



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Caracterização química das sementes de *Foeniculum vulgare* Mill

Ana Cláudia Spranger Mota

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotechnologia
(2º ciclo de estudos)
Orientador: Prof. Doutora Maria Lúcia Almeida da Silva

Covilhã, Junho de 2014

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Lúcia Silva, por todos os conhecimentos transmitidos, ajuda, disponibilidade, apoio e paciência ao longo da realização deste trabalho.

À Engenheira Violeta Lopes do BPGV por ter enviado as sementes de funcho, essenciais para a realização desta investigação.

Ao professor Doutor Jesus Rodilla pela ajuda na realização dos espetros de RMN.

Aos colegas de laboratório, em especial à Sofia Pombal, pela ajuda e experiência transmitida, que contribuiu para a realização deste trabalho.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação académica durante estes anos.

A todos os meus amigos e colegas de curso, pelo apoio e momentos bem passados.

Ao João Pedro, pelo companheirismo, carinho, paciência e apoio durante estes anos, e à sua família por sempre me ter tratado bem.

À minha família, em especial à minha avó, pelo apoio ao longo destes anos e aos meus irmãos, por todo o carinho, apoio e paciência que têm, sem eles nada disto seria possível.

À Universidade da Beira Interior por ter permitido a realização da minha formação académica e à cidade da Covilhã por me ter acolhido durante seis anos, recheados de momentos únicos.

Por fim a todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão desta etapa.

Muito obrigada a todos!

Resumo

Nos últimos anos tem vindo a aumentar o interesse pelos produtos naturais, como é o caso das plantas medicinais e aromáticas devido ao seu amplo espectro de ação na indústria alimentar, cosmética e farmacêutica e na medicina popular.

Esta investigação consistiu na caracterização química das sementes do *Foeniculum vulgare*, vulgarmente conhecido como funcho, pertencente à família *Apiaceae*, sendo esta uma importante planta medicinal com atividade biológica comprovada. Para tal, procedeu-se a análise da composição química dos óleos essenciais das sementes de *Foeniculum vulgare*, colhidas em várias regiões de Portugal. Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação com Clevenger, com um rendimento entre 0.49 e 2.94%. Estes óleos essenciais foram posteriormente analisados por GC-MS, o que permitiu a identificação de dezassete compostos. Os constituintes maioritários dos óleos identificados foram o *trans*-anetol (7.9-78.5%), o estragol (1.8-66.0%) e a fenchona (12.0-37.0%).

Realizou-se também a análise cromatográfica por HPLC - DAD dos extratos resultantes da extração com Soxhlet, com a finalidade de identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes na planta. Foram identificados cinco compostos fenólicos, sendo eles o ácido gálico, ácido cumárico, ácido protocatecuico, ácido vanílico e a rutina.

Palavras-chave

Foeniculum vulgare; óleos essenciais; composição química; GC-MS; HPLC-DAD; *trans*-anetol; fenchona; estragol.

Abstract

In recent years, there has been an increased interest in natural products, such as medicinal and aromatic plants, due to its broad spectrum of action in the food, cosmetic and pharmaceutical industry and in folk medicine.

In this work, it was done the chemical characterization of *Foeniculum vulgare* seeds, commonly known as fennel, belonging to the *Apiaceae* family, being this an important medicinal plant, with proved biological activity. To do so, it was performed the chemical composition analysis of the essential oil of *Foeniculum vulgare* seeds harvested in different regions of Portugal. The essential oils were obtained by hydrodistillation using a Clevenger, with a yield between 0.49 and 2.94%. These essential oils were further analyzed by GC-MS, which allowed the identification of seventeen compounds. The main constituents identified were *trans*-anethole (7.9-78.5%), estragole (1.8-66.0%) and fenchone (12.0-37.0%).

It was also performed the chromatographic analysis by HPLC - DAD of the resulting extracts of Soxhlet extraction, in order to identify and quantify the phenolic compounds present in the plant. Five phenolic compounds were identified, namely gallic acid, coumaric acid, protocatechuic acid, vanilic acid and rutine.

Keywords

Foeniculum vulgare; essential oils; chemical composition; GC-MS; HPLC-DAD; *trans*-anethole; fenchone; estragole.

Índice

Capítulo I. Introdução	1
Capítulo II. Revisão Bibliográfica	2
2.1 Plantas Medicinais	2
2.2 Óleos Essenciais	3
2.2.1 Compostos ativos dos óleos essenciais	4
2.2.2 Fatores que afetam a composição química dos óleos essenciais	4
2.3 Métodos de extração	5
2.3.1 Extração por hidrodestilação	5
2.3.2 Extração com solventes orgânicos - Soxhlet	6
2.4 <i>Foeniculum vulgare</i>	7
2.4.1 Descrição botânica.....	8
2.4.2 Composição do óleo do <i>Foeniculum vulgare</i>	9
2.4.3 Utilizações do <i>Foeniculum vulgare</i>	10
2.5.1 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).....	11
2.5.3 Espectroscopia de Ultravioleta (UV)	12
2.5.4 Espectroscopia de infravermelho (IV)	12
2.5.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	13
Capítulo III. Materiais e Métodos	14
Equipamentos	14
Reagentes	17
3.1 Material vegetal.....	17
3.2 Determinação da composição química do óleo essencial.....	19
3.2.1 Extração por Hidrodestilação	19
3.2.2 Análise cromatográfica por GC-MS.....	20
3.3 Análise de compostos fenólicos na planta.....	20
3.3.1 Extração com solventes orgânicos - Soxhlet	20
3.3.2 Análise cromatográfica por HPLC - DAD	21
3.4 Espectroscopia.....	22
3.4.1 Espectroscopia de Infravermelho (IV)	22
3.4.2 Espectroscopia de ultravioleta (UV)	22
3.4.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	23
Capítulo IV. Resultados e Discussão	24
4.1 Composição química do óleo essencial das sementes de funcho.....	24

4.1.1 Extração por hidrodestilação	24
4.1.2 Análise cromatográfica por GC-MS	25
4.1.2.1 Identificação dos compostos químicos do óleo essencial do funcho	25
4.2 Compostos fenólicos dos extratos da planta	32
4.2.1 Extração com Soxhlet	32
4.2.2 Compostos fenólicos por HPLC - DAD	33
4.3 Caracterização por espectroscopia	41
4.3.1 Fenchona	41
4.3.2 <i>trans</i> - anetol	42
4.3.3 Estragol	42
Capítulo V. Conclusão	46
Considerações finais	46
Perspetivas futuras	48
Bibliografia	49
Anexos	55
Anexo 1	55
Anexo 2	65

Lista de Figuras

Figura 1 - Imagem ilustrativa da hidrodestilação com Clevenger...	6
Figura 2 - Imagem ilustrativa do método de extração com Soxhlet.	7
Figura 3 - Imagem representativa da planta em estudo..	9
Figura 4 - Evaporador rotativo.....	14
Figura 5 - Aparelho de HPLC - DAD	14
Figura 6 - Aparelho de GC-MS.....	15
Figura 7 - Aparelho de IV	15
Figura 8 - Aparelho de UV	16
Figura 9 - Aparelho de RMN	16
Figura 10 - Imagem ilustrativa das sementes do funcho.	17
Figura 11 - Mapa com os locais de recolha das amostras de semente de funcho.....	18
Figura 12 - Montagem experimental da extração com Clevenger.	19
Figura 13 - Montagem experimental da extração com Soxhlet.	21
Figura 14 - Cromatograma do extrato pertencente à amostra 09908, a um comprimento de onda de 280nm.	34
Figura 15 - Cromatograma do extrato pertencente à amostra 09913, a um comprimento de onda de 280nm.	34
Figura 16 - Sobreposição dos cromatogramas dos extratos das amostras 09908 e 09913, a um comprimento de onda de 280nm.	35
Figura 17 - Espectro de UV para o pico cromatográfico A.	36
Figura 18 - Espectro de UV para o pico cromatográfico B.	36
Figura 19 - Espectro de UV para o pico cromatográfico C.	36
Figura 20 - Espectro de UV para o pico cromatográfico D.	37
Figura 21 - Espectro de UV para o pico cromatográfico E.	37
Figura 22 - Retas de calibração dos compostos padrão utilizadas para quantificar os compostos fenólicos presentes no extrato de funcho.	39
Figura 23- Estrutura dos compostos fenólicos identificados no <i>F.vulgare</i>	40
Figura 24 - Estrutura química da fenchona.....	41
Figura 25 - Estrutura química do <i>trans</i> -anetol.....	42
Figura 26 - Estrutura química do estragol.	42
Figura 27 - Cromatograma obtido para a amostra 09564.	55
Figura 28 - Cromatograma obtido para a amostra 09572.	55
Figura 29 - Cromatograma obtido para a amostra 09576.	56
Figura 30 - Cromatograma obtido para a amostra 09578.	56
Figura 31 - Cromatograma obtido para a amostra 09579.	57
Figura 32 - Cromatograma obtido para a amostra 09581.	57

Figura 33 - Cromatograma obtido para a amostra 09583.	58
Figura 34 - Cromatograma obtido para a amostra 09586.	58
Figura 35 - Cromatograma obtido para a amostra 09587.	59
Figura 36 - Cromatograma obtido para a amostra 09596.	59
Figura 37 - Cromatograma obtido para a amostra 09873.	60
Figura 38 - Cromatograma obtido para a amostra 09880.	60
Figura 39 - Cromatograma obtido para a amostra 09884.	61
Figura 40 - Cromatograma obtido para a amostra 09886.	61
Figura 41 - Cromatograma obtido para a amostra 09887.	62
Figura 42 - Cromatograma obtido para a amostra 09901.	62
Figura 43 - Cromatograma obtido para a amostra 09904.	63
Figura 44 - Cromatograma obtido para a amostra 09905.	63
Figura 45 - Cromatograma obtido para a amostra 09908.	64
Figura 46 - Cromatograma obtido para a amostra 09913.	64
Figura 47 - Espectro de infravermelho da fenchona.	65
Figura 48 - Espectro de massa para a fenchona.	65
Figura 49 - Espectro de ¹ H RMN da fenchona.	66
Figura 50 - Espectro de ¹³ C RMN da fenchona.	66
Figura 51 - Espectro de infravermelho para o <i>trans</i> - anetol.	67
Figura 52 - Espectro de massa do <i>trans</i> -anetol.	67
Figura 53 - Espectro do UV do <i>trans</i> -anetol.	67
Figura 54 - Espectro de ¹ H RMN do <i>trans</i> -anetol.	68
Figura 55 - Espectro de ¹³ C RMN do <i>trans</i> -anetol.	68
Figura 56 - Espectro de infravermelho do estragol.	69
Figura 57 - Espectro de massa do estragol.	69
Figura 58 - Espectro de UV do estragol.	69
Figura 59 - Espectro de ¹ H RMN do estragol.	70
Figura 60 - Espectro de ¹³ C RMN do estragol.	70

Lista de Tabelas

Tabela 1- Caracterização taxonómica de <i>F.vulgare</i>	8
Tabela 2 - Listagem dos distritos e concelhos de origem das vinte amostras de semente de funcho estudadas, bem como o código a que corresponde cada amostra.	18
Tabela 3 - Concentração dos extratos.	21
Tabela 4 - Quantidade de sementes, volume de óleo obtido e rendimento de cada extração.	24
Tabela 5 - Composição percentual relativa do óleo essencial das sementes de funcho das amostras em estudo.	26
Tabela 6 - Representação das amostras com óleos ricos em <i>trans</i> -anetol.....	27
Tabela 7 - Representação das amostras com óleos ricos em <i>trans</i> -anetol e algum estragol. ..	28
Tabela 8 - Representação das amostras do grupo III.	28
Tabela 9 - Representação da amostra com óleo rico em estragol.	29
Tabela 10 - Representação da amostra com óleo rico em estragol.	29
Tabela 11 - Representação das amostras com óleos ricos em <i>trans</i> -anetol, fenchona e estragol.	30
Tabela 12 - Quantidade de sementes usadas e extratos obtidos.	32
Tabela 13 - Rendimento das extrações com solventes orgânicos.	33
Tabela 14 - Registo das concentrações e área dos picos cromatográficos dos compostos padrão para elaboração das retas de calibração.	38
Tabela 15 - Identificação e quantificação de compostos fenólicos da planta <i>Foeniculum vulgare</i>	40
Tabela 16- Sinais de RMN de ¹ H para a fenchona, <i>trans</i> -anetol e estragol.	44
Tabela 17 - Sinais de RMN de ¹³ C para a fenchona, <i>trans</i> -anetol e estragol.	45

Lista de Acrónimos

BPGV	Banco Português de Germoplasma Vegetal
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
Hz	Hertz
HPLC - DAD	Cromatografia Líquida de Alta Performance acoplada a detetor de rede de diodos
IV	Infravermelho
Nm	Nanómetros
OMS	Organização Mundial de Saúde
Ppm	Partes por milhão
Rf	Radiofrequência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
UV	Ultravioleta
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda máximo

Capítulo I. Introdução

As plantas aromáticas e medicinais são utilizadas pelo Homem desde o início da humanidade e o interesse nestas plantas tem vindo a aumentar nos últimos anos devido aos efeitos terapêuticos associados as mesmas e aos compostos bioativos que as constituem.

Dada a sua importância, as plantas medicinais têm sido aplicadas há vários anos na medicina popular e também a nível industrial.

Para a utilização destas plantas é necessário a realização de estudos prévios para a caracterização e determinação do seu conteúdo, a nível qualitativo e quantitativo. Desta forma, as plantas têm sido alvo de vários estudos ao longo dos anos a nível dos seus compostos bioativos, através da separação e análise estrutural dos mesmos, uma vez que os efeitos benéficos das plantas resultam da combinação destes compostos.

Neste contexto, investigou-se neste trabalho a planta *Foeniculum vulgare*, nativa da região mediterrânica, sendo que já se encontra implementada em Portugal. Trata-se de uma planta com diversos efeitos terapêuticos comprovados e portanto é fundamental o conhecimento da constituição química da mesma, para que seja possível a aplicação posterior desta planta como matéria-prima em produtos industriais e para a obtenção de novos agentes terapêuticos.

Esta dissertação é constituída por cinco capítulos:

- No primeiro capítulo é realizada uma contextualização do presente trabalho;
- No segundo capítulo é feita a revisão bibliográfica, que reúne os fundamentos teóricos acerca das plantas medicinais, óleos essenciais e da planta *Foeniculum vulgare*, bem como os métodos de extração e caracterização aplicados para o estudo desta planta medicinal.
- No terceiro capítulo encontram-se descritos os equipamentos, os reagentes e os procedimentos utilizados para a realização deste estudo.
- No quarto capítulo estão apresentados os resultados e discussão, onde se apresentam e são discutidos os resultados obtidos nesta investigação.
- Por fim, no capítulo cinco encontram-se as conclusões retiradas deste trabalho. Após o capítulo cinco são apresentadas as perspetivas futuras, com algumas sugestões para trabalho futuro.

Capítulo II. Revisão Bibliográfica

2.1 Plantas Medicinais

As plantas têm sido a base da medicina tradicional em todo mundo desde há milhares de anos e continuam a fornecer novos remédios para o Homem (Krishnaiah *et al.*, 2011). O conhecimento popular acerca da utilização das plantas pelos humanos é baseado nestes milhares de anos de experiência. Até meados do século XIX, as plantas foram o principal agente terapêutico utilizado pelos humanos e ainda hoje em dia o seu papel na medicina continua a ser relevante (Camejo-Rodrigues *et al.*, 2003). A sua utilização continua intacta nos dias de hoje e de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% da população depende das plantas medicinais para os cuidados de saúde (Christaki *et al.*, 2012).

A OMS define uma planta medicinal como sendo uma planta que contém propriedades ou compostos ativos que podem ser utilizados para fins terapêuticos ou aqueles que sintetizam metabolitos para produção de fármacos (WHO, 2000).

A grande maioria dos fármacos produzidos nos dias de hoje é obtida a partir de fontes naturais ou de derivados semi-sintéticos de produtos naturais utilizados nos sistemas tradicionais da medicina. De acordo com a OMS, as plantas medicinais seriam a melhor fonte para a obtenção de fármacos, uma vez que grande parte dos fármacos não-naturais e sintéticos causam efeitos adversos e os microrganismos começam a desenvolver resistência a estes fármacos (Hemalatha *et al.*, 2013; Lahlou, 2013). Os metabolitos descobertos nas plantas medicinais e outros produtos naturais podem evitar estes efeitos adversos dos fármacos sintéticos, uma vez que se acumulam no interior de células vivas (Lahlou, 2013).

As plantas medicinais são também valorizadas pelas suas propriedades, tais como as propriedades nutricionais, sendo que podem ser fontes ricas em proteínas, vitaminas e minerais. Têm também propriedades antioxidantes, sendo que muitas plantas são fonte de antioxidantes naturais. Os compostos fenólicos são os antioxidantes primários nelas presentes e há uma relação linear entre o conteúdo destes compostos e as propriedades antioxidantes. Têm também propriedades antimicrobianas e medicinais (Peter, 2004).

As plantas sintetizam uma grande variedade de compostos orgânicos que são tradicionalmente classificados como metabolitos primários e metabolitos secundários. Os metabolitos primários são compostos que estão envolvidos na fotossíntese, respiração, crescimento e desenvolvimento da planta, que incluem hidratos de carbono, aminoácidos, proteínas, lípidos e ácidos orgânicos. Os metabolitos secundários, por sua vez, têm funções importantes na planta (Crozier *et al.*, 2006; Bernhoft, 2010), uma vez que os efeitos medicinais do material vegetal resultam da combinação de produtos secundários presentes na mesma. Apesar destes

produtos secundários poderem ter uma variedade de funções nas plantas, é provável que a sua função ecológica possa ter alguma influência sobre os potenciais efeitos medicinais para os seres humanos (Briskin, 2000).

As plantas têm sido utilizadas em diversos domínios incluindo na medicina, onde fornecem os ingredientes predominantes na maioria dos sistemas tradicionais de cura, nutrição, bebidas, repelentes, cosméticos e fragrâncias, entre outros fins industriais (Barata *et al.*; Djeridane *et al.*, 2006).

Estas plantas medicinais têm sido utilizadas como remédios caseiros na medicina popular, durante gerações, e portanto a investigação sistemática de tais plantas permite o conhecimento das suas propriedades farmacológicas (Gonçalves *et al.*, 2013)

2.2 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são metabolitos secundários caracterizados por um forte odor. São líquidos, voláteis, aromáticos, lípidos e raramente coloridos e são compostos por substâncias lipofílicas, solúveis em solventes orgânicos geralmente com uma densidade menor do que a da água. São extraídos de plantas aromáticas e medicinais, incluindo o material vegetal proveniente das flores, gomos, raízes, casca e folhas (Jayasena e Jo, 2013; Bakkali *et al.*, 2008; Fornari *et al.*, 2012).

Na natureza, os óleos essenciais desempenham um papel importante na proteção das plantas como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros, pela redução do seu apetite por tais plantas. Podem também atrair alguns insetos para favorecer a dispersão do pólen e das sementes ou repelir outros indesejáveis (Bakkali *et al.*, 2008). Os óleos essenciais têm sido utilizados não só devido às suas propriedades farmacêuticas, mas também como agentes aromatizantes e no fabrico de perfumes e cosméticos, tornando-se também populares devido à aromaterapia, um ramo da medicina alternativa que afirma que os óleos essenciais têm efeitos curativos (Fornari *et al.*, 2012; Figueiredo *et al.*, 2008).

Existem diversas técnicas para a extração de óleos essenciais, a partir de diferentes partes da planta, sendo o óleo geralmente extraído através de destilação ou extração com solventes (Edris, 2007; Gámiz-Gracia e Luque de Castro, 2000).

2.2.1 Compostos ativos dos óleos essenciais

As proporções dos componentes presentes nos óleos essenciais variam bastante. Os óleos essenciais têm uma composição complexa e representam uma pequena fração da composição da planta, sendo que podem conter até várias centenas de componentes (Miguel, 2010; Fornari *et al.*, 2012). Os óleos essenciais contêm cerca de 85-99% de compostos voláteis e 1-15% de compostos não voláteis (Sánchez-González *et al.*, 2011). O óleo essencial é composto maioritariamente por monoterpenos e sesquiterpenos e outros constituintes aromáticos e alifáticos, todos eles caracterizados pelo seu baixo peso molecular (Sánchez-González *et al.*, 2011; Fornari *et al.*, 2012).

Os compostos maioritários do óleo essencial das plantas são os terpenos, que são constituídos por combinações de várias unidades de cinco átomos de carbono (C5), os isoprenos. Os principais terpenos presentes no óleo essencial são os monoterpenos (C10), que podem constituir mais de 80% do óleo essencial, e os sesquiterpenos (C15). Eles podem apresentar estruturas acíclicas, assim como estruturas mono-, bi- ou tricíclicas. Os terpenóides são derivados deste hidrocarbonetos, por oxidação ou apenas por rearranjo do esqueleto hidrocarbonado (Sánchez-González *et al.*, 2011; Fornari *et al.*, 2012).

Os compostos aromáticos são derivados do fenilpropano e ocorrem com menor frequência do que os terpenos. Incluem os aldeídos, álcoois, derivados metoxi e os fenóis (Bakkali *et al.*, 2008; Sánchez-González *et al.*, 2011).

As principais fontes vegetais para estes compostos são plantas tais como o anis, a canela, a noz-moscada, a salsa, o funcho e ainda outras pertencentes a várias famílias botânicas, como a *Apiaceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Rutaceae*.

Componentes azotados ou sulfurados como os glucosinolatos ou derivados de isotiocianato são também metabolitos secundários característicos de diversas plantas (Bakkali *et al.*, 2008).

A quantidade de uma substância particular na composição do óleo essencial varia desde elevadas proporções a quantidades vestigiais. Todavia, os componentes presentes em quantidades vestigiais são também importantes, uma vez que todos os compostos são responsáveis pelo odor e sabor natural característico dos óleos (Fornari *et al.*, 2012).

2.2.2 Fatores que afetam a composição química dos óleos essenciais

A composição química dos óleos essenciais é variável. Há diversos fatores que podem ser considerados como responsáveis por flutuações na composição química, incluindo a parte da planta utilizada, pois apesar de todas as partes da planta conterem óleo essencial, a sua

composição pode variar de acordo com a parte da planta utilizada como matéria-prima. Existem outros fatores que podem determinar a composição e qualidade do óleo essencial, como o período de colheita da planta aromática, condições climáticas e agronômicas, desenvolvimento vegetativo da planta e o tipo de extração realizada (Miguel, 2010; Fornari *et al.*, 2012).

2.3 Métodos de extração

A extração é o passo principal para a recuperação e isolamento de compostos bioativos a partir do material vegetal, antes da análise (Stalikas, 2007), sendo que só é possível realizar uma separação, identificação e caracterização adicional de compostos bioativos quando realizado um processo de extração adequado (Azmir *et al.*, 2013).

A extração é influenciada pela natureza química dos compostos bioativos, pelo tamanho da partícula da amostra e pela presença de substâncias de interferência bem como pelo método de extração utilizado (Stalikas, 2007). Tem como objetivos a extração de compostos bioativos alvo, a partir de uma amostra de planta complexa, aumentar a seletividade dos métodos analíticos, melhorar a sensibilidade dos ensaios pelo aumento da concentração dos compostos alvo e converter os composto bioativos numa forma adequada para a detecção e separação posterior (Azmir *et al.*, 2013).

Os compostos bioativos do material vegetal podem ser extraídos por várias técnicas de extração clássicas. Grande parte destas técnicas são baseadas no poder de extração de diferentes solventes em uso e através da aplicação de calor e /ou agitação. De forma a ser possível a obtenção de compostos bioativos do material vegetal, das técnicas clássicas de extração existem a hidrodestilação e a extração com Soxhlet (Azmir *et al.*, 2013).

2.3.1 Extração por hidrodestilação

O princípio da destilação a vapor é a base dos métodos comumente utilizados na obtenção de óleo volátil a partir de produtos vegetais. Este processo é realizado de duas formas: pela passagem de vapor através de um recipiente adequado que contém o produto vegetal ou através da ebulição do material com água, num recipiente adequado, destilando e recolhendo posteriormente o destilado obtido. O óleo volátil é transportado com o vapor que condensa com ele. Sendo apenas ligeiramente solúvel em água, o óleo é posteriormente separado da porção aquosa do destilado em camadas.

Foi concebido um aparelho para a determinação do óleo volátil que permite uma análise direta da quantidade de óleo volátil obtido, tornando-o disponível para análise posterior.

Este dispositivo consiste essencialmente em três partes: um balão de fundo redondo, onde são colocados o material que contém o óleo volátil e uma determinada quantidade de água; um separador, onde o óleo é automaticamente separado num tubo graduado, permitindo assim uma leitura direta da quantidade de óleo obtida, e um condensador adequado, como se encontra exemplificado na figura 1 (Clevenger, 1928).

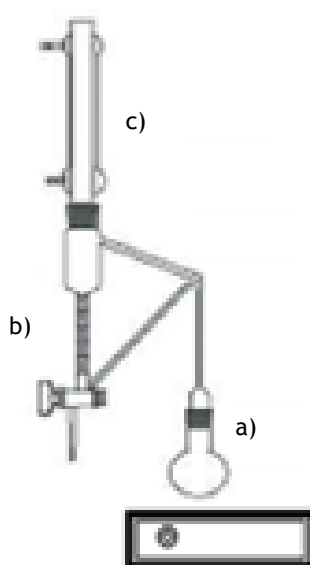


Figura 1 - Imagem ilustrativa da hidroddestilação com Clevenger. a) balão de fundo redondo; b) separador- Clevenger; c) condensador.

2.3.2 Extração com solventes orgânicos - Soxhlet

De modo a isolar os analitos de interesse do material vegetal, a extração com diversos solventes pode ser aplicada, sendo normalmente realizada com aumento de polaridade do agente de extração.

A extração com Soxhlet é uma das técnicas mais antigas para o isolamento de metabolitos existentes no material vegetal. Esta técnica é utilizada para o isolamento e enriquecimento de analitos de baixa ou média volatilidade e estabilidade térmica e tem sido amplamente aplicada na extração de compostos ativos de várias fontes naturais (Azmir *et al.*, 2013; Romanik *et al.*, 2007).

O extrator Soxhlet foi inicialmente proposto pelo químico alemão Franz Ritter Von Soxhlet em 1879 (Azmir *et al.*, 2013). De um modo geral, a amostra é colocada no extrator, e durante o funcionamento este é gradualmente cheio com solvente fresco condensado, que se encontra no balão de destilação. Quando o líquido atinge o nível máximo de capacidade do extrator, um sifão aspira o líquido do extrator e descarrega-o de volta para o balão de destilação, transportando os analitos extraídos para o líquido que se encontra no balão. Esta operação é repetida durante vários ciclos até a extração estar concluída (Luque de Castro e García-Ayuso, 1998).

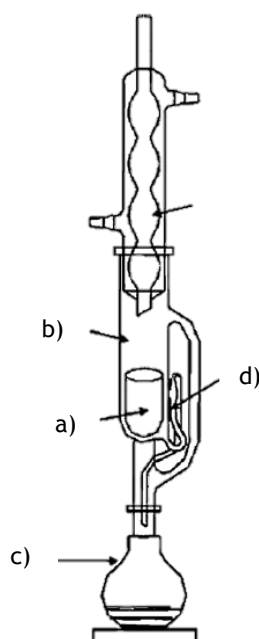


Figura 2 - Imagem ilustrativa do método de extração com Soxhlet. a) amostra; b) extrator Soxhlet; c) balão de destilação; d) sifão. Adaptado de Luque de Castro *et al.*, 2010.

2.4 *Foeniculum vulgare*

O *Foeniculum vulgare* Mill., ou vulgarmente conhecido como funcho, é uma planta anual, bianual ou perene, dependendo da variedade, pertencente à família *Apiaceae*. Esta planta é nativa da região mediterrânea, embora seja cultivada em todas as regiões temperadas e tropicais do mundo (Singh *et al.*, 2006; He e Huang, 2011; Damjanovic *et al.*, 2005).

O funcho tem duas subsespécies, a *piperitum*, com sementes amargas e a *capillaceum*, com sementes doces (Díaz-Maroto *et al.*, 2006). *F. vulgare* subsp. *capillaceum* é posteriormente

classificada em três grupos taxonômicos: var. *vulgare* (Mill.) Thell., var. *dulce* (Mill.) Thell. e var. *azoricum* (Mill) Thell. A subespécie *piperitum* cresce selvagem e é perene. As suas características morfológicas são variáveis no que diz respeito ao tamanho, forma e cor da folha e fruto, número de raios na umbela e, em geral, pode ser distinguida da *capillaceum* por umbelas menores, os lóbulos das folhas mais rígidos e carnudos e fruto com sabor acentuado. Para além das características morfológicas, cada variedade é conhecida por possuir uma composição de óleo essencial específica (Bernáth *et al.*, 1996; Piccaglia e Marotti, 2001).

Tabela 1- Caracterização taxonômica de *F.vulgare*. Adaptado de Carilho, 2009; Bernáth *et al.*, 1996.

Taxonomia do Funcho	
Reino	<i>Plantae</i>
Divisão	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordem	<i>Apiales</i>
Família	<i>Apiaceae</i>
Género	<i>Foeniculum</i>
Espécie	<i>F. vulgare</i>
Subespécie	<i>piperitum</i> (funcho-amargo)
	<i>capillaceum</i> (funcho doce)

2.4.1 Descrição botânica

O *Foeniculum vulgare* é uma planta verde, podendo crescer até uma altura de cerca de 2.5 metros, com caules ocos. As folhas são finamente dissecadas, com os últimos segmentos filiformes, podendo ter até 40 cm e com cerca de 0.5 mm de largura. Nos terminais das umbelas são produzidas inflorescências, com 5 a 15 cm de largura, cada secção da umbela com 20 a 50 flores amarelas pequenas em pedicelos curtos. O fruto desta planta é uma semente seca e ovoide, de 4 a 10 mm de comprimento e 2 a 4 mm de largura (Chittora e Veer, 2013; Conforti *et al.*, 2006).



Figura 3 - Imagem representativa da planta em estudo. a) Rebentos; b) caules; c) folhas; d) caule; e) inflorescência. Adaptado de Barros *et al.*, 2009.

2.4.2 Composição do óleo do *Foeniculum vulgare*

O material da planta com interesse para uso medicinal é o cremocarpo e mericarpo, mais comumente designados por semente, uma vez que este é o local onde os óleos essenciais estão maioritariamente concentrados e são estas que proporcionam o aroma e sabor únicos do funcho, sendo este altamente aromático, com um aroma a anis característico (Barros *et al.*, 2010).

Os óleos essenciais do funcho são principalmente constituídos por uma mistura de vários monoterpenos e fenilpropanóides, sendo a fenchona, o *trans*-anetol, o estragol e o limoneno os principais constituintes (Barazani *et al.*, 2002). O aroma diferente do óleo do funcho-doce relativamente ao funcho-amargo é devido às quantidades de *trans*-anetol e fenchona presentes no óleo essencial: o aroma da subespécie *capillaceum*, mais doce e delicado, é o resultado de um baixo conteúdo de fenchona e um elevado teor de *trans*-anetol, pois o *trans*-anetol é um componente importante pelo seu aroma doce. Por sua vez, a fenchona está especialmente presente no funcho amargo. Segundo a Farmacopeia Europeia, o óleo essencial do funcho amargo deve conter, no mínimo, 60% de anetol e 15% de fenchona, e o óleo do funcho-doce deve conter, pelo menos, 80% de anetol. Desta forma, as quantidades de *trans*-anetol e fenchona poderão ser determinantes para distinguir o funcho-doce do funcho amargo (Dukic *et al.*, 2003; Miraldi, 1999).

Num estudo realizado anteriormente, Cavaleiro C. *et al.* (1993) demonstraram a existência de quimiotipos relativamente à composição química dos óleos essenciais do funcho: um quimiotipo “puro” anetol e um quimiotipo “fenchona/anetol”. O termo quimiotipo pode ser

definido como uma entidade taxonómica que difere da restante população pela composição dos seus metabolitos secundários (Barazani *et al.*, 2002; Gross *et al.*, 2009).

A composição e concentração relativa dos compostos do óleo do funcho dependem de fatores internos e externos que podem afetar a planta, tais como as condições climáticas e ambientais, época de colheita e origem geográfica, idade e parte da planta em estudo, fase de amadurecimento do fruto e métodos de extração aplicados (Diao *et al.*, 2014; Aprotosoai *et al.*, 2010).

2.4.3 Utilizações do *Foeniculum vulgare*

A medicina popular em Portugal continua a ter um papel relevante em diversas regiões, onde existem várias plantas selvagens com usos medicinais tradicionais (Barros *et al.*, 2009). Tradicionalmente, e em virtude das suas propriedades aromáticas, o funcho e o seu óleo essencial têm um largo espectro de aplicações (Zahid *et al.*, 2008). A potencial atividade farmacológica do óleo essencial do funcho tem sido objeto de vários estudos, que mostraram que este pode reduzir a intensidade da cólica infantil e atua como hepatoprotetor. O óleo essencial do funcho apresenta uma atividade antiplaquetária, sem efeitos secundários gastrolesivos (Napoli *et al.*, 2010).

Assim, o funcho tem sido utilizado medicinalmente como antiespasmódico, diurético, laxante, estimulante, hepatoprotetor, digestivo (Zahid *et al.*, 2008) e como remédio caseiro, sendo útil no tratamento de uma variedade de problemas, especialmente os que estão relacionados com o sistema digestivo. É também altamente recomendado para a diabetes, bronquite e tosse crónica e no tratamento da pedra no rim (Barros *et al.*, 2010; Barros *et al.*, 2009). O funcho é aplicado também como agente aromatizante, para condimentar os alimentos, e utilizado como ingrediente nos produtos cosméticos e farmacêuticos (Telci *et al.*, 2009).

2.5 Caracterização

Os extratos complexos dos constituintes das plantas exigem frequentemente técnicas de separação eficazes para permitir a identificação de diferentes compostos (Stalikas, 2007), uma vez que a parte determinante na química dos produtos naturais é a separação e purificação de compostos de interesse a partir de misturas complexas e a elucidação da estrutura destes compostos. A cromatografia é uma das técnicas mais úteis para a separação de misturas de compostos, bem como para purificação e identificação dos mesmos. Para a elucidação acerca da estrutura de produtos naturais, as ferramentas mais importantes são a

ressonância magnética nuclear (RMN), bem como os métodos de espectroscopia de ultravioleta e infravermelho (Cseke *et al.*, 2006).

2.5.1 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)

A cromatografia gasosa é aplicada na separação e análise de misturas complexas de muitos constituintes que podem ser vaporizados sem decomposição. Nesta técnica, a amostra é injetada no injetor do cromatografo e é transportada através da coluna pela fase móvel, constituída por um gás inerte. A velocidade com que estes constituintes da amostra passam através da coluna depende das suas propriedades físicas e químicas e da interação com a fase estacionária da coluna. O tempo necessário para cada composto sair da coluna é chamado o tempo de retenção. A quantidade de substâncias separadas que saem da coluna é detetada e representada por um sinal elétrico (Cseke *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2011).

A combinação de cromatografia gasosa e espectrometria de massa para a deteção e identificação dos constituintes dos óleos essenciais tem-se tornado uma ferramenta analítica poderosa na análise fitoquímica. Os componentes então separados passam depois individualmente através do espectrómetro de massa, onde a ionização, fragmentação e deteção em massa ocorrerá. A combinação GC-MS permite a separação dos componentes do óleo essencial e a aquisição de espectros de massa dos componentes separados (Cseke *et al.*, 2006).

A identificação dos componentes principais é feita pela comparação dos tempos de retenção da cromatografia gasosa e pelos dados da espectrometria de massa. As condições analíticas e o procedimento utilizados devem ser cuidadosamente descritos. Estes incluem o equipamento da análise do óleo, o tipo de coluna utilizada e dimensões da mesma, a velocidade do gás de arraste e as condições de temperatura de programação incluindo a temperatura do injetor, detetor e coluna (Lahlou, 2004).

2.5.2 Cromatografia Líquida de Alta Performance acoplada a detetor de rede de diodos (HPLC - DAD)

Nos últimos vinte anos, a técnica HPLC tem dominado a separação e caracterização de compostos fenólicos, como os ácidos fenólicos e flavonoides. O HPLC é caracterizado pela utilização de pressões elevadas para forçar os compostos químicos a passar através da coluna, que contem a fase estacionária. Esta técnica é uma ferramenta importante para a análise de

compostos que não apresentam volatilidade suficiente para serem analisados por cromatografia gasosa (Stalikas, 2007; Silva *et al.*, 2011).

Tipicamente, um sistema HPLC consiste nos seguintes componentes: um reservatório para os eluentes, um sistema de injeção, uma coluna, uma bomba e um detetor ligado a um computador que regista os perfis cromatográficos. O tipo de detetor mais comum para a deteção dos compostos de interesse é o detetor de rede de diodos, que permite o varrimento completo da faixa UV-VIS (210 - 650 nm). O espectro UV de cada pico separado é também uma ferramenta importante para verificar a identidade do pico em estudo, pois permite a comparação do espectro UV de um composto padrão com o pico de uma amostra com o mesmo tempo de retenção que o composto padrão (Cseke *et al.*, 2006; Waksmundzka-Hajnos e Sherma, 2010).

2.5.3 Espectroscopia de Ultravioleta (UV)

A utilização da espectroscopia de UV tem uma ampla utilização na análise quantitativa de compostos que absorvam radiação UV. Esta técnica tem como base a lei de Lambert Beer.

A absorção molecular na região do ultravioleta do espectro depende da estrutura eletrónica da molécula. A absorção de energia é quantizada e conduz à passagem dos eletrões de orbitais do estado fundamental para orbitais de maior energia num estado excitado. A instrumentação para a espectroscopia de ultravioleta é constituída por uma fonte de energia, uma célula com a amostra, um dispositivo de dispersão, como um prisma e um detetor. O sinal do detetor é transmitido para um computador que indica quanta radiação é absorvida pela amostra a um intervalo de comprimento de onda específico. Obtém-se assim um espectro de ultravioleta, sendo este um gráfico de comprimentos de onda (ou frequências) versus a intensidade da absorção (absorvância ou transmitância). Os comprimentos de onda nesta região são geralmente expressos em nanómetros (nm), sendo que a região do ultravioleta é especialmente interessante dos 200 aos 380 nm (Cseke *et al.*, 2006; Silverstein *et al.*, 1994; Field *et al.*, 2008).

2.5.4 Espectroscopia de infravermelho (IV)

A espectroscopia de infravermelho é utilizada para a identificação de substâncias, em particular, para demonstrar quais os grupos funcionais presentes num determinado composto orgânico. Esta técnica baseia-se no facto de que as ligações nas moléculas orgânicas vibram, torcem e dobram em frequências fixas. Quando a radiação infravermelha passa através do

composto, as moléculas absorvem a radiação apenas com a energia certa para fazer essas ligações vibrar, torcer ou dobrar mais rapidamente. Uma vez que a energia que pode ser transferida a partir do infravermelho (ou qualquer outro tipo de radiação eletromagnética) depende da frequência ou comprimento de onda da radiação, a excitação das diferentes ligações absorve frequências diferentes ou comprimentos de onda. A energia necessária depende do tipo de átomos e a natureza das suas ligações. Ligações que envolvam átomos leves vibram mais rapidamente, com frequências mais altas do que as ligações que envolvem átomos pesados. Várias ligações vibram em frequências mais altas do que as ligações individuais. A região do infravermelho do espectro eletromagnético é na gama de 250-5000 cm^{-1} . A maioria dos espectrómetros de infravermelhos opera a 600-4000 cm^{-1} (Clarke, 2008).

2.5.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é basicamente outra forma de espectroscopia de absorção, semelhante ao infravermelho ou ultravioleta. Sob condições apropriadas, num campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética e essa absorção é função de determinados núcleos da molécula (Silverstein *et al.*, 1994). A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) depende da absorção, isto é, ressonância, de radiofrequências (rf) por núcleos. Enquanto que o momento magnético de um núcleo (por exemplo do ^1H) é constante, a sua localização num composto regula a quantidade de energia de radiofrequências absorvida para atingir a ressonância, o que por sua vez, está relacionado com a forçado campo magnético secundário, gerado pelo movimento de eletrões do campo magnético externo. As ressonâncias de núcleos individuais estão reportados em relação a um sinal de um composto de referencia, não reativo, como por exemplo o tetrametilsilano ($(\text{CH}_3)_4\text{Si}$) (Chalbot *et al.*, 2014).

Capítulo III. Materiais e Métodos

Equipamentos

Evaporador Rotativo

Os solventes orgânicos usados nas extrações foram evaporados num evaporador rotativo Buchi, a pressão entre os 200 e 400 mbar e a 40°C.



Figura 4 - Evaporador rotativo

Cromatografia Líquida de Alta Performance acoplada a detetor de rede de diodos (HPLC - DAD)

O aparelho utilizado para análise cromatográfica dos extratos de solventes das amostras foi um VWR Elite LaChrom, constituído por três módulos: uma bomba (L-2130), um forno (L-2300) e um diode array detector (L-2455).



Figura 5 - Aparelho de HPLC - DAD

Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)

Os óleos essenciais foram analisados e identificados num cromatógrafo de gases acoplado a um espectrofotómetro de massas da marca Agilent. O modelo do cromatógrafo é o 7890 A e o do espectrómetro de massa é o 5975 C inert XL MSD with Triple- Axis.



Figura 6 - Aparelho de GC-MS

Espetros de Infravermelho (IV)

Os espetros IV foram realizados num espectrofotómetro Thermo Scientific NICOLET IS 10.



Figura 7 - Aparelho de IV

Espetros de Ultravioleta (UV)

Os espectros UV foram obtidos num espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 160.



Figura 8 - Aparelho de UV

Espetros de ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de protão (^1H) e de carbono 13 (^{13}C) foram realizados num aparelho Bruker Avance 400, a 400MHz e 100 MHz, respetivamente.



Figura 9 - Aparelho de RMN

Reagentes

Os reagentes utilizados para a realização deste trabalho de investigação foram o n-hexano comercial da Labken, o acetato de etilo e o metanol, adquiridos na Carlo Erba e o etanol na Riedel-de-Haën. Os solventes utilizados no HPLC eram de grau analítico de HPLC e foram adquiridos na Sigma-Aldrich.

3.1 Material vegetal

O material vegetal utilizado para a realização deste trabalho de investigação foram as sementes do funcho.



Figura 10 - Imagem ilustrativa das sementes do funcho.

As sementes do funcho utilizadas foram recolhidas em vinte pontos diferentes de Portugal. As amostras utilizadas neste estudo foram cedidas pelo Banco Português de Germoplasma Vegetal (BPGV). A origem de cada uma das amostras estudadas está indicada na tabela 2. A figura 11 corresponde ao mapa de Portugal com os locais de origem das vinte amostras analisadas.



Figura 11 - Mapa com os locais de recolha das amostras de semente de funcho.

Tabela 2 - Listagem dos distritos e concelhos de origem das vinte amostras de semente de funcho estudadas, bem como o código a que corresponde cada amostra.

Código	Distrito	Concelho
09564-BPGV	Guarda	Trancoso
09572-BPGV	Guarda	Trancoso
09576-BPGV	Guarda	Pinhel
09578-BPGV	Leiria	Leiria
09579-BPGV	Santarém	Ourém
09581-BPGV	Santarém	Torres Novas
09583-BPGV	Santarém	Alcanena
09586-BPGV	Santarém	Ourém
09587-BPGV	Santarém	Ourém
09596-BPGV	Santarém	Porto de Mós
09873-BPGV	Évora	Vila Viçosa
09880-BPGV	Évora	Redondo
09884-BPGV	Évora	Évora
09886-BPGV	Évora	Portel
09887-BPGV	Beja	Serpa
09901-BPGV	Beja	Ourique
09904-BPGV	Beja	Castro Verde
09905-BPGV	Beja	Castro Verde
09908-BPGV	Beja	Aljustrel
09913-BPGV	Setúbal	Santiago do Cacém

3.2 Determinação da composição química do óleo essencial

3.2.1 Extração por Hidrodestilação

Para a análise da composição química do óleo essencial proveniente das sementes de funcho das várias amostras, procedeu-se à extração desse óleo por hidrodestilação, com utilização de um aparelho Clevenger.

Para tal, foram pesadas entre 30 g a 50 g de sementes, conforme a amostra em estudo, e colocadas posteriormente num balão de fundo redondo de 2 L, onde se adicionou também 1,5 L de água e reguladores de ebulição. A extração do óleo essencial teve a duração de 2 horas.

No final das 2 horas de extração, procedeu-se à recolha do óleo essencial. O volume de óleo obtido foi medido e guardado em frascos de vidro âmbar, sendo conservado no congelador, até análise posterior.



Figura 12 - Montagem experimental da extração com Clevenger.

3.2.2 Análise cromatográfica por GC-MS

Os óleos essenciais das sementes de funcho foram analisados e identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.

A coluna utilizada foi uma DB-5^{MS} com 30 m x 0,25 mm e com uma espessura de filme de 0,25 µm. A temperatura do forno foi variável, tendo sido programada a seguinte rampa de temperatura: a temperatura inicial foi de 60°C durante 5 minutos; aumento da temperatura para os 250°C, a uma taxa de 10°C/minuto e a temperatura final manteve-se durante 20 minutos. A temperatura do injetor foi de 250°C e a da fonte foi de 230°C, a do quadrupolo foi de 180°C e a da interface foi de 280°C. O gás utilizado para a fase móvel foi o hélio, com um caudal de 1mL/min.

A identificação dos compostos foi efetuada por comparação dos espectros de massa obtidos com os da biblioteca NIST e Wiley.

3.3 Análise de compostos fenólicos na planta

3.3.1 Extração com solventes orgânicos - Soxhlet

Para a extração dos compostos fenólicos presentes nas amostras de sementes de funcho, procedeu-se à extração sucessiva em Soxhlet, com dois solventes orgânicos: n-hexano e acetato de etilo.

Para a realização da extração, preparou-se um cartucho, feito com papel de filtro, onde se colocaram entre 4 a 10 g de amostra, conforme a amostra em estudo. Posteriormente colocou-se o cartucho preparado anteriormente dentro de um extrator Soxhlet. Num balão de fundo redondo colocaram-se 200 mL de solvente e realizaram-se vários ciclos de extração, com a duração total de 2 horas.

Após o final da extração, procedeu-se à evaporação do solvente com o auxílio de um evaporador rotativo. O extrato seco obtido foi então pesado e procedeu-se ao cálculo do rendimento da extração.

Este método de extração com Soxhlet foi aplicado novamente, utilizando o mesmo cartucho, mas usando como solvente o acetato de etilo. Os extratos obtidos foram conservados em frascos de vidro âmbar no congelador, até análise posterior.



Figura 13 - Montagem experimental da extração com Soxhlet.

3.3.2 Análise cromatográfica por HPLC - DAD

Na análise cromatográfica por HPLC- DAD dos extratos de acetato de etilo obtidos por extração com Soxhlet, procedeu-se à preparação de soluções das amostras em estudo. As soluções foram preparadas em água destilada e metanol (1:1). As respectivas concentrações encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 - Concentração dos extratos.

Código Amostra	[Extrato] (mg/mL)
09587-BPGV	11,96
09596-BPGV	1,06
09873-BPGV	1,00
09880-BPGV	0,60
09886-BPGV	11,06
09901-BPGV	11,50
09904-BPGV	10,92
09905-BPGV	10,90
09908-BPGV	9,94
09913-BPGV	5,58

Para a análise cromatográfica, foram injetados 20 µl, a 25°C de cada uma das soluções em estudo, isto é, padrões e amostras previamente filtradas com um filtro de polipropileno 0.45 µm, numa coluna C-18 de fase reversa, Purospher® Star (Merck) de 250 x 4 mm e com um diâmetro de partícula de 5 µm.

A eluição foi realizada com um sistema binário de solventes: solvente A (H₂O-CH₃COOH (999:1) v/v) e solvente B (CH₃OH-CH₃COOH a (999:1) v/v)). Antes de principiar a análise e entre cada ensaio, a coluna cromatográfica foi lavada com 100% de B e estabilizada com as condições iniciais da análise, durante 5 minutos. A eluição variou ao longo do tempo da análise, com as seguintes condições de gradiente: A:B (10:90) nos primeiros 5 minutos; alteração do gradiente para A:B (50:50) durante 30 minutos, mantendo este gradiente durante 8 minutos; alteração de A:B (50:50) para A:B (90:10) durante 1 minuto, mantendo-se A:B (90:10) durante 16 minutos. O caudal de eluente foi de 1 mL/min.

A deteção dos compostos foi realizada por DAD, entre os 200 e os 600 nm. A identificação dos compostos detetados foi realizada por comparação do tempo de retenção e dos espectros de UV de cada pico cromatográfico das amostras com os dos padrões. Para quantificar os compostos identificados nas amostras, construíram-se retas de calibração dos padrões. Para tal, foram preparadas soluções dos padrões, em água destilada e metanol (1:1), com concentrações entre 1 e 10 ppm para o ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido vanílico e ácido cumárico e entre 10 e 50 ppm para a rutina.

3.4 Espetroscopia

Os três compostos maioritários existentes nos óleos essenciais foram caracterizados por técnicas de espectroscopia de infravermelho (IV), por espectroscopia de ultravioleta (UV), por ressonância magnética nuclear de protão (¹H-RMN) e de carbono 13 (¹³C-RMN) e por espectrometria de massa.

3.4.1 Espetroscopia de Infravermelho (IV)

Para a obtenção dos espectros de infravermelho (IV), as amostras foram colocadas sobre o diamante previamente limpo com isopropanol. O espectro foi obtido através da utilização do software OMNIC. No final voltou-se a limpar o diamante com isopropanol.

3.4.2 Espetroscopia de ultravioleta (UV)

Para a obtenção dos espectros de ultravioleta (UV), foi utilizada uma célula de quartzo e o espectrofotómetro para a leitura das amostras, entre os 200 e os 400 nm. Procedeu-se à preparação de soluções das amostras de *trans*-anetol e estragol. As soluções foram

preparadas em etanol com concentrações de 8 ppm e 20 ppm, respectivamente. Antes das medições foi utilizado etanol para realizar o branco e fixar o zero das leituras. Os espectros foram obtidos através da utilização do software VISIONPro.

3.4.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de próton (^1H) e de carbono 13 (^{13}C) das amostras foram realizados num aparelho Bruker Avance 400, a 400MHz e 100 MHz, respectivamente. Os desvios químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). O solvente utilizado nas amostras foi o clorofórmio deuterado (CDCl_3), sendo que o pico do clorofórmio residual foi usado para acertar a escala, para o ^1H RMN é a 7,26 ppm e para o ^{13}C RMN é a 77,2 ppm.

Capítulo IV. Resultados e Discussão

4.1 Composição química do óleo essencial das sementes de funcho

4.1.1 Extração por hidrodestilação

A extração do óleo essencial das sementes de funcho colhidas em diversos pontos do país foi realizada por hidrodestilação com Clevenger.

Após a extração do óleo essencial das vinte amostras em estudo, calculou-se o seu rendimento. Estes valores, assim como o volume de óleo obtido e a quantidade de sementes usada, estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Quantidade de sementes, volume de óleo obtido e rendimento de cada extração.

Código Amostra	Massa das sementes (g)	Volume de óleo essencial (mL)	Rendimento (%)
09564	52,2	1,30	2,5
09572	30,6	0,15	0,5
09576	54,4	1,60	2,9
09578	42,7	0,70	1,6
09579	51,9	-	-
09581	50,0	0,43	0,9
09583	57,8	0,63	1,1
09586	78,2	1,50	1,9
09587	49,5	0,46	0,9
09596	54,8	0,40	0,7
09873	47,6	0,50	1,1
09880	40,3	0,50	1,2
09884	30,9	0,21	0,7
09886	40,8	0,53	1,3
09887	30,3	-	-
09901	30,2	0,26	0,9
09904	31,2	-	-
09905	69,0	0,40	0,6
09908	57,8	0,48	0,8
09913	58,1	0,75	1,3

Pela análise dos resultados apresentados na tabela 4, é possível observar que houve alguma variação no volume de óleo essencial obtido consoante a sua origem, sendo que o máximo foi 1,6 mL (2,9%) da amostra 09576 que corresponde à amostra colhida no concelho de Pinhel, e o valor mais baixo foi 0,15 mL (0,5 %) que foi obtido na amostra 09572, correspondente à amostra colhida no concelho de Trancoso, ambas no distrito da Guarda.

Para as amostras 09579, 09887 e 09904 não foi possível calcular o rendimento pois formaram-se emulsões e foi impossível separar as duas fases. Apesar disso conseguimos retirar uma pequena gota de óleo e realizar a sua caracterização química.

4.1.2 Análise cromatográfica por GC-MS

O óleo essencial das sementes de funcho obtido por hidrodestilação foi caracterizado por cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa (GC-MS), tendo-se obtido um total de vinte cromatogramas que estão apresentados no Anexo 1. A identificação dos compostos foi feita por comparação entre os índices de retenção e os espectros de massa dos vários componentes das amostras e os espectros das bibliotecas Wiley e NIST e para os três componentes maioritários foram injetados padrões.

4.1.2.1 Identificação dos compostos químicos do óleo essencial do funcho

Pela análise dos cromatogramas (Anexo 1, da figura 27 à figura 46) obtidos por GC-MS foi possível a identificação dos constituintes do óleo essencial das sementes de funcho. Os resultados encontram-se apresentados na tabela 5, por ordem de eluição na coluna DB-5^{MS}.

Caracterização química das sementes de *Foeniculum vulgare* Mill

Tabela 5 - Composição percentual relativa do óleo essencial das sementes de funcho das amostras em estudo.

Composto	IR ^{a)}	9564	9572	9576	9578	9579	9581	9583	9586	9587	9596	9873	9880	9884	9886	9887	9901	9904	9905	9908	9913
α -Tujona	927	-	-	-	-	0,02	0,0	-	-	-	0,0	0,0	0,0	-	-	-	-	-	0,0	-	-
α - Pineno	935	0,4	0,1	0,2	0,6	0,23	0,1	0,2	0,3	0,3	0,2	0,1	0,4	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,5	0,2	0,2
Canfeno	953	0,1	0,0	-	0,0	0,04	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1
Sabineno	975	0,0	0,0	0,1	0,1	0,05	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	0,0	0,1
Mirceno	990	0,3	0,1	0,1	0,2	0,24	0,1	0,2	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,0	0,1	0,2	0,1	0,1
α -Felandreno	1009	0,2	0,0	0,1	0,1	0,06	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1
p-Cimeno	1028	0,1	0,0	0,1	0,1	0,04	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Limoneno	1032	1,1	0,7	1,6	0,7	1,21	0,6	0,7	0,8	0,6	0,7	0,7	0,8	0,3	0,8	0,2	0,6	0,7	1,7	0,9	1,3
1,8-Cineol	1036	0,4	0,2	0,3	0,3	0,12	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,3	0,1	0,0	0,1	0,1	0,2	0,1	0,3
β -Ocimeno	1048	0,4	0,1	0,2	0,2	0,2	0,5	0,3	0,4	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2
γ -Terpineno	1061	0,1	0,3	0,1	-	0,02	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Fenchona	1088	34,7	20,4	16,9	23,4	12,5	18,9	19,0	28,5	32,8	24,8	26,2	21,7	18,4	26,3	12,0	19,5	26,5	45,0	37,0	34,8
Cânfora	1155	0,5	0,0	0,2	0,3	0,17	0,3	0,2	0,4	0,5	0,3	0,3	0,4	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3	0,6	0,5	0,5
Terpinen-2-ol	1186	0,1	0,0	2,5	-	0,02	0,0	0,2	-	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-	0,1	0,0	0,1
Estragol	1201	22,3	37,8	2,5	66,0	13,2	11,3	37,3	31,1	15,6	21,8	2,5	2,6	1,8	20,9	9,5	1,8	22,7	6,2	5,5	15,2
<i>cis</i> - Anetol	1254	-	0,0	-	-	0,04	0,0	0,0	-	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	-	0,0
<i>trans</i> -Anetol	1285	39,3	40,2	77,7	7,9	71,6	68,3	41,5	37,5	45,9	51,7	69,5	73,4	78,5	51,1	77,9	77,1	49,0	38,0	55,1	46,9

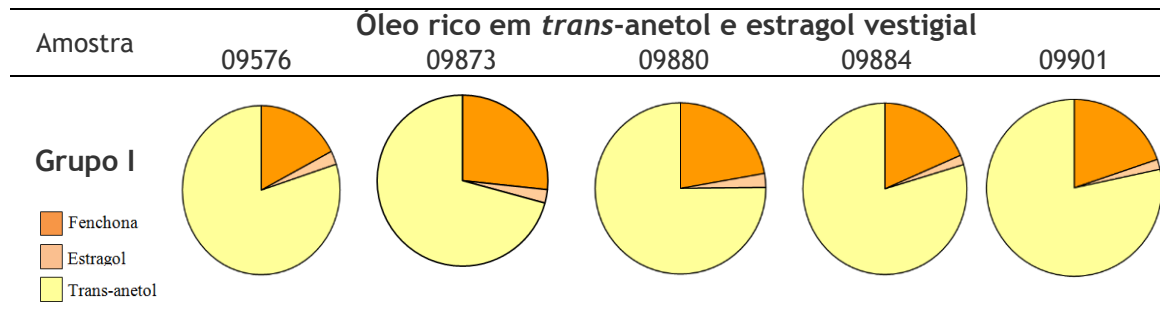
a) Índice de retenção para a coluna DB-5^{MS}

Foram identificados dezassete compostos diferentes no total das vinte amostras de óleo essencial das sementes de funcho em estudo. Embora o número de compostos identificados não tenha sido o mesmo em todas as amostras, os componentes maioritários foram em todas elas os fenilpropanóides *trans*-anetol (7,9-78,5%) e estragol (1,8-66,0%), e o monoterpreno oxigenado fenchona (12,0-45,0%).

O perfil da composição química obtido, no que diz respeito aos componentes maioritários do óleo essencial das sementes de funcho, foi semelhante aos resultados obtidos num estudo prévio de Cavaleiro C. *et al.* (1993), que identificaram treze componentes presentes em óleos essenciais de sementes de funcho, sendo que também obtiveram como principais constituintes o *trans*-anetol (38,9-71,2%), o estragol (2,0-47,0%) e a fenchona (17,2-28,5%), embora no nosso caso se tenha obtido algumas amostras com muito menor quantidade de *trans*-anetol e outras com maior quantidade de fenchona e estragol.

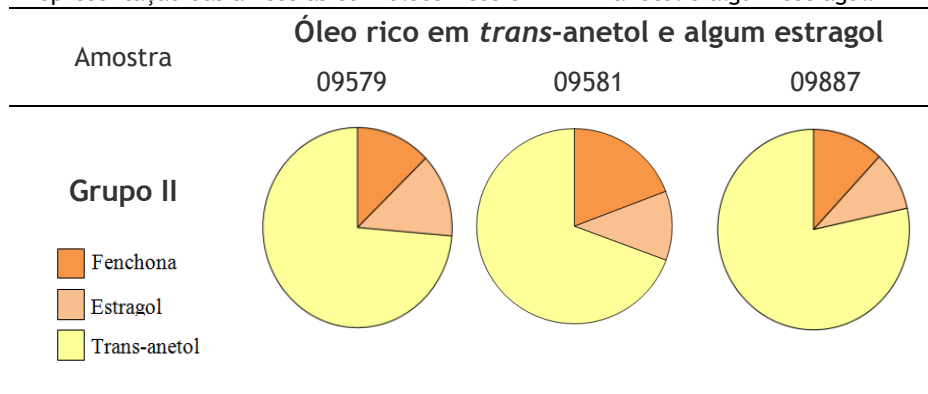
Através da análise individual de cada uma das vinte amostras, de acordo com o teor de cada um dos três compostos maioritários presentes nos óleos, estas foram agrupadas em seis grupos conforme o teor de cada um dos componentes maioritários (tabela 6, 7, 8, 9, 10 e 11).

Tabela 6 - Representação das amostras com óleos ricos em *trans*-anetol.



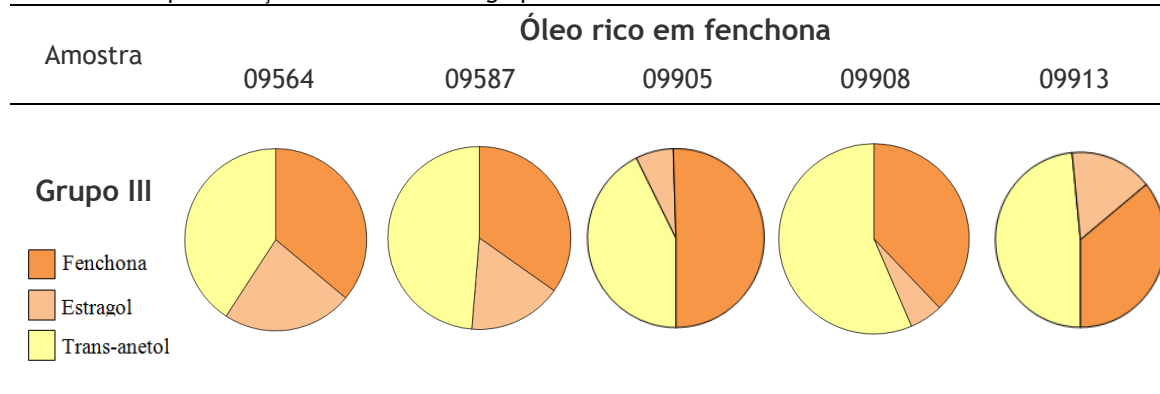
No grupo I estão apresentadas as amostras que têm em comum o facto dos seus óleos essenciais serem ricos em *trans*-anetol (69,5-78,5%), e é também o grupo com menor conteúdo em estragol (1,8-2,6%). O teor de fenchona neste grupo está entre os 18,4 e os 26,2%. Três das amostras aqui presentes foram recolhidas no distrito de Évora, sendo estas a amostra 09873, proveniente do concelho de Vila Viçosa, a amostra 09880 no concelho de Redondo e a amostra 09884 no concelho de Évora. Uma das amostras deste grupo é proveniente da Guarda, correspondente à amostra 09576, recolhida no concelho de Pinhel e por fim a amostra 09901, é originária de Beja, concelho de Ourique.

Tabela 7 - Representação das amostras com óleos ricos em *trans*-anetol e algum estragol.



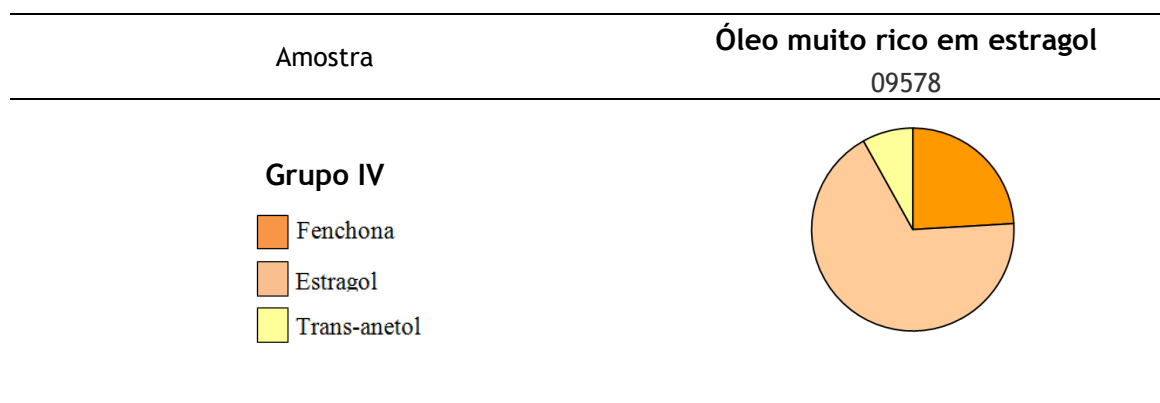
Este grupo é caracterizado por elevadas quantidades de *trans*-anetol (68,3-77,9%), embora que em menor quantidade relativamente ao grupo I (tabela 6). Para além disto, neste grupo verifica-se a existência de maiores quantidades de estragol (9,5-13,2%) comparativamente ao grupo I. Duas das amostras representadas neste grupo foram colhidas no distrito de Santarém, sendo que a amostra 09579 proveniente do concelho de Ourém e a amostra 09581 do concelho de Torres Novas. A amostra com o código 09581 é proveniente do distrito de Beja, pertencente ao concelho de Serpa.

Tabela 8 - Representação das amostras do grupo III.



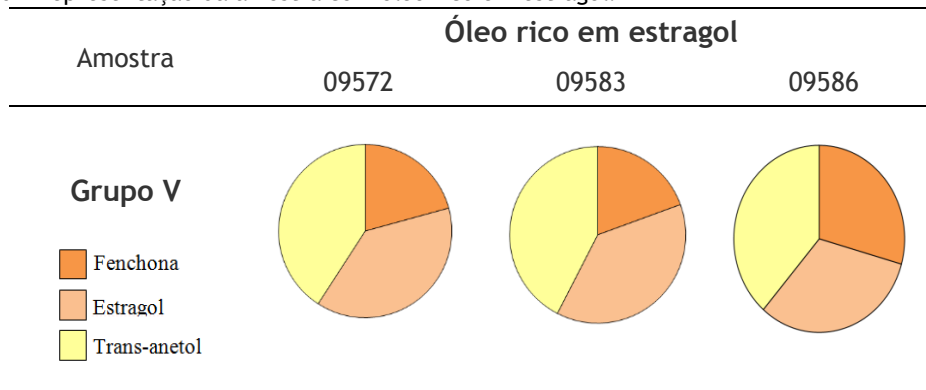
Na tabela 8 está representado o grupo em que as amostras têm em comum o facto de terem uma quantidade considerável de fenchona (32,8-45,0%). A amostra 09564 é proveniente do distrito da Guarda, concelho de Trancoso e a amostra 09587 foi colhida em Santarém, concelho de Ourém. Duas das amostras presentes neste grupo foram colhidas no distrito de Beja, sendo que a amostra 09905 pertence ao concelho de Castro Verde e a amostra 09908 ao concelho de Aljustrel. A última amostra aqui representada tem o código 09913, sendo proveniente do distrito de Setúbal, concelho de Santiago do Cacém.

Tabela 9 - Representação da amostra com óleo rico em estragol.



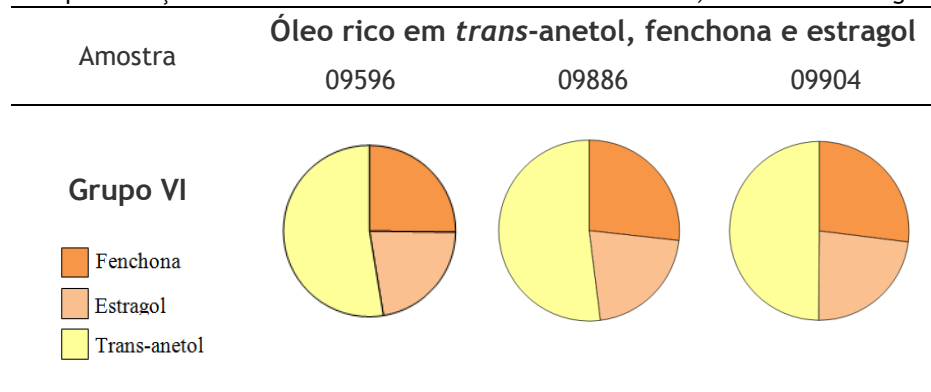
Na tabela 9 está representado o grupo IV constituído apenas por uma amostra, cujo óleo essencial é rico em estragol (66%). A amostra aqui representada, com o código 09578, foi colhida em Leiria.

Tabela 10 - Representação da amostra com óleo rico em estragol.



No grupo V (tabela 10), estão representadas três amostras que têm óleos essenciais ricos em estragol (31,1-37,8%), embora que em menor percentagem relativamente ao grupo III. A amostra com o código 09572 é proveniente do distrito da Guarda, concelho de Trancoso. Das três amostras representadas neste grupo, duas foram colhidas no distrito de Santarém, mais especificamente no concelho de Alcanena (amostra 09583) e Ourém (amostra 09586).

Tabela 11 - Representação das amostras com óleos ricos em *trans*-anetol, fenchona e estragol.



Por fim, na tabela 11 está representado o grupo VI, que corresponde às amostras com óleos ricos em *trans*-anetol (49,0-5,7%), fenchona (24,8-26,5%) e estragol (20,9-22,7%). Das amostras presentes neste grupo, a que apresenta o código 09596 foi colhida em Santarém, concelho de Porto de Mós, a amostra cujo código é 09886 é proveniente de Évora, concelho de Portel e por fim a amostra 09904 foi colhida no distrito de Beja, concelho de Castro Verde.

Assim é possível constatar que nos dois primeiros grupos, grupo I e grupo II, representados nas tabelas 6 e 7, o *trans*-anetol foi sempre o composto maioritário.

No grupo III o óleo das amostras apresenta maiores quantidades de fenchona (32,8-45,0%) e menor conteúdo em *trans*-anetol (38,0-46,9%) relativamente aos grupos anteriores, grupo I e grupo II.

No grupo IV está presente a única amostra que teve como constituinte maioritário o estragol (66,0%), seguindo-se a fenchona (23,4%) e o *trans*-anetol (7,9%). Pela análise global das seis tabelas, verifica-se também que a amostra presente neste grupo é a única em que o *trans*-anetol é o componente minoritário. Tendo em conta estudos realizados anteriormente, a utilização de estragol na indústria alimentar não é recomendada uma vez que se demonstrou que este poderá ser genotóxico e carcinogénico (Raffo *et al.*, 2011).

No grupo V estão representadas as amostras cujo teor de estragol também é considerável (31,1-37,8%), embora neste caso existem também quantidades consideráveis de *trans*-anetol (37,5-41,5%) e fenchona (19,0-28,5%), quando comparado com o grupo IV, em que a amostra 09578 é a única das vinte amostras em estudo cujo perfil químico apresenta o estragol como componente maioritário.

Foi realizado um estudo em 1996 por Bernath, que propôs a existência de três quimiotipos para as sementes de funcho, de acordo com o conteúdo do óleo das sementes em relação ao composto maioritário: um quimiotipo rico em fenchona (31-42%), um rico em estragol (30-43%) e um rico em anetol (60-85%) (Bernáth *et al.*, 1996).

Tendo em conta o estudo referido e comparando os quimiotipos nele proposto com os grupos estabelecidos anteriormente (grupo I a grupo VI), estes resultados podem indicar a presença de um quimiotipo rico em anetol, no caso das amostras inseridas no grupo I e II, com percentagens de *trans*-anetol entre os 68 e os 79%, um quimiotipo rico em fenchona no caso das amostras presentes no grupo III, com percentagens entre os 33 e os 45% e um quimiotipo rico em estragol no caso do grupo IV e V, cujas percentagens de estragol estão entre os 31 e os 66%.

Para além da presença dos quimiotipos propostos por Bernáth *et al.*, analisando o perfil químico do grupo VI, cujas amostras têm quantidades semelhantes entre os três constituintes maioritários, *trans*-anetol, fenchona e estragol, propõe-se neste trabalho a existência de um quarto quimiotipo, rico em *trans*-anetol (49,0-51,7%) / fenchona (24,8-26,5%) / estragol (20,9-22,7%).

4.2 Compostos fenólicos dos extratos da planta

4.2.1 Extração com Soxhlet

A extração foi realizada em Soxhlet com dois solventes orgânicos de polaridade crescente na seguinte ordem: *n* - hexano e acetato de etilo.

Após a extração, evaporou-se o solvente e pesou-se o extrato seco obtido. Calculou-se então o rendimento das extrações. Os valores obtidos dos extratos, após secagem, e do rendimento das extrações estão apresentados na tabela 12 e tabela 13, respectivamente.

Tabela 12 - Quantidade de sementes usadas e extratos obtidos.

Código	Massa de sementes (g)	Massa Extrato (mg)	
		<i>n</i> - hexano	Acetato Etilo
09579	10,17	80	20
09581	10,01	60	20
09583	10,04	20	10
09587	10,10	50	40
09596	10,07	49	19
09873	10,04	51	19
09880	10,07	51	22
09886	10,09	51	20
09901	10,06	60	20
09904	4,38	20	20
09905	10,10	41	23
09908	10,00	47	15
09913	10,04	46	23

Analisando os resultados apresentados nas tabelas 12 é possível verificar que a massa de extrato obtido, após evaporação dos solventes *n*-hexano e acetato de etilo, é superior nos extratos obtidos em *n*-hexano, com valores entre os 20 e os 80 mg, relativamente aos extratos obtidos em acetato de atilo, com valores entre os 10 e os 23 mg.

Tabela 13 - Rendimento das extrações com solventes orgânicos.

Código	Rendimento Extrações (%)	
	<i>n</i> - hexano	Acetato Etilo
09579	0,79	0,20
09581	0,60	0,20
09583	0,20	0,10
09587	0,50	0,40
09596	0,49	0,19
09873	0,51	0,19
09880	0,51	0,22
09886	0,51	0,20
09901	0,60	0,20
09904	0,46	0,46
09905	0,41	0,23
09908	0,47	0,15
09913	0,46	0,23

Analisando os valores apresentado na tabela 13 verifica-se que se obtiveram valores entre os 0,20 e os 0,79, para os extratos em *n*-hexano e entre 0,10 e 0,46, para os extratos obtidos em acetato de etilo. Verifica-se também, como consequência dos pesos obtidos na tabela 12, que os rendimentos obtidos nos extratos de *n*-hexano são superiores quando comparados com os extratos em acetato de etilo.

4.2.2 Compostos fenólicos por HPLC - DAD

Após extração com Soxhlet e evaporação do solvente orgânico, procedeu-se a análise cromatográfica por HPLC-DAD para identificação de possíveis compostos fenólicos presentes na planta.

A identificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos da planta foi realizada pela comparação dos seus tempos de retenção dos picos cromatográficos e também pela comparação dos seus espectros de UV com espectros dos compostos padrão.

Dos extratos analisados por HPLC-DAD, foi possível a identificação de cinco compostos. Nas figuras 14 e 15 apresentam-se como exemplos os cromatogramas obtidos para as amostras com os códigos 09908 e 09913. Os restantes cromatogramas são muito semelhantes.

Caracterização química das sementes de *Foeniculum vulgare* Mill

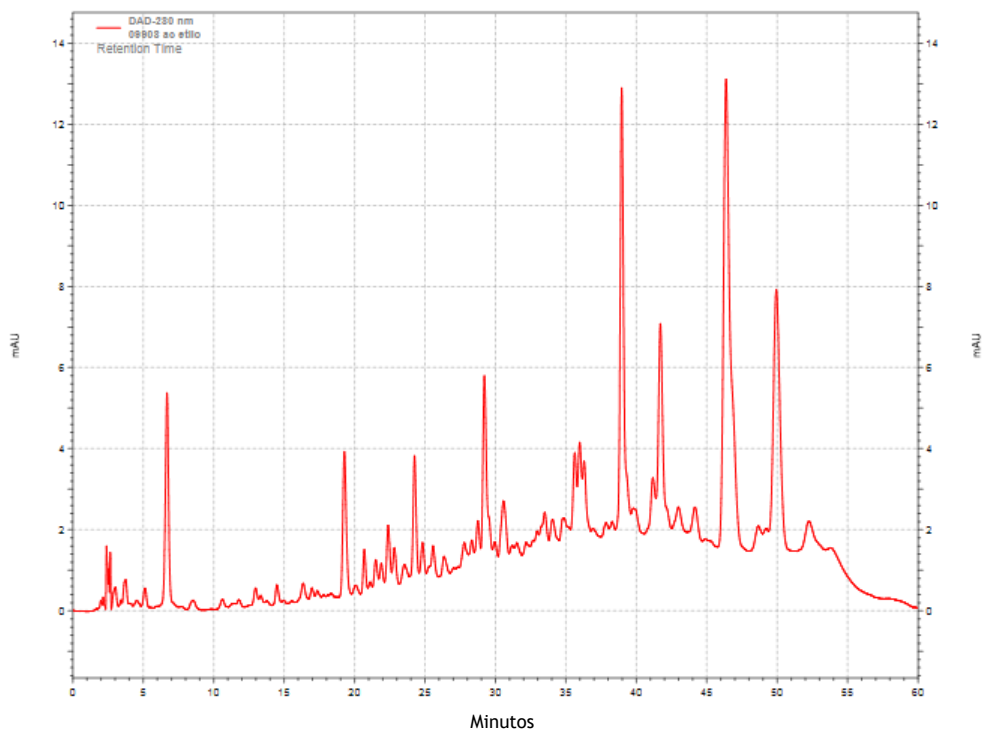


Figura 14 - Cromatograma do extrato pertencente à amostra 09908, a um comprimento de onda de 280nm.

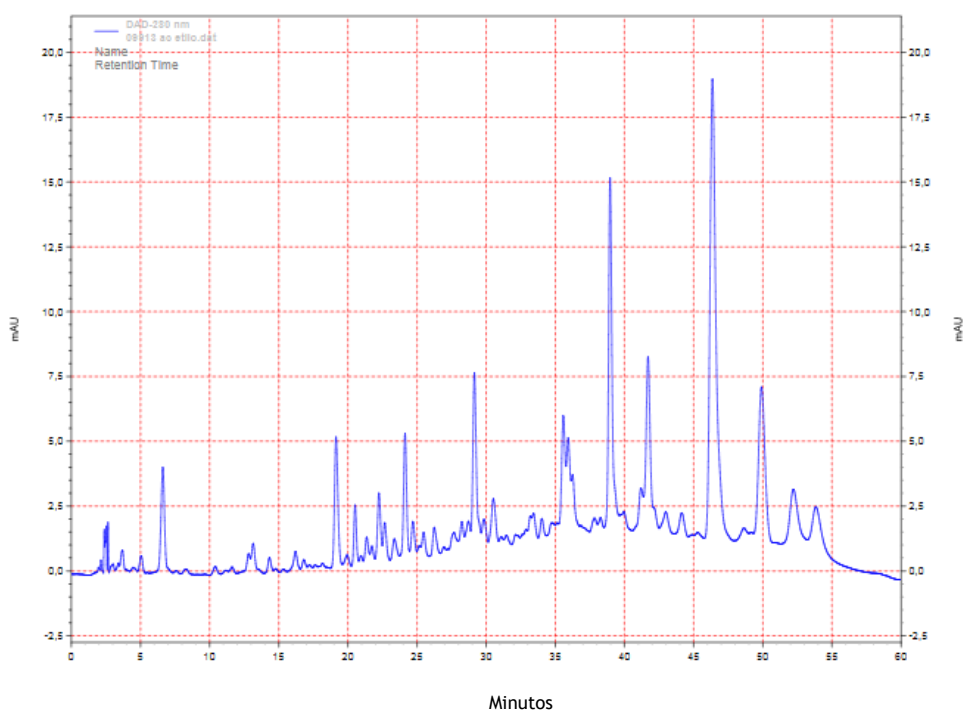


Figura 15 - Cromatograma do extrato pertencente à amostra 09913, a um comprimento de onda de 280nm.

Pela análise dos cromatogramas obtidos (figura 14 e figura 15), a um comprimento de onda de 280 nm, verifica-se a existência de picos cromatográficos coincidentes entre os extratos em estudo, sendo isto ainda mais evidente pela sobreposição dos cromatogramas dos dois extratos, os cinco compostos identificados correspondem, ao pico A (ácido gálico), pico B (ácido protocatecuico), pico C (ácido vanílico), pico D (ácido cumárico) e pico E (rutina), representados na figura 16.

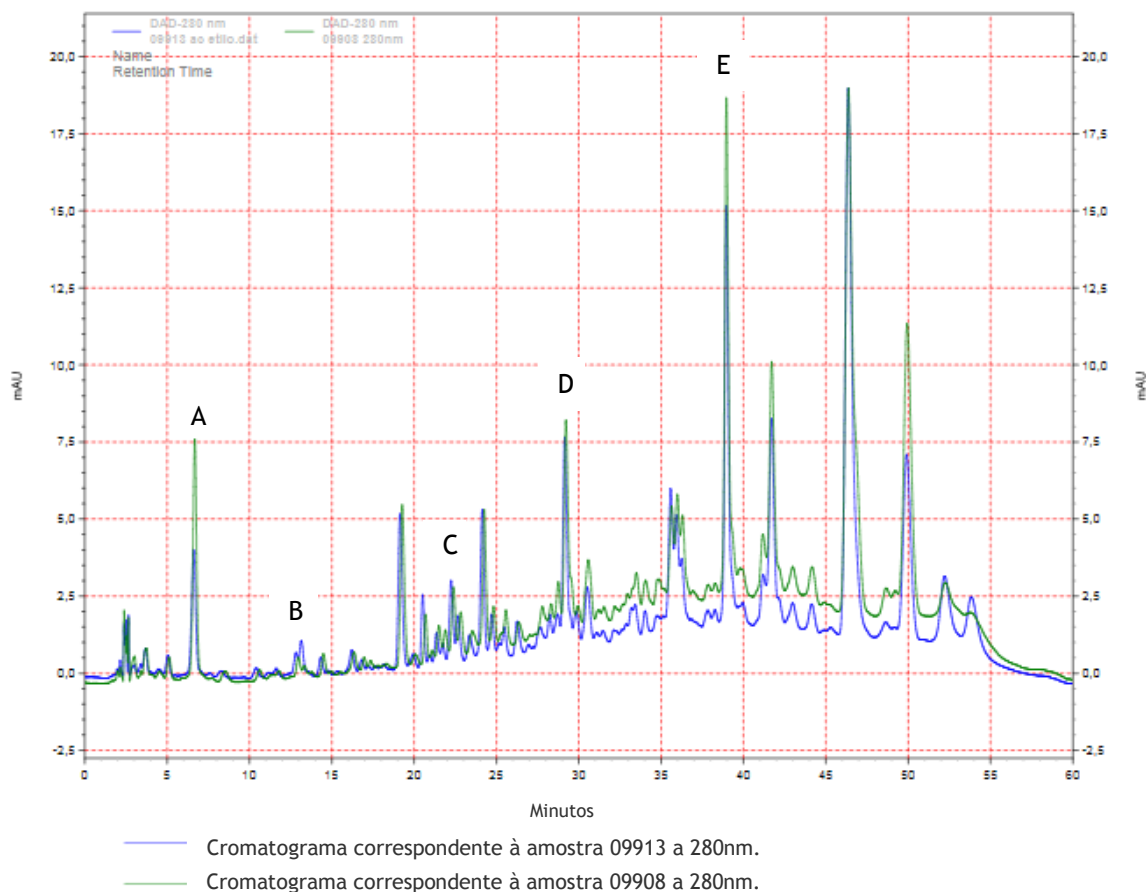


Figura 16 - Sobreposição dos cromatogramas dos extratos das amostras 09908 e 09913, a um comprimento de onda de 280nm.

A quantificação dos compostos identificados foi realizada através da construção de retas de calibração (figura 22) das soluções padrão destes cinco compostos (tabela 14). Através das retas de calibração calculou-se a concentração destes compostos nos extratos.

Os compostos padrão, com as concentrações e respetivas áreas dos picos cromatográficos para a realização das retas de calibração estão representados na tabela 14 e os espetros de ultravioleta obtidos para os picos cromatográficos identificados encontram-se nas figuras 17,18,19,20 e 21.

Caracterização química das sementes de *Foeniculum vulgare* Mill

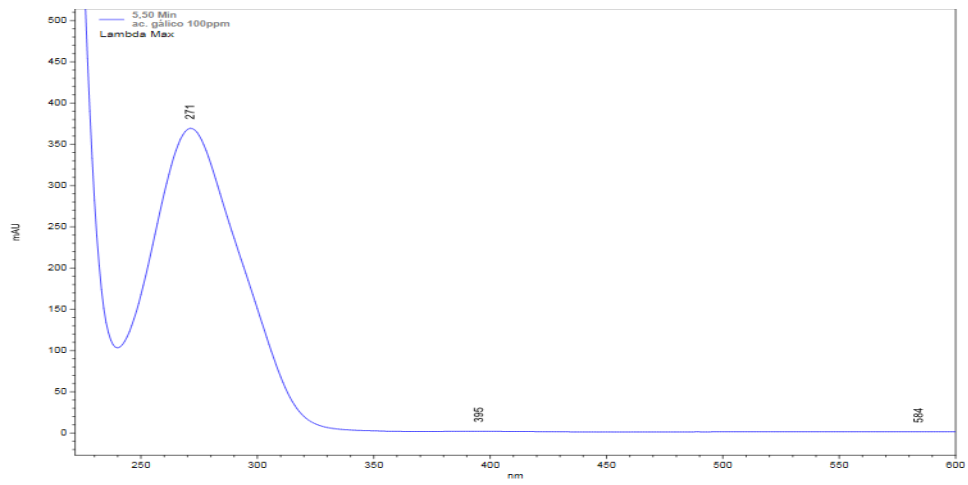


Figura 17 - Espectro de UV para o pico cromatográfico A.

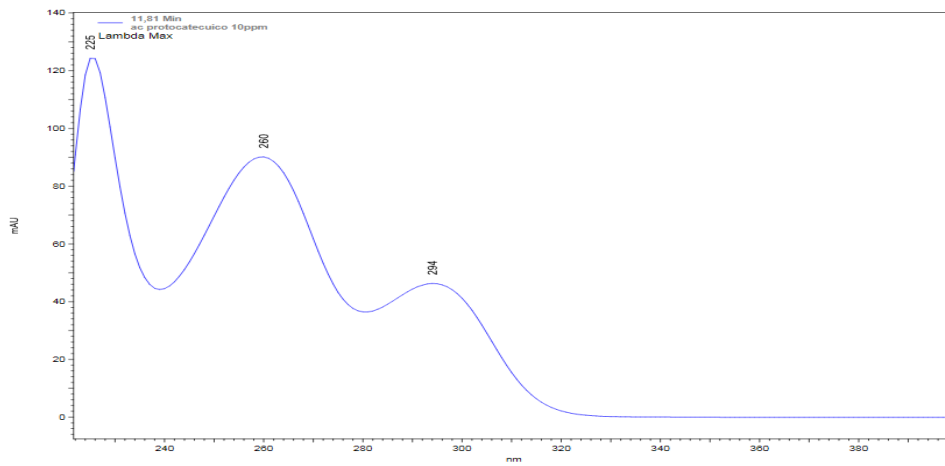


Figura 18 - Espectro de UV para o pico cromatográfico B.

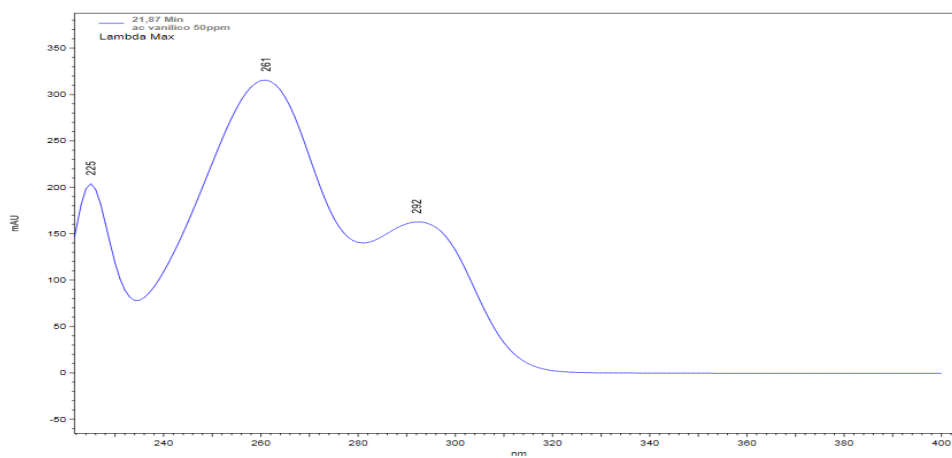


Figura 19 - Espectro de UV para o pico cromatográfico C.

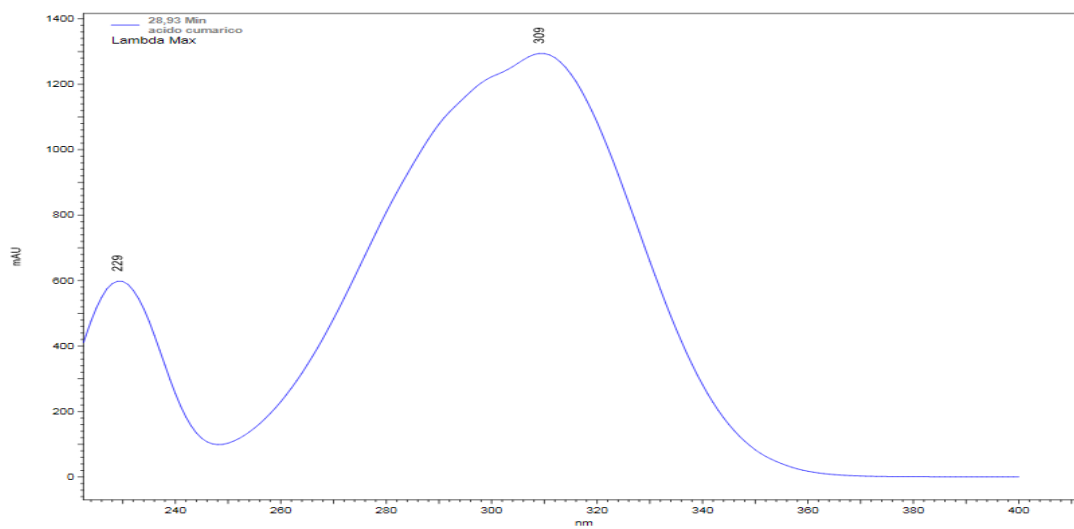


Figura 20 - Espectro de UV para o pico cromatográfico D.

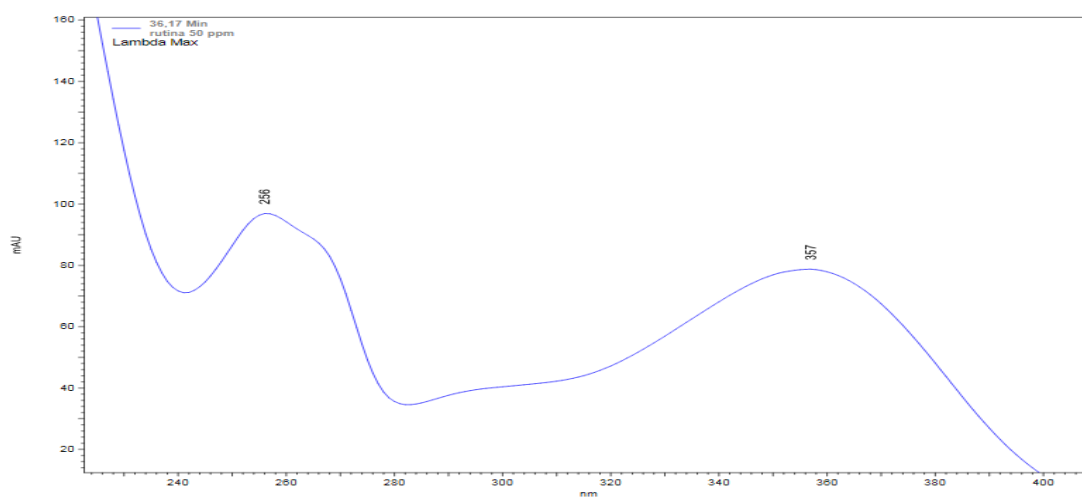


Figura 21 - Espectro de UV para o pico cromatográfico E.

Tabela 14 - Registo das concentrações e área dos picos cromatográficos dos compostos padrão para elaboração das retas de calibração.

Tempo de retenção (min)	Composto	Concentração (ppm)	Área	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
6,2	Ácido Gálico	1,0	254842	271
		2,5	758839	
		5,0	1416282	
		7,5	2188628	
		10,0	3067730	
11,8	Ácido Protocatecuico	1,0	630767	260
		2,5	1516593	
		5,0	3199128	
		7,5	4969394	
		10,0	6404275	
22,7	Ácido Vanílico	1,0	332264	260
		2,5	834561	
		5,0	1577411	
		7,5	2450302	
		10,0	3323470	
30,1	Ácido Cumárico	1,0	1602132	310
		2,5	3883689	
		3,9	5450436	
		5,0	7796750	
		7,5	11609428	
		10,0	15287606	
38,8	Rutina	10,0	915800	256
		20,0	2054643	
		30,0	3143289	
		40,0	4251330	
		50,0	5446608	

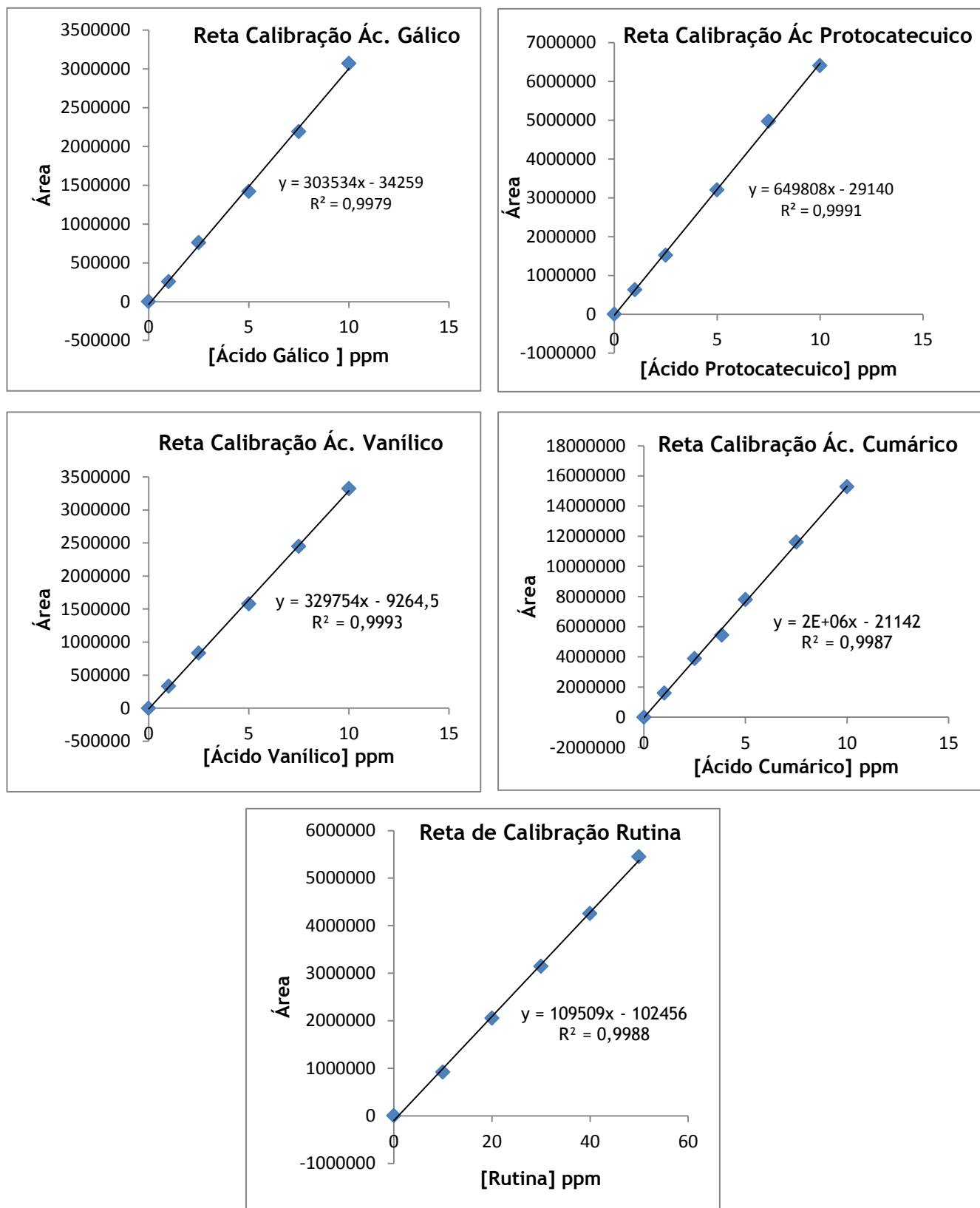


Figura 22 - Retas de calibração dos compostos padrão utilizadas para quantificar os compostos fenólicos presentes no extrato de funcho.

As concentrações, para a amostra 09908, de cada um dos compostos identificados estão representadas na tabela 15. Os resultados obtidos para a concentração dos compostos fenólicos identificados variam entre 3,46 e 39,49 ppm, para o ácido cumárico e rutina, respetivamente. A rutina é portanto o composto fenólico identificado presente em maior quantidade, estando concordante com valores anteriormente publicados por Faudale M. *et al* (2008), em que a rutina foi um dos principais flavonóides presente no funcho.

Tabela 15 - Identificação e quantificação de compostos fenólicos da planta *Foeniculum vulgare*.

Composto identificado	T _{retenção} (min)	λ_{max} (nm)	Área do pico	Concentração (ppm)	Reta de calibração	R ²
Ácido Gálico	6,2	271	1168529	3,74	A = 303534C - 34259	0.998
Ácido Protocatecuico	11,8	260	4902049	7,50	A = 649808C - 29140	0,999
Ácido Vanílico	22,7	260	2482160	7,50	A = 329754C - 9264,5	0.999
Ácido Cumárico	30,1	310	6946148	3,46	A = 2E+06C - 21142	0.999
Rutina	38,8	256	4426977	39,49	A = 109509C - 102456	0.999

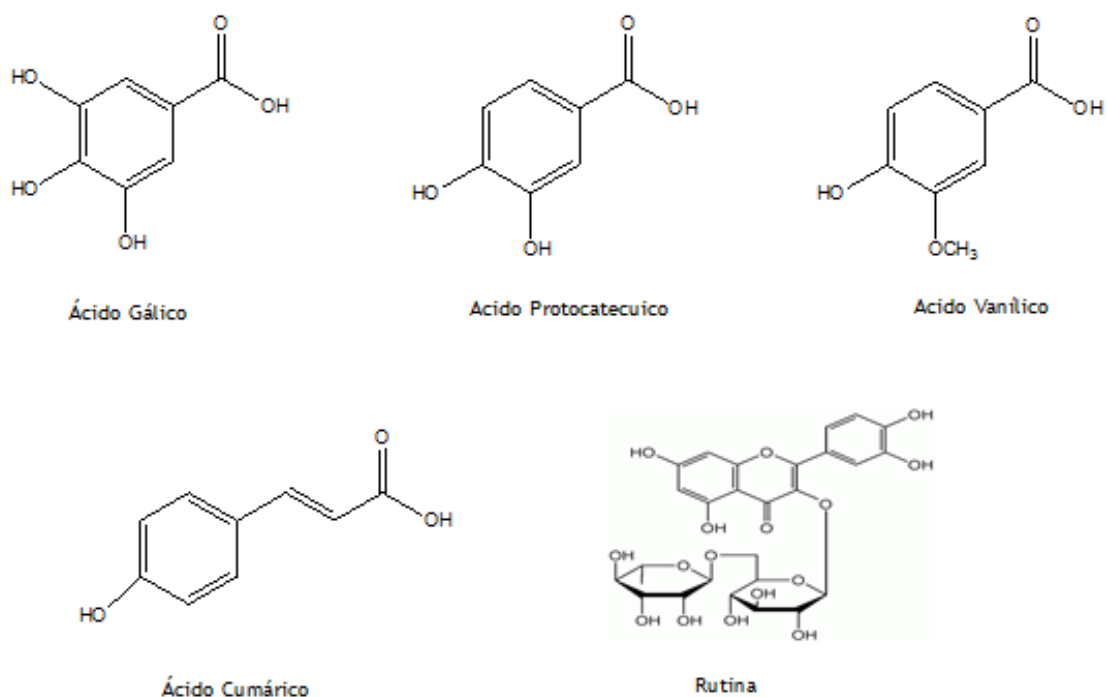


Figura 23- Estrutura dos compostos fenólicos identificados no *F. vulgare*.

4.3 Caracterização por espectroscopia

Os compostos existentes em maior percentagem no óleo essencial da semente de funcho (fenchona, *trans*-anetol e estragol) foram caracterizados por técnicas de espectroscopia de infravermelho (IV), ultravioleta (UV), massa (MS) e ressonância magnética nuclear de protão (^1H RMN) e de carbono 13 (^{13}C RMN). Através da análise espectroscópica destes três compostos, foi possível confirmar a estrutura dos mesmos.

4.3.1 Fenchona

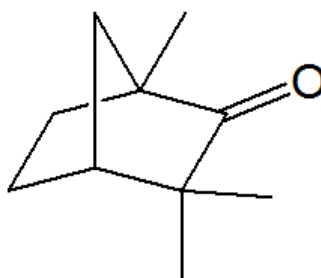


Figura 24 - Estrutura química da fenchona.

Pelo espectro de IV (figura 47) para a fenchona pode verificar-se a presença de uma banda de absorção a 1736 cm^{-1} característica da vibração de extensão entre os átomos de carbono este composto, correspondente ao grupo carbonilo da fenchona, sendo assim possível verificar a existência do grupo funcional presente na estrutura da fenchona.

No espectro de massa de baixa resolução (figura 48) o ião molecular M^{+} surge a m/z 152, correspondente à fórmula química $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$.

Em relação aos dados de RMN de ^1H para a fenchona, cujos resultados estão apresentados na tabela 16, pode observar-se que a fenchona possui dois singletos. O primeiro singlete a δ 1,15 corresponde aos protões do grupo metilo na posição 10 e o segundo singlete a δ 1,04 aos protões dos grupos metilos das posições 8 e 9. Tem também um duplo duplete na posição 4.

Pela análise dos espectros de RMN de ^{13}C (figura 50) cujos valores de desvios químicos estão apresentados na tabela 17, verifica-se que a fenchona apresenta sinais correspondentes a dez átomos de carbono, dos quais três são quaternários, sendo o que aparece a 223,40 ppm característico do carbono do grupo carbonilo. Pode-se observar ainda um sinal de um carbono terciário, três sinais de átomos de carbono secundário e três são relativos a átomos de carbono primário.

4.3.2 *trans* - anetol

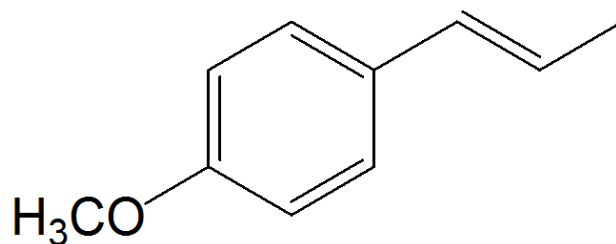


Figura 25 - Estrutura química do *trans*-anetol.

O espectro de IV (figura 51) do *trans*-anetol apresenta absorções características das ligações C-H presentes no anel aromático (3022 cm^{-1}), da ligação dupla (1606 cm^{-1}), das ligações duplas do anel aromático (1508 cm^{-1}) e da ligação C-O-C (1241 cm^{-1}).

No espectro de massa (figura 52) o íon molecular M^{+} surge a m/z 148 que corresponde à fórmula molecular $C_{10}H_{12}O$.

No espectro de UV (figura 53) verifica-se $\lambda_{\text{máx}}=206\text{ nm}$ e 270 nm , que justifica a presença do anel aromático conjugado com outra ligação dupla na estrutura da molécula.

Analisando o espectro de ^1H RMN do *trans*-anetol (figura 54), cujos resultados estão apresentados na tabela 16, verifica-se que este apresenta a δ 3,83 um singlete correspondente aos prótons do grupo metilo, na posição 10. Verifica-se a existência de dois dupletos a δ 6,87 ($^3J=8,7\text{ Hz}$) e a δ 7,27 ($^3J=8,5\text{ Hz}$), o primeiro refere-se aos prótons das posições 2 e 6 e o segundo aos das posições 3 e 5. Tem dois duplos dupletos, um a δ 6,38 ($^3J_{\text{trans}}=15,7\text{ Hz}$ e $^3J_{\text{alílico}}=1,8\text{ Hz}$) e outro a δ 1,89 ($^3J_{\text{H9H8}}=6,6\text{ Hz}$ e $^3J_{\text{alílico}}=1,8\text{ Hz}$) que correspondem aos prótons das posições 7 e 9 respetivamente e ainda um duplo quarteto a δ 6,13 ($^3J_{\text{trans}}=15,7\text{ Hz}$ e $^3J_{\text{H8H9}}=6,6\text{ Hz}$) do próton da posição 8.

O espectro de ^{13}C RMN do *trans*-anetol (figura 55) apresenta sinais correspondentes a dez átomos de carbono, dos quais dois são quaternários, seis são sinais relativos a átomos de carbono terciários e dois sinais são de átomos de carbono primários.

4.3.3 Estragol

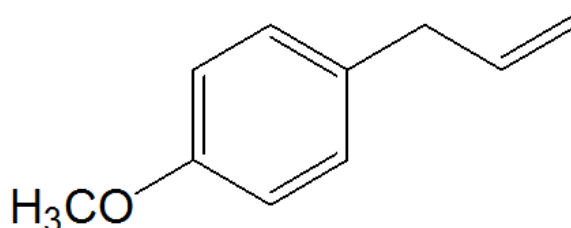


Figura 26 - Estrutura química do estragol.

O espectro de IV (figura 56) para o estragol apresenta absorções características das ligações simples C-H pertencentes ao anel aromático (3001 cm^{-1}), da ligação dupla (1609 cm^{-1}), da vibração da ligação dupla do anel aromático (1508 cm^{-1}), da ligação simples C-O-C (1242 cm^{-1}) e do anel aromático di- substituído nas posições 1,4 (808 cm^{-1}).

No espectro de massa para este composto (figura 57), o ião molecular M^{+} surge a m/z 148 que corresponde à fórmula molecular $C_{10}H_{12}O$.

No espectro de UV (figura 58) verifica-se um $\lambda_{\text{máx}} = 204\text{ nm}$ e 227 nm , que justifica a presença do anel aromático na estrutura da molécula.

O espectro de ^1H RMN do estragol (figura 59), cujos resultados estão apresentados na tabela 16, apresenta um singleto que se refere aos prótons do grupo metilo da posição 10. Pode observar-se também dois dupletos que correspondem aos prótons do anel aromático nas posições 2-6 e 3-5 e um terceiro duplete do próton da posição 7. Tem um multipletto correspondente ao próton da posição 9 e por fim um duplo duplo triplete ($^3J_{\text{trans}}=16,9\text{ Hz}$; $^3J_{\text{cis}}=10,2\text{ Hz}$ e $^3J_{\text{H8H7}}=6,7\text{ Hz}$) do próton da posição 8.

O espectro de ^{13}C RMN do estragol (figura 60) apresenta também sinais correspondentes a dez átomos de carbono, dos quais dois são quaternários, cinco sinais são relativos a átomos de carbono terciários, dois sinais correspondem a átomos de carbono secundários sendo o que aparece a $115,42\text{ ppm}$ relativo ao metileno terminal e por fim um sinal relativo a um átomo de carbono primário.

Pode-se constatar que os compostos *trans*-anetol e o estragol apresentam bandas de absorção no espectro de infravermelho muito semelhantes, uma vez que são isómeros e apenas diferem na posição da ligação dupla da cadeia propenilo (Gross *et al.*, 2002), como se pode verificar pelas figuras 25 e 26.

Tabela 16- Sinais de RMN de ^1H para a fenchona, *trans*-anetol e estragol.

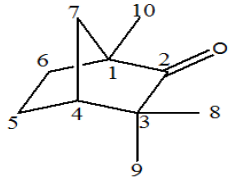
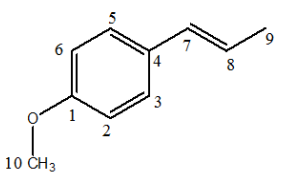
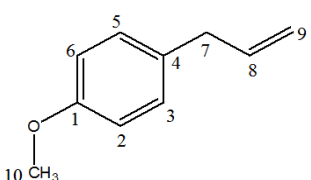
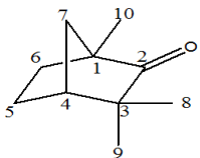
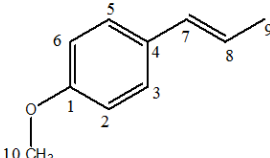
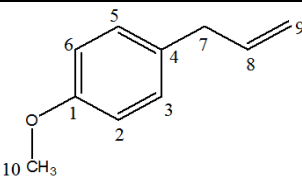
	H	δ (ppm)	Área	Multiplicidade	J (Hz)
Fenchona 	10	1,15	3H	Singleto	-
	8 e 9	1,04	6H	Singleto	-
	4	2,15	1H	Duplo dupleto	3,1; 1,4
	7	1,55	1H	Multipleteo	-
	7	1,79	1H	Multipleteo	-
	6	1,40	1H	Multipleteo	-
	6	1,79-1,50	1H	Multipleteo	-
	5	1,73	1H	Duplo dupleto	5,7;4,0
	5	1,60-1,35	1H	Multipleteo	-
<i>trans</i>-anetol 	7	6,38	1H	Duplo dupleto	15,8; 1,8
	8	6,13	1H	Duplo quarteto	15,7; 6,6
	9	1,89	3H	Duplo dupleto	6,6; 1,7
	10	3,83	3H	Singleto	-
	3 e 5	7,29	2H	Dupleto	8,5
	2 e 6	6,87	2H	Dupleto	8,7
Estragol 	2 e 6	6,89	2H	Dupleto	8,6
	3 e 5	7,15	2H	Dupleto	8,6
	7	3,38	2H	Dupleto	6,7
	8	6,00	1H	Duplo duplo tripleto	16,9; 10,2; 6,7
	9	5,10	2H	Multipleteo	-
	10	3,83	3H	Singleto	-

Tabela 17 - Sinais de RMN de ^{13}C para a fenchona, *trans*-anetol e estragol.

Fenchona			<i>trans</i> -anetol		Estragol	
						
C	Tipo de carbono	δ (ppm)	Tipo de carbono	δ (ppm)	Tipo de carbono	δ (ppm)
1	C	54,14	C	158,50	C	157,99
2	C	223,40	CH	113,90	CH	113,85
3	C	47,38	CH	126,87	CH	129,51
4	CH	45,33	C	130,82	C	132,11
5	CH ₂	24,94	CH	126,87	CH	129,51
6	CH ₂	31,84	CH	113,90	CH	113,85
7	CH ₂	41,65	CH	130,30	CH ₂	39,36
8	CH ₃	23,35	CH	123,48	CH	137,90
9	CH ₃	21,70	CH ₃	18,42	CH ₂	115,42
10	CH ₃	14,62	CH ₃	55,27	CH ₃	55,28

Capítulo V Conclusão

Considerações finais

Esta investigação teve como objetivo a caracterização química do óleo essencial e dos extratos do funcho, proveniente das sementes desta planta. Para tal, foram colhidas amostras em vinte locais diferentes de Portugal, de forma aleatória e foram realizadas extrações por hidrodestilação e extrações sucessivas em Soxhlet com solventes orgânicos com aumento de polaridade desses solventes. A partir das extrações realizadas por hidrodestilação e Soxhlet foi feito o estudo da composição química do óleo essencial e dos compostos fenólicos presentes nos extratos da planta, respetivamente.

Do óleo essencial obtido a partir da hidrodestilação, das vinte amostras de sementes de funcho (*Foeniculum vulgare* Mill.) em estudo, com locais de recolha diferentes, verifica-se claramente que todas elas têm os mesmos compostos maioritários no conteúdo do óleo essencial. Os constituintes presentes em maior quantidade foram os fenilpropanóides e um monoterpeno oxigenado.

Os rendimentos obtidos nas extrações por hidrodestilação foram relativamente razoáveis, estando entre 0,5 e 2,9%.

No total dos dezassete compostos identificados no óleo essencial do funcho através da análise por GC-MS, os componentes maioritários foram, em todas as amostras estudadas, o *trans*-anetol, o estragol e a fenchona. Pela comparação com estudos realizados anteriormente verificou-se a possível presença de um quimiotipo anetol, um quimiotipo fenchona e um quimiotipo estragol. Para além destes quimiotipos, pela análise do perfil químico obtido neste estudo, propôs-se também a presença de um quarto quimiotipo *trans*-anetol/fenchona/estragol.

Embora se pense que o funcho em estudo possa pertencer à subespécie *capillaceum*, devido à elevada quantidade de *trans*-anetol presente nas amostras, é bastante difícil distinguir as subespécies *piperitum* e *capillaceum* apenas com base no conteúdo dos componentes *trans*-anetol e fenchona.

Realizou-se a análise por HPLC-DAD, dos extratos obtidos nas extrações em Soxhlet, para a determinação de compostos fenólicos presentes na planta. Através da comparação de

compostos padrão com os picos cromatográficos dos extratos obtidos nos cromatogramas, identificaram-se cinco compostos fenólicos presentes nos extratos. Além da comparação dos picos cromatográficos, foram também comparados os espectros de UV de cada composto.

A quantificação dos componentes identificados foi realizada com recurso a retas de calibração dos compostos padrão e área dos respetivos picos cromatográficos. Dos cinco compostos identificados, um é flavonoide, a rutina e os outros quatro são ácidos fenólicos, correspondendo ao ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido vanílico e ácido cumárico.

Foi realizada também a caracterização espectroscópica dos componentes maioritários do óleo essencial do funcho, por UV, IV e RMN, com a finalidade de verificar e confirmar a estrutura do *trans*-anetol, estragol e fenchona, correspondentes aos compostos maioritários identificados na análise química por GC-MS do óleo essencial.

Perspetivas futuras

Nesta secção são apresentadas algumas propostas acerca de perspetivas para trabalho futuro, que poderão complementar o trabalho realizado:

- Possível otimização do processo de extração do óleo essencial das sementes do funcho.
- Seria relevante proceder à confirmação da presença dos quimiotipos encontrados, bem como confirmar o quimiotipo proposto neste estudo, correspondente ao *trans*-anetol/fenchona/estragol.
- O estudo realizado pode ser complementado com a realização de testes de atividade biológica das sementes de funcho.

Bibliografia

Aprotosoae, A. C.; Spac, A.; Hancianu, M.; Miron, A.; Tanasescu, V. F.; Dorneanu, V.; Stanescu, U. The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Farmacica* 58 (1) (2010) 46-53.

Azmir, J.; Zaidul, I.S.M.; Rahman, M.M.; Sharif, K.M.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Jahurul, M.H.A.; Ghafoor, K.; Norulaini, N.A.N.; Omar, A.K.M.; Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* 117 (2013) 426-436.

Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008) 446-475.

Barata, M; Rocha, F.; Lopes, V.; Bettencourt, E.; Figueiredo, A. C. Medicinal and aromatic plants - portugal, in Medicinal and Aromatic Plants of The World, [Eds. Munir Ozturk and Gurib-Fakima Bibi Ameenah], in Encyclopedia of Life Support Systems(EOLSS), Developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, 2011.

Barazani, O.; Cohen, Y.; Fait, A.; Diminshtein, S.; Dudai, N.; Ravid, U.; Putievsky, E.; Friedman, J. Chemotypic differentiation in indigenous populations of *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* in Israel. *Biochemical Systematics and Ecology* 30 (2002) 721-731.

Barros, L.; Carvalho, A. M.; Ferreira, I. C. F. R. The nutritional composition of fennel (*Foeniculum vulgare*): shoots, leaves, stems and inflorescences. *LWT- Food Science and Technology* 43 (2010) 814-818.

Barros, L.; Heleno, S. A.; Carvalho, A. M.; Ferreira, I. C. F. R. Systematic evaluation of the antioxidant potential of parts of *Foeniculum vulgare* Mill. from Portugal. *Food and Chemical Toxicology* 47 (2009) 2458-2464.

Bernáth, J.; Németh, É.; Kattan, A.; Héthelyi, É. Morphological and Chemical Evaluation of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) Populations of Different Origin. *Journal of Essential Oil Research* 8 (1996) 247-253.

Bernhoft, A. A brief review on bioactive compounds in plants. Bioactive compounds in plants - benefits and risks for man and animals, Oslo: The Norwegian Academy of Science and Letters, 2010.

Briskin, D. P. Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. *Plant Physiology* 124 (2000) 507-514.

Camejo-Rodrigues, J.; Ascensão, L.; Bonet, M. À.; Vallès, J. An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of “Serra de São Mamede” (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology* 89 (2003) 199-209.

Carilho, R. B. D. Estudos de metabolismo, *in vitro*, de extratos aquosos de funcho, *Foeniculum vulgare*. Aplicações terapêuticas na doença de Alzheimer. Dissertação de mestrado, Universidade de Lisboa, Portugal. 2009

Cavaleiro, C.; Roque, O. L.; da Cunha, P. Contribution for the Characterization of Portuguese Fennel Chemotypes. *Journal of Essential Oils* 5 (1993) 223-225.

Chalbot, M-C. G.; Kavouras, I. G. Nuclear magnetic resonance spectroscopy for determining the functional content of organic aerosols: A review. *Environmental Pollution* 191 (2014) 232-249.

Chittora, M.; Veer, C. Biology and Biotechnology of Fennel. *International Journal of Bioassays* 2 (12) (2013) 1616-1619.

Christaki, E.; Bonos, E.; Giannenas, I.; Florou-Paneri, P. Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds. *Agriculture* 2 (2012) 228-243.

Clevenger; J. F. Apparatus for the determination of volatile oil. *American Pharmaceutical Association* (1928) 345-349.

Clarke, S. Essential Chemistry for Aromatherapy, 2nd edition, Elsevier, 2008.

Conforti, F.; Statti G.; Uzunov, D.; Menichini, F. Comparative Chemical Composition and Antioxidant Activities of Wild and Cultivated *Laurus nobilis* L. Leaves and *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* (Ucria) Coutinho Seeds. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29 (10) (2006) 2056–2064.

Crozier, A.; Clifford, M. N.; Ashihara, H. Plant secondary metabolites, occurrence, structure and role in the human diet. Blackwell Publishing, Oxford, 2006.

Cseke, L.J.; Kirakosyan, A.; Kaufman, P.B.; Warber, S.L.; Duke, J.A.; Brielmann, H.L. Natural Products from Plants, 2nd edition, CRC Press, Florida, 2006.

Damjanovic, B.; Lepojevic, Z.; Zivkovic, V.; Tolic, A. Extraction of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds with supercritical CO₂: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry* 92 (2005) 143-149.

Diao, W-R.; Hu, Q-P.; Zhang, H.; Xu, J-G. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Food Control* 35 (2014) 109-116.

Díaz-Maroto, M. C.; Pérez-Coello, M. S.; Esteban, J.; Sanz, J. Comparison of the volatile composition of wild fennel samples (*Foeniculum vulgare* Mill.) from Central Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (2006) 6814-6818.

Djeridane, A.; Yousfi, M.; Nadjemi, B.; Boutassouna, D.; Stocker, P.; Vidal, N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 97 (2006) 654-660.

Dukic, N. M.; Kujundzic, S.; Sokovic, M.; Couladis, M. Essential oil composition and antifungal activity of *Foeniculum vulgare* Mill. Obtained by different distillation conditions. *Phytotherapy Research* 17(2003) 368-371.

Edris, A. E. Pharmaceutical and therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. *Phytotherapy Research* 21 (2007) 308-323.

Faudale, M.; Viladomat, F.; Bastida, J.; Poli, F.; Codina, C. Antioxidant Activity and Phenolic Composition of wild, edible and medicinal fennel from different Mediterranean countries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (2008) 1912- 1920.

Figueiredo, A. C.; Barroso, J. G.; Pedro, L. G.; Scheffer, J. J. C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and fragrance journal* 23 (2008) 213-226.

Field, L.D; Sternhel, S.; Kalman, J.R. Organic Structures from Spectra, John Wiley and Sons, 4th edition, Chichester, 2008.

Fornari, T.; Vicente, G.; Vázquez, E.; García-Risco, M. R.; Reglero, G. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A* 1250 (2012) 34- 48.

Gámiz-Gracia, L.; Luque de Castro, M.D. Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: comparison with conventional techniques. *Talanta* 51 (2000) 1179-1185.

Gonçalves, S.; Gomes, D.; Costa, P.; Romano, A. The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products* 43 (2013) 465-47.

Gross, M.; Friedman, J.; Dudai, N.; Larkov, O.; Cohen, Y.; Bar, E.; Ravid, U.; Putievsky, E.; Lewinsohn, E. Biosynthesis of estragole and *t*-anethole in bitter fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. Var. *vulgare*) chemotypes. Changes in SAM:phenylpropene *O*-methyltransferase activities during development. *Plant Science* 163 (2002) 1047-1053.

Gross, M.; Lewinsohn, E.; Tadmor, Y.; Bar, E.; Dudai, N.; Cohen, Y.; Friedman, J. The inheritance of volatile phenylpropenes in bitter fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *vulgare*, *Apiaceae*) chemotypes and their distribution within the plant. *Biochemical Systematics and Ecology* 37 (2009) 308-316.

He, W.; Huang, B. A review of chemistry and bioactivities of a medicinal spice: *Foeniculum vulgare*. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5 (16) (2011), 3595-3600.

Hemalatha, M.; Thirumalai, T.; Saranya, R.; Elumalai, E. K.; David, E. A review on antimicrobial efficacy of some traditional medicinal plants in Tamilnadu. *Journal of Acute Disease* (2013) 99-105.

Jayasena, D. D.; Jo C. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science and Technology* (2013) 1-13.

Krishnaiah, D.; Sarbatly, R.; Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and bioproducts processing* 89 (2011) 217-233.

Lahlou, M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research* 18 (2004) 435-448.

Lahlou, M. The Success of Natural Products in Drug Discovery. *Pharmacology and Pharmacy* 4 (2013) 17-31.

Luque de Castro, M.D.; García-Ayuso, L.E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta* 369 (1998) 1-10.

Luque de Castro, M.D.; Priego-Capote, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 2383-2389.

Miguel, M. G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules* 15 (2010) 9252-9287.

Miraldi, E. Comparison of the essential oils from ten *Foeniculum vulgare* Miller samples of fruits of different origin. *Flavour and Fragrance Journal* 14 (1999) 379-382.

Napoli, E. M.; Curcuruto, G.; Ruberto, G. Screening the essential oil composition of wild Sicilian fennel. *Biochemical Systematics and Ecology* 38 (2010) 213-223.

Peter, K. V. Handbook of herbs and spices volume 2, Published by Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2004.

Piccaglia, R.; Marotti, M. Characterization of some Italian types of wild fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2001) 239-244.

Raffo, A; Nicoli, S.; Leclercq, C. Quantification of estragole in fennel herbal teas: Implications on the assessment of dietary exposure to estragole. *Food and Chemical Toxicology* 49 (2011) 370-375.

Romanik, G.; Gilgenast, E.; Przyjazny, A.; Kamiński, M. Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70 (2007) 253-261.

Sánchez-González, L.; Vargas, M.; González-Martínez, C.; Chiralt, A.; Cháfer, M. Use of Essential Oils in Bioactive Edible Coatings. *Food Engineering Reviews* 3 (2011) 1-16.

Silva, S. L.; Silva, A. M.S.; Ribeiro, J. C.; Martins, F. G.; Silva, F. A.; Silva, C. M. Chromatographic and spectroscopic analysis of heavy crude oil mixtures with emphasis in nuclear magnetic resonance spectroscopy: A review. *Analytica Chimica Acta* 707 (2011) 18-37.

Silverstein, R. M.; Bassler, G.C.; Morrill, T.C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Guanabara Koogan S. A. 5ª Edição, Rio Janeiro, 1994.

Singh, G.; Maurya, S.; Lampasona, M.P.; Catalan, C. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food Control* 17 (2006) 745-752.

Stalikas, C. D. Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* 30 (2007) 3268-3295.

Telci, I.; Demirtasb, I.; Sahin, A. Variation in plant properties and essential oil composition of sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) fruits during stages of maturity. *Industrial Crops and Products* 30 (2009) 126-130.

Waksmundzka-Hajnos, M.; Sherma, J. High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis, CRC Press, Florida, 2010.

WHO, General Guidelines for Methodologies on research and evaluation of Traditional Medicine, Geneva, 2000.

Zahid, N. Y.; Abbasi, N. A.; Hafiz, I. A.; Ahmad, Z. Morphological Characteristics and Oil Contents of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) Accessions from Different Regions of Pakistan. *Journal of The Chemical Society of Pakistan* 30 (6) (2008) 889-895.

Anexos

Anexo 1

Neste anexo estão representados os cromatogramas obtidos após análise cromatográfica por GC-MS das vinte amostras de semente de funcho em estudo.

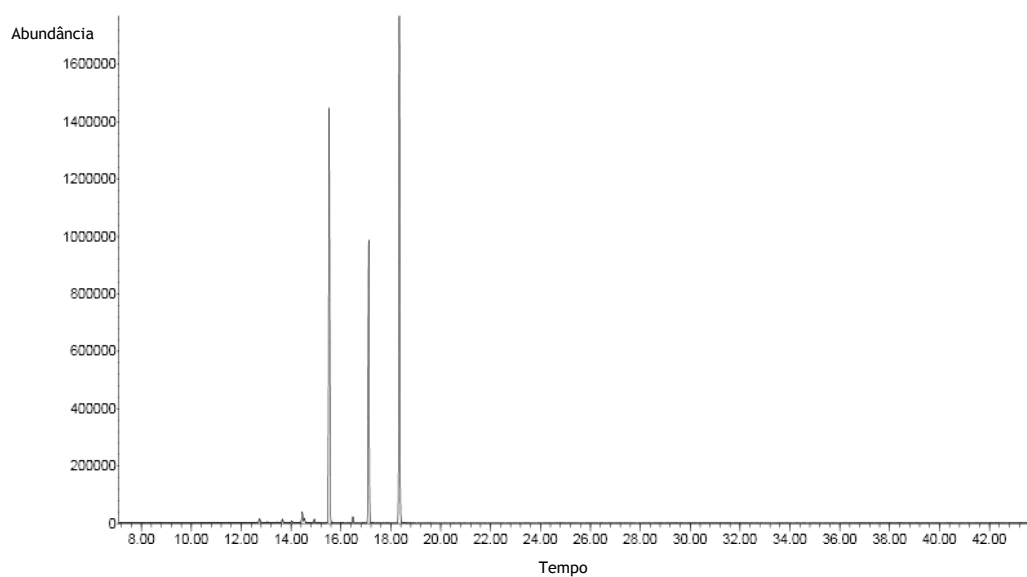


Figura 27 - Cromatograma obtido para a amostra 09564.

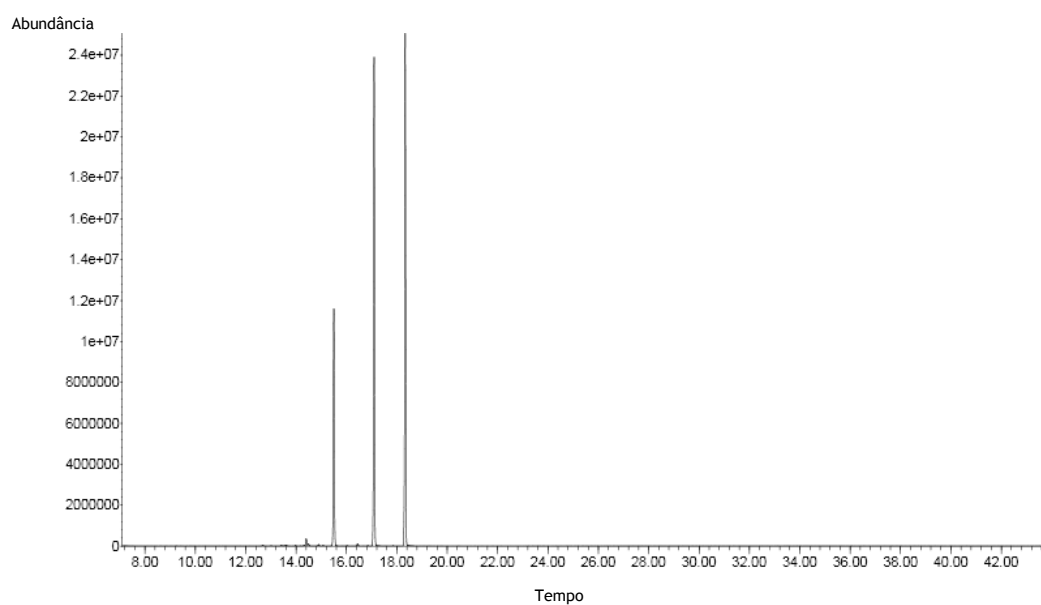


Figura 28 - Cromatograma obtido para a amostra 09572.

Caracterização química das sementes de *Foeniculum vulgare* Mill

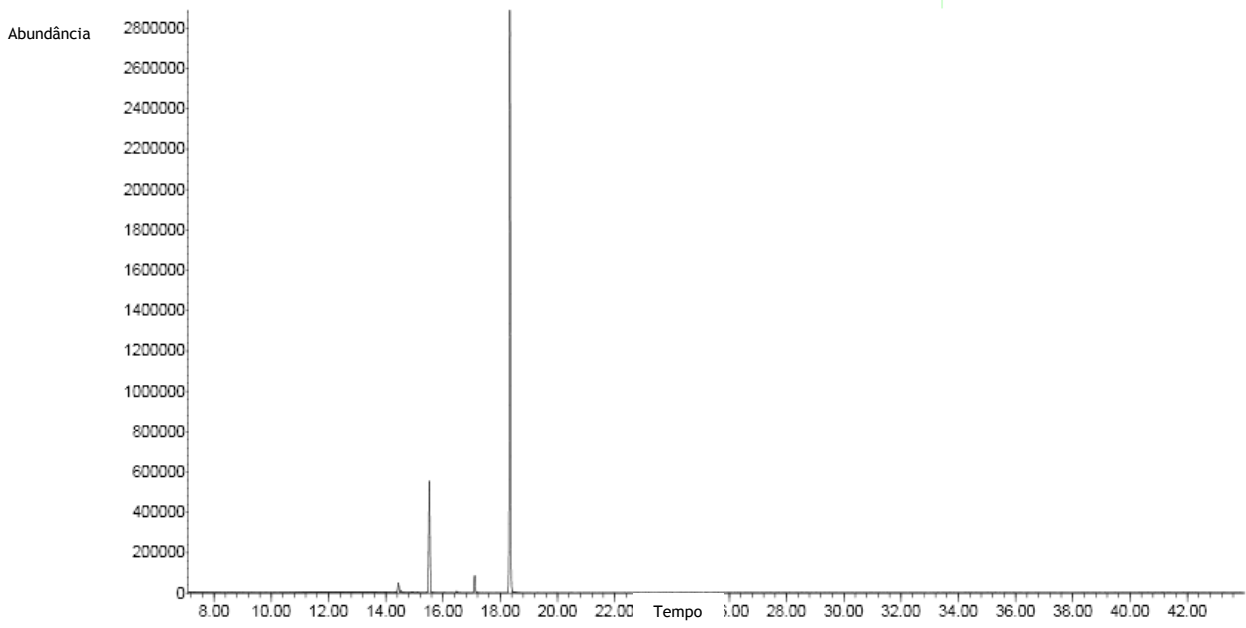


Figura 29 - Cromatograma obtido para a amostra 09576.

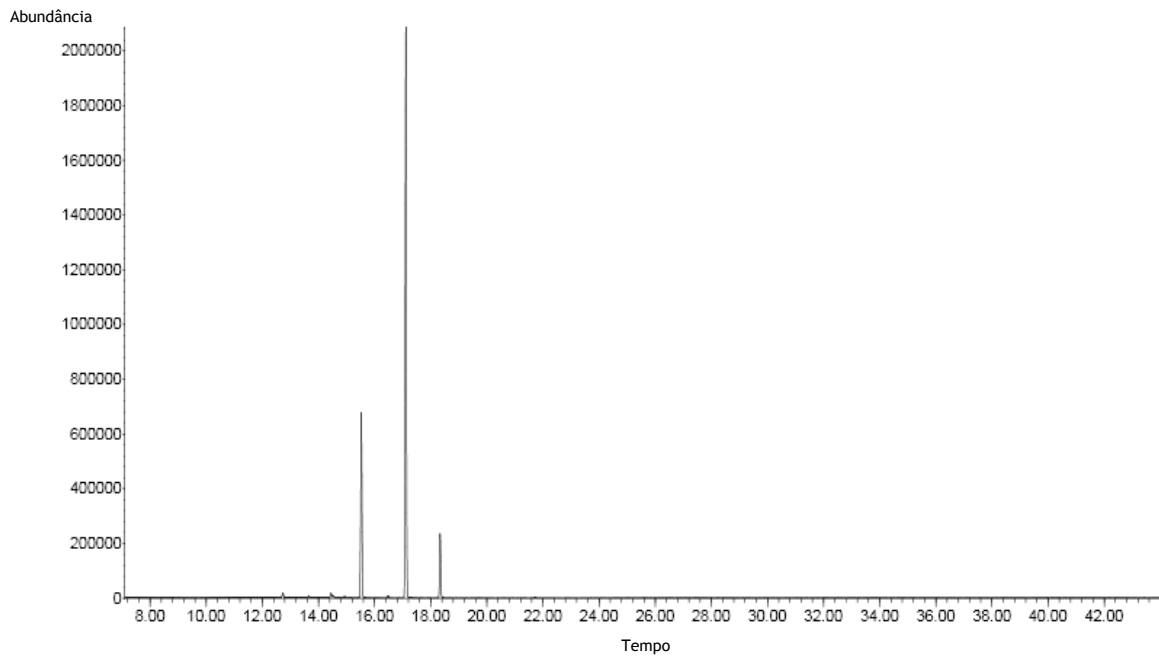


Figura 30 - Cromatograma obtido para a amostra 09578.

Caracterização química das sementes de *Foeniculum vulgare* Mill

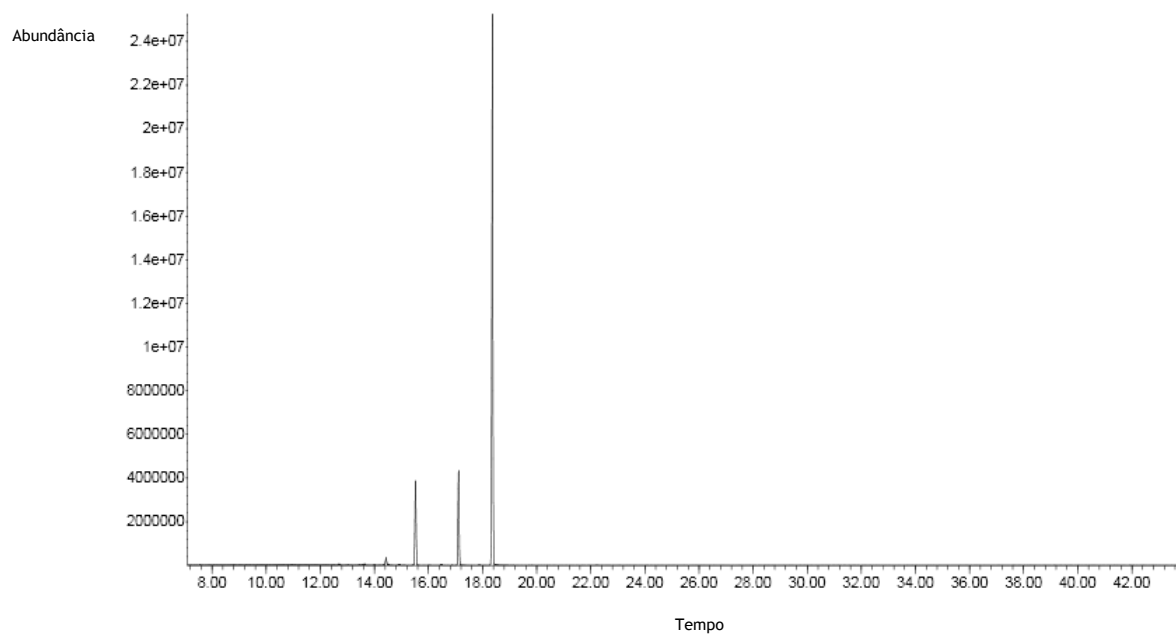


Figura 31 - Cromatograma obtido para a amostra 09579.

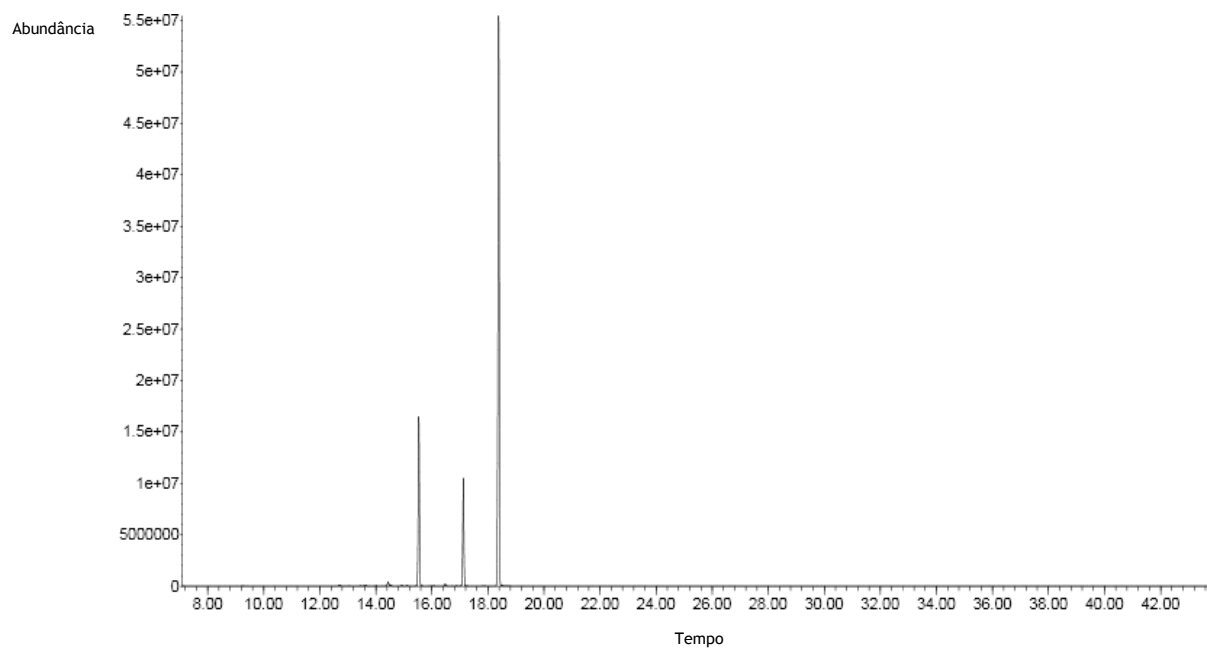


Figura 32 - Cromatograma obtido para a amostra 09581.

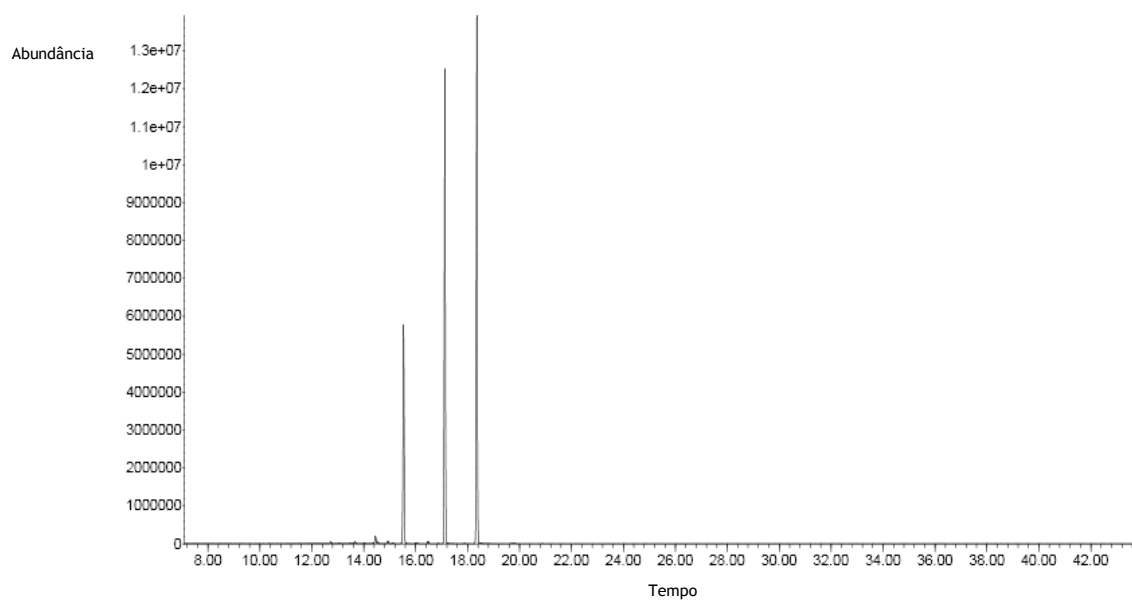


Figura 33 - Cromatograma obtido para a amostra 09583.

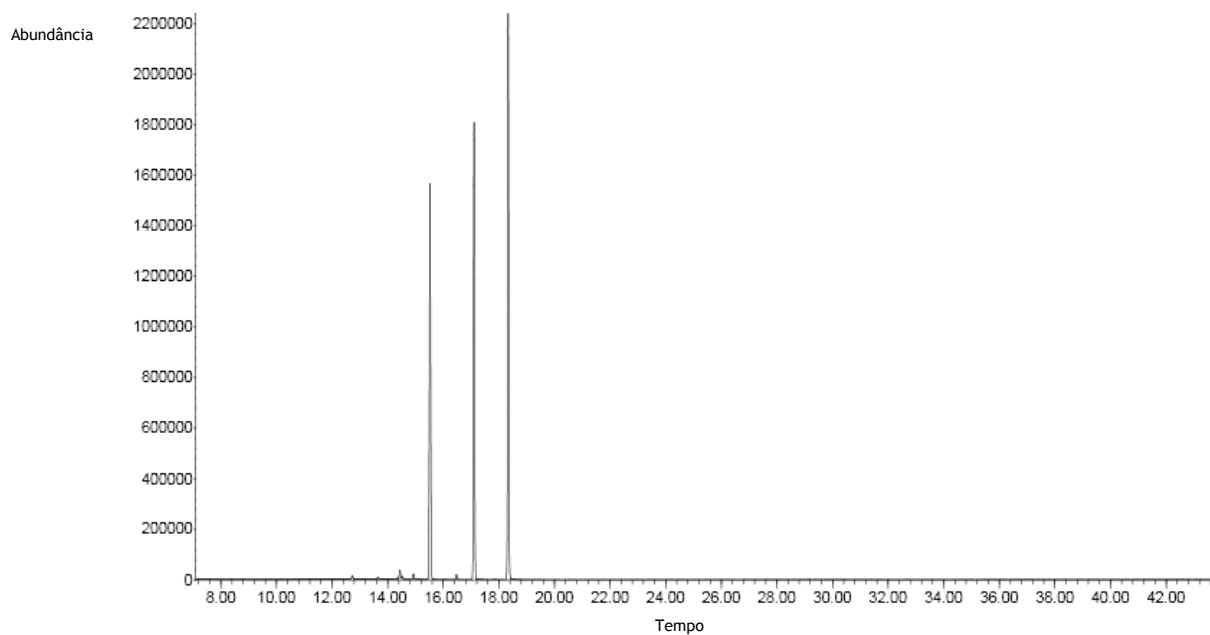


Figura 34 - Cromatograma obtido para a amostra 09586.

Caracterização química das sementes de *Foeniculum vulgare* Mill

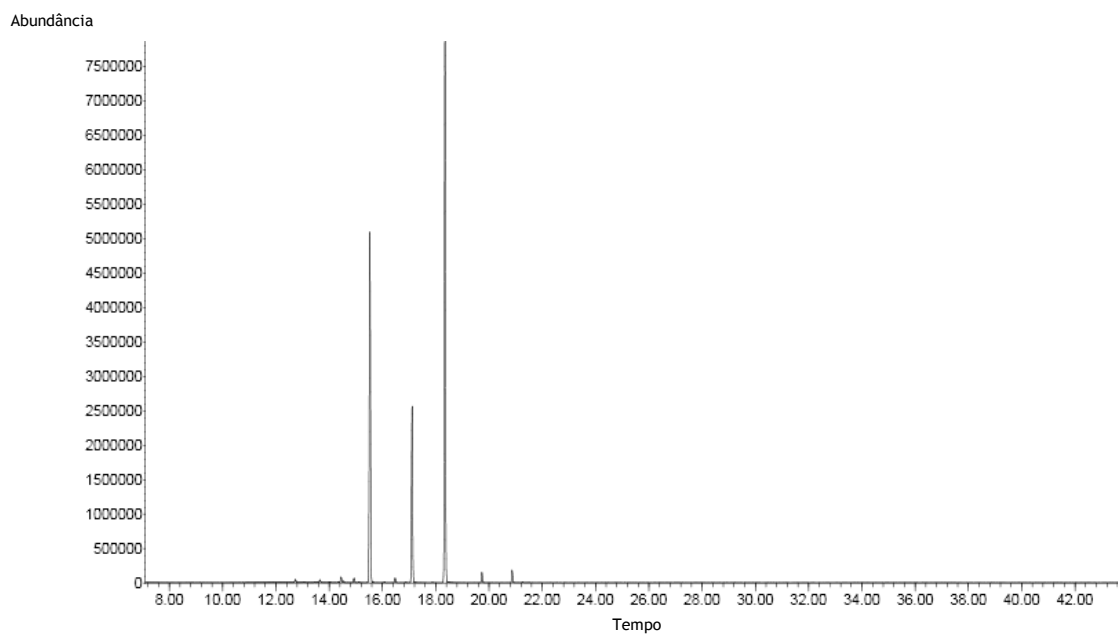


Figura 35 - Cromatograma obtido para a amostra 09587.

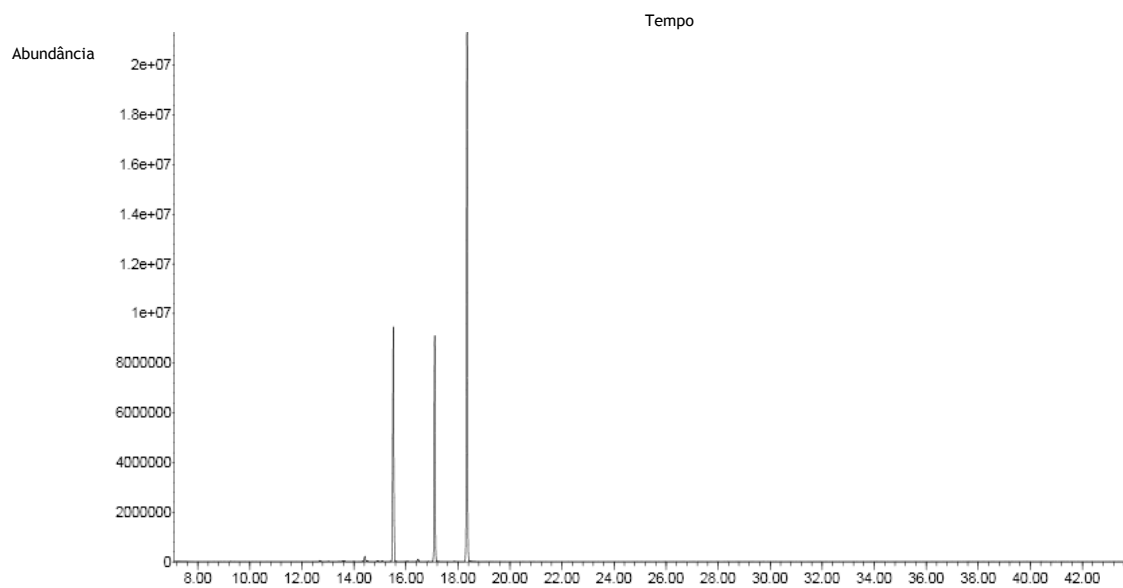


Figura 36 - Cromatograma obtido para a amostra 09596.

Caracterização química das sementes de *Foeniculum vulgare* Mill

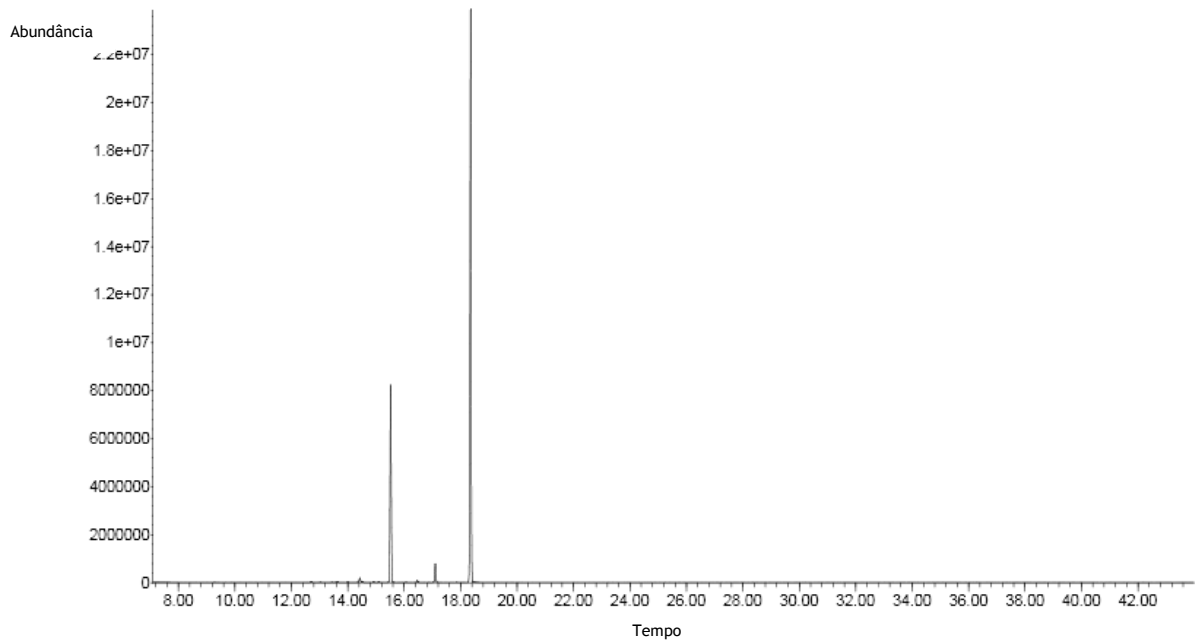


Figura 37 - Cromatograma obtido para a amostra 09873.

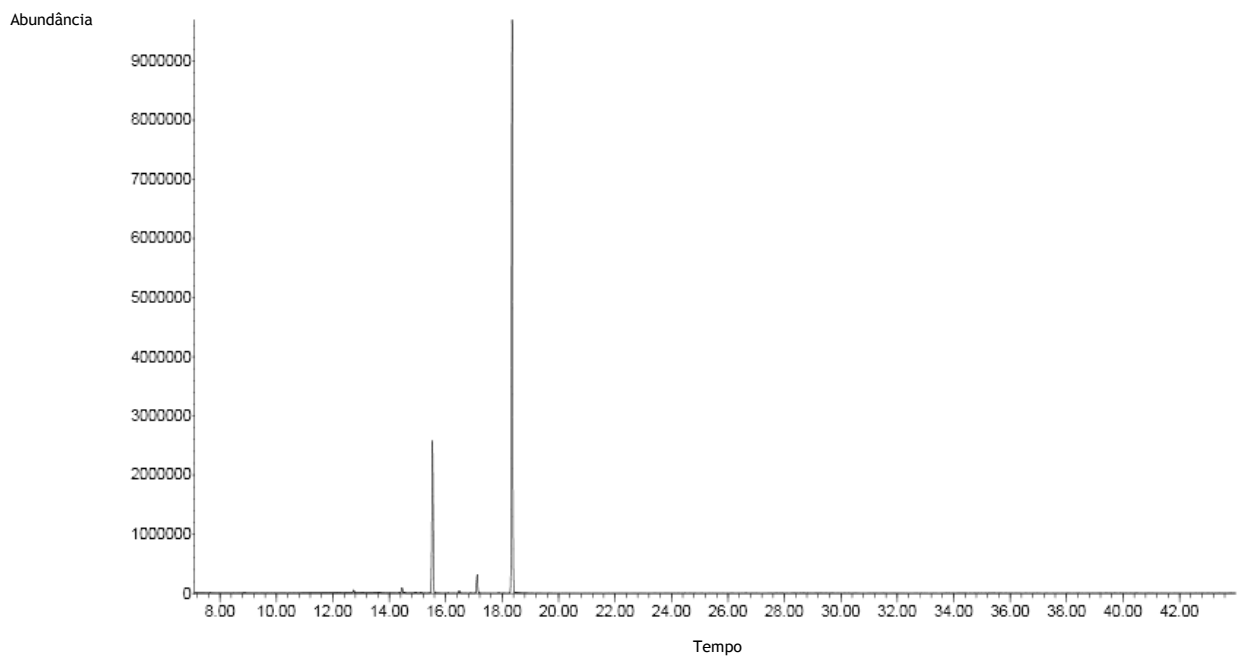


Figura 38 - Cromatograma obtido para a amostra 09880.

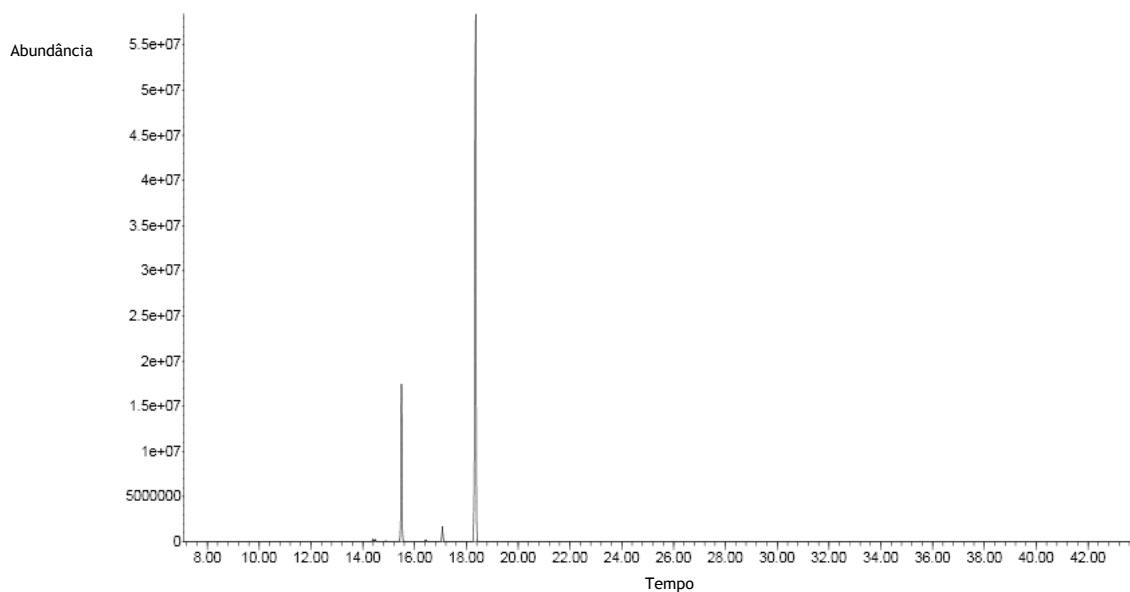


Figura 39 - Cromatograma obtido para a amostra 09884.

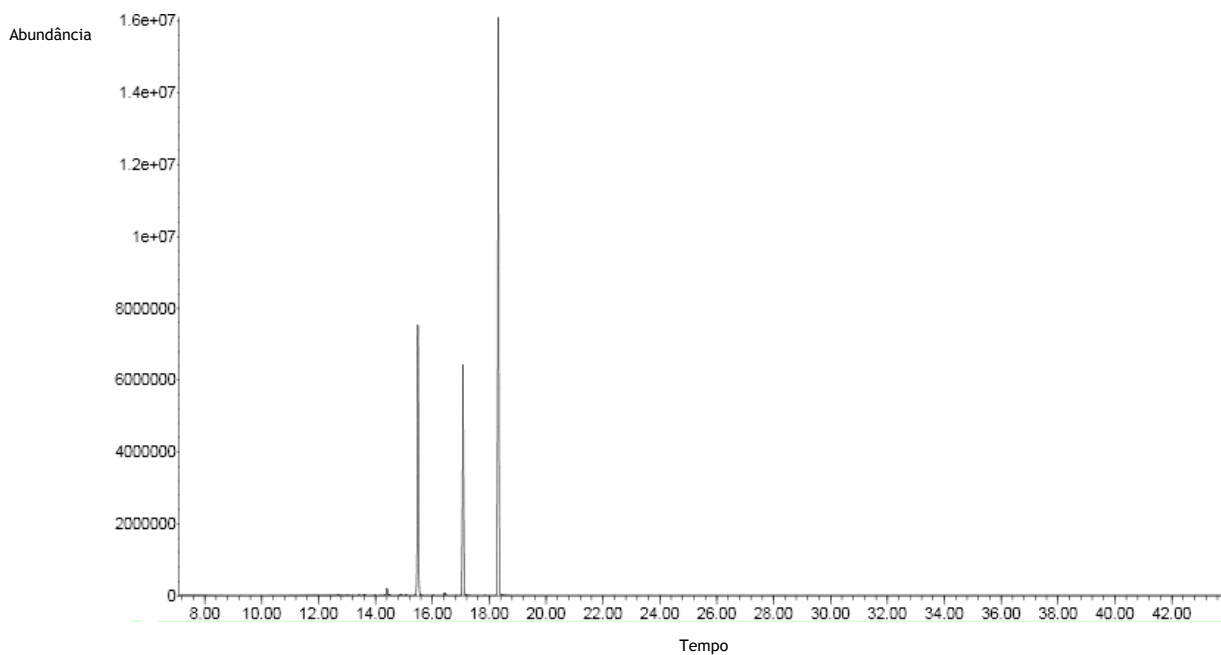


Figura 40 - Cromatograma obtido para a amostra 09886.

Caracterização química das sementes de *Foeniculum vulgare* Mill

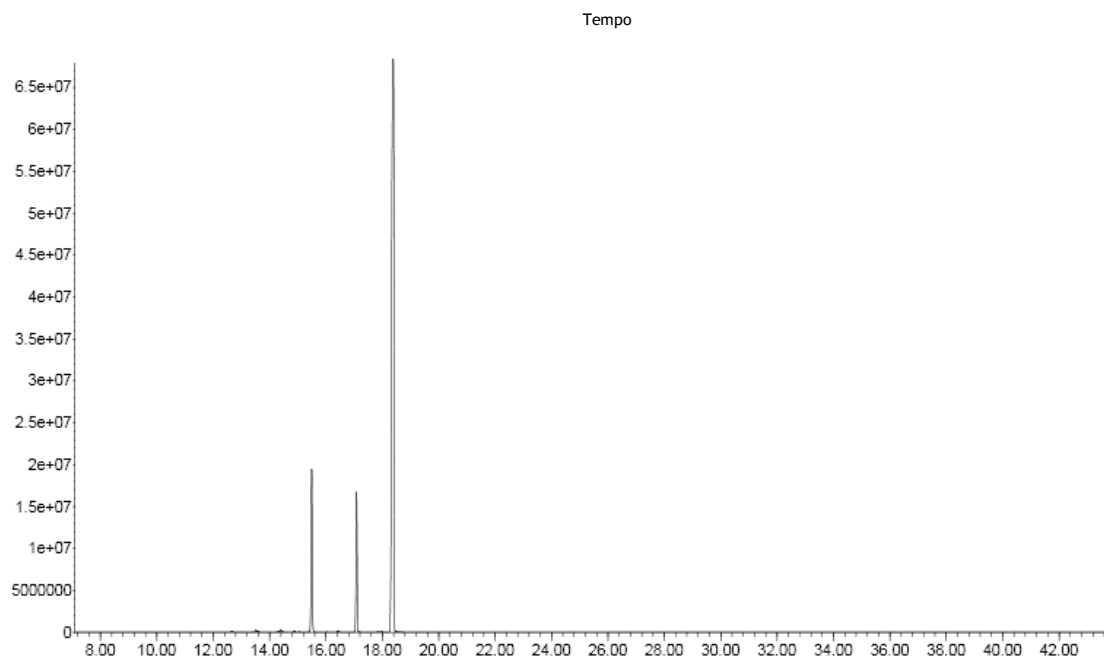


Figura 41 - Cromatograma obtido para a amostra 09887.

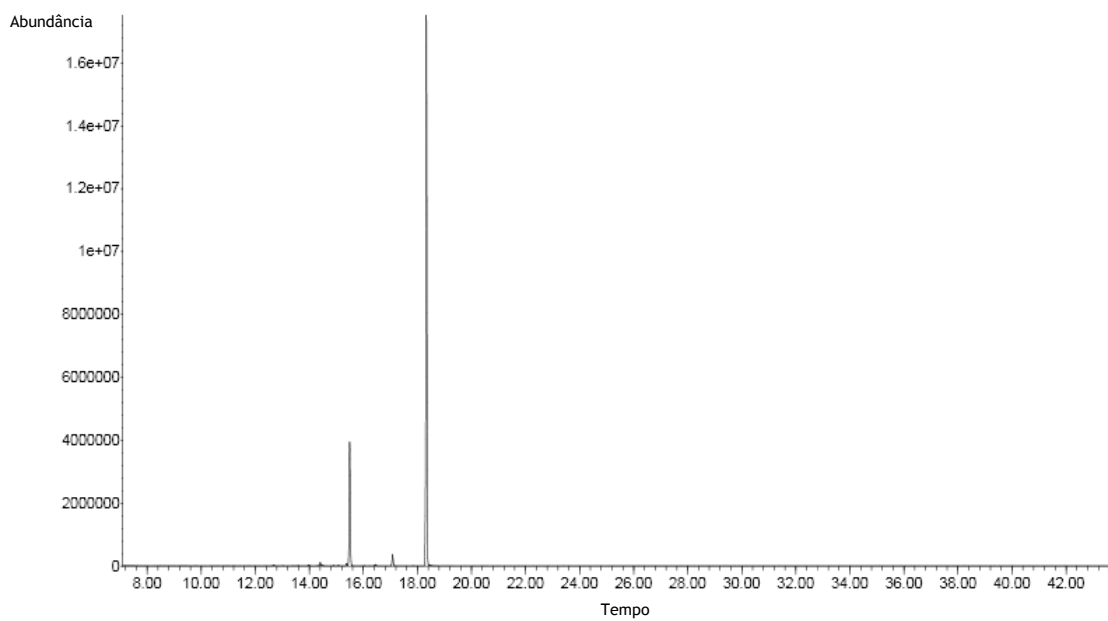


Figura 42 - Cromatograma obtido para a amostra 09901.

Caracterização química das sementes de *Foeniculum vulgare* Mill

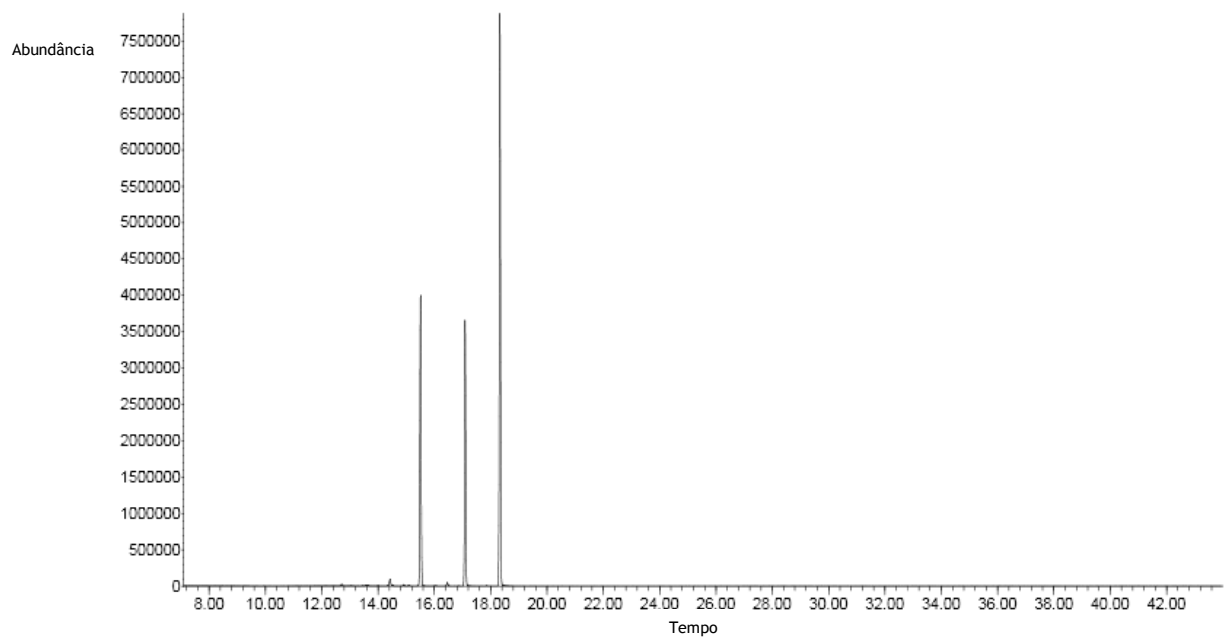


Figura 43 - Cromatograma obtido para a amostra 09904.

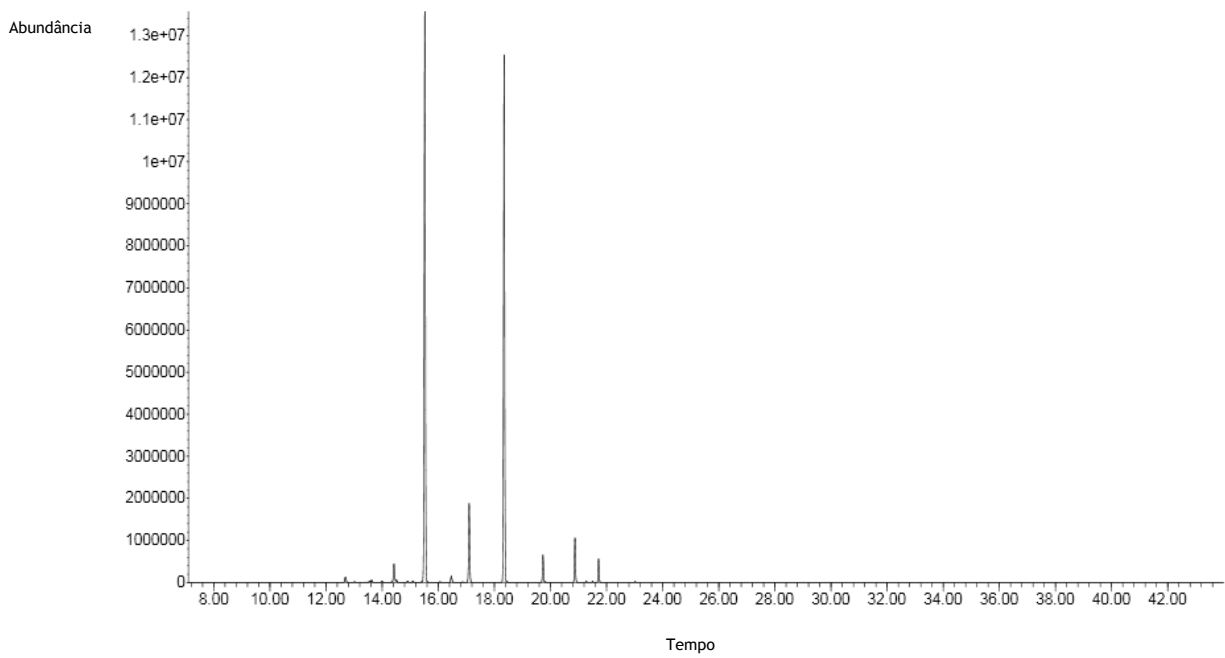


Figura 44 - Cromatograma obtido para a amostra 09905.

Caracterização química das sementes de *Foeniculum vulgare* Mill

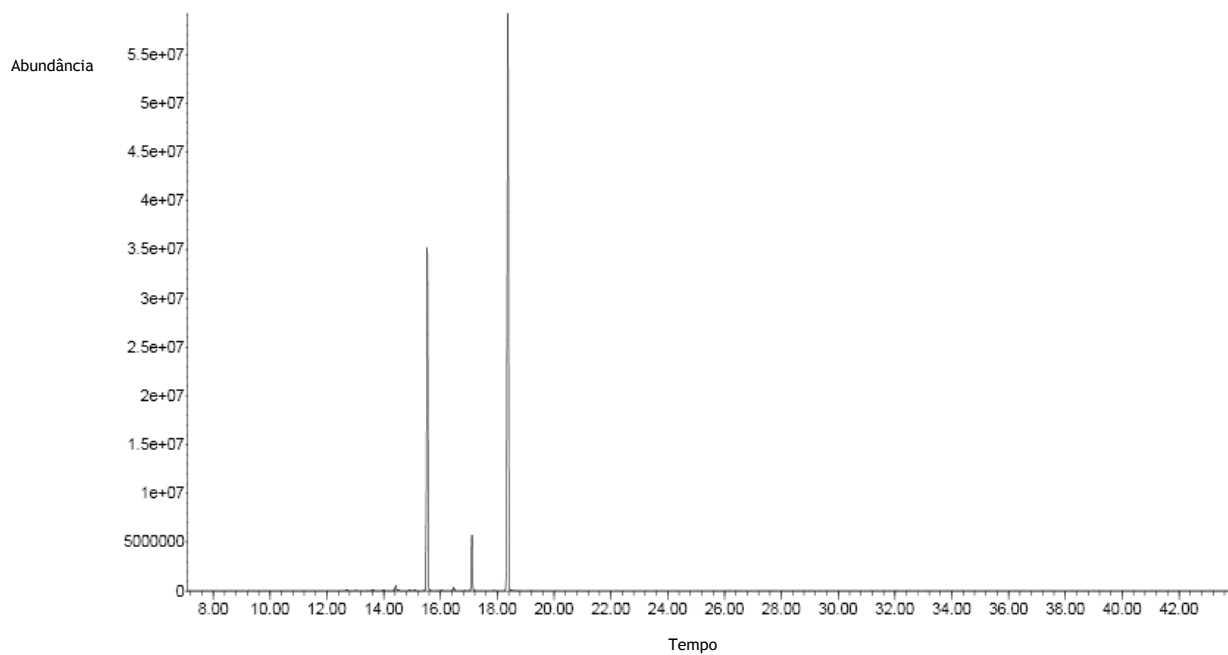


Figura 45 - Cromatograma obtido para a amostra 09908.

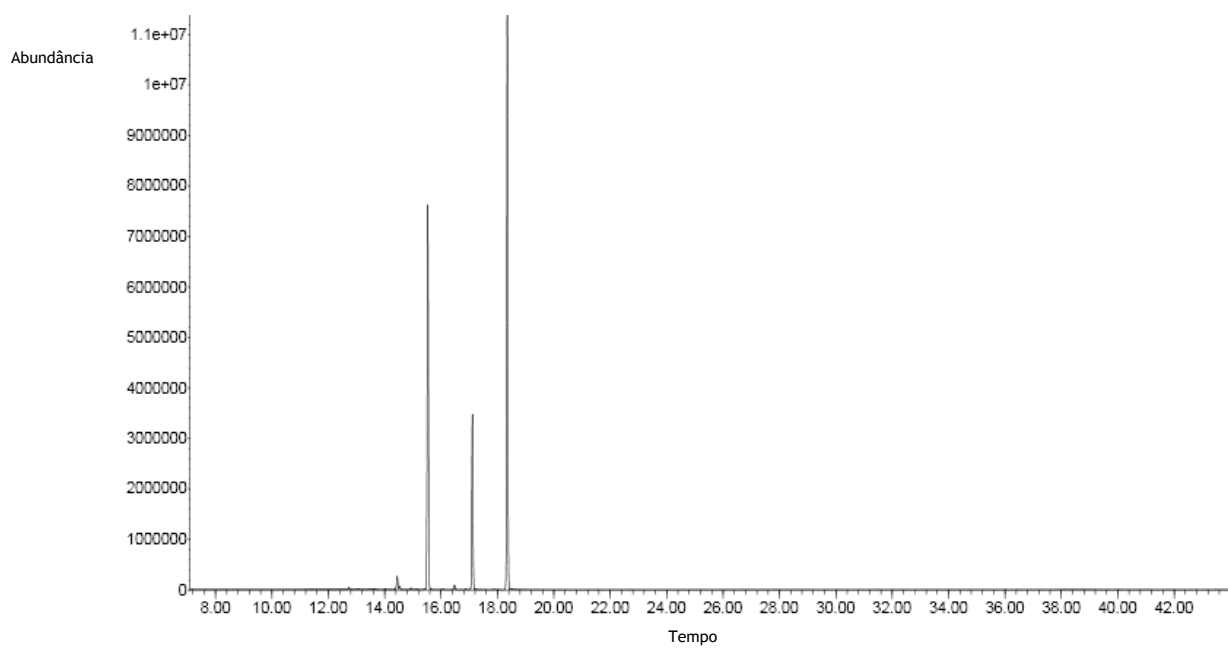


Figura 46 - Cromatograma obtido para a amostra 09913.

Anexo 2

Neste anexo estão apresentados os espectros realizados para a caracterização dos constituintes maioritários do óleo essencial do funcho. Estes incluem os espectros de IV, UV, massas e RMN.

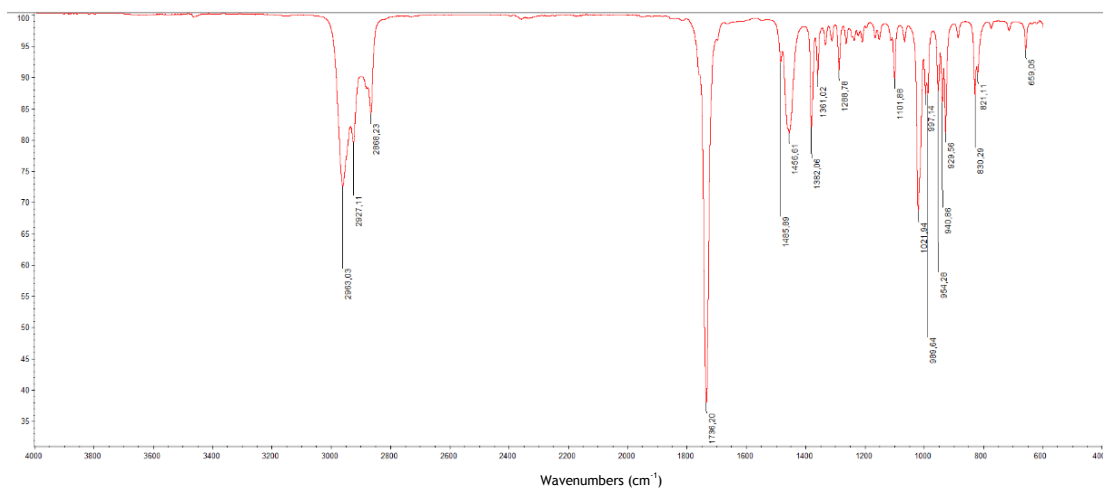


Figura 47 - Espectro de infravermelho da fençhona.

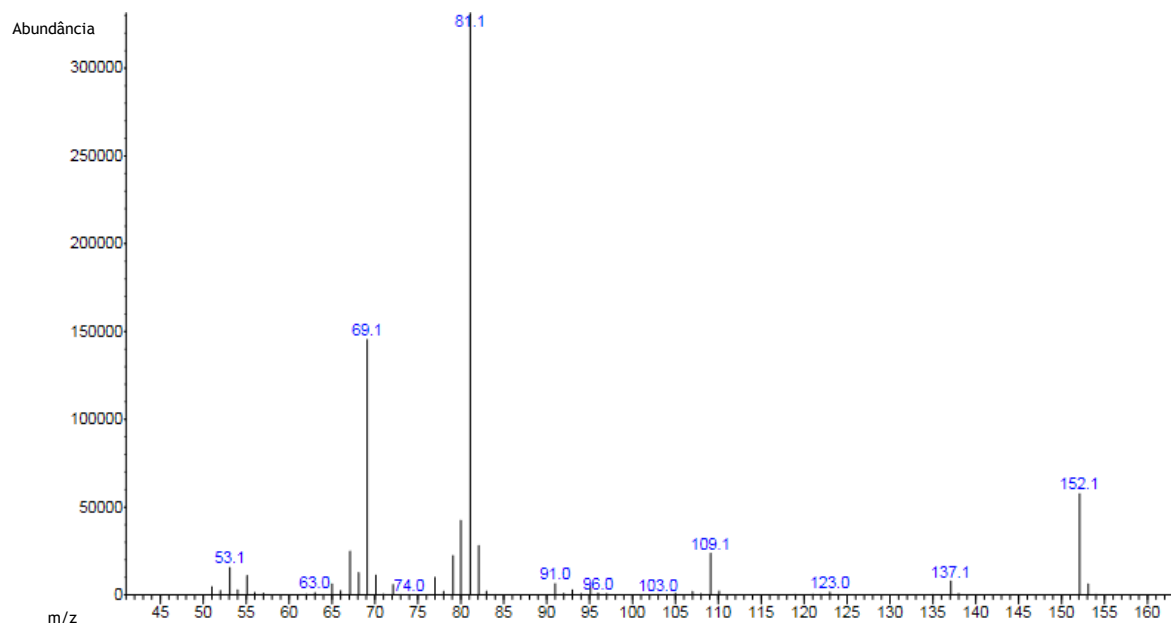


Figura 48 - Espectro de massa para a fençhona.

Caracterização química das sementes de *Foeniculum vulgare* Mill

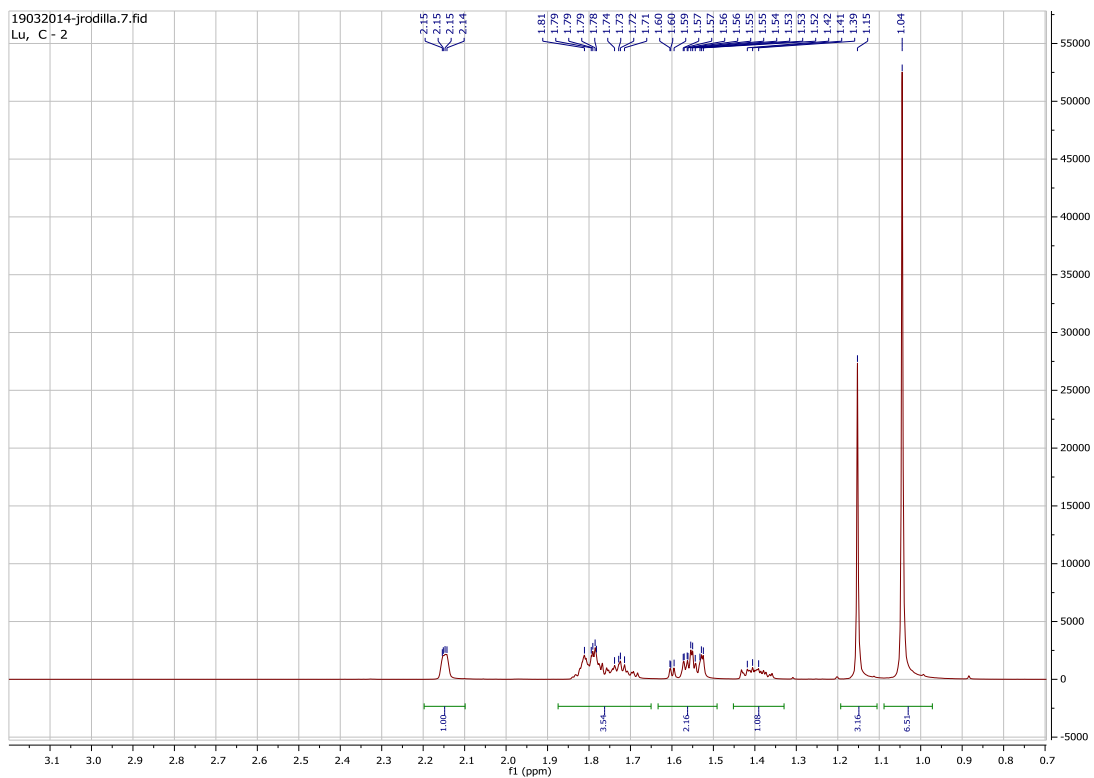


Figura 49 - Espetro de ^1H RMN da fençhona.

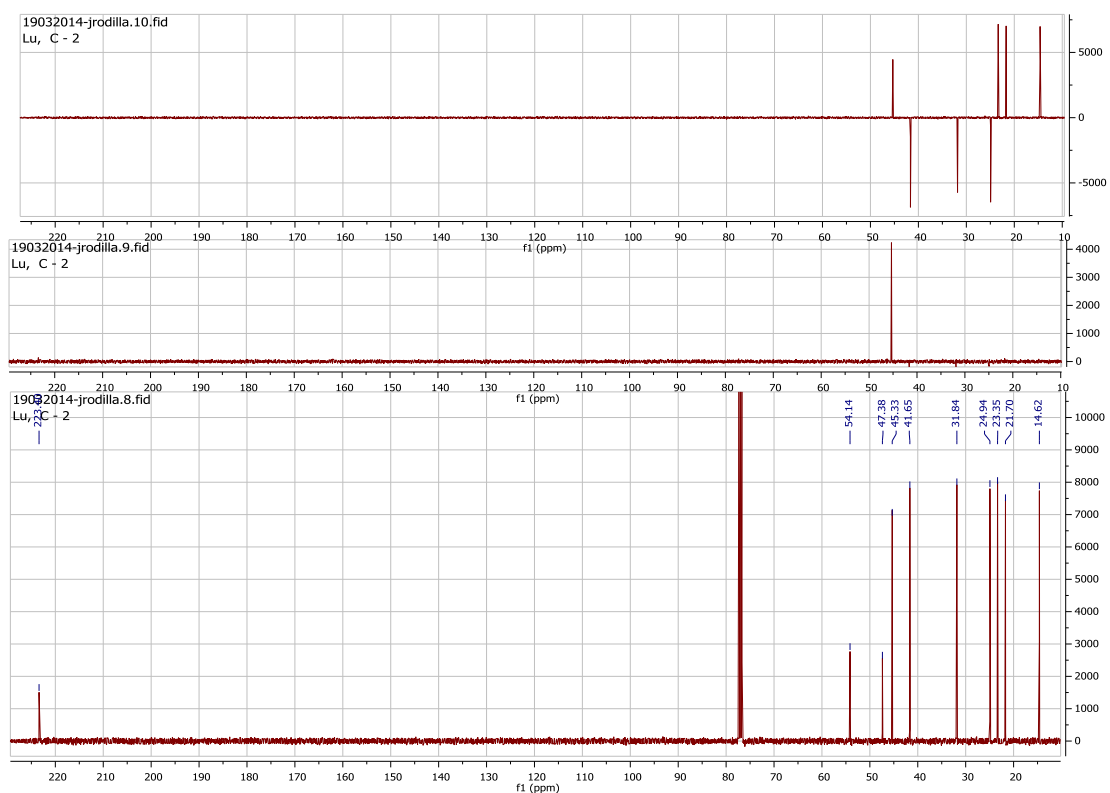


Figura 50 - Espetro de ^{13}C RMN da fençhona.

Caracterização química das sementes de *Foeniculum vulgare* Mill

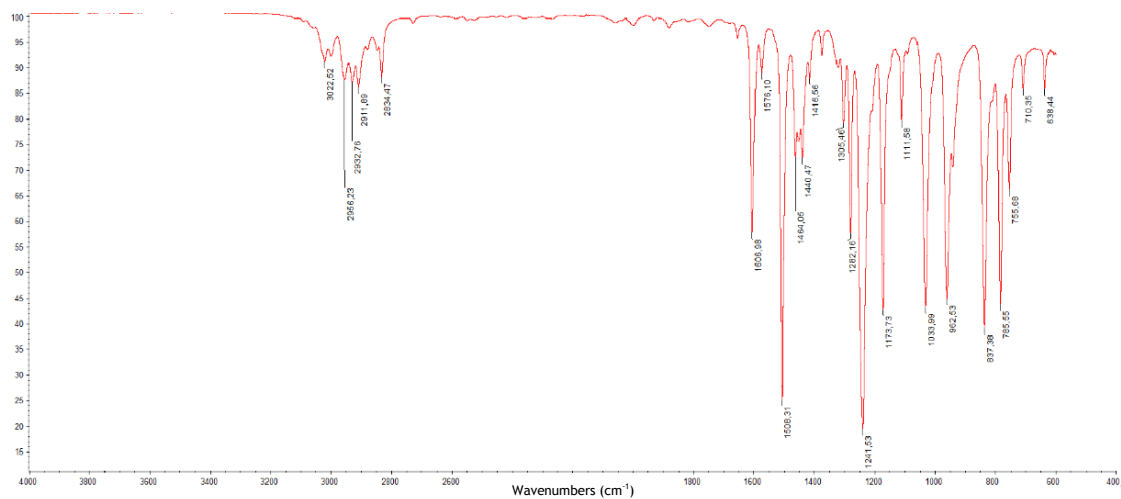


Figura 51 - Espectro de infravermelho para o *trans* - anetol.

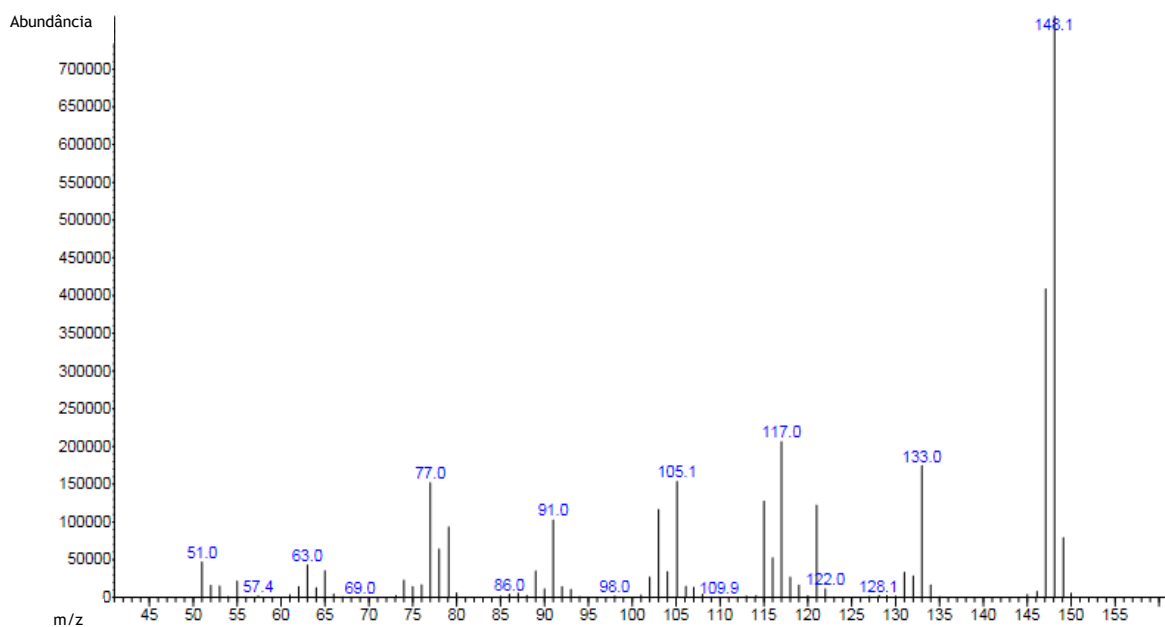


Figura 52 - Espectro de massa do *trans*-anetol.

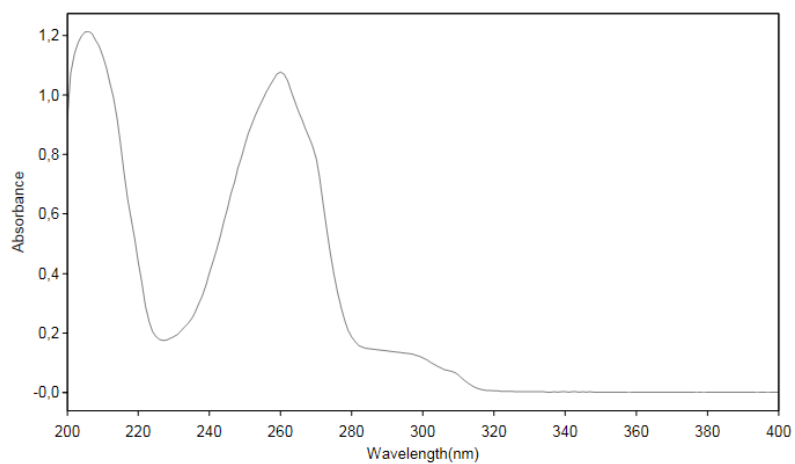


Figura 53 - Espectro do UV do *trans*-anetol.

Caracterização química das sementes de *Foeniculum vulgare* Mill

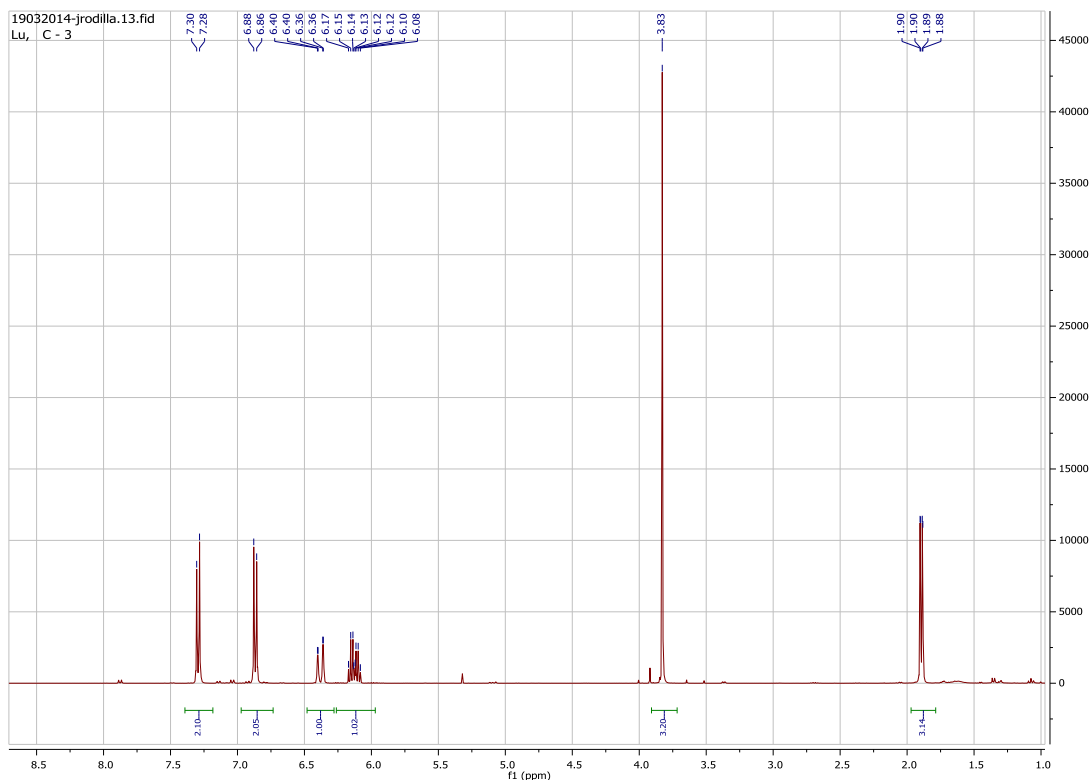


Figura 54 - Espectro de ^1H RMN do *trans*-anetol.

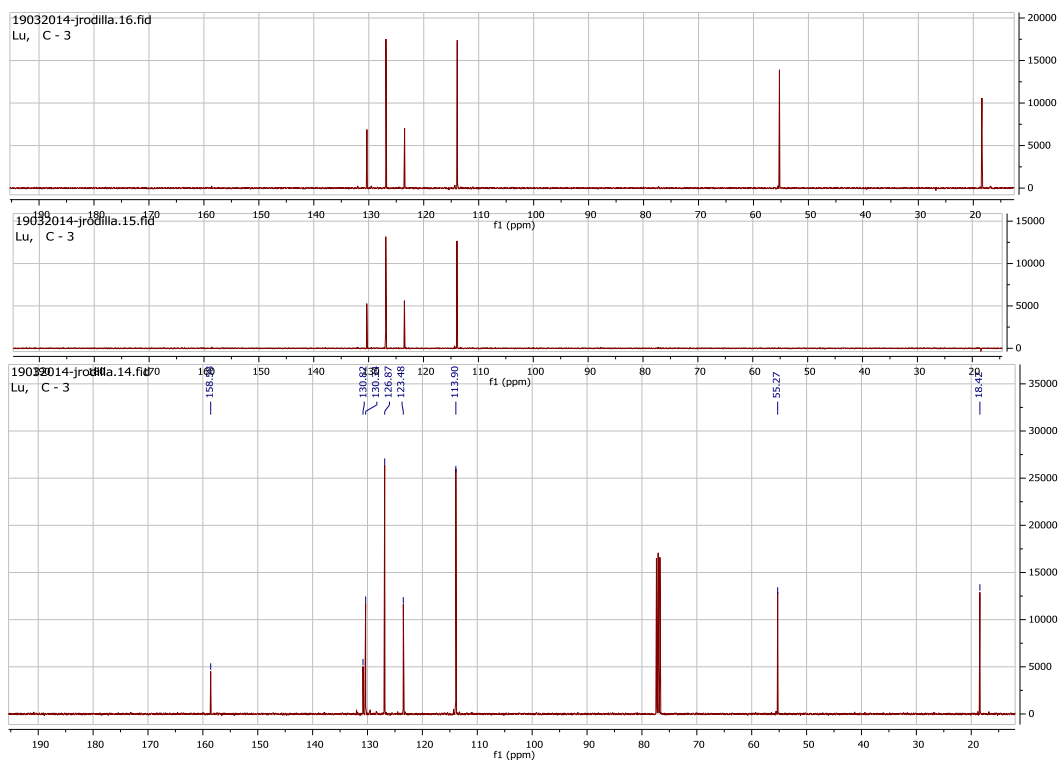


Figura 55 - Espectro de ^{13}C RMN do *trans*-anetol.

Wavenumbers (cm^{-1})

Caracterização química das sementes de *Foeniculum vulgare* Mill

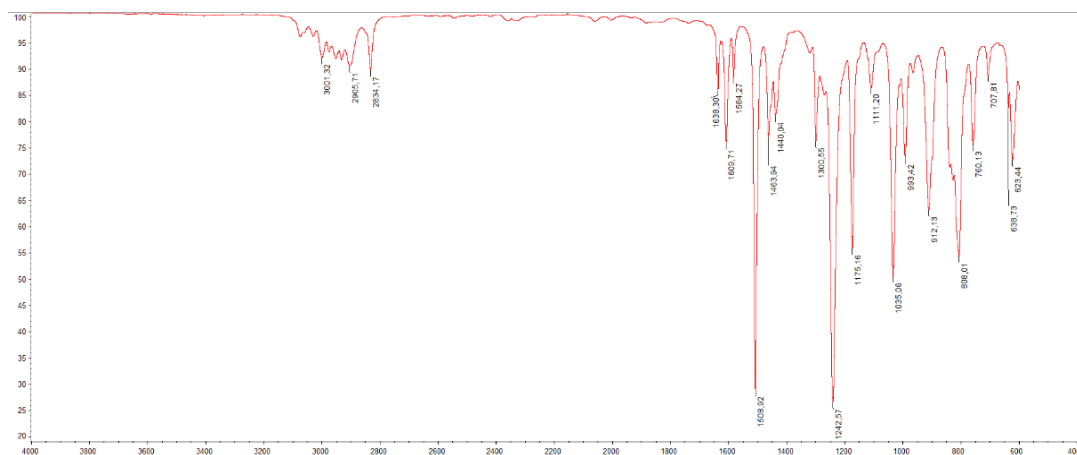


Figura 56 - Espectro de infravermelho do estragol.

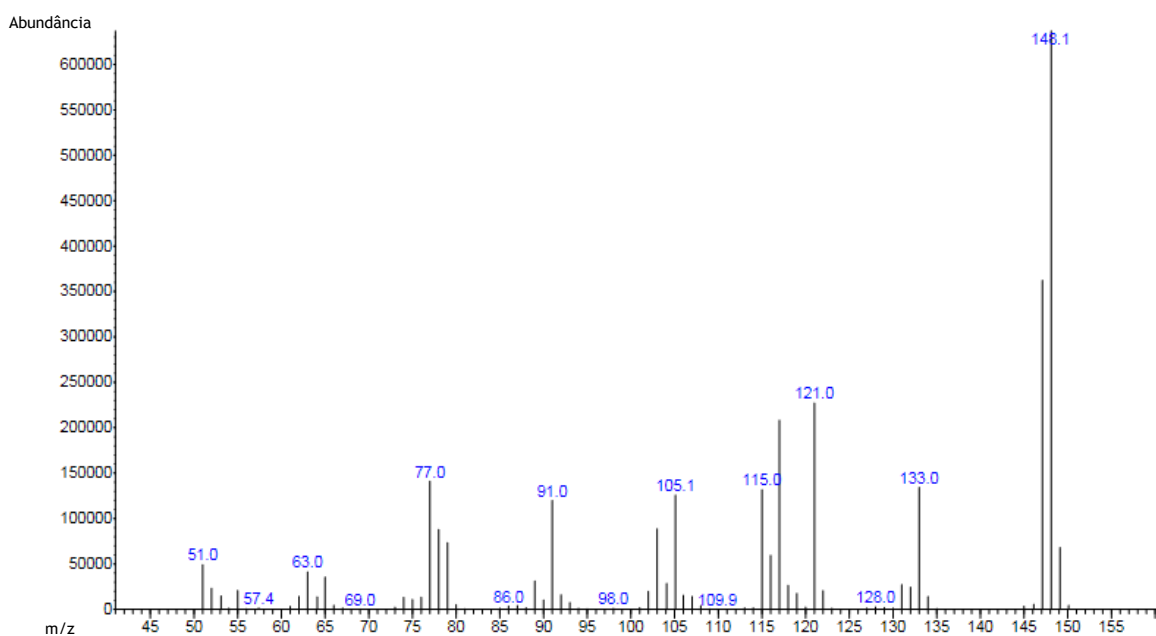


Figura 57 - Espectro de massa do estragol.

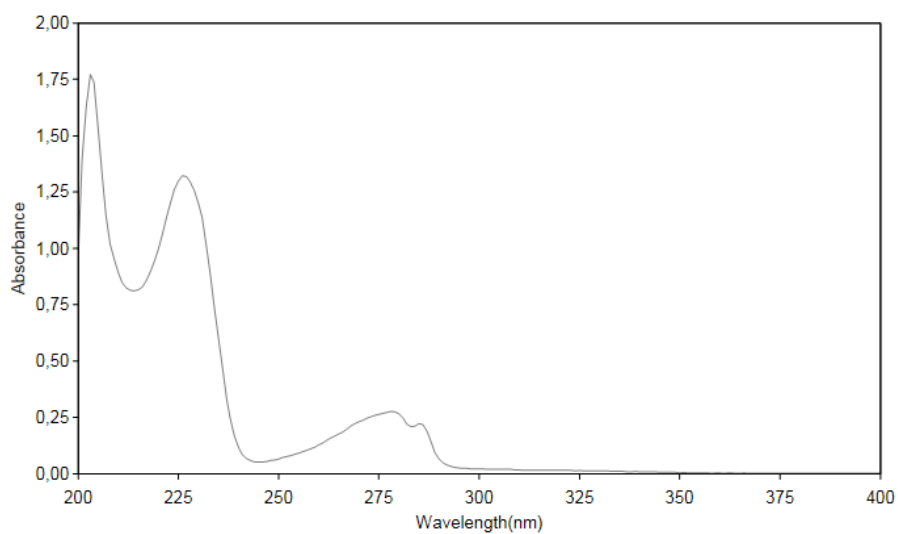


Figura 58 - Espectro de UV do estragol.

Caracterização química das sementes de *Foeniculum vulgare* Mill

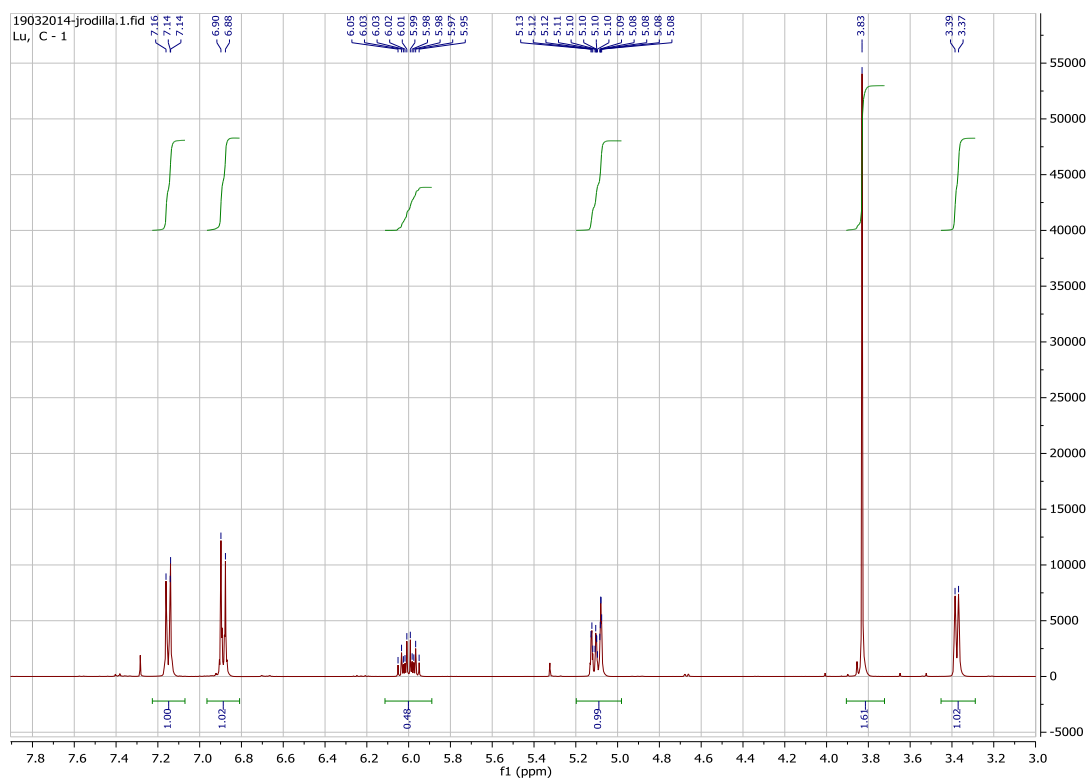


Figura 59 - Espetro de ^1H RMN do estragol.

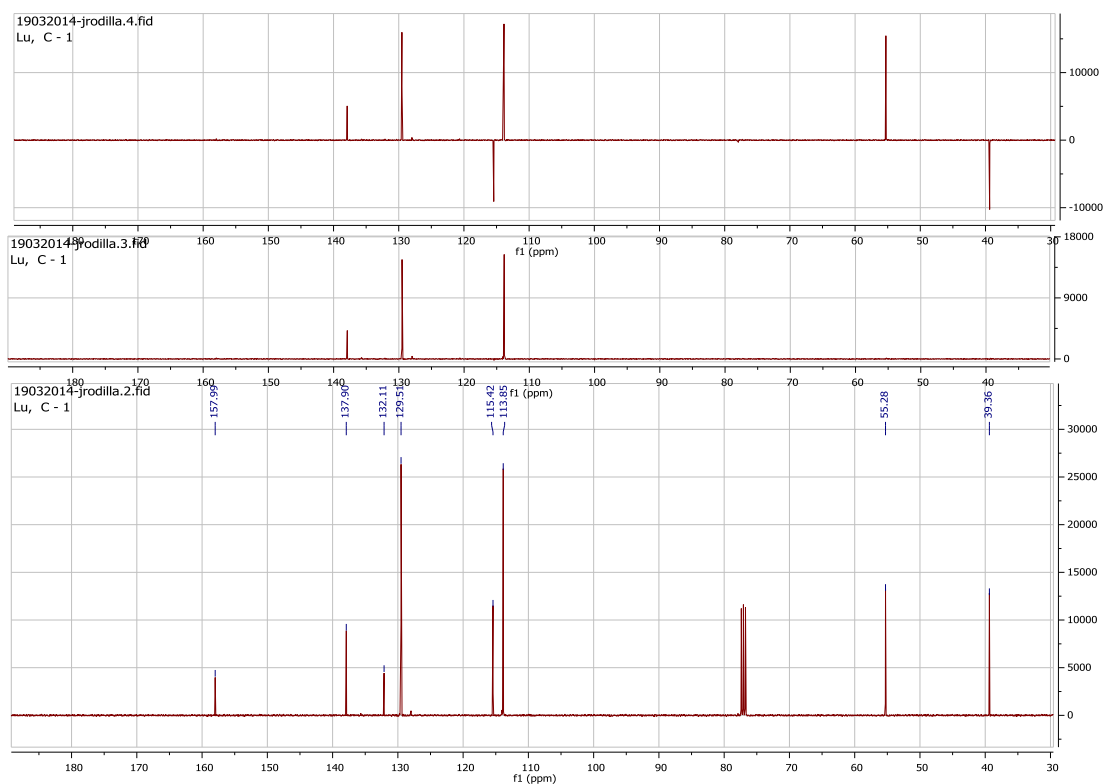


Figura 60 - Espetro de ^{13}C RMN do estragol.