



**Miguel Mussa
Ernesto**

**Composição química de extractos da *Momordica
balsamina* cultivada em Moçambique**



**Miguel Mussa
Ernesto**

**Composição química de extractos da Momordica
balsamina cultivada em Moçambique**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção de grau de Mestre em Química de Produtos Naturais, realizada sob orientação do Doutor José Abrunheiro da Silva Cavaleiro, Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor Armado Jorge Domingues Silvestre, Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Aos meus pais, aos meus filhos e à minha família.

O júri

Presidente

Doutor Artur Manuel Soares da Silva
Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor José Abrunheiro da Silva Cavaleiro
Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor Armando Jorge Domingues Silvestre
Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Maria Lúcia Almeida da Silva
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade da Beira Interior

Agradecimentos

Quero aproveitar este espaço para agradecer a todos os que de algum modo contribuíram para a concretização deste trabalho, em especial:

À minha mãe e à minha família, pelo amor e apoio incondicional que sempre me dedicaram.

Aos meus orientadores, Professor Doutor José Cavaleiro e Professor Doutor Armando Silvestre, pela sábia orientação metodológica, disponibilidade e espírito crítico demonstrados.

Ao Professor Doutor Artur Silva que, na qualidade de Presidente do Conselho Directivo do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, deu o seu apoio e viabilizou todos os aspectos burocráticos inerentes à realização deste trabalho.

Aos meus professores pela boa vontade, disponibilidade e apoio prestados.

Ao Filipe Ferreira, ao Miguel Pinheiro e à Juliana Vinholes pelos seus apoios e companheirismos que tão valiosos foram em vários momentos.

Aos meus colegas do Mestrado e do laboratório de investigação pela colaboração e espírito de grupo por eles revelados e, em particular, ao Domingos Avelar e à sua família, pela simpatia e amizade demonstradas durante a minha estadia em Portugal.

Os meus agradecimentos estendem-se também a todo o pessoal administrativo e de apoio que sempre colaborou e se mostrou prestável.

À Fundação Calouste Gulbenkian pela atribuição da bolsa E193094/P61288(M) e pela sua compreensão face a problemas surgidos, ao Departamento de Química da Universidade de Aveiro pelas facilidades laboratoriais concedidas e ao Instituto Superior de Ciências e Tecnologia de Moçambique que acreditou e apostou neste projecto.

Palavras-chave

Momordica balsamina, propriedades, aplicações, caracterização química, componentes lipofílicos.

Resumo

A *Momordica balsamina*, espécie da família das *Cucurbitaceae*, é uma planta herbácea trepadeira, ou rasteira, perene, espalhada por quase toda a África, Ásia e algumas regiões tropicais da Austrália e América. Esta espécie cresce em terrenos de cultivo das regiões tropical e subtropical, e estendendo-se até às regiões temperadas dos hemisférios sul e norte.

Devido ao seu valor nutricional aquela planta é muito utilizada pelas populações nativas, em particular na região austral da África, essencialmente como constituinte alimentar; são ainda conhecidas outras aplicações de partes da planta em medicina tradicional, dados os efeitos, entre outros, anti-malárico, anti-inflamatório, anti-emético e anti-úlceras, demonstrados.

A composição química das diversas partes da planta é ainda pouco conhecida. Nesta perspectiva foi decidido desenvolver estudos de elucidação estrutural de componentes daquela planta.

Na presente tese são apresentados os resultados da análise por GC-MS de amostras de folhas e de sementes da *Momordica balsamina* colhidas em Moçambique. Os extractos foram obtidos por extracção em Soxhlet, de forma sequencial, em solventes de polaridades crescentes (hexano, diclorometano e acetona).

As fracções lipofílicas obtidas de extractos de folhas e de sementes, antes e depois de hidrólise, são constituídas, essencialmente, por ácidos gordos. Outras famílias de compostos identificados são, por ordem decrescente de abundância, terpenóides, álcoois gordos, hidrocarbonetos de cadeias longas, compostos aromáticos e alguns ésteres metílicos de ácidos gordos. Os compostos identificados em maior concentração foram os ácidos α -linolénico, linoleico, oleico, palmítico e esteárico e o triterpenóide lupeol, conhecido como tendo efeitos anti-tumorais.

Keywords

Momordica balsamina, properties, applications, chemical characterizations, lipophilic compounds.

Abstract

The *Momordica balsamina*, a species of the *Cucurbitaceae* family, is a herbaceous climbing or creeping plant. It is a perennial plant found almost all over the African and Asian continents, and in some tropical parts of Australia and America. This species is grown in cultivable land in tropical and subtropical regions up to the edges of the temperate regions in both southern and northern hemispheres.

Due to its high nutritional value *Momordica balsamina* is heavily utilized by the native populations, particularly those within the austral region of Africa. Parts of the plant are also employed in other uses mainly in traditional medicine for the treatment of infections, and are known for its anti-malarial, anti-inflammatory, anti-emetic and anti-ulcer properties.

Despite its widespread use, the chemical compositions of the different parts of the plant have not, as yet, been well studied. This work attempts to address this lacuna by tabulating certain structural components of this plant.

In this thesis we present the results of the analysis, by GC-MS, of samples of leaves and seeds of *Momordica balsamina* found in Mozambique. The extracts are obtained from Soxhlet extraction in a sequential form with solvents of increasing polarity (hexane, dichloromethane and acetone).

The lipophilic fractions obtained from the leaf and seed extracts, before and after hydrolysis, are composed essentially by fatty acids. Other families of compounds in decreasing order of their abundance include terpenoids, fatty alcohols, long-chain hydrocarbons, aromatic compounds and methyl esters of fatty acids. The most abundant compounds were the acids α -linolenic, linoleic, oleic, palmitic and stearic and the triterpenoid lupeol, known for its anti-tumoral properties.

ÍNDICE

	Página
1 – PESQUISA SOBRE A ESPÉCIE <i>Momordica balsamina</i>	1
1.1 - Âmbito da pesquisa	3
1.2 - Caracterização taxionómica da <i>Momordica balsamina</i>	4
1.3 - Aplicações na medicina tradicional da espécie <i>Momordica balsamina</i> ..	6
1.4 - Pesquisa sobre a composição química da <i>Momordica balsamina</i>	8
1.4.1 - Compostos alifáticos.....	9
1.4.2 - Terpenos e terpenóides.....	10
1.4.3 - Compostos fenólicos ou polifenóis	21
2 – MÉTODOS DE EXTRACÇÃO DE COMPOSTOS	25
2.1 - Considerações gerais	27
2.2 - A escolha de solventes.....	29
2.3 - Técnicas de extracção de produtos naturais	30
3 – PARTE EXPERIMENTAL	35
3.1 - Solventes e equipamentos utilizados.....	37
3.1.1 - Solventes utilizados	37
3.1.2 - Equipamento utilizado	37
3.2 - Preparação de amostras e obtenção de extractos	37
3.2.1 - Preparação de amostras	37
3.2.2 - Obtenção de extractos por Soxhlet.....	38
3.3 - Preparação das amostras para a análise dos extractos por GC-MS	38
3.3.1 - Hidrólise alcalina dos extractos de hexano e diclorometano	38
3.3.2 - Hidrólise ácida dos extractos obtidos em acetona.....	39
3.3.3 - Derivatização dos extractos.....	39
3.3.4 - Preparação do Padrão interno (Pi)	39

3.3.5 - Quantificação dos compostos identificados por GC-MS	39
4 – ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	41
4.1 - Extractos obtidos por ordem de solventes	43
4.2 - Identificação dos constituintes	43
4.2.1 - Extractos de folhas em hexano/diclorometano (P1)	47
4.2.2 - Extractos de folhas em acetona (P2)	48
4.2.3 - Extractos de sementes em hexano/diclorometano (P3)	48
4.2.4 - Extractos de sementes em acetona (P4)	49
4.2.5 - Ácidos gordos	50
4.2.6 - Ácidos aromáticos	51
4.2.7 - Álcoois	53
4.2.8 - Monoglicerídeos	54
4.2.9 - Monossacarídeos e seus derivados	55
4.2.10 - Terpenóides	56
4.3 - Rendimentos obtidos antes da hidrólise	57
4.3.1 - Extractos não hidrolisados de folhas	59
4.3.2 - Extractos não hidrolisados de sementes	59
4.4 - Rendimentos obtidos depois da hidrólise	61
4.4.1 - Extractos hidrolisados de folhas	62
4.4.2 - Extractos hidrolisados de sementes	63
5 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	67
5.1 - Conclusões	69
5.2 - Perspectivas futuras	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1: <i>Momordica balsamina</i> a mostrar A) a estrutura das folhas e gavinhas e a inflorescência axilar e B) a rama, os frutos e as sementes secos. 6	6
Ilustração 2: <i>Momordica balsamina</i> : C) frutos verdes e sementes com cutícula vermelha e D) a rama trepadeira com um fruto maduro..... 6	6
Ilustração 3: estruturas de alguns ácidos gordos identificados na espécie <i>Momordica balsamina</i> 9	9
Ilustração 4: estruturas de mono e sesquiterpenóides comuns identificados na família <i>Cucurbitaceae</i> 12	12
Ilustração 5: estruturas de monoterpenóides usados como feromonas e/ou semioquímicos. 13	13
Ilustração 6: alguns ácidos comuns da resina derivados de diterpenos tricíclicos de tipo pimárico e abiético, segundo Soltes e Zinkel..... 13	13
Ilustração 7: alguns exemplos de estruturas de diterpenóides fisiológicos. 14	14
Ilustração 8: exemplos de esqueletos de álcoois triterpenóides pentacíclicos (oleanano e lupano) e tetracíclicos (demarano e eufano). 15	15
Ilustração 9: exemplo de triterpenóides de tipos oleanano e lupano comuns na família <i>Cucurbitaceae</i> 16	16
Ilustração 10: triterpenóides obtidos do extracto metanólico de frutos de <i>Momordica balsamina</i> 17	17
Ilustração 11: estruturas de fitosteróis comuns e identificados na <i>Momordica balsamina</i> 18	18
Ilustração 12: triterpenóides de tipo cucurbitano isolados da <i>Momordica balsamina</i> 19	19
Ilustração 13: exemplos de cucurbitacinas, triterpenóides típicos da família <i>Cucurbitaceae</i> 20	20
Ilustração 14: ácido rosmarínico e seus derivados como exemplos de antioxidantes fenólicos. 23	23

Ilustração 15: esquema de montagem de extractor Soxhlet, que mostra: o manto de aquecimento (A), o balão de fundo redondo (B), fonte de energia (C), a coluna (D), o cartucho poroso de papel ou cerâmico (E), a amostra (F), as fibras de vidro ou algodão (G), o condensador de refluxo (H), o tubo para saída de vapor (I) e o tubo de retorno de solvente (J).	34
Ilustração 16: cromatograma do extracto hidrolisado de folhas em hexano/diclorometano (P1), analisado por GC-MS, mostrando os compostos identificados, os não identificados (ni) e o Padrão interno (Pi).....	47
Ilustração 17: ácidos aromáticos identificados nos extractos de folhas (P2) e de sementes (P4) da <i>Momordica balsamina</i> em acetona.	48
Ilustração 18: cromatograma do extracto hidrolisado de sementes em hexano/diclorometano (P3), analisado por GC-MS, que mostra os compostos identificados (enumerados) e os não identificados (ni), e o Padrão interno (Pi).	49
Ilustração 19: cromatograma do extracto hidrolisado de sementes em acetona (P4), analisado por GC-MS, onde são mostrados os compostos identificados (enumerados) e os não identificados (ni), o Padrão interno (Pi) e contaminações de solventes (cs).	50
Ilustração 20: espectro de massa do ácido palmítico, como exemplo típico de ácidos alifáticos sililados.	51
Ilustração 21: espectro de massa de ácido salicílico sililado, que mostra os picos característicos dos ácidos aromáticos sililados.....	52
Ilustração 22: espectro de massa do hexadecanol sililado, que mostra os picos característicos dos álcoois sililados.....	54
Ilustração 23: espectro de massa de monopalmitina sililado, em representação de espectros de massa característicos dos monoglicerídeos sililados.....	55
Ilustração 24: espectro de massa do derivado trimetilsilílico de D-glucose, com a proeminência do pico m/z 204, em representação de piranoses sililados.....	56
Ilustração 25: espectro de massa de lupeol sililado, que mostra os picos característicos dos triterpenóides sililados.	57

Ilustração 26: massas totais dos compostos identificados em mg/gr do extracto não hidrolisado de folhas e sementes de <i>Momordica balsamina</i>	58
Ilustração 27: massas totais dos ácidos em comparação com os outros compostos identificados em mg/gr do extracto não hidrolisado de folhas e sementes de <i>Momordica balsamina</i>	58
Ilustração 28: os ácidos gordos mais abundantes nos extractos não hidrolisados de sementes de <i>Momordica balsamina</i>	60
Ilustração 29: comparação das massas totais dos compostos identificados por GC-MS, antes e depois da hidrólise, nos extractos de folhas e de sementes de <i>Momordica balsamina</i>	61
Ilustração 30: massas dos ácidos gordos em comparação com as de outros compostos, em mg/gr de extractos hidrolisados de folhas e de sementes de <i>Momordica balsamina</i>	62
Ilustração 31: ácidos gordos mais abundantes em mg/gr do extracto hidrolisado de sementes em hexano/diclorometano da <i>Momordica balsamina</i>	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: exemplo da taxa de oxidação de grupos alílicos de ácidos gordos. .	10
Tabela 2: rendimentos de extração em Soxhlet de folhas e sementes de <i>Momordica balsamina</i>	43
Tabela 3: quantificação dos compostos lipofílicos identificados por GC-MS em mg/gr de extractos de folhas, obtidos em hexano/diclorometano (P1) e em acetona (P2) e de sementes, obtidos em hexano/diclorometano (P3) e em acetona (P4). O “tr” simboliza quantidade vestigial.	46
Tabela 4: rendimentos de extractos não hidrolisados de folhas de <i>Momordica balsamina</i> , onde são mostradas massas por grupos dos compostos em mg/gr	

do extracto (P1mg/gr e P2mg/gr) e as respectivas percentagens (P1% e P2%).	59
Tabela 5: rendimentos dos extractos não hidrolisados de sementes de <i>Momordica balsamina</i> , que mostram massas por grupos dos compostos em mg/gr do extracto (P3mg/gr e P4mg/gr) e as respectivas percentagens (P3% e P4%).	60
Tabela 6: rendimentos do extracto de folhas em hexano/diclorometano (P1) da <i>Momordica balsamina</i> , onde são mostradas massas por grupos dos compostos em mg/gr do extracto (antes e depois da hidrólise) e os respectivos crescimentos (em massas e em percentagens).	62
Tabela 7: rendimentos do extracto de folhas em acetona (P2) da <i>Momordica balsamina</i> , onde são mostradas massas por grupos dos compostos em mg/gr do extracto (antes e depois da hidrólise) e os respectivos crescimentos (em massas e em percentagens).	63
Tabela 8: rendimentos do extracto de sementes em hexano/diclorometano (P3) da <i>Momordica balsamina</i> , que mostram massas por grupos dos compostos em mg/gr do extracto (antes e depois da hidrólise) e os respectivos crescimentos (em massas e em percentagens).	64
Tabela 9: rendimentos do extracto de sementes em acetona (P3) da <i>Momordica balsamina</i> , onde são mostradas massas por grupos dos compostos em mg/gr do extracto (antes e depois da hidrólise) e os respectivos crescimentos (em massas e em percentagens).	65

1 – PESQUISA SOBRE A ESPÉCIE *Momordica balsamina*

1.1 - Âmbito da pesquisa

Moçambique é um país situado na costa oriental da África Austral, ao longo de 2.470 km de linha da costa do Oceano Índico [1]. Tem uma população constituída por vários grupos étnicos, estimada em 19.420.036 habitantes (2005) a partir do senso populacional de 1997 [2]. Ocupa uma superfície de 779.390 km² de terra firme e cerca de 13.000 km² de águas interiores [2]. Cerca de 5,4% do seu vasto território é aproveitado para a agricultura (2003) [1]. É caracterizado por um clima inter-tropical que varia de subtropical a tropical húmido (de sul para o norte do país) [2] e tem uma grande variedade de espécies vegetais e animais. A maioria das espécies vegetais é conhecida devido as suas aplicações, particularmente em usos terapêuticos na medicina tradicional, contudo, não lhe sendo reconhecido cientificamente os princípios activos. Esta situação deve-se ao facto de existirem muito poucos (ou nenhuns) trabalhos de investigação que incidam sobre os produtos naturais de origem vegetal típicos do ecossistema sub-saariano.

Neste trabalho é objecto de estudo a *Momordica balsamina*, uma espécie vegetal da família *Cucurbitaceae*, que tem uma grande variedade de aplicações tradicionais em Moçambique e em toda África austral, estando espalhada por quase todas regiões tropicais e subtropicais do planeta. A *Momordica balsamina* faz parte das espécies largamente utilizadas como plantas medicinais pelos nativos de várias regiões tropicais [3], em especial Moçambique. Apesar disso, são espécies pouco exploradas no contexto da sua composição química e, conseqüentemente, nos seus princípios activos. Este facto constitui um forte motivo para a escolha desta espécie para o presente estudo. Devido às suas características (ponto 1.2), ao seu potencial terapêutico promissor (ponto 1.3), à sua importância nutritiva no seio das comunidades moçambicanas e de África sub-saariana, a *Momordica balsamina* tem sido alvo de muitas especulações no âmbito das suas aplicações na medicina tradicional. Portanto, a sua fraca exploração científica associada às propriedades e às aplicações tradicionais fundamentam o porquê deste trabalho de investigação baseado na caracterização química dos compostos da *Momordica balsamina*.

Os compostos naturais extraídos das plantas, para efeitos terapêuticos e várias outras aplicações, derivam essencialmente do metabolismo secundário e têm uma ocorrência diferenciada de acordo com a adaptação da espécie. Isto é, cada espécie vegetal segrega determinados tipos de metabolitos secundários e apresenta uma distribuição desigual destes produtos na planta, dependendo das suas propriedades e das funções fisiológicas para as quais este tipo dos compostos é biossintetizado. Por estas razões, e considerando as características herbáceas da *Momordica balsamina*, a análise química dos compostos naturais nesta espécie foi feita separadamente em fracções de sementes e das folhas com a rama.

Ao longo do trabalho são descritos todos os passos e procedimentos experimentais aplicados na análise das amostras das folhas e das sementes de *Momordica balsamina*, desde os processos separativos até à análise e à caracterização estrutural dos compostos identificados. De salientar que neste trabalho é feita uma descrição geral do processo extractivo e uma referência de alguns métodos de extracção de produtos naturais de origem vegetal mais usuais, dando maior ênfase às técnicas usadas neste trabalho.

1.2 - Caracterização taxionómica da *Momordica balsamina*

A *Momordica balsamina* é uma das espécies da família *Cucurbitaceae*, pertencente à ordem *Cucurbitales*. A família *Cucurbitaceae* congrega cinco grandes sub-famílias representadas por, nomeadamente, *Fevilleae*, *Melothrieae*, *Cucurbiteae*, *Cicyoideae* e *Cyclanthereae* [4]. Os membros desta família estão distribuídos em cerca de 100 géneros e 850 espécies, em várias partes da terra. A família *Cucurbitaceae* envolve plantas essencialmente comestíveis e ornamentais.

A Ordem *Cucurbitales* engloba apenas a família *Cucurbitaceae* [5]. É uma ordem próxima das *Campanulales*, devido às peças do androceu serem coerentes e coalescentes, deferindo desta última ordem pela presença de flores unissexuais, pelo ovário do tipo tricarpelar, e pelas sementes sem endosperma [5].

A *Momordica balsamina* é uma espécie vegetal espalhada quase por toda África, Ásia e algumas regiões tropicais da Austrália e América [6]. Esta espécie cresce nos terrenos extractos de cultivo das regiões pantropical e subtropical, e estendendo-se até às regiões temperadas dos hemisférios norte e sul.

São sinónimos desta espécie: *Momordica charantia*, *Momordica chinensis*, *Momordica elegans*, *Momordica indica*, *Momordica operculata*, *Momordica sinensis* e *Sicyos fauriei* [7].

Alguns nomes comuns ou vernáculos pelos quais é designada esta espécie, *Momordica balsamina*, em diferentes partes do mundo: *balsam pear*, *balsam apple*, *bitter melon*, *wonder apple*, *african cucumber*, *bittergourd*, *cerasee bush*, *archucha*, *balsamina*, *achochilla*, *pepinillo*, *cunde amor*, *melão de São Caetano*, *carcilla*, *kakana*, *kekana*, *Calabaza africana*, etc. [8].

A *Momordica balsamina* é uma planta dióica trepadeira, ou rasteira, perene, de caule herbáceo (rama), constituída por folhas alternas palmati-quinquelobadas, com gavinhas enroladas em espiral e situadas na parte superior da base do pecíolo, não ramificadas e sem estípulas (Ilustração 1).



Ilustração 1: *Momordica balsamina* a mostrar A) a estrutura das folhas e gavinhas e a inflorescência axilar e B) a rama, os frutos e as sementes secos.

A inflorescência é axilar, cimeira e bem definida. As flores são amarelas, unissexuais actinomórficas, com cálice quinquelobado e com corola gamopétala campanulada. As flores masculinas têm cinco estames livres, biloculares, alternados com cinco pétalas; o androceu com anteras discentes por uma fenda longitudinal (duas biloculares e uma unilocular) mas com filetes coalescentes. A flor feminina tem um único pistilo (gineceu), um ovário ínfero, com 3 carpelos e um lóculo com placentação parietal. O fruto, do tamanho de uma azeitona verde e de tom que varia do amarelado ao vermelho quando maduro, é uma baga, com pericarpo macio, e de numerosas sementes revestidas por uma camada vermelha (Ilustração 2).

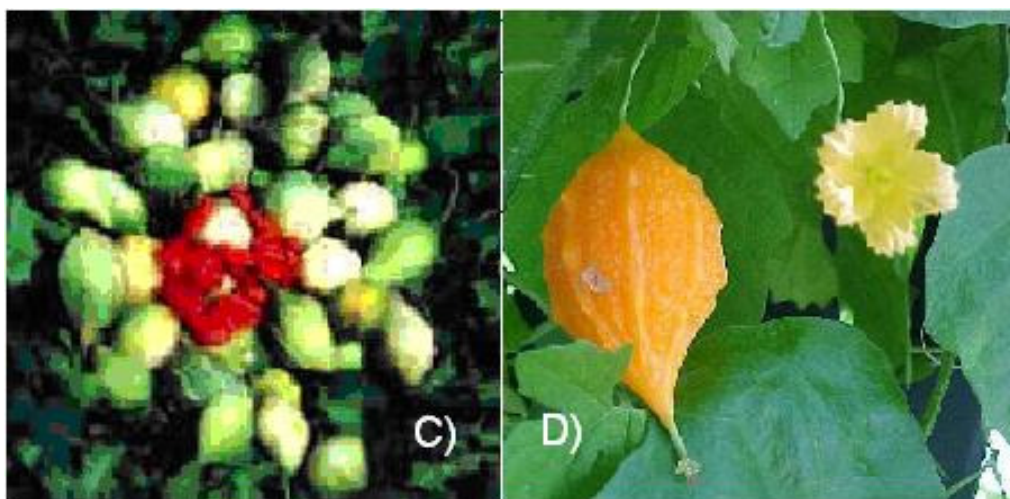


Ilustração 2: *Momordica balsamina*: C) frutos verdes e sementes com cutícula vermelha e D) a rama trepadeira com um fruto maduro.

1.3 - Aplicações na medicina tradicional da espécie *Momordica balsamina*

A *Momordica balsamina* é uma das espécies vegetais mais utilizadas pelos nativos, em particular, na região austral de África [7]. O seu potencial terapêutico na cura de doenças faz dela uma das espécies da família *Cucurbitaceae* mais usadas pelos curandeiros e ervanários, apesar de grande parte da sua actividade curativa não ter sido cientificamente demonstrada [9].

No entanto, o extracto metanólico das folhas de *Momordica balsamina* deu resultados positivos como antibióticos no teste contra 60% dos microrganismos testados. O mesmo extracto das folhas revelou uma acção hipoglicémica quando foi testado em coelhos. A infusão da planta mostra efeitos anti-maláricos moderados, mas não consistentes [3].

É consensual para os habitantes africanos que as propriedades terapêuticas desta espécie variam em função dos solos, sendo a mesma espécie diferenciada na sua actividade segundo a zona onde cada planta cresce. Acredita-se, porém, que a *Momordica balsamina*, independentemente da sua origem territorial, é uma planta que, quando consumida, produz no organismo efeitos preventivos contra possíveis doenças infecciosas; as crianças que consomem regularmente a *Momordica balsamina* como dieta suplementar, além de crescerem saudáveis, apresentam dentes e unhas fortes.

O suco verde extraído por trituração das folhas de *Momordica balsamina* é usado como anti-inflamatório, um anti-emético, e ainda para a cura de certas úlceras e infecções [10]. Tal como o chá das folhas, o suco da trituração das folhas pode ser usado para ajudar as pessoas que sofrem de distúrbios de sono, para ajudar a recuperação dos convalescentes, etc.[6].

O suco dos frutos quando administrado (por via oral) em pacientes que sofrem de diabetes desenvolve a tolerância normal ao açúcar pela actividade hipoglicémica através do estímulo da secreção da insulina para a redução da glicose no sangue [11,12]. Mais ainda, o suco dos frutos é usado como um antidepressivo e para aliviar os problemas hepáticos, reumáticos, gota, etc. [12,13].

Os curandeiros e os ervanários fazem diversos preparados a partir das folhas, dos frutos, das sementes, das raízes e da rama, principalmente moídos a seco. As sementes secas, trituradas e misturadas em óleo, são usadas para o tratamento de hemorróides, úlceras e queimaduras. As raízes, por sua vez, entram na preparação tradicional para a cura de icterícia e problemas hepáticos [11].

No Japão e na Índia usa-se a *Momordica balsamina*, triturada em mistura com outras plantas, para tratamento de infecções cutâneas. Para as

mulheres congolosas e nigerianas a fruta seca e triturada desta planta é o ingrediente principal do preparado local para a cura de cólicas. Os camponeses das regiões tropicais africanas misturam as folhas e as flores desta espécie com a erva para o gado (feno) para desparasitar os animais e, também, para ajudar a recuperar os animais quando ficam debilitados [14-16].

A UNICEF encoraja as famílias dos países em via de desenvolvimento, principalmente com problemas nutricionais, a reforçarem a dieta alimentar dos seus filhos com algumas espécies vegetais sendo uma delas a *Momordica balsamina* [16].

Na região austral da África a *Momordica balsamina* é conhecida por Kakana, ou Kekana, e tem diversas aplicações. Em Moçambique, por exemplo, principalmente na parte sul país, onde é mais conhecida esta planta, faz parte da dieta alimentar e é amplamente utilizado para fins terapêuticos. As folhas e as partes tenras da rama são cozinhadas, condimentadas com amendoim e comidas com arroz ou massa de milho. A água da fervura das folhas, apesar do seu sabor amargo a quinino, toma-se periodicamente para a purificação do sangue, a limpeza do tracto urinário contra infecções, para estimular a produção de leite das mulheres pós-parturientes, para a fortificação do corpo, etc. Este chá de kakana toma-se também para aliviar distúrbios digestivos, para baixar febres e para fazer a desintoxicação alimentar [16].

Os frutos verdes, conhecidos como tiakana, são descaroçados e fritos com ovos e cebola, geralmente para serem comidos com pão ao pequeno-almoço. Na África do Sul, a sua utilização estende-se à indústria de cosméticos, como aditivo, em combinação com outros produtos. Existem formulações de cosméticos comercializados com o nome kekana [10,16].

1.4 - Pesquisa sobre a composição química da *Momordica balsamina*

As pesquisas bibliográficas realizadas incidiram sobre a composição química da *Momordica balsamina* e, devido a exiguidade de informação química sobre esta espécie, as pesquisas foram expandidas para a família *Cucurbitaceae* em geral. Além da caracterização estrutural dos componentes

químicos, foram consideradas as suas aplicações, principalmente as terapêuticas, e o seu papel fisiológico na espécie.

1.4.1 - Compostos alifáticos

No reino vegetal existe uma larga variedade dos compostos alifáticos tais como hidrocarbonetos, álcoois e ácidos gordos, na forma livre e esterificados. Entre os compostos das plantas, são relativamente conhecidas mais variedades de ácidos gordos e na maioria dos casos em forma de ésteres, principalmente, como triglicerídeos e ésteres de esteróis. Os ácidos gordos, palmítico (16:0), oleico (18:1 (Z9)) e linoleico (18:2 (Z9, Z12)), são os que geralmente ocorrem em quantidades mais elevadas nas espécies vegetais [17]. Porém, alguns ácidos gordos insaturados, como por exemplo o ácido linoleico e o ácido oleico, são quimicamente instáveis, oxidam-se facilmente por reacções de adição.

Das sementes de *Momordica balsamina* pode-se extrair até 32% de óleo purgante [10,16]. O óleo purgante apresenta-se sob aspecto castanho avermelhado claro e é constituído por 46,7% de ácido α -eleosteárico, 29,8% de ácido esteárico, 15,8% de ácido oleico e 7,7% de ácido linoleico [16]. A Ilustração 3 mostra as estruturas dos ácidos gordos identificados na *Momordica balsamina*.

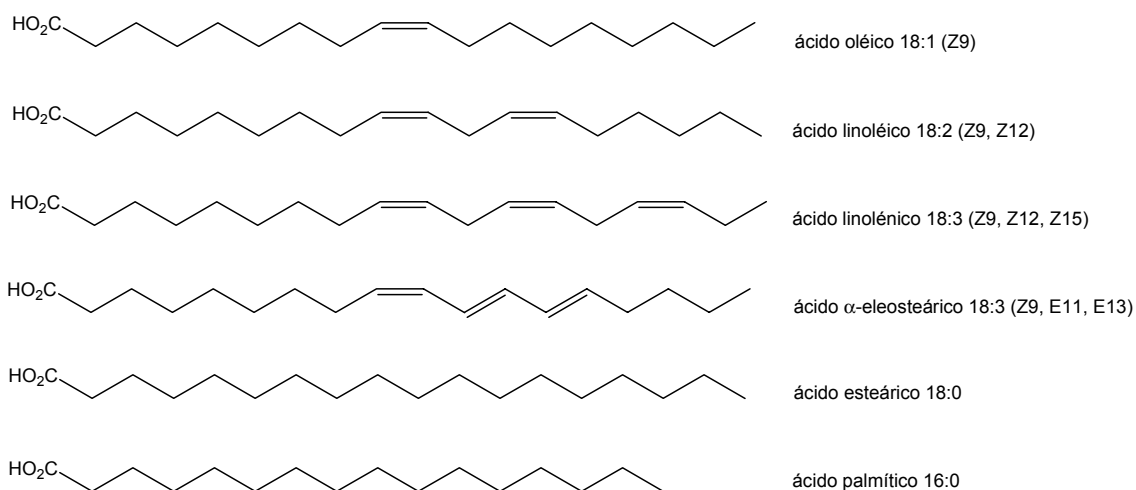


Ilustração 3: estruturas de alguns ácidos gordos identificados na espécie *Momordica balsamina*

Os ácidos gordos são componentes estruturais e determinantes da resistência à oxidação dos lípidos [18]. Em tecidos vivos, os lípidos constituídos

de ácidos gordos saturados são relativamente estáveis. A autooxidação dos lípidos, entre outros factores, depende principalmente da composição dos ácidos gordos, tendo em conta o número de grupos alílicos de ligações duplas [18]. A série de ácidos C₁₈ exemplifica a tendência geral de autooxidação pelo aumento de grupos alílicos e a subsequente redução do tempo (Tabela 1).

Nome do ácido	Estrutura do ácido	Grupos alílicos	Período (horas)	Taxa de oxidação
Esteárico	18:0	0	0	1
Oleico	18:1 (9)	1	82	100
Linoleico	18:2 (9,12)	2	19	1.200
Linolénico	18:3 (9,12,15)	3	1,34	2.500

Tabela 1: exemplo da taxa de oxidação de grupos alílicos de ácidos gordos.

Todavia, as plantas e os animais têm necessidades de complementos de antioxidantes e de enzimas tais como a *glutathione peroxidase* e a *superoxidase dismutase* para a prevenção efectiva da oxidação dos lípidos. Na prática, o processo de autooxidação dos lípidos insaturados por peroxidação pode ser retardado pela adição de D-glucose oxidase ou por conservação dos lípidos em ambientes escuros com baixas temperaturas. Contudo, em frutos e vegetais que contêm a enzima *lipoxigenase* os métodos acima referidos não são funcionais, salvo se a enzima for inactivada pelo processo de derivatização [18].

1.4.2 - Terpenos e terpenóides

Os terpenos são formalmente considerados como produtos provenientes da condensação de duas ou mais unidades de isopreno (metilbutadieno) [19]. Os terpenóides são terpenos substituídos por um ou mais átomos de oxigénio na forma de grupos funcionais álcoois, aldeídos, cetonas e ácidos [20]. Estes compostos ocorrem em várias espécies vegetais [21]. A classificação dos terpenos é feita de acordo com o número de unidades isoprénicas que formam a sua estrutura, sendo nomeadamente: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos, tetraterpenos e politerpenos,

constituídos a partir de duas até seis, oito e mais de oito unidades isoprénicas, respectivamente [22,23].

Os óleos essenciais, também conhecidos como óleos voláteis, óleos etéreos ou simplesmente essências, e obtidos por destilação do material vegetal, são misturas complexas de substâncias voláteis lipofílicas e odoríferas, constituídas principalmente por compostos isoprénicos até C₂₀ [24]. Estes óleos vegetais voláteis são ricos em monoterpenos e derivados monoterpénóides de tipo hidroxilados e, também, de alguns sesquiterpenos [21]. Baseado nos óleos de eucaliptos, Penfold e Willis [25], classificaram os óleos essenciais em função do seu uso, segundo os seus componentes principais: **a)** os óleos medicinais, cujo componente principal é o cineol (mais de 70%), são destinados à fabricação de produtos farmacêuticos (inalantes nasais, produtos de higiene bucal ou, simplesmente, como sinergistas desses medicamentos); **b)** os óleos industriais têm como componente principal o felandreno (35-80%), que é usado como solvente e matéria-prima na produção de desinfetantes e desodorizantes, e a piperitona (40-60%), a partir do qual é obtido o timol (usado como preservativo para gomas, pastas, colas, etc.) e o mentol (usado como aromatizante de produtos medicinais); **c)** os óleos para perfumaria apresentam o citronelal, o acetato de geranilo ou o citral como componentes principais, usados na preparação de produtos cosméticos e de higiene pessoal.

Doran [26], considera que existe uma maior variação genética natural no rendimento em óleos essenciais do que em relação à sua composição química. Com isso, segundo o autor, seria mais fácil trabalhar-se no sentido do aumento da quantidade de óleos do que na tentativa de se obter um maior teor do componente químico desejado no óleo. Todavia, de acordo com Simões e Spitzer [24], os óleos essenciais obtidos de diferentes órgãos de uma mesma planta podem apresentar composições químicas, aspectos físico-químicos e odores distintos. Os componentes atingem valores variáveis no óleo essencial. Segundo Croft et al [20], o α -pineno, por exemplo, pode chegar até três quartos de massa na parte volátil do óleo de resina.

Os terpenos e seus derivados voláteis são elaborados e libertados pelas plantas como meio de defesa contra predadores e infestantes, por repulsão

[27,28]. Takabayashi et al [29], por exemplo, refere que as espécies da família *Cucurbitaceae* quando são infestadas, geralmente por aracnídeos, elevam os níveis de monoterpenos β -ocimeno e 4,8-dimetil-1,3E,7-nonatrieno até 25 e 54%, respectivamente, do total dos compostos voláteis libertados. Enquanto que o β -ocimeno é, particularmente, um monoterpene típico da família *Cucurbitaceae*, o monoterpene 4,8-dimetil-1,3E,7-nonatrieno, tal como o sesquiterpene 4,8,12-trimetil-1,3E,7E,11-tridecatetraeno, é comum em muitas espécies vegetais [27,30]. A Ilustração 4 exhibe estruturas de alguns monos e sesquiterpenóides comuns identificados na família *Cucurbitaceae*.

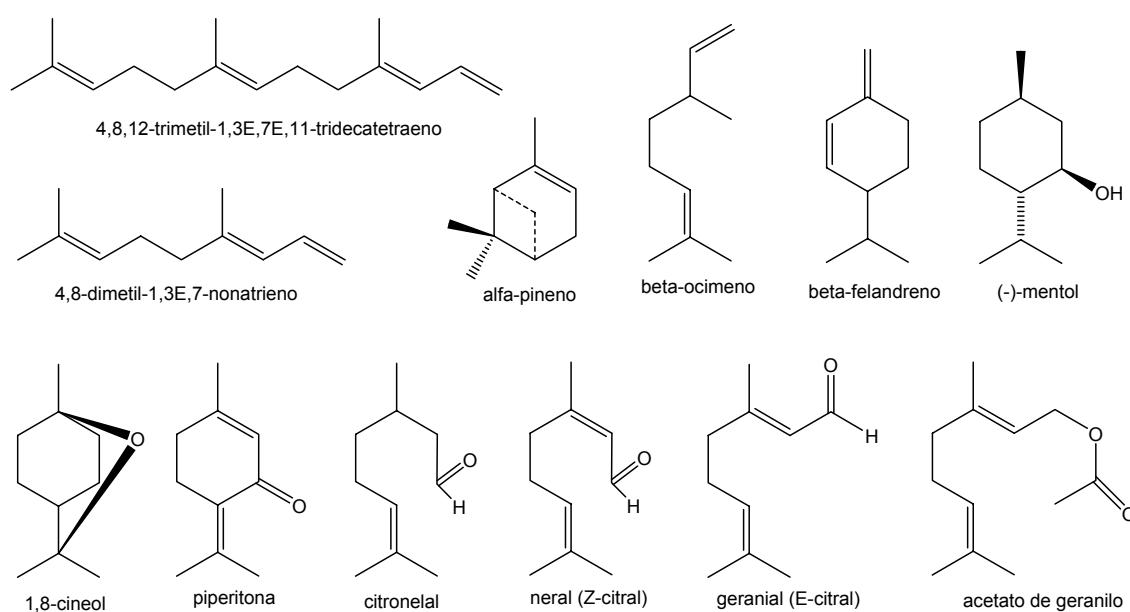


Ilustração 4: estruturas de mono e sesquiterpenóides comuns identificados na família *Cucurbitaceae*

Os compostos semioquímicos, que transportam sinais de um organismo para outro, são principalmente terpenóides (Ilustração 5) e podem ser agrupados em duas classes: a) feromonas, usadas para a comunicação intraespecífica entre os indivíduos como, por exemplo, o d-limoneno usado como feromona para o alarme e o lineatino, para a agregação dos indivíduos, em térmitas; b) aleloquímicos, empregados para a comunicação de indivíduos de espécies diferentes e podem ser alomonas, sinomonas e cairomonas. As alomonas beneficiam as espécies que as sintetizam; o d-limoneno e a cânfora,

por exemplo, são sintetizados pelas plantas contra os insectos; as sinomonas beneficiam as duas espécies, como acontece com o geraniol produzido pelas rosas para atrair os insectos para a polinização. São conhecidos poucos exemplos de cairomonas, que beneficiam apenas as espécies que não os produzem como, por exemplo, o nepetalactona de óleo da planta de gatos (*Nepeta cataria*) [31].

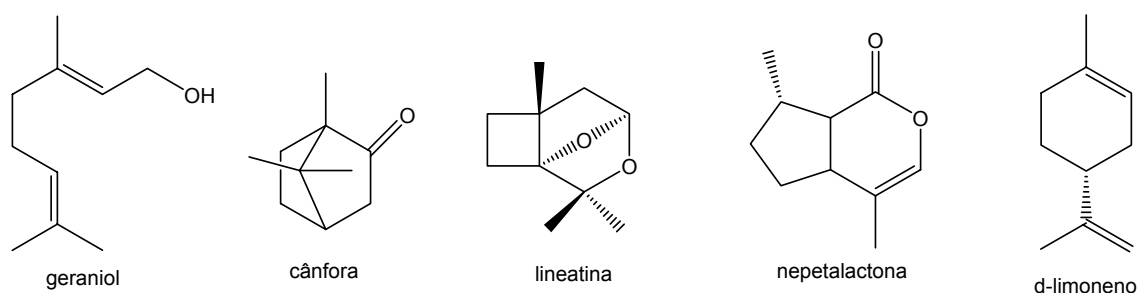


Ilustração 5: estruturas de monoterpenóides usados como feromonas e/ou semioquímicos.

Os **diterpenos** e os seus derivados (diterpenóides) formam no tecido vegetal cadeias abertas, monocíclicas, dicíclicas e tricíclicas [30]. Os ácidos gordos diterpenóides são constituintes principais da resina vegetal aos quais também se juntam outros derivados diterpenóides (de tipo álcool e aldeído) e os próprios diterpenos, em pequenas quantidades. Os ácidos da resina são geralmente diterpenóides tricíclicos monocarboxilados [30,32] com cadeias insaturadas dienóicas. Estes ácidos diterpenóides podem ser distinguidos em dois grupos (Ilustração 6): o tipo pimárico, constituído por substituintes metilo e vinilo na posição C-13; e tipo abiético, caracterizado por apenas um grupo isopropilo na mesma posição C-13 e com a particularidade de possuir a cadeia dienóica com ligações duplas conjugadas [32].

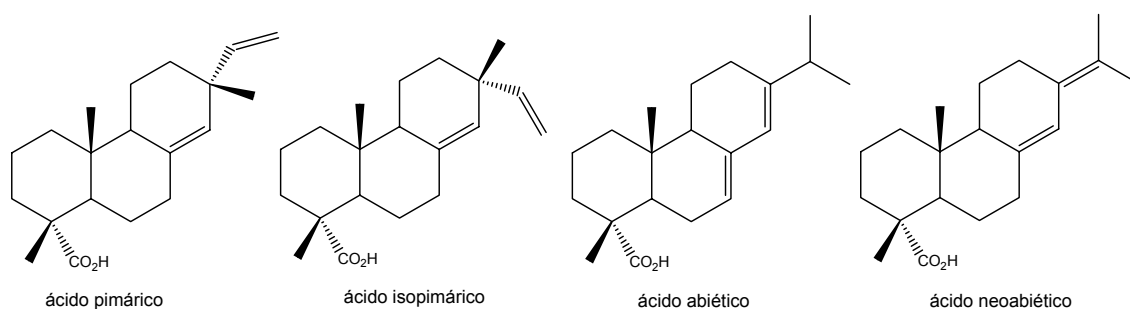


Ilustração 6: alguns ácidos comuns da resina derivados de diterpenos tricíclicos de tipo pimárico e abiético, segundo Soltes e Zinkel.

A resina é uma secreção sintetizada pelas plantas e libertada, em casos de lesões, como uma barreira física contra os organismos infecciosos. Contém diterpenóides antibacterianos, antifúngicos e, outros, que conferem sabor desagradável ao paladar contra herbívoros e insectos [31].

Existem vários diterpenóides fisiológicos cujas ocorrências dependem das espécies. Eis alguns exemplos (Ilustração 7): o ácido giberélico controla o crescimento de plantas; o testosterona e a estrona, hormonas sexuais masculina e feminina em mamíferos [23], etc. O neocembreno-A é usado como feromona em térmitas para a sinalização de rotas. O retinol (vitamina A), precursor de pigmentos detectores da luz para visão [23], é um álcool diterpenóide monocíclico presente no fruto imaturo e nas partes verdes da *Momordica balsamina* [16].

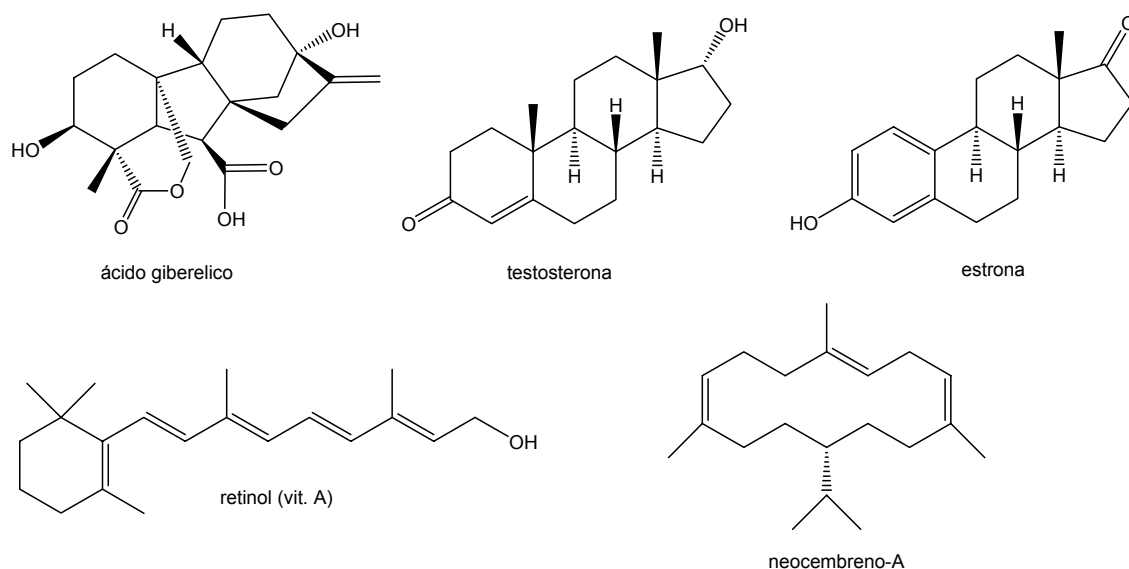


Ilustração 7: alguns exemplos de estruturas de diterpenóides fisiológicos.

Os **triterpenóides** são derivados oxigenados de triterpenos e constituem um dos grupos dos compostos naturais mais vastos, formando diversos esqueletos de tipos pentacíclicos (lupano, oleanano, ursano, etc.) e de tipos tetracíclicos semelhantes ao de esteróis (dammarano, eufano, etc.) [31,33]. A maioria dos álcoois triterpenóides tem um sistema de anéis pentacíclico e um grupo hidroxilo na posição C-3 [31,33]. Este tipo de terpenóides existe nas

plantas na forma livre e esterificado (geralmente ligados com um grupo glicosilo ou fenilo) [33,34]. A Ilustração 8 mostra alguns exemplos de álcoois triterpenóides pentacíclicos e tetracíclicos.

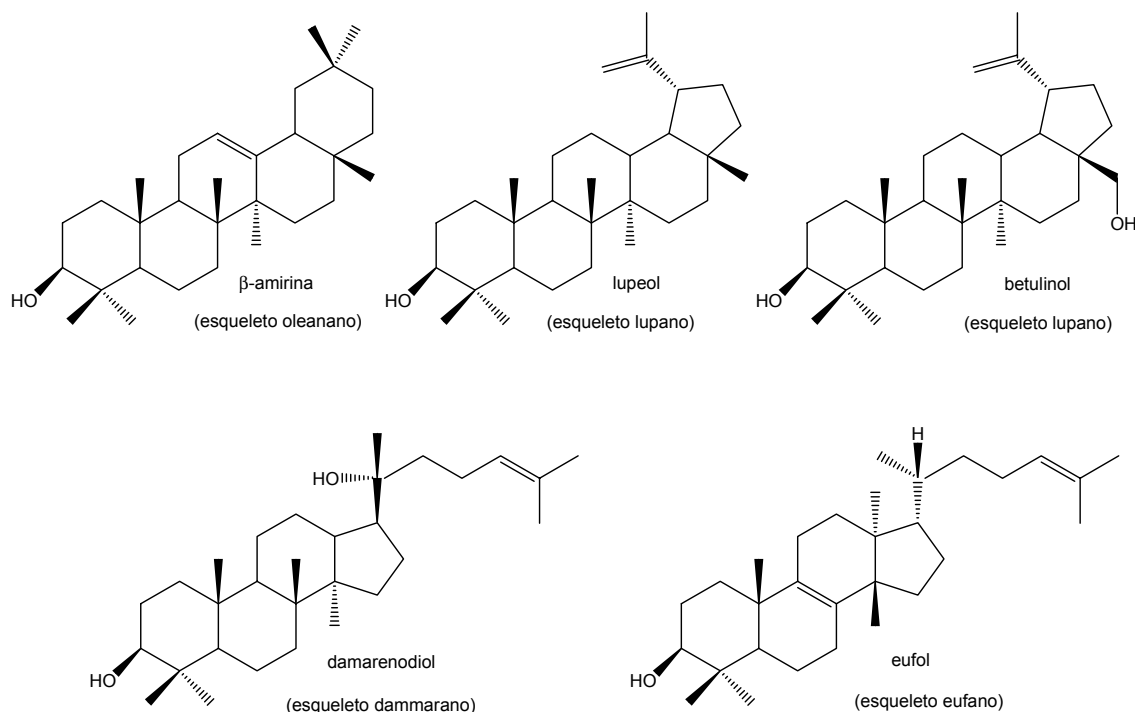


Ilustração 8: exemplos de esqueletos de álcoois triterpenóides pentacíclicos (oleanano e lupano) e tetracíclicos (demarano e eufano).

O betulinol (ou betulina), o precursor biossintético do anticarcinogénico ácido betulínico (Ilustração 9), é o triterpenóide mais abundante na natureza [35]. O ácido betulínico é um bioactivo forte e selectivo contra as células de neuroblastoma em humanos [34,36], induz a morte as células carcinogénicas sem afectar as normais [37] e não manifesta efeitos colaterais. O ácido betulínico e seus derivados, e principalmente o ácido di-hidrobetulínico, inibem a replicação do vírus HIV nas células infectadas impedindo a sua proliferação [37]. Estas características fazem do ácido betulínico o melhor anticarcinogénico [36] e forma com os seus derivados a nova classe de composto protectores do sistema imunológico humano[38].

Os compostos lupeol e β-amirina cujos esqueletos de tipo lupano e oleanano, respectivamente (Ilustração 9), são outros álcoois triterpenóides mais comuns no reino vegetal [32,39]. O lupeol e os seus derivados 3-O-acilos

(acetato, docosanoilato, linoleato, palmitato, etc.) têm uma toxicidade muito fraca para mamíferos e, em doses de 25 até 200 mg/Kg, produzem efeitos anti-inflamatórios [39]. É um inibidor competitivo de tripsina e quimiotripsina [40], enzimas que hidrolisam proteínas em peptonas. Em casos de artrite a acção do lupeol é semelhante à do ácido acetilsalicílico (AAS), mas o lupeol não causa úlceras gástricas [41]. Esta observação sugere que o lupeol actua numa via diferente do mecanismo de acção de AAS e, portanto, não inibe a actividade de ciclooxigenase e a síntese de prostaglandinas [41]. A actividade citotóxica dos triterpenóides pentacíclicos também tem sido demonstrada pelo ácido ursólico [42] e ácido oleanólico [24]. A Ilustração 9 representa os triterpenóides pentacíclicos de tipos oleanano e lupano comuns na família *Cucurbitaceae* [14,28].

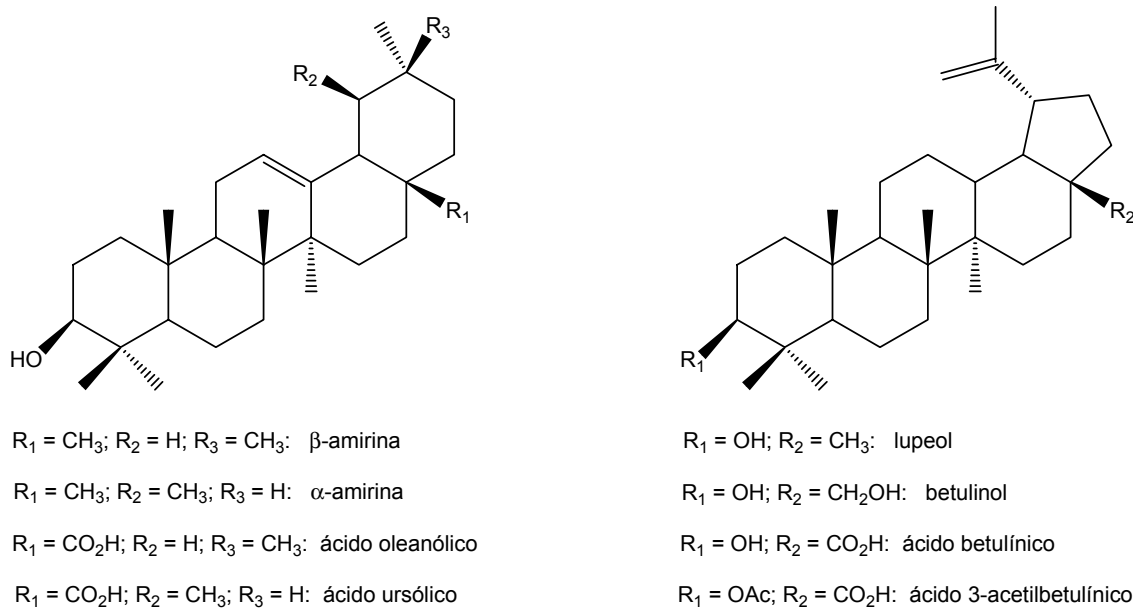


Ilustração 9: exemplo de triterpenóides de tipos oleanano e lupano comuns na família *Cucurbitaceae*.

Sem especificar as quantidades e as composições, alguns trabalhos publicados [10,16] revelam que as diversas partes da *Momordica balsamina* contêm um óleo aromático altamente volátil, um outro óleo não volátil, uma resina, algumas saponinas e alguns alcalóides, estando o triterpenóide momordicina em maior quantidade. Todas as partes da *Momordica balsamina*

apresentam um sabor amargo forte característico da momordicina [10]. O momordol, um álcool triterpenóide monocíclico, e um grupo de triterpenóides pentacíclicos de tipo ursano (Ilustração 10), constituído por momordicina, momordicinina e momordicilina, foram obtidos de um extracto metanólico de frutos de *Momordica balsamina* [43]. Pela sua grande variedade pode se deduzir que a diversidade estrutural dos triterpenóides está relacionada com as funções fisiológicas para as quais estes compostos são sintetizados pelas espécies.

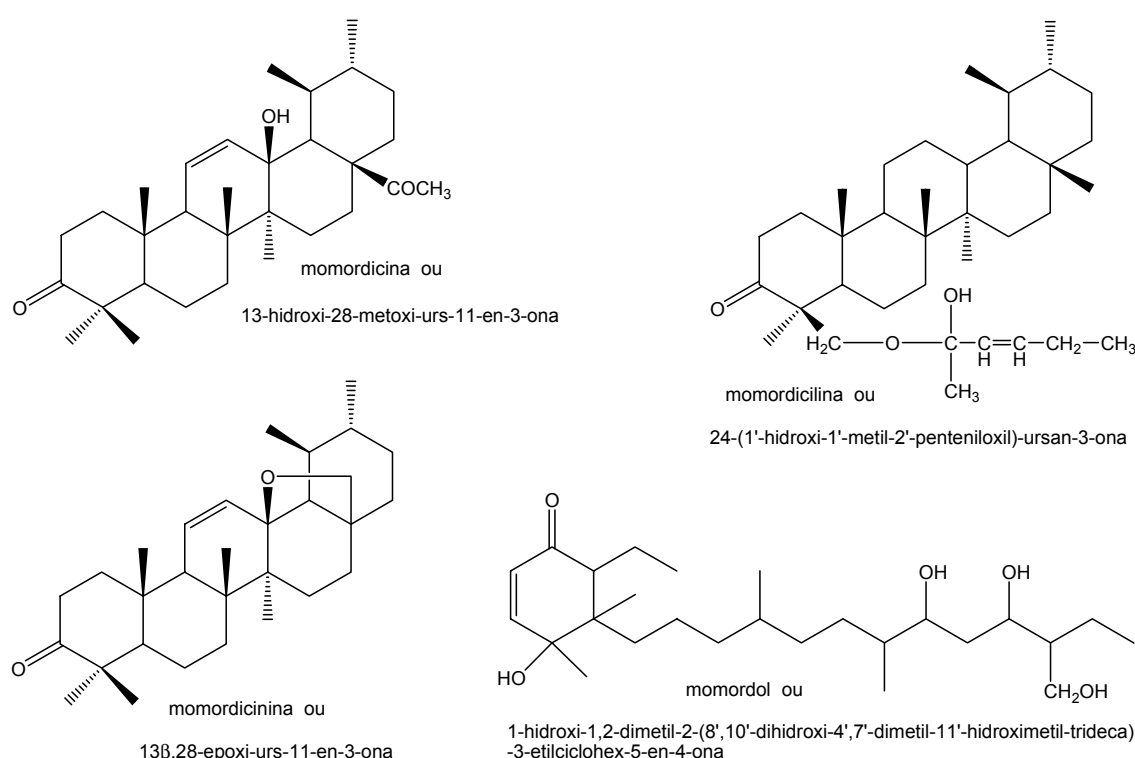


Ilustração 10: triterpenóides obtidos do extracto metanólico de frutos de *Momordica balsamina*

Os **esteróides** são compostos por uma estrutura semelhante à dos triterpenóides, constituídos por um sistema de anéis tetracíclico típico [44]. Os fitosteróis possuem entre 27 a 32 átomos de carbono, têm um grupo hidroxilo na posição C-3, dois grupos metilos nas posições C-10 e C-13 e uma cadeia lateral alquilo na posição C-17 [42]. Podem incorporar grupos metilo e ligações duplas em várias posições [33]. Também podem ocorrer em forma de ésteres de ácidos gordos como, por exemplos, o linoleato de β-sitosterilo [44]. O β-

Os **cucurbitanos** constituem um grupo de triterpenóides tetracíclicos típicos das espécies da família *Cucurbitaceae* referidos, principalmente, como anti-tumorais [45,46]. Em geral os triterpenóides de tipo cucurbitano têm em comum o esqueleto constituído por um núcleo tetracíclico semelhante ao de esteróides (1,2-ciclopentano-peridrofenantreno, designado por gonano ou esterano) e substituído por dois grupos metilos na posição C-4, outros grupos metilos nas posições C-9, C-13 e C-14 e uma cadeia lateral alquila em C-17 (Ilustração 12).

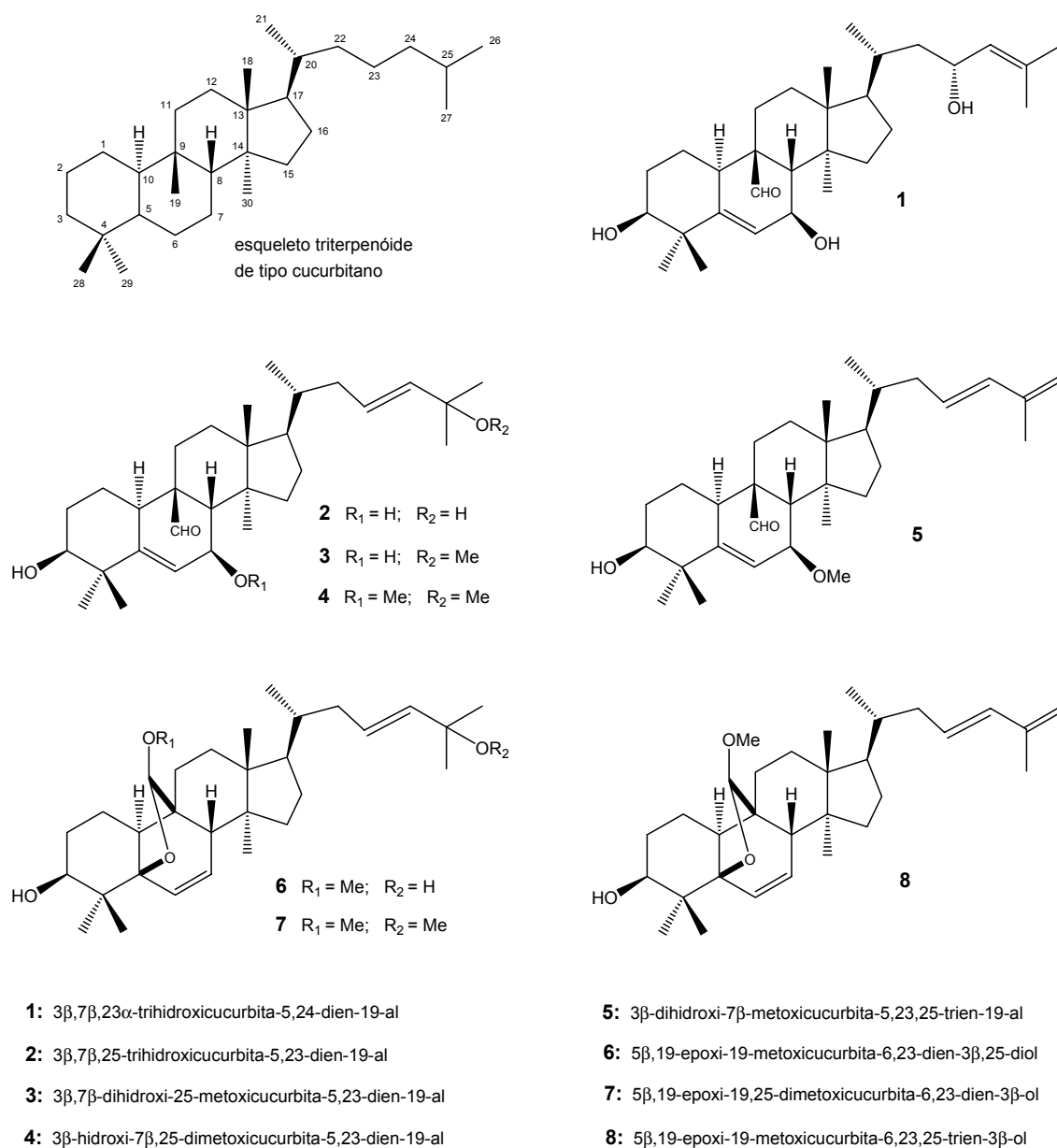
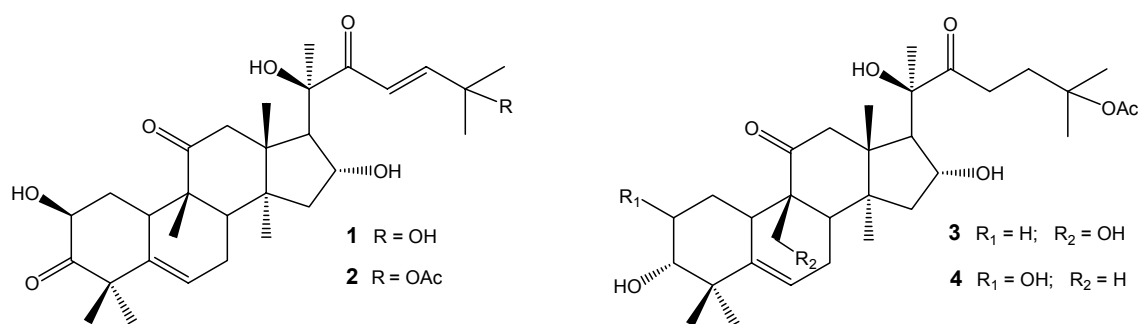


Ilustração 12: triterpenóides de tipo cucurbitano isolados da *Momordica balsamina*.

Uma das diferenças entre estes compostos e os esteróides é o posicionamento de grupo metilo do C-9 em C-10, para os esteróides [46,47]. A Ilustração 12 expõe alguns triterpenóides tetracíclicos de tipo cucurbitano isolados da *Momordica balsamina* [44,48].

As **cucurbitacinas** são derivados bioactivos de triterpenóides tetracíclicos importantes que, tal como os cucurbitanos, ocorrem essencialmente na família *Cucurbitaceae* [44,46] e podem ser encontradas, em quantidades vestigiais, em poucas outras espécies [44]. Têm uma extensa bioactividade [45,49] e são conhecidas por serem extremamente amargos, pela sua alta toxicidade para maioria dos organismos (incluindo o homem) [45] e participam directa ou indirectamente nos processos de defesa da planta contra os predadores, por acções de simples repulsão ou podendo causar a morte do individuo [50]. Existem muitas variedades de cucurbitacinas (Ilustração 13) que diferem entre si quanto à ocorrência de certos tipos de ligandos e a presença de ligações duplas em determinadas posições [51].



- 1 cucurbitacina D ou 2 β ,16 α ,20 β ,25-tetra-hidroxicucurbita-5,23-dien-3,11,22-triona
 2 cucurbitacina B ou 2 β ,16 α ,20 β -trihidroxi-25-acetocucurbita-5,23-dien-3,11,22-triona
 3 di-hidrocucurbitacina C ou 3 α ,16 α ,19,20 β -tetra-hidroxi-25-acetocucurbita-5-en-11,22-diona
 4 di-hidrocucurbitacina Q1 ou 2 β ,3 α ,16 α ,20 β -tetra-hidroxi-25-acetocucurbita-5-en-11,22-diona

Ilustração 13: exemplos de cucurbitacinas, triterpenóides típicos da família *Cucurbitaceae*.

As cucurbitacinas são fagostimulantes de escaravelhos *Luperine chrysomelid*, única espécie conhecida capaz de ingerir cucurbitacinas [44]. A

larva de *Luperine chrysomelid* consome as cucurbitacinas e converte o resto não excretado em glucósidos de di-hidrocucurbitacinas por processos de hidrogenação, acetilação e glicolisação [52,53]. Por outro lado, os fitosteróis como campesterol, sitosterol e estigmasterol têm um grupo metilo ou etilo na cadeia lateral que é necessária desalquilar, para convertê-los em colesterol [54,55]. Portanto, existe maior probabilidade de uma di-hidrocucurbitacina ser usada como precursora de colesterol ou substituí-lo directamente numa estrutura de lípidos [55].

A acção toxicológica das cucurbitacinas varia em função da sua estrutura. As cucurbitacinas, como B e D (Ilustração 13), que possuem na cadeia lateral um grupo funcional Δ^{23} -22-oxo, por exemplo, actuam como antagonistas da acção dos receptores de ecdisteroide [56,57] e isso pode impedir alguns processos biológicos vitais como a gametogénese [58], a diferenciação neuronal e a muda em insectos [59]. Essas cucurbitacinas, do tipo Δ^{23} -22-oxo, quando são convertidas em di-hidrocucurbitacinas, como C e Q1 (Ilustração 13), não antagonizam com a hormona ecdisteroide [56] e podem trazer benefícios nutricionais e ser usadas como esteróides estruturais e hormonais importantes [55]. Estas podem ser as razões porque muitas cucurbitacinas são permanentemente sintetizadas pelas *Cucurbitaceae*.

Os **politerpenos** e os seus derivados (poliprenois) são os terpenóides com mais de oito unidades de isopreno encontrados em plantas. Os exemplos desta família dos compostos são os betulaprenois, ou seja, poliprenois constituídos por seis a nove unidades isoprénicas [17,37].

1.4.3 - Compostos fenólicos ou polifenóis

Os compostos fenólicos têm em comum, pelo menos, um anel aromático hidroxilado. Ocorrem predominantemente acoplados com açúcares (de mono a oligossacáridos), com ácidos glucurónico ou galacturónico, ou com outros anéis aromáticos hidroxilados [60]. Estes compostos desempenham várias funções fisiológicas vitais, nomeadamente, a protecção contra as radiações

ultravioletas, e contra predadores e organismos patogénicos. Contribuem ainda para a coloração e facilitam a reprodução e o crescimento das plantas [60]. Existe uma grande variedade dos compostos fenólicos nas plantas e, segundo as estruturas dos seus esqueletos carbónicos, pode ser agrupada em classes de ácidos fenólicos e seus derivados, flavonóides, lenhanos, estilbenos, taninos e lenhinas. A acção medicinal do suco obtido de frutos da *Momordica balsamina* resulta de diferentes glicosídeos de saponinas. O fruto imaturo e as folhas jovens da *Momordica balsamina* são uma excelente fonte de vitamina C [16], um antioxidante requerido na corrente sanguínea para a prevenção de arteriosclerose [61].

Os antioxidantes naturais que contêm grupos fenólicos formam radicais que são estabilizados pelo sistema de ressonância aromática. Estes radicais estáveis, contrariamente aos radicais livres peroxi (ROO°), alcoxi (RO°) e alquilo (R°) formados durante as etapas de propagação (ou derivatização por degradação de mono-hidroperóxidos), não capturam os átomos de H de um grupo metileno activado de um composto olefínico e, portanto, não podem iniciar a autoxidação.

O ácido rosmarínico e seus derivados (Ilustração 14) são exemplos de antioxidantes fenólicos. O ácido rosmarínico é um éster dos ácidos caféico e 3,4-di-hidroxifenilacético. Ocorre em algumas espécies das famílias Boraginaceae, Lamiaceae, Cucurbitaceae e, também, de certas plantas superiores. É um agente adstringente, antioxidante, anti-inflamatório, antimutagem, antibacteriano e antivírus. Também é usado na terapia contra a infecção de herpes simples. Forma diversos derivados conhecidos pelas suas actividades biológicas, sendo o mais importante de todos, o seu dímero, o ácido litospérmico B. Fica normalmente acoplado a dois aminoácidos: a fenilalanina, na parte do ácido caféico e a tirosina, na parte do ácido di-hidroxifenilacético [62].

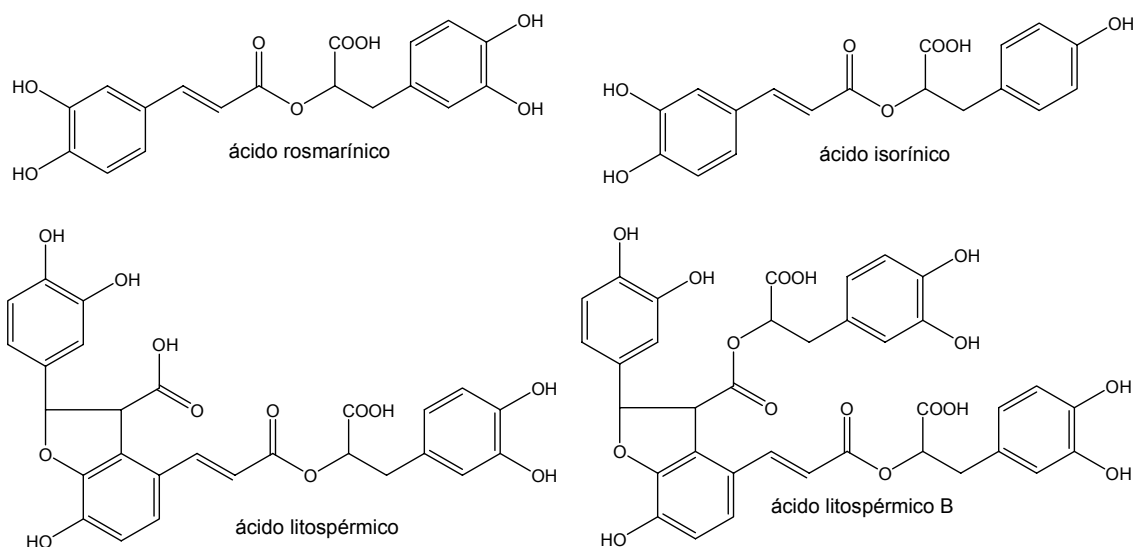


Ilustração 14: ácido rosmarínico e seus derivados como exemplos de antioxidantes fenólicos.

2 – MÉTODOS DE EXTRACÇÃO DE COMPOSTOS

2.1 - Considerações gerais

Na generalidade, a extracção é uma transferência selectiva de um ou mais compostos de um líquido (normalmente água) para outro líquido imiscível (de preferência orgânico) ou de sólido para líquido [63]. O processo de extracção baseia-se, normalmente, no equilíbrio por distribuição de um ou mais compostos entre duas fases, uma das quais, a *fase extractora* (orgânica), constituída por um ou mais solventes que extraem os compostos da outra fase, a *fase da amostra* [63]. Portanto, a extracção é uma operação de transferência de massa que pode ser feita entre dois líquidos, entre um líquido e um sólido e, também, envolvendo fases gasosas [64].

Por analogia, nos processos cromatográficos formam-se equilíbrios de fases que envolvem um ou mais compostos. Durante a eluição, uma das fases, a *fase móvel*, desloca-se relativamente à outra, a *fase estacionária*.

Independentemente da técnica que se pretende aplicar, é crucial referir alguns factores importantes que de uma forma directa, ou indirectamente, interferem o processo de extracção. A considerar: a solubilidade do extracto em relação à solubilidade dos restantes componentes da amostra, a polaridade e o pH do extracto, imiscibilidade das fases, toxicidade do solvente, etc.

Para qualquer que seja o processo de extracção o soluto migra parcialmente duma fase para outra (fase extractora), ficando distribuído entre as duas fases, em proporções definidas e estabelecendo, por isso, um sistema dinâmico de equilíbrio [65]. A extensão do equilíbrio é função das propriedades do composto e como este interage com cada uma das fases.

Tendo em referência um sistema líquido, no equilíbrio entre duas fases imiscíveis de um soluto que não esteja envolvido em nenhuma reacção química, este reparte-se pelos dois solventes de tal maneira que a razão das suas concentrações é constante, para cada temperatura, independentemente do valor delas [64].

$$K_D = \frac{[X_2]}{[X_1]} \cong K_D = \frac{n_2}{n_1} \times \frac{V_1}{V_2} \quad \text{Equação 1}$$

Analiticamente, depreende-se que a eficácia de uma extracção, entre outros factores, depende do *coeficiente de distribuição* ou de *partição* (K_D) que é a razão do soluto distribuído entre as duas soluções, ou seja, a concentração do soluto na solução extractora (X_2) sobre a sua concentração remanescente na solução inicial (X_1). Portanto, a expressão explícita, em parte, algumas propriedades que favorecem o processo de extracção tais como a capacidade extractiva, a interacção entre as fases, etc. Por outras palavras, a expressão evidencia a necessidade de extensão do equilíbrio para a solução extractora de forma a obter maior número de moles de soluto (n_2) em menor quantidade possível de solvente (V_2).

Devido ao equilíbrio de distribuição dos compostos entre os dois solventes é frequente o uso de processos contínuos de extracção para favorecer a eficiência separativa e, por outro lado, são adaptados equipamentos que permitam [64,65]:

- Maior superfície de contacto entre as fases,
- Longo tempo de contacto entre as fases,
- Grande fluxo em volume do solvente extractor (orgânico) sobre o solvente da amostra (água) e
- Alto coeficiente de partição ou distribuição (K_D).

$$K_D = \frac{\text{g/ml de soluto na fase orgânica}}{\text{g/ml de soluto na fase aquosa}}$$

Os extractos preparados da *Momordica balsamina* foram antecipadamente submetidos a sililação para em seguida serem levados a análise por GC-MS. A derivatização é um processo de conversão de grupos funcionais orientada para uma finalidade que se pretende dos compostos, nomeadamente: o aumento da estabilidade, a alteração da volatilidade, a indução de quiralidade (formação de centros quirais), a indução de uma fragmentação específica, a inserção de cromóforos em fracções, o aumento da sensibilidade de detecção para certos equipamentos, etc.

A derivatização por sililação dos extractos é um processo de protecção por substituição dos grupos OH's (em ácidos e álcoois) com grupos trimetilsililo

(TMS), convertidos em ésteres e éteres trimetilsilílicos. Neste caso a silição dos grupos OH's foi feita para incrementar a volatilização dos compostos.

2.2 - A escolha de solventes

A escolha de solventes para uma determinada extracção é baseada na sua maior afinidade com a amostra [63]. O tipo de solvente usado numa extracção produz um extracto específico. Portanto, cada solvente repercute directamente sobre a composição do extracto e o rendimento do processo extractivo [66].

É fundamental que os solventes (o inicial e o de lavagem) sejam, completa ou parcialmente, imiscíveis para formarem as duas fases do sistema. A eficiência da extracção depende da afinidade do soluto pelo solvente de extracção, da razão das fases e do número de extracções [64].

O solvente ideal desejado deve ser capaz de penetrar facilmente no tecido vegetal e extrair todos os componentes lipofílicos dessa matriz, ou deve ser específico, capaz de proporcionar um extracto puro simples. Porém, a maioria dos solventes tem baixo rendimento extractivo (são exemplo disso os alcanos) e os bons lipofílicos, como benzeno, diclorometano e clorofórmio, podem constituir um perigo para o ambiente, quando usados com frequência [67,68].

A acetona, composto selectivo e pouco prejudicial à saúde e ao ambiente, tem sido usado em substituição dos solventes especificamente lipofílicos, como o diclorometano, apesar de extrair também componentes mais polares, tais como simples fenóis, lenhinas e açúcares [66].

Os compostos muito polares (por exemplo, os taninos) são extraídos em solventes fortemente polares, tal como o metanol ou a mistura deste com a água [67].

Por outro lado, diclorometano, clorofórmio, éter de petróleo, éter dietílico, hexano, acetato de etilo e éter metil-tert-butilico (MTBE), são alguns solventes frequentemente usados para extracções em amostras aquosas [69].

As amostras de processos alcalinos (constituídos por sais de ácidos gordos e de resina) são, inicialmente, tratados com ácidos e, em seguida, são submetidos à extracção contínua em diclorometano e acetato de etilo até a obtenção de um filtrado com pH neutro [65,69].

2.3 - Técnicas de extracção de produtos naturais

Uma técnica apropriada para uma determinada extracção deve apresentar características de exequibilidade favoráveis (capacidade extractiva, economia de solventes, rendimento, etc.). A classificação destes processos não é uma tarefa fácil. Existem vários critérios que servem de base para a classificação das técnicas de extracção tais como, a título de exemplo, segundo Pombeiro [64]:

i) Critério “*natureza das espécies envolvidas*” que pode ser por *simples partição* de espécies neutras de átomos ou de moléculas apolares nas duas fases, por *complexação* com as moléculas de solvente (solvatação) e por *formação de pares iónicos* com as espécies existentes nas fases;

ii) De acordo com “*o modo de contacto das duas fases*”, os processos de extracção podem efectuar-se em *correntes cruzadas* e em *contracorrente*. Tanto uns como outros podem ser *contínuos* (quando o contacto entre as duas fases é feito, repetidamente, de forma cíclica) ou *descontínuos*;

iii) Um dos aspectos referenciados na caracterização das técnicas de extracção é “*a diferença de densidades entre os solventes*”. Nas extracções líquidas em corrente contínua muitos tipos de montagens são aperfeiçoados, tendo em conta casos em que o solvente extractor é mais denso e, outros, em que é menos denso que o solvente inicial da amostra. Este procedimento está orientado à adequação do equipamento ao solvente extractor, durante a lavagem da amostra (extracção de compostos); etc.

Na prática, as técnicas de extracção são aperfeiçoadas por combinação de critérios. Desta forma, os processos extractivos variam dos mais simples trabalhos mecânicos para os sistemas analíticos, mais sofisticados, utilizados para isolar compostos de misturas complexas [67]. Dependendo do caso, podem ser por exemplo:

a) O *arrastamento de vapor* – é um sistema constituído por um recipiente com água fervente que injecta vapor num outro recipiente contíguo, no qual se encontra o material botânico. Na sua passagem pelo recipiente contíguo o vapor de água fica misturado com os compostos voláteis (óleos essenciais) do material botânico [68]. Em seguida, o vapor é condensado e arrefecido, obtendo-se no final um extracto de mistura líquida de óleos essenciais, num vaso. Após algumas horas de repouso, os óleos essenciais separam-se da água, formando-se duas fases, as quais podem ser finalmente separadas [68]. É uma das vias usuais para a obtenção de produtos naturais voláteis a partir de extractos de plantas (óleos essenciais). Esta técnica é aplicável, especialmente, para compostos voláteis imiscíveis com a água.

b) A *extracção em head space* – é uma técnica apropriada para análise de pequenas quantidades dos compostos voláteis na atmosfera envolvente da amostra, para o caso do *método estático*, ou pela utilização de um sistema de trap adaptável à cromatografia gasosa, no *método dinâmico* [70]. A técnica de extracção em head space permite fazer a análise de uma porção volátil num extracto líquido ou numa matriz sólida, sem que para isso seja necessário fazer um isolamento preliminar das fracções[70,71].

c) A *extracção por fluido supercrítico* – é um processo de separação que envolve uma fase móvel extractora em condições supercríticas. A baixa viscosidade e a tensão superficial próxima do zero permitem que o fluido denso penetre facilmente nos tecidos vegetais, melhor que um líquido [72].

d) A *extracção em fase sólida* – é um processo de separação que envolve uma fase móvel líquida e uma fase estacionária sólida [71]. A fase estacionária é constituída por um pequeno disco poroso de sílica, inerte e estável, onde é retido o analito, durante a passagem (eluição) da fase móvel [73]. Esta técnica é típica para a extracção e/ou pré-concentração de fracções em matrizes complexas. É rápida, não requer grandes quantidades de solvente e pode ser facilmente programada (fazer a injeção directa no sistema cromatográfico). Tal como nos processos de cromatografia líquida, permite fazer processamentos de grande número de amostras, o emprego de variedade de tamanhos e formas e utilização de diferentes fases estacionárias,

nomeadamente [73]: fase normal (fase polar de sílica, de alumina, de magnésia, etc.), fase reversa (fase apolar de carvão activado, de silicone, etc.) e fase de troca iónica.

e) A *micro-extracção em fase sólida* – é uma variante moderna de SPE desenvolvida por Arthur e Pawliszyn [74]. É própria para gases, líquidos e sólidos em quantidades muito reduzidas e facilmente adaptável a cromatografia em coluna (HPLC e GC) [74]. Utiliza uma micro-seringa com agulha, dentro da qual se encontra uma fase extractora, uma variedade de fibras óptica de sílica fundida, para a adsorção de fracções [73]]. É particularmente muito rápido (tem a duração de 2 a 30 minutos) e não requer o uso de solventes.

f) A *extracção em microondas* – é uma das promissoras técnicas modernas, aperfeiçoadas para a purificação de produtos naturais de origem vegetal, de forma rápida e eficiente, numa matriz sólida [75]. Emprega-se quando se tem grandes quantidades de amostra e de solvente [76]. O mecanismo decorre por aquecimento uniforme, não superficial, de toda amostra colocada em frascos termorresistentes selados, em presença de solventes polares, durante alguns minutos. Podem ser usadas misturas de solventes pouco polares, tais como a de hexano com acetona a 1:1, a mistura de hexano com metanol a 1:1, etc.

g) Uma das vias alternativas para uma extracção rápida e para utilização de quantidade mais reduzida solvente, é o recurso ao sistema de *extracção por Soxtec*. Neste sistema o processo extracção ocorre normalmente numa hora. Porém, o seu rendimento no extractor é ligeiramente baixo. O processo de extracção em Soxtec é assegurado por uma espécie de câmara de refluxo. A amostra, dentro de um cartucho poroso, é submersa num solvente em ebulição. Depois, o cartucho poroso é emerso e lavado com o solvente puro da condensação. No final do processo (1 hora), a válvula é aberta para deixar sair o solvente e concentrar o extracto.

h) Uma particular atenção é dada ao processo de *extracção por Soxhlet* por ser o método escolhido para a realização deste trabalho. Razão pela qual o seu tratamento é mais detalhados.

A extracção por Soxhlet – é um processo desenvolvido no século XIX, na Alemanha, pelo químico agrário, Franz Ritter Von Soxhlet (1848 – 1926). O processo consiste na transferência das massas de uma fase sólida, parcialmente solúvel, para uma fase líquida. Resumidamente, esta técnica é caracterizada por ser [77]: eficiente com pequeno volume de solvente, portanto, é económica; adequada a compostos estáveis, não voláteis, à temperatura de ebulição do solvente e adaptável ao uso de fluidos supercríticos, etc.

O extractor Soxhlet pode ser construído em vários tamanhos (desde 125 ml a 5000 ml). A montagem de Soxhlet corresponde a um sistema de refluxo constituído por um balão de fundo redondo (B) ligado a um condensador de refluxo (H), por meio de uma coluna intermediária (D) que possui tubos laterais de saída de vapor de solvente (I) e de retorno (J) ao balão (Ilustração 15).

A amostra (F), finamente dividida e coberta por fibras de vidro (G), é introduzida num cartucho de papel poroso ou de cerâmica (E), localizado na coluna intermediária. O solvente é vaporizado por um sistema de aquecimento (A,C) colocado por baixo do balão de fundo redondo, e depois de condensado por refluxo, é recolhido na cartucho poroso. Aqui o solvente lava a amostra e retorna ao balão carregado dos compostos extraídos dela.

Um novo circuito é reiniciado com reciclagem do solvente por vaporização. Este sai do balão passando através do tubo lateral até ao condensador donde vai gotejando no cartucho poroso, sobre as fibras de vidro que protegem a amostra. As fibras espalham, uniformemente, o solvente sobre a amostra e impedem que esta última se desperdice. Continuamente, de ciclo em ciclo, a concentração do extracto no balão aumenta, à medida que a quantidade da amostra vai sendo consumida pelas sucessivas passagens (eluição) do solvente puro sobre ela. Uma extracção completa por Soxhlet dura várias horas, dependendo da relação solvente/extracto.

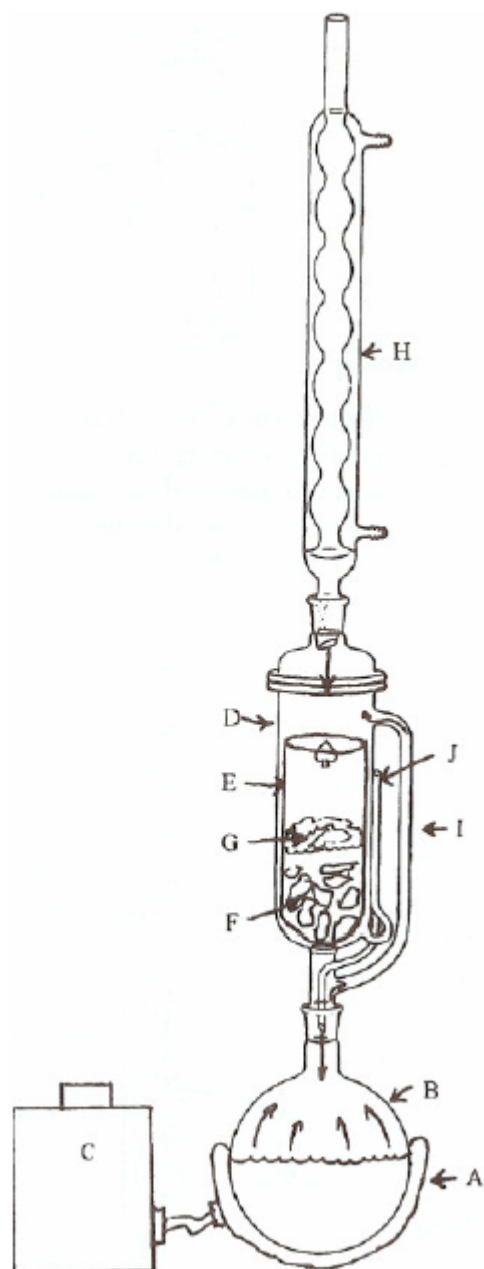


Ilustração 15: esquema de montagem de extrator Soxhlet, que mostra: o manto de aquecimento (A), o balão de fundo redondo (B), fonte de energia (C), a coluna (D), o cartucho poroso de papel ou cerâmico (E), a amostra (F), as fibras de vidro ou algodão (G), o condensador de refluxo (H), o tubo para saída de vapor (I) e o tubo de retorno de solvente (J).

3 – PARTE EXPERIMENTAL

3.1 - Solventes e equipamentos utilizados

3.1.1 - Solventes utilizados

Foram utilizados ao longo deste trabalho solventes de qualidade analítica ou purificados por bidestilação. Foram utilizados hexano, diclorometano e acetona para as extracções.

3.1.2 - Equipamento utilizado

Os extractos foram analisados por GC-MS num equipamento de Chromatograph Trace series 2000 acoplado a um espectrómetro de massa Finnigan Trace MS. Foi usada uma coluna capilar DB-1 J&W (30m x 0,32mm i.d., 0,25µm de espessura de filme), com hélio como gás de arrasto (35 cm/s). As condições de análise foram: a temperatura inicial de 80°C (5 min.), a rampa de temperatura de 4°C/min., a temperatura final de 285°C (10 min.), a temperatura do injector de 290°C, a temperatura da linha de transferência de 290°C e a razão de split 1:100 [69]. Em geral, cada amostra do extracto injectado (1µl) no aparelho de GC-MS foi analisada no tempo global de setenta minutos. A identificação dos compostos detectados nesta análise foi feita com recurso às bases de dados do equipamento, e a interpretação e comparação dos espectros obtidos com dados de literaturas.

3.2 - Preparação de amostras e obtenção de extractos

3.2.1 - Preparação de amostras

As folhas e as sementes de *Momordica balsamina* foram colhidas e postas a secar em Moçambique e, posteriormente, submetidas a trituração. Esta é a fase preliminar da parte experimental cuja importância consiste em:

a) A secagem de amostras é necessária, principalmente, quando se pretende analisar compostos não muito voláteis, para garantir que a planta não fique deteriorada. Este processo deve ser feito ao abrigo das radiações solares directas para a conservação dos compostos;

b) Os solventes orgânicos têm a capacidade de, normalmente, penetrar nos tecidos vegetais. Todavia, a transformação das partes vegetais em

tamanhos menores aumenta a superfície de contacto, permitindo maior número de colisões simultâneas, entre o soluto e o solvente, fazendo com que o processo extractivo seja fácil e dure o menos possível.

3.2.2 - Obtenção de extractos por Soxhlet

Todos os extractos de folhas e de sementes da *Momordica balsamina* foram obtidos por Soxhlet. As amostras trituradas de folhas (309,0gr) e de sementes (193,4gr), de *Momordica balsamina*, foram submetidos a extracção por Soxhlet, em solventes de polaridades crescentes, de forma sequencial: primeiro em hexano, depois em diclorometano e por último em acetona. A montagem do Soxhlet foi acoplada a um sistema de refrigeração a partir dos condensadores devido à volatilidade dos solventes. Os ciclos de extracção tiveram a duração de 15 a 127 horas, de acordo com a conclusão de cada extracto na amostra. A análise preliminar de GC-MS mostrou que as composições dos extractos em hexano e em diclorometano são qualitativamente iguais pelo que se decidiu junta-los e analisa-los em conjunto.

3.3 - Preparação das amostras para a análise dos extractos por GC-MS

3.3.1 - Hidrólise alcalina dos extractos de hexano e diclorometano

Os extractos obtidos podem conter compostos de elevado peso molecular em formas de ésteres ou glucosídeos, não podendo por isso ser analisados directamente por GC-MS. A hidrólise foi feita tendo em vista a detecção e identificação por GC-MS de todos compostos presentes nos extractos na forma livre e de ésteres. A mistura de extractos obtidos em hexano e em diclorometano foi submetida a hidrólise alcalina e a hidrólise ácida, os extractos mais polares obtidos em acetona.

Para a hidrólise alcalina, foram preparadas em dois tubos de Schott cerca de 20 mg de amostras: um tubo com a mistura de extractos de folhas obtidos em hexano e em diclorometano e um outro tubo com uma mistura semelhante, de extractos de sementes. As amostras foram submetidas a hidrólise alcalina com 10 ml de hidróxido de potássio 1M em 1:9 de água com metanol [78,79]. A solução alcalina de KOH foi adicionada aos dois tubos de

amostras, de folhas e de sementes. Os dois preparados finais foram aquecidos em banho de óleo a 100° C durante uma hora e, por último, as amostras hidrolisadas foram arrefecidas, acidificadas até pH 2 e submetidas a extracção líquido-líquido com diclorometano.

3.3.2 - Hidrólise ácida dos extractos obtidos em acetona

Um procedimento semelhante ao da hidrólise alcalina foi efectuado para os extractos em acetona, de folhas e de sementes. Neste caso os extractos foram hidrolisados em ácido clorídrico 2M da seguinte forma: cerca de 2,0 gr de cada extracto foram dissolvidos em 40,0 ml de metanol e adicionados à solução formada 150,0 ml de ácido clorídrico 2M, ou 35,2 ml do mesmo ácido concentrado (a 37% e 0,841g/ml). As duas soluções foram levadas ao refluxo durante 3 horas a 90° C. Feita a hidrólise, as amostras foram arrefecidas e submetidas a extracção líquido-líquido em clorofórmio.

3.3.3 - Derivatização dos extractos

Todas as amostras inicialmente preparadas de extractos de folhas e de sementes (ponto 3.3.1) foram convertidos em ésteres e éteres trimetilsilílicos antes de serem submetidos a análise por GC-MS. Em cada tubo de Schott dissolveram-se cerca de 20 mg de uma das amostras de extractos em 250 µl de piridina e foram adicionados 250 µl de bis(trimetilsilil)trifluoracetamida (BSTFA) e 50 µl de trimetilclorosilano (TMSCI) [78]. Os tubos foram aquecidos no banho de óleo ou em bloco de aquecimento a 70°C durante 45 minutos, arrefecidos e submetido a análise por GC-MS.

3.3.4 - Preparação do Padrão interno (Pi)

Numa balança analítica foram minuciosamente pesadas 68,0 mg de tetracosano (C₂₄H₅₀) e dissolvidos em 25 ml de piridina. Desta solução foram adicionados 250 µl (correspondentes a 0,68 mg de Padrão interno) a, aproximadamente, 20 mg de extracto.

3.3.5 - Quantificação dos compostos identificados por GC-MS

A determinação quantitativa dos componentes de amostras dos extractos de folhas e sementes em estudo foi feita pelo método de adição de um Padrão interno. Neste caso procedeu-se primeiro à quantificação em mg dos compostos em função das áreas dos seus picos cromatográficos e ao tetracosano anteriormente referido (ponto 3.3.4). Por último, foi estimada a massa de cada composto identificado, em mg/gr do extracto.

4 – ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1 - Extractos obtidos por ordem de solventes

A extracção dos constituintes das folhas deu um rendimento global de 15,22%. Os extractos de sementes renderam 12,74%. O maior rendimento dos extractos de folhas foi obtido em diclorometano. O rendimento obtido das sementes é maior no extracto apolar de hexano e baixa com o aumento da polaridade de solventes (Tabela 2).

	Folhas		Sementes	
	Massa	Rendimento	Massa	Rendimento
Hexano	7,54 gr	2,44%	16,46 gr	8,51%
Diclorometano	24,50 gr	7,93%	5,47 gr	2,83%
Acetona	15,00 gr	4,85%	2,71 gr	1,40%
Total	47,04 gr	15,22%	24,64 gr	12,74%

Tabela 2: rendimentos de extracção em Soxhlet de folhas e sementes de *Momordica balsamina*.

Segundo foi referido no ponto 3.1.2, a análise preliminar de GC-MS mostrou que as composições dos extractos em hexano e em diclorometano são qualitativamente semelhantes pelo que se decidiu juntá-los. Desta forma obteve-se: o extracto de folhas em hexano/diclorometano (10,37%), o extracto de folhas em acetona (4,85%), o extracto de sementes em hexano/diclorometano (11,34%) e o extracto de sementes em acetona (1,4%), adiante designados por P1, P2, P3 e P4, respectivamente.

Cada um dos quatro extractos foi analisado por GC-MS antes e depois da hidrólise alcalina (ponto 3.3.1).

4.2 - Identificação dos constituintes

As amostras de extractos de folhas e de sementes da *Momordica balsamina*, hidrolisados e não hidrolisados, são constituídas, essencialmente, por ácidos gordos (Tabela 3). Nos extractos de folhas e de sementes hidrolisados foram, também, identificadas pequenas fracções de outros compostos. São elas, por ordem decrescente de abundância, terpenóides, álcoois gordos, hidrocarbonetos de cadeias longas, compostos aromáticos e

alguns ésteres metílicos de ácidos gordos. Representantes destes grupos dos compostos foram igualmente identificados, em pequenas quantidades, nas amostras de extractos não hidrolisados de folhas e de sementes. Para além disso, os ésteres metílicos de ácidos gordos foram somente identificados nos extractos hidrolisados de folhas e de semente obtidos em acetona (P2 e P4), resultado da transmetilação de ácidos gordos durante a hidrólise das respectivas amostras e, por isso, são contabilizados no grupo de ácidos gordos.

Os ácidos e os álcoois foram identificados em todos os extractos de folhas e de sementes, antes e depois da hidrólise, estando mais concentrados nos extractos hidrolisados. Os hidrocarbonetos foram encontrados somente nas duas amostras de folhas (P1 e P2), hidrolisadas e não hidrolisadas. Os terpenóides foram identificados nos extractos de semente (P3 e P4) hidrolisados com alguns vestígios nos extractos não hidrolisados (Tabela 3).

As amostras de extractos não hidrolisados de folhas e de sementes de *Momordica balsamina* contêm, na generalidade, quantidades e concentrações relativamente baixas de constituintes (Tabela 3). Todavia, alguns compostos, como os trióis glicerol (1) e metilglicerol (6), os ácidos de cadeias curtas succínico (2), tricarbálico (18), azeláico (19), e glucónico (33), os monossacarídeos e seus derivados treitol (5), xilitol (8), sorbose (22), D-frutose (23), D-glucitol (34) e D-glucose (36) e os glicéridos monopalmitina (51), monolinoleína (54), monooleína (55) e monoestearina (56), foram identificados exclusivamente e/ou em maior concentração nos extractos não hidrolisados (Tabela 3). O não aparecimento ou a redução da concentração de alguns compostos em extractos hidrolisados pode estar relacionado com a sua solubilidade durante a hidrólise.

O glicerol aparece em todos os extractos não hidrolisados e nos extractos de folhas e de sementes hidrolisados obtidos em hexano/diclorometano, tendo a maior concentração nas amostras não hidrolisadas de folhas em acetona (Tabela 3). O ácido azeláico consta em todos os extractos de folhas e de semente, hidrolisados e não hidrolisados, excepto no extracto não hidrolisado de folhas em hexano/diclorometano (P1).

Este composto tem maior concentração no extracto não hidrolisado de sementes em acetona (Tabela 3).

O ácido succínico foi apenas identificado nos dois extractos não hidrolisados obtidos em acetona (P2 e P4), estando mais concentrado no extracto de sementes. O metilglicerol, o ácido glucónico e todos os monossacarídeos e seus derivados foram somente identificados nos extractos de folhas não hidrolisados obtidos em acetona. O ácido tricarbálico também foi apenas identificado no extracto não hidrolisado de sementes obtido em acetona (Tabela 3). Todos esses grupos dos compostos não apareceram nas amostras dos extractos hidrolisados, devido à sua solubilidade durante a hidrólise.

Outros grupos dos compostos encontrados antes da hidrólise foram os monoglicerídeos, nos extractos de folhas e de sementes obtidos em hexano/diclorometano, P1 e P3 (Tabela 3). Destes, os monoglicerídeos insaturados apenas nos extractos de sementes, enquanto que os saturados ocorrem nos dois extractos, com maior concentração no de folhas. Depois da hidrólise, quantidades vestigiais de monoglicerídeos foram identificados nos referidos extractos de folhas e de sementes obtidos em hexano/diclorometano como resíduos da conversão incompleta de triglicerídeos para os respectivos ácidos gordos e glicerol, durante a hidrólise. Por isso, a presença de monoglicerídeos e de glicerol nos referidos extractos hidrolisados de folhas e de sementes comprova a ocorrência de triglicerídeos de ácidos gordos.

Nº	Compostos identificado	antes de hidrólise				depois de hidrólise			
		P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
1	glicerol	0,39	59,45	2,45	0,53	4,19		3,96	
2	ácido succínico* 4:0		0,75		4,68				
3	ácido p-anísico								2,49
4	ácido salicílico		4,74				28,20		24,60
5	D-treitol		12,16						
6	metilglicerol		2,00						
7	ácido p-hidroxibenzóico		0,53				3,25		5,24
8	D-xilitol		8,68						
9	ácido vanílico						2,32		8,33
10	ácido α -resorcílico						1,72		1,29
11	ácido cáprico 10:0					10,00		0,28	
12	ácido adípico* 6:0							0,63	
13	dodecan-1-ol					0,80		0,63	
14	ácido láurico 12:0			0,18		3,50		1,38	
15	ácido subérico* 8:0			0,23	1,61			0,88	
16	ácido fumárico* 4:1					0,74			
17	ácido homoverátrico					0,71			
18	ácido tricarbálico				1,27				
19	ácido azelaico* 9:0		0,33	0,54	7,50	0,50	1,77	1,65	6,41
20	neofitadieno	10,78	1,11			tr	6,13		
21	ácido mirístico 14:0	7,40		1,20	1,61	11,23	1,73	3,70	1,23
22	sorbose		7,67						
23	D-frutose		14,01						
24	ácido 2-metil-2(p-metoxi)mandélico						tr		2,58
25	ácido 3-desoxi-eritro-pentónico					3,28		2,30	
26	ácido sirínico				1,82				2,69
27	ácido pentadecanóico	2,79		0,69	1,16	3,37		1,47	
28	palmitato de metilo						5,23		2,91
29	ácido vanilacético						0,41		5,50
30	hexadecan-1-ol	0,94		tr	5,88	2,64		0,70	
31	ácido palmitelaidico 16:1 (9E)	3,73		0,47		0,45		1,44	
32	ácido palmitoleico 16:1 (9Z)	5,44		tr		9,84		1,05	
33	ácido glucónico		3,62						
34	D-glucitol		2,91						
35	ácido palmítico 16:0	108,91	4,14	37,28	52,08	152,74	41,18	85,65	44,20
36	D-glucose		2,39						
37	linoleato de metilo						2,51		3,31
38	esteriato de metilo						1,70		1,09
39	octadec-9E-en-1-ol	0,87		tr	5,61	1,49	2,70	0,50	3,61
40	ácido margárico 17:0	5,09		0,63		5,52		2,15	
41	octadecan-1-ol	0,82		tr	4,87	1,48	0,52	0,54	
42	fitol	6,20				44,79	1,22	0,31	
43	ácido linoleico 18:2 (9Z,12Z)	59,15		32,58	51,68	102,14	18,95	112,14	44,28
44	ácido oleico 18:1 (9Z)	tr		29,45	60,36	tr	tr	103,17	29,77
45	ácido esteárico	42,02	1,78	22,75	33,85	50,11	16,07	45,25	21,22
46	ácido α -linolénico 18:3 (9Z,12Z,15Z)			39,37	88,94		1,95	176,19	13,37
47	ácido 9Z,12E,15Z-octadecatrienóico			6,56	10,44		0,15	9,38	7,81
48	ácido 9E,12Z,15E-octadecatrienóico			2,66	3,52		0,25	4,77	12,04
49	ácido 2-hidroxi-linoleico	15,00		1,51		19,51		0,66	
50	ácido araquídico 20:0	5,01		1,32		9,33	1,20	1,44	3,80
51	monopalmitina	3,05		1,00		0,53		0,22	
52	ácido behénico 22:0	6,36		0,96		11,54	1,55	0,87	6,03
53	heptacosano	3,39				2,62			
54	monolinoleína			1,93				tr	
55	monoleína			1,18				0,32	
56	monoestearina	1,72		0,49				0,17	
57	ácido tricosanóico 23:0						0,64		3,28
58	ácido 2-hidroxibehénico 22:0						2,68		2,75
59	ácido lignocérico 24:0	7,77		0,68		9,46	0,97	0,88	2,23
60	nonacosano	4,08				3,75			
61	ácido 2-hidroxi-lignocérico 24:0						11,87		3,17
62	ácido 2-hidroxipentacosanóico						3,01		
63	ácido hexacosanóico	8,18				9,36			
64	hentriacontano	32,19				34,78			
65	octacosan-1-ol	5,01				8,77			
66	3,24-dihidroxi-3,5-colestadieno								3,21
67	campesterol								4,46
68	estigmasterol				0,40		4,44		2,50
69	espinasterol						24,82		
70	β -sitosterol			3,06				2,14	17,92
71	lupeol								115,61
massas totais de compostos identificados		346,26	126,27	189,16	337,81	519,17	189,14	566,83	408,95

Tabela 3: quantificação dos compostos lipofílicos identificados por GC-MS em mg/gr de extractos de folhas, obtidos em hexano/diclorometano (P1) e em acetona (P2) e de sementes, obtidos em hexano/diclorometano (P3) e em acetona (P4). O “tr” simboliza quantidade vestigial.

4.2.1 - Extractos de folhas em hexano/diclorometano (P1)

Além dos ácidos, compostos distribuídos em todos os extractos hidrolisados e não hidrolisados de folhas e de sementes da *Momordica balsamina*, os álcoois foram maioritariamente identificados nos extractos de folhas obtidos em hexano/diclorometano. São eles: glicerol (1), hexadecan-1-ol (30), octadec-9E-en-1-ol (39), octadecan-1-ol (41), fitol (42) e octacosan-1-ol (65). Nestes extractos foram identificados, em exclusivo, os hidrocarbonetos neofitadieno (20), heptacosano (53), nonacosano (60), e hentriacontano (64). Os monoglicerídeos monopalmitina (51) e monoestearina (56) foram igualmente identificados.

Os ácidos identificados são: mirístico (21), pentadecanóico (27), palmitelaídico (31), palmitoleico (32), palmítico (35), margárico (40), linoleico (43), 2-hidroxilinoico (49), araquídico (50), behénico (52), lignocérico (59) e hexacosanóico (63). Com a excepção dos monoglicerídeos, todos os compostos anteriormente referidos estão mais concentrados no extracto hidrolisado (Ilustração 16).

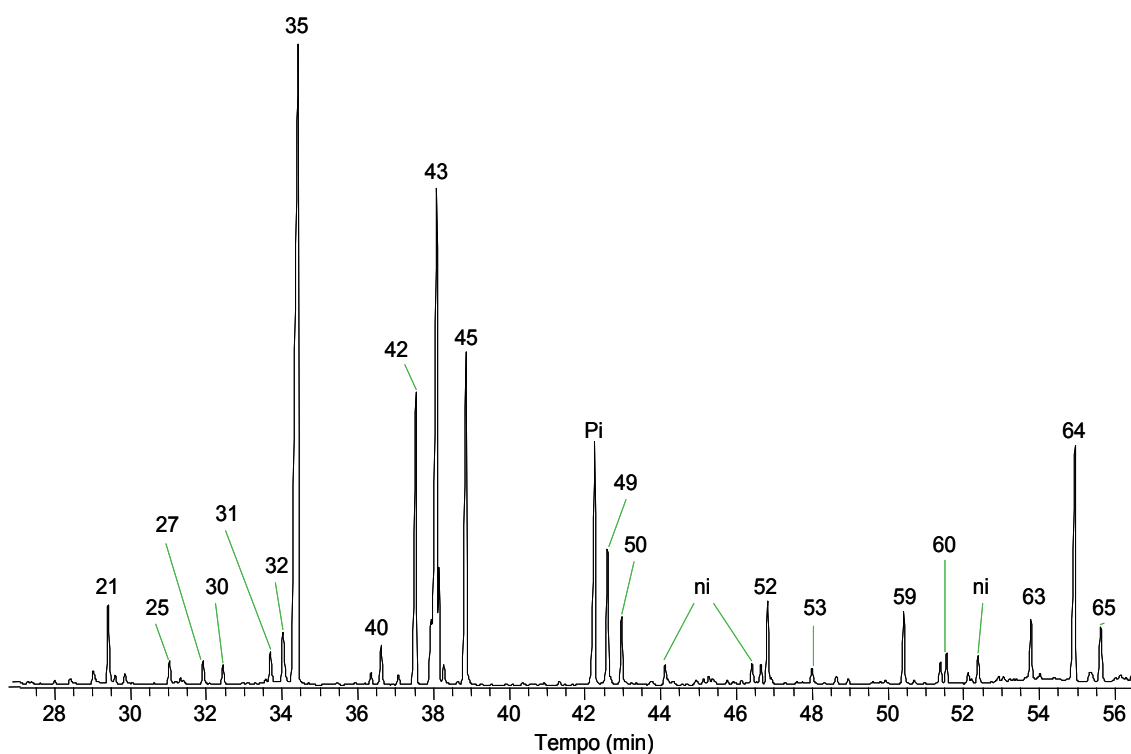


Ilustração 16: cromatograma do extracto hidrolisado de folhas em hexano/diclorometano (P1), analisado por GC-MS, mostrando os compostos identificados, os não identificados (ni) e o Padrão interno (Pi).

4.2.2 - Extractos de folhas em acetona (P2)

O extracto não hidrolisado de folhas em acetona é o mais pobre em ácidos. Neste extracto não hidrolisado de folhas foram identificados, em exclusivo, o metilglicerol e os monossacarídeos e seus derivados. No extracto hidrolisado de folhas em acetona foram identificados um pouco mais de ácidos, predominantemente, gordos (Ilustração 3) e aromáticos (Ilustração 17); os ésteres metílicos de ácidos gordos e alguns álcoois e fitosteróis (Ilustração 11).

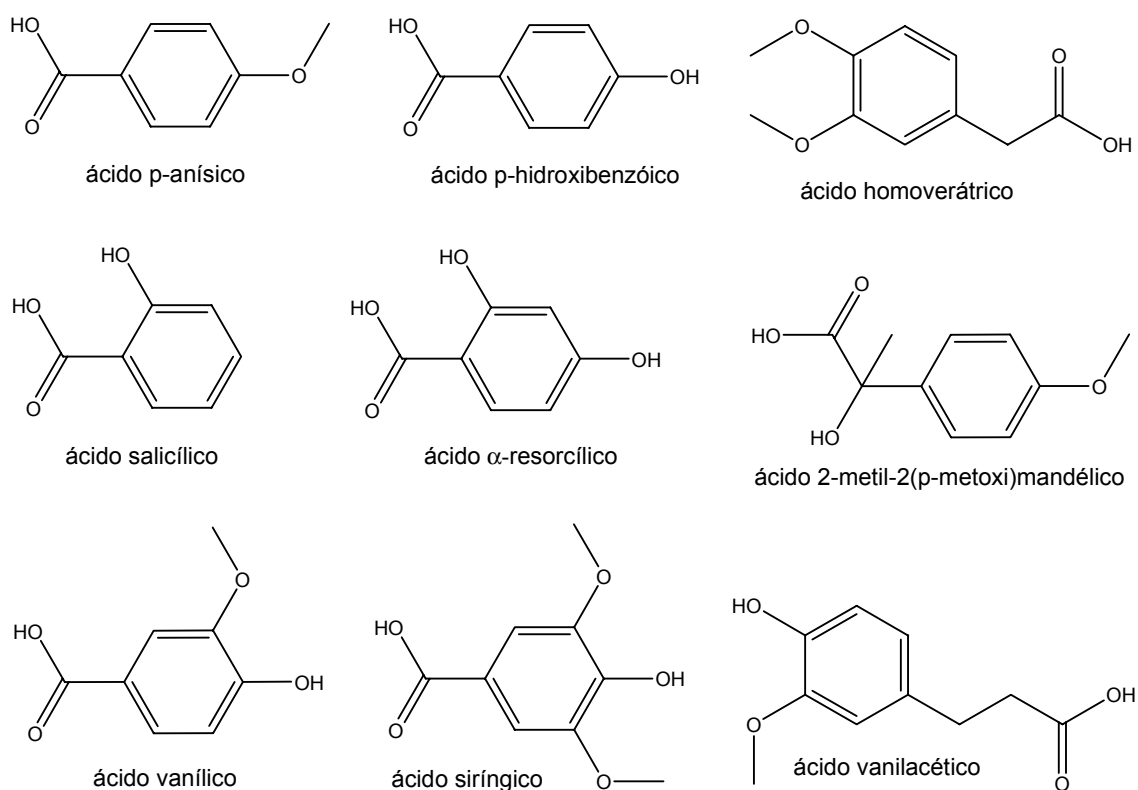


Ilustração 17: ácidos aromáticos identificados nos extractos de folhas (P2) e de sementes (P4) da *Momordica balsamina* em acetona.

4.2.3 - Extractos de sementes em hexano/diclorometano (P3)

Com a excepção dos ácidos aromáticos, nos extractos de sementes obtidos em hexano/diclorometano foi identificada a maior parte dos ácidos, principalmente no extracto hidrolisado (Ilustração 18) onde também foram identificados os monoglicerídeos. Depois do extracto hidrolisado de folhas em hexano/diclorometano (ponto 4.2.1), neste extracto de sementes foi identificada a segunda maior quantidade de álcoois. Foi, ainda, identificado no mesmo

extracto de sementes em hexano/diclorometano, antes e depois da hidrólise, o fitosterol β -sitosterol.

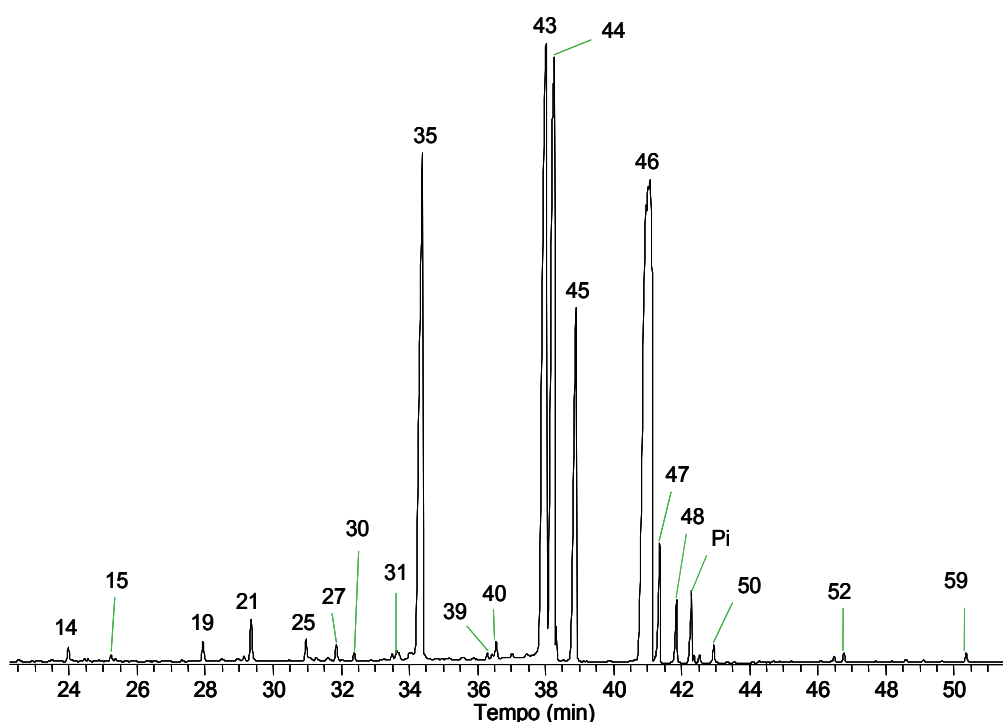


Ilustração 18: cromatograma do extracto hidrolisado de sementes em hexano/diclorometano (P3), analisado por GC-MS, que mostra os compostos identificados (enumerados) e os não identificados (ni), e o Padrão interno (Pi).

4.2.4 - Extractos de sementes em acetona (P4)

No extracto não hidrolisado de sementes em acetona foram identificados alguns ácidos e álcoois alifáticos. Depois da hidrólise, foi observado um aumento de número dos compostos identificados. Entre eles constam: os ácidos aromáticos (Ilustração 17), os esteróides (Ilustração 11) e pequenas quantidades de ésteres metílicos de ácidos gordos. O triterpenóide lupeol (Ilustração 9) é o mais abundante neste extracto de sementes em acetona.

O cromatograma do extracto hidrolisado de sementes em acetona (Ilustração 19) mostra o triterpenóide lupeol (71) e outros componentes deste extracto de sementes (P4), por ordem decrescente de abundância, nomeadamente, o ácido linoleico (43), o ácido palmítico (35), o ácido salicílico (4), o ácido oleico (44) e o ácido esteárico (45).

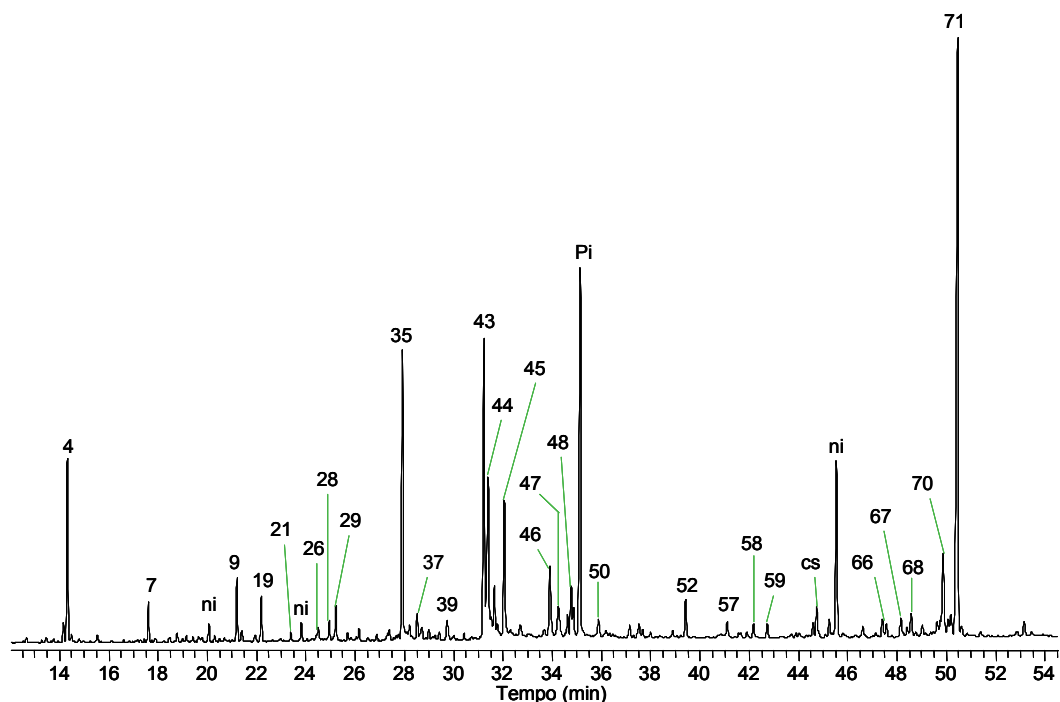


Ilustração 19: cromatograma do extracto hidrolisado de sementes em acetona (P4), analisado por GC-MS, onde são mostrados os compostos identificados (enumerados) e os não identificados (ni), o Padrão interno (Pi) e contaminações de solventes (cs).

4.2.5 - Ácidos gordos

Dos compostos identificados nas amostras de extractos não hidrolisados de folhas e de sementes da *Momordica balsamina* os ácidos gordos constituem a fracção mais abundante. Entre os ácidos gordos, o mais abundante na espécie *Momordica balsamina* é o ácido palmítico. Este ocorre distribuído por todos os extractos e encontra-se mais concentrado nos extractos menos polares de folhas e de sementes em hexano/diclorometano (P1 e P3).

Eis o espectro de massa do ácido palmítico (Ilustração 20) em representação dos ácidos gordos. O espectro de massa de ácidos gordos sililados, e outros derivados oxigenados de trimetilsililo (TMS), apresenta picos de tipo: m/z 73 do ião $[Me_3Si]^+$ (ou TMS), 75 do ião $[Me_2SiOH]^+$ e o ião $[M - 15]^+$ que se forma em consequência da perda de um grupo metilo do TMS [80-82]. A proeminência destes picos distingue os ácidos dos demais compostos sililados, particularmente dos álcoois [81]. A outra particularidade dos ácidos gordos em relação aos álcoois é a formação de um pico característico dos ésteres

alifáticos de TMS, m/z 117 do ião $[H_2C=C(OH)OSi(Me)_2]^+$ resultante da β -clivagem por rearranjo McLafferty e da perda de um grupo metilo do TMS [81,83]. Neste tipo dos compostos são também salientes, nomeadamente, o pico 132 do ião $[H_2C=C(OH)OTMS]^+$ do rearranjo McLafferty e os picos 129 e 145 dos iões $[H_2C=CHC(OH)TMS]^+$ e $[H_2C=CHC(OH)OTMS]^+$, formados a partir de cisões na cadeia alifática [81].

Os picos específicos do espectro de massa do ácido palmítico em particular (Ilustração 20) são m/z 328, que representa o ião molecular $[M]^+$, m/z 313 formado pela perda de um grupo metilo $[M-15]^+$ do TMS, m/z 285 que corresponde à perda de etileno e um radical metilo $[M-43]^+$, m/z 269 resultante da eliminação de CO_2 e um radical metilo $[M-59]^+$ e m/z 201 do ião de éster de TMS derivado da cisão de cadeia alifática $[M-127]^+$.

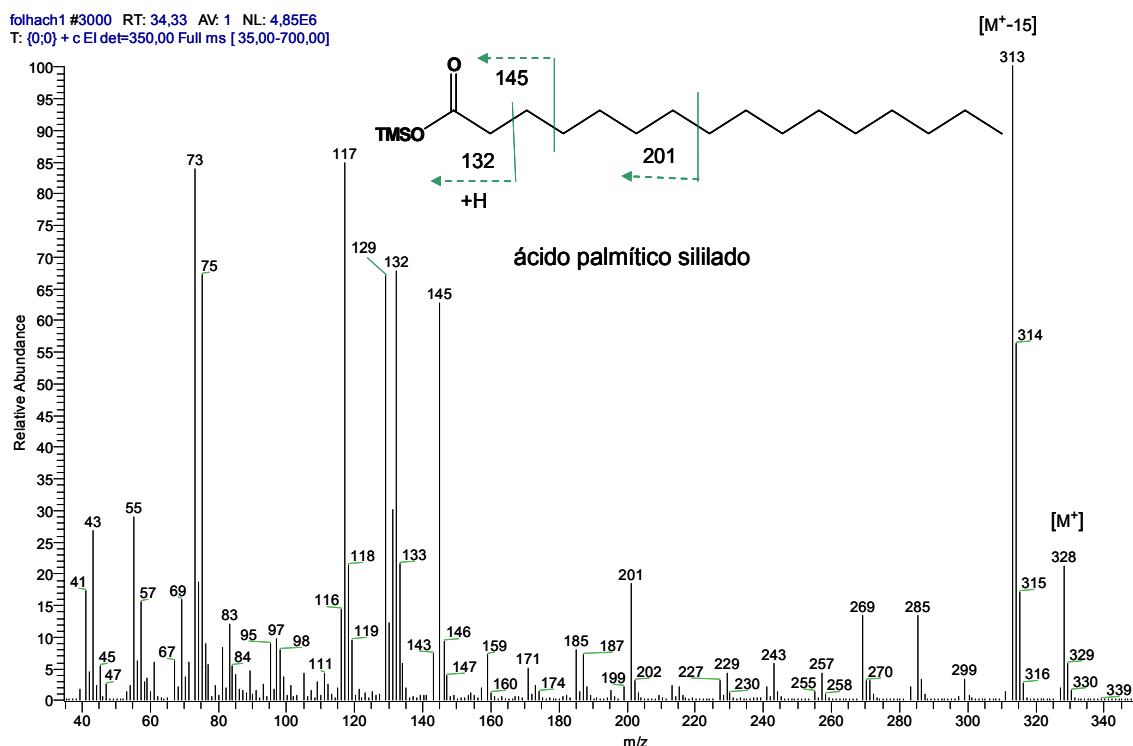


Ilustração 20: espectro de massa do ácido palmítico, como exemplo típico de ácidos alifáticos sililados.

4.2.6 - Ácidos aromáticos

Entre os compostos identificados nas amostras de extractos hidrolisados de folhas e de sementes de *Momordica balsamina* obtidos em acetona (P2 e

P4) destacam-se, depois dos ácidos gordos, os ácidos aromáticos (Ilustração 17), sendo o ácido salicílico (6) o mais abundante de todos. Estes compostos, os ácidos aromáticos, e os triterpenóides constituem grupos identificados particularmente nos extractos obtidos em acetona (P2 e P4).

Os espectros de massa dos ácidos aromáticos siliados, para além dos picos característicos dos derivados oxigenados do TMS, apresentam geralmente o pico do ião molecular $[M]^+$ menor e o pico base do ião $[M-15]^+$ muito intenso [81,82]. Diversos picos pouco salientes podem ser formados em consequência da fragmentação e, também, dependendo das estruturas dos compostos. Entre os mais importantes constam os seguintes picos [81]: o pico do ião acilo $[M-89]^+$, formado a partir da perda do grupo TMSO através da α -clivagem do éster de TMS; o pico do ião $[M-73]^+$, resultante da eliminação dos grupos TMS; etc.

O espectro de massa do ácido salicílico (Ilustração 21) apresenta um pico base m/z 267 proeminente e um pico m/z 282 do ião molecular bastante reduzido [84]. Outros picos que constituem uma característica deste composto são: m/z 209 e 193 dos iões $[M-73]^+$ e $[M-89]^+$, respectivamente [81].

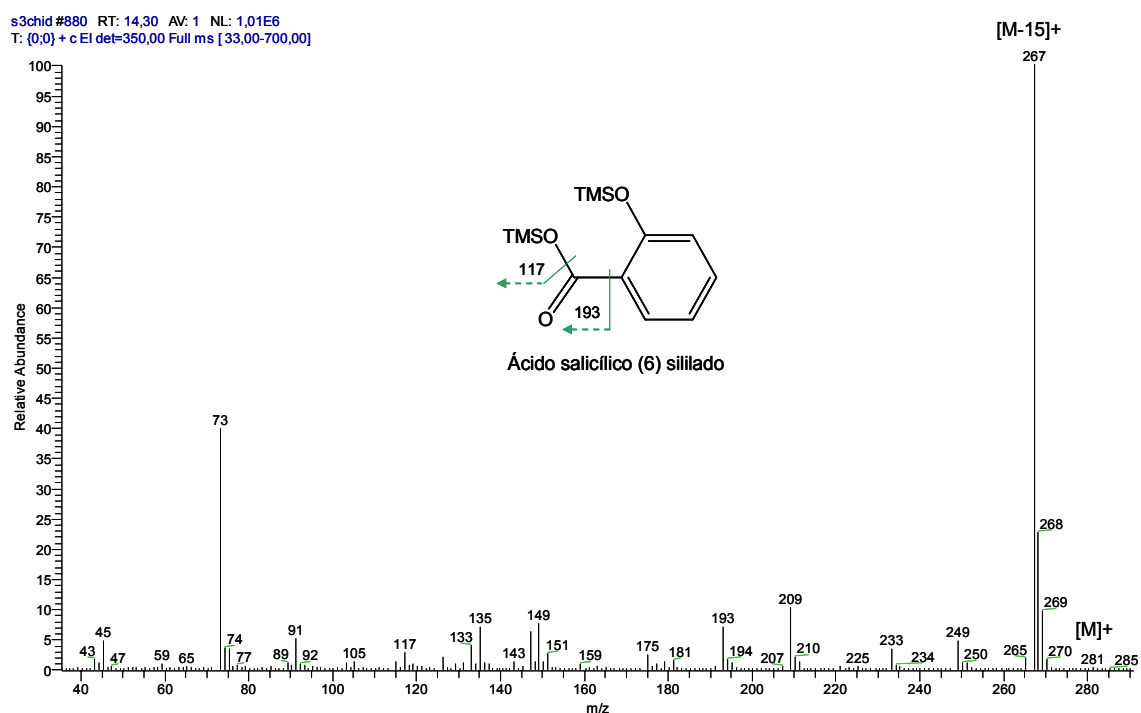


Ilustração 21: espectro de massa de ácido salicílico siliado, que mostra os picos característicos dos ácidos aromáticos siliados.

O pico m/z 105 do ião $[M-177]^+$, originado pela perda dos dois grupos TMSO e a captura de um protão. O pico m/z 249 do ião $[M-33]^+$, resultante da perda de água e um grupo metilo do TMS. A perda de dois grupos metilos, uma molécula de água e um radical H° origina o pico m/z 233 do ião $[M-49]^+$. O pico m/z 149 do ião $[M-133]^+$, formado através da quebra do grupo $TMSO_2C$ e um radical H° do anel aromático e um grupo metilo do segundo TMS [84]. A perda do grupo $TMSO_2C$ e dois grupos metilos dá origem ao pico m/z 135 do ião $[M-147]^+$.

4.2.7 - Álcoois

Os álcoois formam a segunda fracção na ordem decrescente de massa de extractos não hidrolisados de folhas e de sementes de *Momordica balsamina* (ponto 4.2). Estes compostos são representados por glicerol e álcoois gordos.

Os espectros de massa de álcoois são caracterizados por picos muito fracos, sendo o pico do ião molecular $[M]^+$ muito reduzido [84]. Estes espectros de massa têm em comum o pico m/z 103 do ião $[CH_2-OTMS]^+$ característico de álcoois sililados. Esta característica constitui uma diferença notável entre os álcoois e os restantes compostos sililados [80,81]. Porém, tal como nos ácidos, os espectros de massa de álcoois sililados apresentam o característico pico base do ião $[M-15]^+$ proeminente [84]. Formam os picos 73, 75 e 129 verificados em ácidos e outros compostos sililados e, também, o pico m/z 89 do ião $[Me_3SiO]^+$ e o pico do ião $[M-90]^+$ formado pela perda de $TMSOH$ [84].

O espectro de massa do hexadecanol sililado é um dos exemplos de álcoois sililados. Apresenta (Ilustração 22): o pico base m/z 299 do ião $[M-15]^+$ proeminente; o pico m/z 103 típico dos álcoois; os picos reduzidos m/z 73, 75, 89 e 129. Os restantes picos resultam de cisões na cadeia alifática [81].

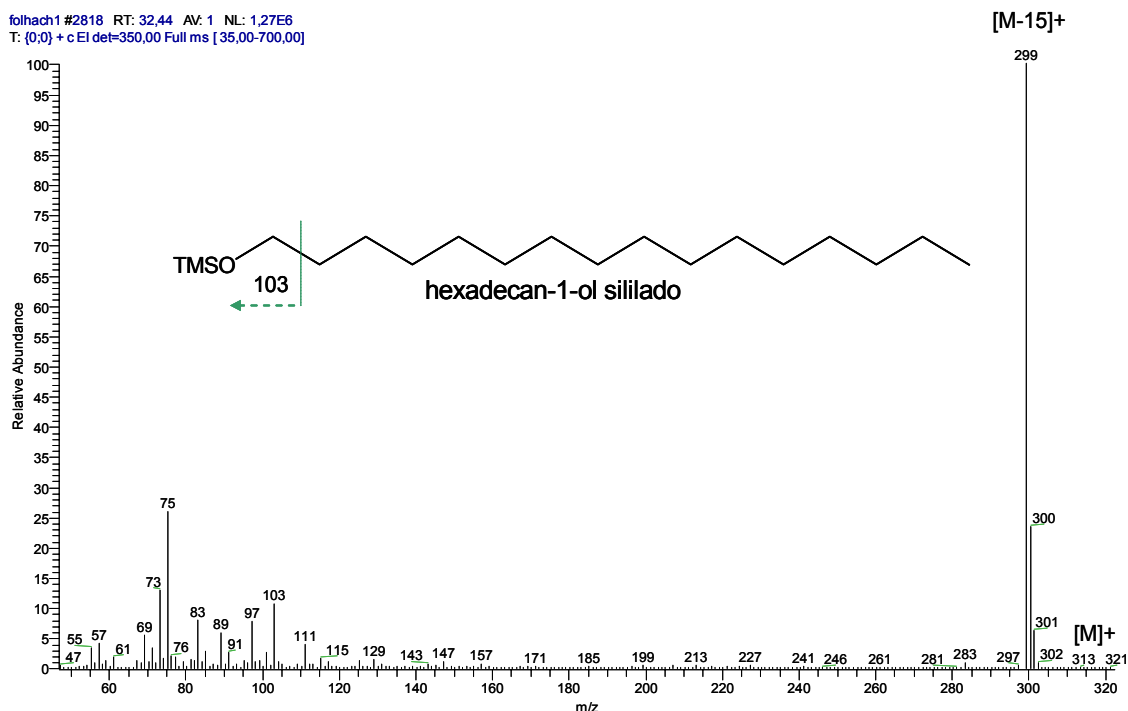


Ilustração 22: espectro de massa do hexadecanol sililado, que mostra os picos característicos dos álcoois sililados.

4.2.8 - Monoglicerídeos

Os monoglicerídeos foram identificados, antes e depois da hidrólise, nos extractos de folhas e de sementes em hexano/diclorometano, principalmente, nos extractos de sementes (ponto 4.2).

Os espectros de massa dos ésteres em geral são caracterizado, tal como nos álcoois, por picos de iões moleculares $[M]^+$ muito reduzidos [81]. Todavia, os tamanhos dos picos de iões moleculares são relativamente proporcionais aos álcoois que formam os ésteres [81]. O espectro de massa de monopalmitina (Ilustração 23), em representação dos monoglicerídeos, apresenta um proeminente pico m/z 371 de ião fragmento resultante da perda de grupo $[TMSOCH_2]$ pela cisão na segunda ligação carbónica do esqueleto de glicerol. O pico m/z 239 corresponde ao ião acilo $[RCO]^+$ formado a partir da α -clivagem de monopalmitina (Ilustração 23).

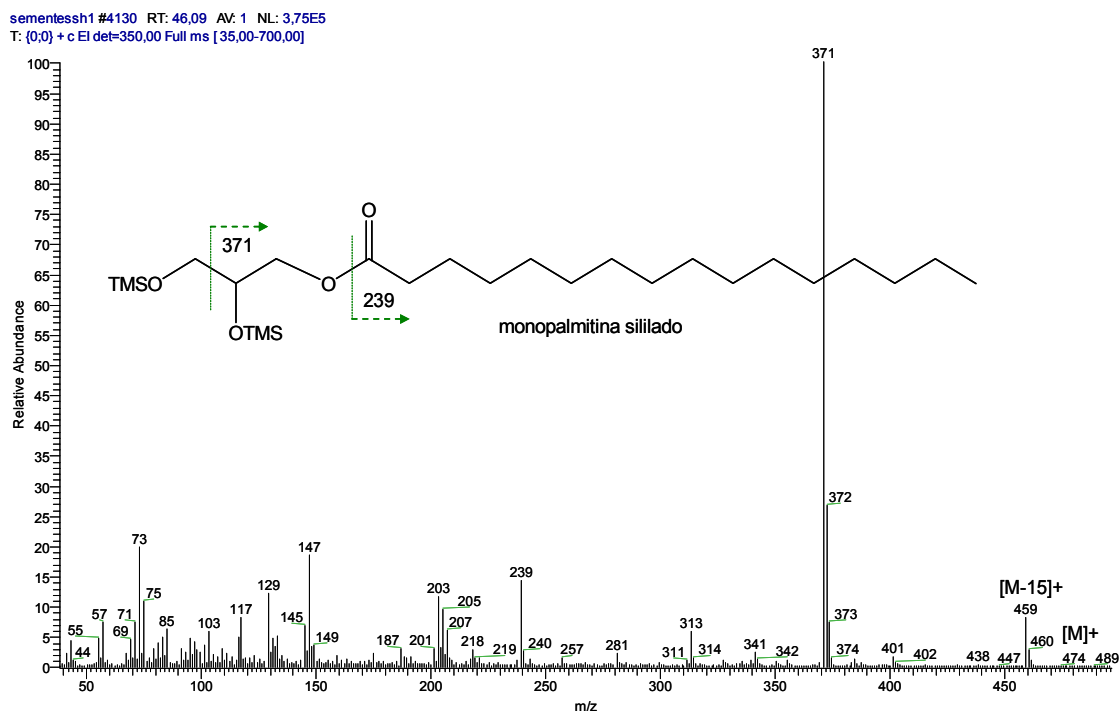


Ilustração 23: espectro de massa de monopalmitina siliada, em representação de espectros de massa característicos dos monoglicéridos siliados.

4.2.9 - Monossacarídeos e seus derivados

Os monossacarídeos e seus derivados constituem uma das fracções (5,14%) de extractos não hidrolisados de folhas de *Momordica balsamina* (Tabela 4). Os representantes deste grupo dos compostos foram todos identificados na amostra de extractos não hidrolisados de folhas em acetona (ponto 4.2)

Além dos picos m/z 73, 75 e do ião $[M - 15]^+$, comuns em derivados oxigenados de trimetilsililo [80], os espectros de massa de monossacarídeos e seus derivados (hexoses, em particular) são caracterizados por picos m/z 191, 204 e 217 e, ainda, por picos correspondentes aos iões $[M - 15 - 90]$, $[M - 15 - 180]$, etc., resultantes da perda sistemática dos grupos TMSOH [85]. Os picos m/z 204 e 217 variam de intensidade segundo as estruturas de piranoses e de furanoses, respectivamente [85]. O espectro de massa do derivado trimetilcílico de D-glucose (Ilustração 24) é um exemplo de espectros de

massa de monossacarídeos e seus derivados sililados, em particular de hexopiranoses.

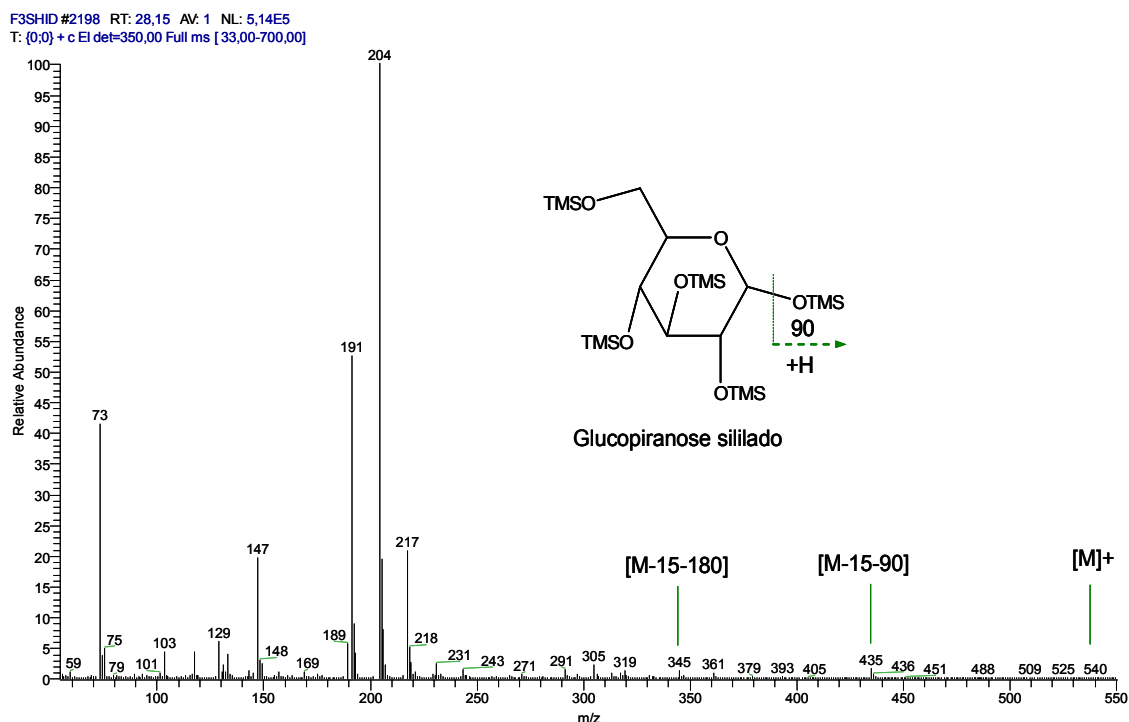


Ilustração 24: espectro de massa do derivado trimetilsilílico de D-glucose, com a proeminência do pico m/z 204, em representação de piranoses sililados.

4.2.10 - Terpenóides

O triterpenóide lupeol é um dos compostos mais abundante nos extractos hidrolisados de semente da *Momordica balsamina*, identificado exclusivamente no extracto de sementes em acetona.

O espectro de lupeol é caracterizado por um pico m/z 498 saliente do ião molecular [M⁺] e tal como os demais compostos sililados forma os picos m/z 73 e 75 e um pico [M⁺-15], mas reduzido [39]. A maior parte dos picos do espectro de lupeol forma-se pelas diferentes cisões do esqueleto triterpenóide. O pico proeminente a m/z 189 corresponde ao estável carbocatião terciário [C₁₄H₂₁]⁺ originado a partir da quebra das duas ligações C8-C14 e C12-C13 e a perda de um radical H^o. O pico m/z 369 do ião [M⁺-129] é formado pela perda do grupo TMSO, dos três carbonos do primeiro anel (C1, C2 e C3) e a captura um prótão do resto da cadeia triterpenóide [39,81]. Por outro lado, o pico m/z 279 do ião [M⁺-219] é formado pelo grupo TMSO, os dois primeiros anéis do esqueleto

triterpenóide e a perda de um radical H^o. Processos semelhantes ocorrem ao longo da cadeia e originam vários picos (Ilustração 25).

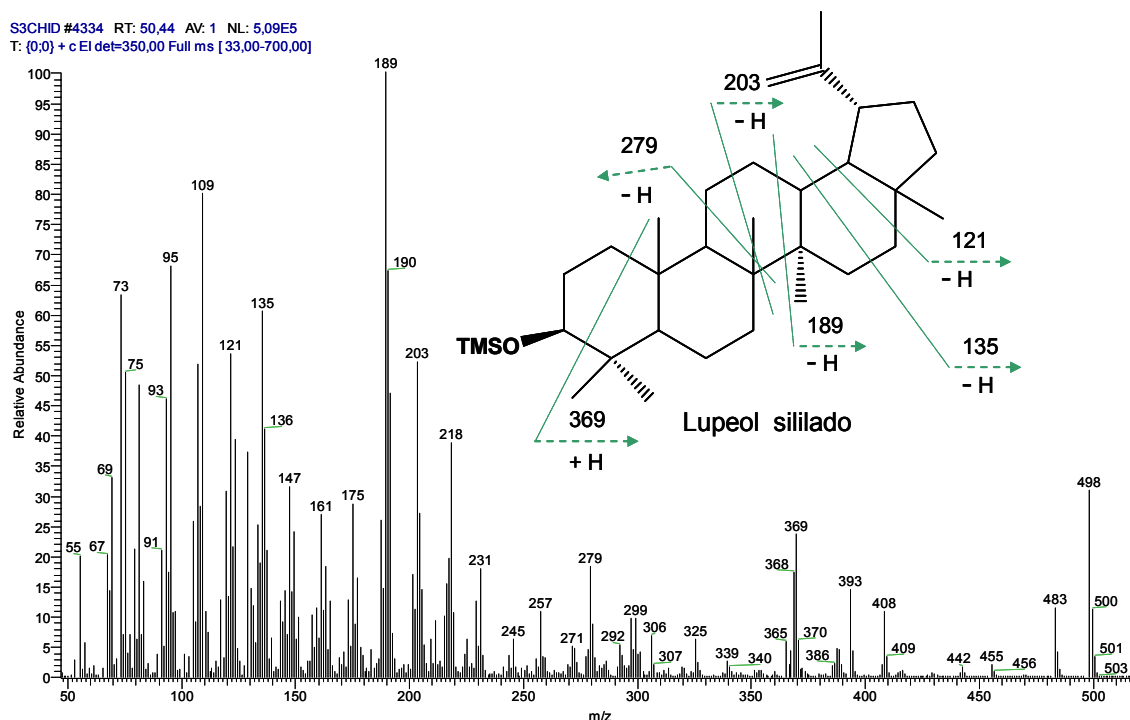


Ilustração 25: espectro de massa de lupeol siliado, que mostra os picos característicos dos triterpenóides siliados.

4.3 - Rendimentos obtidos antes da hidrólise

Antes da hidrólise, a análise por GC-MS de extractos de folhas e de sementes de *Momordica balsamina* (Ilustração 26) deu os seguintes rendimentos, por ordem decrescente da massa, de 34,63% do extracto de folhas em hexano/diclorometano (P1), 33,78% do extracto de sementes em acetona (P4), 18,92% do extracto de sementes em hexano/diclorometano (P3) e 12,63% do extracto de folhas em acetona (P2). (Ilustração 26).

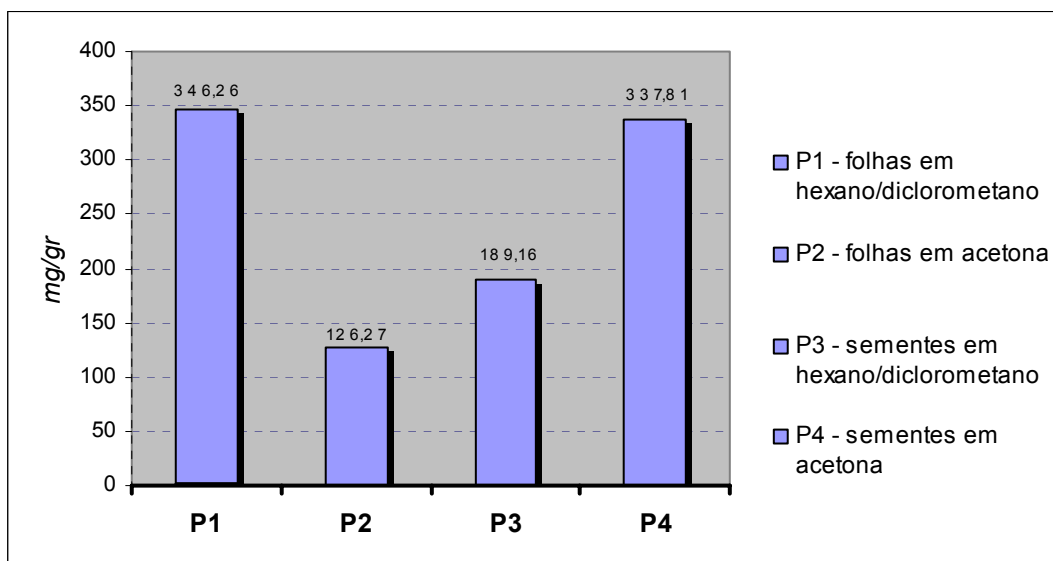


Ilustração 26: massas totais dos compostos identificados em mg/gr do extracto não hidrolisado de folhas e sementes de *Momordica balsamina*

Com a excepção do extracto não hidrolisado de folhas em acetona (P2), as massas totais das fracções identificadas nos extractos não hidrolisados de folhas e de sementes de *Momordica balsamina* são constituídas principalmente por ácidos (Ilustração 27).

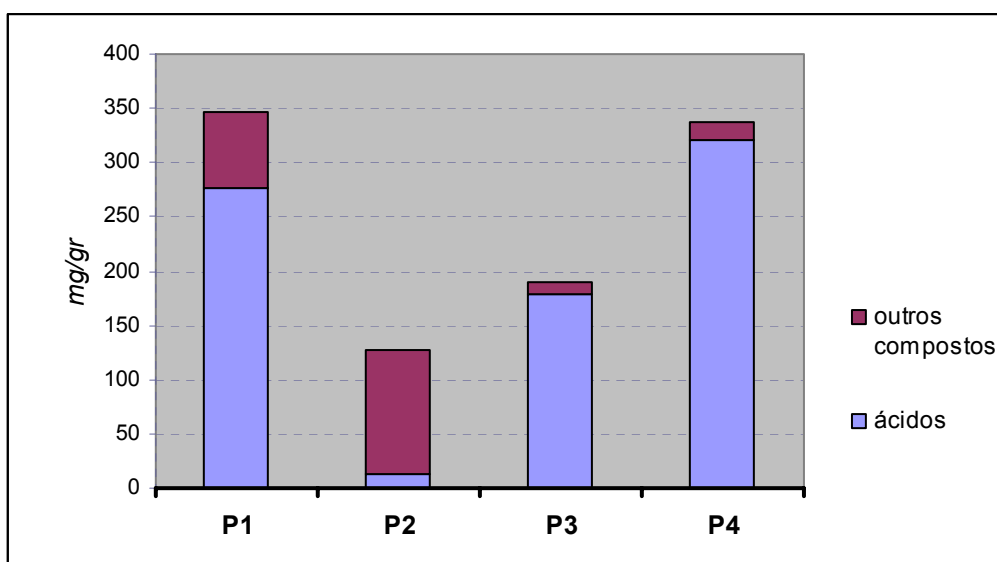


Ilustração 27: massas totais dos ácidos em comparação com os outros compostos identificados em mg/gr do extracto não hidrolisado de folhas e sementes de *Momordica balsamina*

4.3.1 - Extractos não hidrolisados de folhas

Os dois extractos não hidrolisados de folhas de *Momordica balsamina* diferem entre si nas quantidades, na ocorrência dos constituintes identificados (Tabela 4).

	P1 mg/gr	P1 %	P2 mg/gr	P2 %
Ácidos	276,84	27,68	12,27	1,23
Álcoois	14,23	1,42	61,44	6,14
Hidrocarbonetos	50,43	5,04	1,11	0,11
Monoglicerídeos	4,76	0,48	0	0
Monossacarídeos	0	0	51,44	5,14
Total	346,26	34,63	126,27	12,63

Tabela 4: rendimentos de extractos não hidrolisados de folhas de *Momordica balsamina*, onde são mostradas massas por grupos dos compostos em mg/gr do extracto (P1mg/gr e P2mg/gr) e as respectivas percentagens (P1% e P2%).

O maior rendimento obtido dos extractos não hidrolisados de folhas é de 27,68% de ácidos identificados no extracto em hexano/diclorometano (P1), principalmente, ácidos gordos (26,66%), dos quais 10,9% são de ácido palmítico. Outros grupos dos compostos apresentam, por extracto, rendimentos mais baixos. Eis: 6,14% de álcoois e 5,14% de monossacarídeos, obtidos no extracto não hidrolisado de folhas em acetona (P2); 5,04% de hidrocarbonetos e 0,48% de monoglicerídeos no extracto em hexano/diclorometano (Tabela 4). Os 6,14% de álcoois identificados neste extracto não hidrolisado de folhas em acetona são dos trióis glicerol (5,95%) e metilglicerol (0,2%). A existência de monossacarídeos e seus derivados no referido extracto não hidrolisado de folhas em acetona diferencia-o, na sua constituição, dos outros extractos.

4.3.2 - Extractos não hidrolisados de sementes

Os extractos não hidrolisados de sementes de *Momordica balsamina*, em comparação com os extractos não hidrolisados de folhas, possuem mais ácidos e, portanto, menos compostos de outras funções (Tabela 5). O extracto não

hidrolisado de sementes em acetona deu um rendimento mais alto de 32,05% de ácidos (Tabela 5), sendo 30,09% de ácidos gordos. Os álcoois representam acerca de 2% neste extracto. Ainda 0,46% de monoglicerídeos e 0,31% de terpenóides no extracto em hexano/diclorometano.

	P3 mg/gr	P3 %	P4 mg/gr	P4 %
Ácidos	179,05	17,91	320,52	32,05
Álcoois	2,45	0,24	16,90	1,69
Monoglicerídeos	4,61	0,46	0	0
Terpenóides	3,06	0,31	0,40	0,04
Total	189,16	18,92	337,81	33,78

Tabela 5: rendimentos dos extractos não hidrolisados de sementes de *Momordica balsamina*, que mostram massas por grupos dos compostos em mg/gr do extracto (P3mg/gr e P4mg/gr) e as respectivas percentagens (P3% e P4%).

Dos ácidos gordos identificados nos extractos não hidrolisados de sementes de *Momordica balsamina*, o mais abundante é o ácido α -linolénico (8,9%) na amostra de sementes em acetona (P4), seguido de ácidos oleico (6,04%), palmítico (5,21%), linoleico (5,17%) e esteárico (3,39%) no mesmo extracto de sementes em acetona (Ilustração 28).

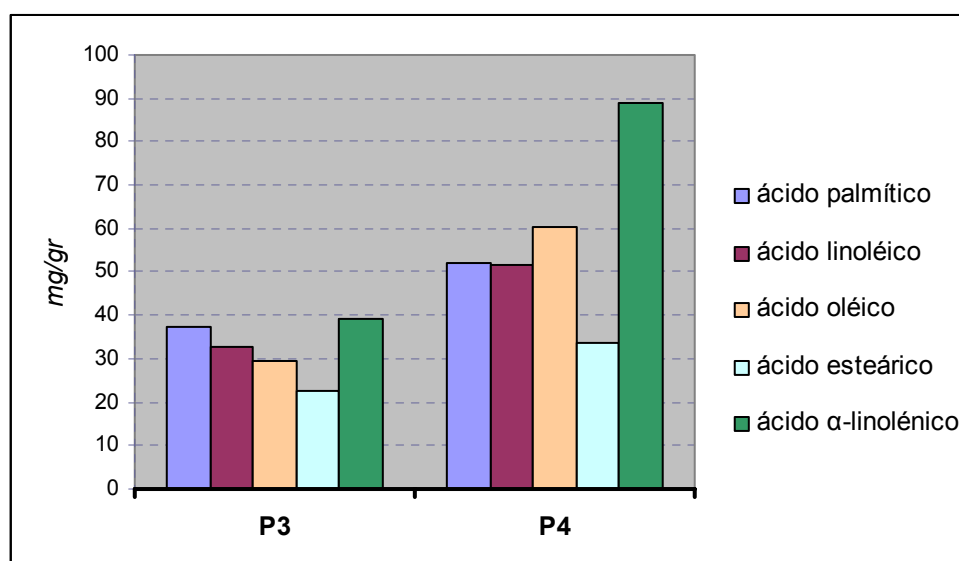


Ilustração 28: os ácidos gordos mais abundantes nos extractos não hidrolisados de sementes de *Momordica balsamina*.

4.4 - Rendimentos obtidos depois da hidrólise

Depois da hidrólise foi observado um aumento significativo das massas totais dos componentes identificados em mg/gr do extracto (Ilustração 29). O rendimento mais alto foi de 56,68% do extracto de sementes em hexano/diclorometano (P3), seguido de 51,92% do extracto de folhas hexano/diclorometano (P1) e de 40,90% do extracto de sementes em acetona (P4). O menor rendimento foi de 18,91% obtido no extracto hidrolisado de folhas em acetona (Ilustração 29), em consequência das perdas totais e parciais das massas de alguns compostos (ponto 4.3.1) identificados, antes da hidrólise, no referido extracto de folhas em acetona (P2).

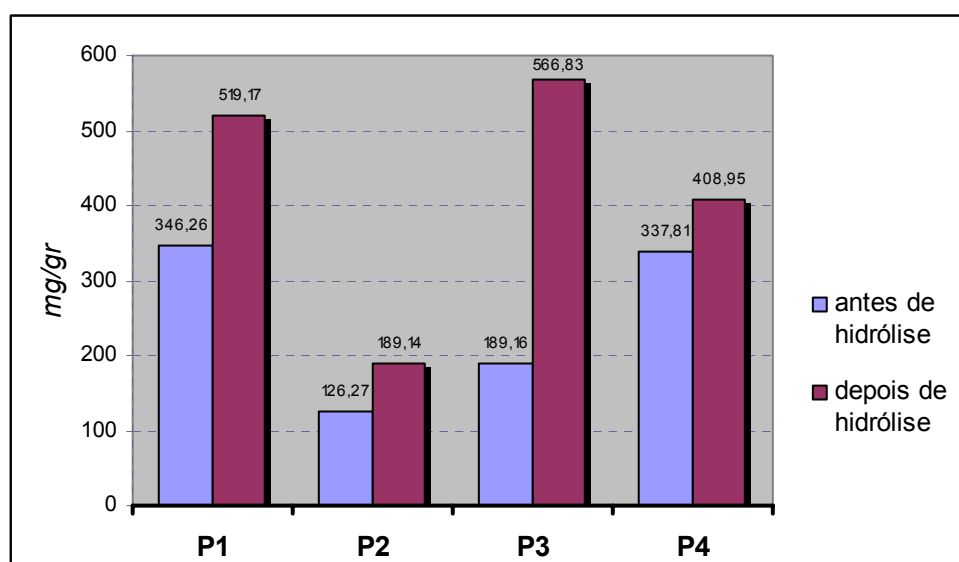


Ilustração 29: comparação das massas totais dos compostos identificados por GC-MS, antes e depois da hidrólise, nos extractos de folhas e de sementes de *Momordica balsamina*.

Os altos rendimentos dos compostos identificados nos extractos hidrolisados de folhas e de sementes de *Momordica balsamina* resultam do aumentos das massas, principalmente, de ácidos gordos (Ilustração 30). Os maiores rendimentos de ácidos gordos foram obtidos nos de extractos sementes (54,50%) e de folhas (38,00%) preparados em hexano/diclorometano.

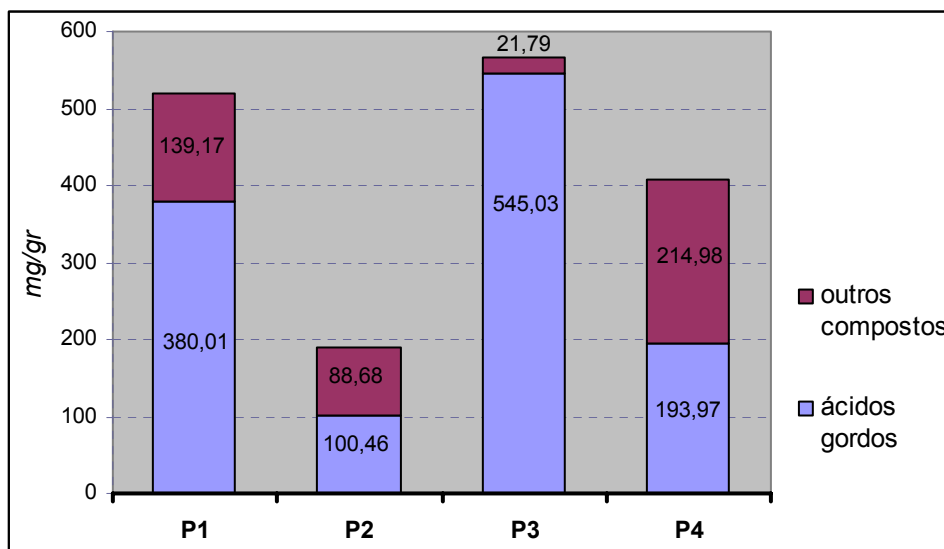


Ilustração 30: massas dos ácidos gordos em comparação com as de outros compostos, em mg/gr de extractos hidrolisados de folhas e de sementes de *Momordica balsamina*.

4.4.1 - Extractos hidrolisados de folhas

Em relação ao rendimento obtido antes da hidrólise, o rendimento de 51,92% do extracto hidrolisado de folhas em hexano/diclorometano (Ilustração 29) resultou de um crescimento na ordem dos 17,29% influenciado, principalmente, pelo aumento de 13,65% de ácidos e, também, cerca de 5% de álcoois (Tabela 6). Por outro lado, neste extracto hidrolisado de folhas o rendimento foi influenciado pelo crescimento negativo de 1,75%, resultante da perda de 0,93% de hidrocarbonetos e de 0,42% de monoglicerídeos (Tabela 6).

	mg/gr de P1		Crescimentos	
	Antes	Depois	mg/gr	%
Ácidos	276,84	413,34	136,50	13,65
Álcoois	14,23	64,16	49,93	4,99
Hidrocarbonetos	50,43	41,14	-9,25	-0,93
Monoglicerídeos	4,76	0,53	-4,23	-0,42
Total	346,26	519,17	172,91	17,29

Tabela 6: rendimentos do extracto de folhas em hexano/diclorometano (P1) da *Momordica balsamina*, onde são mostradas massas por grupos dos compostos em mg/gr do extracto (antes e depois da hidrólise) e os respectivos crescimentos (em massas e em percentagens).

Do rendimento de 41,33% de ácidos, cerca de 38% corresponde a fracção de ácidos gordos identificados neste extracto de folhas. Os ácidos gordos mais abundantes neste extracto hidrolisado de folhas são os ácidos palmítico (15,27%), linoleico (10,21%) e esteárico (5,01%).

O rendimento baixo de 18,91% do extracto hidrolisado de folhas em acetona resultou da fraca abundância de ácidos (cerca de 14%) e da perda de 5,7% de álcoois e de todos os monossacarídeos (-5,14%). A presença de terpenóides e de ésteres metílicos de ácidos gordos neste extracto de folhas em acetona contribuiu em 3,87% do crescimento total de 6,29%, em relação ao rendimento obtido antes da hidrólise no mesmo extracto de folhas em acetona (Tabela 7).

	mg/gr de P2		Crescimentos	
	Antes	Depois	mg/gr	%
Ácidos	12,27	139,86	127,59	12,76
Álcoois	61,44	4,44	-57,00	-5,70
Hidrocarbonetos	1,11	6,13	5,02	0,50
Monossacarídeos	51,44	0	-51,44	-5,14
Terpenóides	0	29,27	29,27	2,93
Ésteres metílicos	0	9,43	9,43	0,94
Total	126,26	189,13	62,87	6,29

Tabela 7: rendimentos do extracto de folhas em acetona (P2) da *Momordica balsamina*, onde são mostradas massas por grupos dos compostos em mg/gr do extracto (antes e depois da hidrólise) e os respectivos crescimentos (em massas e em percentagens).

4.4.2 - Extractos hidrolisados de sementes

O extracto de sementes em hexano/diclorometano da *Momordica balsamina*, analisado depois da hidrólise, deu um alto rendimento de 55,73% de ácidos, sendo maioritariamente ácidos gordos (54,5%). Os álcoois, os monoglicerídeos e os terpenóides representam, conjuntamente, cerca de 1%

do rendimento total de 56,68% dos compostos identificados neste extracto de sementes em hexano/diclorometano (Tabela 8).

	mg/gr de P3		Crescimentos	
	Antes	Depois	mg/gr	%
Ácidos	175,05	557,32	378,27	37,83
Álcoois	2,45	6,65	4,20	0,42
Monoglicerídeos	4,61	0,71	-3,90	-0,39
Terpenóides	3,06	2,14	-0,91	-0,09
Total	189,16	566,83	377,66	37,77

Tabela 8: rendimentos do extracto de sementes em hexano/diclorometano (P3) da *Momordica balsamina*, que mostram massas por grupos dos compostos em mg/gr do extracto (antes e depois da hidrólise) e os respectivos crescimentos (em massas e em percentagens).

Entre os ácidos gordos identificados neste extracto, os mais abundantes são os ácidos α -linolénico (17,62%), linoleico (11,21%), oleico (10,32%), palmítico (8,56%) e esteárico (4,53%), formando uma fracção de 52,24% da massa do extracto hidrolisado de sementes em hexano/diclorometano (Ilustração 31).

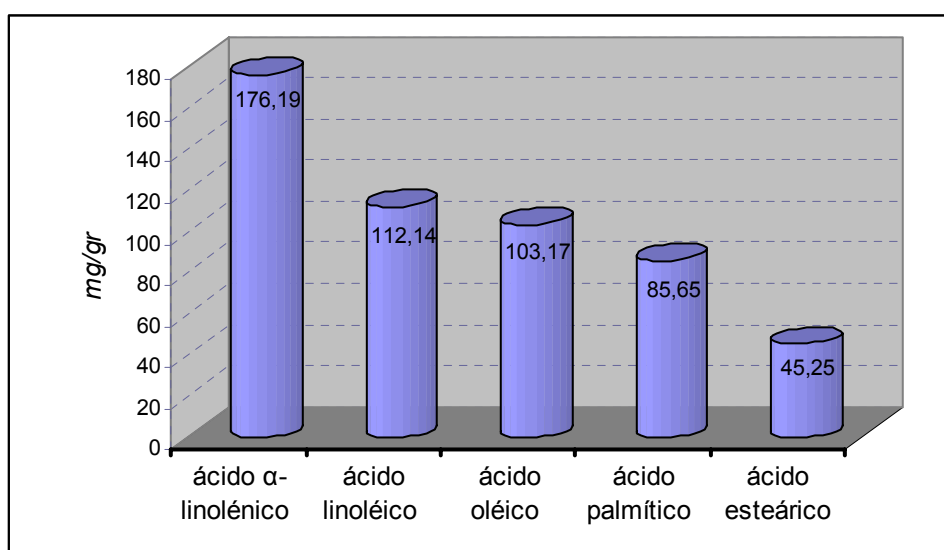


Ilustração 31: ácidos gordos mais abundantes em mg/gr do extracto hidrolisado de sementes em hexano/diclorometano da *Momordica balsamina*.

O rendimento de 40,9% do extracto hidrolisado de sementes em acetona da *Momordica balsamina* representa um crescimento de 7,11% da massa total dos compostos identificados neste extracto, em comparação com o mesmo extracto analisado antes da hidrólise. Neste extracto hidrolisado de sementes em acetona foi verificada uma diminuição de ácidos e de álcoois na ordem de 6,62% e de 1,33%, respectivamente (Tabela 9). Em compensação, houve um aumento de 14,33% de terpenóides, sendo 11,56% de lupeol.

	mg/gr de P4		Crescimentos	
	Antes	Depois	mg/gr	%
Ácidos	320,52	254,33	-66,19	-6,62
Álcoois	16,90	3,61	-13,29	-1,33
Terpenóides	0,40	143,70	143,30	14,33
Ésteres metílicos	0	7,31	7,31	0,73
Total	337,81	408,95	71,14	7,11

Tabela 9: rendimentos do extracto de sementes em acetona (P3) da *Momordica balsamina*, onde são mostradas massas por grupos dos compostos em mg/gr do extracto (antes e depois da hidrólise) e os respectivos crescimentos (em massas e em percentagens).

5 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

5.1 - Conclusões

A maior classe de compostos presente nos extractos de folhas e de sementes de *Momordica balsamina*, antes e depois da hidrólise, é a dos ácidos gordos. Foram identificados, nos extractos de folhas e nos extractos de sementes, em maior concentração, por ordem decrescente de abundância, os ácidos palmítico, linoleico, α -linolénico, oleico e esteárico.

A seguir aos ácidos gordos, os compostos mais abundantes nos extractos de folhas são os álcoois e nos extractos de sementes são os terpenóides. A maior concentração dos terpenóides foi identificada no extracto hidrolisado de sementes em acetona, sendo lupeol o componente maioritário (115,61 mg/gr). O lupeol é conhecido como tendo efeitos anti-tumorais para mamíferos, em doses de 25 até 200 mg/Kg. Actua como um inibidor competitivo de tripsina e quimiotripsina, enzimas que hidrolisam proteínas em peptonas.

As amostras submetidas a hidrólise revelaram um aumento de quantidade, em número e massa, dos compostos identificados. Este facto subentende que os extractos contêm muitos componentes na forma de ésteres. A presença de glicerol nos extractos reforça esta hipótese. Porém, a baixa concentração de glicerol em algumas amostras hidrolisadas fica a dever-se à sua solubilidade na água durante a hidrólise. O mesmo fenómeno de diminuição de massa foi verificado numa fracção importante dos compostos alifáticos de cadeias curtas e pela mesma razão de solubilidade na água os monossacarídeos, identificados nos extractos não hidrolisados de folhas em acetona, não aparecem nos extractos hidrolisados.

Durante a hidrólise os ésteres foram convertidos nos respectivos álcoois e ácidos. A presença de monoglicerídeos de ácidos gordos nos extractos hidrolisados é resultado da conversão incompleta dos triglicerídeos em glicerol e respectivos ácidos gordos.

5.2 - Perspectivas futuras

A realização deste trabalho é um contributo para o entendimento da relação da *Momordica balsamina* com as suas aplicações e constitui um início de estudo nesta linha de investigação. Pretende-se que esta investigação tenha continuidade no futuro. O estudo desta espécie deverá ser feito com mais variedade de amostras de diferentes partes da planta (incluindo raízes) e envolver mais técnicas de purificação e análise de fracções. Deverá também ser desenvolvido a níveis mais avançados, no que toca a determinação dos princípios activos dos compostos isolados.

Futuramente, o estudo deverá alargar a mais espécies de plantas moçambicanas, seleccionadas pelos seus benefícios nutricionais e fitoterapêuticos das populações locais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CIA-USA. The World Factbook (the web page about countries). www.cia.gov/cia/publications/factbook, 2005.
- [2] INE. Dados básicos sobre Moçambique. Maputo: www.ine.gov.mz, 2005.
- [3] Bourdy G, Oporto P, Gimenez A, Deharo E. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians J. Ethnopharm. 2004;93:269 -77.
- [4] Pax E, Muller EGO. Cucurbitaceae. In Engler and Prantl. Die Natürlichen Pflanzenfamilien 1889;4:1 - 38.
- [5] Lawrence GHM. Taxonomia das Plantas Vasculares. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1977.
- [6] Hutchings A, Scott AH, Lewis G, Cunningham AB. Zulu medicinal plants, an inventory. Pietermaritzburg: University of Natal Press, 1996.
- [7] Viridi J, Sivakami S, Shahani S, Suthar AC, Banavalikar MM, Biyani MK. Antihyperglycemic effects of three extracts from *Momordica charantia*. J. Ethnopharm. 2003;88:107 - 11.
- [8] Jackson WPU. Origins and meanings of names of South African plant genera Ecolab, Botany Dept. Cape Town: University of Cape Town, 1990.
- [9] Muñoz V, Sauvain M, Bourdy G, Callapa J, Rojas I, Vargas L, Tae A, Deharo E. The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosekene Indians. J. Ethnopharm. 2000b;69:139 - 55.
- [10] Jeffrey C. Cucurbitaceae. Flora zambesiaca 1978;4: 419 - 29.

- [11] Miura T, Ichiki H, Hashimoto I, Iwamoto N, Kato M, Kubo M, Ishihara E, Komatsu Y, Okada M, Ishida T, Tanigawa K. Antidiabetic activity of a xanthone compound, mangiferin. *Phytomed.* 2001a;8:85 - 7.
- [12] Kiho T, Watanabe T, Nagai K, Ukai S. Hypoglycemic activity of polysaccharide fraction from rhizome of *Rehmannia glutinosa* Libosch. f. *hueichingensis* Hsiao and the effect on carbohydrate metabolism in normal mouse liver. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 1992;112:393 - 400.
- [13] Cheng HQ, Zhang Y, Guo YY. The mechanisms of Chinese traditional medicines to lower blood glucose. *Journal of Chinese Traditional Medicine* 1998;16:53 - 5.
- [14] Gershenzon J, Croteau R. *Herbivores: their interactions with secondary metabolites.* San Diego, California: Academic Press, 1991.
- [15] Addae-Kyereme J, Croft SL, Kendrick H, Wright CW. Antiplasmodial activities of some Ghanaian plants traditionally used for fever/malaria treatment and of some alkaloids isolated from *Pleiocarpa mutica* ; in vivo antimalarial activity of pleiocarpine. *J. Ethnopharm.* 2001;76:99 - 103.
- [16] Bionatural. Properties of *Momordica balsamina*. http://www.geocities.com/bionaturalza/femme.htm#Kekana_med, 2004.
- [17] Deineka VI, Maslov AN, Borzenko ON, Sirotin AA, Deineka LA. Change of triglyceride composition of cucurbitaceae and *Taraxacum officinale* seed oil during ripening. *Chemistry of Natural Compounds* 2003;39:319 - 21.
- [18] Belitz HD, Grosh W. *Food Chemistry.* Berlin: Springer, 2004.
- [19] Torsell KBG. The Mevalonic Pathway - The Terpenes. In: *Natural Products Chemistry. A Mechanistic and Biosynthetic Approach to Secondary Metabolism:* John Wiley & Sons Lim, 1981.

- [20] Croft KP, Juttner R, Slusarenko AJ. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* sv *phaseolicola*. *J. Plant Physiol.* 1993;101:13 - 24.
- [21] Back EL. Pitch Control, Wood Resin and Deresination. Atlanta, USA: Tappi Press, 2000.
- [22] Devon TK, Scott AI. The Terpenes. In: Handbook of Naturally Occurring Compounds. London: Academic Press, 1972.
- [23] Steele CL, Kato S, Bohlmann J, Croteau R. Regulation of Oleoresinosis in Grand Fir (*Abies grandis*). Differential Transcriptional Control of Monoterpene, Sesquiterpene, and Diterpene Synthase Genes in Response to Wounding. *J. Plant Physiol.* 1998;116:1497 - 504.
- [24] Simões CMO, Spitzer V. Farmacognósia da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis Editora da UFSC, 1999.
- [25] Penfold AR, Willis JR. The eucalypts: botany, cultivation, chemistry and utilization. London: Leonard Hill, 1961.
- [26] Doran JC. Eucalyptus leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing. Melbourne: Intaka: House, A. P. N., 1991.
- [27] Loughrin JH, Manukian A, Heath RR, Turlings TCJ, H. TJ. Diurnal cycle of emission of induced volatile terpenoids by herbivore-injured cotton plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 1994;91:11836 - 40.
- [28] Fäldt J. Volatile constituents in conifers and conifer related wood-decaying fungi. Biotic influences on monoterpene compositions in pines. Royal Institute of Technology, 2000.
- [29] Takabayashi J, Dicke M, Takahashi S, Posthumus MA, Van Beek TA. Leaf age affects composition of herbivore-induced synomones and attraction of predatory mites. *J. Chem. Ecol.* 1994a;20:373 - 86.

- [30] Dicke M. Local and systemic production of volatile herbivore-induced terpenoids: their role in plant-carnivore mutualism. *J. Plant Physiol.* 1994;143:465 - 72.
- [31] Vitti AMS, Brito JO. Óleo essencial de Eucalipto. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2003.
- [32] Santos GG, Alves JCN, Rodilla JML, Duarte AP, Lithgow AM, Urones JG. Terpenoids and Other Constituents of *Eucalyptus globulus*. *Phytochem.* 1997;44:1309 - 12.
- [33] Das MC, Mahato SB. Triterpenoids. *Phytochem.* 1983;22:1071 - 95.
- [34] Takasakia M, Konoshimaa T, Muratab Y, Sugiurab M, Nishinoc H, Tokudac H, Matsumotod K, Kasaid R, Yamasaki K. Anticarcinogenic activity of natural sweeteners, cucurbitane glycosides, from *Momordica grosvenori*. *Cancer Lett.* 2003;198: 37 - 42.
- [35] Mahato SB, Sarkar SK, Poddar SG. Triterpenoid saponins. *Phytochem.* 1988;27:3037 - 67.
- [36] Fulda S, Jeremias I, Steiner HH, Pietsch T, Debatin KM. Betulinic acid: a new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells. *Int. J. Cancer* 1999;82:435 - 41.
- [37] Zuco V, Supino R, Righetti SC, Cleris L, Marchesi E, Passerini CG, Formelli F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett.* 2002;175:17 - 25.
- [38] Kashiwada Y, Hashimoto F, Cosentino LM, Chen CH, Garrett PE, Lee KH. Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents. *J. Med. Chem.* 1996;39:1016 - 7.
- [39] Geetha T, Varalaxmi P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in adjuvant-induced arthritis. *Fitoterapia* 1998;69:13 - 9.

- [40] Rajic A, Kweifio-Okai G, Macrides T, Sandeman RM, Chandler DS, Polya GM. Inhibition of serine proteases by anti-inflammatory triterpenoids. *Planta Medica* 2000;66:206 - 10.
- [41] Kweifio-Okai G, de Munk F, Macrides TA, Smith P, Rumble BA. Anti-arthritic mechanisms of Lupeol Triterpenes. *Drug Develop Research* 1955;36:20 - 4.
- [42] Novotny L, Vachalkova A, Biggs D. Ursolic acid: an antitumorigenic and chemopreventive activity. *Neoplasma* 2001;48:241 - 6.
- [43] Begum S, Ahmed M, Siddiqui BS, Khan A, Saify ZS, Arift M. Triterpenes, a sterol and a monocyclic alcohol from *Momordica charantia*. *Phytochem.* 1997;44:1313 - 20.
- [44] Halaweish FT, Tallamy DW, Santana E. Cucurbitacins: a role in cucumber beeter steroid nutrition. *J. Chem. Ecol.* 1999;25:2373 - 83.
- [45] Akihisa T, Yasukawa K, Tokuda H. Bioactive Natural Products (Part J). *Studies in Natural Products Chemistry* 2003;29:73 - 126.
- [46] Miro M. Cucurbitacin and their pharmacological effects. *Phytother. Res.* 1995;9:159 - 68.
- [47] Lavie D, Glotter E. The cucurbitacins, a group of tetracyclic triterpenes. *Fortschr, Chem. Org. Naturst* 1971;29:307 - 56.
- [48] Kimura Y, Akihisa T, Yuasa N, Ukiya M, Suzuki T, Toriyama M, Motohashi S, Tokuda H. Cucurbitane - Type Triterpenoids from the Fruit of *Momordica charantia*. *J. Nat. Prod.* 2005;68:807 - 9.
- [49] Ferguson JE, Metcalf RL, Fischer DC. Disposition and fate of cucurbitacin B in five species of diabroticites. *J. Chem. Ecol.* 1985;11:1307 - 21.
- [50] Tallamy DW, Whittington DP, Defurio F, Fontaine DA, Gorski PM, Gothro P. The effect of sequestered cucurbitacins on the pathogenicity of

- Metarhizium anisopliae (Moniliales: Moniliaceae) on spotted cucumber beetle eggs and larvae (Coleoptera: Chrysomelidae). Environ. Entomol. 1998;27:366 - 72.
- [51] Afifi MS, Ross SA, Elsohly MA, Naeem ZE, Halaweish FT. Cucurbitacins of Cucumis prophetarum and Cucumis prophetarum. J. Chem. Ecol. 1999;25:847 - 59.
- [52] Halaweish FT, Tallamy DW. Production of cucurbitacins by cucurbit cell cultures. Plant Sci. 1998;131:209 - 18.
- [53] Andersen JF, Plattner RD, Weisleder D. Metabolic transformations of cucurbitacinas by Diabrotica virgifera virgifera Leconte and D. undecimpunctata howardi Barber. Insect. Biochem. 1988;18:71 - 7.
- [54] Clark AJ, Bloch K. Conversion of ergosterol to 22-dehydrocholesterol in Blattella germanica. J. Biol. Chem. 1959;234:2589 - 93.
- [55] Hussein HA, Abdel-Halim OB, Marwan ME, El-Gamal AA, Mosana R. Dendrocyin: an isocucurbitacin with novel cyclic ide chain from Dendrosicyos socotrana Phytochem. 2004;65:2551 - 6.
- [56] Dinan L, Whiting P, Girualt J, Lafont R, Dhadialla TS, Cress DE, Mugat B, Antoniewski C, Lepesant J. Cucurbitacins are insect steroid hormone antagonists acting at the ecdysteroid receptor. Biochem. 1997a;237:643 - 50.
- [57] Nishida R, Yokoyama M, Fukami H. Sequestration of cucurbitacin analogs by New and Old World chrysomelid leaf beetles in the tribe Luperini. Chemoecol. 1992;3:19 - 24.
- [58] Hagedorn HH. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Oxford, U.K: Pergamon Press, 1985.
- [59] Truman JW. Hormonal approaches for studying nervous system development in insects. Adv. Insect Physiol. 1988;21:1 - 34.

- [60] Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 1998;56:317 - 33.
- [61] Padayatty SJ, Sun H, Wang Y. Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. *Ann Intern Med* 2004;140:533 - 7.
- [62] Petersen M, Simmonds MSJ. Molecules of Interest : Rosmarinic acid. *Phytochem.* 2003;62:121 - 5.
- [63] Meloan CE. Chemical Separations: Principles, Techniques and Experiments. Kansas, USA: Wiley Interscience Publication, 1999.
- [64] Pombeiro AJLO. Técnicas e Operações Unitárias Em Química Laboratorial. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1998.
- [65] Queiroz SCN, Collins CH, Jardim CSF. Métodos de extracção e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Química Nova* 2001;24:68 - 76.
- [66] Holmbom B. Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping and Papermaking. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1999.
- [67] Sitholé BB. Modern Methods for the Analysis of Extractives from Wood and Pulp: a Review. *Appita j.* 1992;45:260 - 4.
- [68] Fleisher A. The poroplast extraction technique in the flavour and fragrance industry. *Perfum. Flavour* 1990;15:27 - 34.
- [69] Silvestre AJD, Pereira CCL, Neto CP, Evtuguin DV, Duarte AC, Cavaleiro JAS, Furtado FP. Chemical Composition of Pitch Deposits from an ECF Eucalyptus globulus Bleached Kraft Pulp Mill: Its Relationship with Wood Extractives and Additives in Process Streams. *Appita J.* 1999;52:375-82.
- [70] Ullsten NH, Hedenqvist MS. A new test method based on head space analysis to determine permeability to oxygen and carbon dioxide of flexible packaging. *Polymier Testing* 2003;22:291 - 5.

- [71] Fernando LN, Grun IU. Headspace-SPME analysis of volatiles of the ridge gourd (*Luffa acutangula*) and bitter gourd (*Momordica charantia*) flowers. *Flavour and Fragr. J.* 2001;16:289 - 93.
- [72] Cao X, Ito Y. Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromat.* 2003;1021:117 - 24.
- [73] Barrionuevo WR, Lanças FM. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. *Química Nova* 2001;24:172 - 5.
- [74] Arthur CL, Pawliszyn J. Solid-Phase Micro Extraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* 1990;62:2145 - 8.
- [75] Abu-Samra A, Morris JS, Koirtzmann SR. Wet ashing of some biological samples in a microwave oven. *Anal. Chem.* 1975;47:1475 - 7.
- [76] Ganzler K, Salgo A. Microwave extraction: a new method superseding traditional Soxhlet extraction. *Z. Lebensm Unters Forsch* 1987;184:274 - 6.
- [77] Bartle KD, Clifford AA. Supercritical Fluid Extraction and Chromatography of Lipid Materials. In: *Developments in the Analysis of Lipids*. Cambridge - United Kingdom: The Royal Society of Chemistry, 1994.
- [78] Freire CSR, Silvestre AJD, Pascoal Neto C. Identification of New Hydroxy Fatty Acids and Ferulic Acid Esters in the Wood of *Eucalyptus globulus*. *Holzforschung* 2002;56:143 - 9.
- [79] Ekman R. Suberin Monomers and Triterpenoids from the Outer Bark of *Betula verrucosa* Ehrh. *Holzforschung* 1983;37:205 - 11.
- [80] Sharkey AG, Friedel RA, Langer SH. Mass Spectra of Trimethylsilyl Derivatives. *Anal. Chem.* 1957;29:770 - 6.

- [81] Pavia D, Lampman G, Kriz G. Mass Spectrometry In: Vondeling J, Barrosse E, editors. *Intruduction to Spectroscopy*. Florida: Harcourt, Inc., 2001. pp. 390 - 462.
- [82] Minmin L, Meiling Q, Changbin Z, Shan Z, Ruonong F, Junxiong H. Gas chromatography – mass spectrometry analysis of volatile compounds from *Houttuynia cordata* Thunb after extraction by solid-phase microextraction, flash evaporation and steam distillation. *Anal. Chim. Acta* 2005; 531:97 - 104.
- [83] Johnstone RAW, Rose ME. *Mass Spectrometry for Chemists and Biochemists*. In. UK: Cambridge University Press, 1996. pp. 142 - 88.
- [84] Evershed RP. *Mass Spectrometry of Lipids*. In: Hamilton RJ, Hamilton S, editors. *Lipids Analysis - A Practical Aproach*. Oxford: IRL Press, 1992. pp. 263 - 308.
- [85] DeJongh DC, Radford T, Hribar JD, Hanessian S, Bieber M, Dawson G, Sweely CC. Analysis of Trimethylsilyl Derivatives of Carbohydrates by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* 1969;91:1728 - 40.