, H.J. Chaves das Neves, J.P. Noronha, *"Hyphenation of HPLC to MS Through a Particle Beam Interface in the Detection of Unknown Triterpenes*", 2º Encontro Nacional de Espectrometria de Massa, 1-3 de Setembro, Museu da Água, Lisboa, **1997**.

J.P. Noronha, Elvira M.S.M. Gaspar, H.J. Chaves das Neves, *"Chemical Study of Secondary Metabolites from Arbutus unedo Fruits*", Encontro ReQuimte, C.Q.F.B.-C.E.Q.U.P., 5-6 de Fevereiro, FCUP, Porto, **1999**.

J.P. Noronha, Elvira M.S.M. Gaspar, H.J. Chaves das Neves, *"Estudo Químico dos Metabolitos Secundários dos Frutos de Arbutus unedo*", 4º Encontro de Química dos Alimentos, 1-4 de Junho, FCUC, Coimbra, **1999**.

6.0.0 BIBLIOGRAFIA

1. Plaxton, W., "*Plant Physiology Biochemical and Molecular Biology",* Dennis, D. and Turpin, D., eds., **1990**, 28.
2. Gola, G., Negri, G. and Cappelletti, C., *Tratado de Botânica*, ed. Labor S.A, Madrid, **1943**, 815.
3. Grange, R.I., "Crescimiento del Fruto"*,* in *Fisiologia y Bioquimica Vegetal,* Azcon-Bieto, J. and Talon, M. eds. Interamericana, McGraw-Hill, Madrid, **1996***,* 449.
4. Coombe, B.G., *Ann. Rev. of Plant Physiol.*, **1976**, 27, 507.
5. Bollard, E.G., "The Physiology and Nutrition of Developing Fruits", in *The Biochemistry of Fruits and Their Products,* Vol.1, Hulme, A.C. (ed.), Academic Press, Londres, **1970**, 387.
6. Blanke, M.M. and Lenz, F., *Plant Cell Environ.*, **1989**, 12, 31.
7. Ehret, D.L. and Ho, L.C., *J. Agric. Sci.*, **1986**, 61, 361.
8. Beruter, J., *J. Plant Physiol.*, **1989,** 135, 583.
9. Monseline, S.P., Varga, A. and Bruinsma, J., *Annals of Botany*, **1978**, 42, 1245.
10. Campbell, C.A. and Koch, K.E., *J. Amer. Soc. Horticult. Sci.*, **1989**, 114, 455.
11. Ehret, D.L. and Ho, L.C., *J. Experimental Botany*, **1986**, 37, 1294.
12. Grange, E.H., "Maduración del Fruto*",* in *Fisiologia y Bioquimica Vegetal,* Azcon-Bieto, J. and Talon, M., eds., Interamericana, McGraw-Hill, Madrid, **1996***,* 23, 464.
13. Scortichini, M., *Riv. Frutticolt. Ortofloricolt.*, **1986**, 9, 43.
14. Jones, S.B. and Luchsinger, A.E., *Plant Systematics*, 2nd Ed. McGraw-Hill Book Company, **1987**, 344.
15. Caixinhas, L., *Lexicoteca, Moderna Enciclopédia Universal*, Circulo de Leitores, **1987**, 12, 22.
16. Carvalho and Vasconcelos, J., *Focus, Enciclopédia Internacional*, Livraria Sá da Costa Eds., Lisboa, **1977**.
17. Loidi, J., Herrera, M., Olano, J.M. and Silvan, F., *J. Vegetation Sci.*, **1994**, 5, 533.
18. Seidmann, J., *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **1995**, 4, 110.
19. Sulc, D., Kveder, H. and Horgas, D., *Kemija u Industriji (Zagreb)*, **1956**, 5, 113.
20. Medlicott, A.P. and Thompson, A.K., *J. Sci. Food Agric.*, **1985**, 36, 561.
21. Crncevic, V. and Niketic, G., *Tehnika (Belgrade)*, **1957**, 12, 1382.
22. *Methods in Food Analysis – Physical, Chemical and Instrumental Methods of Analysis*, Chapt. XV, 2nd Ed. Maynard, A.J., Academic Press, **1970**, 447 e referências aí citadas.
23. Leitão, A.E.B., Azinheira, H.G., Leitão, C.C.A. and Alarcão-e-Silva, M.L.C.M.M, Resumos in *2º Encontro Nacional de Química dos Alimentos*, S.P.Q., Faro, **1997**, 398.
24. Rovesti, G. *Riv. Ital. Essen., Profumi, Piante Officinali, Olii Vegetii, Saponi*, **1936**, 183.

25. Martins, A.N., Jesus, J.P., Galego, L.R. and Almeida, V.R., Resumos in *2º Encontro Nacional de Química dos Alimentos*, S.P.Q., Faro, **1997**, 410.

26. Versini, G., Seeber, R., Dalla Serra, A., Sferlazzo, G., Carvalho, B. and Reniero, F., *Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence*, Charalambous, G. ed., **1995**, 1779.

27. Karikas, G.A. and Giannitsaros, A., *Plant. Méd. Phytothér.*, **1990**, 24, 27.

28. Tanaka, R. and Matsunaga, S., *Phytochemistry,* **1989**, 28, 3149.

29. Karikas, G.A., Euerby, M.R. and Waigh, R.D., *Plant. Med.*, **1986**, 53, 223.

30. Sosa, A., *Bull, Sté. Chim. Biol.*, **1950**, 32, 344.

31. Velasco de Pedro, F., Palomar, M.L. and Garcia-Villaraco, A., *An. Real Acad. Farm.*, **1995**, 61, 253.

32. Piñol, M.T. and Palazón, J., "Metabolismo Secundário" in *Fisiologia y Bioquimica Vegetal,* Azcon-Bieto, J. and Talon, M., eds. Interamericana, McGraw-Hill, Madrid, **1996,** 11, 238 e referências aí citadas.

33. Whittaker, R.H. and Feeny, P.P., *Science*, **1971**, 171, 757.

34. Mann, J., *Secondary Metabolism*, Atkins, P.W., Holker, J.S.E. and Holliday, A.K. (eds.), Clarendon Press, **1987**.

35. Vollhardt, K, Peter, C. and Schore, N.E., *Organic Chemistry: Structure and Function.* Capt.19, W.H. Freeman & Company, **1999**.

36. Torssell, K.B.G., *Natural Product Chemistry - A Mechanistic and Biosynthetic Approach to Secondary Metabolism*., John Wiley & Sons Limited, **1983**.

37. Gunstone, F.D., *An Introduction to the Chemistry and Biochemistry of Fatty Acids and Their Glicerides*, 2nd ed. Chapman and Hall: London, **1967** e referências aí citadas.

38. Sasson, A. and Monselise, S.P., *J. Amer. Soc. Horticult. Sci.*, **1977,** 102, 331.

39. Davies, J.N. and Hobson, G.E., Critical Reviews in *Food Sci. Nutrit.*, **1981**, 15, 295.

40. Davies, J.N. and Maw, G.A., *J. Sci. Food Agric.*, **1972**, 23, 969.

41. Hulme, A.C., *The Biochemistry of Fruits and their Products*, vols. 1 e 2. Academic Press. Londres, **1970**.

42. Gross, K.C. and Sams, C.E., *Phytochemistry,* **1984**, 23, 2457.

43. Hardenburg, R.E., Watada, A.E. and Wang, C.Y., *The Commercial Storage of Fruits, Vegetables and Florist and Nursery Stocks.*, US Department of Agriculture Handbook, Nº66, Washington DC, **1986**.

44. Wills, R.B.H., McGlasson, W.B., Graham, D. and cols.: Postharvest. BSP Professional Books, Oxford, **1989**.

45. Dinar, M. and Stevens, M.A., *J. Amer. Soc. Horticult. Sci.*, **1981,** 106, 415.

46. Wollenweber, E. and Dietz, V. H., *Phytochemistry,* **1981**, 20, 869.

47. Dauguet, J.C. and Foucher, J.P., *Plant. Méd. Phytothér.,* **1982**, 16, 185.

48. Maccarone, E., Cuffari, G., Passerini, A. and Rapisarda, P., *Annali di Chim.,* **1990**, 80, 171.

49. Drolic, A. and Raymond, J., *Plant. Méd. Phytothér.,* **1981**, 15, 109.

50. Friend, J. and Rhodes, M.J.C., *Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables*, Academic Press, Londres, **1981**.

51. Ketsa, S. and Koolpuksee, M., Postharvest *Biol. Techn.*, **1993**.

52. Kenndler, E., Schwer, Ch., Fritsche, B. and Pöhm, M., *J. Chromatogr.,* **1990**, 514, 383.

53. Ghodsi, M.R. and Netien, G., *Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon,* **1970**, 14, 115.

54. Sosa, A., *Bull. Soc. Chim. Biol.,* **1962**, 45, 117.

55. Fromard, F., *C.R. C.N.S.S., Grenobles, Sciences,* **1983**, 3, 251.

56. Fromard, F., *Can. J. Bot.,* **1987**, 65, 687.

57. Fontquer, P., *Plantas medicinales,* Editorial S.A., **1962**, 1033.

58. Perelo, J.M., "Estudio farmacognosticos sobre las hojas de *Arctostaphylos uva ursi* Sprengel", in *Farmacognosia,* Madrid, **1943**, 50.

59. Deysson, G. and Truhaut, R., *C.R. Soc. Biol.,* **1957**, 151, 1719.

60. Lewinshon, E., Gijzen, M., Savage, T.J. and Croteau, R, *Plant Physiol.,* **1991**, 96, 38.

61. Vögeli, V. and Chapelli, J., *Plant Physiol.,* **1990**, 94, 1860.

62. Seymour, G., Taylor, J. and Tucker, G., *Biochemistry of Fruit Ripening*, Chapman and Hall, Londres, **1993**.

63. Baldwin, E.A., Níperos-Carriedo, M.O., Baker, R. and Scott, J.W., *J. Agric. Food Chem.*, **1991**, 39, 1135.

64. Baas, W.J., *Triterpenoids in Latex and Leaf Wax of Some Hoya Species. Their Structure and Possible Significance.* Ph.D Dissertation, University of Ultrecht: 21 December, **1983**, e referências aí citadas.

65. Muray, E. J. and Houpis, I. N., *J. Amer. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 89973c

66. Banthorpe, D.V. and Charlwood, B.V., *The terpenoids*, Ed. Bell and Charlwood, **1980**, 185.

67. Baas, W.J., *Phytochemistry*, **1985**, 24, 1875.

68. Walton, T.J., *Methods in Plant Biochemistry*, Ed. Dey, P.M., Harborne, J.B., **1990**, 4, 130.

69. Nes, W.R., *Adv. Lipid Res.*, **1977**, 15, 233.

70. Benveniste, P., *Annu. Rev. Plant Physiol.,* **1986**, 37, 275.

71. Abe, H., Morishita, T., Uchiyama, M., Takatsuto, S., Ikekawa, N., Ikeda, M., Sassa, T., Kitsuwa, T. and Marumo, S., *Experientia*, **1983**, 39, 351.

72. Goodwin, T.W. and Mercer, E.I., *Introduction to Plant Biochemistry*, Pergamon Press, Oxford, **1983**.

73. Kleing, H.K., *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **1989**, 40, 39.

74. Schön, K., *Biochem, J.,* **1935**, 29, 1782.

75. Balausard, J., *J. Plant. Med. Phytother.,* **1951**, 638.

76. Balausard, J., *Méd. Trop.,* **1951**, 11, 638.

77. Martson, A., Hostettmann, K., *Nat. Product Report*s, **1991**, 391.

78. Gunstone, F.D., *Methods in Plant Biochemistry*, Eds. Dey, P.M., Harborne, J.B., **1990**, 4, 1.

79. Whitehouse, C.N., Dreyer, R.N., Yamashita, M. and Fenn, J.B., *Anal. Chem.,* **1985**, 57, 675.

80. Niessen, W.M.A., *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*, Vol. 79, **1999**.

81. Marshall, A.G. and Grosshans, P.B., *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 215.

82. Milgram, K.E., White, F.M. and Eyler, J.R., *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 3714.

83. Nakanishi, K., Berova, N. and Woody, R.W., *Circular Dichroism*, VCH Publisher, New York, **1994**.

84. Lambert, J.S., Shurvell, H.F., Lightner, D.A. and Cooks, R.G., "*Electronic Absortion and Chiroptical Spectroscopy*", Part III, in *Organic Structural Spectroscopy*, Prentice-Hall, Inc., New Jersey, **1998**, 251.

85. Bringmann, G., Messer, K., Wohlfarth, M., Kraus, J., Dumbuya, K. and Ruckert, M., *Anal. Chem.,* **1999**, 71, 2678.

86. Shantha, N.C. and Napolitano, G.E., *J. Chromatogr.*, **1992**, 624, 37.

87. Ackman, R.G., *Anal. Fats, Oils Lipoproteins*, **1991**, 270.

88. Shukla, V.K.S, *Anal. Fats, Oils Lipoproteins*, **1991**, 233.

89. Beare-Rogers, J.L. and Dieffenbacher, A., *Pure & Appl. Chem.*, **1990**, 62, 795.

90. Evenari, M., *Bot. Rev.,* **1949**, 15, 153.

91. Ryhage, R. and Stenhagen, E., *J. Lipid Res.*, **1960**, 1, 361.

92. McLafferty, F.W. and Turecek, F., *Interpretation of Mass Spectra.* 4nd ed. University Science Books, Mill Valley, California, **1993**.

93. Tomer, K.B., Crow, F.W. and Gross, M.L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 5487.

94. Jensen, N.J., Tomer, K.B. and Gross, M.L., *Anal. Chem.*, **1985**, 57, 2018.

95. Kawalier A., *Ann. Chem.,* **1852**, 82, 241.

96. Gill, S., Dembinska-Migas, W. and Kozlowska, J., *Farmacia Polska,* **1984**, 15, 211.

97. Sticher, O., Soldati, F. and Lehmann, D., *Planta Med.,* **1979**, 35, 253.

98. Kraus, Lj. and Stahl, E., *J. Chromatogr.* **1979**, 170, 269.

99. Stambergova, A., Supcikova, M. and Leifertova, I., *Ceskoslov. Farm.,* **1985**, 34, 179.

100. Wagner, H., Bladt, S. and Zgnainski, E.M., *Plant Drug Analysis*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **1983**.

101. Sulc, D., Kveder, H. and Horgas, D., *Acta Pharm. Jug.,* **1956**, 13, 117.

102. Rosenthaler, Von L., *Pharm. Acta Helv.,* **1927**, 2, 181.

103. Thies, H. and Sulc, D., *Pharmazie,* **1951**, 6, 169.

104. Petricic, J, and Drazin, V., *Acta Pharm. Jug.*, **1963**, 13, 117.

105. Hedrick, J.L. and Taylor, L.T., *J. High Resol. Chromatogr.,* **1990**, 13, 312.

106. Douillard, C. and Guichard, E., *Sci. Aliment.*, **1989**, 9, 53.

107. Overton, S.V. and Manura, J.J., *Amer. Lab.*, **1994**, Apr.

108. Casabianca, H. and Graff, J.-B., *J. Chromatography,* **1994**, 648, 360.

109. Shimoda, M., Shibamoto, T. and Noble, A.C., *J. Agric. Food Chem.*, **1993**, 41, 1664.

110. Servili, M., Conner, J.M., Piggot, J.R., Withers, S.J. and Paterson, A., *J. Sci. Food Agric.*, **1995**, 67, 61.

111. Boscherini, G. and Michelozzi, M., *J. High Resol. Chromatogr.*, **1993**, 16, 619.

112. Dirinck, P., Veys, J., Decloedt, M. and Schamp, N., *Tobacco Int.*, **1980**, 82, 125.

113. Miranda-Lopez, R., Libbey, L.M., Watson, B.T. and McDaniel, M.R., *J. Food, Sci.*, **1992**, 57, 985.

114. Bicchi, C., D'Amato, A., David, F. and Sandra, P., *Flav. Frang. J.*, **1988**, 3, 143.

115. Horvat, R.J., Chapman, G.W., Robertson, J.A., Meredith, F.I., Scorza, R., Callahan, A.M. and Morgens, P., *J. Agric. Food Chem.*, **1990**, 38, 234.

116. Barberio, J. and Twibell, J., *J. High Resol. Chromatogr.*, **1991**, 14, 637.

117. Pinnel, V., Rosseels, P. and Vandegans, J., *J. High Resol. Chromatogr.*, **1995**, 18, 776.

118. Coleman, W.M., *J. Chromatogr. Sci.*, **1992**, 30, 159.

119. Kallio, H. and Salorinne, L., *J. Agric. Food Chem.*, **1990**, 38, 1560.

120. Berger, R. G., Drawert, F., Kollmannsberger, H., Nitz, S. and Schraufstette, B., *J. Agric. Food Chem.*, **1985**, 33, 232.

121. Kok, M.F., Yong, F.M. and Lim, G., *J. Agric. Food Chem.*, **1987**, 35, 779.

122. Binder, R.G., Turner, C. E. and Flath, R., *J. Agric. Food Chem.*, **1990**, 38, 1053.

123. Humpf, H.U. and Schreier, P., *J. Agric. Food Chem.*, **1991**, 39, 1830.

124. Nelson, P.E. and Hoff, J.E., *J. Food Science*, **1969**, 34, 53.

125. Riitta, M., -Tiitto, K.J., Kirsi, M.J. and Rimpiläinen, T.K., *Lebensm. - Wiss. U. -Technol.*, **1988**, 21, 36.

126. Engel, K. -H., Ramming, D.W., Flath, R.A. and Teranishi, R., *J. Agric. Food Chem.*, **1988**, 36, 1003.

127. Bigois, M., Casabianca, H., Graff, J.-B., Philit, B., Jame, P. and Perrucchietti, C., *Spectra Analyse*, **1994**, 181, 19.

128. Bruche, G., Dietrich, A. and Mosandl, A., *Z. Lebensm. Unters. Forsch*, **1995**, 201, 249.

129. Winterhalter, P., *J. Agric. Food Chem.*, **1990**, 38, 452.

130. Blakesley, C.N., Loots, J.G., du Plessis, L.M. and de Bruyn, G., *J. Agric. Food Chem.*, **1979**, 27, 42.

131. Ha, J.K. and Lindsay, R.C., *J. Dairy Sci.*, **1990**, 73, 1988.

132. Tonsbeek, C.H.T., Plancken, A.J. and Weerdhof, T., *J. Agric. Food Chem.*, **1968**, 16, 1016.

133. Flath, R.A., Black, D.R., Guadagni, D.G., McFadden, W.H. and Schultz, T.H., *J. Agric. Food Chem.*, **1967**, 15, 29.

134. Hirvi, T., *Lebensm. -Wiss. U. -Technol.*, **1983**, 16, 157.

135. Schreier, P., *J. Sci. Food Agric.*, **1980**, 31, 487.

136. Willhalm, B., Palluy, E. and Winter, M., *Helv. Chim. Acta*, **1966**, 9-10, 65.

137. Teranishi, R., Corse, J.W. McFadden, W.H., Black, D.R. and Morgan, A.I., *J. Food Sci.*, **1963**, 24, 478.

138. Pyysalo, T., Honkannen, E. and Hirvi, T., *J. Agric. Food Chem.*, **1979**, 27, 19.

139. Morales, A.L., Albarracín, D., Rodríguez, J., Duque, C., Riaño, L.E. and Espitia, J., *J. High Resol. Chromatogr.*, **1996**, 19, 585.

140. Darriet, P., Tominaga, T., Lavigne, V., Boidron, J. - N. and Dubourdieu, D., *Flav. Fragan. J.*, **1995**, 10, 385.

141. Barron, D., *Z. Lebensm. Unters. Forsch*, **1991**, 193, 454.

142. Parliment, T.H., *J. Agric. Food Chem.*, **1981**, 29, 836.

143. Blanch, G.P., Reglero, G., Herraiz, M. and Tabera, J., *J. Chromatogr. Sci.*, **1991**, 29, 11.

144. Winter, M. and Willhalm, B., *Helv. Chim. Acta.*, **1964**, 133-134, 1215.

145. Mussinan, C.J. and Walradt, J.P., *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 10, 385.

146. McFadden, W.H., Teranishi, R., Corse, J., Black, D.R. and Mon, T.R., *J. Chromatogr.*, **1965**, 18, 10.

147. Nitz, S., Kollmannsberger, H., Albrecht, M. and Drawert, F., *J. Chromatogr.*, **1991**, 547, 516.

148. Binder, R.G., Flath, R.A. and Mon, T.R., *J. Agric. Food Chem.*, **1989**, 37, 418.

149. Feuerbach, M., Fröhlich, O. and Schreier, P., *J. Agric. Food Chem.*, **1988**, 36, 1236.

150. Fischer, N., Nitz, S. and Drawert, F., *J. Agric. Food Chem.*, **1988**, 36, 996.

151. Buttery, R.G., Ling, L.C. and Light, D.M., *J. Agric. Food Chem.*, **1987**, 35, 1039.

152. Ulrich, D., Rapp, A. and Hoberg, E., *Z. Lebesm. Unters. Forsch*, **1995**, 200, 217.

153. Casabianca, H. and Graff, J.-B., *J. High Resol. Chromatogr.*, **1994**, 17, 184.

154. Murray, K.E. and Stanley, G., *J. Chromatogr.*, **1968**, 34, 174.

155. Lübke, M. and Le Quéré, J.-L., *J. Chromatogr.*, **1993**, 646, 307.

156. Aishima, T. and Ozawa, Y., *Chromatographia*, **1989**, 28, 405.

157. Chairote, G., Rodriguez, F. and Crouzet, J., *J. Food Sci.*, **1981**, 46, 1898.

158. Palmer, J.K., *J. Agric. Food Chem.*, **1973**, 21, 923.

159. Schmidt, J.A., Williams, R.C. and Henry, R.A., *J. Agric. Food Chem.*, **1973**, 21, 551.

160. Murray, K.E., Shipton, J.S., Whitfield, F.B. and Last, J.H., *J. Sci. Food Agric.*, **1976**, 27, 1093.

161. Gelsomini, N., Capozzi, F. and Faggi, C., *J. High Resol. Chromatogr.*, **1990**, 13, 352.

162. Morin, P, Caude, M., Richard, H. and Rosset, R., *J. Chromatogr.*, **1986**, 363, 57.

163. Schreier, P. and Mick, W., *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, **1984**, 8, 97.

164. Fröhlich, O. and Schreier, P., *Flav, Fragan. J.*, **1989**, 4, 177.

165. Pino, J. Torricella, R. and Örsi, F., *Die Nahrung*, **1986**, 30, 783.

166. Bosset, J.O., Gauch, R., Mariaca, R. and Klein, B., *Mitt. Gebiete Lebnsm. Hyg.*, **1995**, 86, 672.

167. Aishima, T. and Nobuhara, A., *Food Chem.*, **1977**, 2, 161.

168. Harayama, K., Hayase, F. and Kato, H., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1994**, 9, 1595.

169. Moshonas, M.G. and Shaw, P.E., *J. Agric. Food Chem.*, **1989**, 37, 157.

170. Fröhlich, O. and Schreier, P., *J. Food Sci.*, **1990**, 55, 176.

171. Berdagué, J.-L., Denoyer, C., Le Quéré, J.-L. and Semon, E., *J. Agric. Food Chem.*, **1991**, 39, 1257.

172. Rijks, J., Curvers, J., Noy, T. and Cramers, C., *J. Chromatogr.*, **1983**, 279, 395.

173. Weurman, C., *J. Agric. Food Chem.*, **1969**, 17, 370.

174. Imai, T., Harte, B.R. and Giaicin, J.R., *J. Food Sci.*, **1990**, 55, 158.

175. Takeoka, G.R., Flath, R.A., Güntert, M. and Jennings, W., *J. Agric. Food Chem.*, **1988**, 36, 553.

176. Takeoka, G.R., Güntert, M., Flath, R.A., Wurz, E. and Jennings, W., *J. Agric. Food Chem.*, **1986**, 34, 576.

177. Wilkens, W.F. and Lin, F.M., *J. Agric. Food Chem.*, **1970**, 18, 333.

178. Buttery, R.G., Seifert, R.M., Guadagni, D.G. and Ling, L.C., *J. Agric. Food Chem.*, **1971**, 19, 524.

179. Flath, R.A. and Forrey, R.R., *J. Agric. Food Chem.*, **1977**, 25, 103.

180. Chang, S.S., Vallese, F.M., Hwang, L.S., Hsieh, O.A.L. and Min, D.B.S., *J. Agric. Food Chem.*, **1977**, 25, 450.

181. Jennings, W.G. and Filsoof, M., *J. Agric. Food Chem.*, **1977**, 25, 440.

182. Moyler, D., *Chemistry & Industry*, **1991**, Jan.

183. Venema, A., *J. High Resol. Chromatogr.*, **1990**, 13, 537.

184. Rizzolo, A., Polesello, A. and Polesello, S., *J. High Resol. Chromatogr.*, **1992**, 15, 472.

185. Vannoort, R.W., Chevret, J.-P., Lingeman, H., De Jong, G.J. and Brinkman, U.A., *J. Chromatogr.*, **1990**, 45, 505.

186. King, J.W., *J. Chromatographic Sci.*, **1989**, 27, 355.

187. Manninen, P., Riekkola, M.-L., Holm, Y. and Hiltunen, R., *J. High Resol. Chromatogr.*, **1990**, 13, 167.

188. Zhang, Z. and Pawliszyn, J., *J. High Resol. Chromatogr.*, **1996**, 19, 155.

189. Arthur, C.L. and Pawliszyn, J., *Anal. Chem.*, **1990**, 62, 2145.

190. Yang, X. and Peppard, T., *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, 42, 1925.

191. Nickerson, G.B. and Likens, S.T., *J. Chromatogr.*, **1966**, 21, 1.

192. Likens, S,T. and Nickerson, G.B., *American Society of Brewing Chemists, Proceedings*, **1964**, 5.

193. Maarse, H. and Kepner, R.E., *J. Agric. Food Chem.*, **1970**, 18, 1095.

194. Godefroot, M., Sandra, P. and Verzele, M., *J. Chromatogr.*, **1981**, 203, 325.

195. Haidukewych, D., Forsythe, W.I. and Sills, M., *Clin. Chem.*, **1982**, 28, 642.

196. Majors, R.E., *LC-GC*, **1997**, 9, 93.

197. Frutos, M., Sanz, J. and Martinez-Castro, I.M., *J. Agric. Food Chem.*, **1991**, 39, 524.

198. Dirinck, P., Schreyen, L., van Wassenhove, F. and Schamp, N., *J. Sci. Food Agric.*, **1976**, 27, 499.

199. Horvat, R.J., Denter, S.D., Chapman, G.W. and Payne, J.A., *J. Food Sci.*, **1976**, 27, 499.

200. Sánchez, L., -Velasco, M.A. and del Rio, F., *Phytochemistry,* **1991**, 30, 1915.

201. Careri, M. Manini, P., Spagnoli, S., Barbieri, G. and Bolzoni, L., *Chromatographia*, **1994**, 38, 386.

202. Guichard, E.A. and Ducruet, V.J., *J. Agric. Food Chem.*, **1984**, 32, 838.

203. Tatsuka, K., Suekane, S., Sakai, Y. and Sumitani, H., *J. Agric. Food Chem.*, **1990**, 38, 2176.

204. Au-Yeung, C.Y. and MacLeod, A.J., *J. Agric. Food Chem.*, **1981**, 29, 502.

205. Blanch, G.P., Tabera, J., Herraiz, M. and Reglero, G., *J. Chromatogr.*, **1993**, 628, 261.

206. Spadone, J.-C., Takeoka, G. and Liardon, R., *J. Agric. Food Chem.*, **1990**, 38, 226.

207. Schultz, T.H., Flath, R.A., Mon, T.R., Eggling, S.B. and Teranishi, R., *J. Agric. Food Chem.*, **1977**, 25, 446.

208. Kawakami, M. and Kobayashi, A., *J. Agric. Food Chem.*, **1991**, 39, 1275.

209. Bartley, J.P. and Schwede, A., *J. Food Sci.*, **1987**, 52, 353.

210. Schieberle, P. and Grosch, W., *J. Agric. Food Chem.*, **1988**, 36, 797.

211. Rödel, W. and Petrzika, M., *J. High Resol. Chromatogr.*, **1991**, 14, 771.

212. Schieberle, P. and Grosch, W., *J. Agric. Food, Chem.,* **1987**, 35, 252.

213. Stashenko, E.E., Prada, N.Q. and Martínez, J.R., *J. High Resol. Chromatogr.*, **1996**, 189, 353.

214. Linskens, H.F. and Jackson, J.F., *Plant Volatile Analysis. Modern Methods of Plant Analysis*, Vol.19, Springer, Berlin, **1997**.

215. Adams, R.P., *Identification of Essential Oil Componentes by Gas Chromatography Mass Sprectroscopy*, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, **1995**.

216. Sandra, P. and Bicchi, C., *Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis*, Huethig, Heidelberg, **1987**.

217. Wu, S.-lin and Frenz, J., *LC-GC Int.*, **1995**, 8, 14.

218. Colgrove, S.G. and Svec, H.J., *Anal. Chem.*, **1981**, 53, 1737.

219. Fröhlich, O., Kahre, C. and Schreier, P., *Chromatographia*, **1987**, 3, 54.

220. Nes, W.D., *ACS Symp. Ser.*, **1987,** 325, 303.

221. Heupel, R.C., "Isolation and Primary Characterization of Sterols" in *Analysis of Sterols and other Biologically Significant Steroids*; W.D. Nes and E.J. Parish (Eds.). Academic Press, Inc., **1989**.

222. Patterson, G.W., "Chemical and Physical Methods in the Analysis of Plant Sterols" in *Isopentenoids in Plants, Biochemistry and Function*; W.D. Nes, G. Fuller and Lee-Shin Tsai (Eds.). Marcel Dekker, Inc., **1984**.

223. Rullkötter, J. and Philip, P., *Nature* (Lond), **1981,** 292, 616.

224. Corbett, R.E., Cong, A.N.T., Holland, P.T. and Wilkins, A.L., *Aust. J. Chem.*, **1987**, 40, 461.

225. Perrin, J.L. and Raoux, R., *Rev. Franc. Corps Gras*, **1988**, 35, 329.

226. Heupel, R.C., Sauvaire, Y., Le, Phu H., Parish, E.J. and Nes, W.D., *Lipids*, **1986**, 21, 69.

227. Mahato, S.B. and Sen, S., *Phytochemistry,* **1997**, 44, 1185.

228. Shoolery, J.L. and Rogers, M.T., *J. Amer. Chem. Soc.*, **1958**, 80, 5121.

229. Zurcher, R.F., *Helv. Chim. Acta*, **1961**, 44, 1380.

230. Zurcher, R.F., *Helv. Chim. Acta*, **1963**, 46, 2054.

231. Arnold, W., Meister, W. and Englert, G., *Helv. Chim. Acta*, **1974**, 57, 1555.

232. Cohen, A.I. and Rock, S., *Steroids*, **1964**, 3, 243.

233. Lehn, J.-M. and Ourisson, G., *Mém. Soc. Chim.*, **1962**, 201, 1137.

234. Harmmer, C.F. and Stevenson, R., *Steroids*, **1965**, 5, 637.

235. Hemmert, F., Lacoume, B., Levisalles, J. and Pettit, G.R., *Bull. Soc. Chim. France*, **1966**, 976.

236. Cohen, A.I., Rosenthal, D., Krakover, G.W. and Fried, J., *Tetrahedron*, **1965**, 21, 3171.

237. Cockerill, A.F., Davies, G.L.O., Harden, R.C. and Rackham, D.M., *Chem. Rev.*, **1973**, 73, 553.

238. Demarco, P.V., Elzey, T.K., Lewis, R.B. and Wankert, E., *J. Amer. Chem. Soc.*, **1970**, 92, 5737.

239. Pant, P. and Rastogi, R.P., *Phytochemistry,* **1979**, 18, 1095, e referências aí citadas.

240. Buckley, D.G. Green, G.H. Ritche, E. and Taylor, W.C., *Chem Ind.* **1971**, 298.

241. Inubushi, Y., Hibino, T. and Shingu, T., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1972**, 1, 1682.

242. Shingu, T., Yokoi, T., Niwa, M. and Kikuchi, T., *Chem Pharm. Bull.* **1973**, 21, 2252.

243. Ikeda, T. and Kitao, K., *Mukuzai Gakkaishi*, **1974**, 20, 592.; *Chem Abstracts*, **1975**, 82, 73236.

244. Romeo, G., Giannetto, P. and Aversa, M.C., *Chim. Ind.* (Milan) **1976**, 58, 448; *Chem Abstracts*, **1977**, 86, 16814.

245. Romeo, G., Giannetto, P. and Aversa, M.C., *Org. Magn. Reson.* **1977**, 9, 29.

246. Smith, L.L., *Steroids*, **1964**, 4, 395.

247. Bridgeman, J.E., Cherry, P.C., Clegg, A.S., Evans, J.M., Jones, E.R.H., Kasal, A., Kumar, V., Meakins, G.D., Morisawa, Y., Richards, E.E. and Woodgate, P.D., *J. Chem. Soc. (C)*, **1970**, 250.

248. Bhacca, N.S. and Williams, D.H., *Applications of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry, Illustrations from the Steroid Field.* Holden-Day, Inc., **1964**.

249. Farines, M. and Soulier, J., *Rev. Franc. Corps Gras*, **1988**, 35, 57.

250. Stothers, J.B., in *Carbon-13 NMR Spectroscopy*, Academic Press, New York, **1972**.

251. Seo, S., Tomita, Y. and Tori, K., *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 1, 7.

252. Olea, R.S.G. and Roque, N.F., *Química Nova*, **1990**, 13, 278.

253. Sholichin, M., Yamasaki, K., Kasai, R. and Tanaka, O., *Chem Pharm. Bull.,* **1980**, 28, 1006.

254. Kang, S.S., *Kor. J. Pharmacogn.*, **1987**, 18, 151.

255. Mahato, S.B. and Kundu, A.P., *Phytochemistry,* **1994**, 37, 1517.

256. Blunt, J.W. and Stothers, J.B., *Org. Magn. Reson.*, **1977**, 9, 439.

257. Akihisa, T., "^{13}C-NMR Spectral Identification of Sterols" in *Analysis of Sterols and Other Biologically Significant Steroids,* Nes, W.D. and Parish, E.J., (ed.), Academic Press, Inc., **1989**.

258. Mahato, S.B. Nandy, A.K. and Roy, G., *Phytochemistry,* **1992**, 31, 2199.

259. Reynolds, W.F., Hughes, D.W., Perpick-Dumont, M. and Enriquez, R.G., *J. Magn. Reson.,* **1985**, 63, 413.

260. Reynolds, W.F., McLean, S. Poplawski, J., Enriquez, R.G., Escobar, L.I. and Leon, I., *Tetrahedron*, **1986**, 42, 3419.

261. Cheung, H.T. and Williamson, D.G., *Tetrahedron*, **1969**, 25, 119.

262. Croasmun, W.R. and Carlson, R.M.K., *Methods Stereochem. Anal.9 (Two-Dimens. NMR Spectrosc.)*, **1987**, 387.

263. Tsuda, Y., Yamashita, T. and Sano, T., *Chem. Pharm. Bull.,* **1984**, 32, 4820.

264. Klinot, J., Vsetecka, V., Klinotova, E. and Vystreil, A., *Collect. Czech. Chem. Commun.,* **1986**, 51, 611.

265. Shmueli, U., Carmely, S., Groweiss, A. and Kashman, Y., *Tetrahedron Lett.,* **1981**, 22, 709.

266. Carmely, S. and Kashman, Y., *J. Org. Chem.,* **1983**, 48, 3517.

267. Bellamy, L.J., *The Infrared Spectra of Complex Molecules,* 3rd ed. Chapman & Hall, London, **1975**.

268. Silverstein, R.M., Bassler, G.C. and Morril, T.C., *Spectrometric Identification of Organic Compounds,* 4th. ed. Wiley, New York, **1981**.

269. Acuña-Johson, P. and Oehlschlager, A.C., "Identification of Sterols and Biologically Significant Steroids by Ultraviolet and Infrared Spectroscopy", in *Analysis of Sterols and other Biologically Significant Steroids.,* Nes, W.D. and Parish, E.J. eds. Academic Press, Inc., **1989**, 267.

270. Rahier, A. and Benveniste, P., "Mass Spectral Identification of Phytosterols", in *Analysis of Sterols and other Biologically Significant Steroids.,* Nes, W.D. and Parish, E.J. ed. Academic Press, Inc., **1989**, 223.

271. Budzikiewicz, H., Wilson, J.M. and Djerassi, C., *J. Amer. Chem. Soc.*, **1963,** 85, 3688.

272. Ogunkoya, L., *Phytochemistry,* **1981,** 20, 121.

273. Shiojima, K., Arai, Y., Masuda, K., Takase, Y., Ageta, T. and Ageta, H., *Chem. Pharm. Bull.*, **1992**, 40, 1683.

274. Zaretskii, Z.V., *Mass Spectrometry of Steroids.,* Israel Universities Press, Jerusalém, **1976**.

275. González, A.G., Bermejo, J., Mediavilla, Ma. J. and Toledo, F.J., *Rev. Latinoameri. Quim.,* **1984**, 15, 107.

276. Galli, G. and Maroni, S., *Steroids,* **1967**, 10, 189.

277. Wyllie, S.G. and Djerassi, C., *J. Org. Chem.,* **1968**, 33, 305.

278. Djerassi, C., *Pure & Appl. Chem.,* **1978**, 50, 171.

279. Dumazer, M., Farines, M. and Soulier, J., *Rev. Franc. Corps Gras,* **1986**, 33, 151.

280. Brooks, C.J.W., Horning, E.C. and Young, J.S., *Lipids,* **1968**, 3, 391.

281. Knights, B.A., *J. Gas Chromatogr.*, **1967**, 273.

282. Baldwin, M.A. and McLafferty, F.W., *Org. Mass Spectrom.,* **1973**, 7, 111.

283. Garteiz, D.A. and Vestal, M.L., *LC Mag.*, **1985**, 3, 334.

284. Wolfender, J.-L., Rodriguez, S., Hostettmann, K. and Wagner-Redeker, W., *J. Mass Spectrom.,* **1995**, S35.

285. Blakley, C.R. and Vestal, M.L., *Anal. Chem.,* **1983**, 55, 750.

286. Caprioli, R.M., Fan, T. and Cottrell, J.S., *Anal. Chem.,* **1986**, 58, 2949.

287. Allen, M.H. and Shushan, B.I., *LC-GC,* **1993**, 11, 112 e referências aí citadas.

288. Bruins, A.P., Covey, T.R. and Henion, J.D., *Anal. Chem.,* **1987**, 59, 2642.

289. Willoughby, R.C. and Browner, R.F., *Anal. Chem.,* **1984**, 56, 2626.

290. Winkler, P.C., Perkins, D.D., Williams, W.K. and Browner, R.F., *Anal. Chem.,* **1988**, 60, 489.

291. Bowers, L.D., *Clin. Chem.,* **1989**, 35, 1282.

292. Doelen, G.A, Berg, K.J., Boon, J.J, Shibayama, N., Rie, E.R. and Genuit, W.J.L., *J. Chromatogr. A,* **1998**, 809, 21.

293. Yasuda, T., Tanaka, M. and Iba, K., *J. Mass Spectrom.,* **1996**, 31, 879.

294. Gamoh, K., Abe, H., Shimada, K. and Takatsuto, S., *Rapid Commun. Mass Spectrom.,* **1996**, 10, 903.

295. Aramendia, M.A., Borau, V., Garcia, I., Jimenez, C., Lafont, F. Marinas, J.M. and Urbano, F.J., *Rapid Commun. Mass Spectrom.,* **1996**, 10, 1585.

296. "*Flora Iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares"*, Vol. IV, *Cruciferae-Monotropaceae*, (Eds.) Castroviejo, S., Aedo, C., Campo, C.G., Laínz, M., Montserrat, P., Morales, R., Garmendia, F.M., Feliner, G.N., Rico, E., Talavera and S. E Villar, L., Real Jardin Botánico, C.S.I.C., Madrid, **1993**, 515.

297. Chaves das Neves, H.J. and Gaspar, E.M., *J. High Resol. Chromatogr.,* **1995**, 18, 299.

298. Odham, G. and Stenhagen, E., "Fatty Acids", Chapt. 8, in *Biochemical Applications of Mass Spectrometry*, Waller, G.R. and Dermer, D.C. (Eds.), John Wiley & Sons, New York. **1980**. 211.

299. Spiteller, G., *Fondazione Carlo Erba*, Conference, **1972**, 13.

300. Belitz, H.-D. and Grosh, W., *Food Chemistry*, 2nd Ed, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **1999** e referências aí citadas.

301. Shibahara, A., Yamamoto, K., Nakayama, T. and Kajimoto, G., *J. Amer. Org. Chem. Soc.,* **1987**, 3, 397.

302. Farines, M., Soulier, J. Charrouf, M. and Soulier J., *Rev. Franc. Corps Gras*, **1984**, 31, 283.

303. Mussinan, C.J. and Walradt, J.P., *J. Agric. Food Chem.*, **1975**, 23, 482.

304. Ulberth, F. and Schrammel, F., *J. Chromatogr. A*, **1995**, 704, 455.

305. Wheeler, O.H., *Chem. Rev.*, **1962**, 62, 205.

306. Ford, D.L. and Kennard, W., *J. Oil Colour Chem. Assoc.*, **1966**, 9, 299.

307. Wieder, T., Fritsch, M., Haase, A. and Geilen, C.C., *J. Chromatogr. B.*, **1994**, 652, 9.

308. Jackson, C. and Yau, W.W., *J. Chromatogr. B.*, **1993**, 645, 209.

309. Stolyhwo, A., Colin, H. and Guiochon, G., *J. Chromatogr. B.*, **1983**, 265, 1.

310. Stolyhwo, A., Colin, H., Martin, M. and Guiochon, G., *J. Chromatogr. B.*, **1984**, 288, 253.

311. Lafosse, M., Dreux, M. and Morin-Allory, L., *J. Chromatogr. B.*, **1987**, 404, 95.

312. Yagoubi, N., Baillet, A.E., Pellerin, F. and Baylocq, D., *J. Chromatogr.*, **1990**, 522, 131.

313. Lafosse, M., Elfakir, C., Morin-Allory, L. and Dreux, M., *J. High Resol. Chromatogr.*, **1992**, 15, 312.

314. Mourey, T.H. and Oppenheimer, L.E., *Anal. Chem.*, **1984**, 56, 2427.

315. Lafosse, M., Dreux, M. and Morin-Allory, L., *LC-GC International*, **1996**, 148.

316. Chaves das Neves, H.C. and Braga Morais, Z., in "Proceedings Eighteenth Int. Symp. Capillary Chromatography", Sandra P. And Devos, G. (eds.), Riva del Garda, Huethig Heidelberg, **1996**, 1232.

317. Tökes, L., Jones, G. and Djerassi, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, 90, 5465.

318. Waterhouse, J.S., Ke, J., Pickett, J.A. and Weldon, P.J., *J. Chem. Ecology*, **1996**, 22, 130 e referências aí citadas.

319. Sthal, E., *Thin-Layer Chromatography - A Laboratory Handbook,* Academic Press, London, **1965**.

320. Takeda, K, Hara, S. Wada, A. and Matsumoto, N., *J. Chromatogr.*, **1963**, 11, 562.

321. Khuroo, M.A., Qureshi, M.A., Razdan, T.K. and Nichols, P., *Phytochemistry,* **1988**, 27, 3541.

322. Laxmi, N.M. and Ateeque, A., *Phytochemistry,* **1997**, 45, 575. e referências aí citadas.

323. Matsunaga, S. Tanaka, R. and Akagi, M., *Phytochemistry,* **1988**, 27, 535.

324. Razdan, T.K., Harkar, S., Qadri, B., Qurishi, M.A. and Khuroo, M.A., *Phytochemistry,* **1988**, 27, 1890.

325. Itoh, T., Tamura, T. and Matsumoto, T., *Lipids*, **1974**, 9, 173.

326. Kumar, N. and Seshadri, T.R., *Phytochemistry,* **1975**, 14, 521.

327. Furuya, T., Orihara, Y. and Hayashi, C., *Phytochemistry,* **1987**, 26, 715.

328. Misra, T.R., Singh, R.S., Upadhyay, J. and Srivastava, R., *Phytochemistry,* **1984**, 23, 415.

329. Kahlos, K. and Hiltunen, R., *Acta Pharm. Fennica*, **1987**, 96, 85.

330. Rahier, A. and Benveniste, P., *Mass Spectral Identification of Phytosterols*, **1987**, 11, 223.

331. Budzikiwiez, H. and Djerassi, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1962**, 1430.

332. Budzikiewicz, H., "Steroids" Chapt. 10, in *Biochemical Applications of Mass Spectrometry*, Waller, G.R. and Dermer, D.C. (Eds.), John Wiley & Sons, New York. **1980**. 211.

333. Duffield, A.M., *Recent Advances in Phytochemistry. 4. Utilization of Mass Spectrometry in Natural Products Chemistry.*, **1968**, 107.

334. Soulier, P., Farines, M. and Soulier, J., *J. Am. Org. Chem. Soc.*, **1990**, 67, 388.

335. Masuda, K., Shiojima, K. and Ageta, H., *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, 2530.

336. Bhattacharyya, J. and Barros, C.B., *Phytochemistry,* **1986**, 25, 274.

337. Heupel, R.C., *Phytochemistry,* **1985**, 24, 2929.

338. Doddrell, D.M., Kjhong, P.W. and Lewis, K.G., *Tetrahedron Lett.*, **1974**, 2381.

339. Arai, Y., Kusumoto, Y., Nagao, M., Shiojima, K. and Ageta, H., *Yakugaku Zasshi*, **1983**, 356.

340. Murty, Y.L.N. and Row, L.R., *Indian J. Chem.*, **1982**, 21B, 179.

341. Budzikiewicz, H., Djerassi, C. and Baumann, C.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, 75, 4325.

342. *Dictionary of Natural Products*, Ed. Chapman & Hall, London, **1996**.

343. *The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, 12th ed., Merck & Co., Inv. Whitehouse Station, NJ, **1996**.

344. Baas, W.J. and Nieman, G.J., *J. High Resol. Chromatogr.,* **1978**, 1, 18

345. Tanaka, R., Tabuse, M. and Matsunaga, S., *Phytochemistry,* **1988**, 27, 3563.

346. Bhan, S., Kumar, R., Kalla, A.K. and Dhar, K.L., *Phytochemistry,* **1988**, 27, 539.

347. Harkar, S., Razdan, T.K. and Waight, E.S., *Phytochemistry,* **1984**, 23, 2893.

348. Ionescu, F., Jolad, S.D., Cole, J.R., Arora, S.K. and Bates, R.B., *J. Org. Chem.,* **1977**, 58, 271.

349. Peraza-Sánchez, S.R., Salazar-Aguilar, N.E. and Peña-Rodriguez, L.M., *J. Natural Products*, **1995**, 58, 271.

350. Kojima, h., sato, N., Hatano, A. and Ogura, H., *Phytochemistry,* **1990**, 29, 2351.

351. Enzell, C.R. and Wahlberg, I., "Terpenes and Terpenoids" *in Biochemical Applications of Mass Spectrometry*, Chapt.13, Waller, G.R. and Dermer, D.C. (Eds.), John Wiley & Sons, New York, **1980**, 351.

352. Yagishita, K. and Nishimura, M., *Agric. Biol. Chem.*, **1961**, 25, 517.

353. Bianchi, G., Pozzi, N. and Vlahov, G., *Phytochemistry,* **1994**, 37, 205.

354. Misra, L.N. and Ahmad, A., *Phytochemistry,* **1997**, 575

355. Younes, M. El-G., *Phytochemistry,* **1975**, 14, 592.

356. Ikuta, A. and Itokawa, H., *Phytochemistry,* **1986**, 25, 1625.

357. Savona, G., Bruno, M., Rodriguez, B. and Marco, J.L., *Phytochemistry,* **1987**, 26, 3305.

358. Burnouf-Radosevich, M., Delfel, N.E. and England, R., *Phytochemistry,* **1985**, 24, 2063.

359. Wang, S.-P., Lai, J.-S. and Huang, K.-F., *Chinese Pharm. J.*, **1993**, 45, 329.

360. Cirva, V.Ja., Griskovec, V.I. and Sergienko, T.V., *Pharmazie*, **1980**, 35, 500.

361. Crnecevic, V. and Niketic, G., *Tehnika (Belgrade)*, **1957**, 12, 1382.

362. Bruno, S., Amicos, A. and Stefanizzi, L., *Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, **1980**, 56, 2067.

363. Brozzetti, P., *Ann. Facoltà Agrar. Univ. Perugia*, **1947**, 4, 82.

364. Sulc, D., Kveder, H. and Horgas, D., *Kemija u Industriji (Zagreb).*, **1956**, 5, 113.

365. Sulc, D., Kveder, H. and Horgas, D., *Acta Pharm. Jug.*, **1956**, 6, 163.

366. Versteeg, C., Rombouts, F.M., Spaansen, C.H. and Pilnik, W., *J. Food Science*, **1980**, 45, 969.

367. Medlicott, A.P. and Thompson, A.K., *J. Sci. Food Agric.*, **1985**, 36, 561.

368. Bindler, F. and Laugel, P., "Possibilité de Réduction de la Teneur en Methanol des Eaux-de-vie de Poire: Éventuelles Répercussions sur leur Composition", in *Élaboration et Connaissance des Spiritueux; Recherche de la Qualité, Tradition et Innovation*, Cantagrel, R. (Ed.) (1er. Symposium Scientifique International de Cognac, 11-15 Mai, 1992), Cognac, Lavoisier, **1993**, 375.

369. *Tabela de Composição dos Alimentos Portugueses*, Ministério da Saúde e Assistência, Direcção-Geral de Saúde, elaborado pelos Laboratórios de Higiene Alimentar e Bromatologia do Instituto de Saúde e Higiene Dr. Ricardo Jorge (Lisboa - Porto), **1961**.

370. Oddo, L.P., Piazza, M.G., Sabatini, A.G. and Accorti, M., *Apidologie*, **1995**, 26, 453.

371. Amiot, M.J., Aubert, S., Gonnet, M. and Tacchini, M. *Apidologie*, **1989**, 20, 115.

372. Ohloff, G. *Scent and Fragances. The Fascination of Odor and Their Chemical Perspectives*, Springer-Verlag, **1994** e referências aí citadas.

373. Weiss, E.A., *Essential Oil Crop*, Cab International, **1997** e referências aí citadas.

374. Joulain, D. and Konig, W.A., *The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*, E. B.-Verlag, Hamburg, **1998**.

375. Davies, N.W., *J. Chromatogr.*, **1990**, 503, 1.

376. Thomas, A.F. and Willhalm, B., *Helv. Chim. Acta*, **1963**, 28, 475.

377. Enzell, C.R. and Wahlberg, I., "Terpenes and Terpenoids" Chapt. 13 and "Flavor Components" Chapt.25, in *Biochemical Applications of Mass Spectrometry*, Waller, G.R. and Dermer, D.C. (Eds.), John Wiley & Sons, New York. **1980**.

378. Ryhage, R. and Sydow, E. von, *Acta Chem. Scandinavica*, **1963**, 17, 2025.

379. Sydow, E. von, *Acta Chem. Scandinavica*, **1963**, 17, 2504.

380. Hill, H.C., Reed, R.I. and Rober-Lopes, M.T., *J. Chem. Soc.(C)*, **1968**, 93.

381. Vernin, G., *Parf. Cosm. Sav.*, **1969**, 12, 179.

382. Nursten, H.E., Williams, A.A., *Chemistry and Industry*, **1967**, 486 e referências aí citadas.

383. Hirvi, T., Honkanen, E., *Z. Lebensm Unters Forsch*, **1982**, 175, 113.

384. Farnsworth, N.R., "*Screening Plants for New Medicines*", in *Biodiversity*, Wilson, E.O. and Peters, F.M. (eds.), Academic Press, New York, **1988**, 61.

385. Pezzuto, J.M., *Biochem. Pharmacol.*, **1997**, 53, 121.

386. Hostettmann, K., Wolfender, J.-L. and Rodriguez, S., *Planta Medica*, **1997**, 63, 2.

387. Es-Saady, D., Najid, A., Simon, A., Chulia, A.J. and Delage, C., *Lyon Pharmaceutique*, **1994**, 45, 399.

388. Balandrin, M.F., Kinghorn, A.D. and Farnsworth, N.R., "*Plant derived natural products in drug discovery and development: An overview.*", in *Human Medicinal Agents from Plants*, (ACS Symposium Series, 534) Kinghorn, A.D. and Balandrin, M.F. (eds.), American Chemical Society Books, Washington, **1993**, 2.

389. Farnsworth, N.R. and Morris, R.W., *Am. J. Pharm.*, **1976**, 147, 46.

390. Farnsworth, N.R. and Soejarto, D.D., *Econ. Bot.*, **1985**, 39, 231.

391. Ziyyat, A. and Boussairi, E.H., *Phytotherapy Research*, **1998**, 12, 110.

392. Principe, P.P., "Monetizing the Pharmacological Benefits of Plants" in *Medicinal Plant Resources of the Tropical Forest*, Balick, M.J., Elisabetsky, E. and Laird, S.A., eds., Columbia University press, New York, **1996**, 14, 191.

393. Ziyyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M. and Benjelloun, W., *J. Ethnopharmac.*, **1997**, 58, 45.

394. Akihisa, T., Yasukawa, K., Oinum, H., Kasahara, Y., Yamanouchi, S., Takido, M., Kumaki, K. and Tamura, T., *Phytochemistry,* **1996**, 43, 1255.

395. Gomes, A., Sharma, R.M. and Ghatak, B.J.R., *Indian J. Experimental Biology*, **1987**, 25, 826.

396. Safayhi, H. and Sailer, E.-R., *Planta Medica*, **1997**, 63, 487.

397. Kuo, Y.-H. and Kuo, L.-M.Y., *Phytochemistry,* **1997**, 44, 1275.

398. Kapoor, V.K. and Chawla, A.S., *J. Scien. Industrial Res.*, **1986**, 45, 503.

399. Nagaya, H., Tobita, Y., Nagae, T., Itokawa, H., Takeya, K., Halim, A.F. and Abdel-Halim, O.B., *Phytochemistry,* **1997**, 44, 1115.

400. Konoshima, T., Takasaki, M., Tokuda, H., Masuda, K., Arai, Y., Shiojima, K. and Ageta, H., *Biol. Pharm. Bull.*, **1996**, 19, 962.

401. Ryu, S.Y., Choi, S.U., Lee, S.H., Lee, C.O. No, Z. and Ahn, J.W., *Arch. Pharm. Res*, **1994**, 17, 375.

402. Cha, H.-J., Bae, S.K., Lee, H.-Y., Lee, O.-H., Sato, H., Seiki, M., Park, B.C. and Kim, K.-W., *Cancer Res.*, **1996**, 56, 2281.

403. Simon, A., Najid, A., Chulia, A.J., Delage, C. and Rigaud, M., *Biochim. Biophysica Acta*, **1992**, 1125, 68.

404. Es-Saady, D., Najid, A., Simon, A., Denizot, Y., Chulia, A.J. and Delage, C., *Mediators of Inflamation*, **1994**, 3, 181.

405. Es-Saady, D., Delage, C. and Chulia, A.J., *Fitoterapia*, **1995**, 66, 366.

406. Es-Saady, D., Simon, A., Ollier, M., Maurizis, J.C., Chulia, A.J. and Delage, C., *Cancer Lett.*, **1996**, 106, 193.

407. Es-Saady, D., Simon, A., Jayat-Vignoles, C., Chulia, A.J. and Delage, C., *AntiCancer Res.*, **1996**, 16, 481.

408. Yano, S., Harada, M., Watanabe, K., Nakamaru, K., Hatakeyama, Y., Shibata, S., Takahashi, K., Mori, T., Hirabayashi, K., Takeda, M. and Nagata, N., *Chem. Pharm. Bull.*, **1989**, 37, 2500.

409. Nick, A., Wright, A.D., Rali, T. and Sticher, O., *Phytochemistry,* **1995**, 40, 1691.

410. Sandberg, F., *Nobel*, **1973**, 25, 303.

411. Catalano, S., Cioni, P.L., Panizzi, L. and Morelli, I., *J. Ethnopharmacology*, **1998**, 59, 207.

412. Martson, A. and Hostettmann, K., *Phytochemistry,* **1985**, 24, 639.

413. Shukla, Y.N., Rani, A., Tripathi, A.K. and Sharma, S., *Phytoth. Res.*, **1996**, 10, 359.

414. Williams, L.A.D. and Mansingh, A., *Philippine J. Sci.*, **1995**, 124, 345.

415. Gupta, M.B., Bhalla, T.N., Gupta, G.P., Mitra, C.R. and Bhargava, K.P., *Eur. J. Pharmacol.*, **1969,** 6, 67.

416. Shibata, S., *Proceedings on Life Sciences, New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity*, Wagner, H. and Wolff, P. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, **1977**, 177.

417. Bhargava, K.P., Gupta, M.B., Gupta, G.P. and Mitra, C.R., *Indian J. med. Res*, **1970,** 58, 724.

418. Akihisa, T., Yasukawa, K., Kimura, Y., Takase, S.L., Yamanouchi, S. and Tamura, T., *Chem. Pharm. Bull.*, **1997**, 45, 2016.

419. Gupta, M.B., Nath, R., Gupta, G.P. and Bhargava, K.P., *Indian J. med. Res*, **1981,** 73, 649.

420. Ma, X., Zhao, Y., Yin, L., Han, D. and Ji, C.,*Yaoxue Xuebao*, **1982,** 17, 93.

421. Kozai, K., *Chem Abstr*, **1986,** 104, 115941.

422. *Bull. WHO*, Tropical Disease Research, World Health Organization, Geneva, **1993**.

423. Najera, J.A., *Bull. WHO,* **1989,** 67, 229.

424. Vial, H., *Parasite*, **1996**, 3, 3.

425. Phillipson, J.D. and Wright, C.W., *J. Ethnopharmacol.*, **1991**, 32, 155.

426. Bringmann, G., Saeb, W., Assi, L.A., François, G., Narayanan, A.S.S., Peters., K. and Peters, E.-M., *Planta Medica*, **1997**, 63, 255.

427. Liu, J., *J. Ethnopharmacol.*, **1995**, 49, 57.

428. Khalid, S.A., Farouk, A., Geary, T.G. and Jensen, J.B., *J. Ethnopharmacol.*, **1986**, 15, 201.

429. Ling, H.C., King, M.L., Chen, C.F., Hsu, K.P., Su, M.H. and Lin, M.H. *Chung-hua 1 Hsuch Tsa Chih,* **1982**, 29, 308; *Chem. Abs.*, **1982**, 97, 120120.

430. Dean, H.G., Bonser, J.C. and Gent, J.P., *Clin. Chem.*, **1985**, 35, 1945.

431. Vici, C.D., Bachmann, C., Gradwoht, M. and Colombo, J.P., *Clin. Chim. Acta*, **1988**, 172, 233.

432. Miwa, H. and Yamamoto, M., *J. Chromatography*, **1987**, 421, 33.

433. Agricultural Research Service, Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Database, USDA-ARS-NGRL, Beltsville Agricultural Research Center, Maryland, USA. **2001**. (in *http://www.ars-grin/duke/chem-activities.pl*).

434. Ying, Q.-L., Rinehart, A.R., Simon, S.R. and Cheronis, J.C., *Biochem. J.*, **1991**, 227, 521.

435. Sohn, K.H., Lee, Y.N., Lee, O.H., Chung, H.Y. and Lee, J.J., *Yakhak Hoeji*, **1993**, 37, 532.

436. Rhew, T.-H., Park, S.-M., Chung, H.-Y., Hah, J.-C. and Lee, C.-K., *Yakhak Hoeji*, **1992**, 36, 529.

437. Proliac, A. and Raynaud, J., *Plant. Médic. Phytothér.*, **1982**, 16, 185.

438. Trachant J, "Analyse Qualitative", Chapitre VI, in *Manuel Pratique de Chromatographie en Phase Gazeuse,* 3éme ed., Masson, Paris, **1982**, 312.

439. Colin, F.P. and Poole, S.K., "The Column in Gas Chromatography", Chapter 2, in *Cromatography today*, Ed. Elsevier, Amsterdam,**1991**, 179.

440. Perrin, D. D., Armarego, W.L.F. and Perrin, D.R., *Purification of Laboratory Chemicals*, 2nd ed., Pergamon Press Ltd., **1980**.

441. Vogel's, *Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5th ed., Longman Scientific Technical, **1989**.

442. Knapp, D.R., *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*, John Wiley & Sons, Inc., **1979**.

443. Anonymous, *European Pharmacopoeia*, 3rd ed., Strasbourg, Council of Europe, **1997**, 121.

444. Kessler, A. and Baldwin, I.T., *Science*, **2001**, 291, 2141.

445. Gaspar, E.M.M, Neves, H.J.C., and Pereira, M.M.A., "Triterpenoids and Other Potentially Active Compounds from Wheat Straw: Isolation, Identification, and Synthesis", Chapt. 6, in *Biologically Active Natural Products: Agrochemicals*. Ed. H.G. Cutler and S.J. Cutler, CRC Press, **1999**, 69.

APÊNDICES

SUMÁRIO

APÊNDICE 1 **TRITERPENÓIDES** **229**

TRITERPENOS PENTACÍCLICOS..... **229**

TRITERPENOS TETRACÍCLICOS..... **241**

APÊNDICE 2 **COMPOSTOS DE PEQUENA MASSA MOLECULAR E BAIXO PONTO DE EBULIÇÃO** **245**

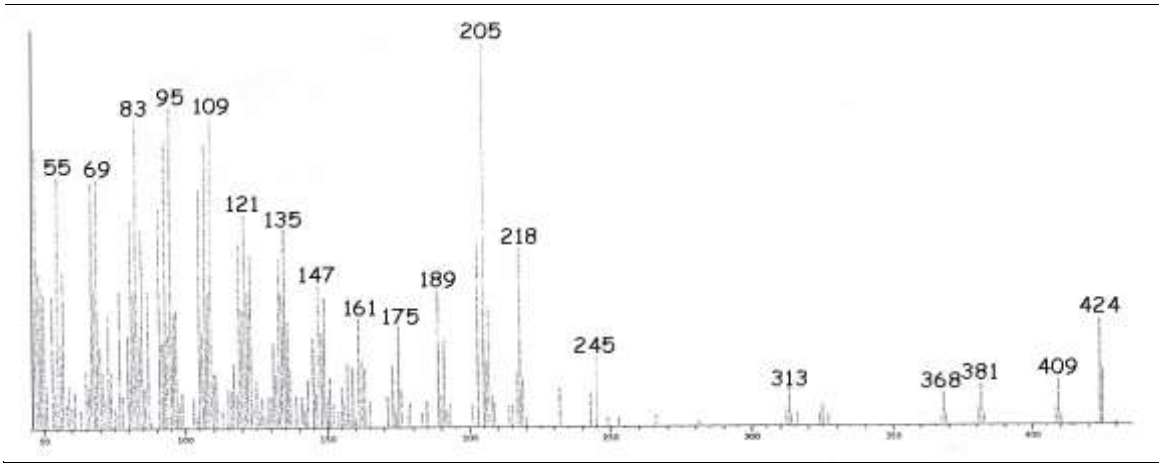
A - CORRELAÇÕES ESPECTRAIS DOS COMPOSTOS DOMINANTES GC-ITD – ESPECTROS DE QUADROPÓLO..... **245**

B - ESPECTROS DE GC-MS(ITD).....……..……..... **251**

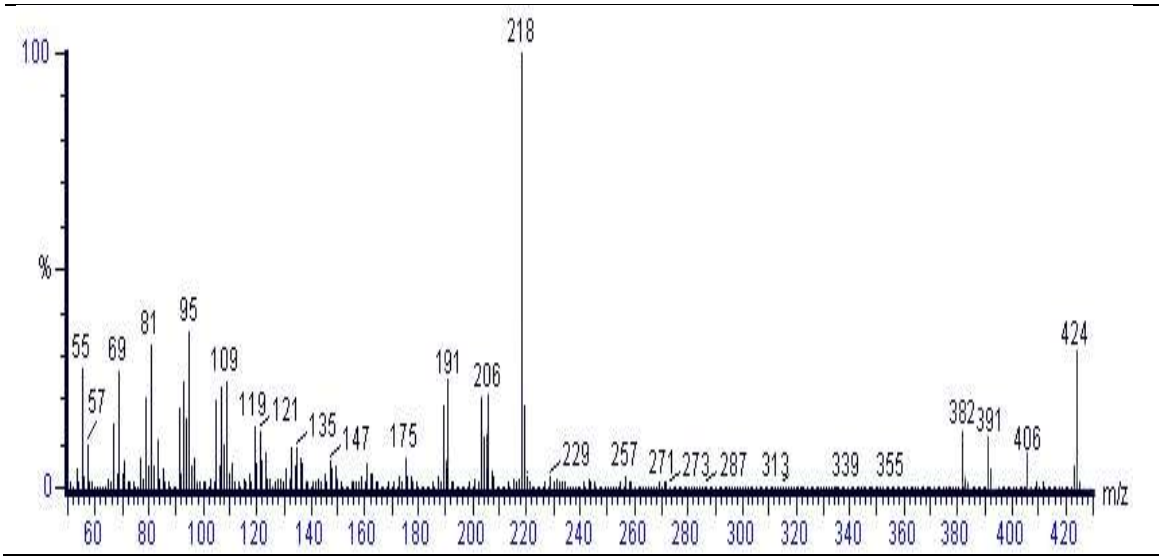
APÊNDICE 3 **OUTROS COMPOSTOS** **265**

APÊNDICE 1 - TRITERPENÓIDES

Triterpenos Pentacíclicos

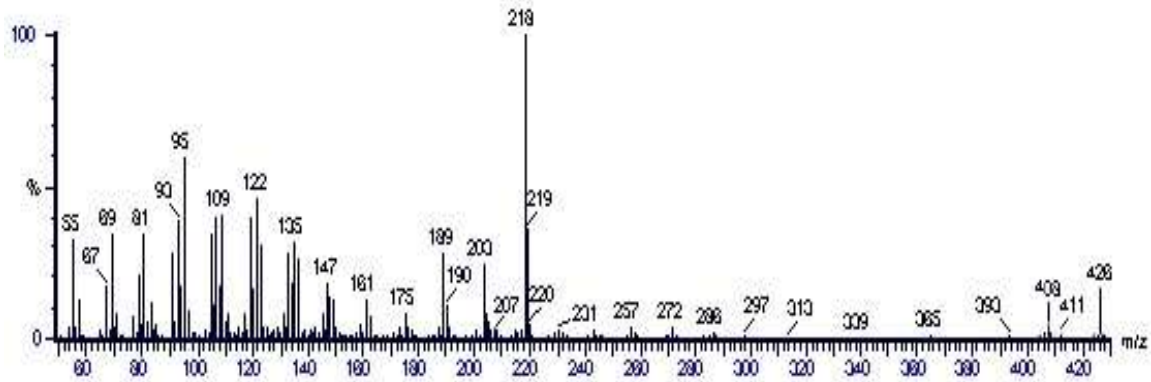


Espectro de massa da Lupeona (*2.2.3-1*).

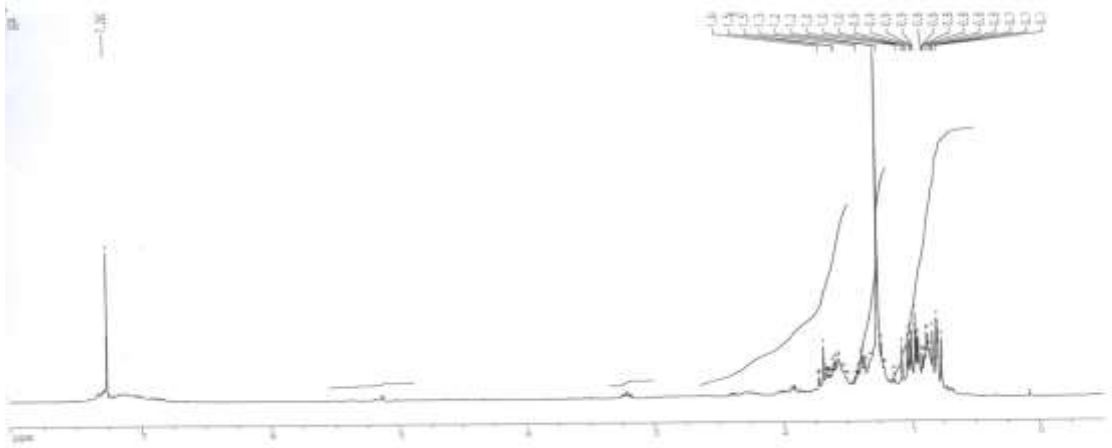


Espectro de massa da α-Amirona (*2.2.3-2*).

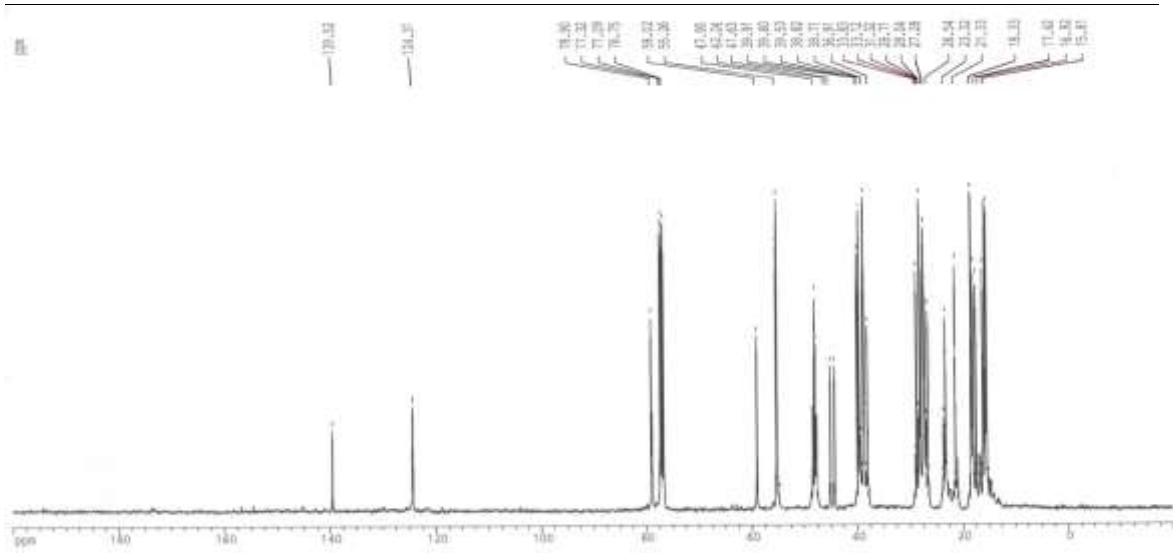
Composto - *2.2.3-3*	***α-Amirina*** — $C_{30}H_{50}O$ (M=426) Urs-12-en-3β-ol
p.f. (ºC)	184-187 (acetona:metanol (1:2))
$[\alpha]_D$	+ 82,5º (c=1, $CHCl_3$), T = 20 ºC
IV $\nu^{CHCl_3}_{máx.}$ (cm^{-1})	3411, 2918.6, 2850, 1735.9 (KBr, 3600-3200, 1638, 1450, 1380)
MS *m/z* (int.rel.%)	426[M+](19), 411(4), 408(15), 393(2), 218(100), 207(4), 205(5), 204(6), 203(24), 189(29), 175(13), 161(14), 147(21), 135(32), 122(48), 109(42), 95(63), 81(35), 69(34), 67(15), 55(31)
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)	0.790 (3H, *d, J* = 6 Hz, H-29), 0.793 (3H, *s*, H-24), 0.799 (3H, *s,* H-28), 0.910 (3H, *br s,* J<5 Hz, H-30), 0.954 (3H, *s,* H-25), 0.998 (3H, *s,* H-23), 1.008 (3H, *s,* H-26), 1.070 (3H, *s,* H-27), 3.320 (1H, *q, J* = 10 Hz, *J* = 6 Hz, H-3α), 5.130 (1H, *t, J* = 4 Hz, H-12)
^{13}C-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)	C-1 (38.82), C-2 (27.28), C-3 (78.90), C-4 (38.71), C-5 (55.26), C-6 (18.33), C-7 (33.12), C-8 (39.91), C-9 (47.90), C-10 (36.91), C-11 (23.32), C-12 (124.31), C-13 (139.52), C-14 (42.24), C-15 (26.54), C-16 (28.2), C-17 (33.83), C-18 (59.02), C-19 (39.53), C-20 (39.60), C-21 (31.32), C-22 (41.63), C-23 (28.04), C-24 (15.81), C-25 (15.81), C-26 (16.92), C-27 (23.34), C-28 (28.71), C-29 (17.42), C-30 (21.33)



Espectro de massa da α-Amirina (*2.2.3-3*).

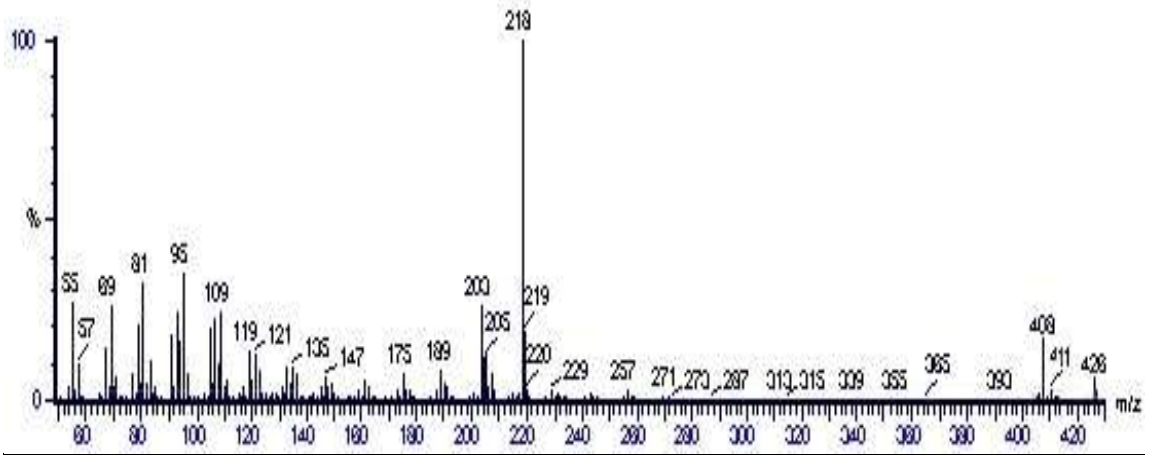


Espectro de ^{1}H-NMR da α-Amirina (*2.2.3-3*).

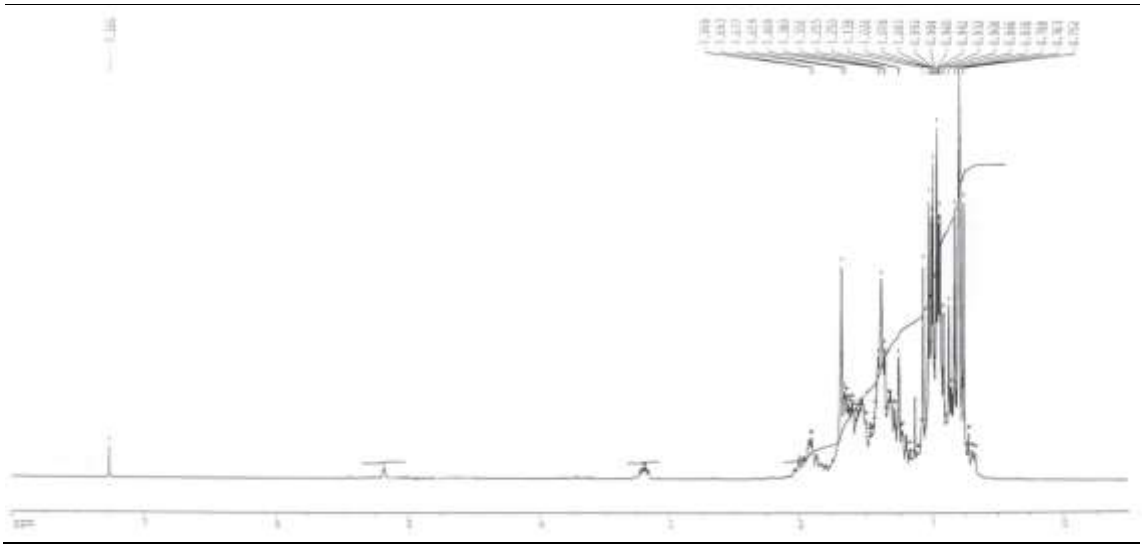


Espectro de ^{13}C-NMR da α-Amirina (*2.2.3-3*).

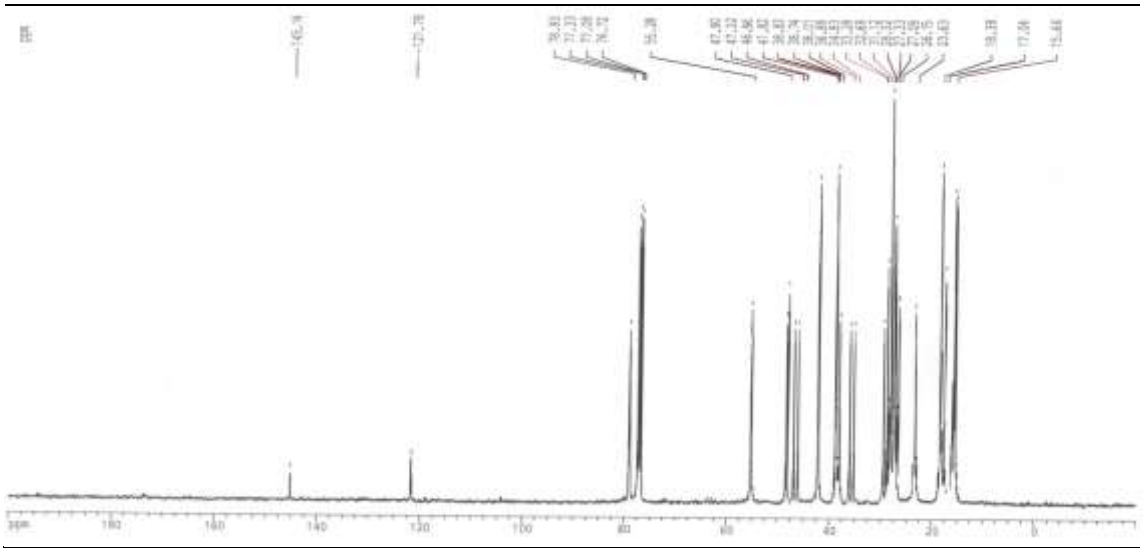
Composto - *2.2.3-4*	***β-Amirina*** - $C_{30}H_{50}O$ (M=426) olean-12-en-3β-ol
p.f. (ºC)	195 - 197
$[\alpha]_D$	+ 88,0º (c=1, $CHCl_3$), T = 20 ºC
IV $\nu^{CHCl_3}_{máx.}$ (cm^{-1})	3435, 2927, 1687
MS *m/z* (int.rel.%)	426[M^+](9), 411(3), 408(19), 218(100), 207(7), 205(15), 204(12), 203(29), 191(8), 189(12), 175(8), 161(5), 147(8), 135(13), 133(13), 123(10), 121(10), 109(21), 107(19), 95(35), 81(32), 69(26), 57(11), 55(27)
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)	0.788 (3H, *s,* H-24), 0.826 (3H, *s*, H-28), 0.866 (6H, *s*, H-29, H-30), 0.932 (3H, *s,* H-25), 0.960 (3H, *s,* H-23), 0.992 (3H, *s,* H-26), 1.128 (3H, *s,* H-27), 3.220 (1H, *m,* H-3α), 5.185 (1H, *t, J* = 4 Hz, H-12)
^{13}C-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)	C-1 (38.74), C-2 (27.33), C-3 (78.93), C-4 (38.83), C-5 (55.28), C-6 (18.38), C-7 (32.68), C-8 (38.83), C-9 (47.90), C-10 (36.88), C-11 (23.63), C-12 (121.78), C-13 (145.19), C-14 (41.82), C-15 (26.15), C-16 (27.08), C-17 (32.68), C-18 (47.32), C-19 (46.86), C-20 (31.12), C-21 (34.83), C-22 (38.01), C-23 (28.32), C-24 (15.64), C-25 (15.64), C-26 (17.04), C-27 (26.15), C-28 (28.32), C-29 (33.28), C-30 (23.63)



Espectro de massa da β-Amirina (*2.2.3-4*).

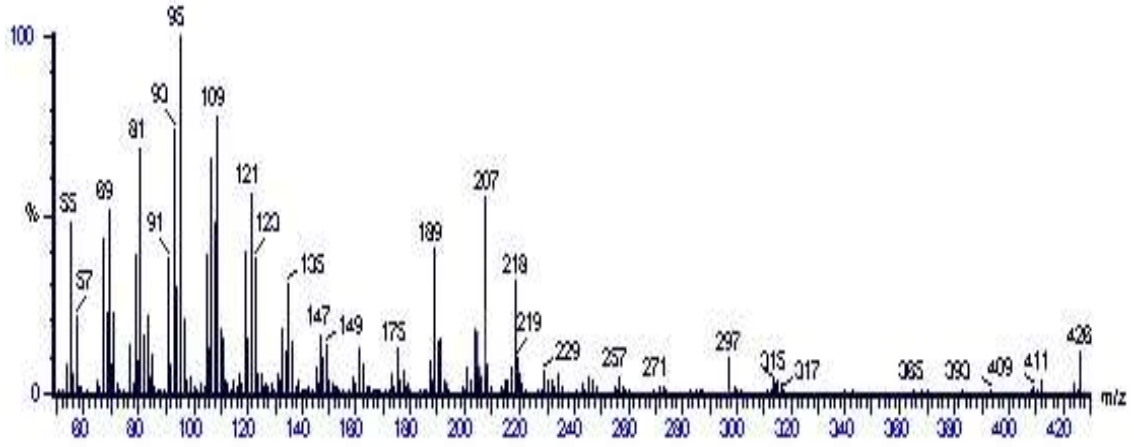


Espectro de ^{1}H-NMR da β-Amirina (*2.2.3-4*).

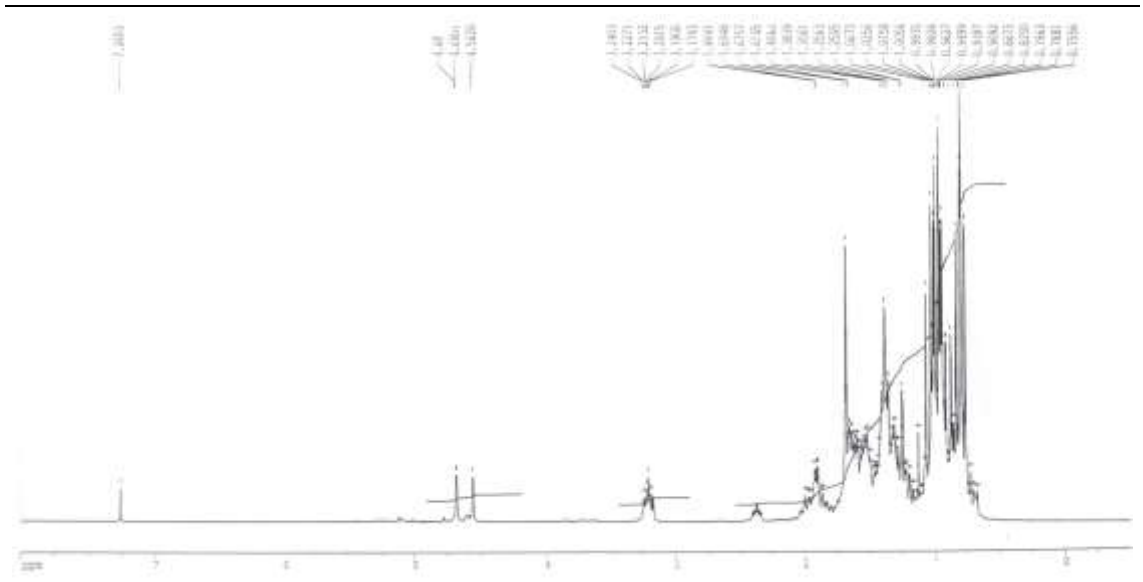


Espectro de ^{13}C-NMR da β-Amirina (*2.2.3-4*).

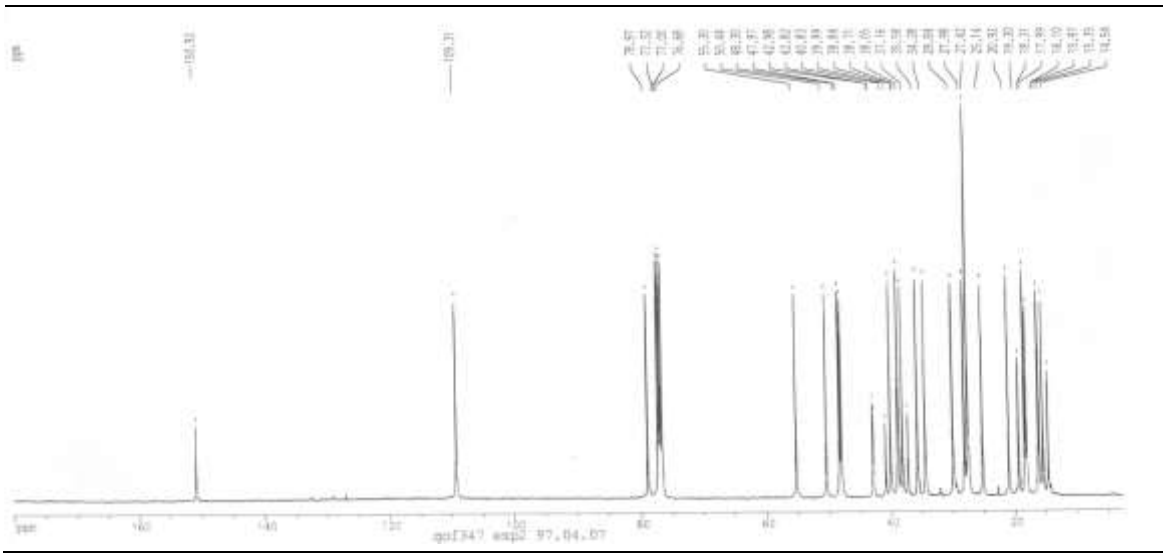
Composto - *2.2.3-5*	***Lupeol*** - $C_{30}H_{50}O$ (M=426) Lup-20(29)-en-3β-ol
p.f. (ºC)	211 – 214 ($CHCl_3$-MeOH)
$[\alpha]_D$	+ 27º (c=5, $CHCl_3$), T = 20 ºC
IV $\nu^{CHCl_3}_{máx.}$ (cm^{-1})	3610, 3370, 3080, 1650, 1645, 1383 (dimetilo geminal) 1032 (OH), 883 (metileno terminal), 880
MS *m/z* (int.rel.%)	426(M^+)(15), 411(6), 408(15), 365(4), 297(14), 229(8), 218(35), 207(56), 205(11), 189(44), 175(12), 161(11), 149(12), 135(30), 121(58), 109(79), 95(100), 81(72), 69(53), 57(22), 55(48)
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)	0.788 (3H, *s*), 0.796 (3H, s), 0.825 (3H, *s*), 0.949 (3H, *s*), 0.983 (3H, *s*), 1.026 (3H, *s*), 1.676 (3H, *s*, C=C-Me), 2.331 (1H, ddd, *J*=11.0, 11.0, 5.4 Hz, C_{19}-H), 3.190 (1H, *dd*, *J*=10.0, 5.8 Hz, $C_{3\alpha}$-H), 4.562, 4.680 (cada 1H, *br s*, -C=CH_2, H-29, H-29')
^{13}C-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)	C-1 (38.71), C-2 (27.42), C-3 (78.92), C-4 (38.84), C-5 (55.30), C-6 (18.31), C-7 (34.28), C-8 (40.83), C-9 (50.44), C-10 (37.16), C-11 (20.92), C-12 (25.14), C-13 (38.05), C-14 (42.82), C-15 (27.42), C-16 (35.58), C-17 (42.98), C-18 (48.30), C-19 (47.97), C-20 (150.92), C-21 (29.84), C-22 (39.99), C-23 (27.98), C-24 (15.35), C-25 (16.10), C-26 (15.97), C-27 (14.54), C-28 (17.99), C-29 (109.31), C-30 (19.30)



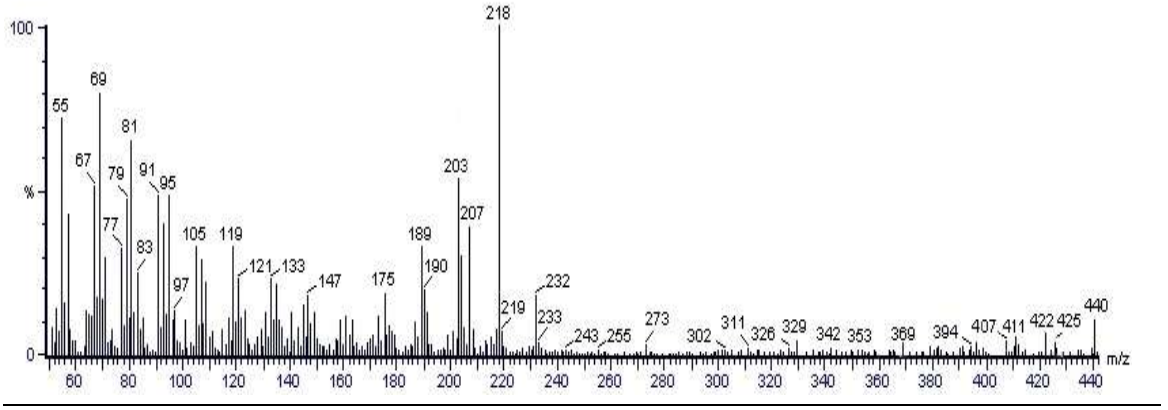
Espectro de massa do Lupeol (*2.2.3-5*).



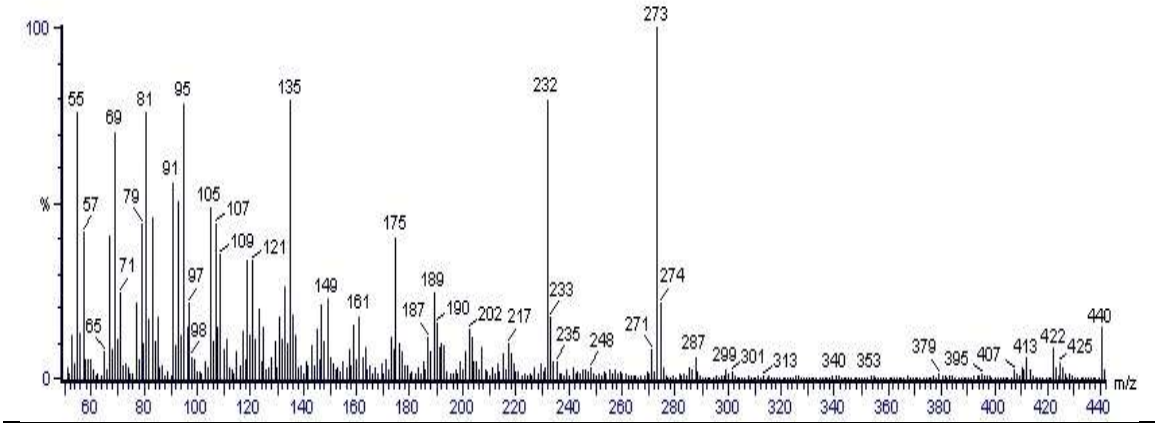
Espectro de ^{1}H-NMR do Lupeol (*2.2.3-5*).



Espectro de ^{13}C-NMR do Lupeol (*2.2.3-5*).

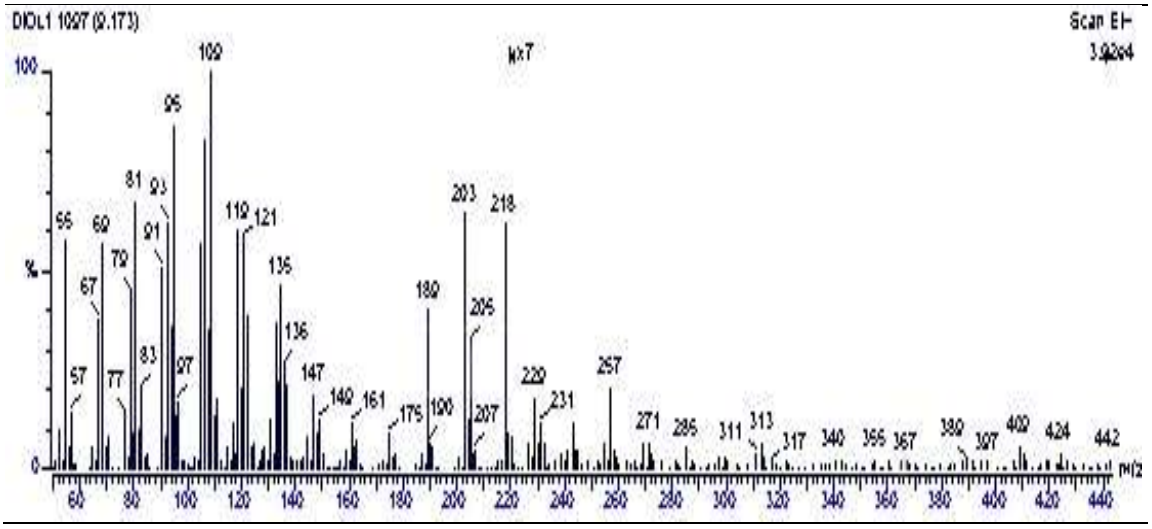


Espectro de massa do Aldeído Ursólico, (*2.2.3-6*).

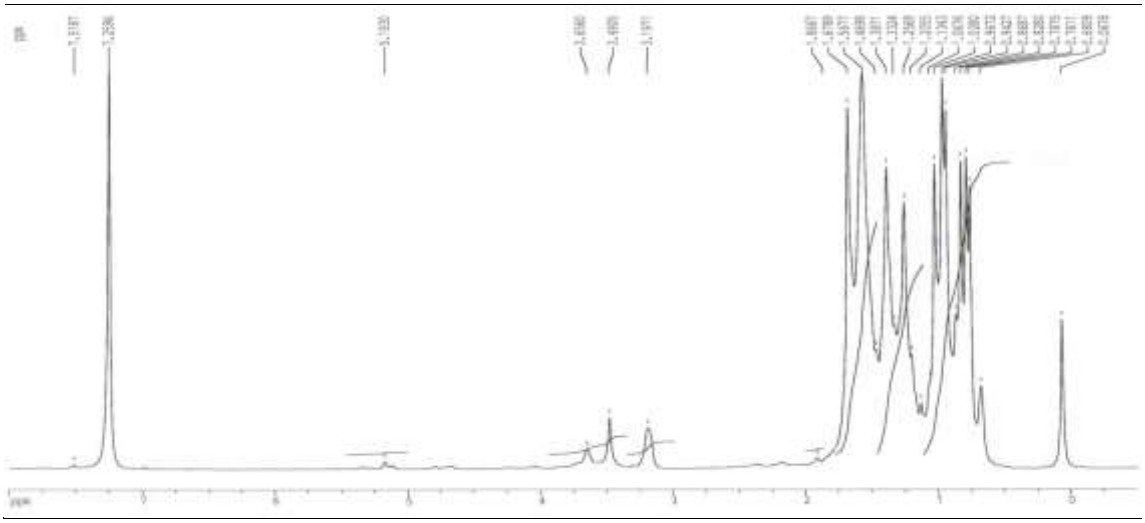


Espectro de massa do α-Amirenonol (*2.2.3-7*).

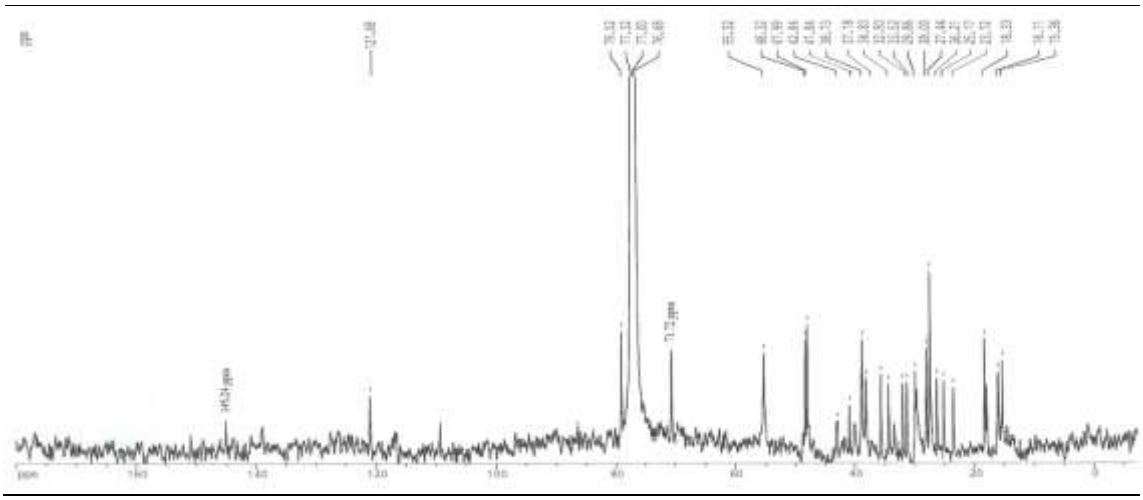
Composto - *2.2.3-8*	***Olean-12-en-3β,23-diol*** - $C_{30}H_{50}O_2$ (M=442)
p.f. (ºC)	247 - 251
IV $\nu^{CHCl_3}{}_{máx.}$ (cm^{-1})	3600-3100, 2918.6, 2850, 1635.9, 1258.9, 800
MS *m/z* (int.rel.%)	442[M^+](0.3), 424[M^+-18] (1), 409[M^+-15-18] (2), 408(1), 389(1), 355(0.5), 313(2), 285(2), 271(2), 257(5), 243(3), 231(3), 229(4), 223(<1), 218(64), 205(34), 203(66), 189(41), 175(9), 161(13), 149(14), 147(28), 135(47), 121(60), 119(61), 109(100), 107(84), 95(87), 93(63), 81(67), 69(56), 55(57)
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)	0.828 (3H, s, H-28), 0.868 (3H, s, H-25), 0.868 (3H, s, H-29), 0.868 (3H, s, H-30), 0.943 (3H, s, H-26), 1.134 (3H, s, H-27), 1.236 (3H, s, H-24), 3.197 (1H, s, *br*, H-23), 3.491 (1H, s, *br,* H-3α), 3.656 (1H, s, *br,* H-23'), 5.183 (1H, t, *J* = 4 Hz*,* H-12),
^{13}C-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)	C-1 (38.73), C-2 (27.44), C-3 (79.02), C-4 (42.84), C-5 (55.32), C-6 (18.33), C-7 (32.80), C-8 (38.73), C-9 (48.32), C-10 (37.18), C-11 (23.60), C-12 (121.68), C-13 (145.24), C-14 (41.84), C-15 (26.21), C-16 (27.44), C-17 (32.52), C-18 (47.99), C-19 (47.99), C-20 (29.86), C-21 (34.80), C-22 (37.18), C-23 (71.72), C-24 (23.60), C-25 (15.36), C-26 (16.11), C-27 (25.17), C-28 (28.00), C-29 (34.80), C-30 (23.72)



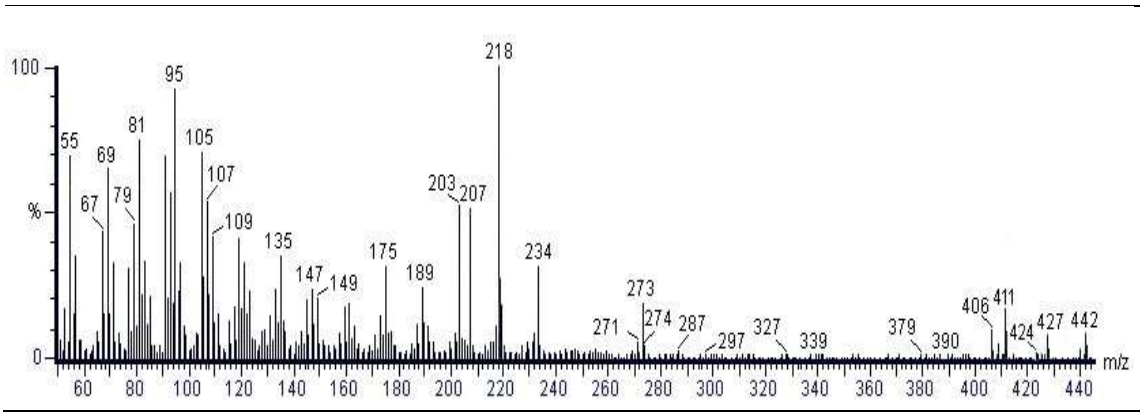
Espectro de massa do Olean-12-en-3β,23-diol (*2.2.3-8*).



Espectro de ^{1}H-NMR Olean-12-en-3β,23-diol (*2.2.3-8*).

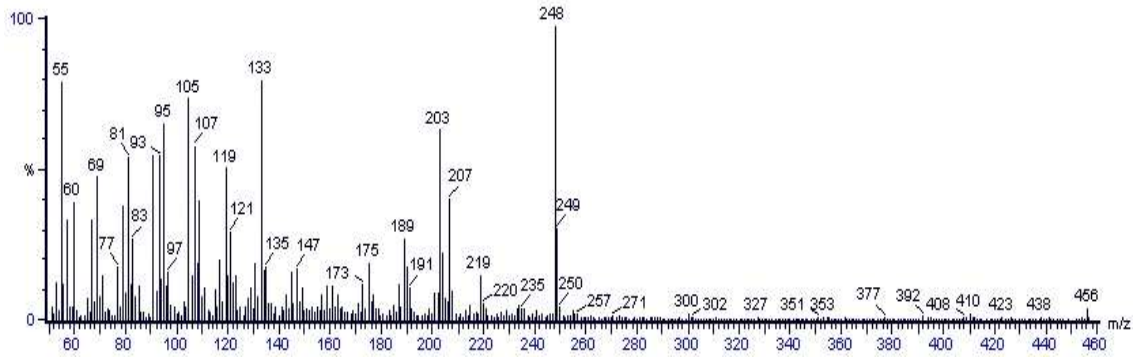


Espectro de ^{13}C-NMR do Olean-12-en-3β,23-diol (*2.2.3-8*).

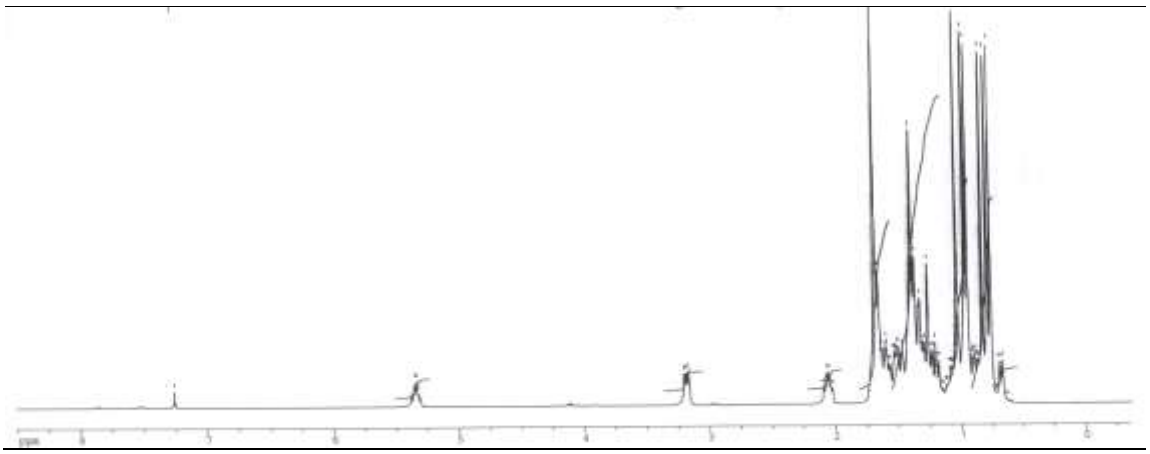


Espectro de massa do Urs-12-en-3β,28-diol (Uvaol, *2.2.3-9*).

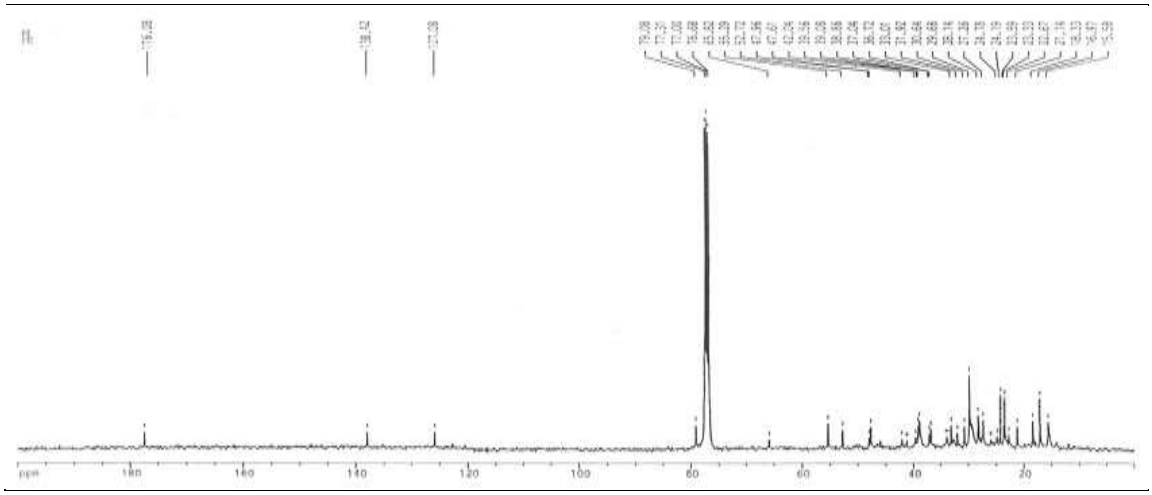
Composto - *2.2.3-10*	***Ácido Ursólico*** - $C_{30}H_{48}O_3$ (M=456) Ácido 3β-Hidroxi-urs-12-en-28-óico
p.f. (ºC)	283 - 287
$[\alpha]_D$	+ 65º (c=1, EtOH), T = 20 ºC
IV $\nu^{CHCl_3}{}_{máx.}$ (cm^{-1})	3600 – 3200 (3434), 2926, 1693, 1645, 1450, 1384
MS *m/z* (int.rel.%)	456[M+](4), 438,(1), 436(1), 423(1), 392(3), 377(2), 351(1), 301(1), 249(31), 248(100), 233(6), 219(17), 207(43), 203(69), 189(29), 175(18), 161(13), 147(18), 133(81), 121(30), 119(51), 105(75), 95(64), 81(53), 69(48), 55(79)
^{1}H-NMR δ (ppm)	0.78, 0.82, 0.91, 0.96 e 1.07 (3H cada), 0.86 e 0.94 (3H cada, d, *J* = 7.0 Hz), 2.19 (1H, m, C_{18}-H), 3.20 (1H, dd, *J* = 7.0, 8.5 Hz, $C_{3\alpha}$-H), 5.42 (1H, t, *J* = 3.5 Hz, C_{12}-H)
^{13}C-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)	C-1 (38.86), C-2 (23.59), C-3 (79.08), C-4 (39.56), C-5 (52.72), C-6 (18.33), C-7 (33.01), C-8 (39.08), C-9 (47.62), C-10 (36.72), C-11 (23.59), C-12 (127.08), C-13 (138.42), C-14 (42.04), C-15 (29.68), C-16 (23.33), C-17 (47.96), C-18 (55.29), C-19 (30.64), C-20 (30.46), C-21 (27.26), C-22 (37.04), C-23 (23.33), C-24 (16.97), C-25 (16.97), C-26 (15.58), C-27 (24.19), C-28 (176.08), C-29 (21.14), C-30 (23.67)



Espectro de massa do Ácido Ursólico (*2.2.3-10*).

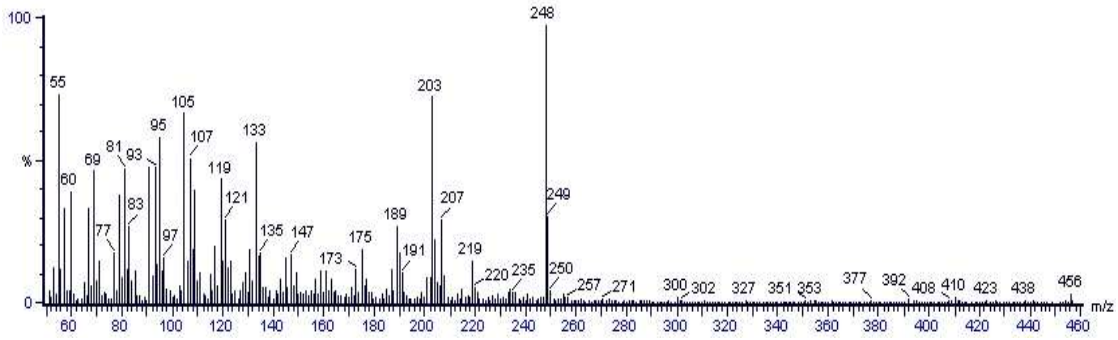


Espectro de ^{1}H-NMR do Ácido Ursólico (*2.2.3-10*).

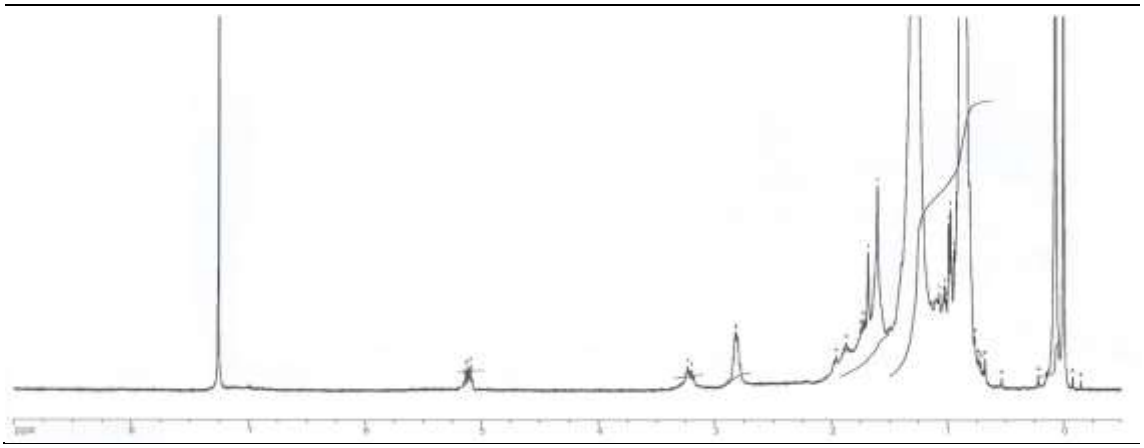


Espectro de ^{13}C-NMR do Ácido Ursólico (*2.2.3-10*).

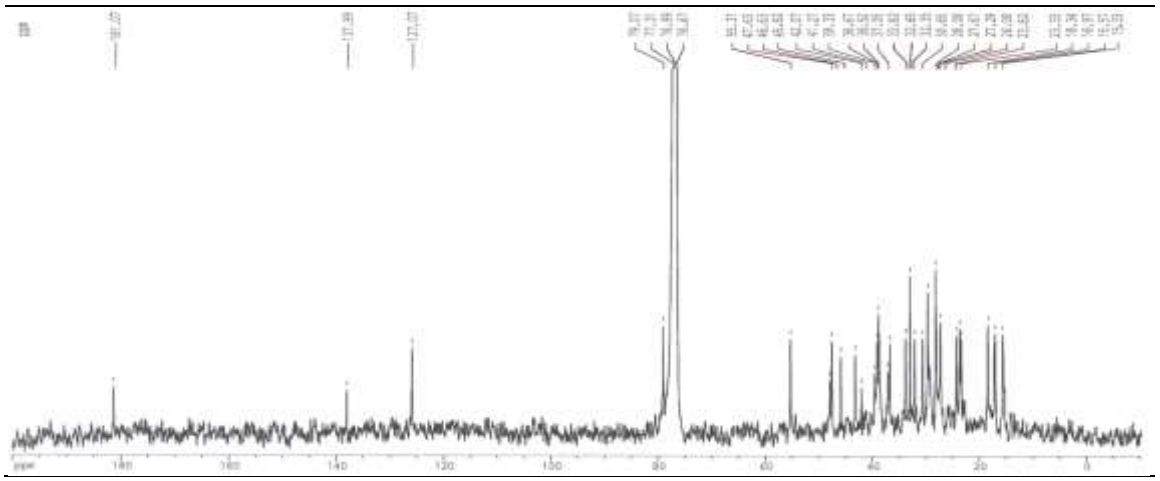
Composto - *2.2.3-11*	***Ácido Oleanólico*** - $C_{30}H_{48}O_3$ (M=456) Ácido 3β-Hidroxi-olean-12-en-28-óico
p.f. (ºC)	305 – 308
$[\alpha]_D$	+ 82.3º (c=0.6, $CHCl_3$), T = 20 ºC
IV ν^{CHCl_3} máx. (cm^{-1})	3600 – 3200(3435), 2926, 1705, 1687, 1457
MS *m/z* (int.rel.%)	456[M$^+$](4), 438,(1), 423(1), 392(3), 377(2), 351(1), 301(1), 249(30), 248(100), 233(7), 219(30), 207(30), 203(74), 189(28), 175(18), 161(13), 147(18), 133(54), 121(30), 119(46), 105(67), 95(59), 81(48), 69(47), 55(74)
^{1}H-NMR δ (ppm)	0.74, 0.76, 0.89, 0.90, 0.92, 0.98 e 1.15 (3H cada), 2.80 (1H, dd, *J* = 13.8, 4.2 Hz, C_{18}-H), 3.24 (1H, dd, *J* = 7.0, 9.0 Hz, $C_{3\alpha}$-H), 5.21 (1H, t, *J* = 3.3 Hz, C_{12}-H)
^{13}C-NMR δ (ppm)	C-1 (38.52), C-2 (27.29), C-3 (79.07), C-4 (38.67), C-5 (55.31), C-6 (18.34), C-7 (32.65), C-8 (39.33), C-9 (47.63), C-10 (37.05), C-11 (23.82), C-12 (122.82), C-13 (145.05), C-14 (42.07), C-15 (27.67), C-16 (23.33), C-17 (46.63), C-18 (41.27), C-19 (45.82), C-20 (30.65), C-21 (33.82), C-22 (32.35), C-23 (28.08), C-24 (15.57), C-25 (15.33), C-26 (16.97), C-27 (26.08), C-28 (181.07), C-29 (32.65), C-30 (23.82)



Espectro de massa do Ácido Oleanólico (*2.2.3-11*).

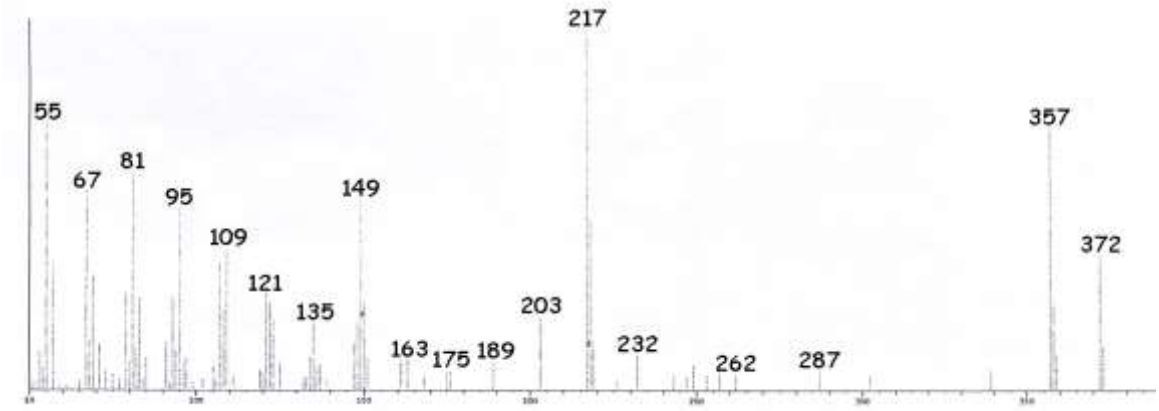


Espectro de ^{1}H-NMR do Ácido Oleanólico (*2.2.3-11*).



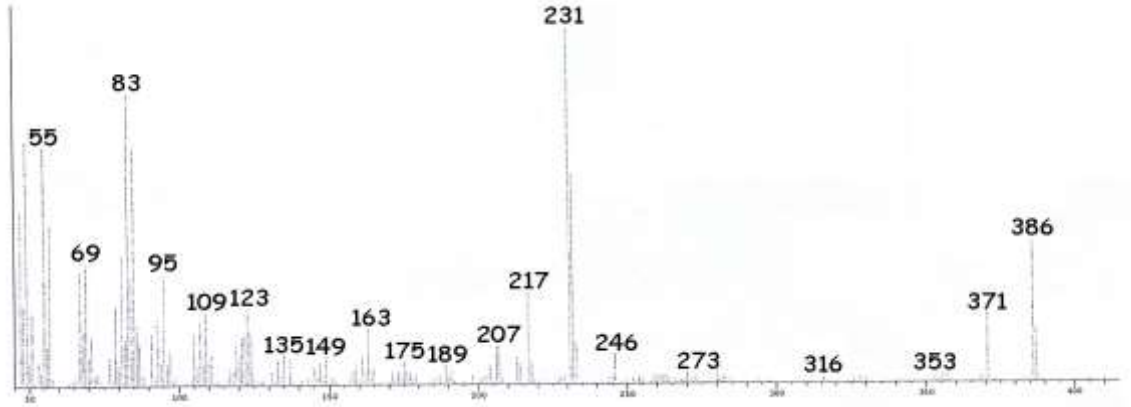
Espectro de ^{13}C-NMR do Ácido Oleanólico (*2.2.3-11*).

Triterpenos Tetracíclicos

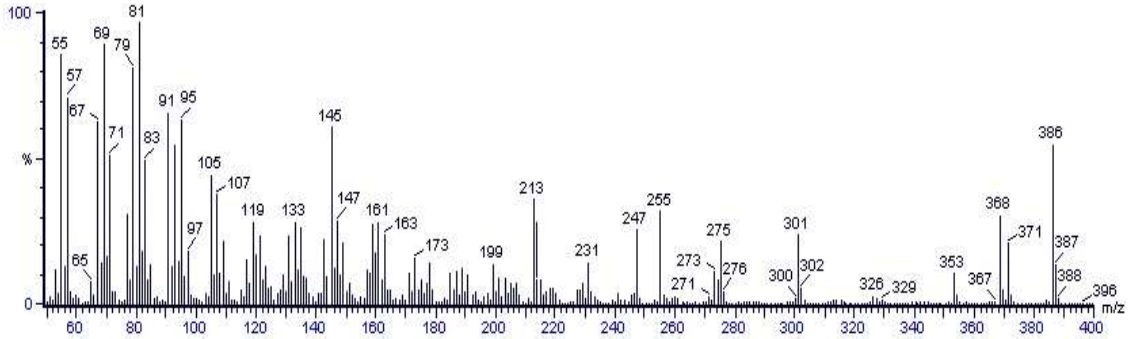


Espectro de massa do 5α-Colestano (*2.2.4-1*).

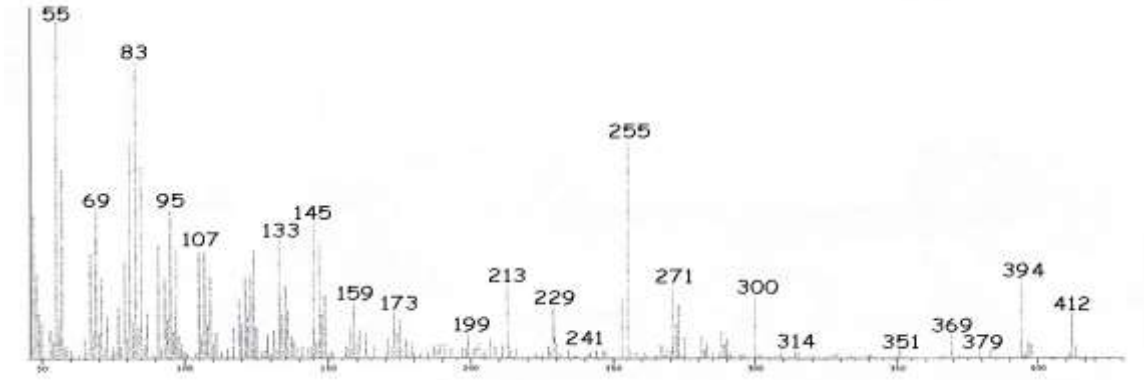
\



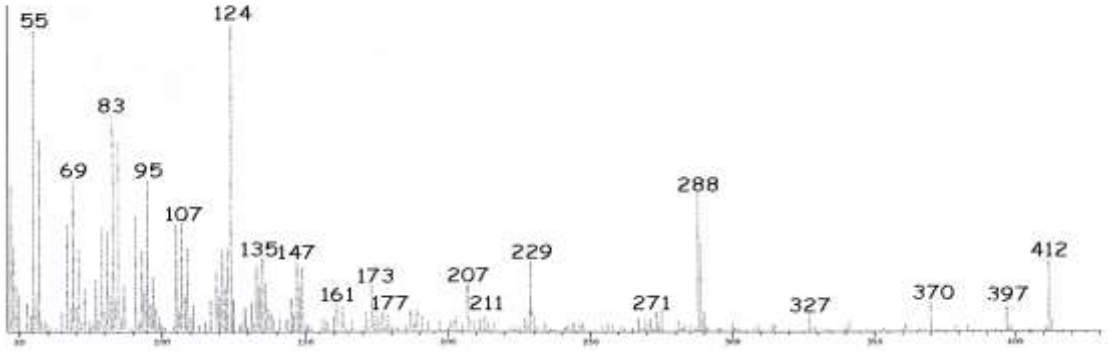
Espectro de massa da Colestan-3-ona (*2.2.4-2*).



Espectro de massa do Colest-5-en-3β-ol (*2.2.4-3*).

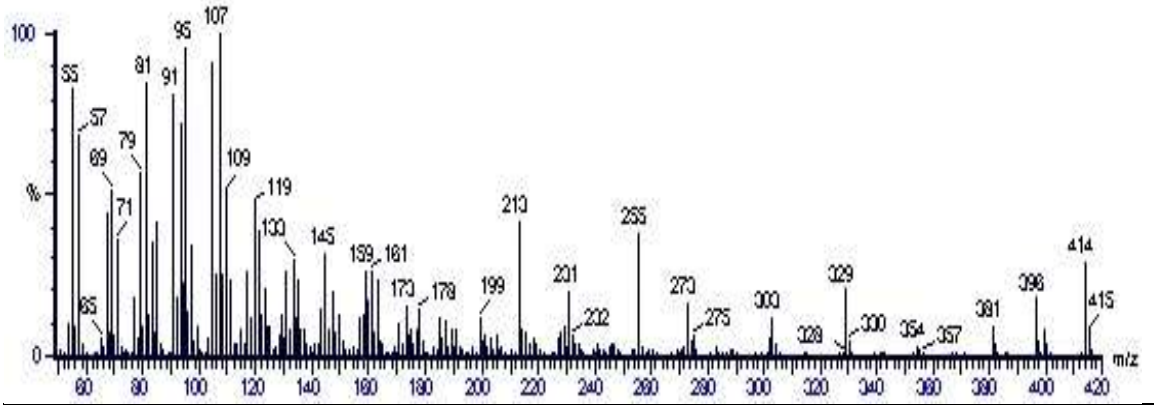


Espectro de massa do Estigmasterol (*2.2.4-4*).

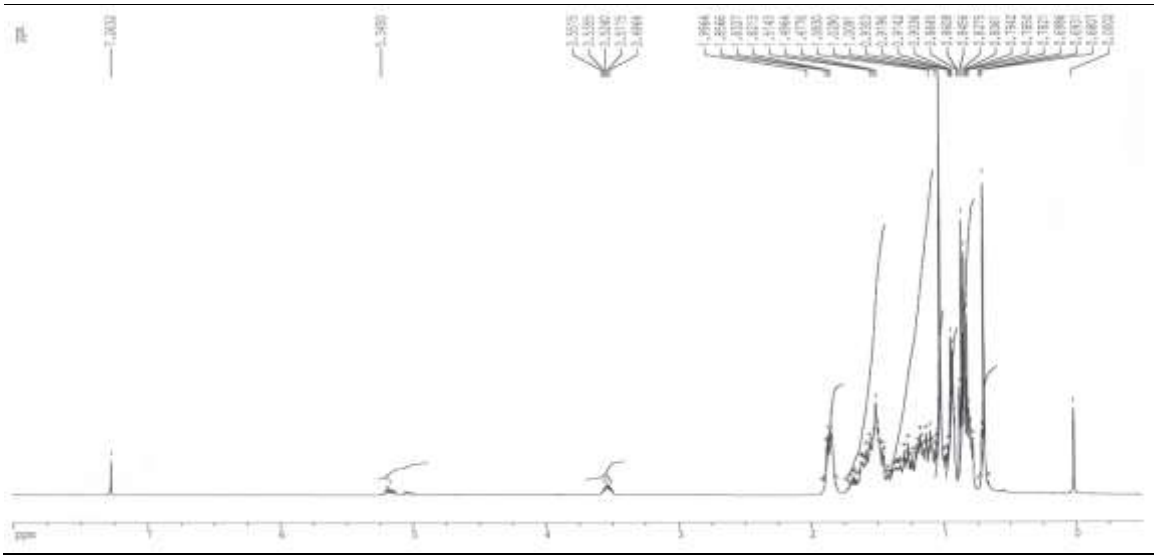


Espectro de massa da Estigmast-4-en-3-ona (*2.2.4-5*).

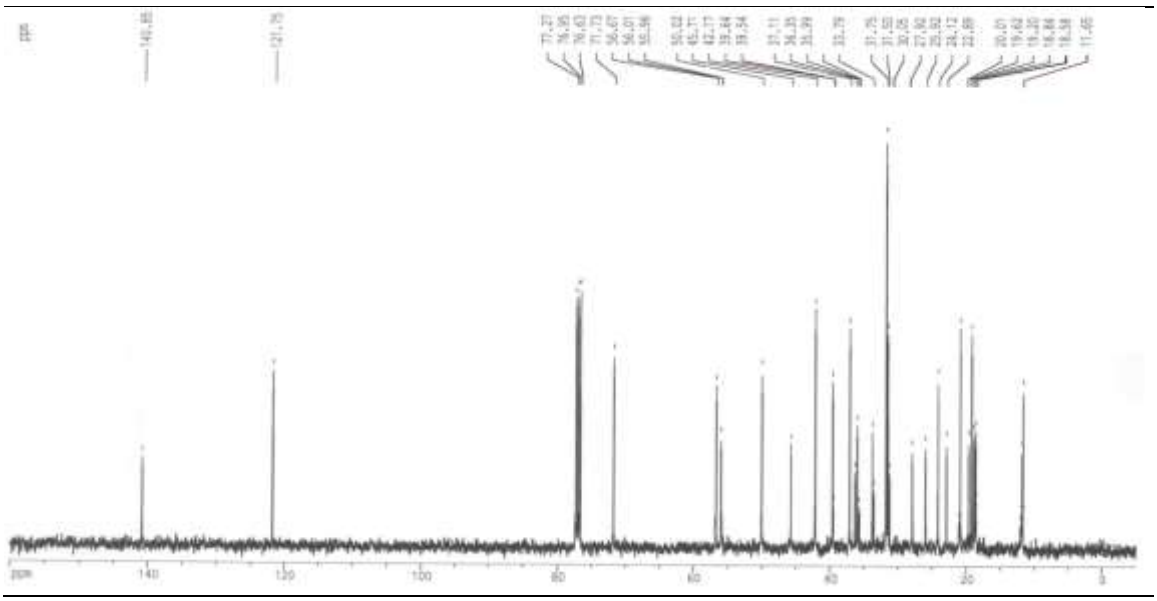
Composto - *2.2.4-6*	***β-Sitosterol*** - $C_{29}H_{50}O$ (M=414) Estigmast-5-en-3β-ol
p.f. (ºC)	135 – 138 (MeOH)
$[\alpha]_D$	- 34.5º (c=1, $CHCl_3$), T = 22 ºC
IV $\nu^{KBr}_{máx.}$ (cm^{-1})	3550 - 3250 (OH), 2934, 2825, 1632, 1465, 1384, 1377, 1367, 1058, 1042, 840, 800.
MS *m/z* (int.rel.%)	414[M^+](32), 399(10), 396(21), 381(12), 329(21), 309(15), 303(15), 275(8), 273(19), 255(41), 231(22), 213(43), 163(23), 161(27), 159(26), 145(35), 107(100), 105(91), 95(95), 93(73), 91(84), 81(86), 69(54), 57(68), 55(84)
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)	0.681 (3H, *s,* H-18), 0.806 (3H, *d,* H-27), 0.827 (3H, *d,* H-26), 0.845 (3H, s, *br* H-29), 0.930 (3H, *d,* H-21), 1.009 (3H, *s,* H-19), 3.524 (1H, *m*, H-3α), 5.345 (1H, *m*, H-6);
^{13}C-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)	C-1 (37.11), C-2 (31.50), C-3 (71.73), C-4 (42.17), C-5 (140.85), C-6 (121.75), C-7 (31.75), C-8 (56.01), C-9 (50.02), C-10 (36.35), C-11 (20.01), C-12 (39.64), C-13 (42.17), C-14 (56.67), C-15 (24.12), C-16 (27.92), C-17 (55.96), C-18 (11.65), C-19 (19.20), C-20 (35.99), C-21 (18.84), C-22 (33.79), C-23 (25.92), C-24 (45.71), C-25 (30.05), C-26 (16.62), C-27 (18.58), C-28 (22.89), C-29 (11.65)



Espectro de massa do β-Sitosterol (*2.2.4-6*).



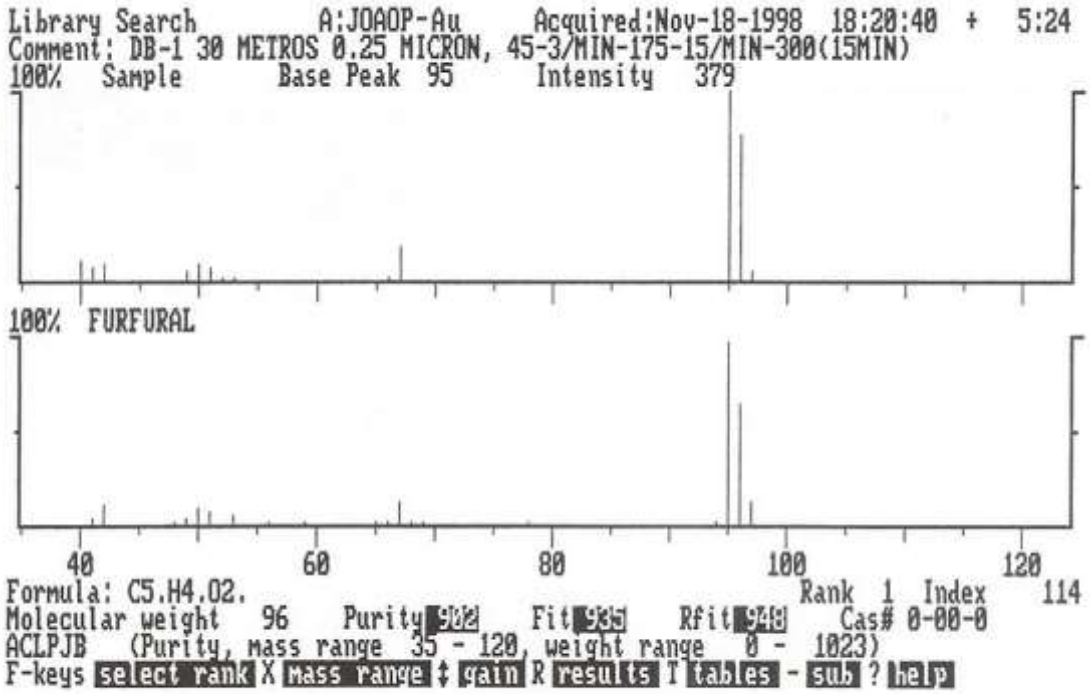
Espectro de ^{1}H-NMR do β-Sitosterol (*2.2.4-6*).



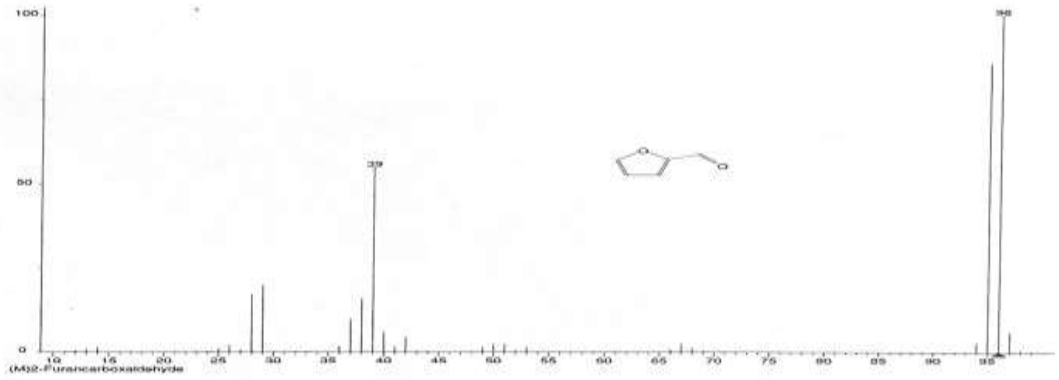
Espectro de ^{13}C-NMR do β-Sitosterol (*2.2.4-6*).

APÊNDICE - 2A
COMPOSTOS DE PEQUENA MASSA MOLECULAR E BAIXO PONTO DE EBULIÇÃO

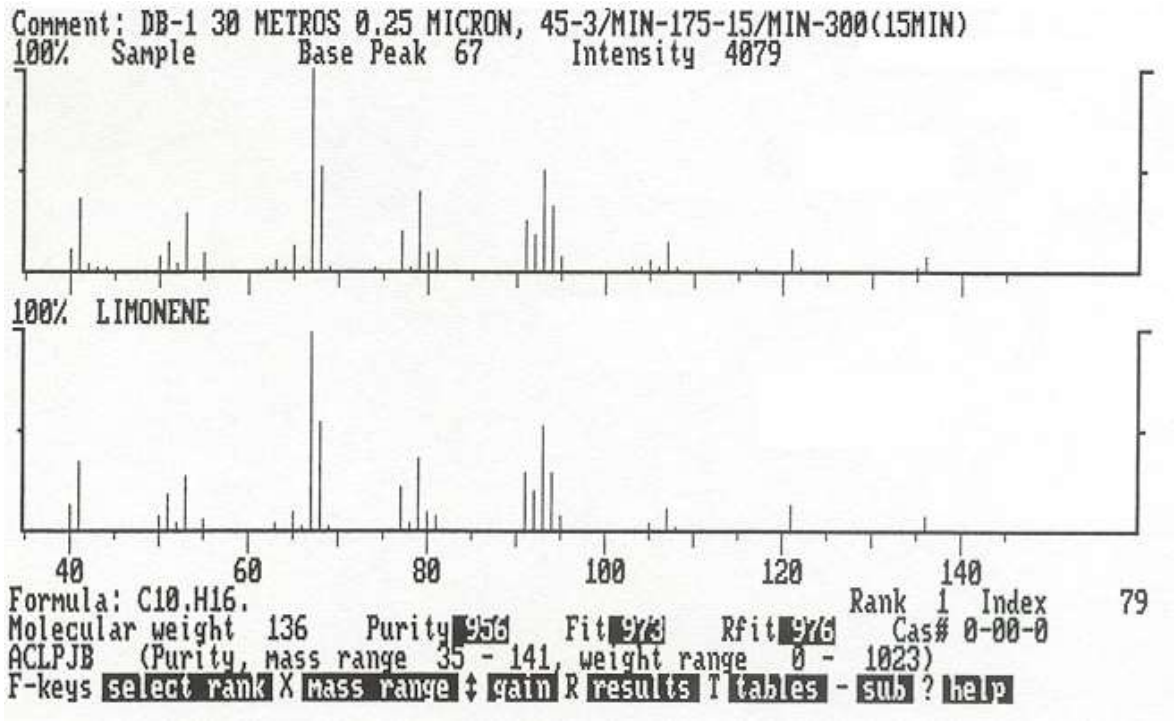
2-FURFURAL



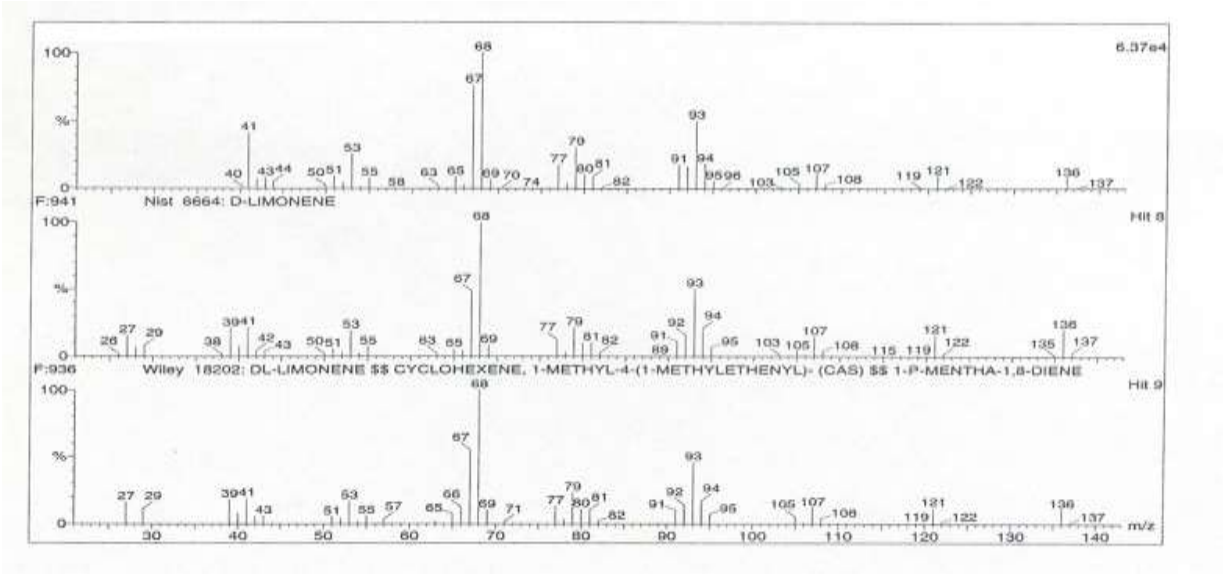
Espectro de Quadropólo



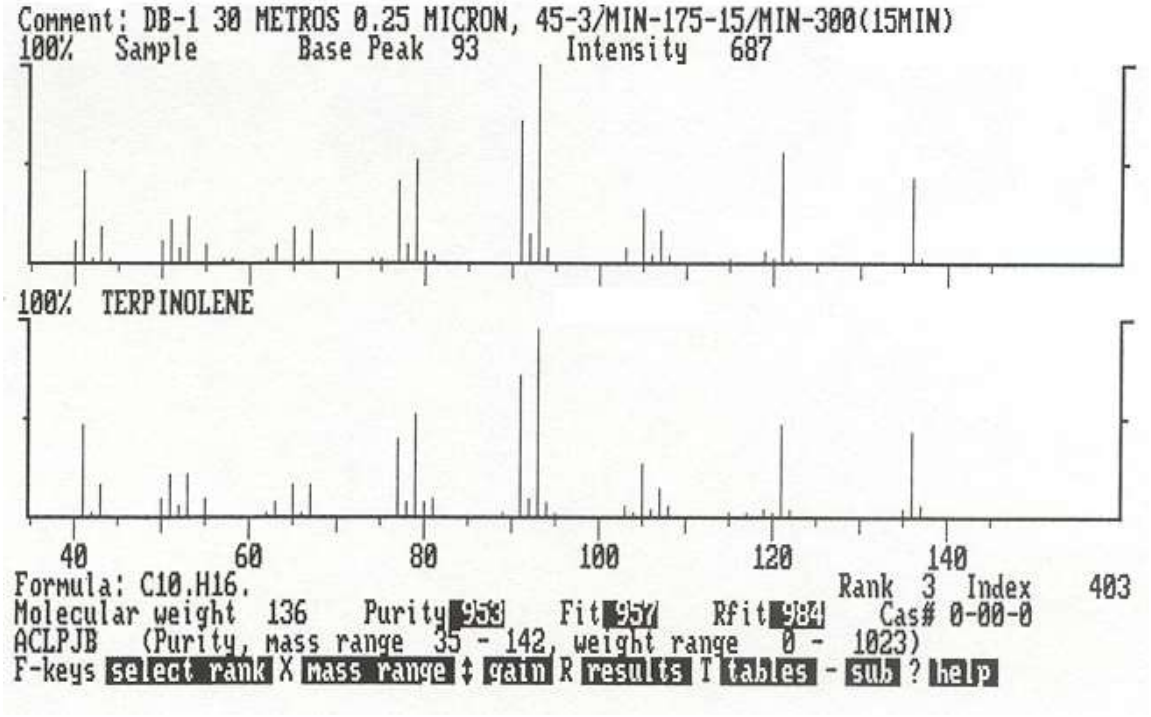
LIMONENO



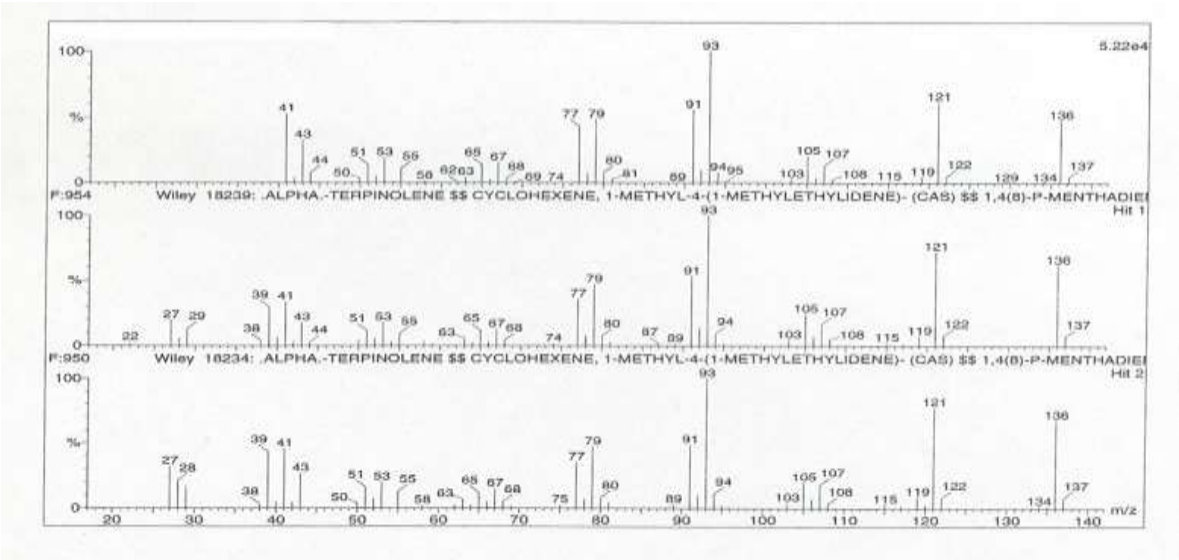
Espectros de Quadropólo



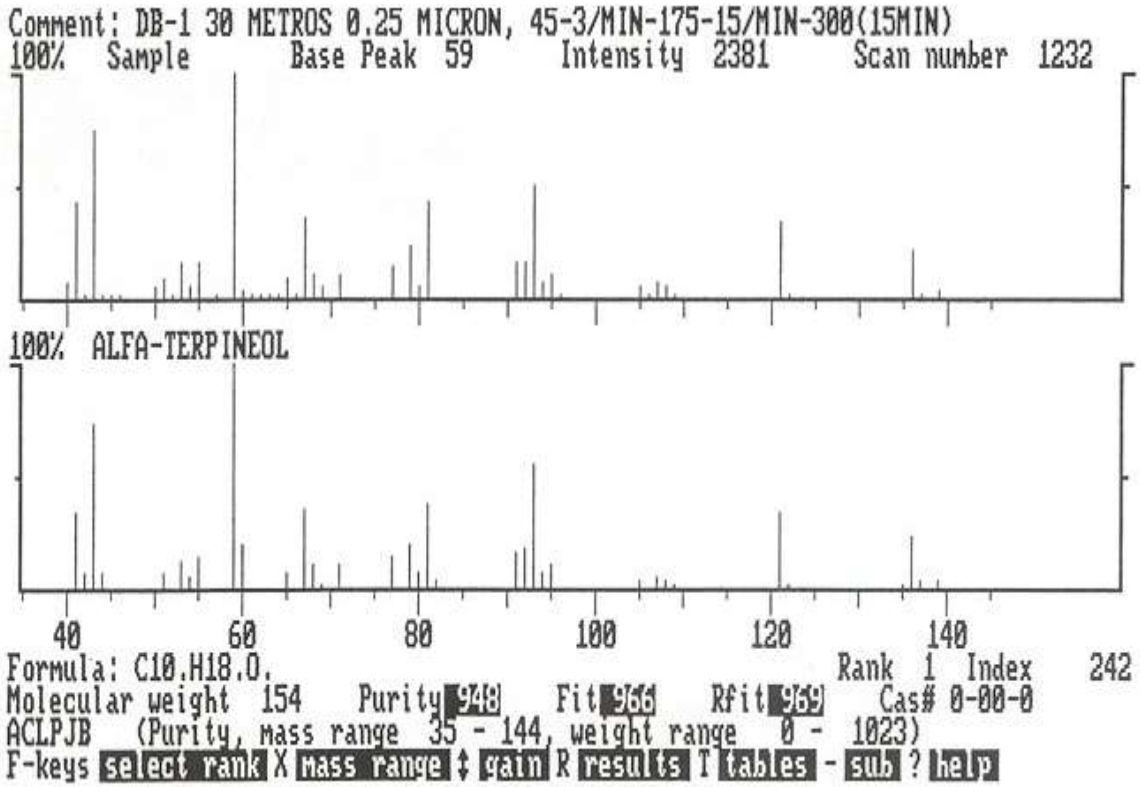
TERPINOLENO



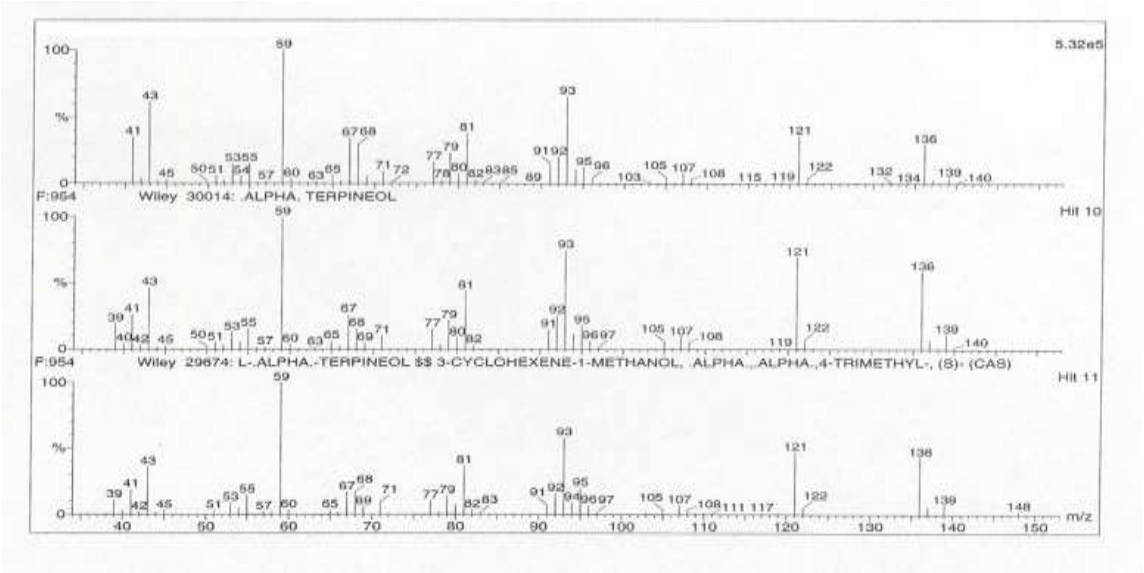
Espectros de Quadropólo



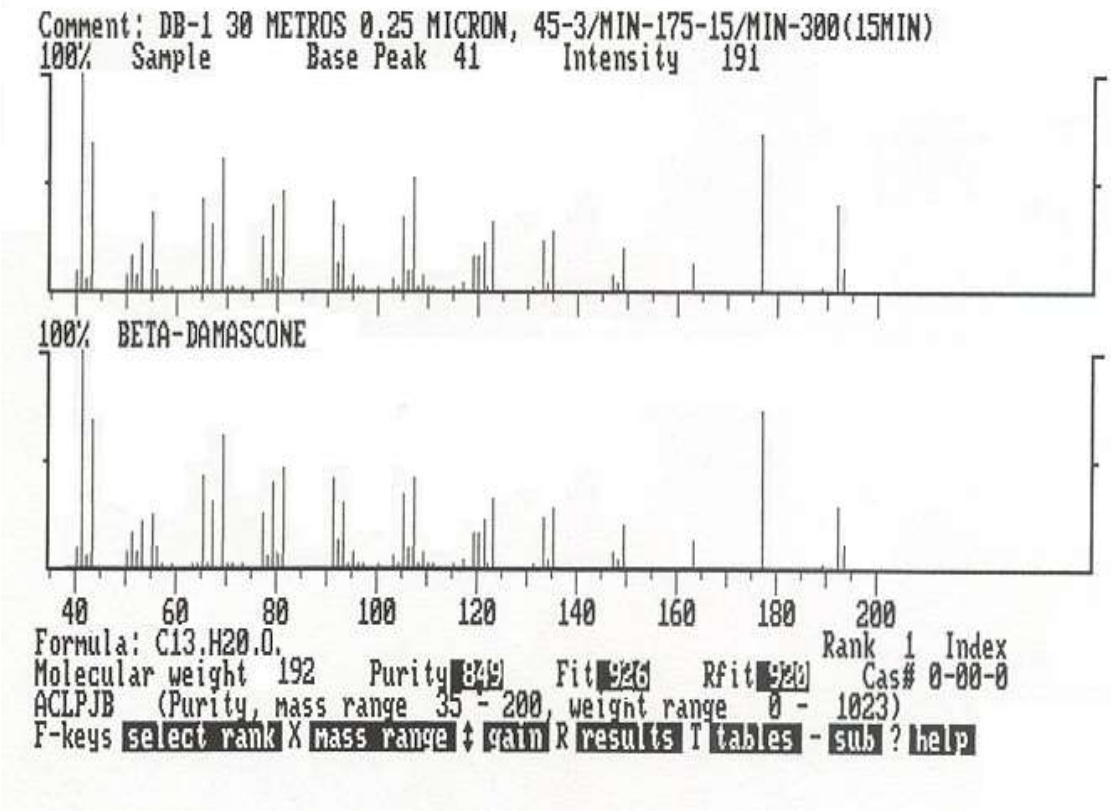
α- TERPINEOL



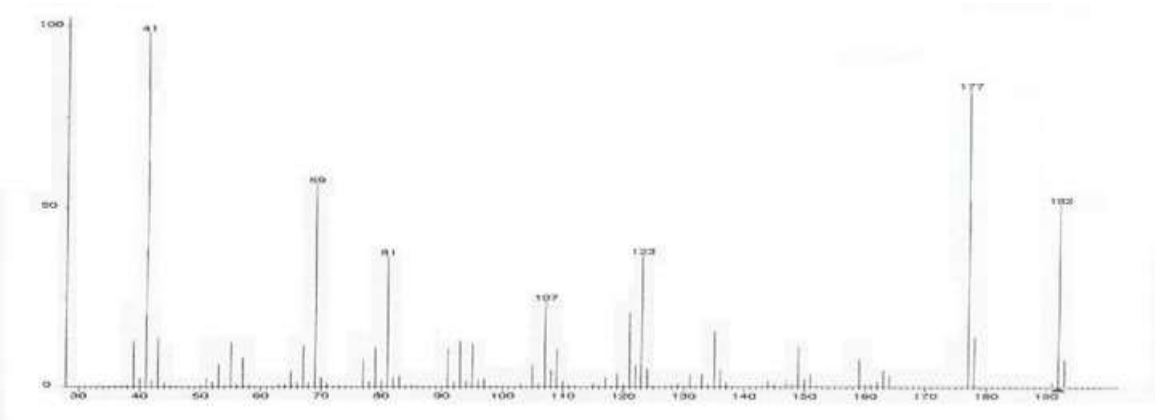
Espectros de Quadropólo



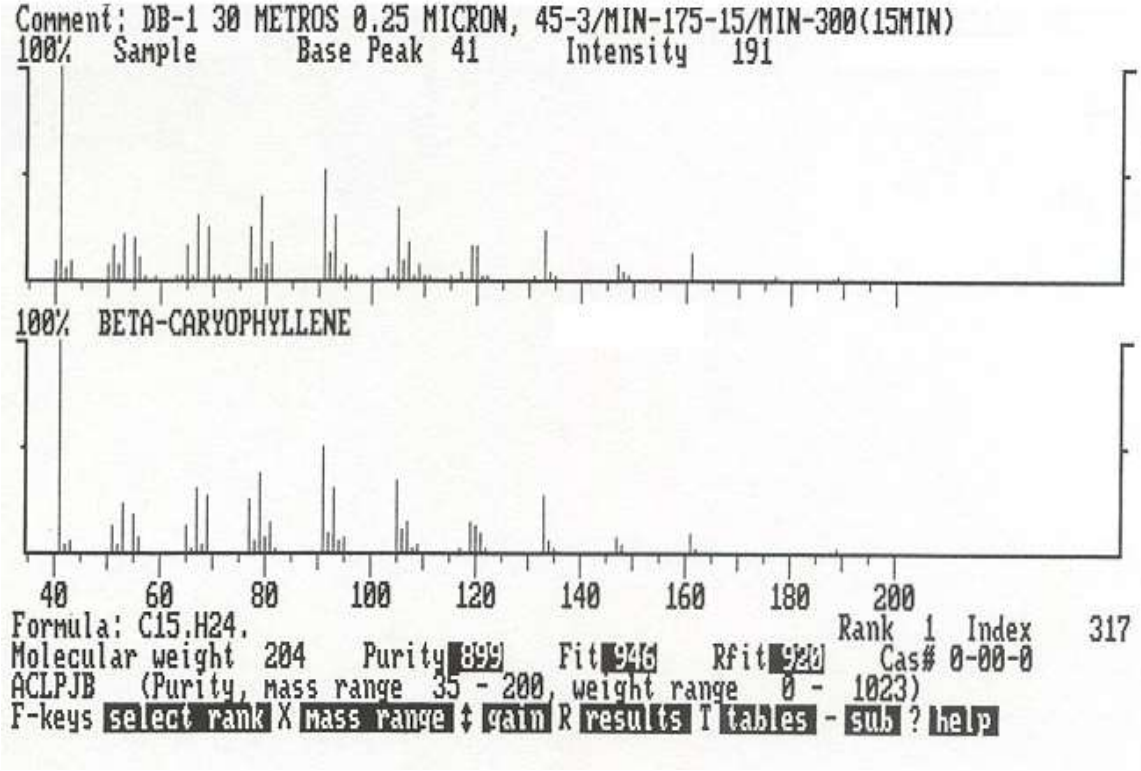
β-DAMASCONA



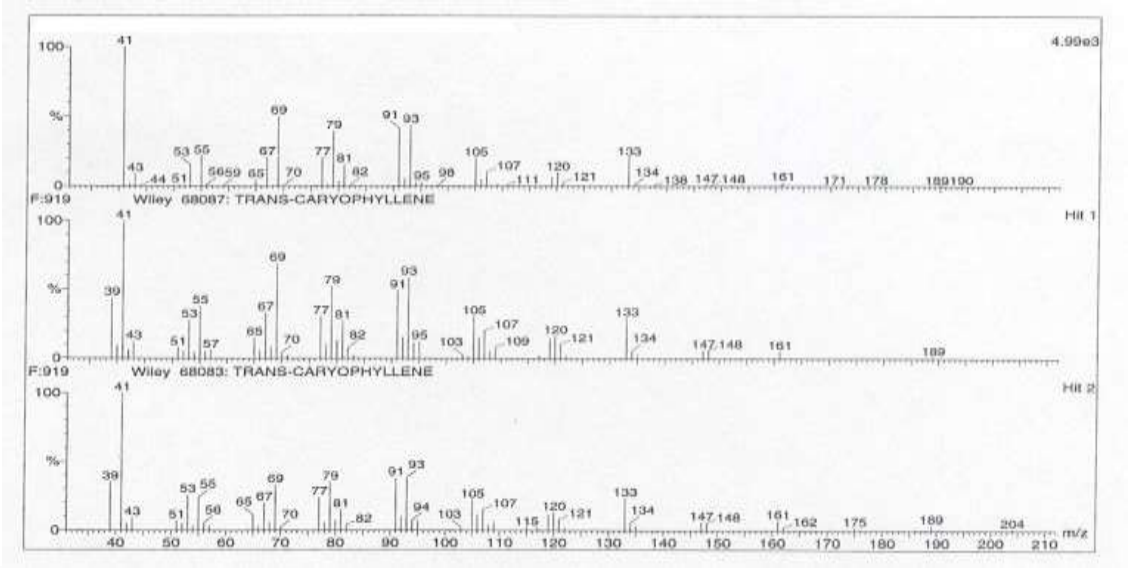
Espectro de Quadropólo



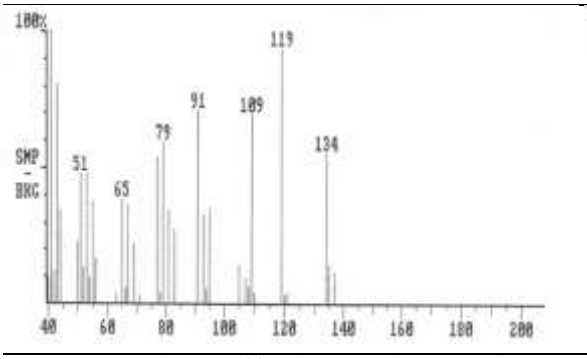
β-CARIOFILENO



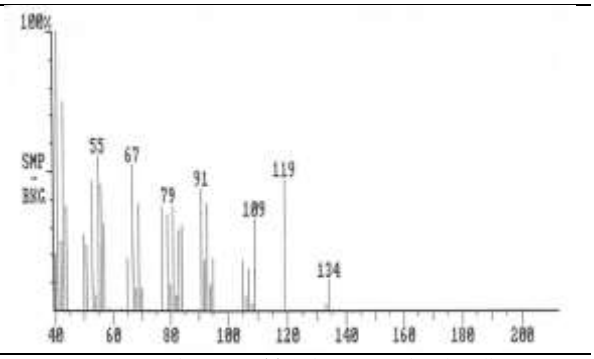
Espectros de Quadropólo



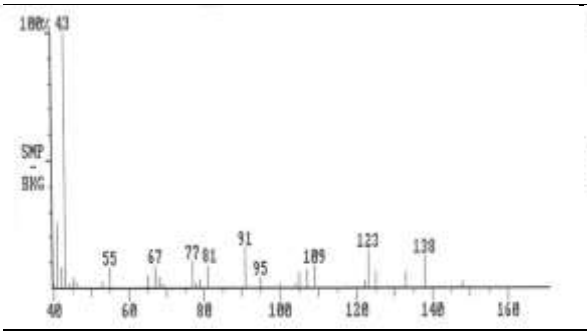
APÊNDICE - 2B
COMPOSTOS DE PEQUENA MASSA MOLECULAR E BAIXO PONTO DE EBULIÇÃO



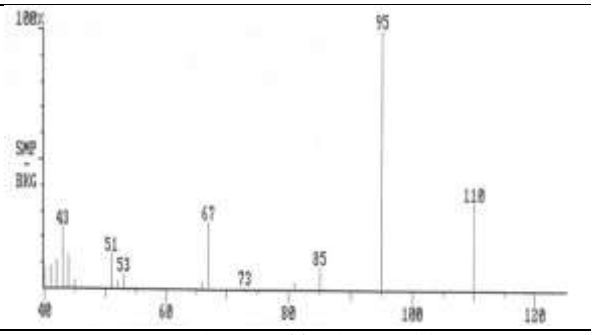
Espectro de massa (ITD) do Acetato de *cis*-Verbenilo



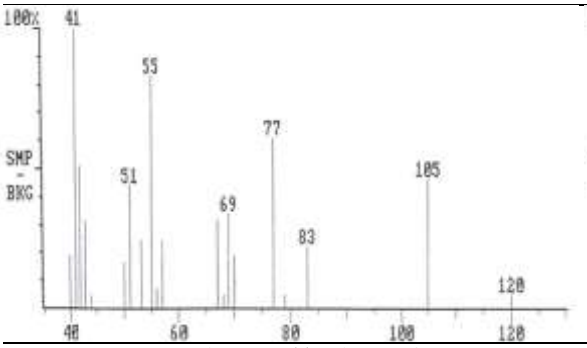
Espectro de massa (ITD) do Acetato de Mirtenilo



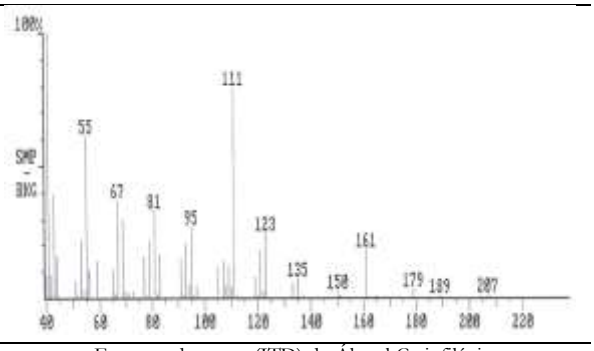
Espectro de massa (ITD) do Acetato de *trans*-Dihidro-α-terpenilo



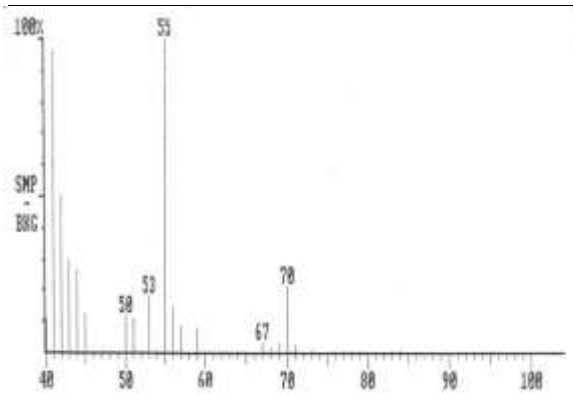
Espectro de massa (ITD) do 2-Acetilfurano



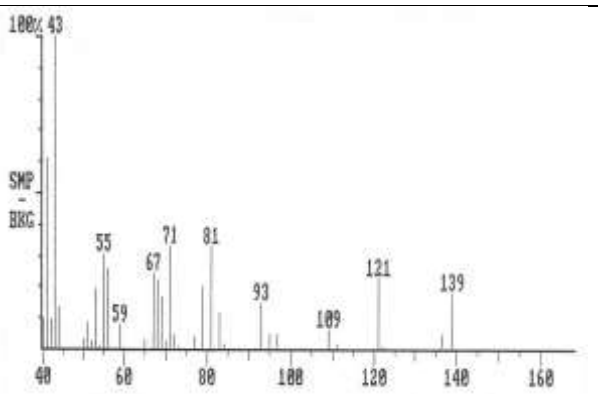
Espectro de massa (ITD) da Acetofenona



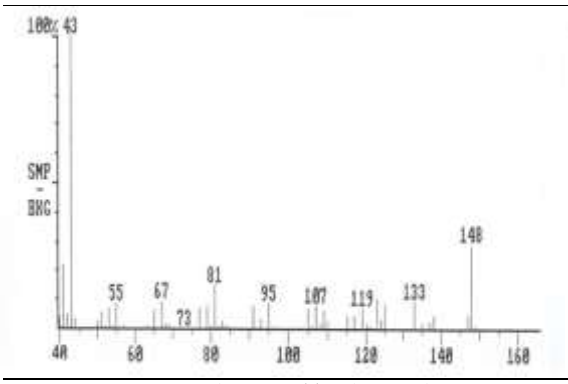
Espectro de massa (ITD) do Álcool Cariofilénico



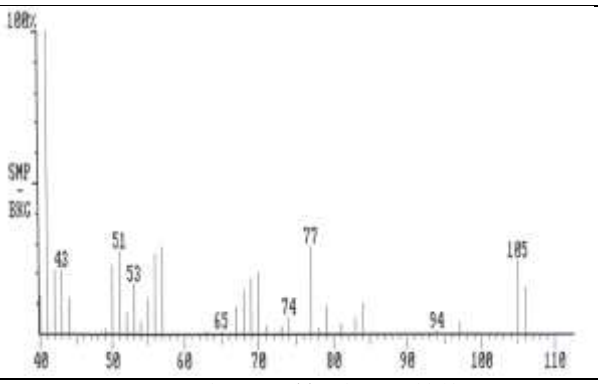
Espectro de massa (ITD) do Álcool Isopentílico



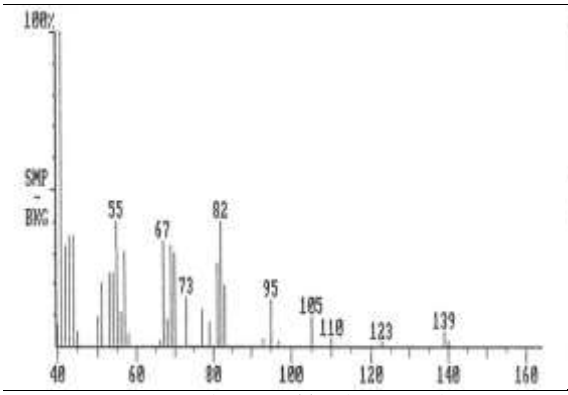
Espectro de massa (ITD) do Álcool Yomogi



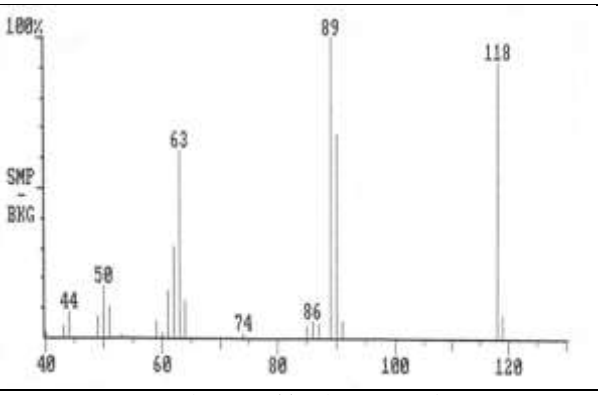
Espectro de massa (ITD) do Anetole



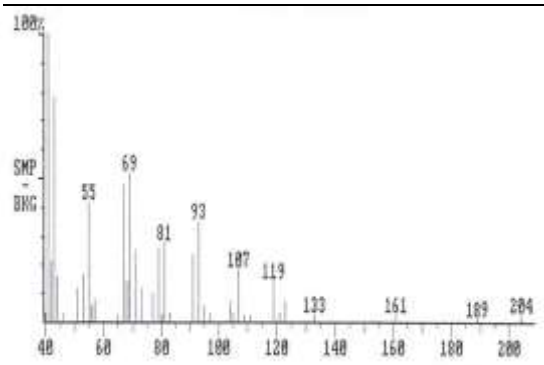
Espectro de massa (ITD) do Benzaldeído



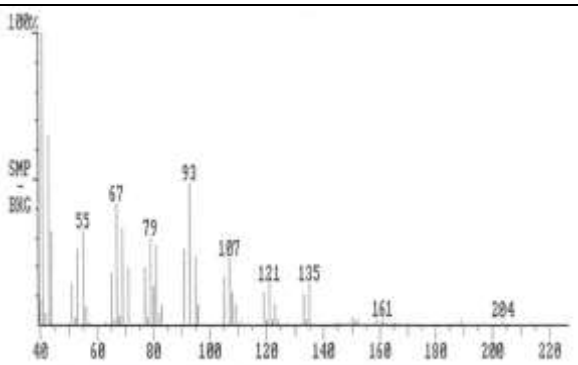
Espectro de massa (ITD) do Bergamal



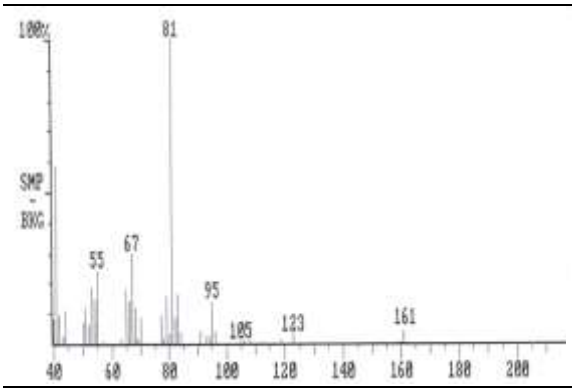
Espectro de massa (ITD) do 2,3-Benzofurano



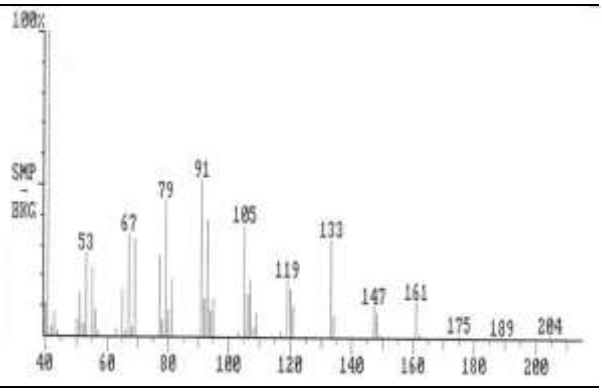
Espectro de massa (ITD) do α-Bisabolol



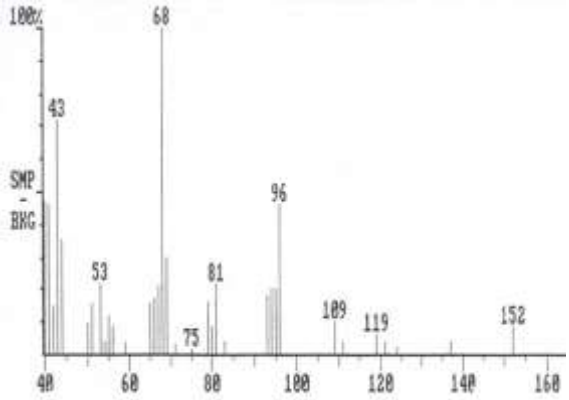
Espectro de massa (ITD) do β-Bisaboleno



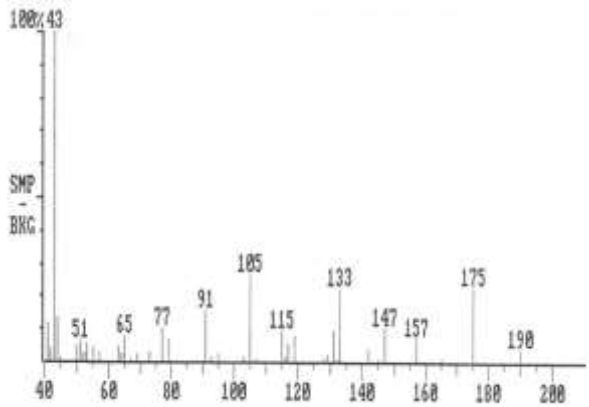
Espectro de massa (ITD) do β-Bourboneno



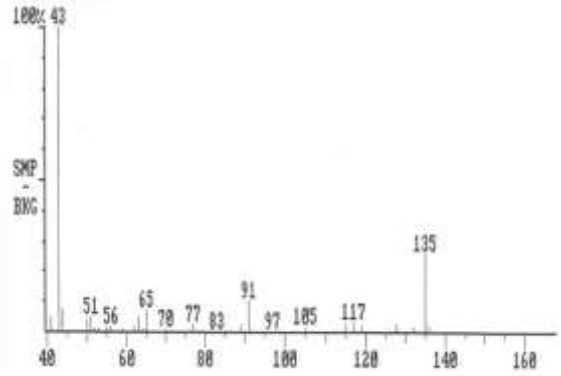
Espectro de massa (ITD) do β-Cariofileno



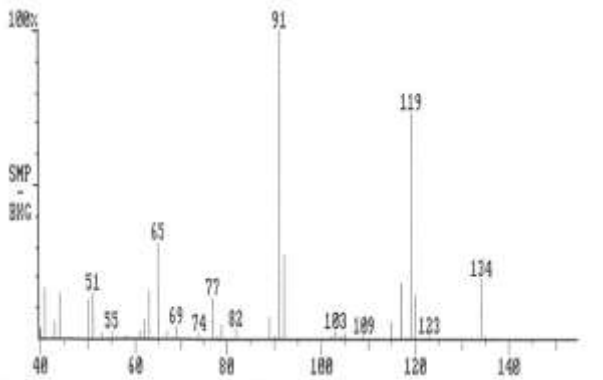
Espectro de massa (ITD) do 4-Cetoisoforona



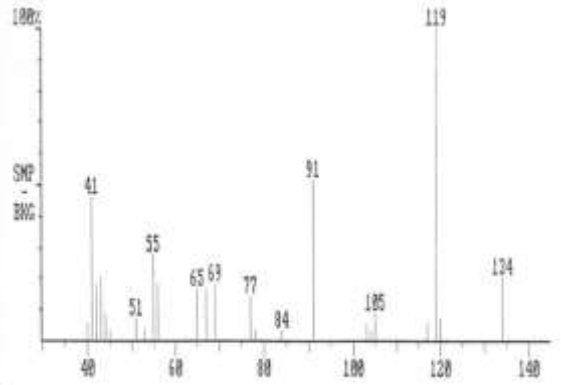
Espectro de massa (ITD) do Ciclamenaldeído



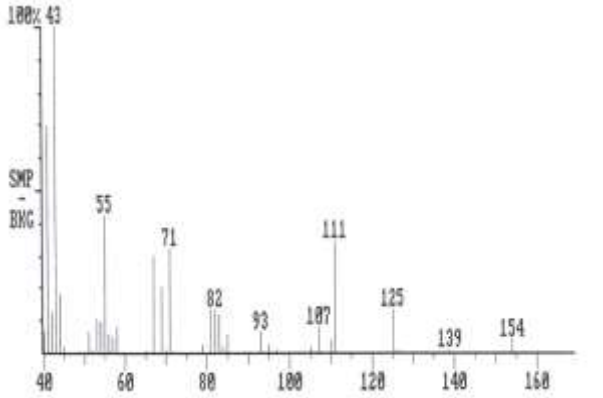
Espectro de massa (ITD) do *meta*-Cimen-8-ol



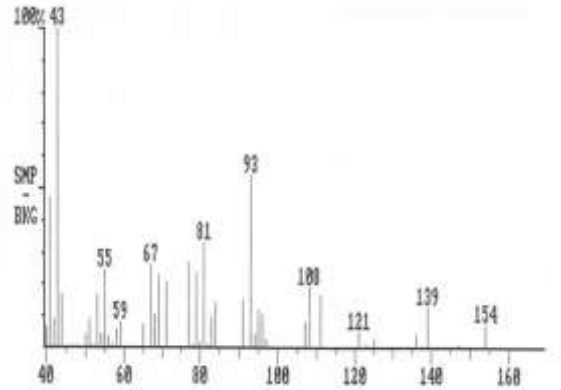
Espectro de massa (ITD) do *orto*-Cimeno



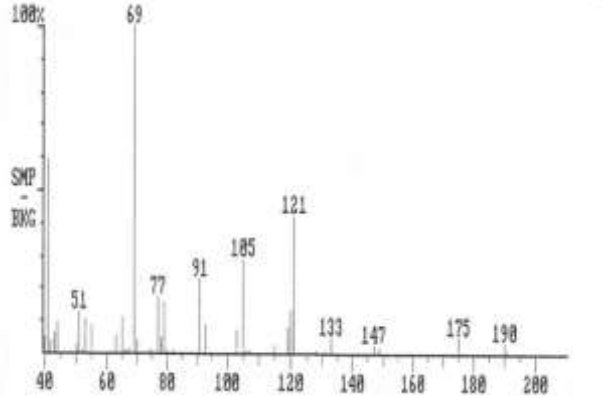
Espectro de massa (ITD) do *para*-Cimeno



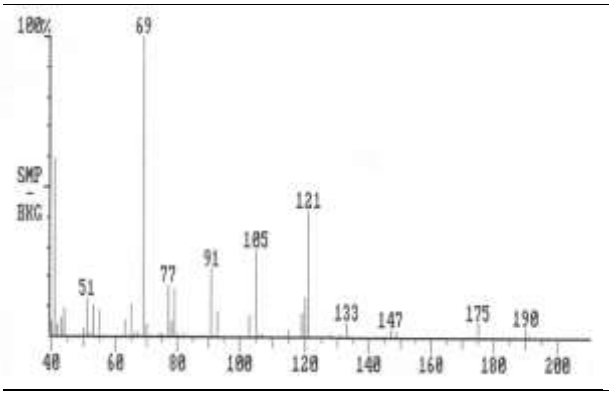
Espectro de massa (ITD) do 1,4-Cineole



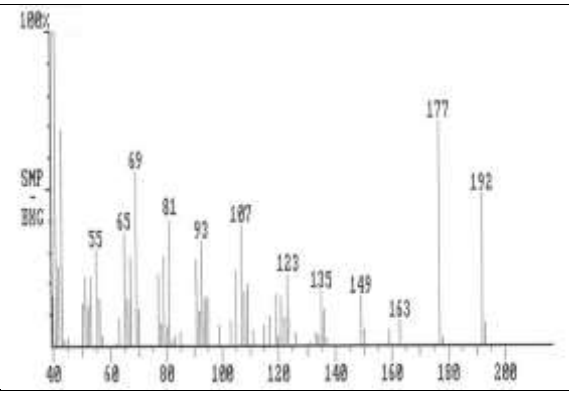
Espectro de massa (ITD) do 1,8-Cineole



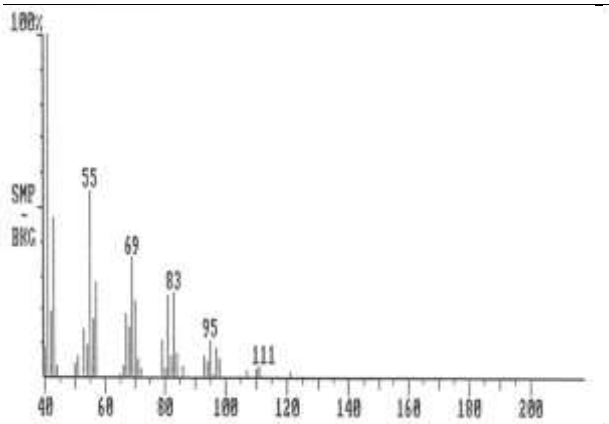
Espectro de massa (ITD) da *trans*-β-Damascenona



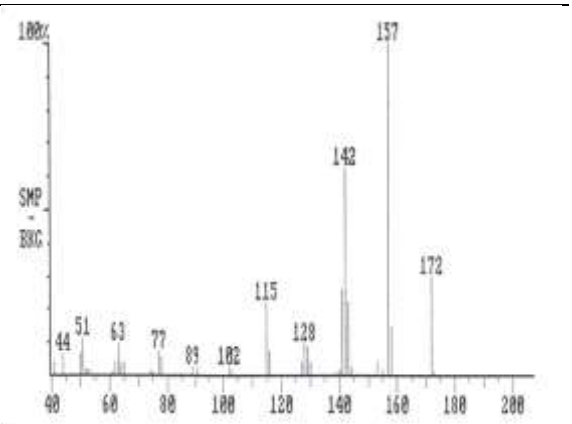
Espectro de massa (ITD) da *trans*-β-Damascenona



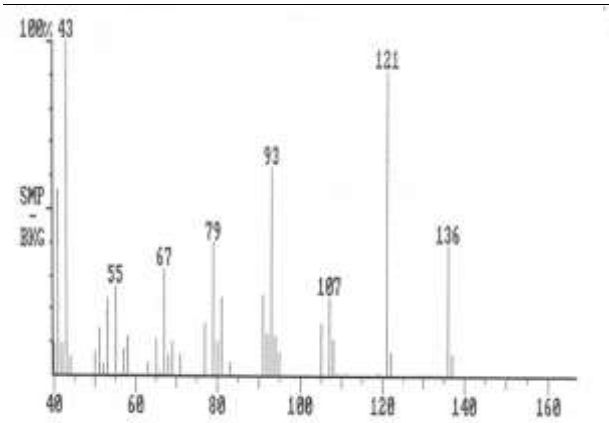
Espectro de massa (ITD) da *cis*-β-Damascona



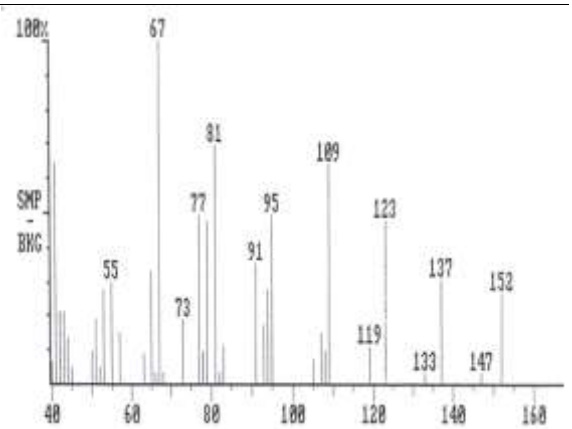
Espectro de massa (ITD) do *n*-Decanol



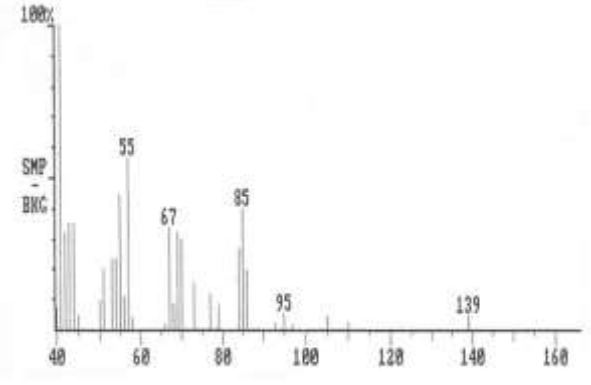
Espectro de massa (ITD) do 1,2-Dihidro-1,1,6-trimetilnaftaleno



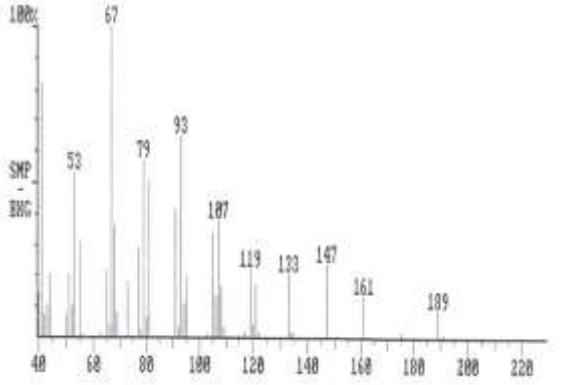
Espectro de massa (ITD) do Dihidrocarveol



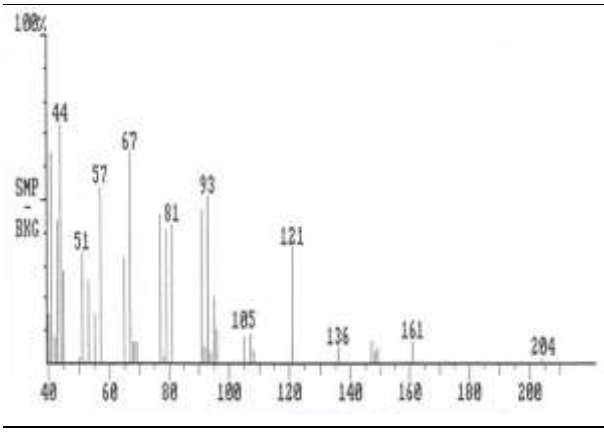
Espectro de massa (ITD) da *trans*-Dihidrocarvona



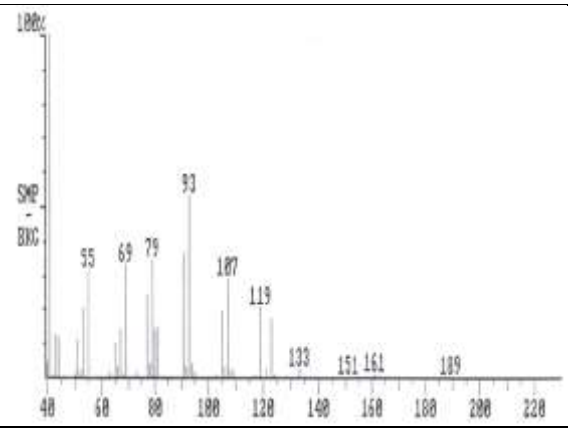
Espectro de massa (ITD) da Dihidrotagetona



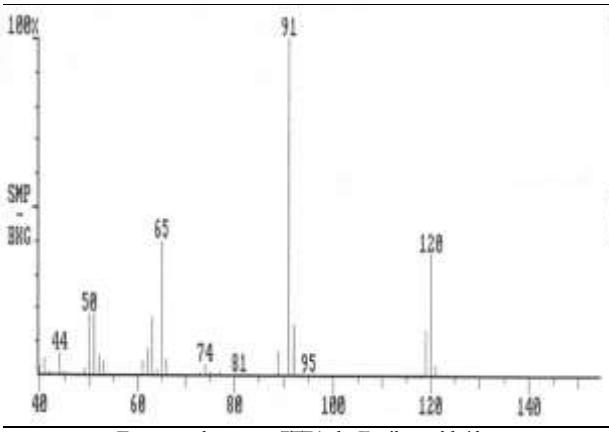
Espectro de massa (ITD) do β-Elemeno



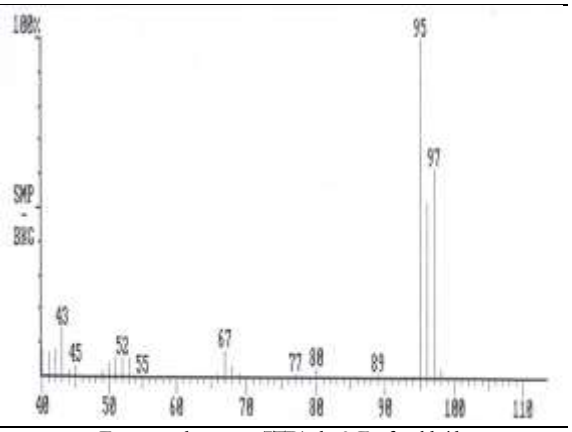
Espectro de massa (ITD) do δ-Elemeno



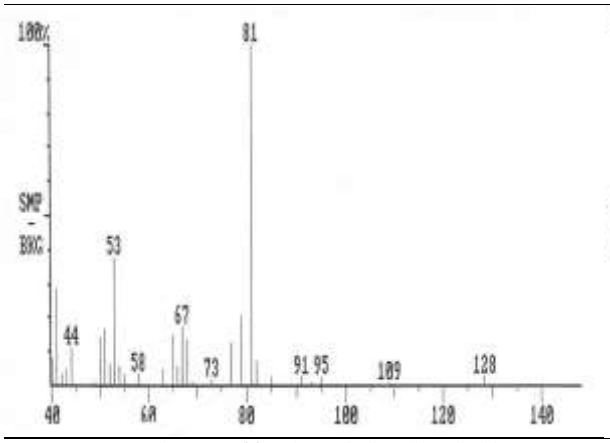
Espectro de massa (ITD) do *trans,trans*-α-Farneseno



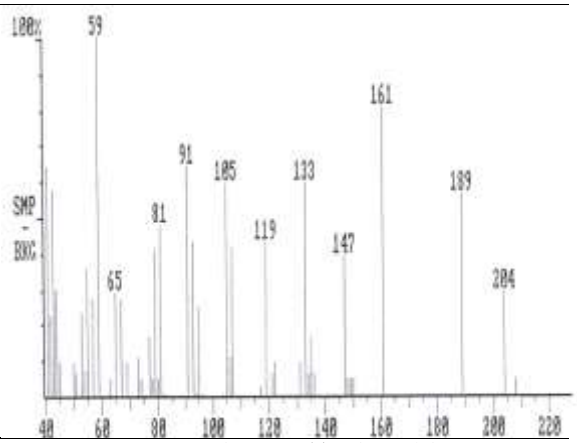
Espectro de massa (ITD) do Fenilacetaldeído



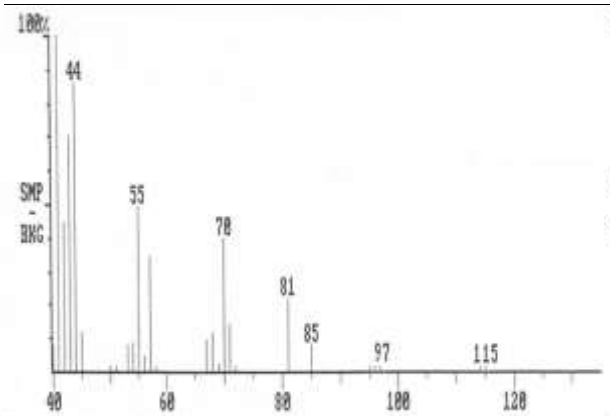
Espectro de massa (ITD) do 2-Furfuraldeído



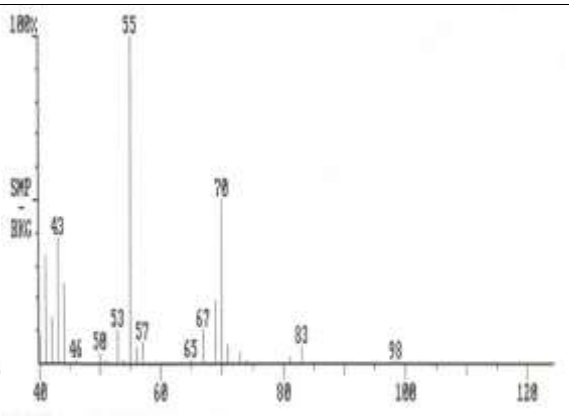
Espectro de massa (ITD) do Furfurilmetil metilsulfureto



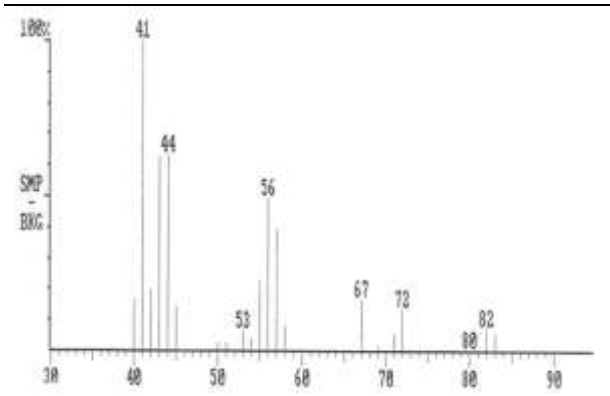
Espectro de massa (ITD) do Guaiol



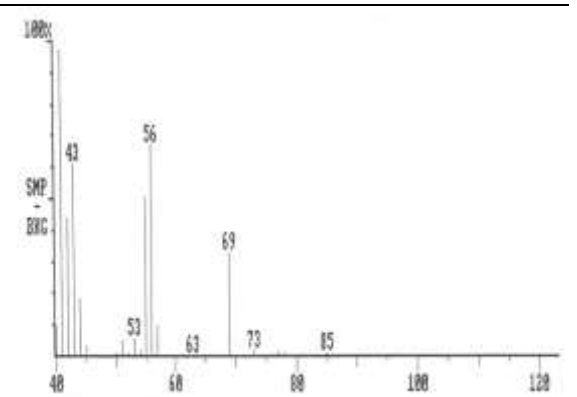
Espectro de massa (ITD) do *n*-Heptanal



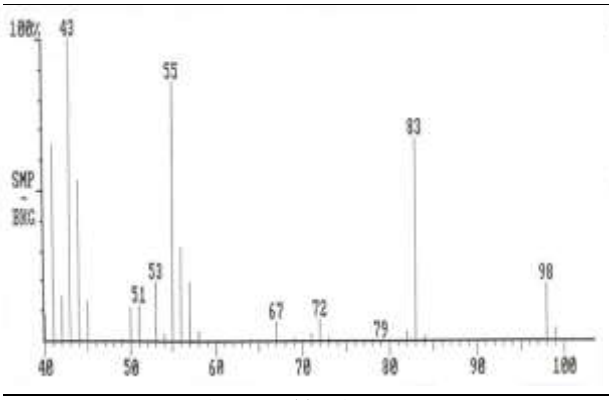
Espectro de massa (ITD) do *n*-Heptanol



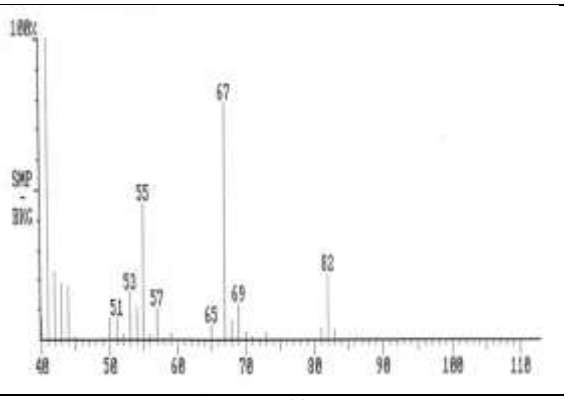
Espectro de massa (ITD) do *n*-Hexanal



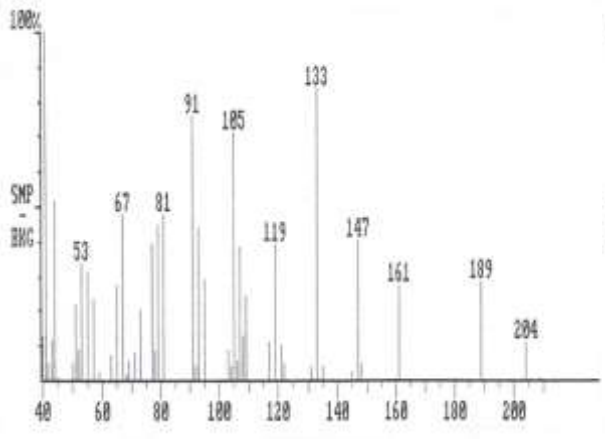
Espectro de massa (ITD) do *n*-Hexanol



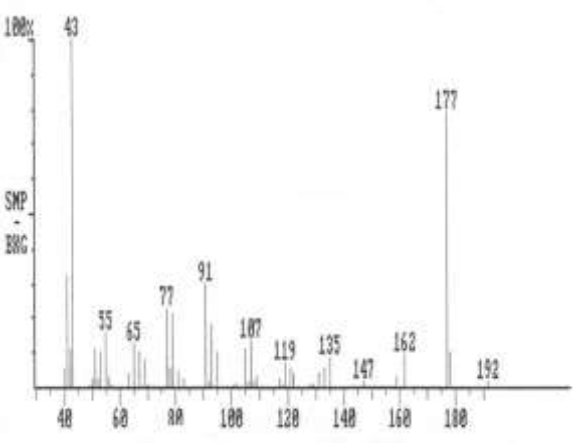
Espectro de massa (ITD) da 5-Hexen-2-ona



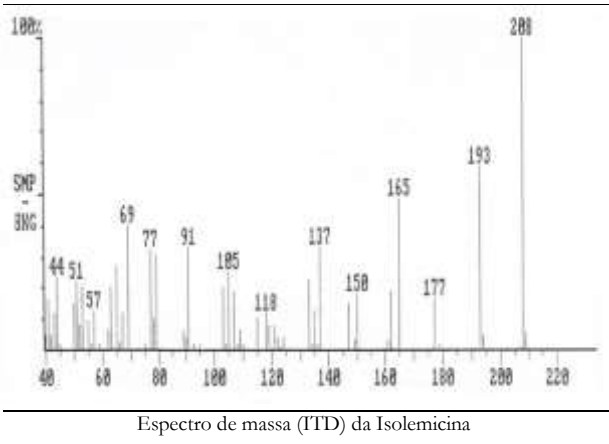
Espectro de massa (ITD) do 3-Hexenol



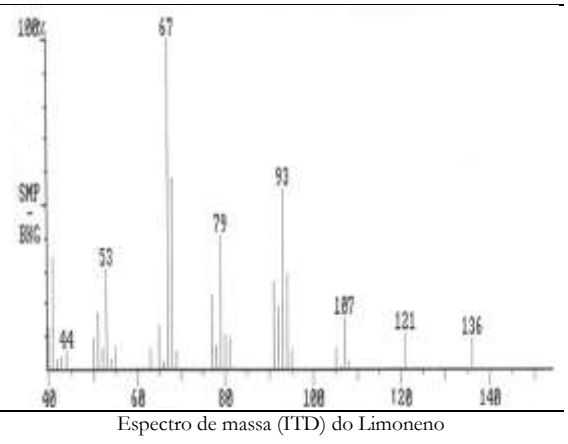
Espectro de massa (ITD) do γ-Himachaleno



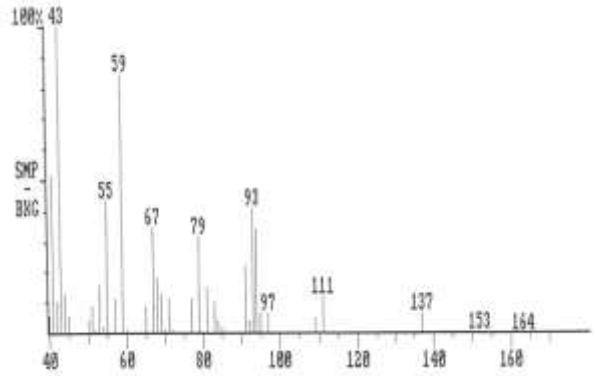
Espectro de massa (ITD) da β-Ionona



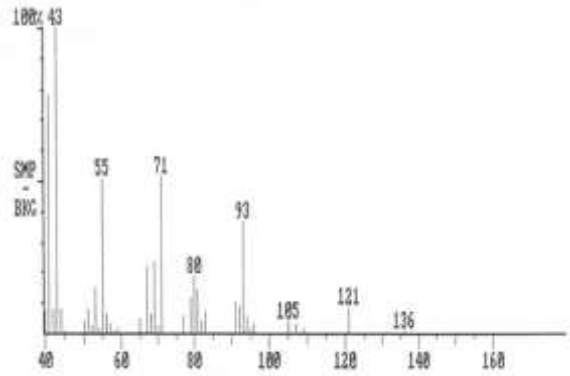
Espectro de massa (ITD) da Isolemicina



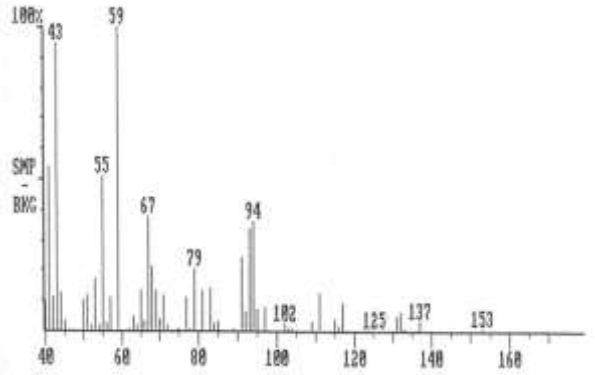
Espectro de massa (ITD) do Limoneno



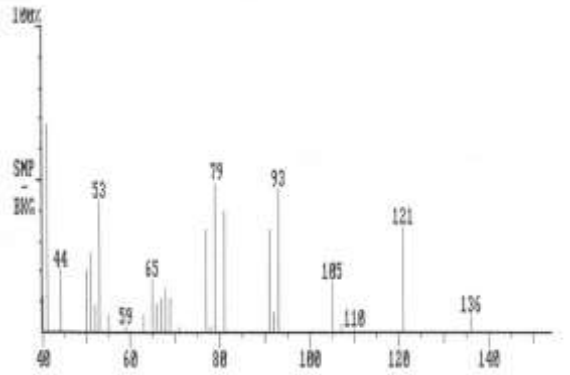
Espectro de massa (ITD) do *cis*-Linalool óxido



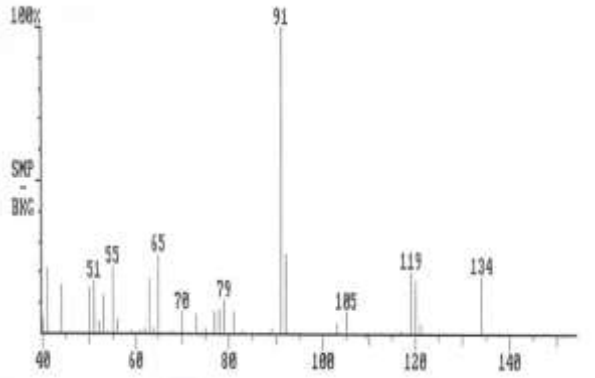
Espectro de massa (ITD) do Linalool



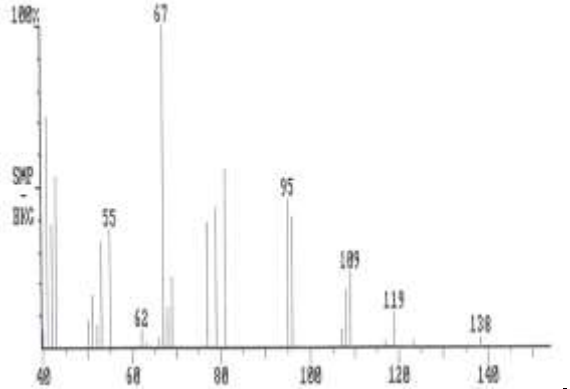
Espectro de massa (ITD) do *trans*-Linalool óxido



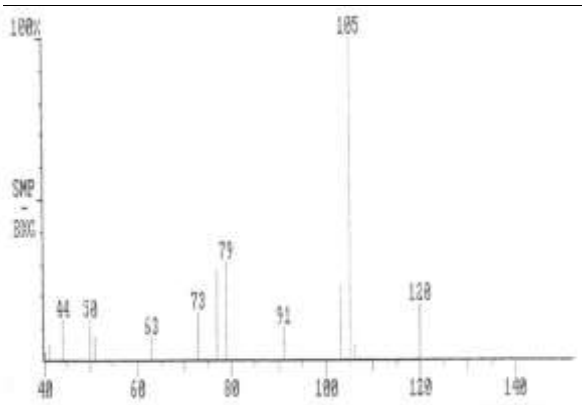
Espectro de massa (ITD) do *m*-Menta-1(7),8-dieno



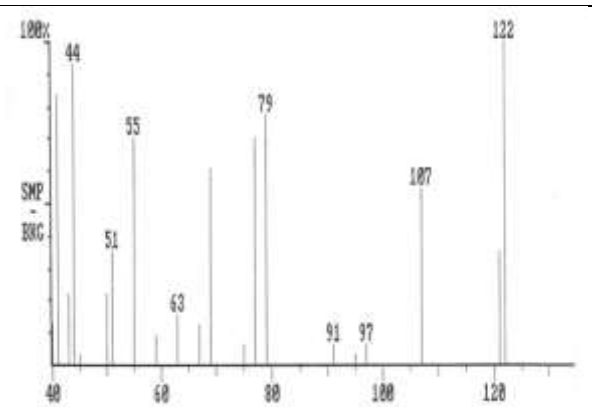
Espectro de massa (ITD) do *p*-Menta-1,3,8-trieno



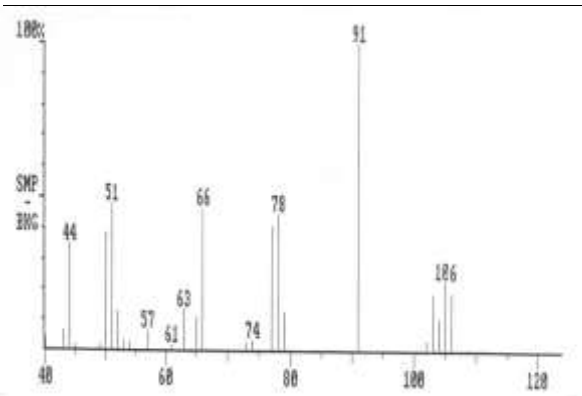
Espectro de massa (ITD) do *p*-Ment-1-eno



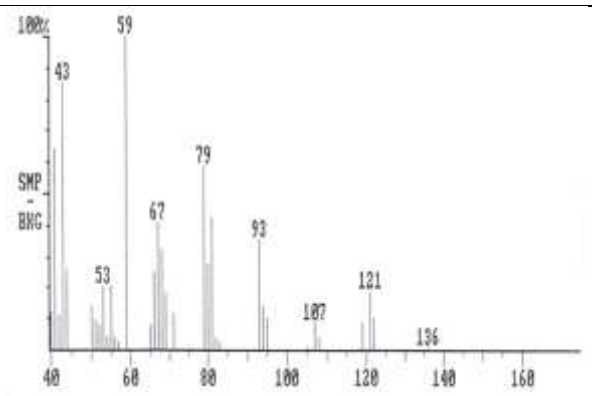
Espectro de massa (ITD) do Mesitileno



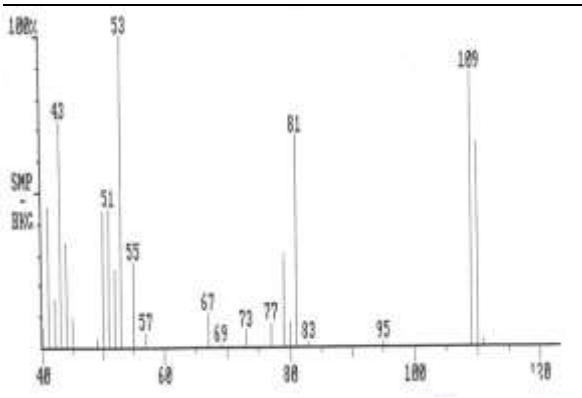
Espectro de massa (ITD) do *para*-Metilanisole



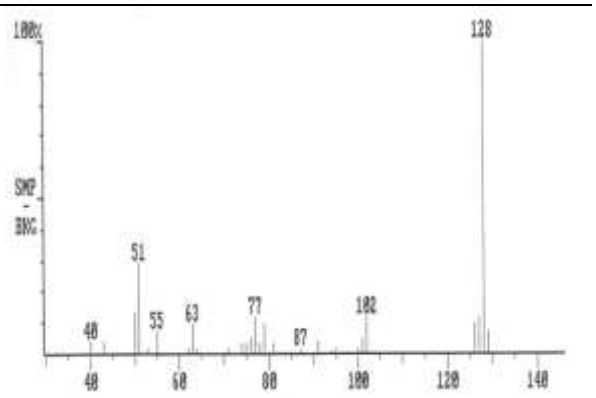
Espectro de massa (ITD) do 5-Metileno-2-norborneno



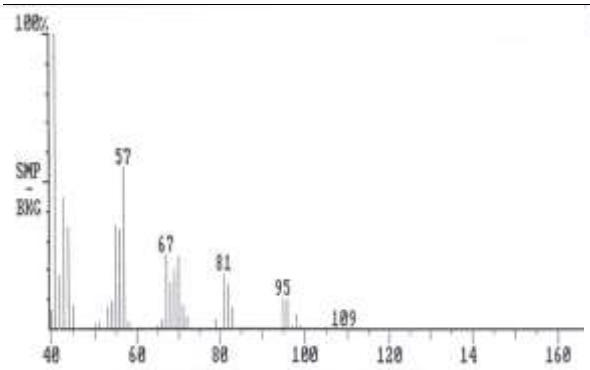
Espectro de massa (ITD) do Mircenol



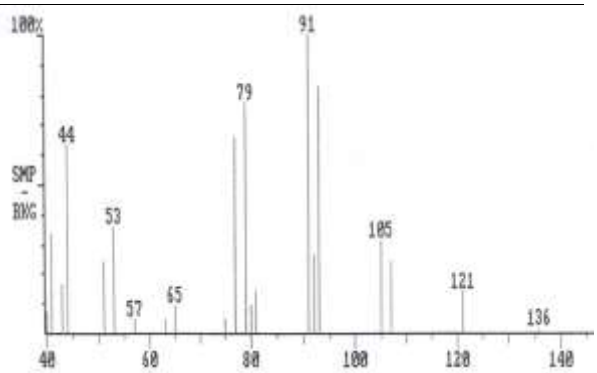
Espectro de massa (ITD) do 5-Metilfurfural



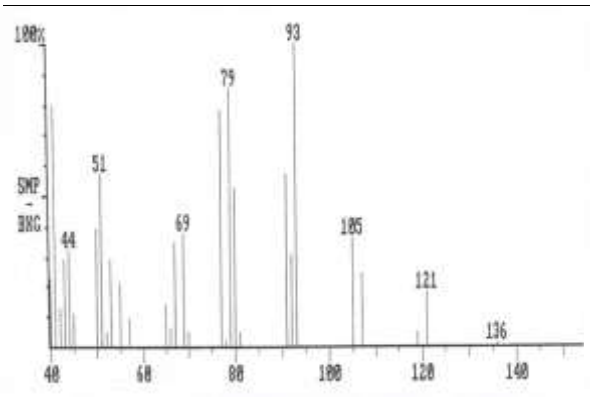
Espectro de massa (ITD) do Naftaleno



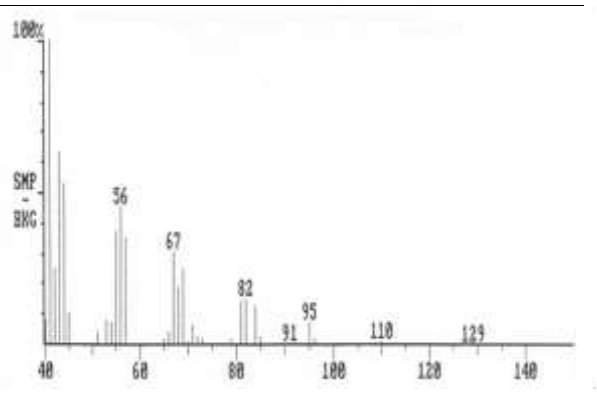
Espectro de massa (ITD) do Nonanal



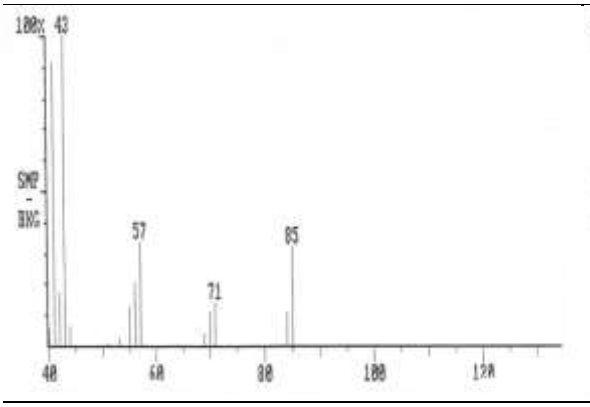
Espectro de massa (ITD) do *cis*-β-Ocimeno



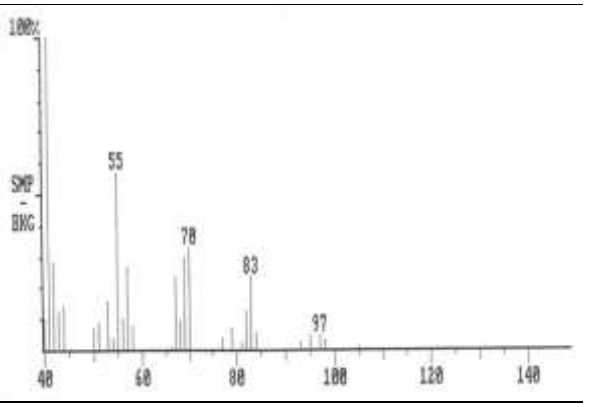
Espectro de massa (ITD) do *trans*-β-Ocimeno



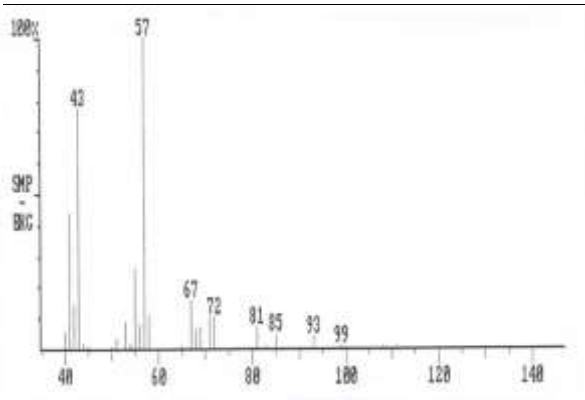
Espectro de massa (ITD) do *n*-Octanal



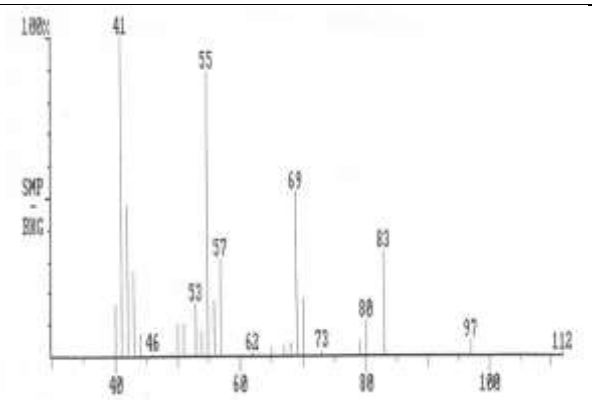
Espectro de massa (ITD) do *n*-Octano



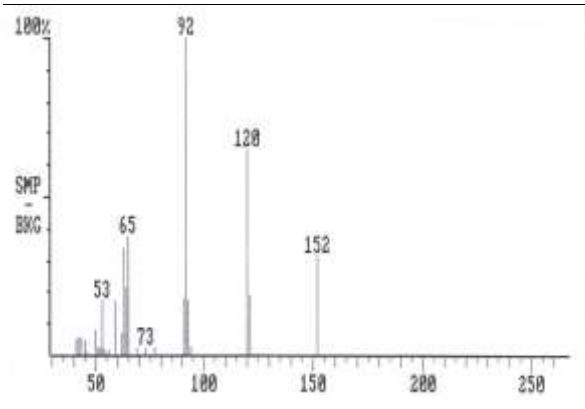
Espectro de massa (ITD) do *n*-Octanol



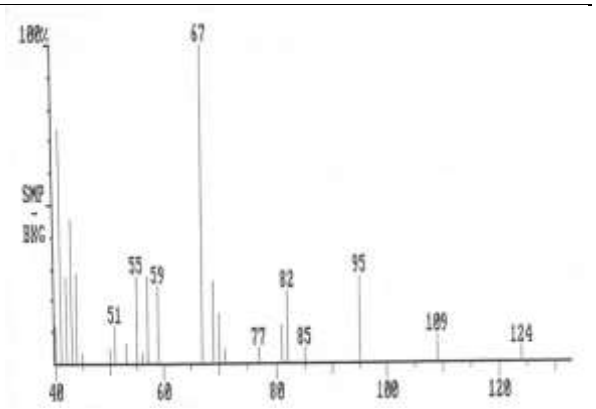
Espectro de massa (ITD) do Octeno-3-ol



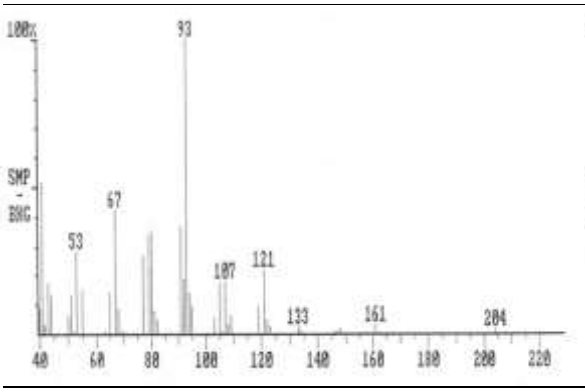
Espectro de massa (ITD) do *cis*-2-Octeno



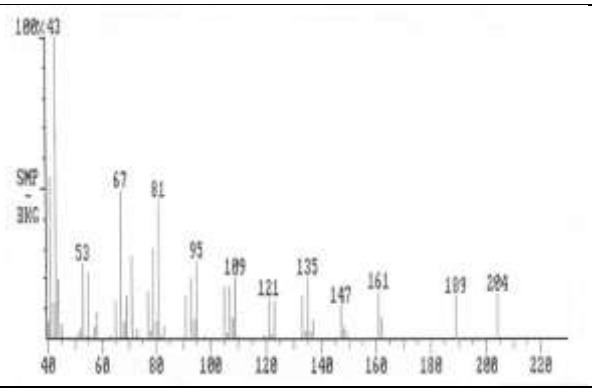
Espectro de massa (ITD) do Salicilato de Metilo



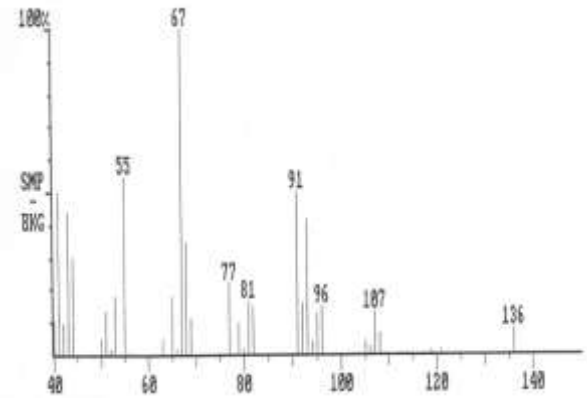
Espectro de massa (ITD) do *trans*-Salveno



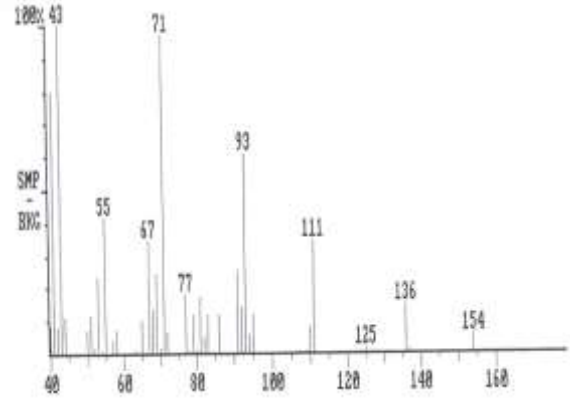
Espectro de massa (ITD) do α-Santaleno



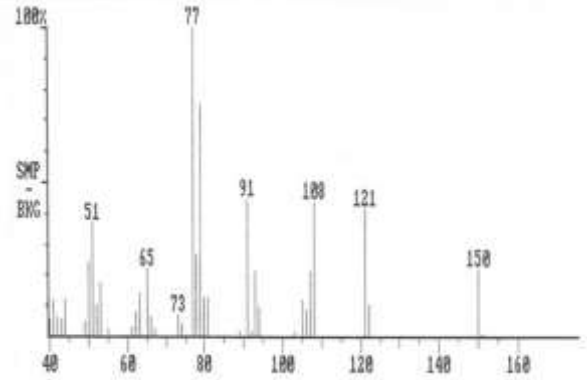
Espectro de massa (ITD) do Selin-11-en-4α-ol



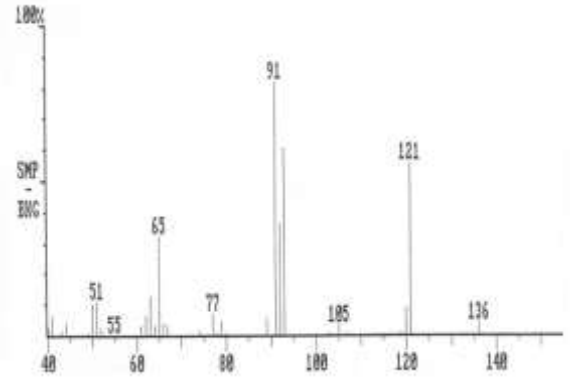
Espectro de massa (ITD) do Silvestreno



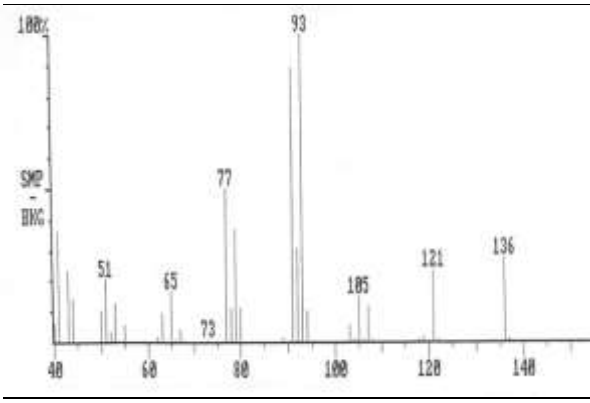
Espectro de massa (ITD) do Terpinen-4-ol



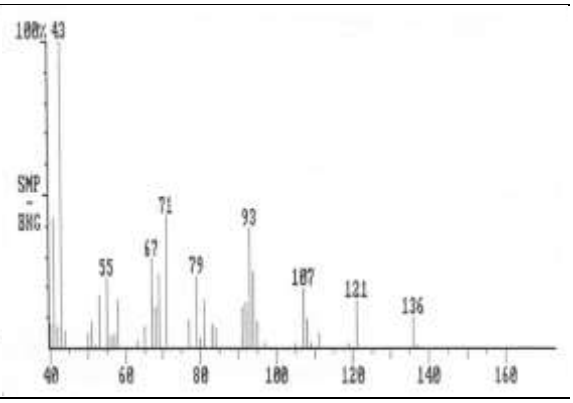
Espectro de massa (ITD) do α-Terpinen-7-al



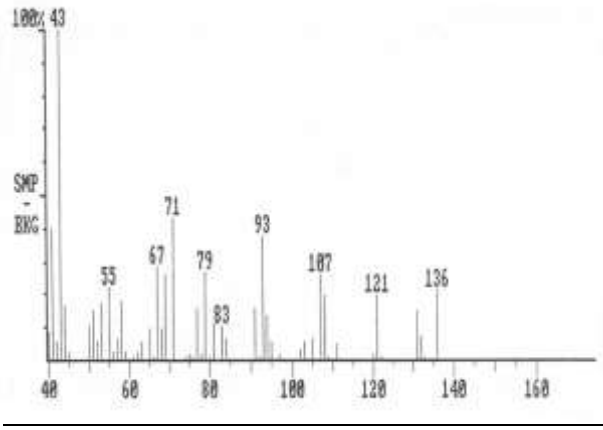
Espectro de massa (ITD) do α-Terpineno



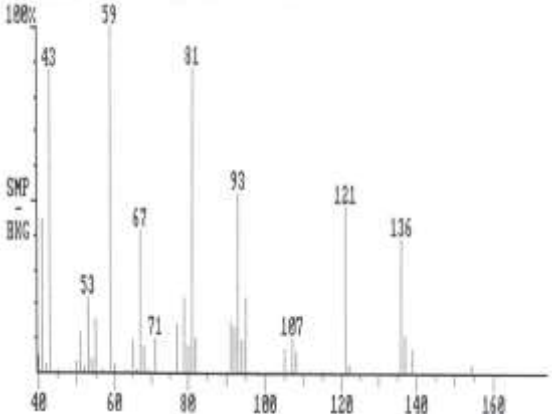
Espectro de massa (ITD) do γ-Terpineno



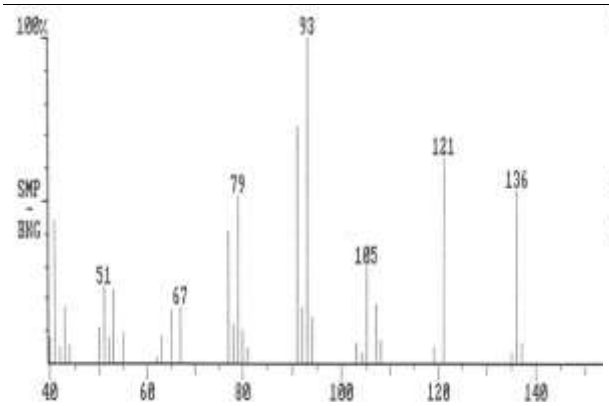
Espectro de massa (ITD) do *cis*-β-Terpineol



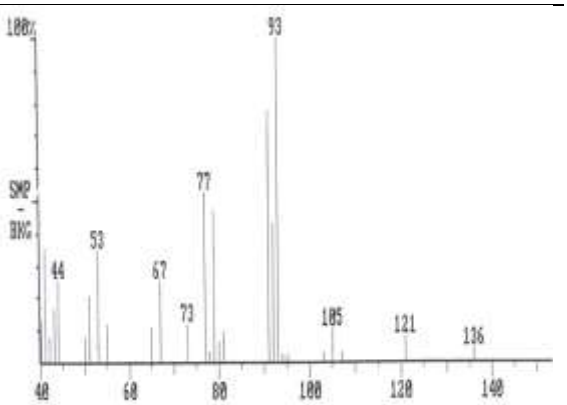
Espectro de massa (ITD) do *trans*-β-Terpineol



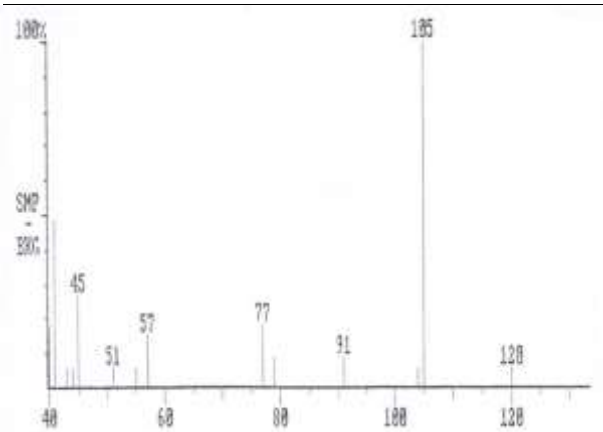
Espectro de massa (ITD) do α-Terpineol



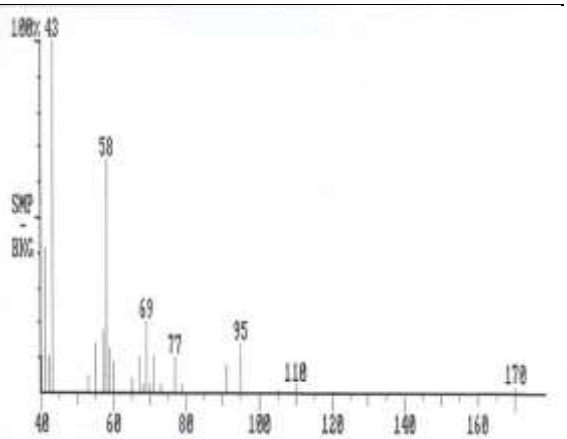
Espectro de massa (ITD) do Terpinoleno



Espectro de massa (ITD) do Tricicleno

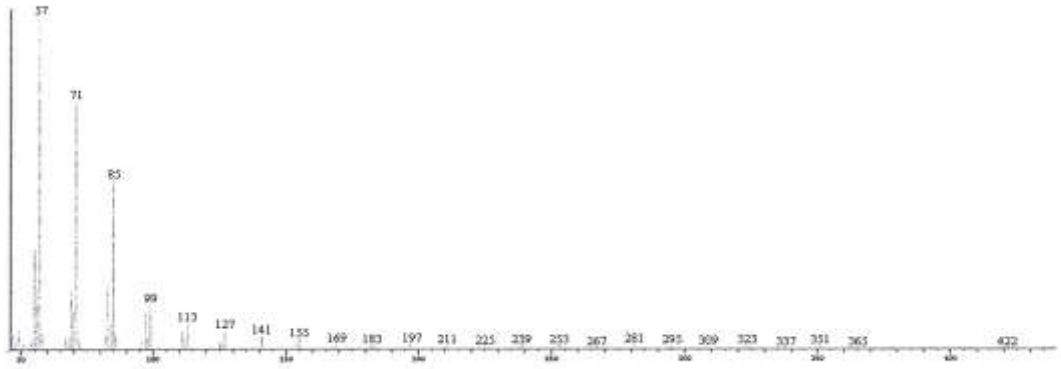


Espectro de massa (ITD) do 1,2,4-Trimetilbenzeno

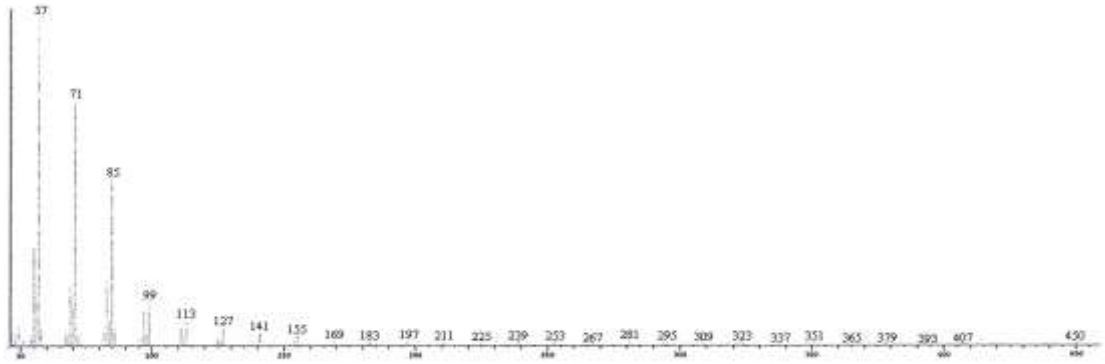


Espectro de massa (ITD) da 2-Undecanona

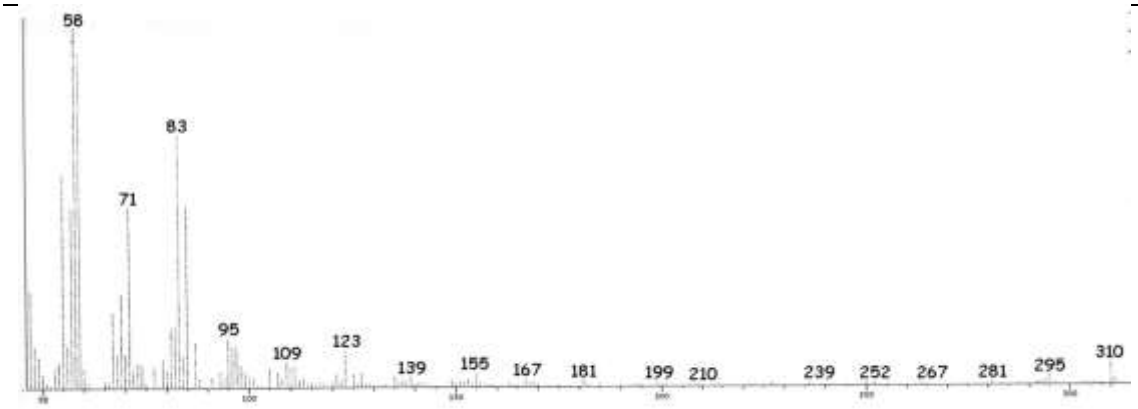
APÊNDICE 3 - OUTROS COMPOSTOS



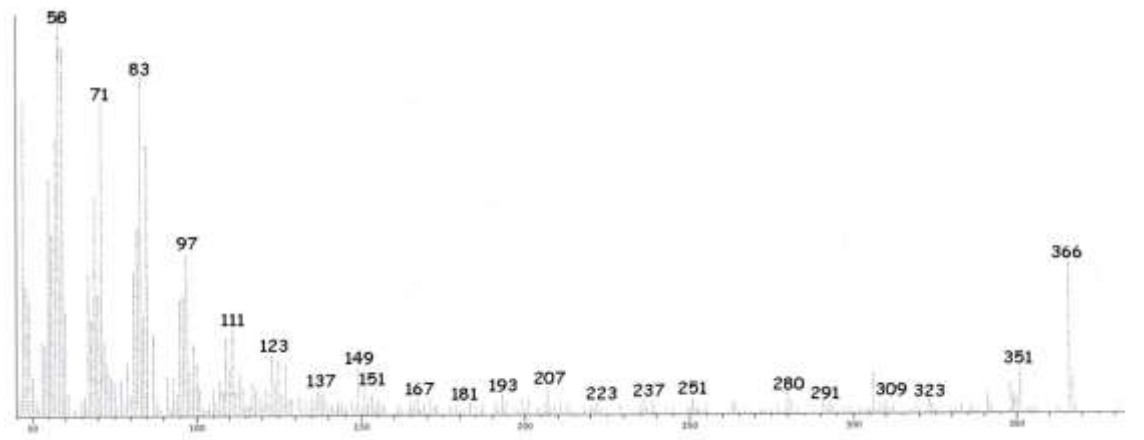
Espectro de massa do Triacontano (composto **a**, 2.1.1).



Espectro de massa do Dotriacontano (composto **b**, 2.1.1).



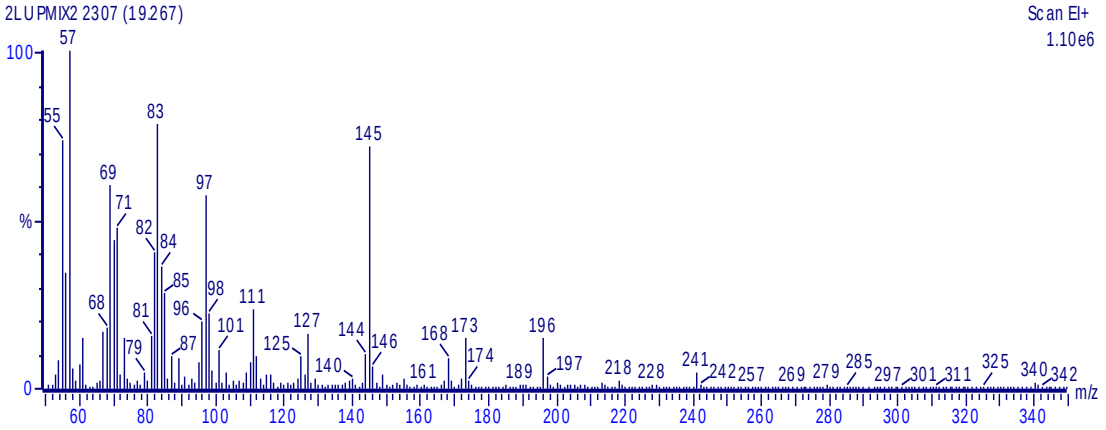
Espectro de massa da 2-Heneicosanona (composto **c**, 2.1.1).



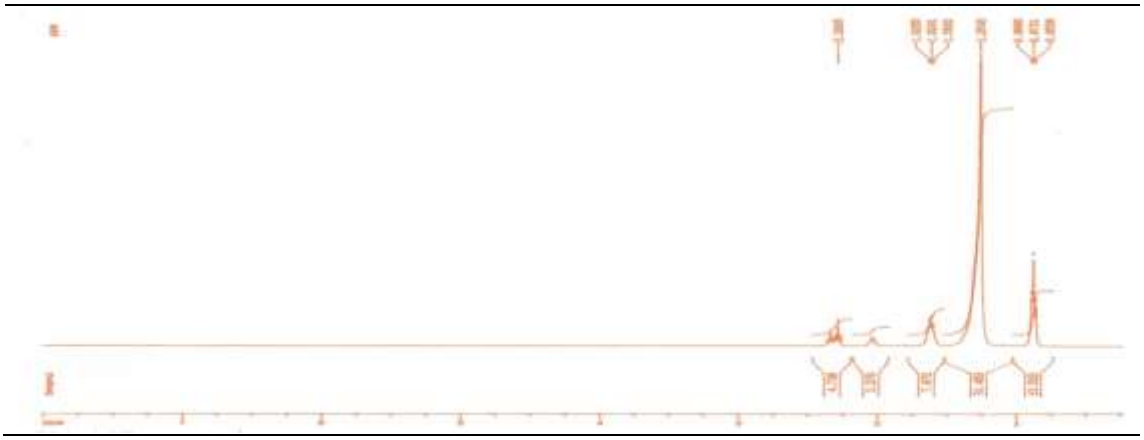
Espectro de massa da 2-Pentacosanona (composto **d**, 2.1.1).

ÉSTERES LONGOS DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS

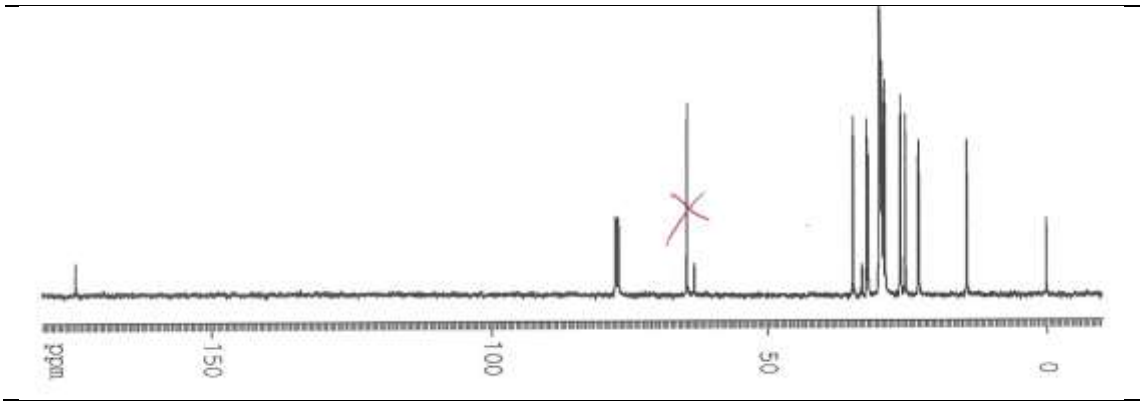
Composto - *2.2.2-2*	***Octanoato de tetradecilo*** - $C_{22}H_{44}O_2$ (M=340)
p.e. (ºC)	162 – 165
n^{T}_{D}	1.4386 (23.5ºC)
IV $\nu^{NaCl}_{máx.}$ (cm^{-1})	2953.3, 2924, 2853.8, 1739, 1712, 1464.4, 1168, 912
MS *m/z* (int.rel.%)	340[M^+](1.2), 297(0.2), 241(2), 213(0.7), 196(11), 173(9), 168(8), 155(2), 146(5), 145(63), 144(11), 139(3), 129(3), 127(15) 125(9), 111(22), 97(32), 87(6), 83(45), 73(16), 71(58), 69(77), 61(25), 57(100), 55(79)
^{13}C-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)	1-CH_3(14.16); 2-CH_2(23.26); 3-CH_2 (22.6);4-CH_2 (29.51); 5-CH_2(31.7); 6-CH_2(29.2); 7-CH_2(34.75); 8-C(173.99); 9-CH_2(63.9); 10-CH_2(29.34); 11-CH_2(28.8); 12-CH_2(29.34); 13-CH_2(28.4); 14-CH_2(29.21); 15-CH_2(28.33);16-CH_2(28.5); 17-CH_2(29.5); 18-CH_2(29.2); 19-CH_2(29.34); 20-CH_2(31.88); 21-CH_2(22.68); 22-CH_3(14.07);



Espectro de massa do Octanoato de Tetradecilo (*2.2.2-2*).



Espectro de ^{1}H-NMR do Octanoato de Tetradecilo (*2.2.2-2*).



Espectro de ^{13}C-NMR do Octanoato de Tetradecilo (*2.2.2-2*).

Composto - *2.2.2-4*	***Octanoato de hexadecilo*** - $C_{24}H_{48}O_2$ (M=368)
p.f. (ºC)	38 – 40
η^{T}_{D}	1.4460 (23º C)
IV $\nu^{NaCl}_{máx.}$ (cm^{-1})	2952.6, 2922, 2853, 1739, 1464.4, 1167.8
MS *m/z* (int.rel.%)	368[M$^+$](1.3), 269(2), 241(0.5), 219(0.3), 213(0.4), 207(0.8), 201(0.3), 196(4), 189(0.6), 173(7), 168(2), 163(0.5), 161(0.7), 155(2), 149(3), 146(5), 145(54), 144(10), 143(1), 139(3), 129(3), 127(13) 125(10), 111(16), 97(27), 87(4), 83(40), 73(10), 71(35), 69(59), 61(11), 57(100), 55(74)
^{13}C-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)	1-CH_3(14.17); 2-CH_2(23.24); 3-CH_2 (22.5);4-CH_2 (29.50); 5-CH_2(31.6); 6-CH_2(29.3); 7-CH_2(34.76); 8-C(174.0); 9-CH_2(64.0); 10-CH_2(29); 11-CH_2(28.78); 12-CH_2(29.10); 13-CH_2(28.37); 14-CH_2(28.58); 15-CH_2(28.36); 16-CH_2(28.48); 17-CH_2(29.5); 18-CH_2(29.19); 19-CH_2(29.36); 20-CH_2(29.38); 21-CH_2(29.38); 22-CH_2(31.89); 23-CH_2(22.69); 24-CH_3(14.08);

Composto – *2.2.2-6*	***Octanoato de octadecilo*** - $C_{26}H_{52}O_2$ (M=396)
p.f. (ºC)	47- 49
IV $\nu^{KBr}_{máx.}$ (cm^{-1})	2953, 2920.5, 2850.7, 1738.6, 1465.5, 1176.5
MS *m/z* (int.rel.%)	396[M^+](1.6), 353(0,3), 297(2), 252(3), 225(0.4), 224(2), 218(0.6), 213(0.2), 207(0.7), 201(0.6), 196(0.7), 189(1), 173(5), 168(2), 163(0.7), 161(1), 155(2), 146(6), 145(68), 144(14), 143(1), 139(4), 129(2), 127(12) 125(10), 111(20), 97(30), 87(4), 83(39), 73(10), 71(36), 69(59), 61(10), 57(100), 55(73)
^{13}C-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)	1-CH_3(14.18); 2-CH_2(23.25); 3-CH_2 (22.6);4-CH_2 (29.51); 5-CH_2(31.65); 6-CH_2(29.25); 7-CH_2(34.77); 8-C(173.98); 9-CH_2(63.9); 10-CH_2(29); 11-CH_2(28.81); 12-CH_2(28.92); 13-CH_2(28.42); 14-CH_2(28.56); 15-CH_2(28.34); 16-CH_2(28.50); 17-CH_2(29.51); 18-CH_2(29.21); 19-CH_2(29.05); 20-CH_2(29.03); 21-CH_2(29.35); 22-CH_2(29.35); 23-CH_2(22.68); 24-CH_2(31.88); 25-CH_2(29.35); 26-CH_3(14.09);

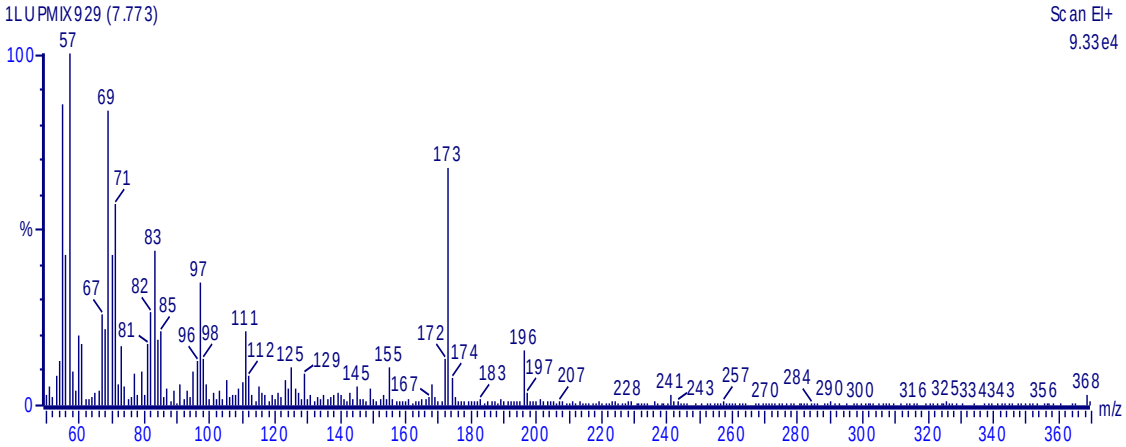
Composto - *2.2.2-8*	***Octanoato de nonadecilo*** - $C_{27}H_{54}O_2$ (M=410)
p.f. (ºC)	36 – 38
IV $\nu^{KBr}_{máx.}$ (cm^{-1})	2918.8, 2856, 1743.8, 1475, 1175
MS *m/z* (int.rel.%)	410[M^+](0.23), 341(0.7), 241(1.4), 219(0.4), 213(0.5), 207(0.5), 201(0.33), 196(9), 189(0.6), 173(7), 168(5), 163(0.5), 161(0.7), 155(2), 146(1.4), 145(47), 144(8), 143(1), 139(2), 129(3), 127(12) 125(8), 111(15), 97(26), 87(4), 83(36), 73(10), 71(33), 69(53), 61(13), 57(100), 55(72)
^{13}C-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)	1-CH_3(14.16); 2-CH_2(23.26); 3-CH_2 (22.6);4-CH_2 (29.51); 5-CH_2(31.7); 6-CH_2(29.2); 7-CH_2(34.75); 8-C(173.99); 9-CH_2(63.9); 10-CH_2(29); 11-CH_2(28.9); 12-CH_2(28.8); 13-CH_2(28.4); 14-CH_2(28.55); 15-CH_2(28.33); 16-CH_2(28.5); 17-CH_2(29.5); 18-CH_2(29.2); 19-CH_2(28.9); 20-CH_2(29.05); 21-CH_2(29); 22-CH_2(29.34); 23-CH_2(31.89); 24-CH_2(29.34); 25-CH_2(29.34); 26-CH_2(22.69); 27-CH_3(14.07);

Composto – *2.2.2-10*	***Octanoato de eicosanilo*** - $C_{28}H_{56}O_2$ (M=424)
p.f. (ºC)	35 – 37
IV $\nu^{KBr}_{máx.}$ (cm^{-1})	2956, 2917.9, 2848.5, 1738, 1179, 1466.5
MS *m/z* (int.rel.%)	424[M^+](<1), 369(0.8), 269(2), 241(0.3), 218(0.6), 213(0.6), 207(1), 196(4), 189(1), 173(8), 168(2), 161(1), 155(2), 146(4), 145(49), 144(10), 143(2), 139(3), 129(3), 127(12) 125(9), 111(18), 97(29), 87(4), 83(39), 73(9), 71(35), 69(56), 61(11), 57(100), 55(70)
^{13}C-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)	1-CH_3(14.16); 2-CH_2(23.26); 3-CH_2 (22.6);4-CH_2 (29.51); 5-CH_2(31.7); 6-CH_2(29.2); 7-CH_2(34.75); 8-C(173.99); 9-CH_2(63.9); 10-CH_2(28.9); 11-CH_2(28.8); 12-CH_2(28.9); 13-CH_2(28.4); 14-CH_2(28.55); 15-CH_2(28.33); 16-CH_2(28.5); 17-CH_2(29.5); 18-CH_2(29.2); 19-CH_2(28.9); 20-CH_2(28.9); 21-CH_2(22.68); 22-CH_2(29.05); 23-CH_2(31.88); 24-CH_2(29); 25-CH_2(29.34); 26-CH_2(29.34); 27-CH_2(29.34); 28-CH_3(14.07);

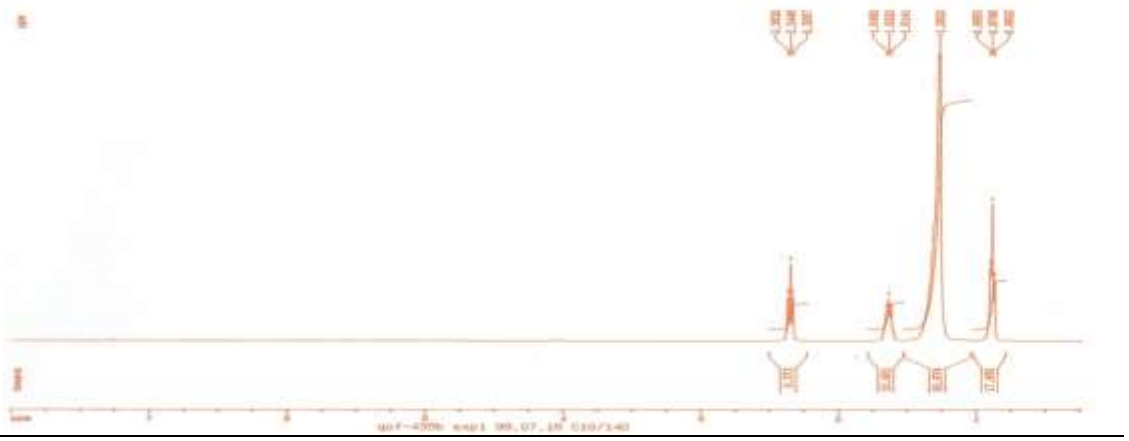
Composto – *2.2.2-12*	***Octanoato de docosanilo*** - $C_{30}H_{60}O_2$ (M=452)
p.f. (ºC)	35 – 40
IV $\nu^{KBr}_{máx.}$ (cm^{-1})	2954.8, 2921.1, 2850.9, 1738.4, 1466.9, 1177
MS *m/z* (int.rel.%)	452[M+](0.2), 421(0.3), 397(1.5), 353(0.7), 345(0.2), 323(0.3), 297(2), 285(0.3), 269(0.4), 253(0.8), 252(3), 237(0.7), 231(0.3), 225(0.4), 224(2), 218(0.5), 207(2), 201(0.6), 196(1), 189(1), 173(5), 168(2), 167(2), 163(1), 155(1), 153(2), 149(5), 146(6), 145(63), 144(13), 143(1), 139(4), 129(3), 127(11) 125(9), 111(17), 97(34), 87(5), 83(39), 71(32), 69(68), 60(18), 57(100), 55(80)
^{13}C-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)	1-CH_3(14.17); 2-CH_2(23.27); 3-CH_2 (22.65);4-CH_2 (29.50); 5-CH_2(31.7); 6-CH_2(29.2); 7-CH_2(34.77); 8-C(173.98); 9-CH_2(63.9); 10-CH_2(28.9); 11-CH_2(28.8); 12-CH_2(28.9); 13-CH_2(28.4); 14-CH_2(28.55); 15-CH_2(28.33); 16-CH_2(28.6); 17-CH_2(29.5); 18-CH_2(29.2); 19-CH_2(28.9); 20-CH_2(28.9); 21-CH_2(29.34); 22-CH_2(28.9); 23-CH_2(29.34); 24-CH_2(28.9); 25-CH_2(29.34); 26-CH_2(29); 27-CH_2(29.05); 28-CH_2(31.88); 29-CH_2(22.68); 30-CH_3(14.1);

Composto – *2.2.2-1*	***Decanoato de dodecilo*** - $C_{22}H_{44}O_2$ (M=340)
p.e. (ºC)	112 – 114
η^T_D	1.4297 (27.5ºC), 1.4316 (23.5ºC)
IV $\nu^{NaCl}_{máx.}$ (cm^{-1})	3025.5, 2953, 2924.5, 2864.7, 1710.75, 1463.7, 1282, 1246.6
MS *m/z* (int.rel.%)	340[M+](1.8), 297(0.4), 213(4), 196(2), 173(64), 168(26), 155(12), 145(14), 140(8), 129(9), 125(10), 111(22), 97(32), 87(6), 83(45), 73(16), 71(58), 69(77), 61(25), 57(100), 55(79)
^{13}C-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)	1-CH_2(31.8); 2-CH_2(23.2); 3-CH_2 (29.2); 4-CH_2(29.05); 5-CH_2(29.25); 6-CH_2(29.15); 7-CH_2(34.6); 8-C(173.99); 9-CH_2(63.9); 10–CH_2(31.93); 11-CH_2(28.8); 12-CH_2(29.37); 13-CH_2(28.4); 14-CH_2(29.41); 15–CH_2(29.46); 16-CH_2(28.65); 17-CH_2(29.5); 18-CH_2(29.2); 19-CH_2(22.68); 20-CH_3(14.09); 21-CH_2(22.7); 22-CH_3(14.1);

Composto – *2.2.2-3*	***Decanoato de tetradecilo*** - $C_{24}H_{48}O_2$ (M=368)
p.e. (ºC)	128 – 131
η^T_D	1.4338 (23.5 ºC)
IV $\nu^{NaCl}_{máx.}$ (cm^{-1})	2953.9, 2923.5, 2853.6, 1711.6, 1463.9, 909.6
MS *m/z* (int.rel.%)	368[M+](2.3), 269(0.5), 241(3), 219(1), 213(0.5), 207(0.8), 201(2), 196(16) , 189(1), 173(72), 168(7), 163(1.4), 161(1), 155(12), 149(4), 146(1), 145 (4), 144(1), 143(3), 139(3), 129(9), 127(3) 125(11), 111(21), 97(36), 87 (6), 83(44), 73(16), 71(61), 69(86), 61(17), 57(100), 55(88)
^{13}C-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)	1-CH_2(31.8); 2-CH_2(23.2); 3-CH_2 (29.2); 4-CH_2(29.05); 5-CH_2(29.25); 6-CH_2(29.15); 7-CH_2(34.6); 8-C(173.99); 9-CH_2(63.9); 10–CH_2(29.34); 11-CH_2(28.8); 12-CH_2(29.34); 13-CH_2(28.4); 14-CH_2(29.21); 15–CH_2(28.33); 16-CH_2(28.5); 17-CH_2(29.5); 18-CH_2(29.2); 19-CH_2(29.34); 20–CH_2(31.88); 21-CH_2(22.68); 22-CH_3(14.07); 23-CH_2(22.7); 24-CH_3(14.1);



Espectro de massa do Decanoato de Dodecilo (*2.2.2-1*).



Espectro de ^{1}H-NMR do Decanoato de Tetradecilo (*2.2.2-3*).

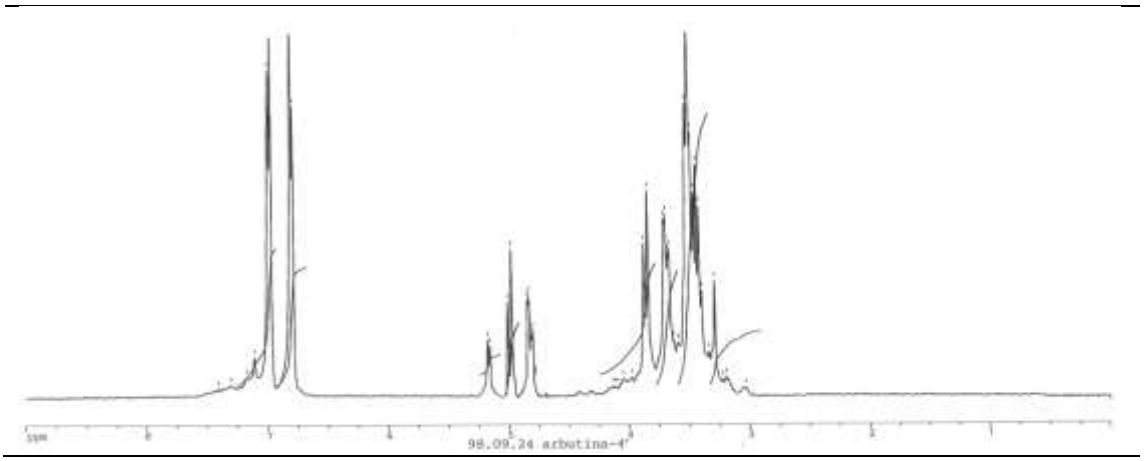
Composto - *2.2.2-5*	***Decanoato de hexadecilo*** - $C_{26}H_{52}O_2$ (M=396)
p.f. (ºC)	28 – 29
IV $\nu^{KBr}_{máx.}$ (cm^{-1})	2924, 2853.6, 1738.6, 1462.5
MS *m/z* (int.rel.%)	396[M^+](1.3), 355(0.2), 324(0.3), 284(1.2), 269(1), 241(3), 225(1), 218(3), 213(0.6), 207(2), 201(1), 196(3), 189(2), 173(35), 168(5), 163(1), 161(1), 155(6), 146(2), 145(15), 144(3), 143(2), 139(4), 129(6), 127(5) 125(10), 111(20), 97(33), 87(4), 83(39), 73(14), 71(47), 69(91), 61(13), 57(100), 55(86)
^{13}C-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)	1-CH_2(31.8); 2-CH_2(23.2); 3-CH_2 (29.2); 4-CH_2(29.05); 5-CH_2(29.25); 6-CH_2(29.15); 7-CH_2(34.6); 8-C(173.99); 9-CH_2(63.9); 10-CH_2(29); 11-CH_2(28.8); 12-CH_2(29.08); 13-CH_2(28.4); 14-CH_2(28.55); 15 – CH_2(28.33); 16-CH_2(28.5); 17-CH_2(29.5); 18-CH_2(29.2); 19-CH_2(29.34); 20– CH_2(29.34); 21-CH_2(29.34); 22-CH_2(31.88); 23-CH_3(14.07); 24- CH_2(22.68); 25- CH_2(22.7); 26-CH_3(14.1);

Composto – *2.2.2-7*	***Decanoato de heptadecilo*** - $C_{27}H_{54}O_2$ (M=410)
p.f. (ºC)	34 – 36
IV $\nu^{KBr}_{máx.}$ (cm^{-1})	2952.7, 2922.6, 2851.4, 1738.9, 1466.8, 1176
MS *m/z* (int.rel.%)	410[M^+](0.3), 381(0.4), 340(1.1), 324(0.3), 297(0.3), 269(0.3), 219(1.1), 213(3), 207(0.8), 201(1), 196(0.6), 189(1), 173(55), 168(20), 163(0.4), 161(1), 155(10), 146(1.4), 145(8), 144(3), 143(3), 139(4), 129(8), 127(3) 125(10), 111(21), 97(29), 87(6), 83(42), 73(16), 71(55), 69(79), 61(21), 57(100), 55(86)
^{13}C-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)	1- CH_2(31.81); 2- CH_2(23.19); 3- CH_2 (29.19); 4- CH_2(29.07); 5- CH_2(29.27); 6- CH_2(29.16); 7- CH_2(34.6); 8- C(173.99); 9- CH_2(63.9); 10- CH_2(29.08); 11- CH_2(28.8); 12- CH_2(28.95); 13- CH_2(28.4); 14- CH_2(28.55); 15- CH_2(28.33); 16- CH_2(28.5); 17-CH_2(29.5); 18- CH_2(29.2); 19- CH_2(29); 20- CH_2(29.34); 21- CH_2(29.34); 22- CH_2(29.34); 23- CH_3(14.07); 24- CH_2(22.69); 25- CH_2(31.89); 26- CH_2(22.8); 27- CH_3(14.09);

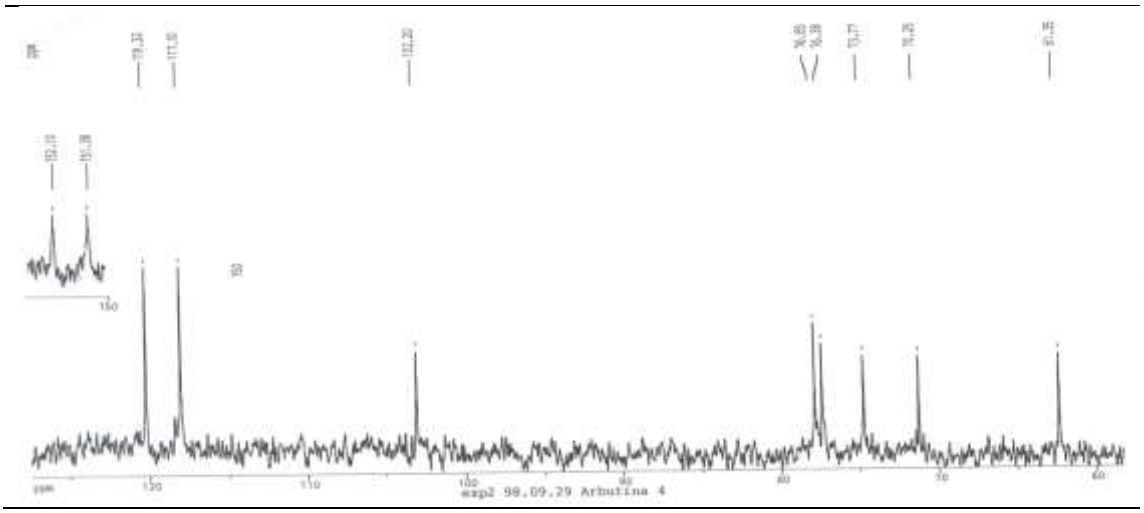
Composto – *2.2.2-9*	***Decanoato de octadecilo*** - $C_{28}H_{56}O_2$ (M=424)
p.f. (ºC)	32 – 35
IV $\nu^{KBr}_{máx.}$ (cm^{-1})	2953, 2924, 2853, 1739.6, 1465.6, 1179
MS *m/z* (int.rel.%)	424[M^+](0.4), 369(2), 342(0.4), 285(0.5), 269(0.2), 241(3), 218(1.2), 213(0.5), 207(1), 201(1.4), 196(13), 189(2), 173(52), 168(6), 163(1), 161(2), 155(10), 146(1), 145(8), 144(2), 143(3), 139(4), 129(9), 127(3) 125(10), 111(23), 97(35), 87(6), 83(46), 73(14), 71(57), 69(89), 61(15), 57(100), 55(88)
^{13}C-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)	1- CH_2(31.79); 2- CH_2(23.21); 3- CH_2 (29.21); 4- CH_2(29.06); 5- CH_2(29.25); 6- CH_2(29.15); 7- CH_2(34.6); 8- C(173.99); 9- CH_2(63.9); 10- CH_2(29.08); 11- CH_2(28.8); 12- CH_2(28.95); 13- CH_2(28.4); 14- CH_2(28.55); 15- CH_2(28.33); 16- CH_2(28.5); 17- CH_2(29.5); 18 - CH_2(29.2); 19 - CH_2(29.05); 20- CH_2(29); 21- CH_2(29.34); 22- CH_3(14.07); 23- CH_2(29.34); 24- CH_2(22.68); 25- CH_2(31.88); 26 – CH_2(29.34); 27 - CH_2(22.72); 28 - CH_3(14.11);

Composto – *2.2.2-11*	***Decanoato de eicosanilo*** - $C_{30}H_{60}O_2$ (M=452)
p.f. (ºC)	36 – 40
IV $\nu^{KBr}_{máx.}$ (cm^{-1})	2925, 2853.4, 1739, 1465.7, 1093
MS *m/z* (int.rel.%)	452[M^+](0.4), 425(0.5), 419(1.5), 414(0.8), 408(0.7), 397(1), 367(2), 358(1.4), 355(0.9), 346(0.6), 337(0.6), 310(0.7), 273(1), 269(1.2), 237(0.7), 225(1.3), 224(2.3), 218(3), 213(1), 207(3), 201(0.8), 196(3), 189(3), 173(30), 168(2), 167(2), 163(2), 161(3), 155(6), 153(3), 149(9), 146(2), 145(6), 144(2), 143(4), 139(4), 129(7), 127(2) 125(9), 111(15), 97(34), 87(4), 83(39), 73(15), 71(55), 69(97), 60(44), 57(99), 55(100)
^{13}C-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)	1- CH_2(31.82); 2- CH_2(23.21); 3- CH_2 (29.19); 4- CH_2(29.07); 5- CH_2(29.25); 6- CH_2(29.15); 7- CH_2(34.6); 8- C(173.99); 9- CH_2(63.9); 10- CH_2(28.9); 11- CH_2(28.8); 12- CH_2(28.9); 13- CH_2(28.4); 14- CH_2(28.55); 15- CH_2(28.33); 16- CH_2(28.5); 17-CH_2(29.5); 18- CH_2(29.2); 19- CH_2(28.9); 20- CH_2(28.9); 21- CH_2(22.7); 22- CH_3(14.1); 23- CH_2(29.05); 24- CH_2(29); 25- CH_2(29.34); 26- CH_2(29.34); 27- CH_2(29.35); 28- CH_2(31.89); 29- CH_2(22.69); 30- CH_3(14.08);

Composto - *2.2.5-1*	***Arbutina*** – $C_{12}H_{16}O_7$ (M=272) *para* –Hidroxifenil-β-D-glucopiranósido Arbutósido
p.f. (ºC)	194 - 195
$[\alpha]_D$	- 59.5º (c=1, H_2O), T = 20 ºC
IV $\nu^{KBr}_{máx.}$ (cm^{-1})	3500-3200 (OH), 2910 (C-H), 1600, 1580 (C=C), 1115, 1065, 815
^{1}H-NMR δ (ppm)	7,03 (2H, d, *J* = 9 Hz, H-2, H-6), 6,82 (2H, d, *J* = 9Hz, H-3, H-5), 5.09 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H-1'), 3,69-3,38 (4H, m, H-2', H-3', H-4', H-5'), 3,72 (1H, dd, *J* = 5.8, 13.7 Hz, H-6'A), 3,83 (1H, dd, *J* = 2.1, 13.7 Hz, H-6'B)
^{13}C-NMR δ (ppm)	C-1(152.10), C-2(117.10), C-3(119.32), C-4(151.38), C-5 (119.32) C-6(117.10), C-1'(102.20), C-2'(73.77), C-3'(76.85), C-4'(70.25), C-5'(76.38), C-6'(61.35),

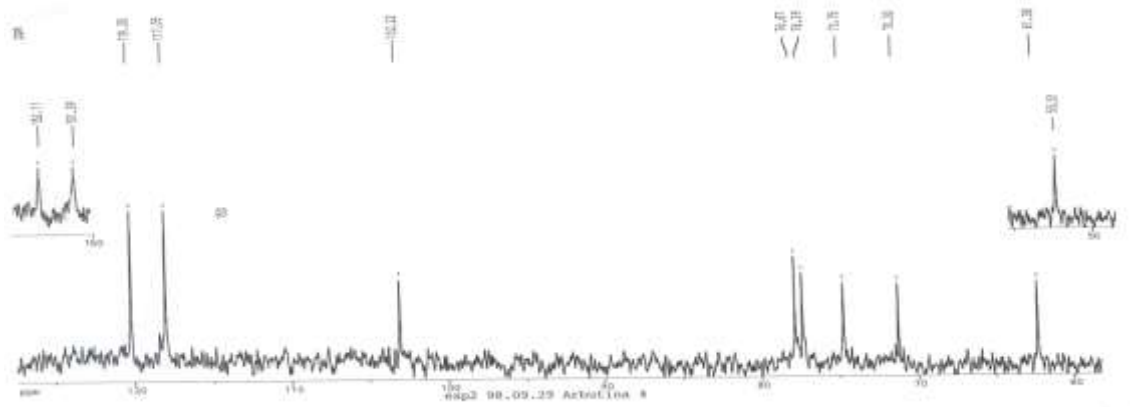


Espectro de ^{1}H-NMR da Arbutina (*2.2.5-1*).



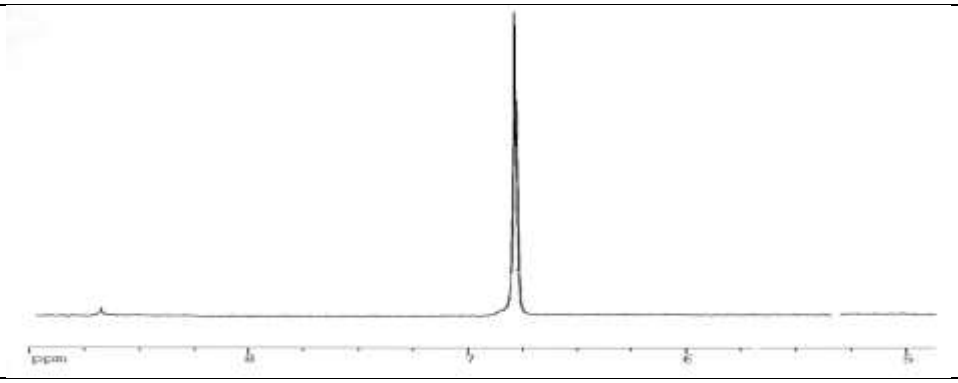
Espectro de ^{13}C-NMR da Arbutina (*2.2.5-1*).

Composto - *2.2.5-2*	**Metilarbutina** – $C_{13}H_{18}O_7$ (M=286) *para* –Metoxifenil-β-D-glucopiranósido Metilarbutósido
p.f. (ºC)	173 -176
$[\alpha]_D$	- 63,5º (c=1, H_2O), T = 20 ºC
IV $\nu^{KBr}_{máx.}$ (cm^{-1})	3482 (OH), 2972, 2930 (C-H), 1603, 1589 (C=C), 1139, 1116, 988, 900
^{13}C-NMR (D_2O) δ (ppm)	C-1 (152.1), C-2 (117.1), C-3 (119.3), C-4 (151.3), C-5 (119.3) C-6 (117.1), C-1' (102.2), C-2' (73.8), C-3' (76.9), C-4' (70.3), C-5' (76.4), C-6' (61.4), C-7 (CH_3O)(55.5)



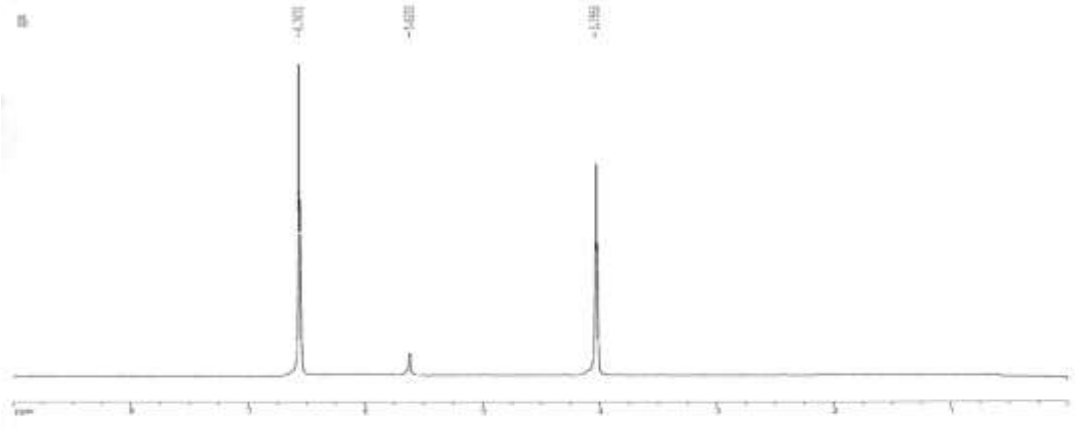
Espectro de ^{13}C-NMR da Metilarbutina (*2.2.5-2*).

Composto - *2.2.5-3*	**Hidroquinona** – $C_6H_6O_2$ (M=110) 1,4-Benzenodiol
p.f. (ºC)	167-170
IV $\nu^{KBr}_{máx.}$ (cm^{-1})	3262 (OH), 3031 (C-H), 1518, 1477 (C=C), 1255, 1244, 1222, 1210, 1192, 827, 759
^{1}H-NMR δ (ppm)	8,59 (2H, s), 6.58 (4H, s, H-2, H-3, H-5, H-6)



Espectro de ^{1}H-NMR da Hidroquinona (*2.2.5-3*).

Composto - *2.2.5-4*	**Metil-hidroquinona** – $C_7H_8O_2$ (M=124) *para*-Metoxifenol
p.f. (ºC)	50 - 53
IV $\nu^{KBr}_{máx.}$ (cm^{-1})	3401-3349 (OH), 1512, 1464 (C=C), 1246, 1236, 826, 736, 532
^{1}H-NMR ($CDCl_3$)δ (ppm)	6.76 (4H, s, H-2, H-3, H-5, H-6), 5.62 (1H, s), 3.75 (3H, s, CH_3)



Espectro de ^{1}H-NMR da Metil-hidroquinona