

# Identificação da Composição Química das Ceras

## Cuticulares de Folhas de Azinheira

### *Quercus ilex* subsp. *ballota*





UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Unidade de Ciências Exactas e Humanas

IDENTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS CERAS CUTICULARES  
DE FOLHAS DE AZINHEIRA-*Quercus ilex* subsp. *ballota*

Carlos Manuel Canas Martins

Dissertação apresentada na Unidade de Ciências Exactas  
e Humanas da Universidade do Algarve para obtenção do  
grau de Mestre em Química Celular

FARO

1996

UNIVERSIDADE DO ALGARVE  
SERVIÇO DE DOCUMENTAÇÃO

|          |       |
|----------|-------|
| 18108100 | 31934 |
|----------|-------|

581.1  
HAR - Jde

O conteúdo deste trabalho é da inteira responsabilidade do autor.

## Resumo

A cutícula é uma membrana lipofílica extracelular, constituída por uma matriz de polímero hidrofóbico impregnado de ceras e recoberta por uma camada de ceras superficiais, que reveste todas as partes tenras aéreas das plantas superiores. Foram investigadas as ceras cuticulares de folhas de *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp. usando métodos cromatográficos variados, após a sua extracção em clorofórmio. O isolamento e purificação das classes de compostos orgânicos constituintes das ceras foi efectuado por cromatografia em camada fina e cromatografia líquida de alta pressão preparativas. Para uma análise mais detalhada as classes de ceras foram submetidas a cromatografia gasosa (GC) e GC acoplada a espectrometria de massas, após processos de derivatização química sempre que tal se mostrou necessário e a identificação dos seus componentes foi efectuada por comparação com compostos padrão comerciais. Estas ceras consistem essencialmente de alcanos com cadeias entre 14 e 31 átomos de carbono e predominância do C<sub>29</sub>, ésteres n-alquílicos com cadeias entre 32 e 56 átomos de carbono e predominância dos C<sub>46</sub>, C<sub>44</sub>, C<sub>48</sub> e C<sub>42</sub>, aldeídos com cadeias entre 22 e 32 átomos de carbono e predominância do C<sub>30</sub>, ácidos carboxílicos com cadeias entre 16 e 30 átomos de carbono e predominância dos C<sub>22</sub> e C<sub>24</sub> e alcoóis primários com cadeias entre 22 e 26 átomos de carbono e predominância do C<sub>24</sub>. Adicionalmente, foram também encontrados triterpenóis nomeadamente  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina. No extracto ceroso obtido os ésteres e os alcoóis primários representam as classes maioritárias com 50 a 56 % e 20 a 27 %, respectivamente.

A composição da cera da Azinheira difere das investigadas em outras Fagáceas, em particular do *Quercus robur* L., por apresentar como constituinte maioritário a classe dos ésteres que, nesta planta, é a que existe em menor quantidade. Por outro lado, ambas as plantas evidenciam como componente dominante da classe dos alcoóis o tetracosanol, com quase 90 %. A distribuição de comprimentos de cadeia incide principalmente em números pares de átomos de carbono na maioria das classes identificadas, com excepção dos alcanos em que ocorrem cadeias moleculares longas, com um número maioritariamente ímpar de átomos de carbono.

## Abstract

The plant cuticle, an extracellular lipophilic membrane, made up of a hydrophobic polymer matrix impregnated with waxes and covered by a superficial wax layer, is a protective layer which covers all tender aerial parts of higher plants. Cuticular waxes from the leaves of the Holm Oak tree (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp.) have been investigated by using several chromatographic methods, after their extraction in chloroform. The separation of the wax into compound classes and their purification was done by preparatives thin layer chromatography and high pressure liquid chromatography. For further analysis the wax classes were submitted to gas chromatography (GC) or GC coupled to mass spectrometry, after chemical derivatization processes when necessary, and the identification of the components was done by comparison with standard compounds. These waxes consisting mainly of n-alkanes with chain lengths between 14 and 31 carbon atoms with C<sub>29</sub> as the main component, n-alkyl esters between 32 and 56 carbon atoms with C<sub>46</sub>, C<sub>44</sub>, C<sub>48</sub> and C<sub>42</sub> as the main components, aldehydes between 22 and 32 carbon atoms with C<sub>30</sub> as the main component, fatty acids between 16 and 30 carbon atoms with C<sub>22</sub> and C<sub>24</sub> as the main components and primary alcohols between 22 and 26 carbon atoms with C<sub>24</sub> as the main component. In addition, triterpenols, namely  $\alpha$ -amyrin and  $\beta$ -amyrin, were also found. In the whole extract alkyl esters and primary alcohols represent the main classes with 50-56 % and 20-27 %, respectively.

The wax composition of the leaves of the Holm-oak tree is different from other *Fagaceae*, particularly from *Quercus robur* L. wax in that the esters are the main constituent whereas in *Quercus robur* L. they are the least abundant constituent. In both plants tetracosanol, with almost 90 %, is the main component in the alcohols class. The chain length distribution presents an even number of carbon atoms in most identified classes, except in alkanes where long molecular chains with an odd number of carbon atoms are frequent.

# Lista de Símbolos e Abreviaturas

acet. - acetona;

ACP - proteína transportadora de grupos acilo ("acyl carrier protein");

°C - graus Celsius;

CHCl<sub>3</sub> - clorofórmio;

CH<sub>3</sub>OH - metanol;

cm - centímetro;

CoA - coenzima A;

DI - diâmetro interno;

FID - detector de ionização de chama ("flame ionisation detector"),

fig. - figura;

g - grama;

GC - cromatografia gasosa ("gas chromatography");

GC/MS - cromatografia gasosa/espectrometria de massas("gas chromatography/mass spectrometry");

hex. .- hexano;

HPLC - cromatografia líquida de alta pressão ("high pressure liquid chromatography");

m - metros;

mg - miligrama;

mL - mililitro;

mm - milímetro,

μm - micrómetro;

nm - nanómetro;

Nº - número;

% - percentagem;

PTFE - politetrafluoro etileno ("teflon");

R<sub>f</sub> - factor de retenção;

SEM - microscopia electrónica de varrimento ("scanning electron microscopy");

Temp. - temperatura;

TIC - cromatograma iónico total ("total ion chromatogram");

TLC - cromatografía em camada fina ("thin layer chromatography");

vs - vestígios;

# Lista das Espécies Referidas no Texto

Nomes Científicos (Castroviejo *et al*, 1990)

Nomes vulgares

*Beta vulgaris* L.

- beterraba

*Castanea sativa* Miller

- castanheiro

*Ceratonia siliqua* L.

- alfarrobeira

*Eucalyptus* spp.

- eucaliptos

*Fagus sylvatica* L.

- faia europeia

*Musa paradisiaca* L.

- bananeira

*Quercus avellaniformis* Colmeiro & E. Boutelou

- azinheira

*Quercus ballota* Desf.

- azinheira

*Quercus ilex* auct.

- azinheira

*Quercus ilex* L. subsp. *rotundifolia* (Lam.) T. Mor.

- azinheira

*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp.

- azinheira

*Quercus rotundifolia* Lam.

- azinheira

*Quercus suber* L.

- sobreiro

*Trifolium repens* L.

- trevo

*Vitis vinifera* L.

- videira

# Índice

|  |     |
|--|-----|
| RESUMO   | ii  |
| ABSTRACT   | iii |
| LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS                         | iv  |
| LISTA DAS ESPÉCIES REFERIDAS NO TEXTO                    | vi  |
| ÍNDICE   | vii |
| <br>   |     |
| INTRODUÇÃO   | 1   |
| <br>   |     |
| CAPÍTULO 1   | 3   |
| 1.1 A CUTÍCULA DAS PLANTAS                               | 3   |
| 1.1.1 Função e Estrutura Geral                           | 3   |
| 1.1.1.1 A Estrutura Física                               | 5   |
| 1.1.1.2 Composição e Propriedades Químicas               | 6   |
| 1.1.1.3 Características e Propriedades Físicas das Ceras | 8   |
| 1.1.2 Composição Cuticular das Fagáceas                  | 12  |
| 1.2 JUSTIFICAÇÃO E FINALIDADE                            | 19  |
| 1.3 CARACTERIZAÇÃO DA AZINHEIRA                          | 21  |
| 1.4 INOVAÇÃO E APLICAÇÕES CIENTÍFICO-TECNOLÓGICAS        | 23  |
| <br>   |     |
| CAPÍTULO 2   | 25  |
| 2.1 MATERIAIS E MÉTODOS                                  | 25  |
| 2.1.1 Material e Equipamento                             | 25  |
| 2.1.2 Métodos  | 27  |
| 2.1.2.1 Extracção das Ceras Cuticulares                  | 27  |
| 2.1.2.2 Análise do Extracto de Ceras Cuticulares         | 28  |



|   |     |
|---|-----|
| 3.1.1.4 Resultados de Análises                    | 54  |
| 3.1.1.4.1 Análise por GC/MS                       | 55  |
| 3.1.1.4.2 Análise Quantitativa dos Extractos      | 66  |
| 3.1.2 Discussão dos Resultados                    | 67  |
| 3.1.2.1 Da Extração                               | 67  |
| 3.1.2.2 Das Separações                            | 68  |
| 3.1.2.2.1 O Fraccionamento Inicial do Extracto    | 69  |
| 3.1.2.2.1.1 A Separação dos Alcanos e dos Ésteres | 72  |
| 3.1.2.2.1.2 A Separação entre Ésteres e Aldeídos  | 73  |
| 3.1.2.2.1.3 A Separação dos Alcoóis e dos Ácidos  | 74  |
| 3.1.2.3 Das Derivatizações Químicas               | 76  |
| 3.1.2.3.1 Derivatização dos Ésteres               | 76  |
| 3.1.2.3.1.1 Secagem do Metanol                    | 76  |
| 3.1.2.3.1.2 Transesterificação                    | 77  |
| 3.1.2.3.2 Derivatização dos Ácidos Gordos         | 78  |
| 3.1.2.3.3 Derivatização dos Alcoóis               | 80  |
| 3.1.2.4 Das Análises                              | 80  |
| 3.1.2.4.1 Análise por GC/MS                       | 80  |
| 3.1.2.4.2 Análise Densitométrica dos Extractos    | 84  |
| 3.1.2.5 Considerações Finais                      | 85  |
| <br>  |     |
| CAPÍTULO 4  | 95  |
| 4.1 CONCLUSÃO                                     | 95  |
| <br>  |     |
| ANEXO 1   | 98  |
| <br>  |     |
| AGRADECIMENTOS                                    | 102 |
| <br>  |     |
| BIBLIOGRAFIA                                      | 104 |

---

## Introdução

---

*"There is a paradox in the growth of scientific knowledge. As information accumulates in ever more intimidating quantities, disconnected facts and impenetrable mysteries give way to rational explanations, and simplicity emerges from chaos."*

[Bruce Alberts *et al*, in *Molecular Biology of the Cell*]

Todas as partes tenras aéreas das plantas superiores, nomeadamente caule, folhas, flores e frutos, encontram-se revestidas por uma camada cerosa que constitui a interface natural entre estas partes e o ambiente aéreo. O desenvolvimento desta camada de ceras foi uma condição indispensável ao passo evolutivo de plantas aquáticas para terrestres há cerca de 400 milhões de anos atrás e há mais de cem anos que se vem estudando a química destas substâncias. A sua

presença nas plantas resulta numa membrana praticamente impermeável à água, a que se deu a designação geral de cutícula, estrutura que constitui a matéria de estudo abordada neste trabalho.

Apesar da camada de ceras ter nas diferentes plantas a mesma função principal, constituir uma membrana impermeável que regule a transpiração minimizando a perda de água, a sua composição apresenta grandes variações qualitativas e quantitativas.

Este trabalho discutirá a composição química das ceras cuticulares da Azinheira, *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp., incidindo predominantemente nas técnicas utilizadas para a sua extracção, separação e análise, comparando-a com as composições conhecidas das ceras de outros membros da família taxonómica a que esta árvore pertence.

Com base na pesquisa bibliográfica efectua-se o enquadramento teórico do tema, em que a cutícula vegetal é descrita em função da sua estrutura física, composição química e função na planta. Estes aspectos são particularizados para uma espécie do mesmo género e contextualizados na informação disponível sobre essas características, na família.

Descriminados os vários pressupostos da hipótese geral que justifica o trabalho no Laboratório, procede-se então à descrição da experimentação específica seguida e à apresentação dos resultados obtidos. Na discussão dos resultados tentou efectuar-se a sua interpretação, através da compreensão dos processos químicos envolvidos e o seu enquadramento taxonómico, através da comparação das características estudadas na espécie em causa com outros elementos da família a que pertence.

---

# Capítulo 1

---

## 1.1 A Cutícula das Plantas

### 1.1.1 Função e Estrutura Geral

A cutícula vegetal, descoberta provavelmente por Brongniart em 1834, consiste numa película muito fina que reveste folhas, frutos, caules e flores das plantas superiores (Schreiber, 1996) e é a primeira barreira que as plantas apresentam ao ambiente aéreo uma vez que todas as substâncias químicas que, por acidente ou propositadamente, entrem em contacto com a superfície verde da planta, devem atravessar a cutícula antes de atingirem o seu interior. É um componente muito importante no processo de economia de água da planta, actuando como a principal barreira contra

a perda indiscriminada de água (Schönherr, 1982) e de nutrientes. Todas as trocas com o meio exterior ao vegetal são naturalmente condicionadas pelas características da cutícula que influenciam ainda, directa ou indirectamente, várias funções fisiológicas como a fotossíntese, a respiração e a transpiração, bem como a absorção e movimento da água e de alguns elementos minerais. Por outro lado, a adaptação das plantas às condições ambientais está dependente das características da cutícula. Sem esta cobertura protectora a transpiração da maioria das plantas terrestres ocorreria tão rapidamente que elas morreriam (Kolattukudy, 1987 in Salisbury & Ross, 1991). Também a resistência das plantas a agentes patogénicos e a alguns danos mecânicos pode estar relacionada com as características cuticulares. A eficácia de algumas práticas agronómicas também está ligada a aspectos da estrutura e propriedades da cutícula, como acontece, por exemplo, com a aplicação de reguladores de crescimento, de pesticidas e de adubos foliares. As propriedades físico-químicas desta estrutura desempenham assim um papel extremamente importante na eco-fisiologia da planta.

Na realidade, a estrutura e função da cutícula não estão ainda totalmente compreendidas. A sua observação e os resultados evidenciados por experimentações são interpretados de formas diferentes por diferentes autores. A cutícula não é mais que um revestimento contínuo de célula para célula, sobre a parede celulósica e primária, ligada à parede celular subjacente por uma camada rica em pectina e que se caracteriza quimicamente por dois grupos específicos de substâncias lipídicas, as cutinas poliméricas e insolúveis em clorofórmio (Holloway, 1982) que constituem a estrutura principal da cutícula e as ceras solúveis em clorofórmio depositadas quer à superfície, como ceras epicuticulares, quer no interior da matriz cutinosa, como ceras intracuticulares (Baker, 1982).

### 1.1.1.1 A Estrutura Física

Na maioria das plantas a cutícula não é estruturalmente homogénea, mas composta por camadas, cada uma das quais é definida em virtude da sua posição e constituição química, se bem que o número, a espessura e os limites destas camadas variem consideravelmente de acordo com as espécies e com o estágio de desenvolvimento.

A primeira camada em todas as plantas terrestres é a cera superficial que pode ter uma morfologia amorfa ou possuir uma estrutura cristalina ou semi cristalina (Baker, 1982). Apesar de em climas temperados esta camada ser normalmente fina, ela pode ser tão ou mais espessa que as camadas abaixo contendo cutina, como se verifica nas plantas características de climas tropicais. A cera superficial, por ser altamente hidrófoba, contribui decisivamente para a conservação da água da folha ou dos frutos (Moreira, 1980).

Abaixo da camada de cera superficial encontra-se a cutícula propriamente dita, ou cutícula própria, que consiste, juntamente com as ceras superficiais, na região mais exterior da membrana cuticular, desprovida de celulose ou de outros materiais característicos da parede celular. É uma camada contínua, rica em cutina e ceras cuticulares e que surge ao microscópio electrónico, geralmente, com um aspecto lamelar.

Abaixo da cutícula própria pode encontrar-se uma ou mais camadas de espessura variável entre a membrana cuticular e a camada celular da folha. Dum modo geral, estas camadas são consideradas incrustações de cutina e de cera cuticular na parede celular epidérmica, apresentando uma matriz sem estrutura definida e com um retículo de material electronicamente denso.

A figura 1.1 representa, esquematicamente, um modelo muito simplificado de uma cutícula vegetal ilustrando também algumas fibras hidrocarbonatadas que se estendem desde a parede celulósica

até ao interior cuticular. Especula-se que as fibras hidrocarbonatadas providenciam uma possível via hidrofílica desde o apoplasto aquoso até uma região muito próxima da superfície externa da cutícula. Por outro lado, a natureza fortemente viscosa da matriz cutinosa e das ceras sugere também a possibilidade de existência de descontinuidades no seio dos componentes lipofílicos da cutícula o que, juntamente com o referido componente hidrocarbonatado poderá constituir um *continuum* aquoso atravessando a cutícula (Cutler *et al*, 1982).

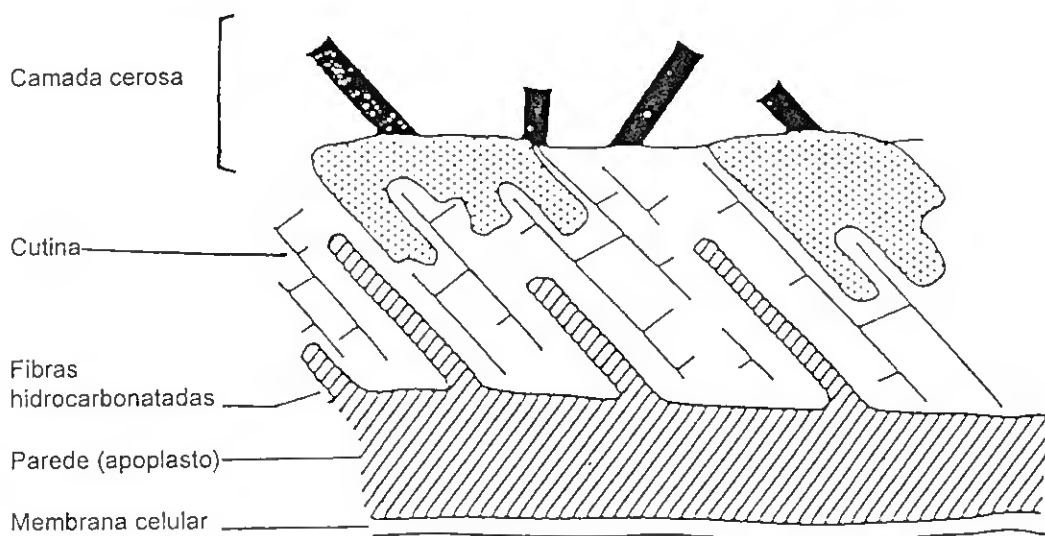


Figura 1.1 Representação esquemática de um modelo simplificado da cutícula vegetal (Price, 1982 in Cutler *et al*, 1982)

### 1.1.1.2 Composição e Propriedades Químicas

Numa parede epidérmica, as substâncias lipídicas que a constituem são consideradas ou de baixo peso molecular e extraíveis, ou altamente polimerizadas e insolúveis nos solventes habituais dos lípidos. As ceras cuticulares, incluídas nos lípidos extraíveis, têm uma composição bastante complexa variando qualitativa e quantitativamente de espécie para espécie, de órgão para órgão e nas diferentes fases de desenvolvimento (Gülz, 1994b), podendo ainda modificar-se com a variação das condições ambientais (Moreira, 1980). Elas são sintetizadas pela epiderme sendo então, de alguma forma secretadas para a superfície, onde apresentam uma estrutura que pode ter

uma morfologia diversa. Dum modo geral são constituídas quimicamente por várias famílias de substâncias de natureza hidrófoba como alcanos de cadeia longa (parafinas), alcoóis primários, derivados de alcanos, ácidos gordos e ácidos hidroxilados, ácidos gordos de cadeia longa esterificados com alcoóis primários de cadeia longa e, adicionalmente, aldeídos, alcoóis secundários, monocetonas, dicetonas, hidroxidicetonas e, muitas vezes, também, triterpenois (Baker, 1982; Gülz, 1992a). Como consequência desta composição química bem como da cutina, a superfície das folhas resulta hidrófoba e por isso raramente fica molhada pelo contacto com soluções aquosas. Esta repulsão da água das superfícies foliares reduz também a difusão de substâncias do interior das folhas para a superfície cuticular (Schreiber, 1996).

Relativamente à cutina, por outro lado, da sua saponificação obtém-se ácidos solúveis em éter. A referida natureza polimérica da cutina deve-se à existência de ligações éster unindo grupos hidroxilo e grupos carboxilo nesses ácidos gordos. Trabalhos recentes suportam o ponto de vista de que é, na realidade, uma rede polimolecular de ácidos carboxílicos e hidroxicarboxílicos com ligações éter e éster e também com algumas ligações peróxido, embora com menos frequência (Moreira, 1980), encontrando-se ainda neste biopolímero alguns compostos fenólicos que se julga servirem para ligar ácidos gordos a pectinas, por ligações éster, nas paredes celulares epidérmicas (Salisbury & Ross, 1991). Alguns grupos carboxílicos não sofrem contudo a esterificação, permanecendo livres e explicando assim a presença de cargas negativas na cutina e o consequente comportamento hidrófobo mais fraco do que o das ceras (Moreira, 1980). Segundo Kolattukudy e colaboradores (1975) a cutina das folhas é caracterizada pelas famílias de ácidos monocarboxílicos em  $C_{16}$  e  $C_{18}$ .

Além dos lípidos referidos, cutina e ceras e, da celulose e componentes derivados da fracção pécica, que são certamente os principais constituintes da zona mais interna da camada cuticular, têm-se encontrado ainda nesta camada algumas proteínas, cuja hidrólise origina os ácidos aspártico e glutâmico e outros aminoácidos que se supõe constituírem enzimas segregadas para a cutícula e subseqüentemente desnaturadas. As substâncias fenólicas, para além da função acima

referida, acredita-se estarem também relacionadas com fenómenos de concorrência entre plantas, no que se refere a competição pelo espaço ou por outros factores ambientais (Moreira, 1980).

### **1.1.1.3 Características e Propriedades Físicas das Ceras**

Em folhas maduras observa-se frequentemente, nas camadas de cera, as chamadas esculturas e/ou cristalóides cerosos sobrepostos, pelo que tem ainda interesse mencionar algumas características físicas destas substâncias. As ceras alifáticas têm tendência para cristalizarem no sistema ortorrômbico, mas podem apresentar-se num estado mais ou menos amorfo. São muito variáveis os arranjos geométricos em túbulos, pequenos rolos, palhetas ou placas mais ou menos dispersas, flocos e lamelas, entre outros. Aparentemente, a estrutura física das ceras está dependente da sua composição. Os ésteres alquílicos de cadeia longa, por exemplo, são um componente característico das ceras cuticulares de folhas e frutos de muitas espécies de Angiospérmicas, havendo fortes evidências de que desempenham um papel essencial como barreira ao transporte cuticular uma vez que formam os domínios cristalinos das ceras obstruindo assim a difusão da água e de solutos através da cutícula das plantas (Gülz, 1994a). Por outro lado, a presença de uma substância lipídica cerosa em particular, numa concentração relativamente alta dentro da mistura de ceras foliares, leva à formação de cristalóides de ceras com uma forma distinta e característica, verificando-se uma forte correlação entre determinados compostos químicos e a micromorfologia específica dos cristalóides cerosos que eles formam (Gülz & Boor, 1992).

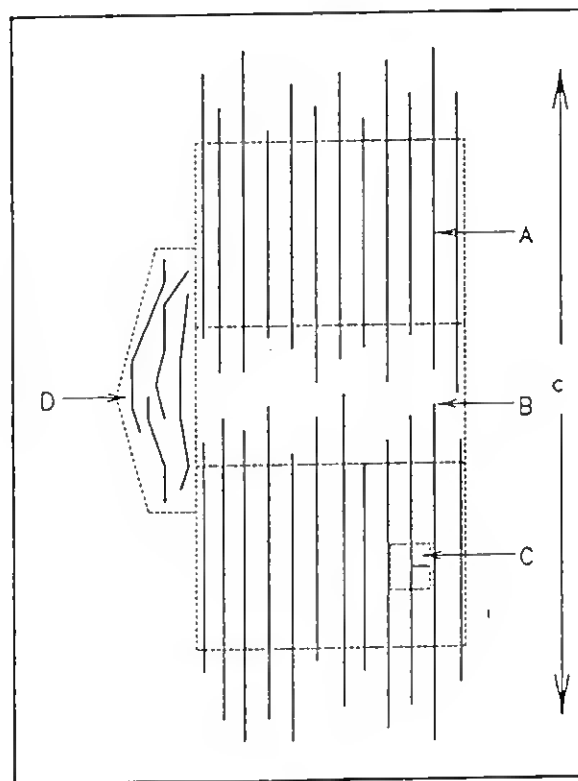
A ideia de que as ceras cuticulares das plantas possam existir como formas polimórficas de um líquido cristalino introduz alguns aspectos interessantes ao estudo da cutícula vegetal. Em geral os cristais líquidos têm a propriedade de sofrer transições de uma fase ou estado estrutural a outro, tais como transições entre fases esmécticas e nemáticas ou entre uma fase altamente ordenada

(sólida ou gel) para uma fase desordenada (fluida ou líquida). Estas transições de fase podem ser despetotadas pela temperatura (transições termotrópicas), por variações no solvente (transições liotrópicas) e por variações na pressão do sistema (transições barotrópicas), podendo também ser consequência da adição de pequenas quantidades de uma variedade de substâncias como por exemplo, alcoóis, anestésicos e pesticidas. No caso de sistemas biológicos o solvente em causa é a água e, no caso da cutícula vegetal as transições termotrópicas e liotrópicas são, provavelmente, as mais importantes. As fases altamente ordenadas caracterizam-se geralmente por uma baixa difusibilidade e baixo grau de tolerância a impurezas, isto é, têm tendência para ser sistemas de solvente fraco enquanto as fases desordenadas se caracterizam por uma alta difusibilidade e tolerância à dissolução de impurezas dentro da fase. A existência de vários componentes químicos na constituição de um cristal líquido permite ainda a heterogeneidade e separação de fases nestes sistemas. Sob determinadas condições um cristal líquido pode existir como um sistema homogéneo (fase ordenada ou desordenada), mas dentro de um determinado intervalo de temperaturas, pressões e composição do solvente, poderá existir como um sistema heterogéneo (com a coexistência de fases ordenadas e/ou desordenadas). Sabe-se que é este o caso nas bicamadas lipídicas e membranas biológicas (Cevc & Marsh, 1987).

A análise da estrutura química das ceras cuticulares das plantas indica que, de facto, algumas destas substâncias têm tendência para formar fases de cristais líquidos, semelhantes se bem que não necessariamente idênticas, às formadas pelos referidos componentes lipídicos das membranas celulares. Considerando então que as camadas de cera possuem um componente ou um carácter de cristal líquido, torna-se importante conhecer o termotropismo e o liotropismo dos constituintes químicos destas camadas, quer como componentes individuais puros (sistemas de componentes simples) quer como misturas (estados homogéneos ou heterogéneos), nas proporções em que eles aparecem nas plantas. A compreensão dos efeitos da temperatura e da humidade torna-se particularmente importante para plantas que crescem em regiões soalheiras e semi-áridas o que inclui as regiões de clima mediterrâneo, como o sul de Portugal. Se se tiver uma ideia do tipo de fases físico-químicas formadas pelas ceras cuticulares das plantas como sistemas quimicamente puros e como misturas (como aparecem na superfície das plantas), poderão ser

efectuados estudos para avaliar a influência de alguns constituintes ambientais (por exemplo, poluentes gasosos e pesticidas) no comportamento das fases e para se compreender este comportamento em resposta à partição destes químicos na cutícula, bem como a estabilidade de alguns deles (especialmente pesticidas) dissolvidos nas fases cerosas sob influências ambientais diversas (temperatura, humidade e exposição à luz).

Segundo Reynhardt *et al* (1993), ao nível molecular, uma cera consiste de fracções estruturalmente distintas com diferentes graus de ordem e de composição: zonas cristalinas, amorfas, amorfas móveis e amorfas rígidas, tal como se ilustra no esquema representado na figura 1.2.



**Figura 1.2** Diagrama esquemático de um modelo estrutural de ceras da camada cuticular (Reynhardt *et al*, 1993).

A zona A, cristalina pura, assemelha-se bastante a um alcano de cadeia simples, enquanto que a zona B, amorfa, contém terminações de cadeias. A zona A apresenta uma estrutura ortorrômbica que se transforma numa fase hexagonal à temperatura imediatamente abaixo daquela em que a cera se encontra completamente fundida. O tamanho da zona B depende da extensão da distribuição dos comprimentos das cadeias. Os defeitos ou imperfeições causados pelas ramificações das cadeias evidenciam-se na zona C, amorfa e rígida e geralmente pequena em ceras vegetais, enquanto que a zona D, amorfa e móvel, consiste de compostos cerosos de cadeia curta, com baixo ponto de fusão, que acabam entre cristalites durante o processo de cristalização. Esta zona, contudo, não está completamente separada do resto da estrutura atendendo a que uma fracção dela ocupa as lacunas da zona B, amorfa. Esta fracção é determinada pela temperatura e pela extensão da distribuição total de comprimentos das cadeias. Por aumento de temperatura a zona amorfa e móvel forma-se inicialmente dentro da zona B e só começa a formar-se fora dela depois de terem sido preenchidos os seus vazios.

Uma mistura de ceras não possui um ponto de fusão com um valor exacto, mas funde num largo intervalo de temperaturas (Reynhardt *et al*, 1993). À medida que a temperatura aumenta as zonas amorfas móveis vão crescendo à custa de outras zonas. Na zona A verifica-se a transição do arranjo ortorrômbico das cadeias alifáticas constituintes da sua rede cristalina para um arranjo hexagonal, enquanto que na zona B, em que existe um grau de ordem menor, se tornam possíveis movimentos de reorientação das terminações das cadeias. As cadeias menores da zona D, amorfa e sólida, tornam-se móveis surgindo a zona D, amorfa e móvel. O processo de fusão considera-se completo quando toda a amostra se encontra na fase líquida.

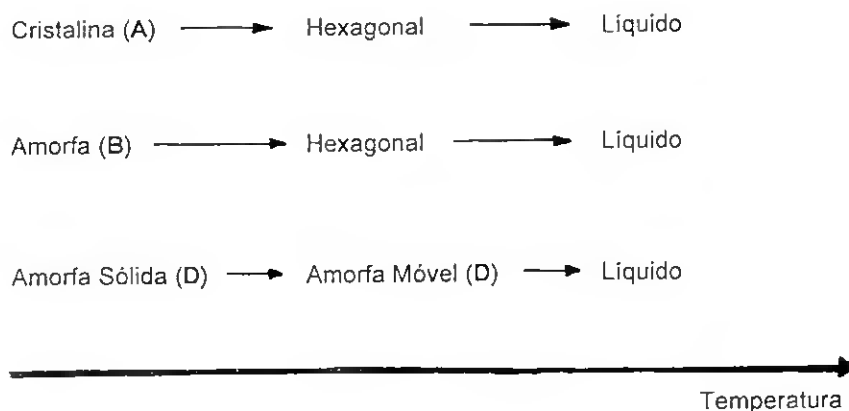


Figura 1.3 Transições termotrópicas propostas por Reynhardt e colaboradores (1993) para as ceras cuticulares cujo modelo se representou na figura 1.2.

### 1.1.2 Composição Cuticular das Folhas das Fagáceas

As variações das ceras dentro de uma mesma família de plantas podem ser bem ilustradas pelo exemplo das *Fagaceae*. As ceras das folhas da Faia europeia (*Fagus sylvatica* L.), do Castanheiro (*Castanea sativa* Miller) e do Carvalho comum (*Quercus robur* L.) possuem, numa forma geral, idênticas séries homólogas de hidrocarbonetos, de ésteres cerosos, de aldeídos, de alcoóis e de ácidos gordos, mas diferem na sua composição quantitativa (figura 1.4).

Enquanto que, para além das classes de compostos comuns, as ceras de *Fagus sylvatica* L. contêm adicionalmente ésteres benzoil-acílicos, as ceras de *Castanea sativa* Miller e de *Quercus robur* L. contêm os triterpenóides  $\beta$ -amirina,  $\alpha$ -amirina e lupeol e o *Quercus robur* L. contêm ainda o taraxerol.

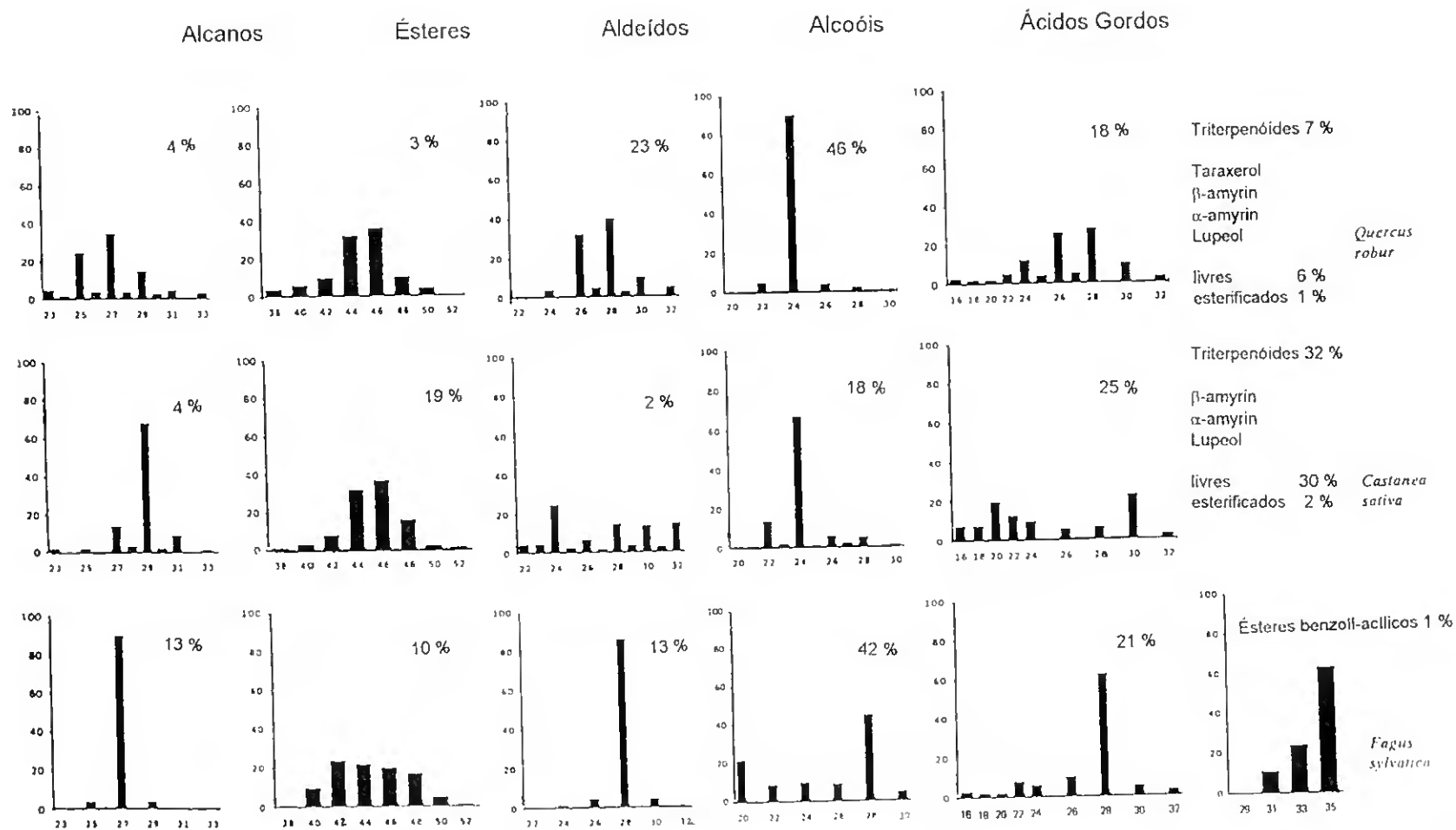


Figura 1.4 Composição e padrões de distribuição das ceras superficiais de folhas maduras de *Quercus robur* L., *Castanea sativa* Miller e *Fagus sylvatica* L. (Gülz, 1994b).

Estudos acerca da variação da composição química ao longo do desenvolvimento foliar revelam que, ao longo das diversas fases de desenvolvimento, nenhuma das classes lipídicas, constituintes das ceras superficiais de *Fagus sylvatica* L. e de *Castanea sativa* Miller, aparece representada numa percentagem relativa tão elevada como a que se verifica relativamente aos alcoóis primários nas ceras de *Quercus robur* L. (Gülz, 1994b). Nesta espécie, em folhas completamente desenvolvidas, o álcool tetracosanol é o componente dominante na classe, com mais de 90 %, situação que não se verifica nas outras plantas, em que não ocorre um componente maioritário pertencente a uma determinada classe lipídica que, por sua vez, também seja maioritária na composição química da complexa mistura de classes de substâncias constituintes das ceras.

Por outro lado, sabe-se que a composição das ceras de folhas maduras é diferente da das folhas jovens. Após o desenrolamento das folhas ocorre uma forte dinâmica de biossíntese de diferentes lípidos cerosos, frequentemente com um comprimento de cadeia distinto. Por exemplo, em *Fagus sylvatica* L., são sintetizados predominantemente compostos cerosos com comprimento de cadeia de C<sub>28</sub> enquanto que em ceras de *Quercus robur* L. é o tetracosanol que continua a ser predominantemente sintetizado. Adicionalmente, há substâncias que apenas são sintetizadas depois do desenrolamento foliar, podendo ser detectadas pela primeira vez 10 dias depois (Gülz, 1994b). É o caso dos aldeídos quer em *Fagus sylvatica* L., quer em *Quercus robur* L.. A figura 1.5 representa a composição das ceras foliares em *Quercus robur* L., analisada em estádios diferentes de desenvolvimento sendo a última análise a representativa do valor médio para as folhas maduras (Gülz, 1994b).

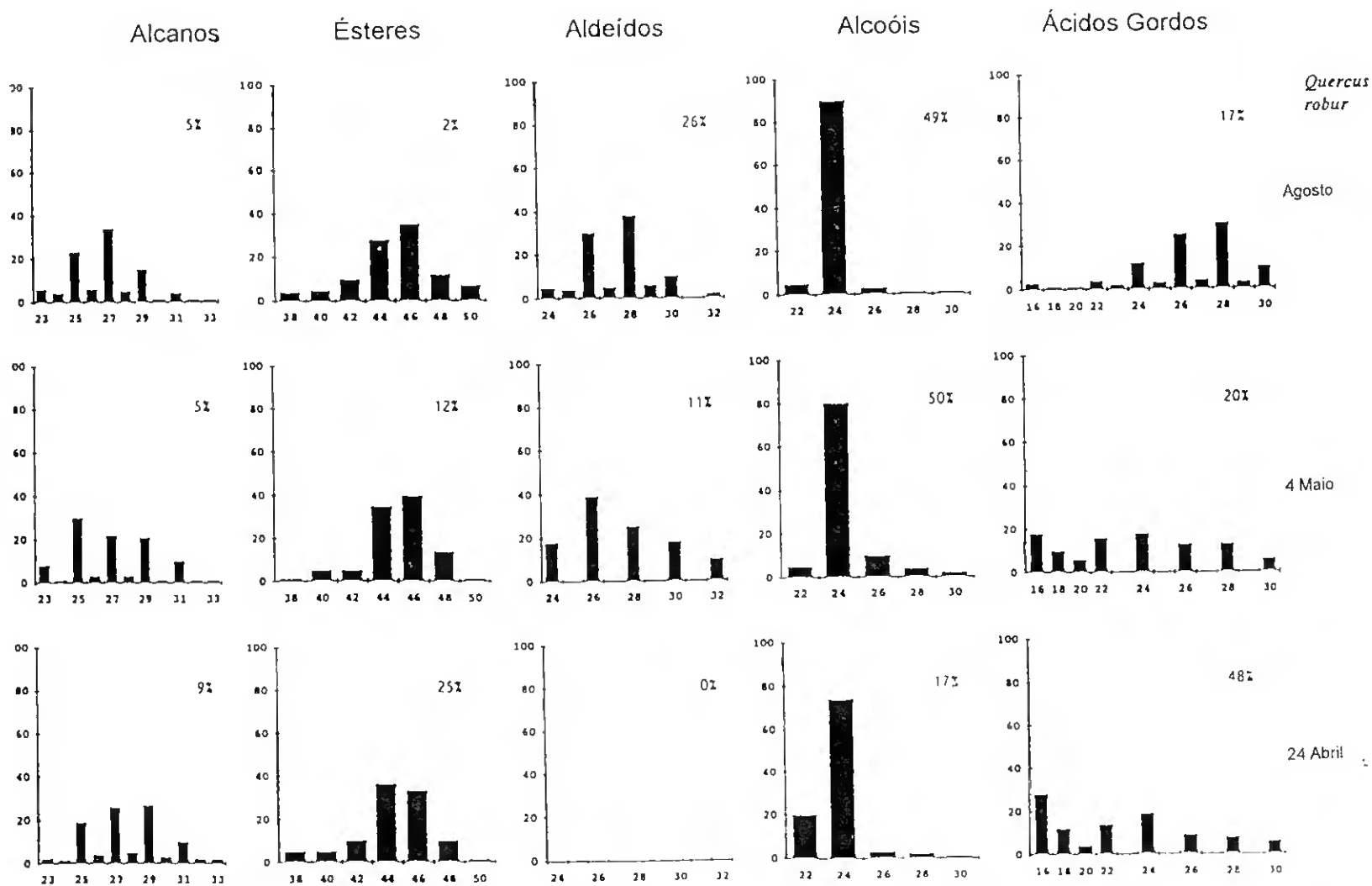


Figura 1.5 Composição e padrões de distribuição das ceras superficiais de *Quercus robur* L. em diferentes estádios de desenvolvimento (Gülz, 1994b).

A estrutura das ceras superficiais de folhas maduras, ilustrada através da técnica de microscopia electrónica de varrimento ("SEM"), evidencia a presença de cristalóides cerosos, formados por um arranjo denso e compacto de plaquetas de orlas cortantes em ambos os lados das folhas de *Quercus robur* L., com uma maior concentração e orientação à volta dos estomas. Estas estruturas cerosas, certamente condicionadas pela alta concentração do álcool tetracosanol (Gülz & Boor, 1992) que representa cerca de 40 % da cera superficial, não ocorrem nas folhas de *Fagus sylvatica* L. e de *Castanea sativa* Miller que apresentam uma camada contínua de cera na superfície inferior das folhas e, na superfície superior, apenas se verifica uma deposição de ceras, formando aquilo a que se chama esculturas, mas sem quaisquer estruturas cristalóides definidas. De facto, o desenvolvimento de cristalóides cerosos só é possível se uma só substância estiver presente numa concentração de mais de 80 % dentro de uma classe lipídica dominante (por exemplo, em cerca de 40 %). Considerando que espécies de plantas pertencentes à mesma família têm composições diferentes dos lípidos constituintes das suas ceras, elas têm, conseqüentemente, ultraestruturas cerosas superficiais também diferentes.

Em *Quercus robur* L., a temperaturas superiores a 30°C verifica-se a fusão de parte dos cristalóides cerosos, começando a verificar-se o arredondamento dos bordos das plaquetas, seguindo-se a sua fusão integral e coalescência. As transições entre ambas as formas cerosas ocorre entre limites pouco precisos, podendo observar-se, em pequenas áreas, as duas formas juntas. Nunca foi registada a fusão dos cristalóides cerosos em toda a região de uma folha, ocorrendo normalmente em partes distintas, que são certamente aquelas mais directamente expostas ao sol. Inversamente, quando a temperatura desce, observa-se a recristalização das plaquetas cerosas (Gülz & Boor, 1992).

Relativamente à constituição química da camada cutinosa das folhas das *Fagaceae*, Matzke & Riederer (1991) referem a obtenção dos seguintes monómeros alifáticos, quando é provocada a sua despolimerização: ácidos gordos monobásicos de cadeia longa, ácidos  $\omega$ -hidroximonobásicos,

ácidos dihidroximonobásicos, ácidos trihidroximonobásicos e ácidos epoxihidroximonobásicos, cuja discriminação se apresenta na tabela 1.1.

O comprimento das cadeias alifáticas dos monómeros inclui desde C<sub>16</sub> a C<sub>22</sub> sendo a maioria dos constituintes saturada, com exceção dos ácidos octadecenóico, octadecadienóico, octadecatrienóico e 18-hidroxi octadecenóico. Adicionalmente ao material alifático foi também identificado ácido ferrúlico e cumárico e ainda β-sitosterol.

**Tabela 1.1** Composição do resultado da despolimerização com  $\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  da camada de cutina das folhas de *Fagus sylvatica* L. e de *Quercus robur* L. (Matzke & Riederer, 1991).

| Composto <sup>a</sup>                          | <i>Fagus sylvatica</i> L. |                   | <i>Quercus robur</i> L. |                  |
|--|---------------------------|-------------------|-------------------------|------------------|
|  | mg.m <sup>-2</sup>        | %                 | mg.m <sup>-2</sup>      | %                |
| <i>Ácidos Gordos Monobásicos:</i>              |                           |                   |                         |                  |
| Hexadecanóico                                  | 62.4                      | 9.9               | 44.8                    | 3.3              |
| Octadecanóico                                  | 5.2                       | 0.8               | 6.4                     | 0.5              |
| Octadecenóico                                  | -                         | -                 | 15.5                    | 1.2              |
| Octadecadienóico                               | 224 <sup>b</sup>          | 35.7 <sup>b</sup> | 79.6 <sup>c</sup>       | 5.9 <sup>c</sup> |
| Octadecatrienóico                              | -                         | -                 | -                       | -                |
| Docosanóico                                    | 4.5                       | 0.7               | vs                      | vs               |
| Total  | 296                       | 47.1              | 146                     | 10.8             |
| <i>Ácidos Gordos Dibásicos</i>                 |                           |                   |                         |                  |
|  | -                         | -                 | -                       | -                |
| <i>Ácidos Gordos ω-hidroxi-monobásicos:</i>    |                           |                   |                         |                  |
| 16-OH-hexadecanóico                            | 8.9                       | 1.4               | 12.7                    | 0.9              |
| 18-OH-octadecenóico                            | 19.8                      | 3.2               | 133                     | 0.9              |
| Total  | 28.7                      | 4.6               | 146                     | 10.8             |
| <i>Ácidos Gordos 2-hidroxi-monobásicos:</i>    |                           |                   |                         |                  |
| 2-OH-hexadecanóico                             | 1.9                       | 0.3               | -                       | -                |
| 2-OH-docosanóico                               | 8.0                       | 1.3               | -                       | -                |
| 2-OH-tetracosanóico                            | 5.5                       | 0.9               | -                       | -                |
| Total  | 15.4                      | 2.5               | -                       | -                |
| <i>Ácidos Gordos Dihidroxi-monobásicos:</i>    |                           |                   |                         |                  |
| DiOH-hexadecanóico <sup>d</sup>                | 110                       | 17.4              | 361                     | 26.8             |
| <i>Ácidos Gordos Trihidroxi-monobásicos:</i>   |                           |                   |                         |                  |
| 9,10,18-TriOH-octadecanóico                    | 12.7                      | 2.0               | 18.5                    | 1.4              |
| <i>Ácidos Gordos Epoxihidroxi-monobásicos:</i> |                           |                   |                         |                  |
| 9,10-Epoxi-18-OH-octadecanóico                 | 77.2                      | 12.3              | 411                     | 30.5             |
| <i>Alcoóis Primários:</i>                      |                           |                   |                         |                  |
| Heptadecanol                                   | -                         | -                 | -                       | -                |
| Octadecanol                                    | 3.3                       | 0.5               | -                       | -                |
| Eicosanol                                      | vs                        | vs                | -                       | -                |
| Octacosanol                                    | vs                        | vs                | -                       | -                |
| Total  | 3.3                       | 0.5               | -                       | -                |
| <i>Dióis</i>                                   |                           |                   |                         |                  |
|  | -                         | -                 | -                       | -                |
| <i>Não identificados</i>                       |                           |                   |                         |                  |
|  | 85                        | 13.6              | 265                     | 19.7             |
| <hr/>  |                           |                   |                         |                  |
| <i>Monômeros totais</i>                        | 629                       | 100.0             | 1350                    | 100.0            |

a) Determinado como o correspondente derivado éster metílico e éter trimetilsilílico, sempre que necessário;

b) Soma dos ácidos octadecenóico, octadecadienóico e octadecatrienóico; c) Soma dos ácidos octadecadienóico e octadecatrienóico; d) Ácido 10,16-dihidroxihexadecanóico em *Quercus robur* L. e ácidos 8,16- e 9,16-dihidroxihexadecanóico em *Fagus sylvatica* L., não detectado; vs, vestígios.

## 1.2 Justificação e Finalidade

Este trabalho de investigação decorreu no Laboratório de Bioquímica da Unidade de Ciências Exactas e Humanas da Universidade do Algarve onde faz parte de um projecto de investigação mais alargado que estuda as consequências eco-fisiológicas das propriedades físico-químicas da cutícula das plantas e que aprofunda a química-física da cutícula vegetal, incluindo estudos de permeação e partição de algumas substâncias químicas através da cutícula, a caracterização química da matriz polimérica da cutícula própria, a caracterização química das ceras cuticulares e a caracterização do polimorfismo termotrópico das ceras cuticulares que se supõe ser um aspecto particularmente importante no controlo do fluxo e retenção de água nas plantas. Neste sentido estão a ser estudadas três espécies de plantas nativas do sul de Portugal: a Azinheira [*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp.], o Sobreiro (*Quercus suber* L.) e a Alfarrobeira (*Ceratonia siliqua* L.).

Sabe-se que as características cuticulares influenciam as adaptações ecológicas de numerosas espécies de plantas podendo destacar-se, em particular, a resistência à secura de certas plantas, certamente relacionada com a fraca transpiração cuticular ou com a capacidade de absorção cuticular da água dos orvalhos e nevoeiros. Numa região como o Algarve, onde as plantas são sujeitas para além de alguns períodos de resistência à secura, a intensa incidência dos raios solares, as suas superfícies cuticulares podem conter substâncias capazes de reflectirem a luz, como ceras no estado cristalino ou eventualmente espículas de sílica, exemplos de possíveis adaptações específicas que não surgem em plantas de sombra. Assim, procurou seleccionar-se como fonte de estudo uma espécie não só nativa e abundante na região, mas também característica e bem adaptada, cuja cutícula não tivesse uma composição química já identificada e eventualmente passível de ilustrar algumas diferenças relativamente a outras espécies já estudadas.

Deste modo, o objectivo do trabalho consistiu no isolamento e identificação dos constituintes químicos das ceras cuticulares das folhas de uma árvore de reconhecida importância económica e ecológica no sul de Portugal, a Azinheira [*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp.], um componente importante do ecossistema nesta região do país. Considerando que as principais perdas de água das plantas resultam da transpiração, a tese que deu origem a este estudo baseia-se na suposição de que a camada cerosa superficial é uma das principais estruturas responsáveis pela economia hídrica da planta. Atendendo a que a maior parte da transpiração ocorre por evaporação superficial, quer através da cutícula das células dos complexos estomáticos quer através da cutícula das restantes células epidérmicas (Moreira, 1980), torna-se evidente a importância das propriedades características destas superfícies, especialmente a sua homogeneidade ou heterogeneidade em termos físico-químicos, ou seja, a existência de uma única fase ou a coexistência de mais que uma fase na zona de ceras superficiais, que a tornam, conseqüentemente, uma camada contínua ou descontínua, em que as eventuais falhas de continuidade funcionam como "comportas" de escape da água. Reynhardt e colaboradores (1993), por outro lado, ao explicarem a baixa permeabilidade da cutícula à água referem a existência de domínios de cera cristalina no seu interior. Estes domínios cristalinos constituem zonas de exclusão de eventuais moléculas difundindo através da cutícula, pelo que a sua presença reduz a área seccional disponível para a difusão e aumenta o comprimento do percurso efectivo que essas moléculas terão de efectuar.

As ceras cuticulares experimentam pois transições de fase de um estado cristalino ordenado a um estado líquido desordenado, a uma temperatura de transição de fase característica. Em misturas como as encontradas em cutículas estas transições de fase ocorrem num largo intervalo de temperaturas cujo limite inferior ronda os 30-40 °C, temperatura que, na região, facilmente se atinge por acção do sol directo sobre a superfície de uma folha. Conseqüentemente, impõe-se saber em que condições as ceras se comportam de uma maneira homogénea ou heterogénea, ou seja, torna-se necessário obter um diagrama de fases em função da temperatura e composição da camada. Para o efeito, há que ter o conhecimento prévio da composição química e do comportamento de cada componente ou grupo de componentes, quer individualmente quer em

misturas com os outros componentes ou grupos de componentes bem como ter o conhecimento dos limites de temperatura em que ocorrem, na Azinheira, estas transições de fase.

Este polimorfismo termotrópico poderá estar relacionado com o controlo da retenção e fluxo de água na planta, aspecto de particular importância se considerarmos que a árvore estudada, aparentemente tão bem adaptada à região e elemento dominante na flora endémica original, apesar de posteriormente destruída nas campanhas do trigo nos anos '60, se encontra igualmente bem adaptada a regiões com condições ambientais, principalmente a nível da temperatura média diária e da disponibilidade de água, tão distintas como sucede no norte do país e em outras regiões da Península Ibérica, onde esta árvore também surge com uma excelente capacidade de adaptação. Além do polimorfismo termotrópico este tipo de ceras apresenta, provavelmente também, se bem que não exista ainda evidência disso, um polimorfismo liotrópico.



### 1.3 Caracterização da Azinheira

Tal como no Alentejo, deve ter predominado originalmente no Algarve, a floresta xerofítica, com o domínio do sobreiro (*Quercus suber* L.) nos sítios de clima com feição atlântica, delimitados a sudeste pelas serras da Mesquita, Monchique e Espinhaço de Cão e com o domínio da azinheira [*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp.] na restante e maior parte. O nome científico referido para a azinheira é o aprovado pelo Código Internacional de Nomenclatura (Castroviejo *et al*, 1990), apesar de frequentemente se encontrarem na literatura os seguintes sinónimos: *Quercus ballota* Desf., *Quercus rotundifolia* Lam., *Quercus ilex* L. subsp. *rotundifolia* (Lam.) T. Mor., *Quercus avellaniformis* Colmeiro & E. Boutelou e *Quercus ilex* auct..

O género *Quercus* apresenta alguns problemas de taxonomia e nomenclatura devido à frequência do aparecimento de híbridos. As folhas das árvores deste género, no que se refere à forma, margens e dimensões, podem variar muito dentro da mesma espécie, consoante se trate de indivíduos jovens ou adultos ou se trate de folhas que pertençam a ramos normais da copa ou a rebentos do tronco. Nas regiões mais quentes da Península é vulgar que se produzam, para além dos ramos normais com folhas típicas, outros que se desenvolvem no Verão com folhas de um modo geral maiores, com um maior número de nervuras e um pecíolo mais curto. Este dimorfismo foliar, não conhecido nas regiões extra mediterrâneas da Europa, tem originado alguma confusão e, inclusivamente, sido causa para a descrição de pretensos novos taxones.

A Azinheira é uma árvore ou um arbusto da famílias das *Fagaceae*, pertencente ao género *Quercus*, sendo a subespécie *ballota* da espécie *Quercus ilex* L., podendo atingir cerca de 8 a 12 metros de altura, com uma copa ampla, densa e arredondada. As suas folhas, persistentes, muito coriáceas e pequenas, variam normalmente de orbiculares a elípticas ou lanceoladas sendo dentado-espinhosas no estado juvenil e depois inteiras, com 5 a 8 pares de nervuras secundárias inseridas a 50-70° e um pecíolo de 3 a 6 mm. É uma árvore que se mantém sempre verde pois as suas folhas permanecem na árvore até três anos, renovando-se sucessivamente. As flores são unissexuais, pouco vistosas, agrupadas em inflorescências. É uma espécie característica de zonas mediterrâneas continentais ou sub-continentais ou até litorais, crescendo sempre sob condições climáticas bastante quentes e secas e sendo pouco exigente quanto à natureza do substrato. A Azinheira cresce em qualquer tipo de solo, subindo na montanha até aos 1900 metros em encostas expostas ao sol. É a árvore característica das regiões mais secas da Península Ibérica (com excepção das regiões de clima atlântico do norte e noroeste), França mediterrânea e Norte de África. Constitui frequentemente bosques mais ou menos extensos, muitas vezes destruídos para dar lugar a culturas de sequeiro, vinhas ou plantações de pinheiros e eucaliptos. Em Portugal, consoante a região, é designada por azinheira, azinho, sardão, sardoeira, chaparro e chaparreiro. O fruto desta árvore é a bolota, que chega a ser o mais doce do género e é comestível, sendo muito utilizado para a alimentação do gado suíno e também, se bem que em menor escala, para a alimentação humana, sobretudo assada como as castanhas.

## 1.4 Inovação e Aplicações Científico-Tecnológicas

Pretendeu-se com este trabalho, identificar a composição química da primeira camada/barreira existente na cutícula das folhas de uma espécie vegetal característica da região e efectuar a sua análise quantitativa, primeiros passos do conhecimento básico necessário para que se possa futuramente investigar a estrutura física das suas ceras cuticulares e, principalmente, as respectivas implicações eco-fisiológicas a nível das propriedades de transporte através da cutícula desta espécie, a sofrer, actualmente, de um certo declínio nesta região quer tanto a nível da atenção que merece a sua preservação enquanto componente importante do ecossistema, quer mesmo a nível fisiológico (Brasier *et al*, 1993; Bussotti *et al*, 1995).

Para além de que não era conhecida nem a composição química nem a estrutura molecular e supramolecular das ceras cuticulares da espécie estudada, dados de alguma importância filogenética uma vez que constituem o conhecimento básico necessário para uma comparação real dessas características com outras espécies e subespécies do género *Quercus* na Península, há outros aspectos inovadores do ponto de vista científico e tecnológico, que se espera que este trabalho possa directa ou indirectamente ter contribuído.

Assim, sabe-se que é muito reduzido o número de estudos respeitantes aos efeitos ambientais sobre as propriedades químicas e físicas das cutículas das plantas e, no que respeita a *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp., a literatura é omissa. A partir da informação sobre a composição química de primeira camada da cutícula poder-se-ão concretizar estudos nessa linha de investigação possibilitando, deste modo, a correcta planificação de projectos de florestamento e de medidas de prevenção que urge tomar relativamente à eco-fisiologia desta planta.

Por outro lado, sabe-se também que nos processos de impermeabilização de frutos, com o objectivo de melhorar a sua conservação, se utilizam frequentemente ceras parafínicas. A

substituição destas, por ceras equivalentes às naturais, após os testes obviamente necessários seria, do ponto de vista sanitário, altamente vantajosa. Os resultados obtidos poderão assim ser aplicados ao desenvolvimento de impermeabilizantes naturais para o revestimento de frutos.

Poder-se-ão ainda acrescentar as implicações relacionadas com o destino de substâncias químicas que, uma vez introduzidas na cutícula, oriundas do meio atmosférico, se revertem de enorme importância eco-toxicológica. Não existem, por outro lado, dados sobre a bioconcentração de agro-químicos e dos seus produtos de degradação no meio cuticular. Sendo os princípios activos dos pesticidas, geralmente lipossolúveis, o seu tempo de retenção na cutícula é elevado, tornando importante o conhecimento da sua concentração e da química e cinética dos processos de foto- e termodegradação que aí têm lugar. Alguns destes compostos podem ligar-se covalentemente a grupos epóxido das cutículas, permanecer imóveis e não se redistribuírem. Outros, que apenas se encontrem solubilizados na cutícula, são móveis, podendo difundir para fora dela, dependendo das direcções e magnitudes das forças responsáveis por esses movimentos, estudos que apenas poderão ser concretizados a partir da identificação prévia da composição química do meio em que ocorrem. Por outro lado, o conhecimento que se vier a adquirir sobre as alterações das propriedades da cutícula devido à interacção com agro-químicos e com os seus produtos de degradação poderá levar ao desenvolvimento de formulações menos agressivas e que optimizem a penetração e acção dos princípios activos. Um estudo futuro sobre a partição e estabilidade de pesticidas na cutícula será uma importante contribuição no campo do desenho de novas formulações.

---

## Capítulo 2

---

### 2.1 Materiais e Métodos

#### 2.1.1 Material e Equipamento

Em relação ao material biológico, foram usadas folhas jovens de *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp., recolhidas no próprio dia da extracção das suas ceras cuticulares, de uma árvore crescida no litoral sob acção de um clima marcadamente mediterrâneo e num solo de composição essencialmente argilo-arenosa, em Pinheiros de Marim, concelho de Olhão;

Os reagentes utilizados foram de qualidade "analítica" e de origem comercial. Os solventes utilizados foram de qualidade "para cromatografia". Todo o material de laboratório usado para a armazenagem das amostras e durante a sua manipulação foi de material resistente à acção de solventes orgânicos (vidro ou "Teflon"). Os seguintes compostos padrão foram obtidos da Sigma Chemical Company: alcanos (do C<sub>8</sub> ao C<sub>30</sub> e os C<sub>32</sub>, C<sub>34</sub>, C<sub>36</sub>, C<sub>38</sub>, C<sub>40</sub>, C<sub>44</sub> e C<sub>50</sub>); ésteres (C<sub>24</sub>, C<sub>32</sub>, C<sub>40</sub>, C<sub>44</sub>); ésteres metílicos (os C<sub>7</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>17</sub>, C<sub>19</sub>, C<sub>21</sub>, C<sub>23</sub> e do C<sub>25</sub> ao C<sub>32</sub>); alcoóis primários (do C<sub>8</sub> ao C<sub>22</sub> e os C<sub>24</sub>, C<sub>26</sub>, C<sub>28</sub> e C<sub>30</sub>); ácidos carboxílicos (os C<sub>12</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub>, C<sub>22</sub>, C<sub>24</sub>, C<sub>26</sub>, C<sub>28</sub> e C<sub>30</sub>); aldeído (C<sub>16</sub>) e cetona (C<sub>16</sub>).

As HPLC preparativas foram feitas utilizando colunas Lobar Si 60 e RP18, com 24 cm de comprimento, 11 mm de diâmetro interno e partículas de 40-63 µm, de marca Merck, e uma bomba para HPLC, marca ELDEX, modelo "A-120-S-2". As fracções foram colectadas utilizando um colector de fracções, marca ISCO, modelo "Retriever™ 500". As fracções foram concentradas utilizando uma centrífuga concentradora de amostras, sob baixo vácuo, marca LABCONCO, modelo "78100-01".

A cromatografia gasosa foi efectuada com uma coluna capilar apolar SE 30, da Alltech, com 30 metros de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e uma espessura de película de 0,25 µ, num cromatógrafo de gases, marca HR PTV DANI, modelo "DANI 3800 Gas Chromatograph", equipado com integrador de marca Hewlett Packard, modelo "3390 A Integrator", ligado a um detector de ionização de chama (FID) e no cromatógrafo de gases, marca Fisons Instruments, modelo "8035-GC 8000 Series", ligado a um detector de espectrometria de massa, marca Fisons Instruments, modelo "TRIO 1000" e a uma impressora, marca OKI, modelo "Microline 320 Elite". A cromatografia em camada fina foi feita utilizando placas pré-preparadas de sílica gel 60, analíticas e preparativas, com 0,25 mm e 2 mm de espessura respectivamente, de marca Merck. A densitometria em camada fina foi efectuada com um densitómetro, marca LKB Bromma, modelo "Ultrosan XL Enhanced Laser Densitometer".

## 2.1.2 Métodos

### 2.1.2.1 Extracção das Ceras Cuticulares

O trabalho foi iniciado com a colheita das folhas de Azinheira, tendo sido seleccionadas apenas as folhas juvenis, ou seja, folhas desenvolvidas na própria estação em que foram colectadas. Efectuaram-se duas colheitas, a primeira em Julho de 1995 e a segunda em Janeiro de 1996.

Após a recolha, os ramos foram submetidos a uma lavagem em água corrente, de uma torneira, depois passados por água destilada de forma a serem retiradas as poeiras e outras impurezas sobre eles depositadas. Foram agitados vigorosamente para retirar o excesso de água e depositados sobre várias camadas de papel absorvente, onde se procedeu à selecção das folhas sem danos físicos e melhor representativas de cada ramo, tendo, para o efeito, sido escolhidas as folhas centrais localizadas entre a terceira e a oitava folhas, numeradas a partir da extremidade de crescimento do ramo. Cada folha foi retirada com o respectivo pecíolo, pesadas no seu conjunto e repartidas por três balões de "Erlenmeyer" de 500 mL. Foi adicionado clorofórmio ao primeiro recipiente permitindo assim que as folhas ficassem imersas neste solvente durante 15 minutos, submetidas simultaneamente a uma agitação manual suave. O volume de solvente utilizado foi apenas o suficiente para que, no interior do recipiente, todas as folhas ficassem imersas. Decorridos os primeiros 15 minutos esse solvente foi transferido para o segundo balão de modo a poder actuar sobre o segundo conjunto de folhas e, seguidamente, após idêntico procedimento, foi transferido para o balão contendo o terceiro conjunto de folhas. O solvente com o material extraído foi então filtrado para um balão "kitasato" com a ajuda de uma trompa de água e foi evaporado a 40 °C, sob uma pressão reduzida por um evaporador rotativo. Nas situações em que o material não foi analisado imediatamente, foi solubilizado num volume mínimo de clorofórmio e armazenado num recipiente de vidro, bem isolado, a -18 °C.

Para evitar problemas de contaminação que pudessem ocorrer durante a extração devido a compostos estranhos que acidentalmente fossem introduzidos pelo solvente ou pelo equipamento usado teve-se em atenção alguns cuidados. Foi rigorosamente evitado o contacto do solvente com borrachas ou plásticos e foram sempre usados utensílios de vidro cuidadosamente lavados com o solvente escolhido para a extração, procedimento aliás, aplicado a todo o material usado na manipulação das amostras ao longo do trabalho. Os solventes usados foram de elevada qualidade e a sua pureza foi regularmente controlada, através da evaporação total de cerca de 100 a 200 mL e posterior análise por TLC e GC do resíduo, dissolvido num volume mínimo (0.1 a 0.2 mL).

### **2.1.2.2 Análise do Extracto de Ceras Cuticulares**

Na análise das ceras cuticulares extraídas foram usados diversos métodos cromatográficos que permitiram fraccionar o extracto total nas classes que o constituíam e identificá-las. Os mesmos métodos permitiram ainda isolar essas classes e separar e identificar os seus componentes individuais. Foram usadas cromatografias em camada fina (TLC), cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) e cromatografia gás-líquido (GC) acoplada a espectrometria de massas (MS).

Na primeira análise do extracto obtido foi utilizada a técnica de TLC em sílica gel, por ser um modo simples, rápido e sensível de determinar a composição qualitativa dessa mistura lipídica. Para a análise, foi redissolvida em clorofórmio uma pequena porção do extracto, de forma a obter-se uma concentração de aproximadamente 10 mg/mL e, com uma microseringa, foram aplicadas à placa entre 50 a 100 µg de material, num leque de diferentes quantidades.

Foram também aplicados vários compostos padrão (cerca de 10 a 20 µg de cada), usados como referências e representativos das diferentes classes cuja presença se suspeitava, de acordo com os trabalhos de Prasad e colaboradores (1990) e de Gülz (1994b) em ceras superficiais das folhas da árvore do mesmo género taxonómico, *Quercus robur* L. (Prasad *et al*, 1990).

A placa foi desenvolvida numa mistura de solventes, constituída por n-hexano:éter dietílico:ácido fórmico (80:20:1) (adaptado de Christie, 1987) e, antes da detecção, permitiu-se que todos os resíduos do eluente se evaporassem da placa, de contrário a sensibilidade poderia resultar prejudicada ou perder-se o contraste entre as manchas obtidas e o fundo.

Com base nas propriedades de detecção e por ser um reagente facilmente acessível no Laboratório, com uma resposta rápida e satisfatória para o volume de análises que se requeriam, foi utilizado o vapor de iodo como modo corrente e geral de detecção. Mais raramente e apenas com fins quantitativos, foi também usada uma solução aquosa de ácido ortofosfórico a 8% e acetato de cobre a 3% (Shand & Noble, 1980).

Como modo de garantir a reproducibilidade dos resultados obtidos por TLC foram tidos alguns cuidados de carácter prático que a experiência comprovou como essenciais e que têm a ver com a utilização de solventes com um grau elevado de pureza, com a colocação de papéis de filtro nas paredes internas das câmaras cromatográficas, com a introdução do solvente de eluição no interior das câmaras pelo menos 1 hora antes do desenvolvimento das placas de forma a garantir a saturação da atmosfera da câmara com o seu vapor e com a certificação de que todo o solvente se evaporou da placa após a aplicação das amostras, antes da placa ser colocada na câmara de desenvolvimento.

#### **2.1.2.2.1 Fraccionamento Inicial do Extracto**

Provisoriamente identificadas as diferentes classes de substâncias constituintes do extracto, procedeu-se de seguida à sua separação. É contudo importante referir que, ao longo de todo o trabalho experimental, na procura das melhores condições quer para a separação quer para a análise das classes de compostos constituintes das ceras cuticulares extraídas, foi sempre utilizada uma mistura padrão dos correspondentes compostos sintéticos, em que se encontrava

representado um elemento de cada uma das diferentes classes de substâncias constituintes do extracto. Só após a determinação dessas condições e da realização dos testes à sua validade, se efectuou a correspondente aplicação ao material biológico entretanto armazenado.

Assim, quer em relação ao primeiro extracto, obtido em 1995, quer em relação ao segundo, obtido em 1996, foram usados processos de separação baseados nas técnicas cromatográficas referidas. Contudo, o processo de abordagem ao segundo extracto registou algumas diferenças relativamente ao primeiro, justificadas pela aprendizagem até então adquirida e pela avaliação dos resultados até então obtidos.

No tratamento inicial a aplicar aos extractos, verifica-se a primeira diferença nos métodos seguidos. Ambos os extractos foram submetidos a um processo de separação em HPLC preparativa utilizando uma coluna de sílica, Lobar Lichroprep Si 60. Para o fraccionamento do extracto de 1995 contudo, após a coluna ter sido equilibrada com 100 mL de n-hexano:éter dietílico (80:20), solvente aliás usado como eluente (adaptado de Mangold *et al*, 1984), foram-lhe aplicadas cerca de 100 mg de material (correspondentes a 0,5 % do peso da fase estacionária), solubilizadas em 1 mL de clorofórmio. A eluição foi feita à temperatura ambiente, cerca de 20 °C e, a um fluxo de 1mL/min. O eluato foi recolhido num colector adequado, em fracções de 1 mL que foram, de seguida, analisadas em TLC como forma de detecção. A lavagem da coluna, realizada com a mistura de clorofórmio e metanol na proporção de 2:1 (v/v) e recolhida num balão de evaporação de 100 mL, foi igualmente aplicada à placa de TLC analítica, após evaporação da maior parte do solvente num evaporador rotativo, para detecção do seu conteúdo. Na mesma placa foi ainda aplicada, como referência, uma mistura padrão contendo um composto representativo de cada classe.

Duma forma geral, as separações entre as várias classes de compostos orgânicos existentes no extracto de 1995 foram levadas a cabo através de recromatografias sucessivas das diferentes "pools" de substâncias construídas pela reunião das fracções com composição semelhante e detectadas pela revelação das placas de TLC referidas, no vapor de iodo. Este procedimento foi

relativamente demorado atendendo a que foram requeridas diversas cromatografias para a constituição das referidas "pools" e seguidamente uma série de recromatografias, no mesmo sistema eluente, para se proceder à separação das classes de substâncias existentes nessas "pools".

Constatada a complexidade da mistura em que consiste o extracto optou-se, em relação ao extracto de 1996, por se seguir um procedimento ligeiramente diferente, descrito com maior pormenor, por se considerar mais adequado ao tipo de mistura a separar. Assim, começou por se fazer uma primeira separação baseada na relativa polaridade dos componentes, utilizando também a técnica de HPLC no modo preparativo e cujas condições experimentais de análise se resumem no Quadro 2.1.

|  |  |
|--|--|
| <b>Coluna:</b>                           | Lobar Lichroprep Si 60, (1,1 x 24 cm) com partículas de 40-63 µm.  |
| <b>Capacidade volumétrica da coluna:</b> | 22,8 cm <sup>3</sup> .   |
| <b>Coluna equilibrada com:</b>           | 100 mL de n-hexano.  |
| <b>Quantidade de material aplicada:</b>  | 100 mg, solubilizadas em 1 mL de clorofórmio.  |
| <b>Eluição com:</b>                      | 100 mL de n-hexano;<br>100 mL de n-hexano:acetona (95:5);<br>100 mL de n-hexano:acetona (90:10).                       |
| <b>Fluxo:</b>                            | 1 mL/min.  |
| <b>Temperatura:</b>                      | temperatura ambiente (cerca de 20 °C)  |
| <b>Lavagem da coluna:</b>                | 100 mL de clorofórmio:metanol (2:1).   |
| <b>Detecção:</b>                         | Os eluatos e a lavagem da coluna foram recolhidos em balões separados de 100 mL cada, evaporados e analisados por TLC. |

**Quadro 2.1** Separação entre classes de compostos apolares e polares constituintes do extracto.

As fracções recolhidas foram concentradas no evaporador rotativo e analisadas por TLC, sendo comparadas com substâncias padrão utilizadas como referência e aplicadas à mesma placa.

Este procedimento foi repetido o número de vezes necessário à obtenção da quantidade de cada fracção considerada suficiente para realizar as separações cromatográficas específicas subsequentes. Constituíram-se assim três fracções, correspondentes às três condições de eluição:

- n-hexano;
- n-hexano:acetona (95:5);
- n-hexano:acetona (90:10).

#### 2.1.2.2.2 Separação entre Alcanos e Ésteres

Dos fracções recolhidas deu-se então início à separação da correspondente à eluição com 100 % de n-hexano, constituída exclusivamente por duas classes de compostos apolares ou muito fracamente polares, aparentemente alcanos e ésteres. Esta separação foi efectuada em TLC, no modo preparativo, para o que foram usadas placas de sílica com 2 mm de espessura.

|   |   |
|---|---|
| <b>Tipo de placa:</b>                   | Preparativa, de sílica gel, com 2 mm de espessura, (20 x 20 cm).  |
| <b>Pré-desenvolvimento:</b>             | "overnight", no mesmo solvente usado para a eluição das amostras. |
| <b>Quantidade de material aplicada:</b> | 40 mg, solubilizadas em 1 mL de clorofórmio.                      |
| <b>Solvente de eluição:</b>             | tetracloroeto de carbono.   |
| <b>Número de desenvolvimentos:</b>      | dois, no mesmo sistema eluente.                                   |
| <b>Detecção:</b>                        | vapor de iodo.  |

Quadro 2.2 Separação entre Alcanos e Ésteres.

De modo a assegurar que a resolução da separação preparativa era comparável à obtida pelo método analítico, teve-se em atenção o pré-desenvolvimento das placas até à sua distância total, no sistema eluente seleccionado, eluindo assim a maioria das impurezas para o topo da placa. Por

outro lado, durante a aplicação da amostra a linha de aplicação foi o mais estreita possível, com cerca de 1 a 2 mm de largura, considerando que as bandas constituintes separadas durante o desenvolvimento se poderiam espalhar tornando-se mais largas do que a banda de aplicação. A forma como se conseguiu bandas de aplicação de largura satisfatória foi aquecer as placas antes de se proceder à aplicação do material de forma a que quando a solução da amostra foi aplicada, o solvente evaporou rapidamente deixando uma zona compacta de material na placa. Um outro aspecto tido em atenção foi a não sobrecarga da placa durante a aplicação do material. Assim, nos ensaios efectuados, a quantidade máxima aplicada às placas preparativas com 2 mm de espessura nunca excedeu as 80 mg sendo, na maioria das vezes e sempre que o método foi aplicado ao material biológico, cerca de 40 mg apenas. Finalmente teve-se em atenção o nível do solvente na câmara de eluição, que não excedeu a posição da banda de aplicação na placa. Conseguiu-se assim uma resolução comparável à obtida no processo analítico.

Para a detecção das bandas, depois da separação preparativa, foi usado o vapor de iodo. As placas (20 x 20 cm) foram cobertas com um vidro de menores dimensões (18 x 18 cm) de modo que apenas foram coradas as extremidades de cada banda. Marcaram-se esses limites em cada banda e permitiu-se a evaporação natural do iodo. As áreas marcadas foram então removidas cuidadosamente das placas por raspagem com o auxílio de uma espátula e as fracções lipídicas foram recuperadas do adsorvente por extracção com clorofórmio. Após a evaporação do solvente, as fracções recuperadas foram redissolvidas num volume mínimo, a sua pureza foi testada por TLC e foram então armazenadas separadamente a -18 °C.

#### **2.1.2.2.3 Separação entre Ésteres e Ésteres Metílicos**

No decurso do trabalho foi desenvolvido um método de separar ésteres de ésteres metílicos, usando para o efeito compostos padrão. Aparentemente este método é também eficaz na separação entre ésteres e aldeídos, envolvendo uma vez mais a técnica de HPLC preparativa com

a utilização de uma coluna de fase reversa e cujas condições analíticas se resumem no Quadro 2.3.

|  |  |
|--|--|
| <b>Coluna:</b>                           | Lobar RP 18, preparativa, (1,1 x 24 cm), com partículas de 40-63 $\mu\text{m}$ .   |
| <b>Capacidade volumétrica da coluna:</b> | 22,8 $\text{cm}^3$ .   |
| <b>Coluna equilibrada com:</b>           | 100 mL de clorofórmio:metanol (60:40).   |
| <b>Quantidade de material aplicada:</b>  | 50 mg, solubilizadas em 1 mL de clorofórmio:metanol (60:40)  |
| <b>Eluição com:</b>                      | 60 mL de clorofórmio:metanol (20:80);<br>10 mL de clorofórmio:metanol (40:60);<br>60 mL de clorofórmio:metanol (60:40).  |
| <b>Fluxo:</b>                            | 1 mL/min.  |
| <b>Temperatura:</b>                      | temperatura ambiente (cerca de 20 °C).   |
| <b>Lavagem da coluna:</b>                | 100 mL de clorofórmio:metanol (2:1).   |
| <b>Deteção:</b>                          | O eluato foi recolhido em fracções de 4 mL, o seu solvente foi evaporado e cada fracção foi aplicada em TLC analítica, como forma de deteção. A revelação da TLC foi efectuada em vapor de iodo. |

**Quadro 2.3** Resumo das condições cromatográficas de separação entre ésteres e ésteres metílicos.

Cada fracção, recolhida num colector de fracções, foi evaporada na centrífuga concentradora, sob baixo vácuo, redissolvida num volume mínimo de clorofórmio e aplicada à placa de TLC cuja revelação permitiu verificar quais as fracções que continham o material separado. Cada grupo de fracções, correspondente a cada classe assim isolada, foi então reunido e armazenado separadamente até análise posterior.

#### 2.1.2.2.4 Separação dos Alcoóis e dos Ácidos

As classes de substâncias provisoriamente identificadas como alcoóis e ácidos, componentes maioritários da fracção eluída com a proporção de 95:5 (v/v) da mistura n-hexano:acetona, foram separadas por HPLC preparativa com as condições que se resumem no Quadro 2.4.

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| Coluna:                           | Lobar Lichrorep Si 60, (1,1 x 24 cm).  |
| Capacidade volumétrica da coluna: | 22,8 cm <sup>3</sup> .   |
| Coluna equilibrada com:           | 100 mL de n-hexano:éter dietílico (80:20).   |
| Quantidade de material aplicada:  | 100 mg, solubilizadas em 1 mL de clorofórmio.  |
| Eluição isocrática com:           | 140 mL de n-hexano:éter dietílico (80:20).   |
| Fluxo:                            | 1 mL/min.  |
| Temperatura:                      | temperatura ambiente (cerca de 20 °C).   |
| Lavagem da coluna:                | 100 mL de clorofórmio:metanol (2:1).   |
| Deteccção:                        | O eluato foi recolhido em fracções de 1 mL num colector de fracções, o seu solvente foi evaporado e cada fracção foi aplicada em TLC analítica para deteccção. |

Quadro 2.4 Resumo das condições cromatográficas de separação dos alcoóis e dos ácidos.

As fracções recolhidas foram aplicadas a uma placa de TLC para deteccção e, de acordo com os resultados evidenciados pela revelação da placa no vapor de iodo, as fracções correspondentes a cada classe assim separada foram reunidas, o seu solvente foi evaporado na centrífuga concentradora e cada uma foi redissolvida num volume menor de clorofórmio sendo depois armazenadas até análise posterior. O resíduo obtido por evaporação do solvente usado na lavagem da coluna foi igualmente aplicado a uma placa de TLC para deteccção do seu conteúdo.

#### **2.1.2.2.5 Derivatização dos Ésteres**

Os ésteres, antes de poderem ser analisados por GC e GC/MS foram convertidos em derivados de menor peso molecular e voláteis, por um processo de transesterificação, através de aquecimento com um excesso de metanol seco e na presença de um catalisador ácido que, no caso, foi o ácido sulfúrico a 1 %. Se houvesse água presente a reacção poderia não decorrer de uma forma completa, pelo que teve de se secar cerca de 100 mL de metanol e, além disso, todo o material de vidro usado para a reacção foi previamente deixado na estufa a 100 °C.

##### **2.1.2.2.5.1 Secagem do Metanol**

A secagem do metanol seguiu uma adaptação do método descrito para a secagem do etanol por Vogel (1941). Assim, dentro de um balão de evaporação de fundo redondo foram colocados 5 mL de metanol aos quais foi adicionado 0,05 g de iodo e 0,5 g de tiras de magnésio. O balão contendo esta mistura foi colocado num banho de parafina sobre uma placa de aquecimento e, mantendo a temperatura a 60-65 °C e alguma agitação produzida por uma barra magnética, aguardou-se que o iodo desaparecesse completamente. Quando a cor amarelada devida ao iodo desapareceu, adicionaram-se mais 95 mL de metanol deixando-se então a mistura a refluxar por 30 minutos. Seguidamente esse metanol foi destilado, sendo recolhido directamente no balão de vidro em que foi guardado até ser utilizado.

#### 2.1.2.2.5.2 Transesterificação

O processo de transesterificação seguiu uma adaptação do procedimento descrito por Christie (1989). Assim, foram colocadas cerca de 50 mg, do material previamente separado e correspondente à classe dos ésteres, num balão redondo de duas tubuladuras juntamente com 0,02 mL de ácido sulfúrico em 2 mL de metanol seco. A mistura foi deixada a refluxar durante 120 minutos a cerca de 65-70 °C, sendo então transferida para uma ampola de decantação onde se adicionaram 10 mL de clorofórmio, de forma a extraír os produtos da metanólise, mais 5 mL de uma solução de cloreto de sódio a 5 %. Esta mistura foi agitada e, permitida a separação das fases, descartou-se a fase aquosa. A adição da solução de cloreto de sódio foi repetida bem como o procedimento subsequente. Foram então adicionados mais 5 mL de clorofórmio e 4 mL de uma solução de bicarbonato de sódio a 2 %. A mistura foi então seca sobre sulfato de sódio anidro. A solução foi depois filtrada e o seu solvente evaporado na centrífuga concentradora, sob baixo vácuo. O resíduo foi finalmente redissolvido em 1 mL de clorofórmio, aplicado em TLC analítica para detecção do resultado da reacção e armazenado até à sua análise posterior em GC/MS.

#### 2.1.2.2.6 Derivatização dos Ácidos Gordos

Separados da mistura inicial, os ácidos gordos constituem uma classe de compostos excessivamente polares para serem analisados directamente por GC, pelo que antes, foram convertidos em derivados mais adequados, os seus ésteres metílicos correspondentes. Para o efeito, foi usado um processo de metilação, adaptado do catálogo da Pierce (1989), em que se utilizou o  $\text{BF}_3$ -Metanol (14 % w/v) como reagente.

#### **2.1.2.2.6.1. Esterificação**

A preparação de ésteres metílicos a partir dos ácidos gordos separados do extracto de ceras cuticulares de Azinheira foi efectuada combinando 5 mg de material correspondente à classe dos ácidos e 0,3 mL de BF<sub>3</sub>-Metanol num balão de evaporação de fundo redondo, de 50 mL. O balão foi tapado e aquecido a 60 °C durante aproximadamente 7 minutos, num banho de parafina colocado sobre uma placa de aquecimento. Seguidamente deixou-se arrefecer o balão e o seu conteúdo foi transferido para uma ampola de decantação contendo 3 mL de n-hexano. Esta mistura foi agitada e lavada duas vezes com uma solução saturada de cloreto de sódio sendo, em ambas as vezes, descartada a fase aquosa formada. A solução foi então seca sobre sulfato de sódio anidro, foi filtrada e o seu solvente foi evaporado na centrifuga concentradora, sob baixo vácuo. O resíduo obtido foi redissolvido num volume mínimo de clorofórmio, aplicado a uma placa de TLC para análise e confirmação do resultado da reacção e armazenado a -18 °C até análise posterior em GC/MS.

#### **2.1.2.2.7 Derivatização dos Alcoóis**

O processo de derivatização seguido para a classe dos alcoóis foi a acetilação, adaptado do procedimento sugerido por Mangold e colaboradores (1984) e por Christie (1989), tendo sido usado como reagente a mistura de anidrido acético e piridina (5:1 v/v). Tal como nos casos anteriores o processo de derivatização foi testado primeiro, numa mistura padrão e, posteriormente aplicada não só à fracção correspondente aos alcoóis livres do extracto, separados nos processos cromatográficos atrás descritos, mas também à fracção dos alcoóis derivados dos ésteres metanolizados.

#### 2.1.2.2.7.1 Acetilação

Num tubo de ensaio foram colocadas cerca de 10 mg de material, solubilizadas em 0,2 mL de clorofórmio e correspondentes à fracção álcool a acetilar, juntamente com 2 mL de anidrido acético:piridina (5:1). Esta mistura foi agitada num "vortex" para facilitar a dissolução e foi depois deixada à temperatura ambiente, até ao dia seguinte. Nessa altura foi colocada na centrífuga concentradora e, à temperatura de 40 °C, foi evaporado o solvente, tendo o resíduo sido redissolvido em clorofórmio e armazenado a -18 °C. Antes da análise por GC/MS, o resultado desta reacção foi verificado por TLC analítica.

#### 2.1.2.2.8 Análise por GC/MS

A análise por GC/MS das diferentes classes de compostos separadas do extracto de ceras cuticulares iniciou-se com a determinação das melhores condições cromatográficas de separação dos seus componentes, utilizando primeiro misturas padrão correspondentes a cada uma das classes em estudo e o melhor possível representativas dos seus componentes e, determinando ao mesmo tempo, os respectivos tempos de retenção para as condições que resumidamente se descrevem no Quadro 2.5.

|  |               |                     |                |
|--|---------------|---------------------|----------------|
| Coluna: SE 30 (30 m x 0,32 mm DI x 0,25 µ) |               |                     |                |
| Detector: MS                               |               |                     |                |
| Gás arrastador: Hélio                      |               | Fluxo: 2 mL/min.    |                |
| Programa de temperaturas:                  |               |                     |                |
| Injector:                                  |               | 320 °C              |                |
| Detector:                                  |               | 320 °C              |                |
| Coluna:                                    | Temp. inicial | 80 °C               | durante 2 min. |
|  |               | 10 °C/min. até 300. |                |
| "Split Ratio": 25:30                       |               |                     |                |

Quadro 2.5 Condições gerais de análise utilizadas em GC/MS.

Concluída a optimização do processo foram iniciadas as análises por cromatografia gasosa das diferentes classes de compostos separadas do extracto de ceras cuticulares original, segundo as condições experimentais anteriormente estabelecidas. Cada classe foi assim analisada, tendo-se obtido vários cromatogramas. Procedeu-se seguidamente à identificação dos picos existentes, comparando-os com os cromatogramas anteriormente obtidos a partir das misturas padrão. Após o processo da identificação, passou-se à análise quantitativa, determinando-se as percentagens relativas dos componentes de cada classe, a partir das áreas dos respectivos picos.

Para cada pico cromatográfico obtido quer nas misturas padrão, quer nas amostras correspondentes às diferentes classes em estudo, foi traçado simultaneamente o respectivo espectro de massa, atendendo a que a técnica usada foi a cromatografia gasosa acoplada a um detector de espectrometria de massa. Por conseguinte, procedeu-se à análise dos espectros de massa obtidos que permitiram a confirmação da maioria das identificações e a identificação daqueles componentes para os quais não se dispunha do(s) composto(s) padrão(ões) correspondente(s) para comparação.

#### **2.1.2.2.9 Análise Quantitativa dos Extractos**

Confirmada a composição qualitativa da mistura lipídica constituinte do extracto e com vista à sua análise quantitativa, foram efectuados diversos ensaios de densitometria em placas de TLC, após detecção das manchas com um reagente pulverizado adequado, a solução aquosa de ácido ortofosfórico a 8 % e acetato de cobre a 3 % (adaptado de Shand & Noble, 1980). Assim, as placas para o efeito foram pré-desenvolvidas durante a noite anterior em éter dietílico e, depois de secas e com o auxílio de um estilete, foram-lhes marcados sulcos entre cada 7 mm de forma a definir 25 pistas em cada placa que têm por objectivo não só facilitar a migração vertical de todas as amostras mas também garantir uma maior uniformidade no diâmetro das manchas uma vez que

evita a sua dispersão para os lados. Imediatamente antes da aplicação das amostras, as placas foram reactivadas a 130 °C por meia hora. O extracto foi aplicado sempre na mesma quantidade, alternado com quantidades crescentes de uma mistura padrão de composição e concentrações conhecidas. Após o desenvolvimento das placas, no eluente habitual (n-hexano:éter dietílico:ácido fórmico nas proporções de 80:20:1), estas foram deixadas ao ar para evaporação completa do solvente, sendo então pulverizadas com o referido reagente de detecção. A pulverização foi o mais uniforme possível, deixando as placas bem impregnadas até ficarem translúcidas, mas sem as deixar a escorrer. Logo de seguida foram colocadas numa estufa a 180 °C durante 15 minutos e, ao serem retiradas, eram visíveis as manchas correspondentes à carbonização das várias classes lipídicas. As placas foram então analisadas a 633 nm num densitómetro que registou os valores de densidade óptica para as diferentes concentrações das misturas padrão e para as concentrações desconhecidas das várias classes de substâncias constituintes do extracto. A partir da curva de calibração, traçada para cada classe com os resultados obtidos com os padrões, foi possível calcular as concentrações correspondentes aos valores de densidade óptica obtidos para as diferentes classes existentes no extracto.

---

## Capítulo 3

---

### 3.1 Resultados e Discussão

#### 3.1.1 Resultados

##### 3.1.1.1 Resultados das Extracções

A extracção dos lípidos superficiais apresenta normalmente poucos problemas uma vez que estes materiais são solúveis, à temperatura ambiente, em solventes orgânicos de baixa ou moderada polaridade, como por exemplo n-hexano, benzeno, cloreto de metileno, éter dietílico, clorofórmio ou acetona (Mangold *et al*, 1984). O solvente utilizado foi o clorofórmio por se ter verificado, em

análise por TLC, ser aquele que permitiu uma extracção mais completa no que respeita ao número de classes de substâncias extraídas.

Os pesos das folhas colectadas bem como das respectivas ceras cuticulares extraídas foram os que abaixo se indicam:

**Tabela 3.1** Indicação dos pesos das folhas e das respectivas ceras cuticulares extraídas.

|                  | Extracção Julho 95 | Extracção Janeiro 96 |
|------------------|--------------------|----------------------|
| Pesos das folhas | 250 g              | 450 g                |
| Peso das ceras   | 0,5 g              | 0,8 g                |

Apesar da diferença no peso das folhas, a extracção teve em Julho de 1995 e em Janeiro de 1996 o mesmo rendimento ou seja, cerca de 0,2 % do peso das folhas, em ceras.

### 3.1.1.2 Resultados das Separações

#### 3.1.1.2.1 A Análise do Extracto

Encontra-se disponível na literatura uma vasta gama de solventes de eluição com base nas propostas de Holloway e Challen ou Tulloch (Mangold *et al*, 1984). São ainda descritas técnicas de desenvolvimentos múltiplos em diferentes solventes mas, no presente trabalho, para análises correntes em TLC analítica, foi usada apenas uma mistura de solventes, constituída por n-hexano:éter dietílico:ácido fórmico (80:20:1) (adaptado de Christie, 1987) que oferece a mesma separação num único desenvolvimento, não se tendo encontrado especiais vantagens na utilização

de desenvolvimentos múltiplos. Além disso, pelo facto desta mistura conter um componente de ácido fórmico, evita-se a formação de uma mancha com arrastamento e mal definida na classe dos ácidos livres.

A aplicação à placa de TLC, de um leque de diferentes quantidades do extracto (50 µg, 75 µg e 100 µg) foi efectuada para que, grosso modo, pudessem ser estimadas, na mistura, as quantidades relativas quer dos componentes minoritários quer dos maioritários (figura 3.1).

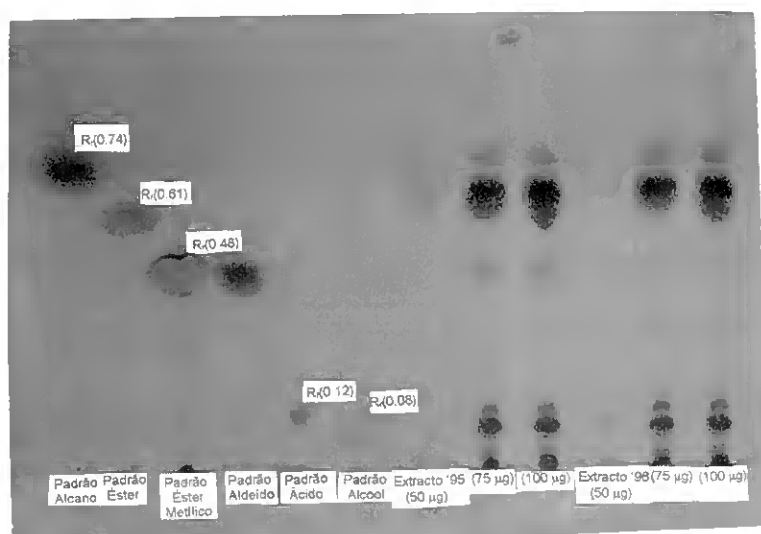
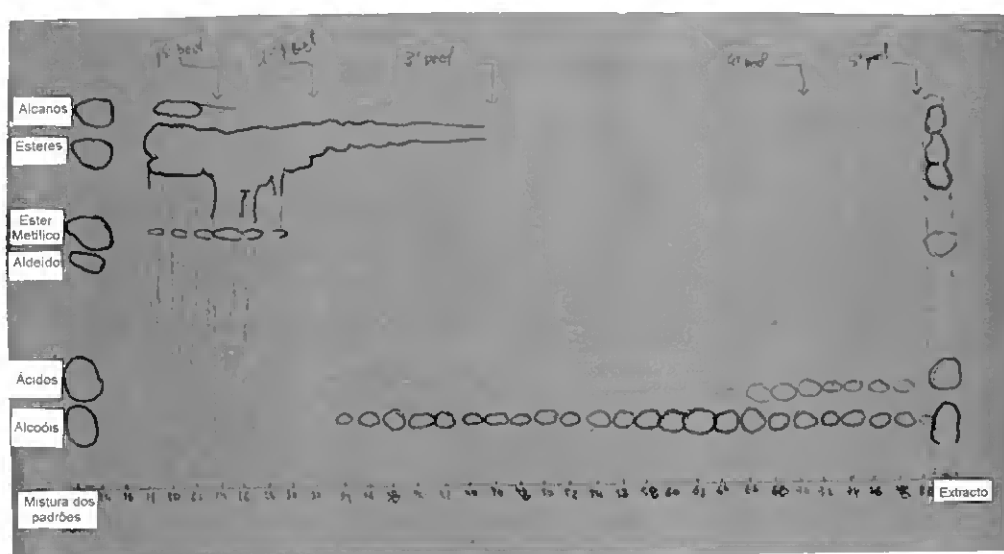


Figura 3.1 Fotografia de uma TLC efectuada para análise qualitativa do extracto.

Com base na comparação dos valores de  $R_f$  evidenciados pelos compostos autênticos, representativos das diferentes classes, verificou-se a aparente existência de alcanos, ésteres, aldeídos (no extracto de Julho de 1995), ácidos, alcoóis e duas classes de substâncias com um valor de  $R_f$  menor do que o dos alcoóis e que não foram identificadas (não aparentes nesta figura mas existentes).

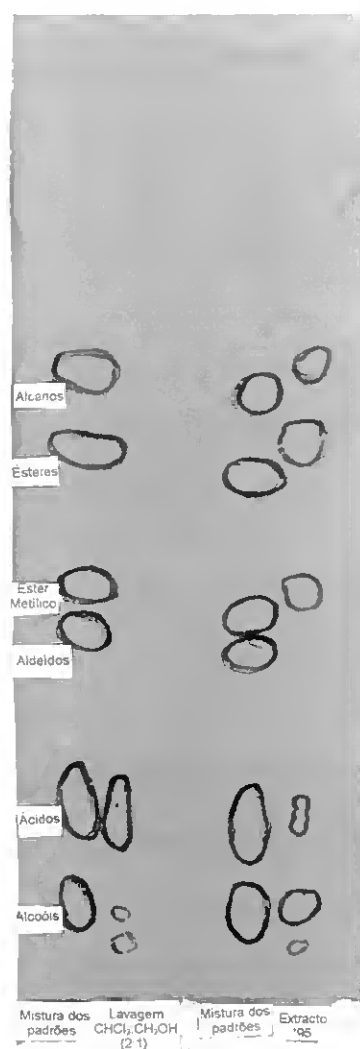
### 3.1.1.2.2 O Fraccionamento do Extracto

No fraccionamento inicial, por HPLC preparativa, do extracto de Julho de 1995, a revelação pelo vapor de iodo das placas de TLC analíticas usadas permitiu detectar quais das fracções recolhidas continham material qualitativamente semelhante e por conseguinte, reuni-las, constituindo assim misturas com um menor número de classes de substâncias e portanto menos complexas e mais facilmente separáveis em cromatografias subsequentes. Em alguns casos foi mesmo possível isolar pequenas quantidades de alcoóis num único processo cromatográfico (figura 3.2)



**Figura 3.2** Fotografia de uma TLC analítica representativa da forma de detecção realizada às fracções recolhidas nas primeiras separações cromatográficas do extracto de 1995.

Neste sistema eluente a classe de compostos provisoriamente identificada como ácidos gordos apresenta apenas alguns vestígios nas fracções recolhidas, co-eluídos com a porção final da curva descendente do pico de eluição dos alcoóis, ficando na realidade maioritariamente retida na coluna e só saindo, numa forma praticamente pura, durante o processo de lavagem da coluna com clorofórmio:metanol (2:1) (figura 3.3).

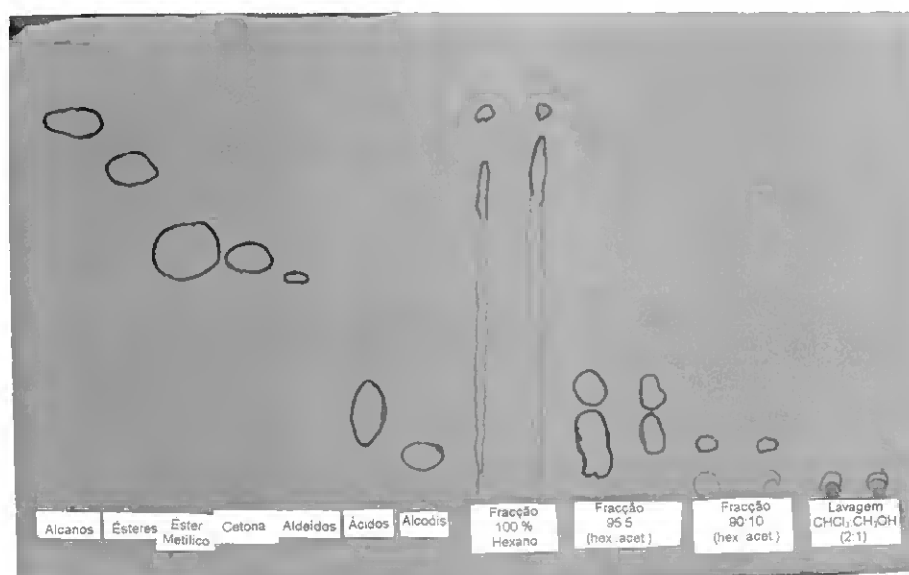


**Figura 3.3** Fotografia de uma TLC analítica efectuada para detecção da eventual presença de substâncias no solvente usado para a lavagem da coluna.

Relativamente ao extracto de Janeiro de 1996, a figura 3.4 representa o modo de detecção das fracções recolhidas na HPLC preparativa efectuada com o intuito de separar as classes de componentes apolares e polares.

As classes de componentes menos polares tais como os alcanos e os ésteres, foram eluídas pela fracção menos polar do eluente, a constituída exclusivamente por n-hexano. Quando a polaridade do eluente foi alterada pela adição de acetona, na proporção de 95:5 em n-hexano:acetona, foram

então eluídas as restantes classes lipídicas, correspondentes às mais polares de entre as constituintes do extracto, como os alcoóis primários e os ácidos gordos

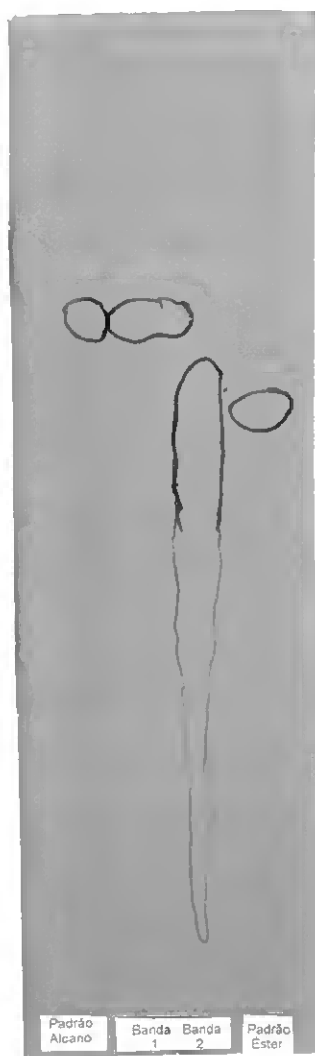


**Figura 3.4** Fotografia da TLC efectuada para detecção das fracções recolhidas na HPLC preparativa de separação entre componentes apolares e polares.

Por vezes esta fracção (n-hexano:acetona, 95:5) apresentou ainda vestígios dos componentes maioritariamente eluídos com a fracção anterior, facilmente separados numa cromatografia subsequente usando n-hexano:éter dietílico (80:20) como solvente de eluição. A fracção eluente de maior polaridade constituída pela mistura de n-hexano:acetona (90:10), na maior parte das vezes não continha já material algum, salvo raras excepções em que ocorreram vestígios da classe alcool, algumas vezes juntamente com uma ou duas classes de componentes não identificadas e cujo valor de  $R_f$ , em TLC, é menor que o dos alcoóis no sistema eluente usado. Na lavagem da coluna com clorofórmio:metanol (2:1) nada foi detectado.

### 3.1.1.2.2.1 Separação entre Alcanos e Ésteres

Efectuada a TLC preparativa para separar os alcanos dos ésteres, foram obtidas duas bandas tendo o material constituinte de cada uma sido então extraído com clorofórmio e a pureza das correspondentes fracções recuperadas, testada pela TLC representada na Figura 3.5.



**Figura 3.5** Fotografia da TLC analítica feita para testar a pureza das fracções recuperadas na TLC preparativa de separação entre alcanos e ésteres.

Ficaram deste modo separados os alcanos e os ésteres.

### 3.1.1.2.2 Separação entre Ésteres e Ésteres Metílicos/Aldeídos

A extracção efectuada em Julho de 1995 apresenta, na sua composição, uma classe de substâncias, identificada mais tarde como aldeídos, cuja presença não foi detectada na extracção de Janeiro de 1996. Esta classe, inicialmente confundida com ésteres metílicos a partir da interpretação dos resultados obtidos na análise do extracto por TLC analítica, foi separada da "pool" em que se encontrava e que continha essencialmente alcanos e ésteres através do processo de HPLC preparativa em que foi utilizado o sistema eluente de n-hexano:éter dietílico (80:20) e que, sucessivamente, foi separando os alcanos. A "pool" dos ésteres assim constituída, co-solubilizada com os aldeídos, foi depois submetida ao método referido no capítulo anterior para separar os ésteres dos ésteres metílicos, separando-se deste modo a classe que mais tarde veio a ser identificada como aldeídos.

A detecção das fracções recolhidas, na separação cromatográfica dos aldeídos, encontra-se ilustrada na figura 3.6, seguinte:

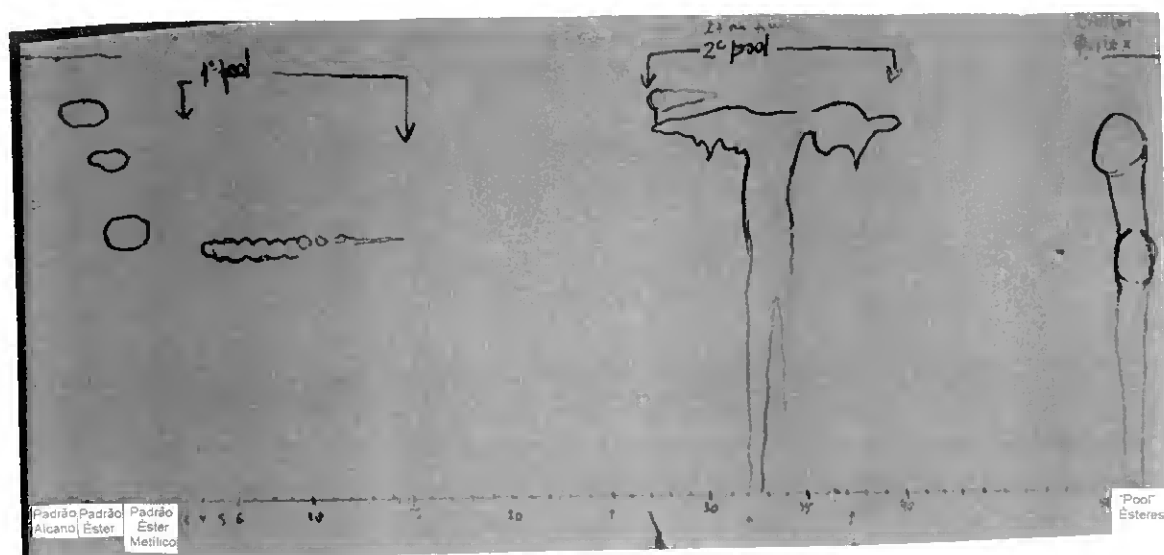


Figura 3.6 Fotografia da detecção por TLC das 38 fracções recolhidas numa separação entre ésteres e aldeídos.

### 3.1.1.2.3 Separação dos Ácidos e dos Alcoóis

A maior parte da fracção eluída com a proporção de n-hexano:acetona de 90:10 continha apenas alcoóis pelo que não foi necessário proceder a mais separações cromatográficas. A restante parte desta fracção contendo além dos alcoóis, duas outras classes com um valor de  $R_f$  mais baixo, foi recromatografada em n-hexano:éter dietílico (80:20) em coluna de sílica, separando-se assim todos os alcoóis. O sistema eluente constituído por n-hexano:acetona, mas na proporção de 95:5 continha, por outro lado, uma mistura de classes em que, predominavam duas classes de substâncias com valores de  $R_f$  em TLC analítica característicos dos alcoóis e dos ácidos, mas apresentando ainda, por vezes, alguns vestígios de ésteres e de alcanos, apesar destes terem sido maioritariamente eluídos na fracção de 100 % de n-hexano.

A partir da fracção 95:5 de n-hexano:acetona, foram efectuadas diversas HPLC preparativas em coluna de sílica usando a mistura de n-hexano e éter dietílico na proporção de 80:20 como eluente, com o objectivo de separar alcoóis de ácidos. A detecção dos resultados foi efectuada por TLC analítica, tal como se ilustra na figura 3.7.

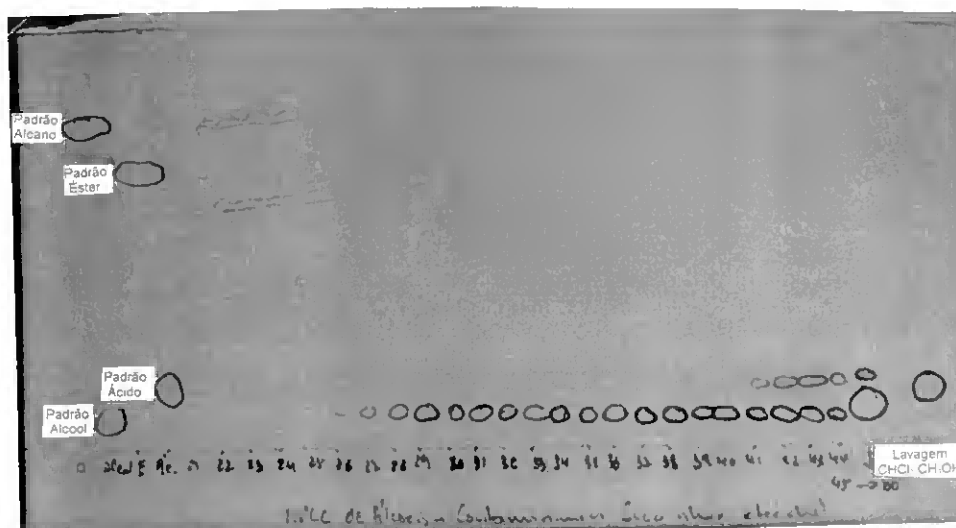


Figura 3.7 Fotografia da TLC analítica usada como detecção das fracções recolhidas na separação dos alcoóis e dos ácidos.

Face à separação dos alcoóis e à reduzida quantidade de ácidos detectados nas fracções recolhidas a detecção por TLC da eventual presença de classes de componentes no solvente usado na lavagem da coluna revelou a presença de uma classe de compostos com um  $R_f$  (0,13) semelhante ao evidenciado pelos ácidos padrões aplicados como referência  $R_f$  (0,16). Esta classe fica maioritariamente retida na coluna saindo apenas com o solvente de lavagem numa forma pura ou quase pura. Quando aconteceu a presença simultânea de vestígios de outras classes na fracção de lavagem, o processo de cromatografia foi repetido conseguindo-se, desta forma, purificar a classe provisoriamente identificada como ácidos e isolar e separar essas classes de compostos cujo valor de  $R_f$ , em TLC com n-hexano:éter dietílico:ácido fórmico (80:20:1), é menor que o dos alcoóis e cuja identificação, devido à reduzida quantidade em que se encontravam presentes, não foi conseguida.

### **3.1.1.3 Resultados das Derivatizações Químicas**

#### **3.1.1.3.1 Derivatização dos Ésteres**

A metanólise e a transesterificação dos ésteres, requeridas para a análise posterior destes compostos em GC/MS, foram verificadas pela TLC ilustrada na figura 3.8.

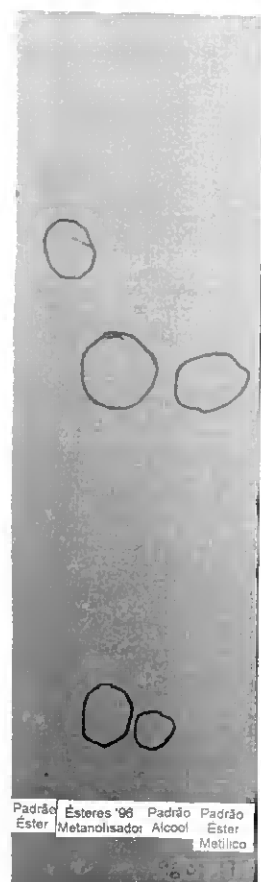
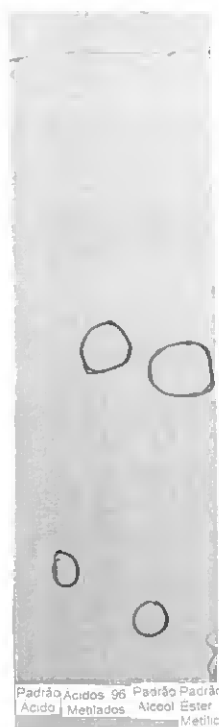


Figura 3.8 Fotografia da TLC analítica de detecção do produto da reacção da metanólise dos ésteres.

Observa-se a presença das duas classes de compostos resultantes da reacção de fragmentação das moléculas dos ésteres. A metade ácido convertida nos ésteres metílicos correspondentes e a metade álcool que foi posteriormente acetilada.

### 3.1.1.3.2 Derivatização dos Ácidos Gordos

A esterificação da classe dos ácidos foi efectuada usando  $\text{BF}_3$ -Metanol como reagente e o produto dessa reacção foi verificado por TLC, conforme representa a figura 3.9.



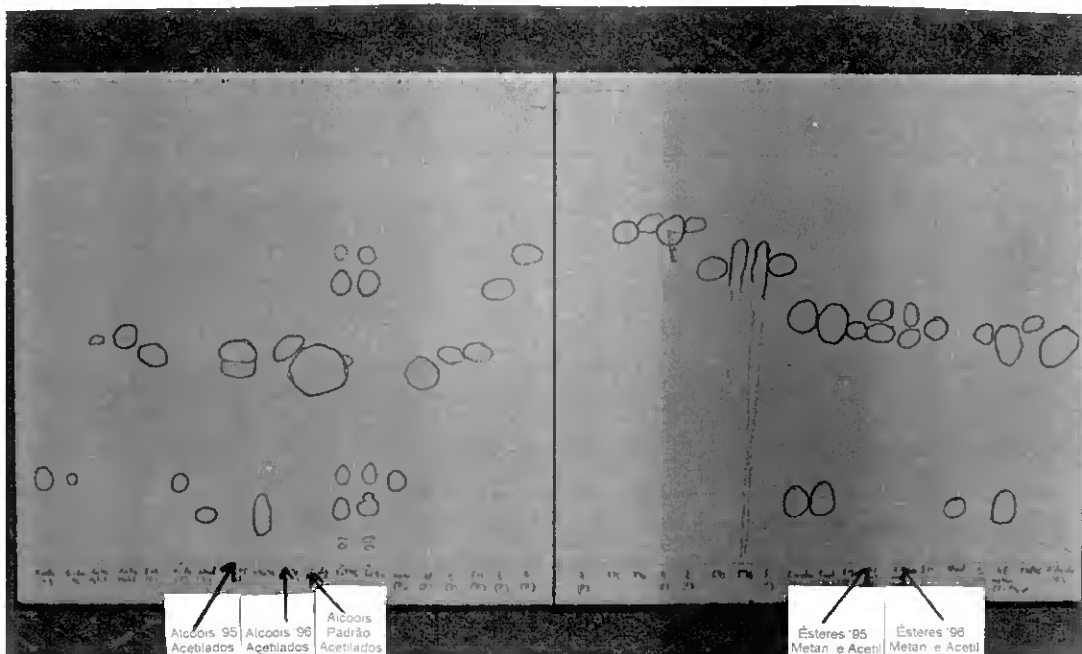
**Figura 3.9** Fotografia da TLC analítica para confirmação do resultado da metilação dos ácidos gordos livres.

### 3.1.1.3.3 Derivatização dos Alcoóis

A análise por GC/MS dos alcoóis evidenciou, nas colunas e restantes condições cromatográficas que foram usadas em diversos ensaios preliminares, a dificuldade deste tipo de análise a esta classe de compostos orgânicos, quer no que se refere à forma do pico obtido nos cromatogramas, quer à presença do pico correspondente ao ião molecular nos espectros de massa obtidos, quer à própria presença de alguns destes compostos em algumas das fracções analisadas. Assim, optou-se por se efectuar a derivatização desta classe de substâncias antes de se proceder à sua análise definitiva por GC/MS, tendo esta técnica sido também aplicada à fracção dos ésteres metanolizados por se ter verificado, nos ensaios analíticos preliminares em GC/MS, existir, para as

metades alcool resultantes da metanólise das moléculas dos ésteres a mesma dificuldade de análise e de detecção que se tinha verificado para a classe dos alcoóis primários livres.

Assim, o produto das reacção de acetilação das diversas fracções alcool constituintes do extracto foi verificado pela TLC analítica, ilustrada na figura 3.10



**Figura 3.10** Fotografia da TLC analítica efectuada como forma de verificação do resultado de algumas das derivatizações levadas a cabo onde foi também aplicado o produto das acetilações feitas às diversas fracções contendo classes de alcoóis, no extracto.

#### 3.1.1.4 Resultados de Análises

Além das análises periódicas ao extracto e aos produtos do seu fraccionamento efectuadas correntemente como controlo e como modo de detecção das técnicas de separação utilizadas e cujos resultados foram já referidos, efectuaram-se ainda as análises em GC/MS e densitométricas. Os resultados obtidos em GC/MS, documentam a identificação positiva de todos os compostos que se enumerarão.

#### 3.1.1.4.1 Análise por GC/MS

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa revelou-se de enorme potencial permitindo a identificação da maioria dos componentes de cada classe e permitindo inclusivamente a determinação da estrutura de uma classe minoritária de compostos cuja identificação por TLC analítica não assegurou e que se veio a comprovar corresponder a aldeídos.

A determinação das melhores condições cromatográficas de separação dos componentes das misturas padrão bem como a determinação dos seus tempos de retenção constituiu uma operação relativamente demorada que permitiu a obtenção dos cromatogramas representados nas figuras 3.11, 3.12 e 3.13.

As figuras 3.14, 3.15, 3.16 e 3.17, representam a comparação dos picos existentes nos cromatogramas obtidos na análise de cada classe, com os cromatogramas obtidos para as misturas padrão.

- 1- SOLVENTE
- 2- HENEICOSANO
- 3- DOCOSANO
- 4- TRIACOSANO
- 5- TETRACOSANO
- 6- PENTACOSANO
- 7- HEXACOSANO
- 8- HEPTACOSANO
- 9- OCTACOSANO
- 10- NONACOSANO
- 11- TRIACONTANO
- 12- DOTRIACONTANO

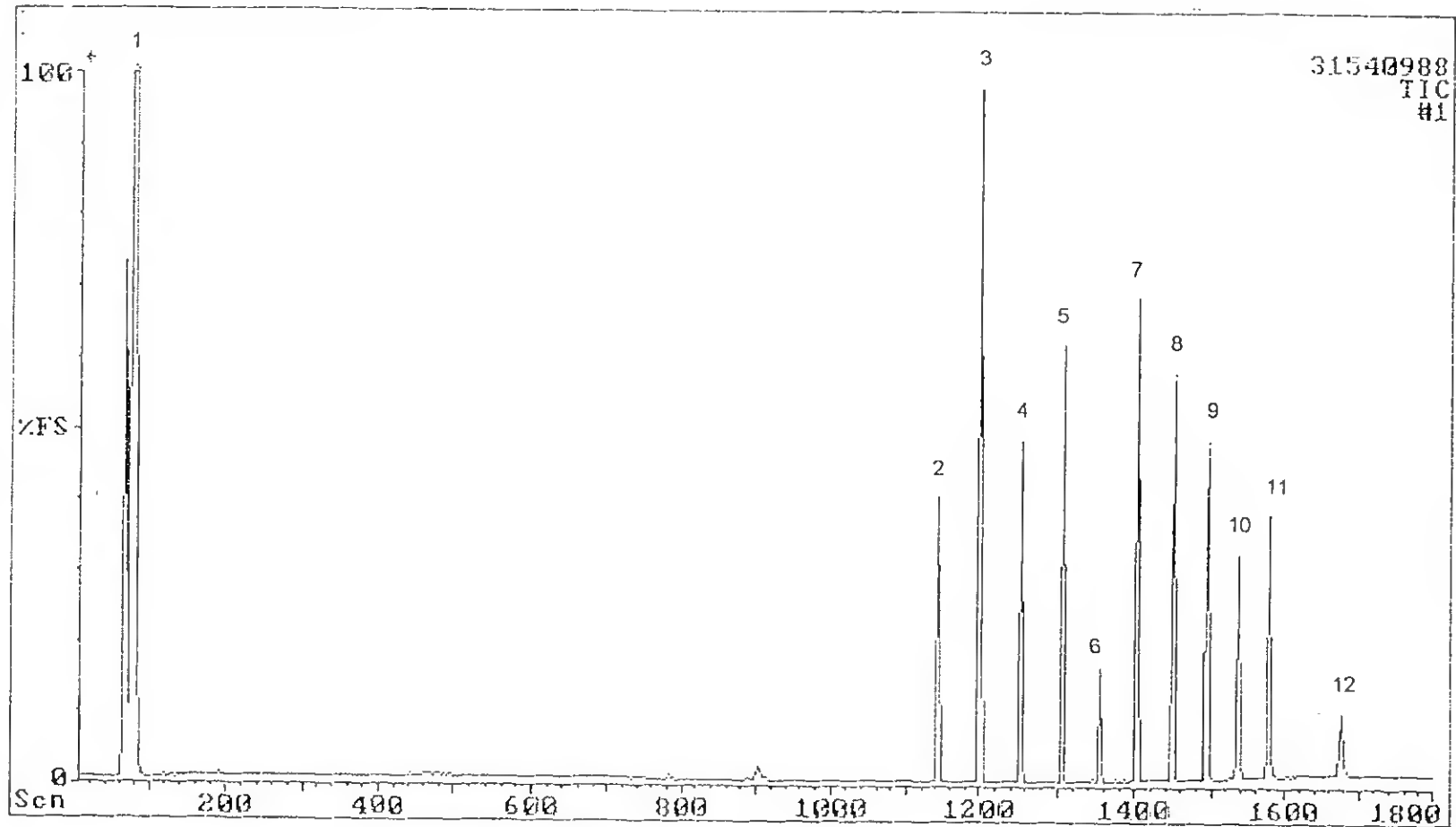


Figura 3.11 - Cromatograma iônico total (TIC) obtido para a mistura padrão de alcanos. Os integrais relativos não podem ser comparados em virtude das quantidades aplicadas não terem sido idênticas.

- 1- SOLVENTE
- 2- ÉSTER METÍLICO DO  
  ÁCIDO DODECANÓICO
- 3- ÉSTER METÍLICO DO  
  ÁCIDO HEXADECANÓICO
- 4- ÉSTER METÍLICO DO  
  ÁCIDO OCTADECANÓICO
- 5- ÉSTER METÍLICO DO  
  ÁCIDO EICOSANÓICO
- 6- ÉSTER METÍLICO DO  
  ÁCIDO DOCOSANÓICO
- 7- ÉSTER METÍLICO DO  
  ÁCIDO TETRACOSANÓICO
- 8- ÉSTER METÍLICO DO  
  ÁCIDO HEXACOSANÓICO
- 9- ÉSTER METÍLICO DO  
  ÁCIDO OCTACOSANÓICO

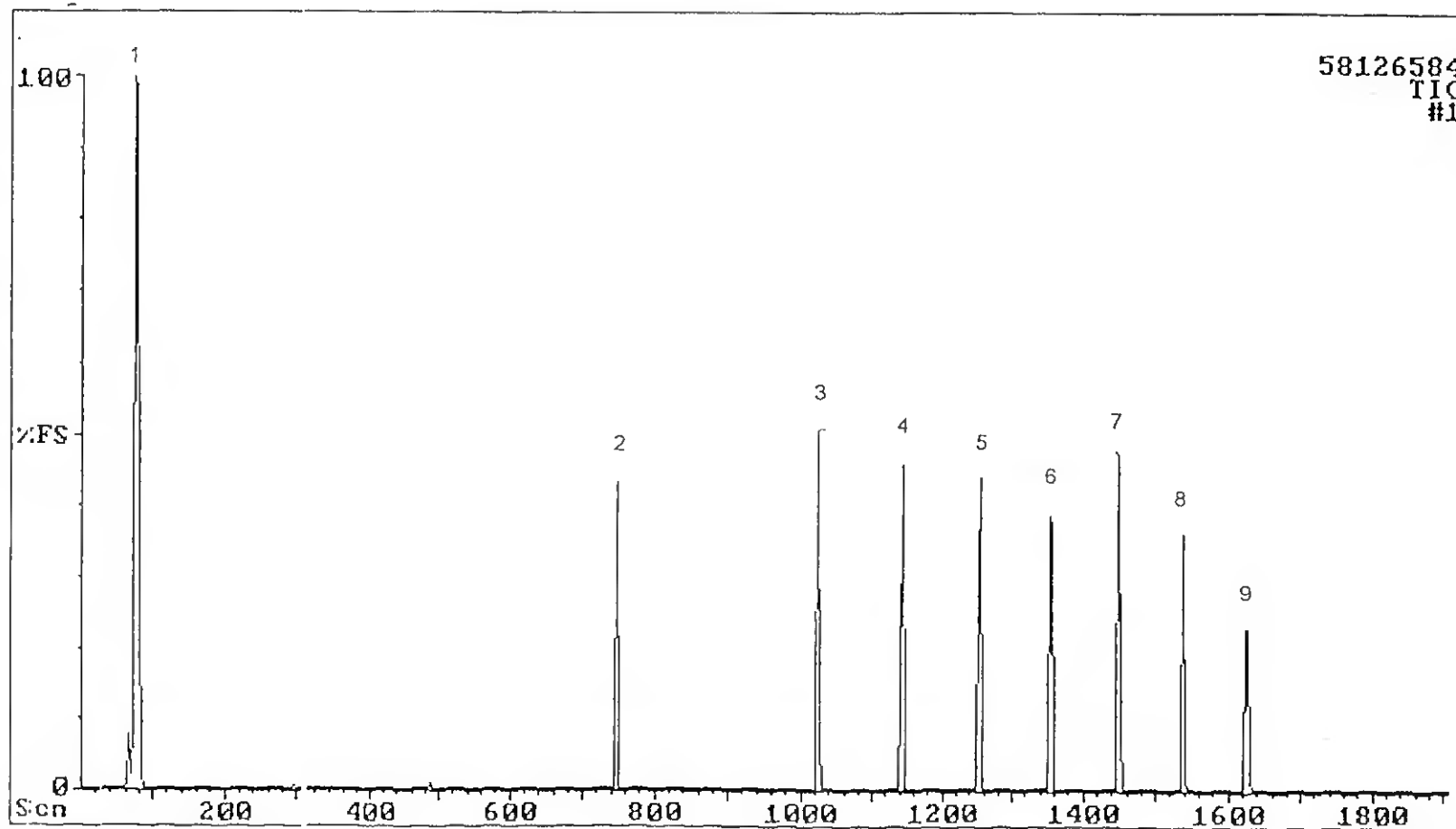


Figura 3.12 Cromatograma (TIC) obtido com a mistura padrão dos ácidos gordos metilados. Os integrais relativos não podem ser comparados em virtude das quantidades aplicadas não terem sido idênticas.

- 1- SOLVENTE
- 2- ACETATO DO OCTADECANOL
- 3- ACETATO DO NONADECANOL
- 4- ACETATO DO EICOSANOL
- 5- ACETATO DO HENEICOSANOL
- 6- ACETATO DO DOCOSANOL
- 7- ACETATO DO TETRACOSANOL
- 8- ACETATO DO HEXACOSANOL
- 9- ACETATO DO NONACOSANOL
- 10- ACETATO DO TRIACONTANOL

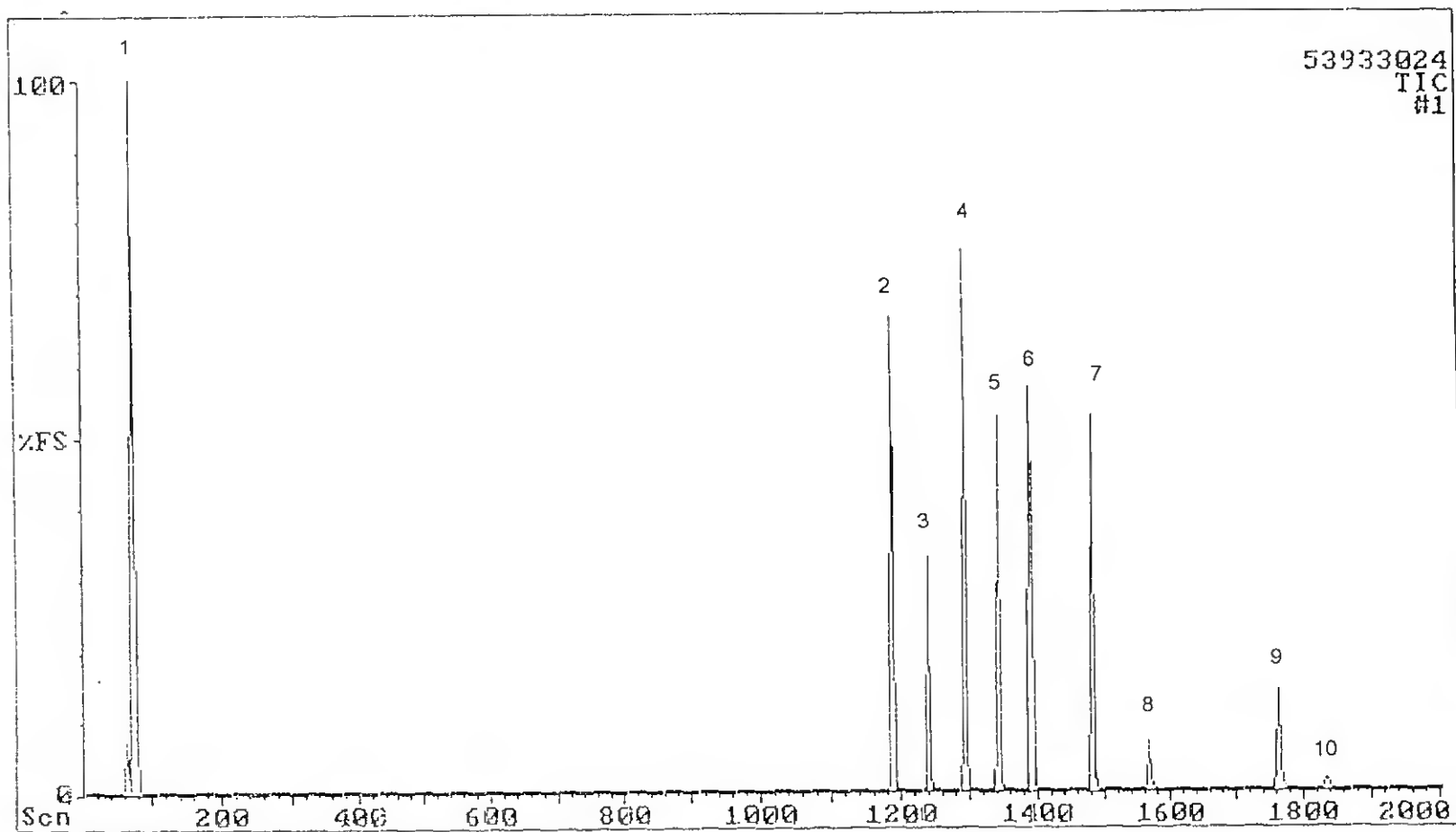


Figura 3.13 Cromatograma (TIC) obtido com a mistura padrão de alcoóis acetilados. Os integrais relativos não podem ser comparados em virtude das quantidades aplicadas não terem sido idênticas.

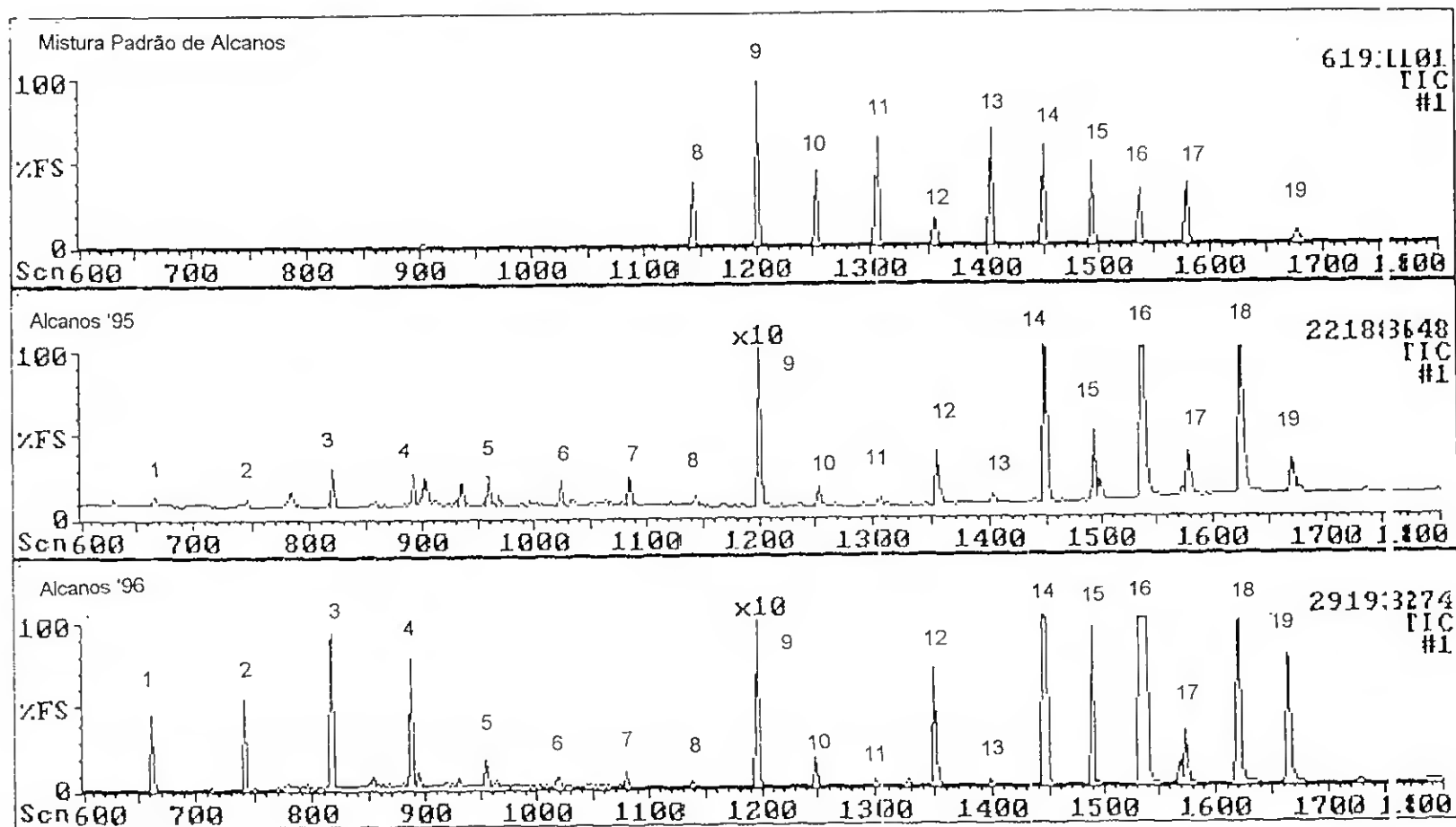


Figura 3.14 Comparação entre o cromatograma correspondente à mistura padrão de alcanos com os cromatogramas correspondentes à fracção dos extractos contendo a classe dos alcanos. 1-Tetradecano; 2-Pentadecano; 3-Hexadecano; 4-Heptadecano; 5-Octadecano; 6-Nonadecano; 7-Eicosano; 8-Heneicosano; 9-Docosano; 10-Triacosano; 11-Tetracosano; 12-Pentacosano; 13-Hexacosano; 14-Heptacosano; 15-Octacosano; 16-Nonacosano; 17-Triacontano; 18-Hentriacontano; 19-Dotriacontano.

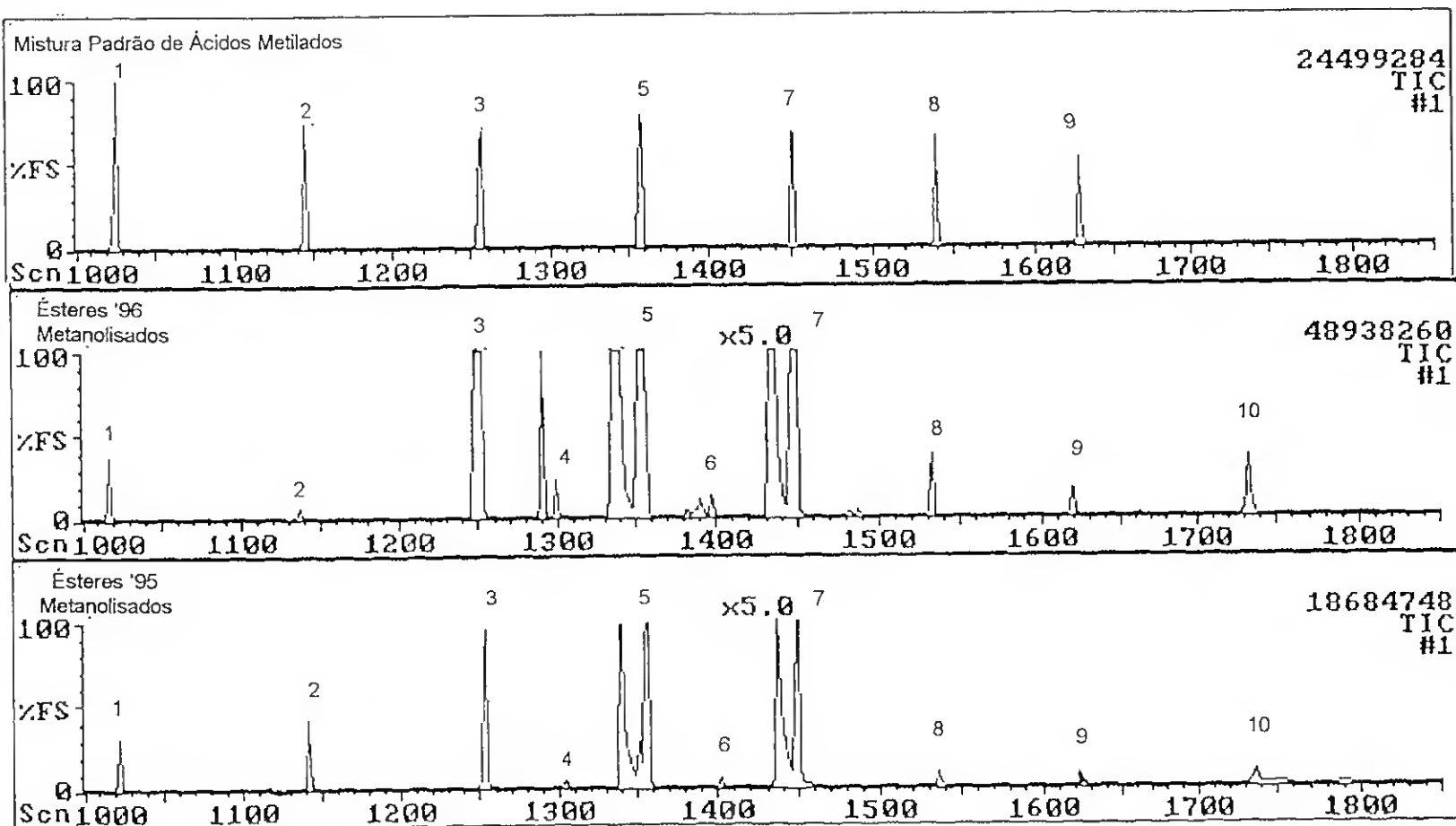


Figura 3.15 A - Comparação entre o cromatograma correspondente à mistura padrão dos ácidos metilados com os cromatogramas correspondentes à fracção dos extractos contendo a classe dos ésteres metanolizados. 1-Éster metílico do ácido hexadecanóico; 2-Éster metílico do ácido octadecanóico; 3-Éster metílico do ácido eicosanóico; 4-Éster metílico do ácido heneicosanóico; 5-Éster metílico do ácido docosanóico; 6-Éster metílico do ácido triacosanóico; 7-Éster metílico do ácido tetracosanóico; 8- Éster metílico do ácido hexacosanóico; 9- Éster metílico do ácido octacosanóico; 10-Éster metílico do ácido triacontanóico.

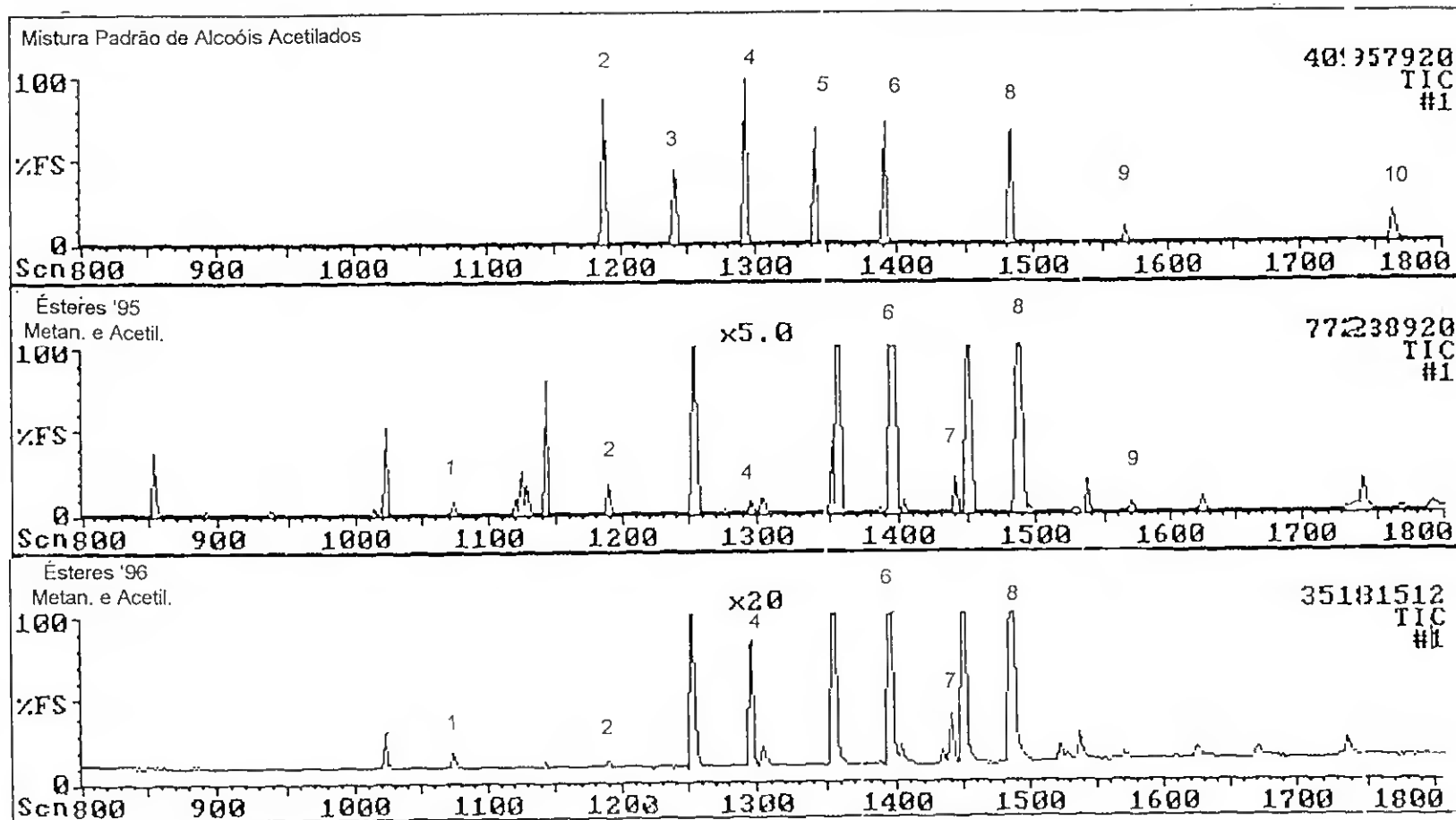


Figura 3.15 B - Comparação entre o cromatograma correspondente à mistura padrão de alcoóis acetilados com os cromatogramas correspondentes à fracção dos extractos contendo a classe dos ésteres metanolizados e acetilados. 1-Acetato do hexadecanol; 2-Acetato do octadecanol; 3-Acetato do nonadecanol; 4-Acetato do eicosanol; 5-Acetato do heneicosanol; 6-Acetato do docosanol; 7-Acetato do triacosanol; 8-Acetato do tetracosanol; 9-Acetato do hexacosanol; 10-Acetato do nonacosanol.

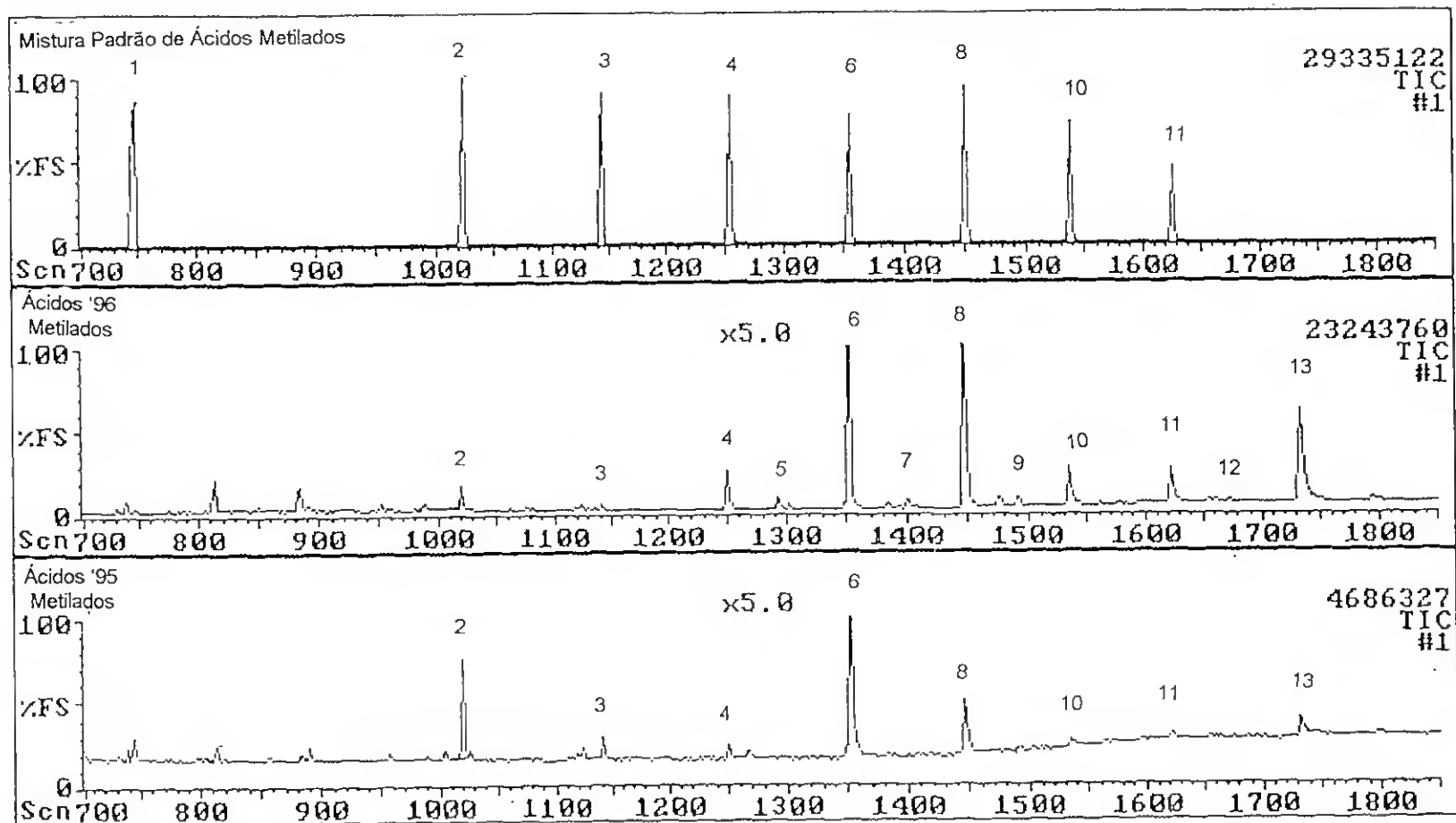


Figura 3.16 Comparação entre o cromatograma correspondente à mistura padrão de ácidos metilados com os cromatogramas correspondentes à fracção dos extractos contendo a classe dos ácidos também metilados. 1-Éster metílico do ácido dodecanóico; 2-Éster metílico do ácido hexadecanóico; 3-Éster metílico do ácido octadecanóico; 4-Éster metílico do ácido eicosanóico; 5-Éster metílico do ácido heneicosanóico; 6-Éster metílico do ácido docosanóico; 7-Éster metílico do ácido triacosanóico; 8-Éster metílico do ácido tetracosanóico; 9-Éster metílico do ácido pentacosanóico; 10-Éster metílico do ácido hexacosanóico; 11-Éster metílico do ácido octacosanóico; 12-Éster metílico do ácido nonacosanóico; 13-Éster metílico do ácido triacontanóico.

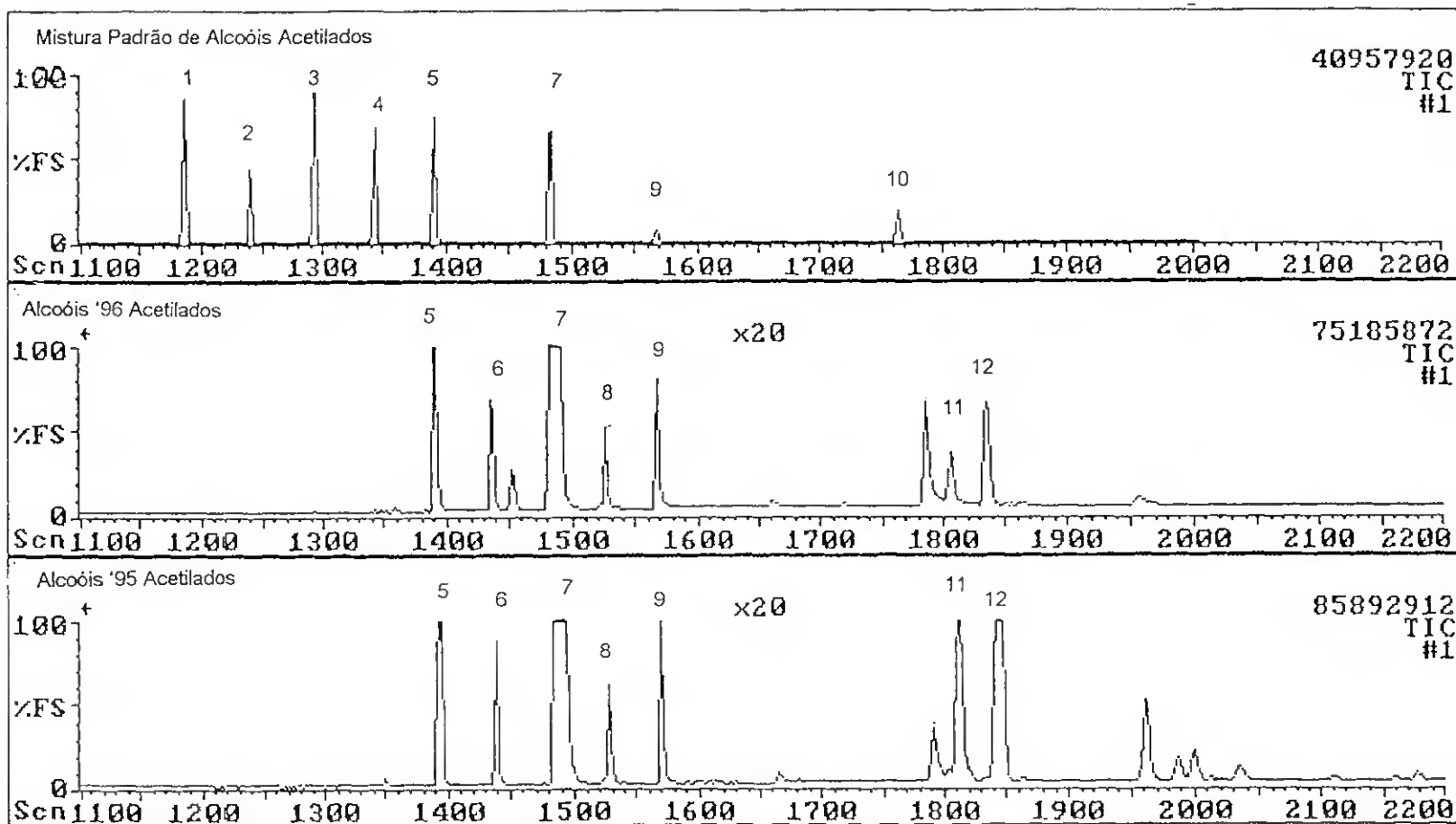


Figura 3.17 Comparação entre o cromatograma correspondente à mistura padrão de alcoóis acetilados com os cromatogramas correspondentes à fracção dos extractos contendo a classe dos alcoóis após a respectiva acetilação. 1-Acetato do octadecanol; 2-Acetato do nonadecanol; 3-Acetato do eicosanol; 4-Acetato do heneicosanol; 5-Acetato do docosanol; 6-Acetato do triacosanol; 7-Acetato do tetracosanol, 8-Acetato do pentacosanol; 9-Acetato do hexacosanol; 10-Acetato do nonacosanol; 11- $\alpha$ -amyrin; 12- $\beta$ -amyrin.

A tabela 3.2 representa as percentagens relativas dos componentes individuais de cada classe, calculadas com base nas áreas dos respectivos picos cromatográficos, para o extracto de Julho de 1995 e para o extracto de Janeiro de 1996.

Tabela 3.2 Composição (percentagem das áreas dos picos) de alcanos, aldeídos, alcoóis primários, ácidos gordos e ésteres em ceras cuticulares de folhas de *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp., extraídas em Julho de 1995 e em Janeiro de 1996.

| n <sub>C</sub> | Alcanos (%) |      | Aldeídos (%) |      | Alcoóis Primários (%) |                  | Ácidos Gordos (%) |      | Ésteres Metanolisados |      |                    |      |     |
|----------------|-------------|------|--------------|------|-----------------------|------------------|-------------------|------|-----------------------|------|--------------------|------|-----|
|                |             |      |              |      |                       |                  |                   |      | Fracção Ácido (%)     |      | Fracção Alcool (%) |      |     |
|                | 1995        | 1996 | 1995         | 1996 | 1995                  | 1996             | 1995              | 1996 | 1995                  | 1996 | 1995               | 1996 |     |
| 14             | < 5         | < 5  | -            | -    | -                     | -                | -                 | -    | -                     | -    | -                  | -    | -   |
| 15             | < 5         | < 5  | -            | -    | -                     | -                | -                 | -    | -                     | -    | -                  | -    | -   |
| 16             | < 5         | < 5  | -            | -    | -                     | -                | 9                 | < 5  | < 5                   | < 5  | < 5                | < 5  | < 5 |
| 17             | < 5         | < 5  | -            | -    | -                     | -                | -                 | -    | -                     | -    | -                  | -    | -   |
| 18             | < 5         | < 5  | -            | -    | -                     | -                | < 5               | < 5  | < 5                   | < 5  | < 5                | < 5  | < 5 |
| 19             | < 5         | < 5  | -            | -    | -                     | -                | -                 | -    | -                     | -    | -                  | -    | -   |
| 20             | < 5         | < 5  | -            | -    | -                     | -                | < 5               | < 5  | 20                    | 21   | < 5                | < 5  | < 5 |
| 21             | < 5         | < 5  | -            | -    | -                     | -                | -                 | < 5  | < 5                   | < 5  | -                  | -    | -   |
| 22             | 12          | < 5  | < 5          | -    | 6                     | 7                | 62                | 22   | 38                    | 37   | 43                 | 47   | 47  |
| 23             | < 5         | < 5  | -            | -    | < 5                   | < 5              | -                 | < 5  | < 5                   | < 5  | < 5                | < 5  | < 5 |
| 24             | < 5         | < 5  | 19           | -    | 78                    | 87               | 13                | 39   | 31                    | 37   | 54                 | 47   | 47  |
| 25             | < 5         | < 5  | -            | -    | < 5                   | < 5              | -                 | < 5  | -                     | -    | -                  | -    | -   |
| 26             | < 5         | < 5  | < 5          | -    | < 5                   | < 5              | < 5               | 6    | < 5                   | < 5  | < 5                | -    | -   |
| 27             | 11          | 21   | -            | -    | -                     | -                | -                 | -    | -                     | -    | -                  | -    | -   |
| 28             | < 5         | < 5  | < 5          | -    | -                     | -                | < 5               | 7    | < 5                   | < 5  | -                  | -    | -   |
| 29             | 54          | 58   | < 5          | -    | -                     | -                | -                 | < 5  | -                     | -    | -                  | -    | -   |
| 30             | -           | -    | 57           | -    | 9 <sup>1</sup>        | < 5 <sup>1</sup> | 6                 | 17   | < 5                   | < 5  | -                  | -    | -   |
|                |             |      |              |      | < 5 <sup>2</sup>      | < 5 <sup>2</sup> |                   |      |                       |      |                    |      |     |
| 31             | 12          | 8    | -            | -    | -                     | -                | -                 | -    | -                     | -    | -                  | -    | -   |
| 32             | -           | -    | 15           | -    | -                     | -                | -                 | -    | -                     | -    | -                  | -    | -   |

<sup>1, 2</sup> - Triterpenóis  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina respectivamente

Apesar de terem sido obtidos os espectros de massa de todos os componentes individuais identificados, apresenta-se o correspondente ao C<sub>24</sub> alcool, por este composto representar cerca de 24 % das ceras cuticulares em estudo e por apresentar alguma variação no respectivo tempo de retenção em cromatografia gasosa relativamente ao do correspondente composto padrão (figura 3.17), apresentando-se também, para comparação, o espectro de massa do padrão. Ambos os espectros foram obtidos a partir dos picos correspondentes a estes dois compostos antes das respectivas derivatizações.

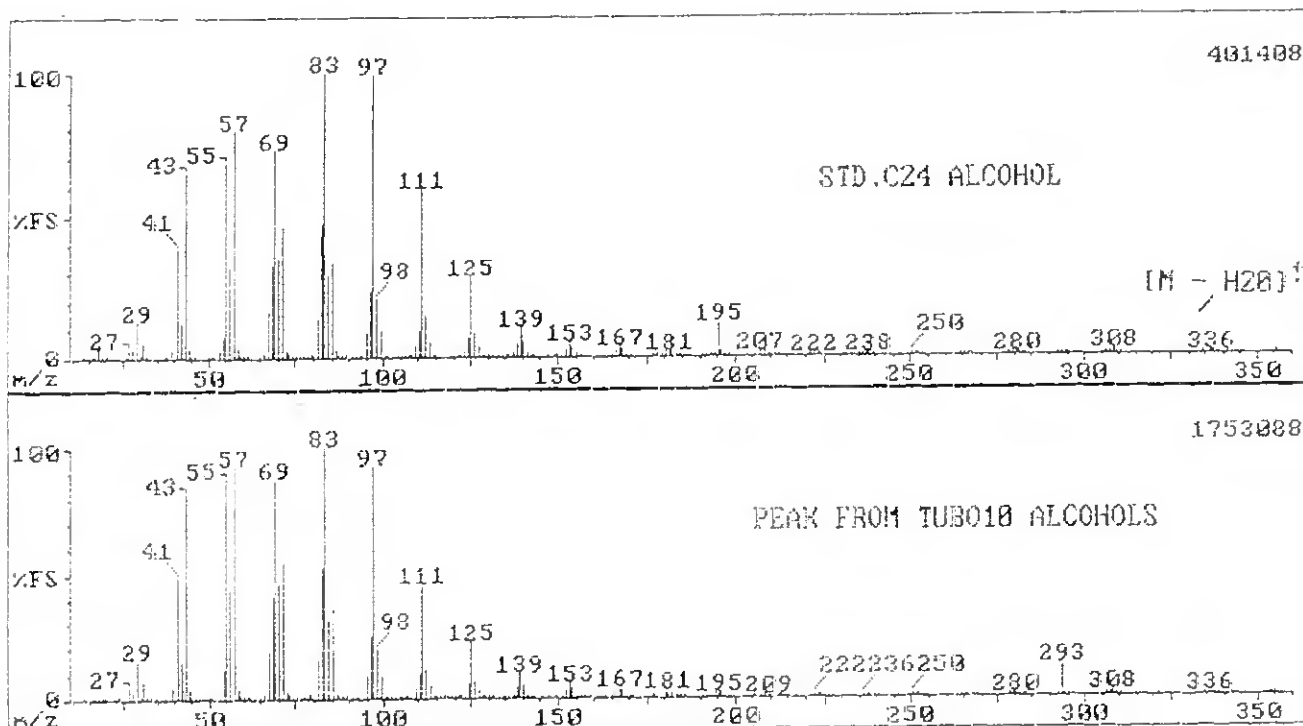


Figura 3.18 - Comparação entre o espectro de massa do pico correspondente ao peso molecular de 354 e o espectro de massa do composto padrão  $C_{24}$  álcool.

Da análise a uma das classes, separada do extracto de Julho de 1995, provisoriamente identificada por TLC como ésteres metílicos, foram obtidos os espectros de massa dos componentes individuais presentes. A figura 3.19 representa o espectro de massa do composto maioritário de uma série homóloga de aldeídos, classe inconfundível com ésteres metílicos no que respeita aos respectivos espectros de massa. Esta classe, minoritária no extracto de ceras de Julho de 1995, não foi encontrada no extracto de Janeiro de 1996.

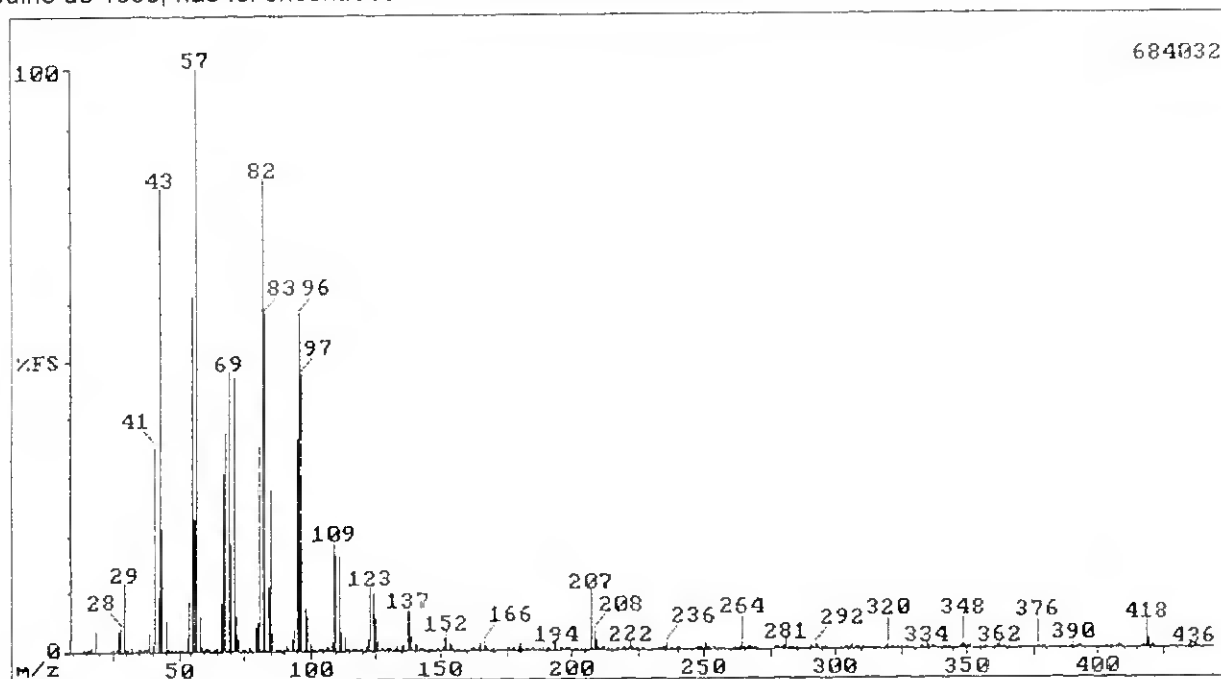
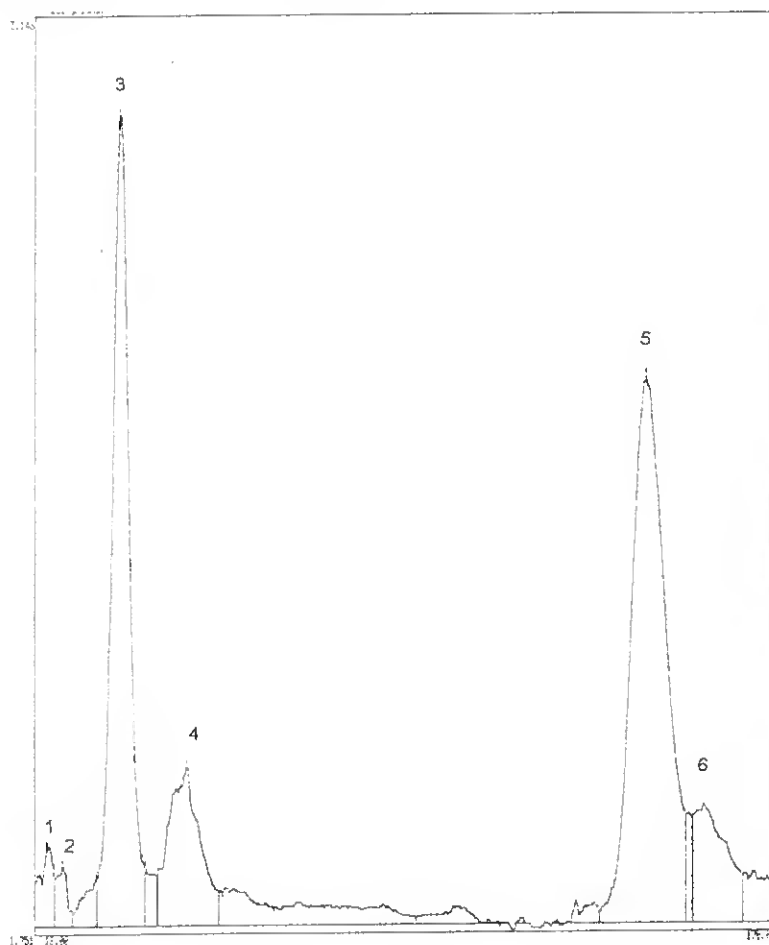


Figura 3.19 Espectro de massa do  $C_{30}$  aldeído.

### 3.1.1.4.2 Análise Quantitativa dos Extractos

A análise quantitativa dos extractos foi levada a efeito através de técnicas de densitometria. A figura 3.20 representa o varrimento do cromatograma em camada fina do extracto de ceras de Julho de 1995, registado pelo densitómetro.



**Figura 3.20** Registo no densitómetro do cromatograma em camada fina do extracto de ceras cuticulares de Azinheira. 1 e 2- classes de componentes não identificadas, 3- alcoóis primários, 4- ácidos gordos; 5- ésteres; 6- alcanos.

A partir dos valores de densidade óptica obtidos com os padrões, foi calculada a equação da recta correspondente à curva de calibração obtida para cada classe de compostos. Assim foram calculadas as concentrações relativas das diferentes classes de substâncias existentes no extracto total, cujos resultados se apresentam na tabela 3.3.

**Tabela 3.3** Quantificação relativa das diferentes classes de compostos orgânicos constituintes dos extractos.

|                   | Extracto de<br>Julho de 1995 (%) | Extracto de<br>Janeiro de 1996 (%) |
|-------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| Alcanos           | 9                                | 9                                  |
| Ésteres           | 56                               | 50                                 |
| Aldeídos          | <3                               | -                                  |
| Alcoóis Primários | 20                               | 27                                 |
| Ácidos Gordos     | 12                               | 11                                 |
| Não Identificados | 3                                | 3                                  |

### 3.1.2 Discussão dos Resultados

#### 3.1.2.1 Da Extração

A polaridade do solvente de extração foi a considerada suficientemente elevada para garantir que todos os lípidos superficiais fossem rapidamente extraídos. A utilização de um hidrocarboneto como solvente, por exemplo, não teria sido a melhor opção para a extração efectuada uma vez que estes lípidos superficiais continham quantidades elevadas de classes de compostos mais polares tais como alcoóis primários ou ácidos gordos. Foi testada a eficiência de um determinado leque de solventes mediante lavagens ou imersões sucessivas de curta duração, monitorizando os resultados e a composição dos extractos obtidos. Este procedimento permitiu a escolha do clorofórmio como solvente de extração porque foi o que originou o melhor resultado no que respeita à quantidade de lípidos extraídos, no menor tempo de contacto possível.

A contaminação do extracto de lípidos superficiais com alguns lípidos internos que eventualmente pudessem ter sido co-extraídos foi pouco provável de ter ocorrido uma vez que não se provocaram danos físicos na camada celular das folhas durante o processo de extração. Por outro lado, nos

casos estudados, a composição química desta fracção é também marcadamente diferente da que se obtém à superfície da mesma planta.

### 3.1.2.2 Das Separações

Na análise dos extractos obtidos foi escolhida a sílica gel como adsorvente das placas de TLC, uma vez que a alternativa do óxido de alumínio poderia não ser adequada para a análise de todas as classes lipídicas, particularmente aldeídos, que poderiam ser decompostos por esse adsorvente e pelos compostos acídicos fortemente adsorvidos.

Sabe-se que o fraccionamento de lípidos superficiais em camada fina de sílica gel ocorre predominantemente por um processo de adsorção selectiva, em competição com a solubilidade no eluente, da qual resulta a separação dos constituintes numa mistura de acordo com a sua classe química. O factor principal responsável pelo movimento das classes de substâncias em TLC é, assim, a sua polaridade relativamente uns aos outros o que, por sua vez, está directamente relacionado com a natureza, número e posição dos grupos funcionais presentes. Os hidrocarbonetos como não têm nenhum grupo funcional são a classe menos fortemente adsorvida e, conseqüentemente, exibem sempre o mais elevado valor de  $R_f$ . Por substituição no esqueleto hidrocarbonado, o valor de  $R_f$  vai diminuindo, o que ocorre progressivamente de acordo com a seguinte ordem aproximada de polaridade crescente de grupos funcionais: éster < cetona < aldeído < álcool primário < ácido gordo. A solubilidade de classes individuais de lípidos no solvente de eluição também tem a sua quota-parte de responsabilidade no processo global de fraccionamento e isto reflecte-se em alterações significativas na ordem relativa de eluição de certas classes, em determinados sistemas, especialmente aqueles que contenham uma pequena proporção de ácido. É o que sucede na mistura analisada em que os ácidos gordos apresentam um valor de  $R_f$  superior ao dos alcoóis.

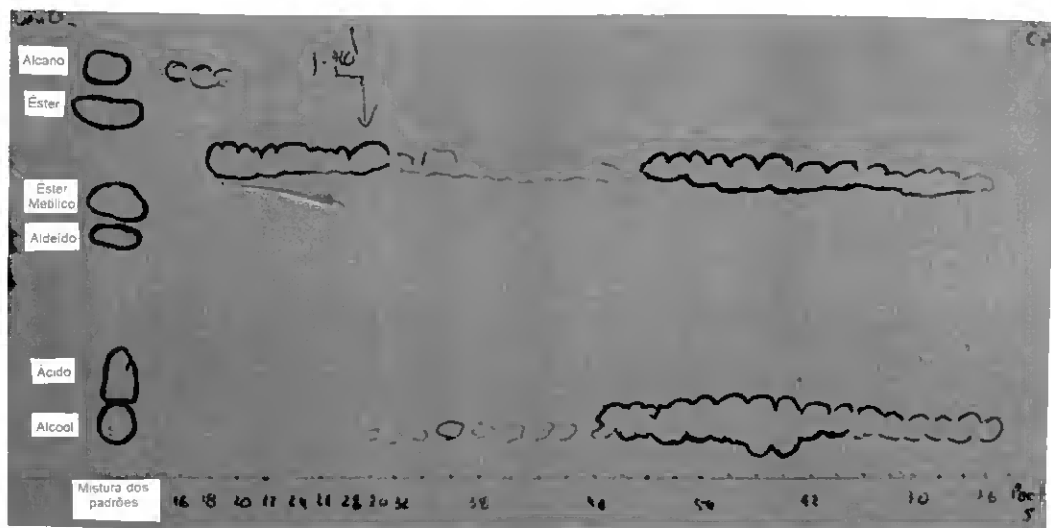
### 3.1.2.2.1 O Fraccionamento Inicial do Extracto

Apesar da cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) não ter desenvolvido ainda todo o seu potencial na análise de lípidos superficiais, principalmente devido à inexistência de um sistema de detecção com sensibilidade adequada para todas as classes de compostos, esta técnica revelou-se de extrema importância no trabalho permitindo o fraccionamento do extracto total nas várias classes de compostos orgânicos que o constituíam e o seu isolamento.

Apesar da separação entre a maioria das classes destes lípidos cuticulares ter sido numa forma geral boa, não foi encontrado um sistema universal capaz de separar todas elas completamente, numa única aplicação. Isto não é de estranhar se se considerar não apenas a larga gama de polaridades diferentes que ocorrem entre as classes mas também as pequenas diferenças que se verificam entre algumas delas.

Apesar de se reconhecer a eficácia do sistema eluente n-hexano:éter dietílico:ácido fórmico (80:20:1) em TLC analítica, cuja separação evidenciada entre as classes de componentes do extracto foi satisfatória, este sistema não foi usado nas separações em HPLC preparativa, apesar da idêntica composição das fases estacionárias utilizadas. Em ensaios preliminares, quer com misturas padrão, quer com pequenas quantidades de ceras extraídas antes de Julho de 1995, foi verificado por análise em TLC que, durante o aperfeiçoamento dos métodos de separação, a presença do ácido fórmico nessa mistura, apesar de oferecer uma boa separação, alterava a quantidade da classe de substâncias identificada como alcoóis após a sua separação da mistura, como classe isolada ou não, convertendo-os progressivamente num derivado não identificado, cuja análise por TLC evidenciava um valor de  $R_f$  situado entre os valores de  $R_f$  dos ésteres e dos ésteres metílicos. Imediatamente após cada separação cromatográfica, o solvente das fracções recolhidas era evaporado, constatando-se a pouca volatilidade do componente ácido da mistura eluente. Após esta evaporação o resíduo era redissolvido em clorofórmio mas, aparentemente, a existência de algum ácido fórmico residual era responsável pela reacção com a classe álcool e

pela conseqüente conversão no referido derivado. A figura seguinte representa uma fotografia de uma placa de TLC usada como detecção numa recromatografia a uma "pool" de alcoóis, constituída num desses ensaios preliminares. Além da presença de vestígios de alcanos, que aliás justificaram a recromatografia, é também visível na placa a detecção da referida classe de compostos, inexistente no extracto original.



**Figura 3.21** Fotografia de uma TLC realizada para detecção das fracções recolhidas durante um ensaio preliminar de recromatografia de uma "pool" de alcoóis anteriormente constituída.

Estas recromatografias decorreram sempre no sistema eluente indicado pelo que, mesmo após a separação da classe de compostos em causa, pelo processo cujo resultado se ilustrou na figura anterior, a derivatização da classe alcool continuou a ocorrer, quer durante o armazenamento do eluato resultante, quer durante o próprio processo cromatográfico, como se ilustra na figura 3.21 onde é evidente a separação entre a classe correspondente ao derivado formado durante o período de armazenagem e os alcoóis restantes, cujo pico de eluição coincide com um segundo pico de presença daquela classe, o que leva a supor que a mesma se formou no decurso da recromatografia em questão, especialmente no período de tempo decorrido entre a recolha das fracções e a sua análise por TLC, correspondente apenas ao tempo necessário para evaporar 1 mL de solvente em cada fracção, na centrífuga concentradora.

O mecanismo da reacção que provavelmente ocorreu pode ter sido o que a seguir se propõe:



A opção de se efectuar primeiro, no fraccionamento inicial do extracto, uma separação entre classes de componentes apolares e polares e só depois se proceder à separação de cada classe representou, relativamente ao processo de separação do extracto de Julho de 1995, não só economia de tempo mas também dos solventes orgânicos usados nos processos cromatográficos, diminuindo o número de separações que foram levadas a efeito.

Assim, ao ser usado um sistema eluente em que se vai aumentando a sua polaridade, efectua-se simultaneamente um jogo de interacções e de processos de equilíbrio que se estabelecem entre a superfície da fase estacionária, os compostos constituintes do extracto e as características da fase móvel. Por isso, ao ser usado n-hexano a 100 % como eluente, ocorreu a separação dos alcanos e dos ésteres, constituintes apolares do extracto com maior afinidade para com as moléculas do eluente estabelecendo com elas interacções apolares características como forças de London e de van der Waals. Com este tipo de fase móvel as restantes classes de substâncias, principalmente os ácidos gordos livres e os alcoóis primários, ficam adsorvidos aos grupos hidroxilo de superfície da sílica com os quais estabelecem interacções bastante favoráveis e fortes essencialmente do tipo de ligações por pontes de hidrogénio, atendendo à natureza polar dos seus grupos funcionais, ficando preferencialmente adsorvidos a esta superfície até porque a sua solubilidade na fase móvel é praticamente nula.

Com a adição de acetona e a mistura eluente consistindo de n-hexano:acetona na proporção de 95:5, criam-se as condições a nível das interacções moleculares e conseqüentemente da solubilidade para que, quer os alcoóis quer os ácidos progridam ao longo da coluna graças ao

estabelecimento de uma série de equilíbrios de partição entre a fase estacionária e a fase móvel, com tendência para deslocação desse equilíbrio no sentido da partição na fase móvel, graças ao estabelecimento preferencial de ligações polares (ligações por pontes de hidrogénio e ligações iónicas) entre as moléculas dos alcoóis e dos ácidos com as moléculas do eluente.

A fracção 90:10 de n-hexano:acetona contém ainda vestígios de alcoóis que, por ser uma classe maioritária relativamente aos ácidos, apresenta um pico de eluição mais alargado de forma que 100 mL de n-hexano:acetona na proporção de 95:5 não são suficientes para a sua eluição completa, obtendo-se a porção restante com a fracção 90:10 da referida mistura. Com esta fracção são igualmente eluídas duas classes de substâncias com um  $R_f$  menor que o dos alcoóis, no sistema eluente usado para as TLC analíticas efectuadas, cuja identificação não foi possível devido à baixa quantidade em que se encontravam presentes no extracto.

#### **3.1.2.2.1.1 A Separação dos Alcanos e dos Ésteres**

Nas análises de TLC preparativa, a aplicação do material à placa foi efectuada numa linha o mais estreita possível atendendo a que se fosse demasiado larga, a resolução entre as bandas separadas seria reduzida porque também estas seriam muito largas e teriam tendência para se sobrepor. Foi utilizado o procedimento de múltiplos desenvolvimentos, de modo a obter a melhor separação possível. O uso de desenvolvimentos múltiplos melhorou a resolução porque teve um efeito de concentração das bandas, tornando-as mais compactas e, por isso, melhor separadas.

A utilização de tetracloreto de carbono como eluente foi uma adaptação da técnica indicada por Mangold *et al* (1984), para a separação entre alcanos e ésteres, em placas preparativas de sílica

gel. A separação ocorre devido à preferencial interacção dos alcanos com o eluente. Os ésteres, fracamente polares, são possuidores, nas suas moléculas, do grupo funcional característico desta classe que, em presença de um solvente apolar como eluente, interage com a superfície da sílica, se não por ligações por pontes de hidrogénio, pelo menos por interacções transitórias dipolo-dipolo, resultando na sua progressão mais lenta ao longo da fase estacionária e a eluição dos alcanos em primeiro lugar.

#### **3.1.2.2.1.2 A Separação entre Ésteres e Aldeídos**

Verificou-se na "pool" dos ésteres de 1995, a presença de uma outra classe de substâncias, cuja existência já se suspeitava pela análise da TLC analítica do extracto de Julho desse ano e que se admitia poderem ser ésteres metílicos. Nesse sentido, utilizando compostos padrão foi desenvolvido um método de separar ésteres de ésteres metílicos que após aplicação ao material biológico foi também eficaz na separação das duas classes em causa. Mais tarde, a análise por GC/MS veio identificar definitivamente a classe em causa como sendo aldeídos e não ésteres metílicos.

Este método, cuja eficácia de separação entre ésteres e ésteres metílicos é bastante elevada, requer contudo confirmação e testes à sua validade na separação entre ésteres e aldeídos, uma vez que no extracto de Janeiro de 1996, dada a inexistência da classe dos aldeídos, não voltou a ser aplicado.

O fundamento do método baseia-se no estudo e utilização do conhecimento sobre os limites de solubilidade de ésteres e de ésteres metílicos. Assim, utilizando o éster padrão correspondente ao

C<sub>44</sub>, solubilizado em clorofórmio, foi estudada a variação da sua solubilidade por adição gradual de metanol, tendo sido constatado o seu limite de solubilidade nessa mistura, à proporção de 60:40. Assim, ésteres e ésteres metílicos foram aplicados à coluna solubilizados em clorofórmio:metanol na proporção de 60:40. Quando se iniciou a cromatografia foi usada a proporção de 20:80 dessa mesma mistura como eluente, o que inibiu a solubilidade da classe éster, imobilizando-a na coluna e permitindo à classe dos ésteres metílicos a sua progressão pela coluna e a sua completa eluição. Por diminuição gradual da polaridade do eluente, correspondente à alteração da proporção da mistura eluente para 40:60 e depois para 60:40 em clorofórmio:metanol, os ésteres experimentam um progressivo aumento da sua solubilidade sendo então eluídos da coluna e concretizando-se deste modo a separação entre estas duas classes. A utilização neste processo de uma coluna de fase reversa, possibilitou a existência de uma superfície (fase estacionária) com a qual as classes a separar estabelecem interações com diferentes graus de afinidade e que permitiu a interação favorável da classe éster relativamente aos ésteres metílicos garantindo a sua separação. Diminuindo-se a polaridade do eluente, confere-se à fase móvel características que a permitem estabelecer com as moléculas dos ésteres, interações preferenciais relativamente à superfície da fase estacionária, pelo que estas são eluídas.

Na aplicação ao extracto, como os aldeídos constituem uma classe com características mais polares do que os ésteres metílicos, na mistura contendo aldeídos e ésteres, estes ficam imobilizados na coluna enquanto que os aldeídos, tal como acontece com os ésteres metílicos, são eluídos, se for usado um sistema eluente como o clorofórmio:metanol (20:80).

#### **3.1.2.2.1.3 A Separação dos Ácidos e dos Alcoóis**

No extracto os alcoóis representam uma das classes maioritárias pelo que, apesar de serem eluídos na sua maioria com a fracção de 95:5 de n-hexano:acetona, verificou-se, algumas vezes,

haver ainda vestígios da sua presença na fracção de 90:10. Os ácidos, sendo compostos mais polares e existindo em quantidades muito menores no extracto, interagem mais fortemente com a fase móvel sendo todos eluídos da coluna com a proporção de 95:5 da referida mistura.

Verificou-se que a classe de compostos identificada pelas TLC como ácidos, ficava maioritariamente retida na coluna de sílica, quando o sistema eluente de n-hexano:éter dietílico (80:20) era usado, apesar da ocorrência de vestígios da sua presença em algumas fracções, como se ilustra na figura 3.2, sendo posteriormente eluída na sua totalidade durante a lavagem da coluna com clorofórmio:metanol (2:1). O mesmo se verificou, aliás, ao longo de todo o trabalho na separação da classe dos ácidos, não só em relação ao extracto de Julho de 1995 mas também em relação ao de Janeiro de 1996 e que constituiu a forma de separar a classe dos ácidos a partir do extracto original.

O método usado na separação dos alcoóis e dos ácidos tem por base a diferença de afinidades destas classes para com os grupos hidroxilo de superfície da sílica e para com as moléculas do eluente. Sendo compostos polares os ácidos gordos interagem preferencialmente com os grupos -OH da sílica através de ligações por pontes de hidrogénio, ficando assim aí adsorvidos. Os alcoóis apesar de compostos polares, interactuam preferencialmente com o eluente sendo eluídos primeiro. Aumentando a polaridade da mistura eluente, como acontece quando se efectua a lavagem da coluna com clorofórmio:metanol (2:1) ou como aconteceria se se usasse a mistura que os separou constituída por n-hexano:acetona (95:5) ou ainda se se adicionasse 1 % de ácido fórmico, à mistura n-hexano:éter dietílico (80:20), confere-se poder eluente à fase móvel, relativamente às moléculas dos ácidos adsorvidas na fase estacionária e, estas, passando a interagir preferencialmente com as moléculas constituintes do eluente, por forças polares específicas do tipo dipolo-dipolo ou ligações por pontes de hidrogénio, são eluídas.

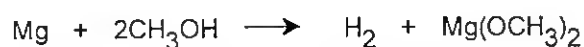
### 3.1.2.3 Das Derivatizações Químicas

#### 3.1.2.3.1 Derivatização dos Ésteres

As moléculas dos ésteres são excessivamente longas para serem volatilizadas e permitem a análise por cromatografia gasosa, pelo que tiveram de ser convertidas em derivados adequados ao tipo de análise que se pretendia. Assim, essas moléculas foram transesterificadas, convertendo-se em ésteres metílicos, os derivados correspondentes à fracção ácido das moléculas dos ésteres e, posteriormente, também a fracção álcool dessas moléculas foi convertida nos correspondentes derivados acetato, obtendo-se deste modo compostos suficientemente voláteis e estáveis para as condições de análise por cromatografia gasosa.

##### 3.1.2.3.1.1 Secagem do Metanol

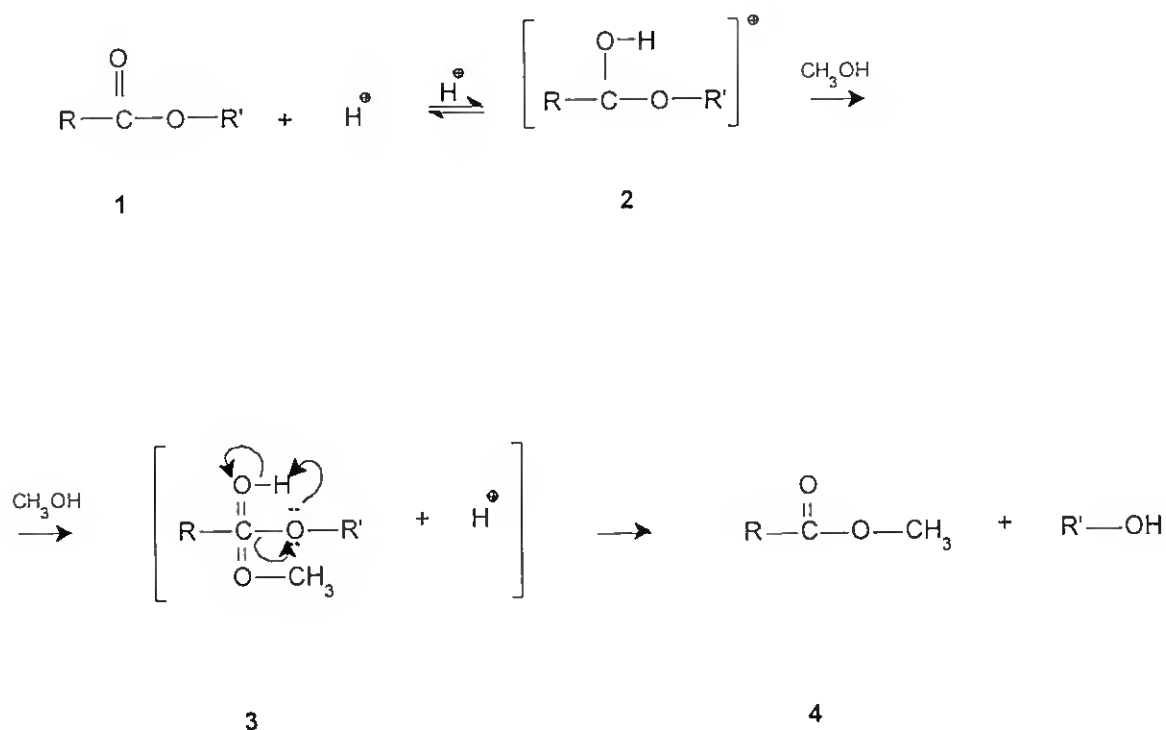
A reacção de secagem do metanol pode ser esquematizada pelas equações químicas seguintes:



A presença do iodo é para limpar o magnésio, activando-o. A interacção subsequente entre o metanolato de magnésio e a água dá o hidróxido de magnésio, altamente insolúvel. Assim, a água eventualmente existente no metanol liga-se ao magnésio.

### 3.1.2.3.1.2 Transesterificação

Dum modo geral, os ésteres podem ser transesterificados por alcoóis na presença de um catalisador ácido adequado, conforme se representa no esquema seguinte:



À protonação inicial do éster segue-se a adição do álcool substituinte para dar o intermediário (3), que pode rearranjar-se, para dar o éster (4). Cada passo é reversível e, na presença de um largo excesso de metanol, o ponto de equilíbrio da reacção é deslocado de modo que o produto é quase apenas o éster que se requeria (4). Não deve haver água presente uma vez que a sua presença

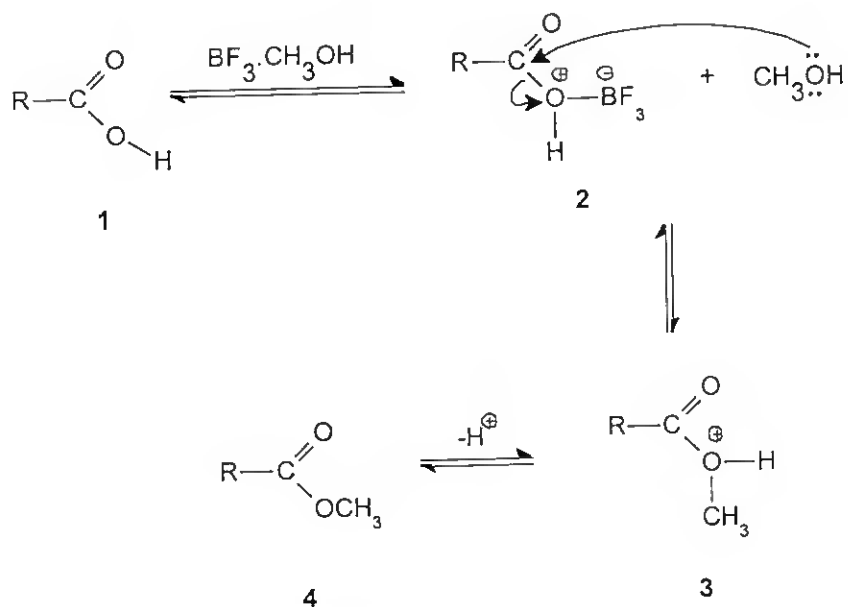
poderia produzir alguma hidrólise, pelo que o metanol utilizado teve de ser seco. No caso em apreço o catalisador ácido foi o ácido sulfúrico a uma concentração final no meio da reacção de 1 %.

Durante o procedimento experimental seguido para a transesterificação, a adição de cloreto de cálcio teve a função de facilitar a separação das fases, para poder ser identificada e descartada a fase aquosa. A adição posterior de bicarbonato de sódio tem o objectivo de neutralizar o ácido sulfúrico utilizado como catalisador.

### **3.1.2.3.2 Derivatização dos Ácidos Gordos**

Os ácidos gordos sendo compostos muito polares são, por isso, pouco voláteis e, mesmo utilizando programas de temperaturas muito elevadas, na análise por GC, chegam a ficar retidos na coluna contribuindo para a sua degradação, especialmente o tipo de ácidos existentes nas ceras cuticulares vegetais uma vez que as suas moléculas têm cadeias extremamente longas. Ao serem convertidos nos seus ésteres metílicos, menos polares, tornam-se mais voláteis, permitindo uma melhor, mais facilitada e adequada análise por GC.

Os ácidos foram assim esterificados pelo metanol na presença do catalisador trifluoreto de boro,  $\text{BF}_3$ , como se ilustra no esquema seguinte:



Cada passo é reversível, mas na presença de um largo excesso do álcool, o ponto de equilíbrio é deslocado de modo que a esterificação prossegue até ficar completa. Contudo, na presença da água, fortemente dadora de electrões relativamente aos alcoóis alifáticos, a formação do intermediário (2) não seria favorecida e a esterificação não prosseguiria completamente.

A escolha do  $\text{BF}_3$ -Metanol como reagente catalisador usado para a metilação foi por oferecer a vantagem de rapidamente esterificar ácidos gordos livres. O trifluoreto de boro, que funciona como um ácido de Lewis, na forma do seu complexo de coordenação com o metanol é um poderoso catalisador acídico para a esterificação de ácidos gordos. No processo de transesterificação dos ésteres não foi usado, apesar de adequado, por requerer tempos de reacção muito extensos relativamente aos ácidos gordos livres. Sabe-se que este reagente tem um tempo de vida limitado pelo que foi usada uma embalagem recente e intacta.

### 3.1.2.3.3 Derivatização dos Alcoóis

Foi necessário proceder à derivatização da classe dos alcoóis para os tornar susceptíveis de uma análise rigorosa por GC/MS. Em ensaios preliminares, cujos resultados não foram aqui apresentados, verificou-se a necessidade de se proceder à conversão desta classe em derivados cuja análise em GC resultasse em picos satisfatórios e com uma boa resolução. Assim, optou-se por converter a classe dos alcoóis nos seus derivados acetilados. A escolha do processo de acetilação em vez do de sililação com conseqüente formação dos derivados éteres trimetilsilílicos, teve a ver não só com a disponibilidade imediata dos reagentes necessários à acetilação no laboratório mas também com o facto de se saber que apesar dos derivados éteres trimetilsilílicos serem mais voláteis que os acetatos, são por outro lado menos estáveis, particularmente sob condições ácidas e sofrem hidrólise lenta nos adsorventes de TLC (Christie, 1989). Mais tarde, no decurso do trabalho, veio a comprovar-se que os acetatos, apesar de constituírem bons derivados para GC, nem sempre originam espectros de massa satisfatórios para fins identificativos.

### 3.1.2.4 Das Análises

#### 3.1.2.4.1 Análise por GC/MS

Em todas as classes de compostos, a análise quantitativa foi efectuada a partir da integração das áreas dos picos correspondentes aos seus componentes individuais. Na classe dos ésteres foram integrados os picos correspondentes aos componentes das fracções álcool e ácido, separadas após metanólise. Esta classe de compostos é constituída predominantemente por homólogos com

um número par de átomos de carbono nas suas cadeias, desde o C<sub>32</sub> até ao C<sub>56</sub> no extracto de Julho de 1995 e, desde o C<sub>32</sub> até ao C<sub>54</sub> no extracto de Janeiro de 1996. Dentro de um determinado comprimento de cadeia, podem certamente ocorrer distribuições de isómeros resultantes de combinações entre diferentes metades ácido e álcool.

A análise por GC/MS dos produtos da metanólise revelou que estes ésteres eram formados principalmente pelos alcoóis C<sub>24</sub> (47-54 %) e C<sub>22</sub> (43-49 %) esterificados com os ácidos gordos C<sub>22</sub> (37-38 %), C<sub>24</sub> (31-37 %) e C<sub>20</sub> (20-21 %), pelo que é possível deduzir que os ésteres maioritários na classe são os homólogos, com número par de átomos de carbono nas cadeias carbonatadas, C<sub>46</sub>, C<sub>44</sub>, C<sub>48</sub> e C<sub>42</sub>. Adicionalmente aos ésteres com numeração par das suas cadeias e a partir dos dados da tabela 3.2 pode ainda deduzir-se que existem quantidades menores de homólogos com comprimento de cadeia ímpar.

Não foram detectados triterpenóis na fracção álcool resultante da metanólise dos ésteres, ao contrário do que aconteceu na fracção dos alcoóis primários livres. Aparentemente, a reduzida quantidade relativa de algumas metades álcool não permitiu uma análise adequada em GC/MS pelo que, não dispondo de identificação positiva relativamente a esses compostos, não se indica a sua presença na tabela 3.2. Aliás, essa situação verificou-se não apenas para os alcoóis esterificados mas também para alguns componentes da classe dos alcanos e da classe dos ácidos gordos livres.

O pico de massa correspondente ao ião molecular nos alcoóis é frequentemente pouco intenso ou mesmo irreconhecível. Por outro lado, os acetatos são dos derivados mais usados em química orgânica sintética. Infelizmente, a sua tendência para eliminarem ácido acético, é quase tão acentuada quanto a perda de água pelos alcoóis, pelo que não oferecem vantagens especiais para determinações de peso molecular (Budzikiewicz *et al*, 1967). Relativamente à sua aplicação à classe álcool das ceras da Azinheira após a respectiva acetilação, não foi evidente a referida perda de 60 unidades de massa correspondentes à eliminação do ácido acético mas apresentou, por outro lado, nas condições de análise seleccionadas, um outro tipo de fragmentação inicial, menos

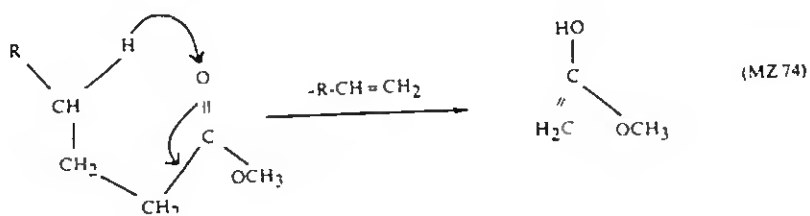
frequente mas igualmente possível, em que o íon molecular sofre a perda de 15 unidades de massa, correspondentes à fragmentação de um grupo  $\text{CH}_3$  do acetato. Apesar disso e, ao contrário do que sucedia antes da derivatização, obtiveram-se picos melhor definidos e melhor resolvidos dentro da série e tornou-se possível a detecção de um maior número destes compostos.

Nas figuras 3.15B e 3.17 verifica-se a ocorrência de tempos de retenção, para o álcool  $\text{C}_{24}$ , ligeiramente diferentes do que o obtido com o composto padrão. Essas diferenças podem ser explicadas pontualmente mas, dum modo geral têm a ver com a excessiva concentração relativa do componente em causa causando a sobrecarga da coluna e conseqüente alargamento do pico correspondente ou com fenómenos de degradação da própria coluna.

Os triterpenóis  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina foram identificados na classe dos alcoóis primários, a partir de um padrão de fragmentação iónica consideravelmente diferente do evidenciado pelos alcoóis, originando espectros perfeitamente inconfundíveis e, a partir ainda, de determinados fragmentos característicos nos respectivos espectros, como o foram por exemplo, o próprio íon molecular  $[\text{M}]^+$  cujo  $m/z=426$  e, um pico base, de massa 218. Simultaneamente, a biblioteca instalada no computador ligado ao aparelho permitiu uma identificação positiva destes compostos com um elevado grau de fiabilidade, por comparação com o espectro do composto autêntico sintético, arquivado em memória.

A análise do espectro de massa do  $\text{C}_{30}$  aldeído, representada na figura 3.19, permite observar o pico correspondente ao íon molecular  $[\text{M}]^+$ ,  $m/z=436$ , bem como o característico  $[\text{M}-18]^+$ ,  $m/z=418$ , correspondente à característica perda de uma molécula de água. Os alcoóis evidenciam também este tipo de fragmentação, mas nunca associada à perda complementar de 28 unidades de massa ( $\text{CO}$ ),  $m/z=408$  e de 44 unidades de massa ( $\text{CH}_3\text{CHO}$ ),  $m/z=392$ , não assinaladas no espectro, mas existentes, conforme listagem das intensidades dos picos de massa, em Anexo 1, o que, segundo Budzikiewicz (1967), constitui uma forte evidência do modo característico de fragmentação do íon molecular, de uma estrutura aldeídica alifática.

Os ésteres metílicos apresentam, nos seus espectros de massa, para além de um padrão de fragmentação típico, uma diferença de 31 unidades entre o pico de massa correspondente ao ião molecular  $[M]^+$  e o pico de massa seguinte, devido à fragmentação de um grupo  $-OCH_3$  e apresentam ainda o característico pico de massa a  $m/z$  74, devido ao rearranjo de McLafferty:



Os espectros de massa dos alcanos foram os menos exigentes no que se refere à sua interpretação pois, na ausência de um grupo funcional, o padrão de fragmentação dum estrutura hidrocarbonatada é facilmente detectado quer pela própria morfologia, quer pela diferença entre os valores correspondentes aos fragmentos obtidos.

O modo de ionização utilizado para todos os compostos analisados por GC/MS foi a ionização electrónica, caracterizada por causar a ionização das moléculas da amostra através do impacto entre cada uma delas e um electrão bastante energético, havendo transferência da energia deste para aquela, resultando na saída de um electrão da molécula e formando-se deste modo o ião molecular. Este método tem a desvantagem de fragmentar excessivamente as moléculas de modo que o espectro de massa resultante pode conter apenas picos correspondentes a fragmentos iónicos, podendo acontecer que todos os iões moleculares se fragmentem antes de atingirem o detector. Infelizmente não foi possível, simultaneamente, efectuar este tipo de análise usando a ionização química, especialmente importante para a obtenção de bons espectros de massa para os compostos cujo ião molecular (ou a molécula protonada que é a espécie que na maioria das vezes é a obtida através do processo de ionização química) é de difícil reconhecimento.

Através da análise dos diferentes espectros de massa obtidos foram então confirmadas as identificações de todos os componentes referidos.

#### 3.1.2.4.2 Análise Densitométrica dos Extractos

Identificada a gama de constituintes alifáticos de cadeia longa, verificou-se que alguns deles se encontravam presentes apenas como componentes minoritários. É o caso dos aldeídos no extracto de Julho de 1995 e das duas classes de compostos não identificadas, cujo valor de  $R_f$  em TLC analítica é menor que o dos alcoóis no sistema eluente usado. O baixo teor de aldeídos não foi inclusivamente suficiente para detecção densitométrica, pelo que o seu valor, na tabela 3.3, é indicado em função do menor valor obtido para outras classes. Os ésteres, por outro lado, constituem a principal classe presente em mais de 50 %.

As referidas classes de componentes polares, com o valor de  $R_f$  menor que o da classe álcool, apesar de existentes em baixa quantidade foram detectadas densitometricamente uma vez que, caracterizando-se por um valor de  $R_f$  muito baixo, a sua migração na placa de TLC ocorre apenas numa distância de alguns milímetros pelo que se obtém, na detecção, manchas pouco difusas e nítidas. Os aldeídos por outro lado, para além de se encontrarem em menor quantidade, têm um valor de  $R_f$  maior pelo que têm uma maior distância a migrar o que, apesar das pistas definidas na placa, causa um alargamento e alguma difusão da mancha correspondente após detecção. Obteve-se assim uma mancha muito ténue e difusa que não foi a adequada para uma carbonização eficaz e, conseqüentemente, para o limite mínimo de sensibilidade da análise densitométrica efectuada.

A classe dos alcoóis, representando quase 30 % das ceras extraídas (em Janeiro de 1996), apresenta como componente dominante o tetracosanol que constitui quase 90 % da classe. De

acordo com Gülz e colaboradores (1993), esta proporção é contudo insuficiente para haver possibilidade de formação de cristalóides cerosos.

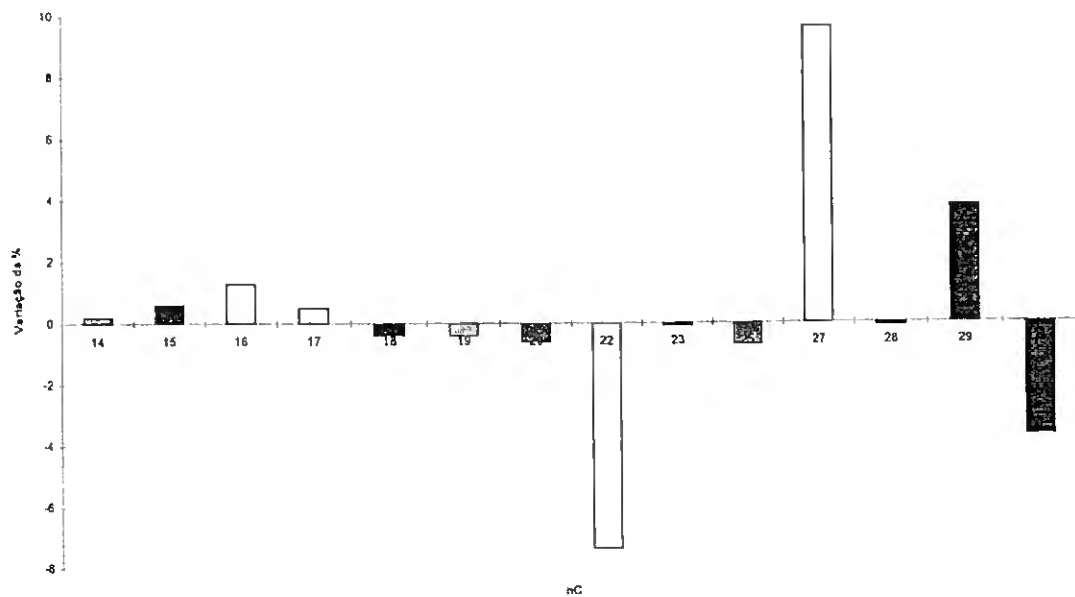
Comparando plantas expostas a diferentes condições de crescimento, Baker (in Cutler *et al*, 1982) observou que um aumento de 20 °C na temperatura resultava numa redução de 40 % nos produtos de elongação (nonacosano, nonacosanol, nonacosanona) nas folhas, enquanto que um aumento no fluxo da energia radiante ou uma diminuição da humidade estimulava a oxidação de hidrocarbonetos para cetonas. Por outro lado é conhecida a variação, sazonal e com o estágio de desenvolvimento foliar, da composição química das ceras das folhas de diversas espécies vegetais, em particular das fagáceas, pelo que não é de estranhar a variação observada relativamente às proporções relativas das classes constituintes das ceras da Azinheira entre Julho de 1995 e Janeiro de 1996.

### 3.1.2.5 Considerações Finais

A representação gráfica da evolução da percentagem de cada componente em cada classe, de Julho de 1995 para Janeiro de 1996, ilustrada na figura 3.22, sugere que não existe uma tendência definida para essa variação que, aparentemente, é aleatória e devida apenas a factores naturais.

As ceras cuticulares das folhas de *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp., de *Quercus robur* L e de *Castanea sativa* Miller apresentam séries homólogas semelhantes de alcanos, ésteres, aldeídos, alcoóis e ácidos gordos mas diferem na sua composição quantitativa. Todas estas séries homólogas lipídicas são sintetizadas pelas reacções redutivas ilustradas no esquema representado na figura 3.23.

Varição da % de Alcanos entre Julho '95 e Janeiro '96



Varição da % de Aldeídos entre Julho '95 e Janeiro '96

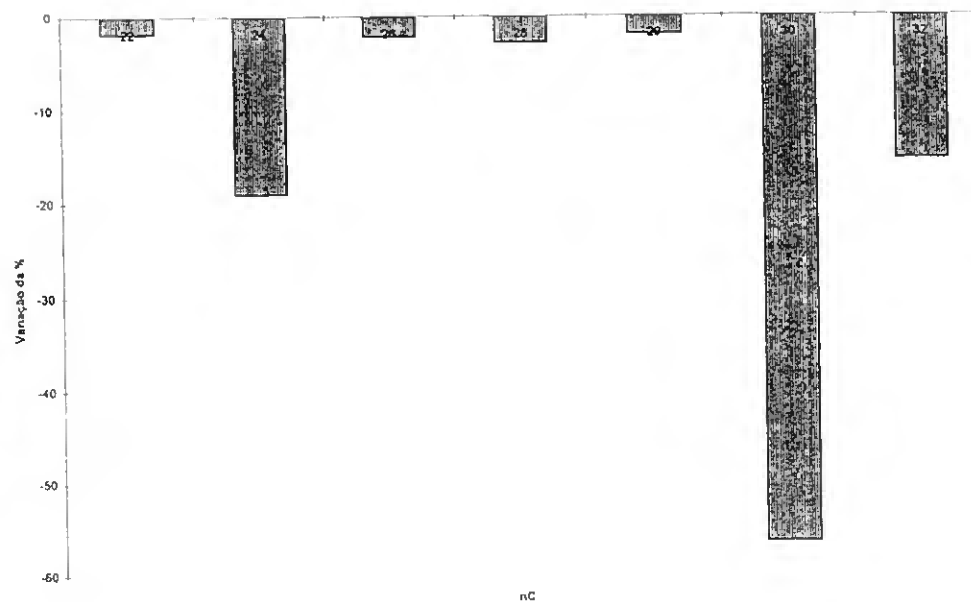
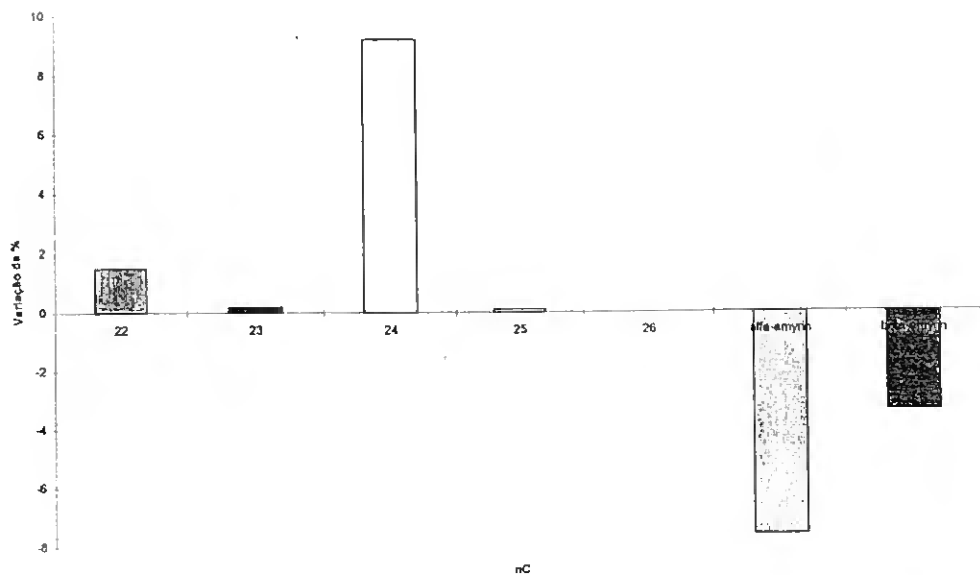


Figura 3.22 Representação gráfica da variação da percentagem relativa dos componentes das várias classes de compostos constituintes das ceras cuticulares das folhas de Azinheira, entre Julho de 1995 e Janeiro de 1996. (Continua)

(Continuação)

Varição da % de Ácidos Gordos entre Julho '95 e Janeiro '96



Varição da % de Alcoóis Primários e Triterpenóis entre Julho '95 e Janeiro '96

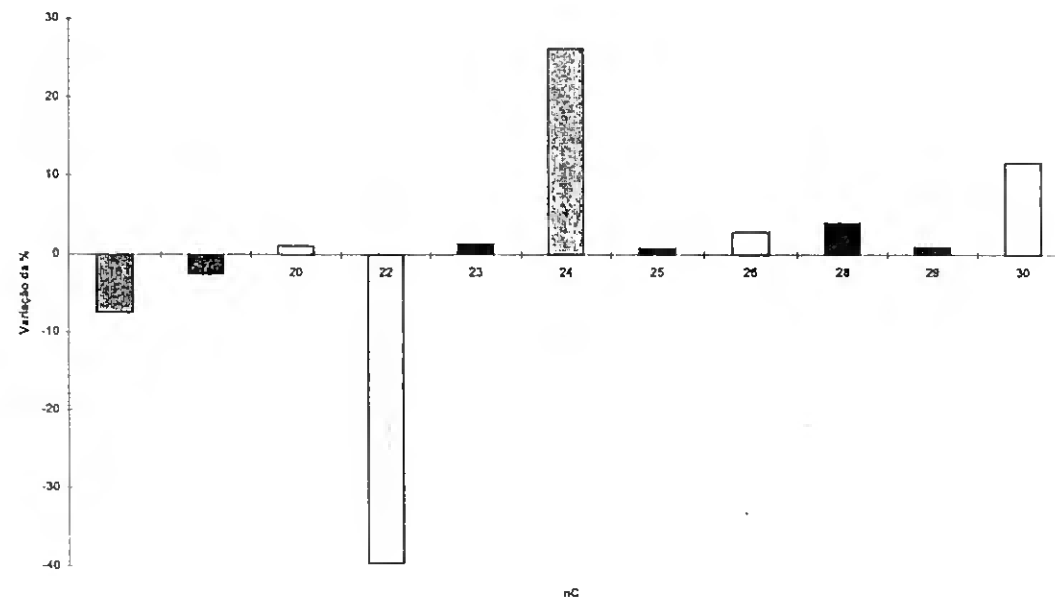
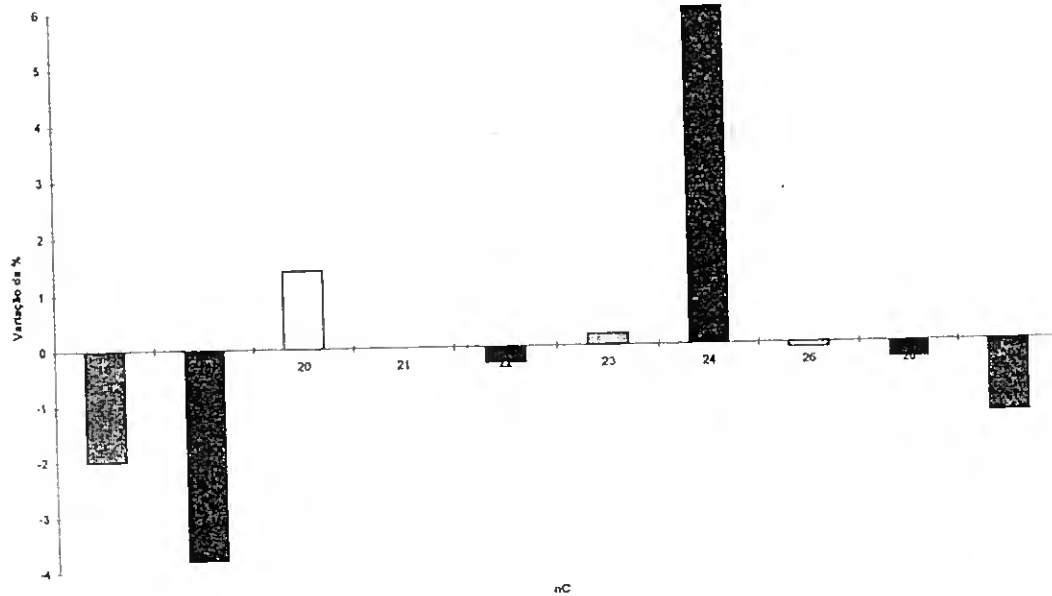


Figura 3.22 Representação gráfica da variação da percentagem relativa dos componentes das várias classes de compostos constituintes das ceras cuticulares das folhas de Azinheira, entre Julho de 1995 e Janeiro de 1996. (Continua)

(Continuação)

Variação da % de Ésteres (porção ácido) entre Julho '95 e Janeiro '96



Variação da % de Ésteres (porção álcool) entre Julho '95 e Janeiro '96

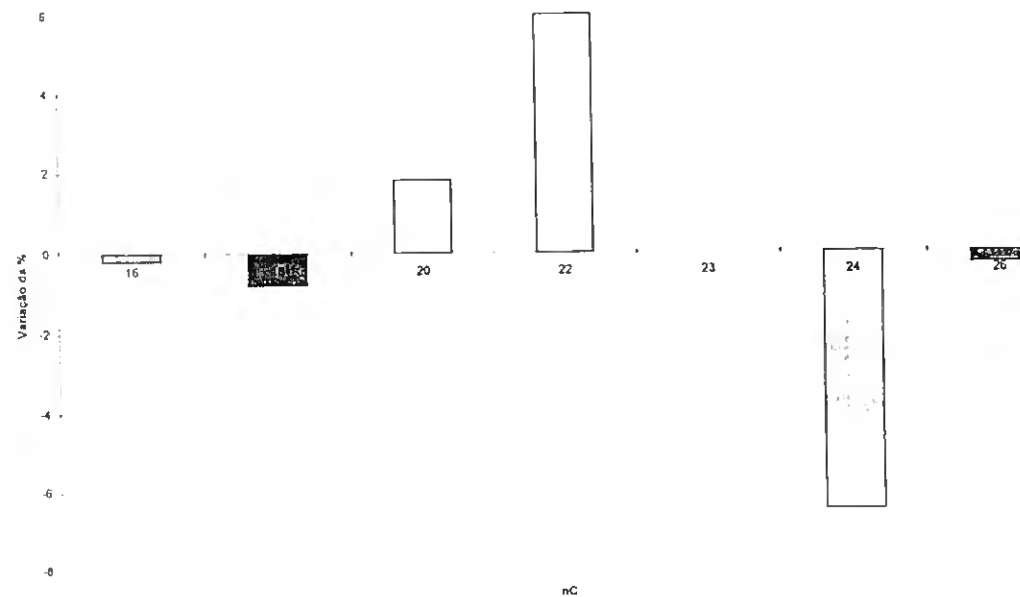


Figura 3.22 Representação gráfica da variação da percentagem relativa dos componentes das várias classes de compostos constituintes das ceras cuticulares das folhas de Azinheira, entre Julho de 1995 e Janeiro de 1996.

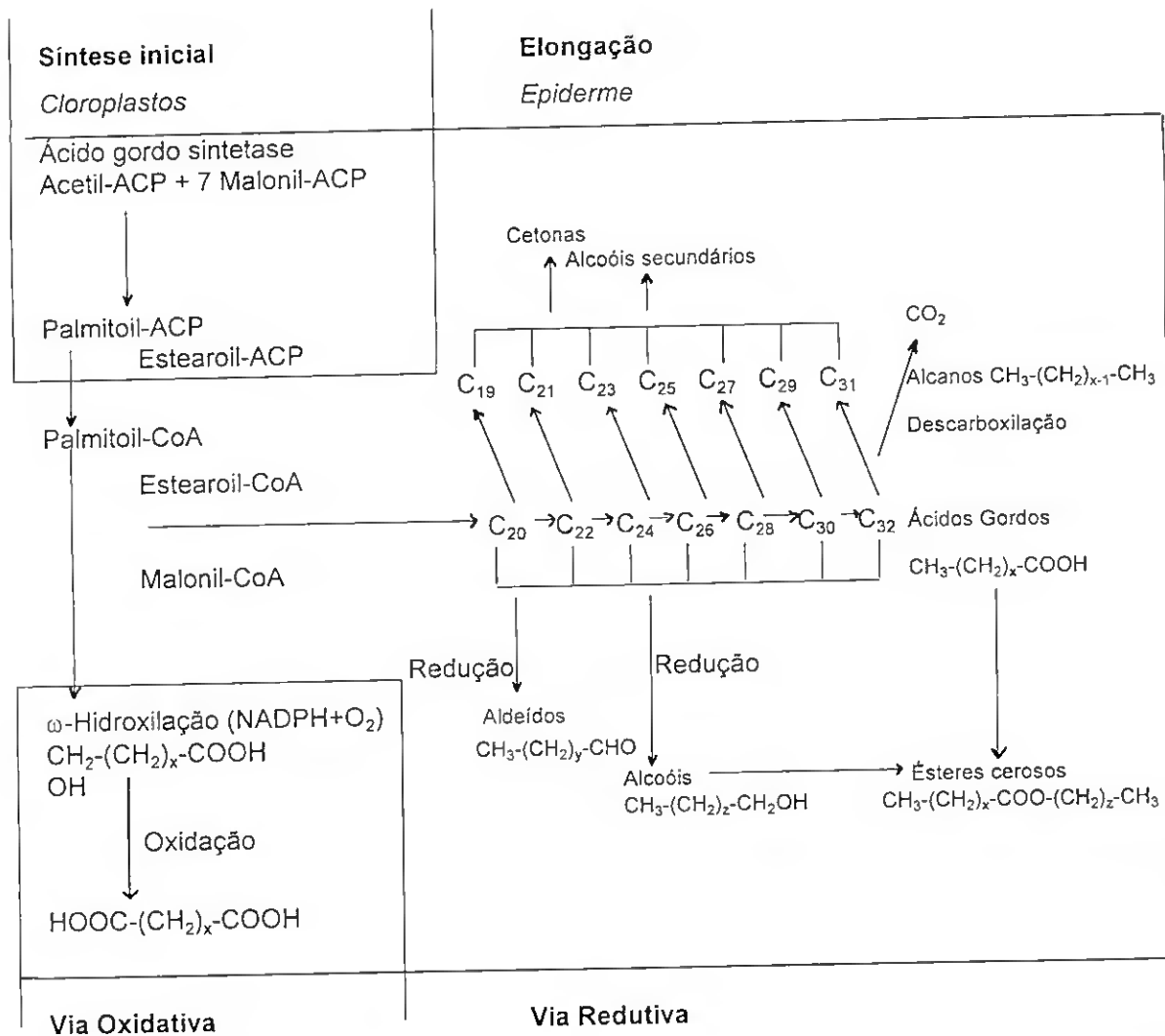


Figura 3.23 Representação esquemática da via metabólica dos lipídios constituintes das ceras: a) Reações de elongação de ácidos gordos, características das gimnospérmicas e das angiospérmicas. b) Predominância das reações de oxidação para a formação de lipídios cerosos bifuncionais, em gimnospérmicas. c) Reações de redução para a formação das séries homólogas dos lipídios cerosos, de cadeia muito longa, nas angiospérmicas (Gülz, 1994b).

Para a biossíntese dos lipídios cerosos, com base em ácidos gordos homólogos, predominam as vias redutivas. Estes ácidos gordos são sintetizados por reações de elongação (Kolattukudy, 1976) no retículo endoplasmático das células epidérmicas (Figura 3.23) e constituem os precursores para a síntese dos restantes lipídios constituintes das ceras. Além da biossíntese dos lipídios cerosos deve ter-se em consideração ainda o complexo metabolismo de terpenos para justificar os triterpenóis presentes nas ceras da Azinheira.

Sabe-se que em Angiospérmicas de níveis sistemáticos superiores as ceras cuticulares apresentam composições químicas bastante complexas e diferenciadas relativamente a árvores de folha caduca. Algumas das diferenças encontradas na composição química das ceras da árvore em estudo relativamente à árvore do mesmo género *Quercus robur* L. poderão ser explicadas pelo facto da primeira ser uma árvore de folha persistente o que não acontece com o *Quercus robur* L..

Ao contrário do que se verifica em *Quercus robur* L., em que os ésteres constituem a classe de compostos encontrada em menor quantidade, nas ceras da Azinheira eles constituem a classe maioritária logo seguida pelos alcoóis. Os alcoóis primários são a classe dominante nas ceras superficiais de *Quercus robur* L. onde, tal como se verifica em *Castanea sativa* Miller e também em *Quercus ilex* subsp. *ballota*, o componente maioritário é o C<sub>24</sub>. A presença dos triterpenóis  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina nas ceras das folhas do carvalho-comum e do castanheiro, estende-se também à Azinheira onde, como já foi referido, foram detectados juntamente com os alcoóis primários.

Os alcoóis primários e os ácidos gordos livres mais abundantes são os C<sub>22</sub> e C<sub>24</sub>. Não é pois de estranhar que, nos ésteres, estes sejam também os componentes mais abundantes uma vez que, na sua biossíntese, a enzima que vai buscar um álcool e um ácido para formar um éster, ligar-se-á mais facilmente e primeiro aqueles que são mais abundantes, considerando que o processo é, certamente, mediado por enzimas.

No extracto poderiam existir classes susceptíveis de sofrer oxidação atmosférica, particularmente aldeídos e, se bem que não tivessem sido detectadas, classes que contivessem componentes insaturados. Esta será possivelmente uma explicação para o não aparecimento de aldeídos no extracto de 1996, apesar de terem sido acautelados os procedimentos relativos à armazenagem bem isolada das amostras. Uma outra explicação tem a ver com a idade das folhas, uma vez que os aldeídos são uma classe de substâncias que, em *Quercus robur* L. pelo menos, só surgem 10 dias depois do desenrolamento foliar. As folhas do 2º extracto poderiam ser de tal modo jovens que a biossíntese dos aldeídos não tivesse ainda ocorrido, considerando que o processo é semelhante ao que acontece com o *Quercus robur* L.. De qualquer modo, a presença destes compostos em

Julho de 1995 indica que, ao longo do desenvolvimento foliar, há biossíntese de aldeídos. Por outro lado, a sua ausência em Janeiro de 1996 pode indicar que essa biossíntese ocorre em momentos diferentes das restantes classes de substâncias orgânicas constituintes das ceras. Esta observação poderá indicar um processo de activação individual para as enzimas biossintéticas dos aldeídos e sugere uma via diferente para os aldeídos relativamente aos alcoóis. Um estudo sobre a variação sazonal da composição química das ceras cuticulares das folhas de Azinheira torna-se pois indispensável à compreensão do processo.

Atendendo a que o extracto de 1995 continha aldeídos e a que, na composição das ceras superficiais de *Quercus robur* L., extraídas a partir de folhas maduras, se verifica também a presença dessa classe de substâncias (Prasad *et al*, 1990; Gülz, 1994b), apresenta-se de um modo comparativo, na tabela 3.4, a composição de cada classe de substâncias constituinte das referidas ceras nas duas árvores, extraídas, em ambos os casos, no mês de Julho. Apresenta-se também, para a Azinheira, os valores correspondentes ao extracto de Janeiro de 1996.

Relativamente à classe dos ésteres, os valores apresentados para a Azinheira referem-se aos produtos da sua metanólise, enquanto que os valores apresentados por Prasad e colaboradores (1990) referem-se às moléculas originais. Em ambos os casos a quantificação relativa em cada classe foi obtida a partir da percentagem das áreas dos picos cromatográficos. Em *Quercus ilex* subsp. *ballota* contudo, a análise que deu origem a esses picos só foi possível após a respectiva conversão desses compostos em derivados menores e mais voláteis, como foi referido, pelo que os valores apresentados na tabela 3.4 referem-se aos produtos da metanólise dos ésteres e não às moléculas inteiras.

Tabela 3.4 Comparação da composição de alcanos, aldeídos, alcoóis primários, ácidos gordos e ésteres cerosos em ceras superficiais de folhas de *Quercus robur* L. (adaptado de Prasad *et al*, 1990 e de Gülz, 1994b) e de *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp..

| nC | Alcanos (%)                             |               |                    | Aldeídos (%)                            |                |                    | Alcoóis Primários (%)                   |                                    |                    | Ácidos Gordos (%)                       |                |  | Ésteres (%)      |                   |                  |                   | <i>Quercus robur</i> L.<br>07/89<br>(2%) |
|----|---|---------------|--------------------|---|----------------|--------------------|---|------------------------------------|--------------------|---|----------------|--|------------------|-------------------|------------------|-------------------|--|
|    | Q. <i>ilex</i> subsp.<br><i>ballota</i> |               | Q.<br><i>robur</i> | Q. <i>ilex</i> subsp.<br><i>ballota</i> |                | Q.<br><i>robur</i> | Q. <i>ilex</i> subsp.<br><i>ballota</i> |                                    | Q.<br><i>robur</i> | Q. <i>ilex</i> subsp.<br><i>ballota</i> |                | Ésteres Metanolizados<br><i>Quercus ilex</i> subsp. <i>ballota</i> |                  |                   |                  |                   |  |
|    | 01/96<br>(9%)                           | 07/95<br>(9%) | 07/89<br>(5%)      | 01/96<br>(0%)                           | 07/95<br>(<3%) | 07/89<br>(26%)     | 01/96<br>(27%)                          | 07/95<br>(20%)                     | 07/89<br>(49%)     | 01/96<br>(11%)                          | 07/95<br>(12%) | 07/89<br>(17%)   | 01/96 (50%)      |                   | 07/95 (56%)      |                   |  |
|    |   |               |                    |   |                |                    |   |                                    |                    |   |                |  | Fracção<br>Ácido | Fracção<br>Alcool | Fracção<br>Ácido | Fracção<br>Alcool |  |
| 14 | < 5                                     | < 5           | -                  | -                                       | -              | -                  | -                                       | -                                  | -                  | -                                       | -              | -  | -                | -                 | -                | -                 | -  |
| 15 | < 5                                     | < 5           | -                  | -                                       | -              | -                  | -                                       | -                                  | -                  | -                                       | -              | -  | -                | -                 | -                | -                 | -  |
| 16 | < 5                                     | < 5           | -                  | -                                       | -              | -                  | -                                       | < 0,1                              | < 5                | 9                                       | 8,6            | < 5  | < 5              | < 5               | < 5              | -                 | -  |
| 17 | < 5                                     | < 5           | -                  | -                                       | -              | -                  | -                                       | -                                  | -                  | -                                       | -              | -  | -                | -                 | -                | -                 | -  |
| 18 | < 5                                     | < 5           | -                  | -                                       | -              | -                  | -                                       | 0,8                                | < 5                | < 5                                     | 2,3            | < 5  | < 5              | < 5               | < 5              | -                 | -  |
| 19 | < 5                                     | < 5           | -                  | -                                       | -              | -                  | -                                       | -                                  | -                  | -                                       | -              | -  | -                | -                 | -                | -                 | -  |
| 20 | < 5                                     | < 5           | < 0,1              | -                                       | -              | -                  | -                                       | 0,7                                | < 5                | < 5                                     | 2,3            | 21   | < 5              | 20                | < 5              | -                 | -  |
| 21 | < 5                                     | < 5           | 0,4                | -                                       | -              | -                  | -                                       | -                                  | < 5                | -                                       | -              | < 5  | -                | < 5               | -                | -                 | -  |
| 22 | < 5                                     | 12            | 0,6                | -                                       | < 5            | < 0,1              | 7                                       | 6                                  | 5,0                | 22                                      | 62             | 3,5  | 37               | 47                | 38               | 43                | -  |
| 23 | < 5                                     | < 5           | 5,6                | -                                       | -              | 0,7                | < 5                                     | < 5                                | -                  | < 5                                     | -              | -  | < 5              | < 5               | < 5              | < 5               | -  |
| 24 | < 5                                     | < 5           | 3,8                | -                                       | 19             | 1,9                | 87                                      | 78                                 | 87,8               | 39                                      | 13             | 5,2  | 37               | 47                | 31               | 54                | -  |
| 25 | < 5                                     | < 5           | 19,2               | -                                       | -              | 2,7                | < 5                                     | < 5                                | -                  | < 5                                     | -              | -  | -                | -                 | -                | -                 | -  |
| 26 | < 5                                     | < 5           | 5,7                | -                                       | < 5            | 25,3               | < 5                                     | < 5                                | 3,8                | 6                                       | < 5            | 28,8   | < 5              | -                 | < 5              | < 5               | -  |
| 27 | 21                                      | 11            | 34,4               | -                                       | -              | 2,9                | -                                       | -                                  | -                  | -                                       | -              | -  | -                | -                 | -                | -                 | -  |
| 28 | < 5                                     | < 5           | 3,8                | -                                       | < 5            | 44,2               | -                                       | -                                  | 1,3                | 7                                       | < 5            | 36,7   | < 5              | -                 | < 5              | -                 | -  |
| 29 | 58                                      | 54            | 20,1               | -                                       | < 5            | 1,5                | -                                       | -                                  | -                  | < 5                                     | -              | -  | -                | -                 | -                | -                 | -  |
| 30 | -                                       | -             | 2,0                | -                                       | 57             | 16,6               | < 5 <sup>1</sup><br>< 5 <sup>2</sup>    | 9 <sup>1</sup><br>< 5 <sup>2</sup> | 0,4                | 17                                      | 6              | 11,9   | < 5              | -                 | < 5              | -                 | -  |
| 31 | 8                                       | 12            | 4,4                | -                                       | -              | 0,5                | -                                       | -                                  | -                  | -                                       | -              | -  | -                | -                 | -                | -                 | -  |
| 32 | -                                       | -             | < 0,1              | -                                       | 15             | 3,7                | -                                       | -                                  | 0,2                | -                                       | -              | 0,7  | -                | -                 | -                | -                 | -  |
| 33 | -                                       | -             | < 0,1              | -                                       | -              | < 0,1              | -                                       | -                                  | -                  | -                                       | -              | -  | -                | -                 | -                | -                 | -  |
| 34 | -                                       | -             | -                  | -                                       | -              | < 0,1              | -                                       | -                                  | -                  | -                                       | -              | -  | -                | -                 | -                | -                 | -  |
| 36 | -                                       | -             | -                  | -                                       | -              | -                  | -                                       | -                                  | -                  | -                                       | -              | -  | -                | -                 | -                | -                 | -  |
| 38 | -                                       | -             | -                  | -                                       | -              | -                  | -                                       | -                                  | -                  | -                                       | -              | -  | -                | -                 | -                | -                 | < 0,1                                    |
| 40 | -                                       | -             | -                  | -                                       | -              | -                  | -                                       | -                                  | -                  | -                                       | -              | -  | -                | -                 | -                | -                 | 3,4                                      |
| 42 | -                                       | -             | -                  | -                                       | -              | -                  | -                                       | -                                  | -                  | -                                       | -              | -  | -                | -                 | -                | -                 | 4,8                                      |
| 44 | -                                       | -             | -                  | -                                       | -              | -                  | -                                       | -                                  | -                  | -                                       | -              | -  | -                | -                 | -                | -                 | 27,1                                     |
| 46 | -                                       | -             | -                  | -                                       | -              | -                  | -                                       | -                                  | -                  | -                                       | -              | -  | -                | -                 | -                | -                 | 40,0                                     |
| 48 | -                                       | -             | -                  | -                                       | -              | -                  | -                                       | -                                  | -                  | -                                       | -              | -  | -                | -                 | -                | -                 | 21,2                                     |
| 50 | -                                       | -             | -                  | -                                       | -              | -                  | -                                       | -                                  | -                  | -                                       | -              | -  | -                | -                 | -                | -                 | 3,5                                      |
| 52 | -                                       | -             | -                  | -                                       | -              | -                  | -                                       | -                                  | -                  | -                                       | -              | -  | -                | -                 | -                | -                 | < 0,1                                    |

<sup>1,2</sup> - Triterpenóis  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina, respectivamente; Prasad e colaboradores (1990) e Gülz (1994b) também referem a presença de triterpenóis em *Q. robur* L., identificados como uma mistura de taraxerol e  $\beta$ -amirina com  $\alpha$ -amirina e lupeol, livres (6%) e esterificados (1%). Nenhum destes pares triterpenóicos foi separado por GC, pelo que não foram quantificados individualmente.

A quantidade de ácidos gordos é certamente uma função do grau de biossíntese dos vários compostos, pois sendo os precursores biossintéticos dos restantes lípidos, eles encontram-se em baixa quantidade durante esse período. Observações efectuadas por Prasad e colaboradores (1990) em *Fagus sylvatica* L., indicam que após a desactivação das enzimas usadas para a biossíntese dos hidrocarbonetos, dos ésteres cerosos, dos aldeídos e dos alcoóis ocorre um aumento significativo no teor de ácidos gordos.

Como se referiu, a análise por GC/MS detectou, na classe dos alcoóis, a presença dos triterpenóis,  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina, cuja variação da respectiva percentagem nos dois extractos, também se apresenta na tabela 3.2. Poder-se-à especular que estes triterpenóis fazem parte da fisiologia da planta, havendo inclusivamente alguns indícios da sua presença no interior da madeira de *Quercus ilex* L. (Ribo & Raventos, 1972), ou ainda que funcionam como plastificantes da cutícula conferindo-lhe maior ou menor plasticidade. Devido a estes plastificantes, a camada cerosa a uma dada temperatura, pode encontrar-se no estado sólido e no estado líquido, sendo essa característica que permite, por exemplo, que as folhas se possam dobrar, sem partir as camadas cerosas protectoras.

Considerando que a Azinheira estudada está adaptada à secura, a composição química das suas ceras cuticulares deverá ter como consequência uma estrutura física tal que impeça, reguladamente, a perda de água, tornando-a mais adaptada ao clima. Citando Moreira (1980), "a contribuição da cutícula para a resistência à passagem de água parece estar mais relacionada com a sua composição do que com a sua espessura".

Baker (in Cutler *et al*, 1982) indica a formação de plaquetas cerosas quando a cera é constituída principalmente por alcoóis e a formação de túbulos quando é formada por  $\beta$ -dicetonas e apresenta como evidência o resultado do estudo da variação das ceras foliares em *Eucalyptus* spp.. Por outro lado, refere também que, apesar dos aldeídos raramente ocorrerem como constituintes cerosos maioritários, a sua presença em misturas de ceras superficiais está relacionada com a produção de

estruturas em forma de varetas. Sabe-se ainda que o aparecimento de longas varetas enroladas (existentes por exemplo na espécie *Musa paradisiaca* L.) deve-se à presença de ceras ricas em ésteres de cadeia longa ( $C_{48}$ - $C_{52}$ ). O efeito das classes de constituintes minoritárias na estrutura física das camadas cerosas, é ainda pouco conhecido.

A partir destes dados poder-se-ia especular que, se ocorrerem fenómenos de cristalização nas ceras estudadas, eles poderiam ter como consequência o aparecimento de estruturas em forma de varetas enroladas e plaquetas, considerando as quantidades relativas de ésteres e de alcoóis que as constituem.

Por outro lado, nem sempre a predominante presença de uma classe de compostos parece determinar o tipo de estrutura física, pois em folhas de algumas espécies vegetais, em que o revestimento de ceras é bastante reduzido, mesmo evidenciando um teor de alcoóis considerado suficiente, observam-se apenas ceras amorfas. Este fenómeno ocorre essencialmente em folhas imaturas de *Vitis vinifera*, *Beta vulgaris* e *Trifolium repens* (Baker in Cutler *et al*, 1982).

---

## Capítulo 4

---

### 4.1 Conclusão

Em relação aos métodos seguidos na separação das diferentes classes de compostos considera-se mais adequado, o utilizado na separação dos constituintes do extracto de Janeiro de 1996 em que foi efectuada uma primeira separação entre classes de componentes polares e apolares o que facilitou as separações subsequentes uma vez que fragmentou o extracto inicial em misturas menos complexas.

Relativamente às derivatizações químicas levadas a cabo, como forma de tornar algumas classes de compostos mais adequadas ao tipo de análise de que iriam ser alvo, refere-se que o processo de acetilação seguido para a derivatização da classe álcool, apesar de ter resultado

satisfatoriamente, não permitiu a observação do pico de massa correspondente ao ião molecular pelo que, neste aspecto, os derivados trimetilsilílicos da classe em causa, por exemplo, teriam sido mais adequados para o efeito.

Após a metanólise da classe dos ésteres, os seus produtos da reacção, ésteres metílicos e alcoóis, não foram separados. Apesar deste facto não ter constituído um obstáculo à análise e identificação dos respectivos componentes atendendo a que os cromatogramas obtidos nestas classes apresentaram picos relativamente bem separados e resolvidos originando espectros de massa satisfatórios, considera-se que a separação entre as classes resultantes da metanólise teria permitido a obtenção de cromatogramas menos complexos e mais rapidamente analisáveis em espectrometria de massas.

Em relação ao objectivo principal do trabalho, foi obtida a composição química das ceras cuticulares das folhas de *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp. que é dominada pela presença de séries homólogas de compostos alifáticos de cadeia longa (tabela 4.1). Os constituintes identificados são alcanos de cadeia simples (9 % em 07/1995 e 9 % em 01/1996), ésteres (56 % em 07/1995 e 50 % em 01/1996), aldeídos (menos que 3 % em 07/1995 e 0 % em 01/1996), alcoóis primários (20 % em 07/1995 e 27 % em 01/1996) e ácidos gordos (12 % em 07/1995 e 11 % em 01/1996).

**Tabela 4.1** Composição relativa da cera cuticular de folhas jovens de *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp.

| Composto  | Extracto de 07/1995 | Extracto de 01/1996 |
|---|---------------------|---------------------|
| <b>Alcanos</b>  |                     |                     |
| C <sub>22</sub>   | 1                   | <0,5                |
| C <sub>27</sub>   | 1                   | 2                   |
| C <sub>29</sub>   | 5                   | 5                   |
| C <sub>31</sub>   | 1                   | 1                   |
| Componentes minoritários                                | 1                   | 1                   |
| <b>Total de Alcanos</b>                                 | <b>9</b>            | <b>9</b>            |
| <b>Ésteres:</b>   |                     |                     |
| <b>Ácidos esterificados</b>                             |                     |                     |
| C <sub>20</sub>   | 11                  | 11                  |
| C <sub>22</sub>   | 21                  | 19                  |
| C <sub>24</sub>   | 17                  | 18                  |
| Componentes minoritários                                | 7                   | 2                   |
| <b>Alcoóis esterificados</b>                            |                     |                     |
| C <sub>22</sub>   | 24                  | 24                  |
| C <sub>24</sub>   | 30                  | 24                  |
| Componentes minoritários                                | 2                   | 3                   |
| <b>Total de Ésteres</b>                                 | <b>56</b>           | <b>50</b>           |
| <b>Aldeídos</b>   |                     |                     |
| C <sub>24</sub>   | <1                  | -                   |
| C <sub>30</sub>   | <2                  | -                   |
| C <sub>32</sub>   | <0,5                | -                   |
| Componentes minoritários                                | vs                  | -                   |
| <b>Total de Aldeídos</b>                                | <b>&lt;3</b>        | <b>0</b>            |
| <b>Alcoóis Primários Livres e Triterpenóis</b>          |                     |                     |
| C <sub>22</sub>   | 1                   | 2                   |
| C <sub>24</sub>   | 16                  | 24                  |
| α-amirina   | 2                   | <1                  |
| Componentes minoritários                                | 1                   | 1                   |
| <b>Total de Alcoóis primários Livres e Triterpenóis</b> | <b>20</b>           | <b>27</b>           |
| <b>Ácidos Gordos Livres</b>                             |                     |                     |
| C <sub>16</sub>   | 1                   | <1                  |
| C <sub>22</sub>   | 7                   | 2                   |
| C <sub>24</sub>   | 2                   | 4                   |
| C <sub>26</sub>   | <1                  | 1                   |
| C <sub>28</sub>   | <1                  | 1                   |
| C <sub>30</sub>   | 1                   | 2                   |
| Componentes minoritários                                | 1                   | 1                   |
| <b>Total de Ácidos Gordos Livres</b>                    | <b>12</b>           | <b>11</b>           |

vs- vestígios.

Perspectivando trabalho subsequente, seria importante conhecer a variação da composição química das ceras cuticulares das folhas de Azinheira em função da idade da folha e em função das características sazonais.

---

## Anexo 1

---

Listagem dos picos de massa correspondentes ao espectro do C<sub>30</sub> aldeído

| Pk# | Mass | Abs Int | Rel Int | Pk# | Mass | Abs Int | Rel Int |
|-----|------|---------|---------|-----|------|---------|---------|
| 1   | 14   | 1520    | 0.22    | 55  | 77   | 4352    | 0.64    |
| 2   | 15   | 1728    | 0.25    | 56  | 78   | 2384    | 0.35    |
| 3   | 16   | 1440    | 0.21    | 57  | 79   | 25600   | 3.74    |
| 4   | 17   | 6464    | 0.94    | 58  | 80   | 31744   | 4.64    |
| 5   | 18   | 23808   | 3.48    | 59  | 81   | 238592  | 34.88   |
| 6   | 25   | 348     | 0.05    | 60  | 82   | 557056  | 81.44   |
| 7   | 26   | 2144    | 0.31    | 61  | 83   | 397312  | 58.08   |
| 8   | 27   | 22784   | 3.33    | 62  | 84   | 74752   | 10.93   |
| 9   | 28   | 26624   | 3.89    | 63  | 85   | 189440  | 27.69   |
| 10  | 29   | 80896   | 11.83   | 64  | 86   | 21760   | 3.18    |
| 11  | 30   | 2256    | 0.33    | 65  | 87   | 3536    | 0.52    |
| 12  | 31   | 2096    | 0.31    | 66  | 88   | 876     | 0.13    |
| 13  | 32   | 5696    | 0.83    | 67  | 89   | 1840    | 0.27    |
| 14  | 35   | 524     | 0.08    | 68  | 90   | 344     | 0.05    |
| 15  | 36   | 1872    | 0.27    | 69  | 91   | 4672    | 0.68    |
| 16  | 37   | 700     | 0.10    | 70  | 92   | 1328    | 0.19    |
| 17  | 38   | 1616    | 0.24    | 71  | 93   | 13120   | 1.92    |
| 18  | 39   | 22528   | 3.29    | 72  | 94   | 25088   | 3.67    |
| 19  | 40   | 6976    | 1.02    | 73  | 95   | 246784  | 36.08   |
| 20  | 41   | 238592  | 34.88   | 74  | 96   | 397312  | 58.08   |
| 21  | 42   | 65024   | 9.51    | 75  | 97   | 323584  | 47.31   |
| 22  | 43   | 544768  | 79.64   | 76  | 98   | 49664   | 7.26    |
| 23  | 44   | 144384  | 21.11   | 77  | 99   | 39168   | 5.73    |
| 24  | 45   | 35840   | 5.24    | 78  | 100  | 7040    | 1.03    |
| 25  | 46   | 1536    | 0.22    | 79  | 101  | 1248    | 0.18    |
| 26  | 47   | 516     | 0.08    | 80  | 102  | 688     | 0.10    |
| 27  | 49   | 256     | 0.04    | 81  | 103  | 2416    | 0.35    |
| 28  | 50   | 916     | 0.13    | 82  | 104  | 1280    | 0.19    |
| 29  | 51   | 1712    | 0.25    | 83  | 105  | 2240    | 0.33    |
| 30  | 52   | 1248    | 0.18    | 84  | 106  | 860     | 0.13    |
| 31  | 53   | 16064   | 2.35    | 85  | 107  | 5760    | 0.84    |
| 32  | 54   | 58624   | 8.57    | 86  | 108  | 11200   | 1.64    |
| 33  | 55   | 417792  | 61.08   | 87  | 109  | 128000  | 18.71   |
| 34  | 56   | 155648  | 22.75   | 88  | 110  | 111616  | 16.32   |
| 35  | 57   | 684032  | 100.00  | 89  | 111  | 112640  | 16.47   |
| 36  | 58   | 40448   | 5.91    | 90  | 112  | 21760   | 3.18    |
| 37  | 59   | 5888    | 0.86    | 91  | 113  | 14848   | 2.17    |
| 38  | 60   | 592     | 0.09    | 92  | 114  | 3872    | 0.57    |
| 39  | 61   | 1232    | 0.18    | 93  | 115  | 3632    | 0.53    |
| 40  | 62   | 432     | 0.06    | 94  | 116  | 1216    | 0.18    |
| 41  | 63   | 616     | 0.09    | 95  | 117  | 3488    | 0.51    |
| 42  | 64   | 260     | 0.04    | 96  | 118  | 784     | 0.11    |
| 43  | 65   | 4800    | 0.70    | 97  | 119  | 3040    | 0.44    |
| 44  | 66   | 55808   | 8.16    | 98  | 120  | 916     | 0.13    |
| 45  | 67   | 207872  | 30.39   | 99  | 121  | 6464    | 0.94    |
| 46  | 68   | 254976  | 37.28   | 100 | 122  | 12352   | 1.81    |
| 47  | 69   | 327680  | 47.90   | 101 | 123  | 73728   | 10.78   |
| 48  | 70   | 125952  | 18.41   | 102 | 124  | 66560   | 9.73    |
| 49  | 71   | 319488  | 46.71   | 103 | 125  | 38400   | 5.61    |
| 50  | 72   | 39168   | 5.73    | 104 | 126  | 10368   | 1.52    |
| 51  | 73   | 12416   | 1.82    | 105 | 127  | 8576    | 1.25    |
| 52  | 74   | 1632    | 0.24    | 106 | 128  | 2624    | 0.38    |
| 53  | 75   | 1792    | 0.26    | 107 | 129  | 1040    | 0.15    |
| 54  | 76   | 580     | 0.08    | 108 | 130  | 400     | 0.06    |

| Pk# | Mass | Abs Int | Rel Int | Pk#  | Mass | Abs Int | Rel Int |
|-----|------|---------|---------|------|------|---------|---------|
| 109 | 131  | 888     | 0.13    | 1163 | 191  | 7680    | 1.12    |
| 110 | 132  | 760     | 0.11    | 1164 | 192  | 2080    | 0.30    |
| 111 | 133  | 7168    | 1.05    | 1165 | 193  | 6720    | 0.98    |
| 112 | 134  | 1408    | 0.21    | 1166 | 194  | 9152    | 1.34    |
| 113 | 135  | 5568    | 0.81    | 1167 | 195  | 2976    | 0.44    |
| 114 | 136  | 8384    | 1.23    | 1168 | 196  | 2000    | 0.29    |
| 115 | 137  | 47104   | 6.89    | 1169 | 197  | 1424    | 0.21    |
| 116 | 138  | 45824   | 6.70    | 1170 | 198  | 648     | 0.09    |
| 117 | 139  | 15424   | 2.25    | 1171 | 199  | 344     | 0.05    |
| 118 | 140  | 6656    | 0.97    | 1172 | 201  | 226     | 0.03    |
| 119 | 141  | 5120    | 0.75    | 1173 | 202  | 280     | 0.04    |
| 120 | 142  | 1680    | 0.25    | 1174 | 203  | 796     | 0.12    |
| 121 | 143  | 768     | 0.11    | 1175 | 205  | 424     | 0.06    |
| 122 | 144  | 260     | 0.04    | 1176 | 207  | 69632   | 10.18   |
| 123 | 145  | 628     | 0.09    | 1177 | 208  | 22272   | 3.26    |
| 124 | 146  | 300     | 0.04    | 1178 | 209  | 10496   | 1.53    |
| 125 | 147  | 3296    | 0.48    | 1179 | 210  | 2560    | 0.37    |
| 126 | 148  | 848     | 0.12    | 1180 | 211  | 1632    | 0.24    |
| 127 | 149  | 2560    | 0.37    | 1181 | 212  | 628     | 0.09    |
| 128 | 150  | 1760    | 0.26    | 1182 | 213  | 352     | 0.05    |
| 129 | 151  | 14336   | 2.10    | 1183 | 215  | 268     | 0.04    |
| 130 | 152  | 20480   | 2.99    | 1184 | 217  | 228     | 0.03    |
| 131 | 153  | 7616    | 1.11    | 1185 | 218  | 308     | 0.05    |
| 132 | 154  | 4800    | 0.70    | 1186 | 219  | 420     | 0.06    |
| 133 | 155  | 3392    | 0.50    | 1187 | 220  | 500     | 0.07    |
| 134 | 156  | 1040    | 0.15    | 1188 | 221  | 3184    | 0.47    |
| 135 | 157  | 280     | 0.04    | 1189 | 222  | 8576    | 1.25    |
| 136 | 159  | 284     | 0.04    | 1190 | 223  | 2288    | 0.33    |
| 137 | 161  | 1016    | 0.15    | 1191 | 224  | 1376    | 0.20    |
| 138 | 162  | 272     | 0.04    | 1192 | 225  | 1072    | 0.16    |
| 139 | 163  | 2240    | 0.33    | 1193 | 226  | 484     | 0.07    |
| 140 | 164  | 968     | 0.14    | 1194 | 227  | 280     | 0.04    |
| 141 | 165  | 7744    | 1.13    | 1195 | 233  | 228     | 0.03    |
| 142 | 166  | 11712   | 1.71    | 1196 | 234  | 456     | 0.07    |
| 143 | 167  | 4288    | 0.63    | 1197 | 235  | 2848    | 0.42    |
| 144 | 168  | 3184    | 0.47    | 1198 | 236  | 8448    | 1.24    |
| 145 | 169  | 2256    | 0.33    | 1199 | 237  | 2096    | 0.31    |
| 146 | 170  | 876     | 0.13    | 1200 | 238  | 1120    | 0.16    |
| 147 | 171  | 364     | 0.05    | 1201 | 239  | 928     | 0.14    |
| 148 | 173  | 304     | 0.04    | 1202 | 240  | 412     | 0.06    |
| 149 | 175  | 540     | 0.08    | 1203 | 241  | 208     | 0.03    |
| 150 | 176  | 776     | 0.11    | 1204 | 247  | 239     | 0.03    |
| 151 | 177  | 3296    | 0.48    | 1205 | 248  | 428     | 0.06    |
| 152 | 178  | 1104    | 0.16    | 1206 | 249  | 3296    | 0.48    |
| 153 | 179  | 4928    | 0.72    | 1207 | 250  | 7936    | 1.16    |
| 154 | 180  | 8768    | 1.28    | 1208 | 251  | 2512    | 0.37    |
| 155 | 181  | 3328    | 0.49    | 1209 | 252  | 1056    | 0.15    |
| 156 | 182  | 2496    | 0.36    | 1210 | 253  | 908     | 0.13    |
| 157 | 183  | 1824    | 0.27    | 1211 | 261  | 260     | 0.04    |
| 158 | 184  | 720     | 0.11    | 1212 | 262  | 528     | 0.08    |
| 159 | 185  | 420     | 0.06    | 1213 | 263  | 2416    | 0.35    |
| 160 | 187  | 300     | 0.04    | 1214 | 264  | 6912    | 1.01    |
| 161 | 189  | 1000    | 0.15    | 1215 | 265  | 2896    | 0.42    |
| 162 | 190  | 472     | 0.07    | 1216 | 266  | 996     | 0.15    |

| Pk# | Mass | Abs Int | Rel Int | IPk# | Mass | Abs Int | Rel Int |
|-----|------|---------|---------|------|------|---------|---------|
| 217 | 267  | 1792    | 0.26    | 1258 | 341  | 788     | 0.12    |
| 218 | 268  | 504     | 0.07    | 1259 | 342  | 332     | 0.05    |
| 219 | 269  | 360     | 0.05    | 1260 | 343  | 218     | 0.03    |
| 220 | 276  | 344     | 0.05    | 1261 | 347  | 1504    | 0.22    |
| 221 | 277  | 2192    | 0.32    | 1262 | 348  | 4224    | 0.62    |
| 222 | 278  | 6528    | 0.95    | 1263 | 349  | 1344    | 0.20    |
| 223 | 279  | 1568    | 0.23    | 1264 | 350  | 1040    | 0.15    |
| 224 | 280  | 748     | 0.11    | 1265 | 351  | 636     | 0.09    |
| 225 | 281  | 9600    | 1.40    | 1266 | 355  | 856     | 0.13    |
| 226 | 282  | 2912    | 0.43    | 1267 | 356  | 412     | 0.06    |
| 227 | 283  | 1856    | 0.27    | 1268 | 357  | 255     | 0.04    |
| 228 | 284  | 504     | 0.07    | 1269 | 361  | 2560    | 0.37    |
| 229 | 285  | 288     | 0.04    | 1270 | 362  | 6528    | 0.95    |
| 230 | 290  | 276     | 0.04    | 1271 | 363  | 1712    | 0.25    |
| 231 | 291  | 2112    | 0.31    | 1272 | 364  | 572     | 0.08    |
| 232 | 292  | 6016    | 0.88    | 1273 | 365  | 404     | 0.06    |
| 233 | 293  | 1536    | 0.22    | 1274 | 375  | 1936    | 0.28    |
| 234 | 294  | 544     | 0.08    | 1275 | 376  | 3792    | 0.55    |
| 235 | 295  | 648     | 0.09    | 1276 | 377  | 1200    | 0.18    |
| 236 | 296  | 284     | 0.04    | 1277 | 378  | 276     | 0.04    |
| 237 | 297  | 210     | 0.03    | 1278 | 379  | 207     | 0.03    |
| 238 | 304  | 252     | 0.04    | 1279 | 389  | 1792    | 0.26    |
| 239 | 305  | 1984    | 0.29    | 1280 | 390  | 8640    | 1.26    |
| 240 | 306  | 5056    | 0.74    | 1281 | 391  | 2864    | 0.42    |
| 241 | 307  | 1456    | 0.21    | 1282 | 392  | 1616    | 0.24    |
| 242 | 308  | 652     | 0.10    | 1283 | 393  | 696     | 0.10    |
| 243 | 309  | 528     | 0.08    | 1284 | 403  | 532     | 0.08    |
| 244 | 310  | 228     | 0.03    | 1285 | 405  | 264     | 0.04    |
| 245 | 319  | 1584    | 0.23    | 1286 | 407  | 260     | 0.04    |
| 246 | 320  | 4480    | 0.65    | 1287 | 408  | 316     | 0.05    |
| 247 | 321  | 1184    | 0.17    | 1288 | 417  | 251     | 0.04    |
| 248 | 322  | 540     | 0.08    | 1289 | 418  | 32768   | 4.79    |
| 249 | 323  | 316     | 0.05    | 1290 | 419  | 10816   | 1.58    |
| 250 | 325  | 468     | 0.07    | 1291 | 420  | 1744    | 0.25    |
| 251 | 327  | 468     | 0.07    | 1292 | 421  | 340     | 0.05    |
| 252 | 332  | 244     | 0.04    | 1293 | 435  | 204     | 0.03    |
| 253 | 333  | 1440    | 0.21    | 1294 | 436  | 316     | 0.05    |
| 254 | 334  | 4544    | 0.66    | 1295 | 436  | 3120    | 0.46    |
| 255 | 335  | 1344    | 0.20    | 1296 | 438  | 1136    | 0.17    |
| 256 | 336  | 868     | 0.13    | 1297 | 439  | 272     | 0.04    |
| 257 | 337  | 568     | 0.08    |      |      |         |         |

# Agradecimentos

Desejo expressar um sincero agradecimento ao meu orientador neste trabalho, Prof. Doutor Winchil Luís Cláudio Vaz, não só pelo apoio, encorajamento e facilidades de trabalho proporcionadas, como também pela cuidada revisão e valiosas críticas na elaboração desta tese de Mestrado e ainda pela paciência, pelo convívio e pela amizade.

Ao Prof. Doutor Amadeu Brigas, expresso a minha gratidão pelo contacto estabelecido com a Universidade de Liverpool, pelo incentivo, pela disponibilidade, pelas sugestões e trocas de ideias.

Agradeço ao Prof. Doutor Robert Jonhstone, pela possibilidade e excelentes condições de trabalho proporcionadas no Departamento de Química da Universidade de Liverpool, pelas sugestões, pela atenção e ajuda preciosas na interpretação dos resultados obtidos em espectrometria de massa.

Ao Prof. Doutor Alfin Vaz agradeço o interesse manifestado, a ajuda na definição das estratégias de abordagem ao trabalho e a disponibilidade demonstrada.

À Dra. Sónia Mesquita, um agradecimento especial pelas horas de trabalho de equipa, pelas trocas de ideias relativamente ao trabalho, pelo apoio nas horas de desânimo e pela amizade.

Aos técnicos superiores de laboratório do Departamento de Química da Universidade de Liverpool, testemunho a minha gratidão pela disponibilidade, pelas horas de trabalho extraordinário dispendidas, pela boa disposição e pela simpatia.

Agradeço ainda à minha mulher e à minha filha pela paciência e pela compreensão e, aos meus pais, pelo incentivo e pela ajuda constantes.

À JNICT/Programa PRAXIS XXI, agradeço a bolsa de estudo concedida, sem a qual não me teria sido possível a dedicação exclusiva indispensável à realização do trabalho.

Finalmente um testemunho de gratidão aos meus colegas de Mestrado e a todos quantos, aqui não mencionados, de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

## Bibliografia

- Aasen, A. J., Hofstetter, H. H., Yengar, B. T. R., Holman, R. T., (1970), Identification and Analysis of Wax Esters by Mass Spectrometry, *Lipids*, Vol. 6, N° 7, pp 502-507;
- Baker, E. A., (1982), Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In Cutler, D. F., Alvin, K. L. and Price, C. E. (Eds), *The Plant Cuticle*, Academic Press, London, pp 139-165;
- Barthlott, W., Theisen, I., (1995), Epicuticular wax ultrastructure and classification of *Ranunculiflorae*, *Pl. Syst. Evol. (Suppl.)*, **9**, pp 39-45;
- Beynon, J. H., (1964), *Mass Spectrometry and its Applications to Organic Chemistry*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam;
- Bianchi, G., Vlahov, G., Anglani, C., Murelli, C., (1993), Epicuticular Wax of Olive Leaves, *Phytochemistry*, Vol. 32, N° 1, pp 49-52;
- Bidlingmeyer, B. A., (1992), *Practical HPLC Methodology and Applications*, John Wiley & Sons, Inc., New York;
- Budzikiewicz, H., Djerassi, C., Williams, D. H., (1967), *Mass Spectrometry of organic Compounds*, Holden-Day. Inc., San Francisco;
- Burchfield, H. P., Storrs, E. E., (1962), *Biochemical Applications of Gas Chromatography*, Academic Press Inc., New York;
- Bussotti, F., Ferretti, M., Cozzi, A., Grossoni, P., Bottacci, A., Tani, C., (1995), Crown Status of Holm Oak (*Quercus ilex* L.) Trees as Related to Phenology and Environmental Stress, *Water, Air and Soil Pollution*, **85**, pp 1269-1274;
- Brasier, C. M., Robredo, F., Ferraz, J. F. P., (1993), Evidence for *Phytophthora cinnamomi* Involvement in Iberian Oak Decline, *Plant Pathology*, Vol. 42, N° 1, pp 140-145;
- Castell, C., Terradas, J., Tenhunen, J. D., (1994), Water relations, gas exchange, and growth of resprouts and mature plant shoots of *Arbutus unedo* L. and *Quercus ilex* L., *Oecologia*, **98**, pp 201-211;

- Castroviejo, S., Laínz, M., González, G. L., Montserrat, P., Garmendia, F. M., Paiva, J., Villar, L. (Eds), (1990), *Flora Iberica: plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*, Vol.II, Real Jardín Botánico, Madrid;
- Cevc, G., Marsh, D., (1987), *Phospholipid Bilayers*, Wiley, New York;
- Christie, W. W., (1985), Rapid separation and quantification of lipid classes by high performance liquid chromatography and mass (light-scattering) detection, *Journal of lipid Research*, Vol.26, pp 507-512;
- Christie, W. W., (1987), *High -performance Liquid Chromatography and Lipids- a practical guide*, Pergamon Press, Oxford, England;
- Christie, W. W., (1989), *Gas Chromatography and Lipids: a practical guide*, The Oily Press Ltd, Ayr, Scotland;
- Christie, W. W., (1992), *Advances in Lipid Methodology-one*, The Oily Press Ltd, Glasgow;
- Christie, W. W., (1993), *Advances in Lipid Methodology-two*, The Oily Press Ltd, Dundee;
- Cutler, D. F., Alvin, K. L., Price, C. E., (Eds), (1982), *The Plant Cuticle*, Academic Press, London;
- Davyt, D., Pandolfi, E., Heinzen, L., troche, L., Moyna, P., (1995), TLC-Scanning of Wheat Seed Waxes, *Anales de la Asociación Química Argentina*, Vol. 83, Nº 1-2, pp 1-4;
- Dove, H., Mayes, R. W., (1996), *Plant Wax Components: A New Approach to Estimating Intake and Diet Composition in Herbivores*, American Institute of Nutrition;
- Downing, D. T., (1968), Photodensitometry in the Thin-Layer Chromatographic Analysis of Neutral Lipids, *Journal of Chromatography*, **38**, pp 91-99;
- Ebercon, A., Blum, A., Jordan, W. R. , (1977), A Rapid Colorimetric Method for Epicuticular Wax Content of *Sorghum* Leaves, *Crop Science*, Vol. 17, pp179-180;
- Eckl, K., Gruler, H., (1980), Phase Transitions in Plant Cuticles, *Planta*, **150**, pp 102-113;
- Garrec, J. P., Henry, C., Maout, L. Le, (1995), Cires Epi- et Intracuticulaires: Etude de leurs Separation, de leurs Caracteristiques Chimiques et de leurs Rôles Respectifs dans la Permeabilité Cuticulaire, *Environmental and Experimental Botany*, Vol. 35, Nº 3, pp 399-409;
- Goerg, M. S. G., (1986), Epicuticular wax of needles of *Pinus cembra*, *Pinus sylvestris* and *Picea abies*, *Eur. J. For. Path.*, **16**, pp 400-408;

- Gülz, P. G., (1992), Surface Structures and Chemical Composition of Epicuticular Waxes during Leaf Development of *Fagus sylvatica* L., *Z. Naturforsch.*, **47c**, pp 190-196;
- Gülz, P. G., (1994a), Isomeric Alkyl Esters in *Quercus robur* leaf Cuticular Wax, *Phytochemistry*, Vol. 35, N° 1, pp79-81;
- Gülz, P. G. (1994b), Epicuticular Leaf Waxes in the Evolution of the Plant Kingdom, *Journal of Plant Physiology*, Vol.143, pp 453-464;
- Gülz, P. G., Boor, G., (1992), Seasonal Variations in Epicuticular Wax Ultrastructures of *Quercus robur* Leaves, *Z. Naturforsch.*, **47c**, pp 807-814;
- Gülz, P., G., Markstädter, C., Riederer, M., (1994), Isomeric Alkyl Esters in *Quercus robur* Cuticular Wax, *Phytochemistry*, Vol. 35, pp 79-81;
- Gülz, P. G., Müller, E., (1992), Seasonal Variation in the Composition of Epicuticular Waxes of *Quercus robur* Leaves, *Z. Naturforsch.*, **47c**, pp 800-806;
- Gülz, P. G., Müller, E., Prasad, R. B. N., (1989), Organ-Specific Composition of Epicuticular Waxes of Beech (*Fagus sylvatica* L.) Leaves and Seeds, *Z. Naturforsch.*, **44c**, pp 731-734;
- Gülz, P. G., Müller, E., Herrmann, T., (1993), Epicuticular Leaf Waxes of the Hop (*Humulus lupulus*). Chemical Composition and Surface Structures, *Z. Naturforsch.*, **48c**, pp 689-696;
- Gülz, P. G., Müller, E., Schmitz, K., (1992), Chemical Composition and Surface structures of Epicuticular Leaf Waxes of *Ginkgo biloba*, *Magnolia grandiflora* and *Liriodendron tulipifera*, *Z. Naturforsch.*, **47c**, pp 516-526;
- Gülz, P. G., Prasad, R. B. N., (1990), Development and seasonal variations in the leaf epicuticular waxes of deciduous trees, In Quinn, P. J., Harwood, J. L., (Eds), *Plant Lipid Biochemistry, Structure and Utilization*, Portland Press, London, pp 36-39;
- Gülz, P. G., Prasad, R. B. N., Müller, E., (1991), Surface Structures and Chemical Composition of Epicuticular Waxes during Leaf Development of *Fagus sylvatica* L., *Z. Naturforsch.*, **47c**, pp 190-196;
- Haas, K., Rentschler, I., (1984), Discrimination between epicuticular and intracuticular wax in blackberry leaves: ultrastructural and chemical evidence, *Plant Science Letters*, **36**, pp 143-147;

- Hamilton, R. J., (ed.) (1995)**, *Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions*, The Oily Press Ltd., Dundee, Scotland;
- Hamilton, R. J., Hamilton, S., (1992)**, *Lipid Analysis- a Practical Approach*, Oxford University Press Inc., New York;
- Hamilton, R. J., Sewel, P. A., (1977)**, *Introduction to High Performance Liquid Chromatography*, Chapman and Hall Ltd., 2<sup>nd</sup> edition, London;
- Hamming, M. C., Foster, N. G., (1972)**, *Interpretation of Mass Spectra of Organic Compounds*, Academic Press, New York;
- Heinzen, H., Moyna P., (1993)**, Activity of Wax Constituents on Denatured Cellular Structures, *International Journal of Experimental Botany*, **54**, pp 51-58;
- Hemmers, H., Gülz, P. G., (1986)**, Epicuticular Waxes from Leaves of five *Euphorbia* Species, *Phytochemistry*, Vol. 25, N° 9, pp 2103-2107;
- Holloway, P. J., (1982)**, The chemical constitution of plant cutins. In Cutler, D. F., Alvin, K. L. and Price, C. E. (Eds), *The Plant Cuticle*, Academic Press, London, pp 45-85;
- Holloway, P. J., Challen, S. B., (1966)**, Thin Layer Chromatography in the Study of Natural Waxes and their Constituents, *Journal of Chromatography*, **25**, pp 336-346;
- Holme, D. J., Peck, H., (1983)**, *Analytical Biochemistry*, Longman Group Limited, England;
- Jacob, J., (1975)**, TLC, GLC and MS of complex Lipid Mixtures from Uropygial Secretions, *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 13, pp 415-422;
- Jenks, M. A., Rich, P. J., Ashworth, E. N., (1994)**, Involvement of Cork Cells in the Secretion of Epicuticular Wax Filaments on *Sorghum bicolor* (L.) Moench, *Int. J. Plant Sci.*, **155**, pp 505-518;
- Jetter, R., Riederer, M., (1994)**, Epicuticular crystals of nonacosan-10-ol: In-vitro reconstitution and factors influencing crystal habits, *Planta*, **195**, pp 257-270;
- Jetter, R., Riederer, M., (1995)**, In vitro Reconstitution of Epicuticular Wax Crystals: Formation of Tubular Aggregates by Long-Chain Secondary Alkanediols, *Botanica Acta*, **108**, pp 111-120;

- Karabourniotis, G., Fasseas C., (1996)**, The dense indumentum with its polyphenol content may replace the protective role of the epidermis in some young xeromorphic leaves, *Can. J. Bot.*, **74**, pp 347-351;
- Kasperbauer, M. J., Wilkinson, R. E., (1995)**, Mulch Surface Color Affects Accumulation of Epicuticular Wax on Developing Leaves, *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 62, N° 5, pp 940-944;
- Kolattukudy, P. E., (Ed), (1976)**, *Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam;
- Korolczuk, J., Kwasniewska, I., (1974)**, Cupric Sulphate as a charring agent in the TLC of Lipids, *Journal of Chromatography*, **88**, pp 428-429;
- Larsson, K., (1994)**, *Lipids: Molecular Organization, Physical Functions and Technical Applications*, The Oily Press Ltd., Dundee;
- Mangold, H. K., Zweig, G., Sherma, J., (Eds), (1984)**, *Handbook of Chromatography: Lipids*, Vol.I, CRC Press, Boca Raton, Florida;
- March, Jerry, (1992)**, *Advanced Organic Chemistry: reactions, mechanisms, and structure*, 4<sup>th</sup> ed., John Wiley & Sons, Inc., New York;
- Matzke, K., Riederer, M., (1991)**, A comparative study into the chemical constitution of cutins and suberins from *Picea abies* (L.) Karst., *Quercus robur* L., and *Fagus sylvatica* L., *Planta*, **185**, pp 233-245;
- Meusel, I., Leistner, E., Barthlott, W., (1994)**, Chemistry and micromorphology of compound epicuticular wax crystalloids (*Strelitzia* type), *Pl. Syst. Evol.*, **193**, pp 115-123;
- Moreira, I., (1980)**, Membrana Cuticular. In *Epiderme dos Orgãos Aéreos das Plantas*, Centro de Botânica Aplicada à Agricultura da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, pp 1-37;
- Orgell, W. H., (1954)**, The Isolation of Plant Cuticle with Pectic Enzymes, *Plant Physiology*, pp 78-80;
- Penas, A., Llamas, F., Morales, C. P., Acedo, C., (1994)**, Aportaciones al Conocimiento del Genero *Quercus* en la Cordillera Cantabrica. I. Tricomias Foliáres de las Especies Caducifolias, *Lagasalia*, **17**, pp 311-324;

- Perissol, C., Roux, M., Petit, J. Le, (1993), Succession of bacteria attached to evergreen oak leaf surfaces, *Eur. J. Soil Biol.*, **29**, pp 167-176;
- Pierce Chemical Company, *Handbook & General Catalog*, Pierce & Warriner Limited, 1989;
- Prasad, R. B. N., Gülz, P. G., (1990), Developmental and Seasonal variations in the Epicuticular Waxes of Beech Leaves (*Fagus sylvatica* L.), *Z. Naturforsch.*, **45c**, pp 805-812;
- Prasad, R. B. N., Gülz, P. G., (1990), Surface Structure and Chemical Composition of Leaf Waxes from *Quercus robur* L., *Acer pseudoplatanus* L. and *Juglans regia* L., *Z. Naturforsch.*, **45c**, pp 813-817;
- Prasad, R. B. N., Müller, E., Gülz, P. G., (1990), Epicuticular Waxes from Leaves of *Quercus robur*, *Phytochemistry*, Vol. 29, N° 7, pp 2101-2103;
- Priestley, E. B., Wojtowicz, P. J., Sheng, P., (1976), *Introduction to Liquid Crystals*, Plenum Press, New York;
- Prügel, B., Lognay, G., (1996), Composition of the Cuticular Waxes of *Picea abies* and *P. sitchensis*, *Phytochemical Analysis*, Vol. 7, pp 29-36;
- Prügel, B., Loosveldt, P., Garrec, J. P., (1994), Changes in the content and constituents of the cuticular wax of *Picea abies* (L.) Karst. in relation to needle ageing and tree decline in five European forest areas, *Trees*, **9**, pp 80-87;
- Rafii, Z. A., Dodd, R. S., Pelleau, Y., (1993), Biochemical diversity and Systematics of Mediterranean Evergreen Oak from South East France, *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 21, n° 6/7, pp 687-694;
- Reynhardt, E. C., Riederer, M., (1991), Structure and molecular dynamics of the cuticular wax from leaves of *Citrus aurantium* L., *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **24**, pp 478-486;
- Reynhardt, E. C., Riederer, M., Schneider, G., (1993), Structures and Molecular Dynamics of Plant Waxes. II. Cuticular Wax from Leaves of *Fagus sylvatica* L., *Eur. Biophys. J.*;
- Reynhardt, E. C., Riederer, M., (1993), Structure and Molecular Dynamics of Plant Waxes. III. Cuticular Wax from Leaves of Barley (*Hordeum vulgare* L.), *Eur. Biophys. J.*;
- Ribo, J. M., Raventos, J., (1972), Fatty Acids and Triterpenoids of *Quercus ilex*, *Phytochemistry*, Vol. 11, pp 3089, Pergamon Press, England;

- Riederer, M., Schneider, G., (1989)**, Comparative study of the composition of waxes extracted from isolated leaf cuticles and from whole leaves of *Citrus*: Evidence for selective extraction, *Physiologia Plantarum*, **77**, pp 373-384;
- Riederer, M., Schneider, G., (1990)**, The effect of the environment on the permeability and composition of *Citrus* leaf cuticles. 2. Composition of soluble cuticular lipids and correlation with transport properties, *Planta*, **180**, pp 154-165;
- Riederer, M., Schönherr, J., (1984)**, Accumulation and Transport of (2,4-Dichlorophenoxy)acetic Acid in Plant Cuticles: Sorption in the Cuticular Membrane and its Components, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **8**, pp 236-247;
- Riederer, M., Schönherr, J., (1986)**, Quantitative Gas Chromatographic Analysis of Methyl Esters of Hydroxy Fatty Acids Derived from Plant Cutin, *Journal of Chromatography*, **360**, pp 151-161;
- Riederer, M., Schönherr, J., (1986)**, Thermodynamic analysis of nonelectrolyte sorption in plant cuticles: The effects of concentration and temperature on sorption of 4-nitrophenol, *Planta*, **169**, pp 69-80;
- Riederer, M., Schönherr, J., (1988)**, Development of plant cuticles: fine structure and cutin composition of *Clivia miniata* Reg. leaves, *Planta*, **174**, pp 127-138;
- Riederer, M., Schönherr, J., (1990)**, Effects of Surfactants on Water Permeability of Isolated Plant Cuticles and on the Composition of their Cuticular Waxes, *Pestic. Sci.*, **29**, pp 85-94;
- Riederer, M., (1990)**, Estimating Partitioning and Transport of Organic Chemicals in the Foliage/Atmosphere System: Discussion of a Fugacity-Based Model, *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 24, N° 6, pp 829-836;
- Sala, A., Tenhunen, J. D., (1996)**, Simulations of Canopy net Photosynthesis and Transpiration in *Quercus ilex* L. Under the Influence of Seasonal Drought, *Agricultural and Forest meteorology*, **78**, pp 203-222;
- Salasoo I., (1987)**, Epicuticular Wax Alkanes of Some Heath Plants in Central Alaska, *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 15, N° 1, pp 105-107;
- Salisbury, F. B., Ross, C. W., (1991)**, *Plant Physiology*, Wadsworth Publishing Company, Belmont, California;

- Segura, R., Gotto, A., M., Jr., (1974)**, A New Fluorimetric procedure for the detection and Quantitation of Organic Compounds in Thin-Layer Chromatography, *Journal of Chromatography*, **99**, pp 643-657;
- Schönherr, J., (1976)**, Water Permeability of Isolated Cuticular Membranes: The effects of Cuticular Waxes on Diffusion of Water, *Planta*, **131**, pp 159-164;
- Schönherr, J., Riederer, M., (1988)**, Desorption of Chemicals from Plant Cuticles: Evidence for Assymetry, *Arch. Environ. Toxicol.*, **17**, pp 13-19;
- Schönherr, J., Riederer, M., (1989)**, Foliar penetration and accumulation of organic chemicals in plant cuticles, *rev. Environment Contam. Toxicol*, **108**, pp 1-70;
- Schreiber, L., (1994)**, Comparative investigations of cuticular permeability of conifer needles from healthy and damaged trees, *New Phytol.*, **128**, pp 251-261;
- Schreiber, L., (1996)**, Wetting of the upper needle surface of *Abies grandis*: influence of pH, wax chemistry and epiphylic microflora on contact angles, *Plant, Cell and Environment*, **19**, pp 455-463;
- Schreiber, L., (1996)**, Wetting of the upper needle surface of *Abies grandis*: influence of pH, wax chemistry and epiphylic microflora on contact angles, *rev. Plant, Cell and Environment*, **19**, pp 455-463;
- Schreiber, L., Schönherr, Jörg, (1992)**, Analysis of Foliar Uptake of Pesticides in Barley Leaves: Role of Epicuticular Waxes and Compartmentation, *Pestic. Sci.*, **36**, pp 213-221;
- Schreiber, L., Kirsch, T., Riederer, M., (1995)**, Transport properties of cuticular waxes of *Fagus sylvatica* L. and *Picea abies* (L.) Karst.: Estimation of size selectivity and tortuosity from diffusion coefficients of aliphatic molecules, *Planta*, **198**, pp 104-109;
- Shand, J. H., Noble, R. C., (1980)**, Quantification of lipid Mass by a Liquid Scintillation Counting Procedure Following Charring on Thin-Layer Plates, *Analytical Biochemistry*, **101**, pp 427-434;
- Skoog, West, Holer, (1992)**, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 6<sup>th</sup> ed., Saunders College Publishing, Orlando;
- Smith, R. M., (1988)**, *Gas and Liquid Chromatography in Analytical Chemistry*, St. Edmundsbury Press, Bury St. Edmunds, Suffolk;

- Snyder, L. R., Glajch, J. L., Kirkland, J. J., (1988), *Practical HPLC Method Development*, John Wiley & Sons, New York;
- Stahl, E. (Ed.) (1965), *Thin-Layer Chromatography. A Laboratory Handbook*, 6<sup>th</sup> ed., Springer-Verlag, Berlin;
- Stammitti, L., Garrec, J. P., Derridj, S., (1995), Permeability of Isolated Cuticles of *Prunus laurocerasus* to Soluble Carbohydrate, *Plant Physiol. Biochem.*, **33**, pp 319-326;
- Tava, A., Cunico, C., Cremona, R., Piccinini, E., (1996), Isomeric Composition of the Ester Fraction from Epicuticular Waxes of *Festuca arundinacea* Schreb., *J. High Resol. Chromatogr.*, Vol. 19, pp 43-48;
- Touchstone, J. C., (1992), *Practice of Thin Layer Chromatography*, John Wiley & Sons, Inc., New York;
- Trabaud, L., Méthy, M., (1992), Effets de températures sub-létales sur l' appareil photosynthétique du chêne vert (*Quercus ilex* L.), *Ann. Sci. For.*, **49**, pp 637-649;
- Tretiach, M., (1993), Photosynthesis and transpiration of evergreen Mediterranean and deciduous trees in an ecotone during a growing season, *Acta Oecologica*, **14**, pp 341-360;
- Tretiach, M., Bolognini, G., (1993), A Phytogeographic Analysis of a Transect Between Mediterranean and Submediterranean Vegetation (Trieste - NE Italy), *Bolletino Della Società Adriatica di Scienze LXXIV*, pp 23-40;
- Tulloch, A. P., (1975), Chromatographic Analysis of Natural Waxes, *Journal of Chromatographic science*, Vol. 13, pp 403-407;
- Tulloch, A. P., (1987), Epicuticular Waxes of *Abies balsamea* and *Picea glauca*. Occurrence of long-chain methyl esters, *Phytochemistry*, Vol. 26, N° 4, pp1041-1043;
- Varley, J. H., (1979), *A Novel Approach to the Synthesis of Prostaglandins*, PhD Thesis, Liverpool;
- Wakeham, S. G., Frew, N. M., (1982), Glass Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Wax Esters, Steryl Esters and Triacylglycerols. In *Lipids*, Vol. 17, N° 11;
- Wattendorff, J., Holloway, P. J., (1982), Studies on the Ultrastructure and Histochemistry of Plant Cuticles: Isolated Cuticular Membrane preparations of *Agave americana* L. and the Effects of Various Extraction Procedures, *Ann. Bot.*, **49**, pp 769-804;

Welker, O. A., Furuya, S., (1994), Surface Structure of Leaves in Heat Tolerant Plants, *J.*

*Agronomy 6 Crop Science*, **173**, pp 279-288;

Willard, H. H., Merrit, L. L. Jr., Dean, J. A., Settle, F. A. Jr., (1988), *Instrumental Methods of*

*Analysis*, Wadsworth;

Vogel, A. I., (1941), *Vogel's Text book of Practical Organic Chemistry*, 5<sup>th</sup> edition, Rev. by Furniss,

B. S. *et al.*

